

犬新星诺卡氏菌合并犬瘟病毒感染的病例报告

黄薇

(北京中农大动物医院检验中心)

前言:诺卡氏菌(*Nocardia* .sp)是一类能形成分支状纤细菌丝,不产生孢子,无运动力,专性需氧的革兰氏阳性细菌,人类医学上有报道称,诺卡氏菌会导致免疫抑制患者的侵袭性感染,伴侣动物临床却较为少见。本病例为国内首次报道一例临床罕见的犬瘟热病毒感染与新诺卡氏菌感染引起患犬颈部脓性肉芽肿的病例,该病例的临床表现突出,镜检人员通过宠物临床常规罗曼诺夫斯基染色起初并未识别该菌,经革兰氏染色涂片结果为革兰阳性、分枝状长杆菌,细菌的16S rRNA测序分析以及MODAL-TOF分析证实为新诺卡氏菌(*Nocardia nova*)。犬麻疹病毒(犬瘟热病毒)的免疫抑制作用可能有利于机会致病性微生物的感染,而诺卡菌病多发生于机体免疫受损及合并慢性基础疾病的人群,本文重点讨论了犬诺卡氏菌病的临床发病症状以及诊断方法,因为宠物和其主人之间的密切关系,可能会促进病原体(如诺卡氏菌)从宠物传播到人类,这构成了一个新的公共卫生问题。

1. 病例信息

犬,雄性,4月龄,因颈部突然出现一坚硬肿物(见图1)而就诊,动物主人刚饲养两周,一周前检查出犬瘟病毒感染,目前处于犬瘟治疗期间。肿物情况发展迅速。

2. 临床检查

2.1 体格检查

患犬精神沉郁,体况评分为3/5,被毛粗乱,颈部可见大小约为5×3cm的肿物,心率105次/分钟,呼吸65次/分钟,体表淋巴结未见增大。

2.2 B超检查

对肿物进行B超检查,可见颈部肿物大小为5.36×3.37cm,位于气管右侧,边界不清,内部呈网格样及产回声暗区,为囊实性(见图2),疑右侧下颌腺囊肿/脓肿。右侧咽后淋巴结轻度增大。

2.3 实验室检查

2.3.1 CDV 抗原胶体金试纸复检,呈阳性。

表1 血常规检查

项目	结果	参考范围(犬)
红细胞总数(RBC)	5.25	5.65-8.87 × 10 ¹² /L
红细胞压积(HCT)	32.4	37.3-61.7%
血红蛋白浓度(HGB)	10.4	13.1-20.5g/dL
网织红细胞(RETIC)	157	10.0-110.0K/μL
平均红细胞体积(MCV)	61.7	61.6-73.5fL
平均红细胞血红蛋白浓度(MCHC)	32.1	32.0-37.9g/dL
红细胞分布宽度(RDW)	18.3	13.6-21.7%
白细胞总数(WBC)	17.06	5.05-16.76 × 10 ⁹ /L
分叶中性粒细胞(SEG)	13.65	2.95-11.64 × 10 ⁹ /L
杆状中性粒细胞(BAND)	0	/
淋巴细胞(LYM)	0.34	1.05-5.10 × 10 ⁹ /L
单核细胞(MONO)	3.07	0.16-1.12 × 10 ⁹ /L
嗜酸性粒细胞(EOS)	0	0.06-1.23 × 10 ⁹ /L
嗜碱性粒细胞(BASO)	0	0.00-0.10 × 10 ⁹ /L
血小板(PLT)	459	148-484K/μL

