

A case of malignant melanoma patient complicating pneumonia of *Legionella pneumophila* Sg 1 infection

ZHU Qing-yi¹, HU Chao-hui¹, QIU Yu-rong²

¹Guangzhou Kingmed Center for Clinical Laboratory, Guangzhou, China

²Nanfang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou, China

Received: May 04, 2014

Accepted: Jun 13, 2014

Published: Jul 10, 2014

DOI: 10.14725/gjcr.v1n1a407

URL: <http://dx.doi.org/10.14725/gjcr.v1n1a407>

This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Legionella pneumonia is mainly in community-acquired and nosocomial pneumonias caused by the *L. pneumophila*. The paper reported a case of *Legionella* pneumonia caused by *Legionella pneumophila* Sg1 in a man with malignant melanoma. The method for diagnosing *Legionella* pneumonia by standard culture method, serotyping, PCR-enzymatic digestion analysis and gene sequencing was elaborate. To confirm the diagnosis result of this rapid diagnostic method, sequencing of the bacteria in patient's sputum partial gene was also carried out. The diagnosis result of this rapid diagnostic method was consistent with the culture method which indicated that it was effective in diagnosing *L. pneumophila* infection.

Key words

Legionella pneumophila; Malignant melanoma, Pneumonia.

恶性黑色素瘤合并嗜肺军团菌感染性肺炎病例报告

朱庆义^{1*}, 胡朝晖¹, 裘玉容²

¹广州金域医学检验中心, 广东广州, 中国

²南方医科大学南方医院, 广东广州, 中国

通讯作者: 朱庆义, Email: zqy@kingmed.com.cn

【摘要】 军团菌肺炎主要是由嗜肺军团菌感染引起的一种社区获得性或医院内感染性肺炎。本文报告了 1 例临床上极为罕见的恶性黑色素瘤合并嗜肺军团菌血清 1 型感染引起的军团菌肺炎, 并对其实验室诊断作了系统描述, 包括病人痰液标本的细菌分离培养、血清学分型、PCR-酶切分型和基因测序鉴定等分子生物学诊断技术, 结果表明 PCR-酶切分型对于诊断军团菌病是一种快速、准确可靠的试验方法。

【关键词】 嗜肺军团菌; 恶性黑色素瘤; 肺炎

嗜肺军团菌是引起社区获得性和院内感染性肺炎的最常见的病原菌^[1]。军团菌属中约有 24 种与人类致病有关, 其中 80% 是由嗜肺军团菌引起的^[2]。从临床标本分离的军团菌属中最常见的是嗜肺军团菌 (85%), 长滩军团菌 (3.2%), 博兹曼军团菌 (2.4%), 麦氏军团菌、杜氏军团菌和菲氏军团菌 (2.2%)。长滩军团菌在澳大利亚感染者中最为常见^[3]。临床分离的军团菌种, 除了嗜肺军团菌, 至少有 20 军团菌种可引起人类致病, 但是发病率很低^[4,5]。

军团菌肺炎的临床特征各不相同, 早期的症状是发热、萎靡、肌痛、厌食、头痛、咳嗽等症状。重症军团菌肺炎发热可达 40℃, 出现昏迷, 并可发展成为多器官衰竭^[6], 并且常有肌酸激酶升高以及腹泻等军

军团菌特有的症状^[7]。军团菌病以往称其为“非典型肺炎”，临床表现和胸部 X-光线检查，可见肺两叶显示斑点状阴影^[8]。

细菌培养是诊断军团菌病的金标准，但其方法复杂，且费时。现有众多军团菌病的检测方法：包括尿抗原测定，直接免疫荧光抗体（DFA），PCR 基因测序分型和实时荧光-PCR^[1,9,10,11]。但是尿抗原测定只适用嗜肺军团菌血清 1 型，约有 40%军团菌病可能漏检^[12,13]，直接免疫荧光法（DFA）检测军团菌病敏感性低。因此，需要建立一种快速检测嗜肺军团菌和非嗜肺军团菌的试验方法。我们曾报告使用 PCR-酶切分型检测嗜肺军团菌和非军团菌种^[14]，具有简便、快速、敏感、特异之优点，可用于军团菌病的诊断。

1 病例报告

男性，51 岁，2009 年 2 月，第一次住院昆明医学院第一附属医院，病理切片诊断为恶性黑色素瘤（皮肤活检切片，图 1），这次住院对病人采用多烯紫杉醇和卡铂化疗 9 个月。2009 年 11 月 6 日，第二次入院南方医科大学附属南方医院。病人临床表现：疲乏、厌食、进行性淋巴结肿大和左侧胸腔积液。2 个月后常常出现咳血、胸闷、呼吸困难，体重减轻约 5kg，住院时体温 36.7℃，心律 88 次/min，血压 122/62 mm Hg，呼吸 18 次/min。体检：病人的皮肤和黏膜轻度黄染，淋巴结肿大 5cm×6cm，轻度发硬，浅表淋巴结没有肿大，其他体检发现左足根有 8cm 长手术后瘢痕，住院观察，常规血液化验有轻度白细胞减少，WBC $3.38 \times 10^9/L$ ，中性粒细胞 82%，淋巴细胞 13%，单核细胞 5%，血小板 $83 \times 10^9/L$ ，C-反应蛋白（CRP）增高 209mg/L。动脉血气（ABG）分析显示中度缺氧，由于换气过度出现呼吸性碱中毒，（PaO₂ 9.29kPa，P CO₂ 5.53kPa，pH 7.090，HCO₃ 12.00mmol/L，PO₂(A) 13.82kPa，血清 K⁺ 4.44mmol/L，Na⁺ 130.6mmol/L，Cl⁻ 96.4mmol/L，Ca²⁺ 2.18mmol/L，Mg²⁺ mmol/L），肝功能显示谷草转氨酶 95IU/L 和谷丙转氨酶 196IU/L，中度升高。血液生化试验，总蛋白 60.0g/L，白蛋白 30.9g/L，球蛋白 29.1g/L，葡萄糖 5.8mmol/L，总胆红素 88.9 μmol/L，直接胆红素 54.6 μmol/L，间接胆红素 34.3 μmol/L，总胆酸 163.9 μmol/L，前白蛋白 105mg/L，血尿素氮 7.7mmol/L，肌酐 68 μmol/L 和尿酸 617 μmol/L。心肌酶谱显示异常：乳清酸脱氢酶（LDH）44 03IU/L，羟丁酸脱氢酶（HBDH）2569IU/L，肌酸激酶（CK）70IU/L，肌酸激酶同工酶（CK-MB）42IU/L，谷草转氨酶（AST）95IU/L。其他血清酶谱变化：碱性磷酸酶 ALP 860IU/L，谷氨酰转移酶（γ-GT）1 242IU/L，胆碱酯酶（CHE）3.3U/mL，岩藻糖苷酶（AFU）31.2IU/L。胸部 X-光线照片显示多发性结节阴影，边缘模糊不清，双肺下叶密度均匀，可见肿瘤肺转移灶（图 2）。

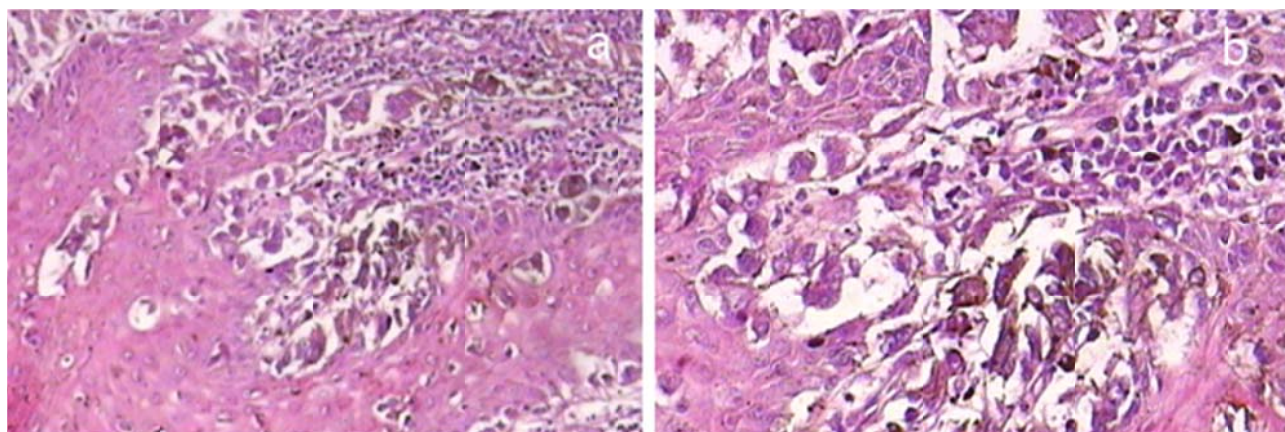


图 1 皮肤活检组织，上皮样癌细胞浸润，可见大量酸性核细胞，细胞内黑色素颗粒和大量淋巴细胞浸润

FIG1 Biopsy of skin tissue. Epithelioid tumor cell infiltrating the dermis, with a visible, large eosinophilic nucleolus and intracellular melanin granules with much lymphocytic infiltrating of the dermal stroma.