小动物病例报告分享



图1 患犬颈部肿物

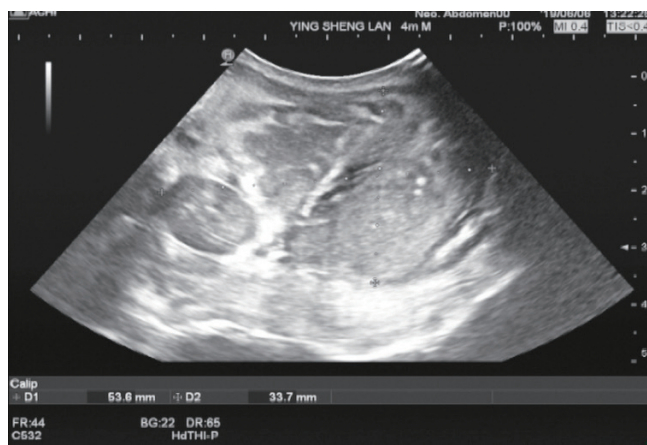


图2 气管右侧网格样及产回声暗区

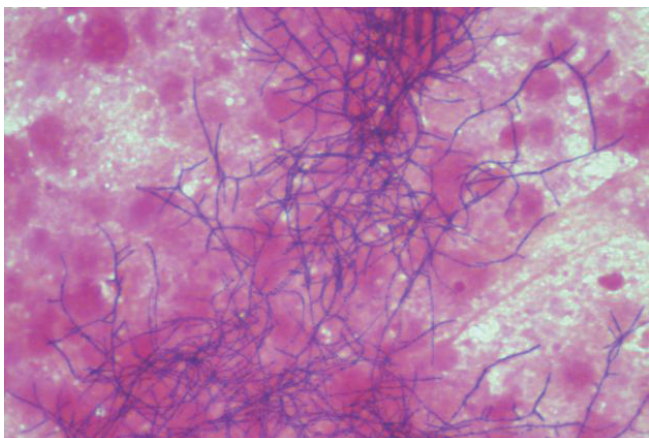


图3 可见背景有大量阳性分支丝状菌(革兰氏染色, 1000×)

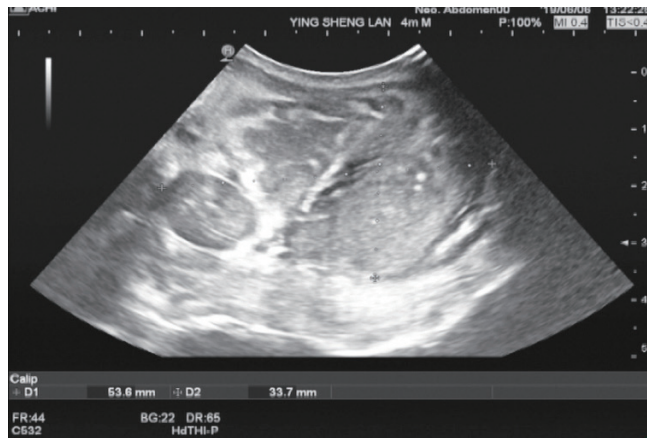


图4 37℃需氧培养48小时可见大量针尖状细菌菌落, 菌落亮白色粉末状

2.3.2 采用IDEXX ProCyte Dx全血细胞分析仪进行血常规检查, 结果(见表1)显示, 白细胞总数(WBC)、分叶中性粒细胞(SEG)、单核细胞(MONO)绝对数值增高, 淋巴细胞(LYM)和嗜酸性粒细胞(EOS)绝对数值降低, 提示急性炎症反应或应激反应。红细胞压积(HCT)轻度下降, 可能与患犬较年幼相关。

2.3.3 细胞学检查

通过细针抽吸肿物采集样本进行细胞学检查, 脱落细胞数量大, 主要为中性粒细胞, 占比约85%, 巨噬细胞约占15%, 背景可见少量多核巨细胞及成簇的上皮细胞、大量粉红色基质, 瑞氏姬姆萨染色可见未被着色的透明丝状菌, 进行革兰氏染色, 呈革兰氏阳性分叉的树枝状菌体(见图3), 怀疑诺卡氏菌。

2.3.4 细菌分离培养与药敏试验

对肿物进行引流, 取脓肿液接种于绵羊血琼脂平板

中, 37℃需氧条件培养48小时, 血琼脂培养基可见大量针尖状表面褶皱、干燥的白色圆形菌落生长(见图4)。

2.3.5 细菌菌种鉴定

(1) 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS) 鉴定

基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS) 鉴定结果为新诺卡氏菌(*Nocardia nova*), 分值为9.336。

(2) 16S rRNA 测序

从肿物穿刺液培养的血琼脂平板中挑取多个可疑菌落制成菌液, 使用北京世纪元亨动物防疫技术有限公司的柱式提取试剂盒进行核酸提取。合成16s rRNA基因的通用引物进行扩增, 上游引物为27F(5'→3'): AGAGTTTGATCMTGGCTCAG, 下游引物为1492R(5'→3'): CCGYTACCTTGTTACGACTT, 由北京擎科新业生物

技术有限公司合成。PCR扩增采用25 μL体系：Premix Taq (Takara) 12.5 μL，上下游引物(10 μmol/L)各1 μL，DNA模板2.5 μL，灭菌双蒸水补足至25 μL。PCR反应条件为：95℃预变性5min；95℃变性1min，57℃退火30s，72℃延伸1min，36个循环；72℃延伸10min。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定为单一特异性条带，送至北京擎科新业生物技术有限公司进行测序。所得序列使用NCBI的BLAST进行比对，根据GenBank中的参考序列使用MEGA6.0进行分子进化树的构建。PCR扩增得到大小为1352bp的产物，经测序和BLAST比对，产物序列与NCBI数据库中Nocardia nova ATCC 33726分离株(NR_117343.1)和JCM6044分离株(NR_041858.1)的16SrRNA基因序列相似度均为99.85%。结果证实，该患病动物肿物穿刺物中分离得到的菌株属于新诺卡氏菌。