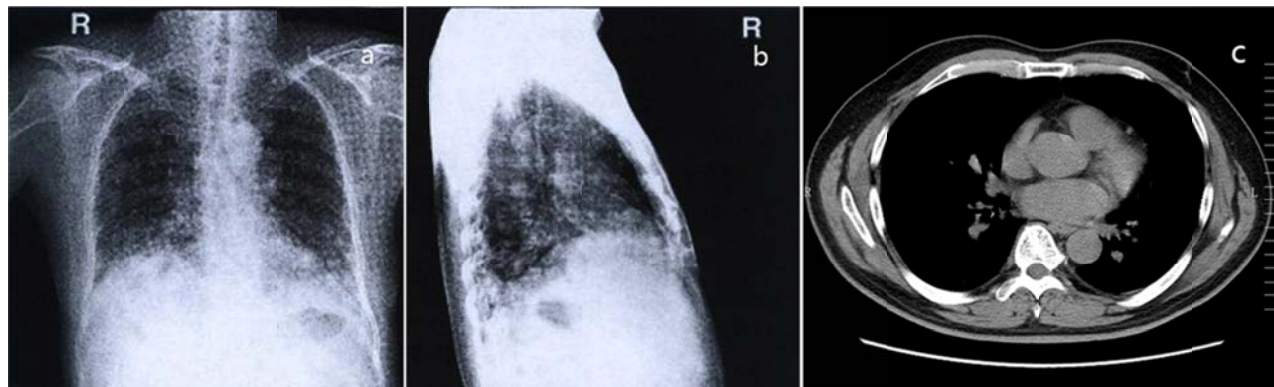


图 2 (a, b) 入院时胸部 X-光照相, 两侧肺下叶可见多发性结节状阴影, 边缘模糊, 密度均匀; (c) 胸部-CT, 在两肺下叶可见大量小颗粒状结节, 黑色素瘤病灶。

FIG2 (a, b) Chest radiograph on admission showing multiple nodules photocopying, edge blur, and uniform density of the double lung lower lobe. (c) Chest-CT additionally revealed multiple millet grain nodules in the double lower lung, which was regarded as the metastatic carcinoma focus .

2 材料与方法

2.1 细菌分离培养和生化试验 采集病人痰液标本接种 BCYE α -DGVPC 培养基, 置 5% CO₂ 孵育箱, 80% 湿度, 37°C 孵育, 每天观察结果, 至第 5d, 出现肉眼可见菌落, 挑取疑似菌落接种 BCYE α 琼脂和血琼脂平板, 在 BCYE α 琼脂生长, 血琼脂不生长, 初步判断为军团菌属细菌。做生化试验: 包括硝酸盐还原, 脲素酶, 葡萄糖发酵, 触酶, 马尿酸水解和明胶液化试验。

2.2 血清凝集试验 采用日本生研株式会社嗜肺军团菌血清 1 型、2 型、3 型、4 型、5 型、6 型乳胶凝集试剂盒, 英国 Microgen 军团菌乳胶凝集试剂盒 (包括嗜肺军团菌血清 1 型单价血清、2~15 型多价血清、军团菌种多价血清), 按说明书进行操作。

2.3 PCR-酶切分型鉴定军团菌种 采用本实验室常规试验方法^[14], 嗜肺军团菌在 226bp 位点有一特异性 HpyCH₄III 核酸内切酶位点, 被酶切为 180bp 和 46bp 两个片段; 非嗜肺军团菌中菲氏军团菌、昆氏军团菌、伯明翰军团菌、布吕诺军团菌、圣灵军团菌、多纳尔特军团菌和兰辛军团菌等 7 种被酶切为 153bp 和 73bp 两个片段, 其他非嗜肺军团菌不被酶切仍为 226bp 片段。