3. 诊断

犬瘟热病毒感染与新诺卡氏菌合并感染导致颈部脓性肉芽肿。

4. 治疗方案

诊断初期即对患犬肿物进行引流，但因为宠物临床遇见诺卡氏菌感染的病例罕见，且药物获取渠道有限，故使用临床常规药物阿莫西林克拉维酸钾及外部抗生素(苄星氯唑西林)处理。

5. 预后与转归

就诊后第四天患犬死亡。

6. 讨论

本病例首次报道了一只患犬瘟病毒的幼犬合并新诺卡氏菌(Nocardia nova)的混合感染，对其进行了血液学、细胞学、微生物学、影像学、PCR测序等诊断，犬瘟病毒是一种免疫抑制性病毒，病原体在患犬身上混合感染的情况已经变得越来越普遍^[1,2]。最近有一篇文章描述了犬瘟患犬同时患马红球菌、刚地弓形虫三重感染^[1]，另一篇文章介绍了犬瘟患犬同时患星形诺卡氏菌(Nocardia asiatica)导致严重肺炎及胸腔积液的^[3]。强调

了免疫抑制对病原性感染的影响。

诺卡氏菌是一类能形成分支状纤细菌丝，不产生孢子，无运动力，专性需氧的革兰氏阳性细菌。广泛存在于土壤、淡水、海水和腐烂的植被中^[4]。它属于细菌界，放线菌门，放线菌纲，放线菌亚纲，放线菌目，棒状杆菌亚目，诺卡菌科，诺卡菌属^[5]。该属以Nocard命名，Nocard是一名兽医，他从牛Farcy(牛四肢远端的一种淋巴管炎)中分离出这样一种细菌^[6]。到目前为止，已确认92种，其中54种为临床输入型。尽管分类不同，但与犬猫临床疾病相关的主要种类是星形诺卡氏菌(N. asiatica)、巴西诺卡氏菌(N. brasiliensis)、豚鼠联诺卡氏菌(N. otitidiscaviarum)、横纹诺卡氏菌(N. transvalensis)、新星诺卡氏菌(N. nova)、皮疽诺卡氏菌(N. farcinica)和非洲诺卡氏菌(N. africana)^[4]。

新星诺卡氏菌(N. nova)生长速度一般较慢，可在血琼脂培养基、沙氏培养基(SDA)上生长。37℃条件，一般需要在血琼脂培养基上培养7天才能被肉眼所见，有时在培养的第4-5天就可以观察到生长，在SDA培养基上需培养10天才能生长^[7]，有很多实验室由于受到不合格标本、样本运输、培养时间、采集样本前使用抗生素、杂菌污染等限制，导致微生物培养假阴性。从另一个方面体现了细胞学检查、革兰氏染色等临床试验的重要性，随着饲养伴侣动物的数量激增，近年来新增不少动物医院，但是大部分动物医院的基础检查如显微镜检查，以及特殊染色并未获得足够的重视，因此很容易造成漏诊。本病例在最初的细胞学检查时，常规罗曼诺夫斯基染色该菌并未着色，也非常容易漏诊，可见制定严格检查流程规定的重要性。另一个值得注意的是，本病例的新星诺卡氏菌，在培养的第48小时即出现肉眼可见菌落，而后期转至SDA培养基上，37℃培养10天以上，却并未生长，可能与细菌本身特性有关，值得后续研究，最终经过细菌的16S rRNA测序分析以及MODAL-TOF分析证实为新诺卡氏菌。

本病例中，该犬的主要病变表现为下颌肿物，与文献中所描述一致，即犬诺卡氏菌病常见临床症状包括淋巴皮肤损害，如脓肿、结节、溃疡和蜂窝组织炎，尤其在颈部和面部。在复杂的病例中，它们通过血液淋巴系统迁移，影响到其他器官，如肺部和中枢神经系统^[8]。本病例中该犬就诊时呼吸系统症状表现并不明显，因此

并未对其进行胸部X线检查或气管灌洗。但巴西最新报道了一例3月龄混血雌犬，混合感染犬瘟病毒和星形诺卡氏菌(*N.asiatica*)，患犬出现明显的咳嗽、体温升高等典型的犬瘟症状，且出现了胸腔积液，该犬死后剖检发现患犬肺部质地坚硬，有脓性结节，革兰染色发现革兰氏阳性分支状杆菌，但微生物培养未见细菌生长，最终通过RT-PCR确诊星形诺卡氏菌(*N.asiatica*)^[3]。