2.4 基因测序鉴定 对病人痰液分离军团菌株(km1108)和痰液标本 226bp 扩增阳性标本作基因测序鉴定, 根据军团菌 16SrRNA 和 mip 基因序列设计引物, 进行 PCR 扩增, 对扩增产物做基因测序鉴定, 根据 Gen Bank 数据库 BLAST 做序列分析, 判定测序结果^[9]。

3 结果

3.1 细菌培养和生化试验 分离菌株 km1108 在 BCYE α 琼脂平板生长, 血琼脂平板不生长, 初步鉴定为军团菌种; 生化试验: 硝酸盐还原 (-), 脲素酶 (-), 葡萄糖发酵 (-), 触酶 (+), 马尿酸水解 (+), 明胶液化 (+), 结果表明属于嗜肺军团菌。

3.2 血清凝集试验 分离菌株 km-1108 玻, 做片凝集试验, 与日本生研株式会社嗜肺军团菌血清 1 型以及英国 Microgen 军团菌乳胶凝集试剂嗜肺军团菌血清 1 型均为凝集, 证明分离菌株 km-1108 为嗜肺军团菌血清 1 型。

3.3 PCR-酶切分型鉴定 分离菌株 km-1108 和病人痰液标本直接进行 PCR 试验, 均产生 226bp 扩增片段阳性 (图 3a 和 3b), 经 HpyCH₄III 核酸内切酶鉴定, 被酶切成 180bp 和 46bp 两个片段, 同样证明为嗜肺军团菌血清 1 型 (见图 3c 和 3d)。

3.4 基因测序 痰液标本和 km-1108 菌株扩增产物经 16SrRNA 和 mip 基因测序鉴定,结果与嗜肺军团菌(*L. pneumophila* gb/AFO22332.1) 一致, 证明为嗜肺军团菌血清型 1 型, 见表 1。

表 1 病人痰液标本和分离细菌 km1108 菌株 16SrRNA 和 mip 基因测序结果

table 1. Results of partial 16S rRNA and mip gene sequencing for patient sputum samples and km 1108 isolate

Gene	Species or sample tested	Gene sequence
16S rRNA	<i>L. pneumophila</i> gb CP001828.1	AGGGTTGATA TAGCTGTTGG (bases 451 to 837)
	Sputum km 1108	AGGGTTGATA TAGCTGTTGG (bases 451 to 837)
		AGGGTTGATA TAGCTGTTGG (bases 451 to 837)
Mip	<i>L. pneumophila</i> gb AF022332.1 AF022332	CTGCAGCTGT.....G ^aG ^bT ^cC ^d GGCCACGTA(bases 4 to 609)
	km 1108	CTGCAGCTGT.....A ^aA ^bC ^cA ^dGGCCACGTA(bases 4 to 609)

注: ^abases 212, ^bbases 260, ^cbases 437, ^dbases 554.

4 讨论

该病例临床表现有轻度白细胞降低和贫血, CRP 显著增高, 胸部 X-光线片可见多发性结节状阴影, 边缘模糊, 双肺下叶密度均匀。胸部 CT 检测在双肺下方可见多发性米粒状肿瘤转移灶。军团菌病根据其临床表现和胸部 X-光线片检查, 以往称其为“非典型肺炎”。嗜肺军团菌感染性肺炎有 3/4 病人可见胸部 X-光线片明显异常, 存在斑片状肺部浸润, 罕见有空泡形成^[15]。

支气管肺泡灌洗液 (BLA) 和痰液标本细菌培养是军团菌病诊断的“金标准”, 但所需时间长 (4~10 d) 不利于临床诊断。军团菌尿抗原只适用于嗜肺军团菌血清 1 型血清学检测^[16]。PCR 用于诊断军团菌病弥补了细菌培养和尿抗原试验的不足, 具有快速和检测各种不同的军团菌种。PCR 检测法常用 16S 和 5SrRNA 以及 mip 基因片段作为军团菌种特异性靶基因片段, 用于临床呼吸道标本检测, 能够快速鉴定军团菌种^[17, 18]。

据多数报告, 认为感染非军团菌种, 在免疫力低下病人中发病率比免疫功能活性好的发病率高^[19]。长滩军团菌感染引起的社区获得性军团菌病, 病人的免疫力活性并没有降低^[20]。在全球范围内与嗜肺军团菌和非嗜肺军团菌感染相关的病例报告, 有如心包心肌炎^[21], 社区获得性肺脓肿^[22], 军团菌感染性心内膜炎^[23], 风湿性关节炎^[24], 慢性淋巴细胞性白血病^[25, 26, 27], 心肌炎^[28], 癌症^[29], 侵袭性曲霉菌病^[30]等。然而, 有关恶性黑色素瘤合并嗜肺军团菌血清 1 型感染的军团菌肺炎, 尚未见有报道。在此研究中, 我们使用军团菌培养法金标准和 PCR-酶切分型两步法检测病人痰液标本中嗜肺军团菌和非嗜肺军团菌, PCR 法 4h, 细菌培养 7d, 确定诊断该病例是恶性黑色素瘤合并嗜肺军团菌血清型 1 型感染性肺炎。结果表明, PCR 酶切分型检测病人痰液标本中嗜肺军团菌和非嗜肺军团菌, 与细菌分离培养, 基因测序结果是一致的, 说明这是一种快速, 简便, 准确, 可靠的病原学诊断方法。

注: 该论文已以英文的形式发表在 African Journal of Microbiology Research 7 卷 19 期。

【参考文献】

- [1] Fields BS, Benson RF, Besser RE. Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. Clin. Microbiol. Rev. 2002, 15: 506-526.
<http://dx.doi.org/10.1128/CMR.15.3.506-526.2002>
- [2] Girard LP, Gregor DB. Community-acquired lung abscess caused by Legionella micdadei in a myeloma patient receiving thalidomide treatment [J]. Clin Microbiol. 2007, 45: 3135-3137.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02321-06>
- [3] Kämpfers P, Tiede A, Kirschner P, Girke [J], Ganser A, Peest D. Legionnaires' disease in immunocompromised patients: a case report of Legionella longbeachae pneumonia and review of the literature. J. Med. Microbiol. 2008, 57: 384-387.
<http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.47556-0>