迄今为止，包括星形诺卡氏菌(*N.asiatica*)在内的最有效的体外抗菌药物有阿米卡星、头孢噻唑钠、头孢曲松、庆大霉素、亚胺培南和磺胺甲恶唑/甲氧苄啶^[9]，由于实验室限制，未对该菌进行有效的肉汤稀释法检测需要使用的抗菌药物最小抑菌浓度，后续会持续研究。

人类医学上有报道称，诺卡氏菌会导致免疫抑制患者的侵袭性感染，特别是那些T细胞介导的免疫缺陷患者，如接受实体器官移植患者，长期服用皮质类固醇的患者，接受化疗的癌症患者，以及具有抗粒细胞巨噬细胞/单核细胞集落刺激因子(GM-CSF)自身抗体的患者。事实上，T淋巴细胞、巨噬细胞和中性粒细胞是诺卡氏菌免疫的基础。此外，20%的侵袭性诺卡氏菌病是在没有已知危险因素的情况下发生的。其中，诺卡氏菌病可提示原发性免疫缺陷疾病，特别是慢性肉芽肿性疾病(Cgd)或白细胞介素-2途径缺陷患者^[10]。随着免疫缺陷宿主数量的增加，人类疾病的流行率大幅上升。并且，同样的情况可能会发生在小动物临床。尽管有许多已报道的个别案例，但与人类患者可获得的数据相比，有关伴侣动物诺卡氏菌感染的信息有限，因此，我们强调伴侣动物诺卡氏菌病的重要性，由于非特异性临床症状或缺乏实验室进行分子诊断，这种疾病仍然被低估或未被注意到。分子技术的高度敏感性和特异性使其成为诺卡氏菌鉴定和分类的必要诊断方法，以及对病原菌的毒力和分子流行病学的了解，使对该病原体的早期诊断和控制措施成为可能。

越来越多的伴侣动物及其对主人身心健康的重要性已经得到了全球范围内的关注。然而，宠物与其主人之间的密切关系和直接接触可能有利于病原体(包括诺卡氏菌)从宠物向人类传播^[11]。这构成了一个新的公共卫生问题。

参考文献

- [1] Portilho, F.V.R., Paes, A.C., Megid, J., Hataka, A., Neto, R. T., Headley, S.A., Ribeiro, M.G. Rhodococcus equi VAPN type causing pneumonia in a dog coinfecting with canine morbillivirus (distemper virus) and Toxoplasma gondii. *Microbial Pathogenesis*, (2019) 129, 112–117.
- [2] Sykes, J.E. (2012). Actinomycosis and nocardiosis. In C.E. Greene (Ed.), *Infectious diseases of the dog and cat* (4th ed., p490–495).
- [3] Allyne Isabela Teixeira Ribeiro, Pyogranulomatous pleuropneumonia caused by *Nocardia asiatica* in a dog coinfecting with canine morbillivirus (canine distemper virus). *Vet Med Sci*. 2019;00:1–7.
- [4] Ribeiro, M.G. (2010). Nocardiosis. In: C.M. Kahn (Ed.), *The Merck veterinary manual*. 10th ed., p72–75.
- [5] 张媛等. 诺卡氏菌研究进展. *中国人兽共患病学报* [J]. 2012, 28(6).
- [6] R MALIK, MB KROCKENBERGER. *Nocardia* infections in cats: a retrospective multi-institutional study of 17 cases *Clinical Veterinary Microbiology, Australian Veterinary Journal* Volume 84, No 7, July 2006. 235–245.
- [7] Conville, P.S., Brown-Elliott, B.A., Smith, T., & Zelazny, A. M. (2018). The complexities of *Nocardia* taxonomy and identification. *Journal of Clinical Microbiology*, 56.
- [8] Zhao, P., Zhang, X., Du, P., Li, G., Li, L., & Li, Z. (2017). Susceptibility profiles of *Nocardia* spp. to antimicrobial and antituberculous agents detected by a microplate Alamar Blue assay. *Scientific Reports*, 7, 43660.
- [9] Lafont E, Marciano BE. Nocardiosis Associated with Primary Immunodeficiencies (Nocar-DIP): an International Retrospective Study and Literature Review 2020. *J Clin Immunol* 2020 Nov; 408(8).
- [10] Esch, K.J., & Petersen, C.A. (2013). Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. *Clinical Microbiology Reviews*, 26, 58–85.