- [4] Newton HJ,Ang DK,van Driel IR,Hartland EL.Molecular Pathogenesis of Infections Caused by Legionella pneumophila. Clin.Microbiol.Rev.2010,23:274-298.
- [5] Burke PT,Shah R,Thabolingam R,and Saba S.Suspected Legionella-induced perimyocarditis in an adult in the absence of pneumonia:a rare clinical entity.Tex.Heart I[J].2009,36:601-603.
<http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00052-09>
- [6] Sopena N,Sabrià-Leal M,Pedro-Bote ML,Padilla E, Dominguez[J],Morera[J],and Tudela P.Comparative Study of the Clinical Presentation of Legionella Pneumonia and Other Community-Acquired Pneumonias.Chest,1998,113:1195-1200.
<http://dx.doi.org/10.1378/chest.113.5.1195>
- [7] Stout JE.and Yu VL.Legionellosis.New Engl[J].Med.1997,337:682-687.
- [8] Winn WC.Legionnaire's disease:historical perspective.Clin.Microbiol. Rev.1988,1:60-81.
- [9] Cloud JL,Carroll KC,Pixton P,Erali M,and Hillyard DR.Detection of Legionella Species in Respiratory Specimens Using PCR with Sequencing Confirmation[J].Clin.Microbiol.2000,38:1709-1712.
- [10] Massey R,Kumar P,and Pepper JR.Innocent victim of a localized outbreak:legionella endocarditis.Heart.2003,89:16.
<http://dx.doi.org/10.1136/heart.89.5.e16>
- [11] Thacker WL,Dyke JW,Benson RF,Havlichek DH, Robinson-Dunn B,Stiefel H, Schneider W,Moss CW,Mayberry WR,and Brenner D[J].Legionella lansingensis sp.nov.isolated from a patient with pneumonia and underlying chronic lymphocytic leukemia[J].Clin.Microbiol.319920:2398-401.
- [12] Fields BS,Benson RF,and Besser RE.Legionella and Legionnaires'disease:25 years of investigation.Clin.Microbiol.Rev.2002,15:506-526.
<http://dx.doi.org/10.1128/CMR.15.3.506-526.2002>
- [13] Muder RR,and Yu VL.Infection Due to Legionella Species Other Than L.pneumophila.Clin.Infect.Dis.2002,35:990-998.
<http://dx.doi.org/10.1086/342884>
- [14] Zhan XY,Li LQ,Hu CH, Zhu QY.Two-Step Scheme for Rapid Identification and Differentiation of Legionella pneumophila and Non-Legionella pneumophila Species[J].Clin. Microbiol. 2010,48:433-439
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01778-09>
- [15] Tan MJ,Tan JS,Hamor RH,File TM,and R.F.Breiman.The radiologic manifestations of Legionnaire's disease.Chest;2000,117:398.
<http://dx.doi.org/10.1378/chest.117.2.398>
- [16] Roig J,Rello[J],and Yu V L,Legionnaires'disease:a guide to diagnosis and therapy[J].Respir.Dis.2002,23:229-234.
- [17] Stølhaug A and K.Bergh.Identification and Differentiation of Legionella pneumophila and Legionella spp.with Real-Time PCR Targeting the 16S rRNA Gene and Species Identification by mip Sequencing.Appl.Environ.Microb.2006,72: 6394-6398.
<http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02839-05>
- [18] Wilson DA,Reischl U,Hall GS,and Procop GW.Use of Partial 16S rRNA Gene Sequencing for Identification of Legionella pneumophila and Non-pneumophila Legionella spp[J].Clin.Microbiol.2007,45:257-258.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01552-06>
- [19] McClelland MR,Vaszar LT,and Kagawa FT.Pneumonia and osteomyelitis due to Legionella longbeachae in a woman with systemic lupus erythematosus.Clin.Infect.Dis.2004,38:102-106.
<http://dx.doi.org/10.1086/386322>
- [20] Diederer BM,van Zwet AA,van der Zee A,and Peeters MF.Community-acquired pneumonia caused by Legionella longbeachae in an immunocompetent patient.Eur[J].Clin.Microbiol.2005,24:545-548.
- [21] Burke PT,Shah R,Thabolingam R,and Saba S.Suspected Legionella-induced perimyocarditis in an adult in the absence of pneumonia:a rare clinical entity.Tex.Heart I[J].2009,36:601-603.
- [22] Girard LP,and Gregson.Community-acquired lung abscess caused by Legionella micdadei in a myeloma patient receiving thalidomide treatment[J].Clin.Microbiol.2007,45:3135-3137.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02321-06>
- [23] Massey R,Kumar P,and Pepper JR.Innocent victim of a localized outbreak:legionella endocarditis.Heart.2003,89:16.
<http://dx.doi.org/10.1136/heart.89.5.e16>
- [24] Chang CC,Chung CL,Huang CL,and Wang FC.Legionnaires'disease in a patient with rheumatoid arthritis[J].Microbiol. Immunol.Infect.Mar,2001,34:76-78.
- [25] Hendrick A.Fatal legionella pneumonia after fludarabine treatment in chronic lymphocytic leukemia[J].Clin.Pathol.2001,54:412-413.
<http://dx.doi.org/10.1136/jcp.54.5.412-b>

- [26] Siegel MO, Fedorko DP, Drake SK, Calhoun LB, and Holland SM. Legionella feeleii Serotype 2 Pneumonia in a Man with Chronic Lymphocytic Leukemia: a Challenging Diagnosis [J]. Clin. Microbiol. 2010, 48: 2294–2297.
<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00176-10>
- [27] Thacker WL, Dyke JW, Benson RF, Havlichek J, r DH, Robinson-Dunn B, Stiefel H, Schneider W, Moss CW, Mayberry WR, and Brenner DJ. Legionella lansingensis sp. nov. isolated from a patient with pneumonia and underlying chronic lymphocytic leukemia [J]. Clin. Microbiol. 1992, 30: 2398–401.
- [28] Armengol S, Domingo C, and Mesalles E. Myocarditis: a rare complication during Legionella infection. Int [J]. Cardiol. 1992, 37: 418–420.
- [29] Jacobson KL, Miceli MH, Tarrand [J], and Kontoyiannis DP. Legionella pneumonia in cancer patients. Medicine 2008, 87: 152–159.
<http://dx.doi.org/10.1097/MD.0b013e3181779b53>
- [30] Saijo T, Izumikawa K, Takazono T, Kosai K, Kurihara S, Nakamura S, Imamura Y, Miyazaki T, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Fukushima K, and Kohno S. A case of Legionella pneumophila pneumonia followed by invasive aspergillosis. Jpn [J]. Infect. Dis. 2008, 61: 379–381.