

艾滋病患者深部真菌感染菌群分布及其耐药性

张嗣兴, 寇建琼, 李惠琴, 李佳佳, 冯 菊, 劳云飞, 楼金成

(云南省传染病专科医院/艾滋病关爱中心, 云南 昆明 650301)

[摘要] **目的** 探讨医院住院艾滋病患者深部真菌感染的病原菌特性及其对常用抗真菌药物的敏感度, 为临床治疗选用药物提供参考依据。**方法** 采用 Bact /ALERT 3D120 血培养仪进行真菌培养和检测。根据菌落生长特征, 用 YBC 鉴定卡进行菌种的鉴定与分析; ATB FUNGUS 3 试条进行真菌临床敏感性测定。**结果** 从 2 868 份不同标本中培养分离出 208 株深部真菌, 不同阳性标本分离菌株构成比依次为: 痰 34.13%(71 株), 脑脊液 27.40%(57 株), 血 12.50%(26 株), 粪 10.10%(21 株), 骨髓 7.21%(15 株), 尿 4.81%(10 株), 其他部位标本 3.85%(8 株)。14 例危重患者在多部位分离出 2~3 种不同种类真菌。208 株真菌中, 构成比居前 5 位者分别为: 新生隐球菌 34.13%(71 株), 白假丝酵母菌 33.65%(70 株), 马内菲青霉菌 14.90%(31 株), 光滑假丝酵母菌 5.77%(12 株), 热带假丝酵母菌 3.85%(8 株)。新生隐球菌、白假丝酵母菌对两性霉素 B 及 5 氟胞嘧啶非常敏感(敏感率 90.63%~100.00%); 白假丝酵母菌、光滑假丝酵母菌及热带假丝酵母菌对氟康唑与伏立康唑显示 45.45%~57.82% 的耐药。马内菲青霉菌对两性霉素 B 及伊曲康唑敏感, 敏感率分别为 95.80%、84.10%。**结论** 艾滋病患者深部真菌感染病原菌较正常人群分布特殊, 加强艾滋病患者不同部位病原标本的送检及监测, 对临床合理使用抗真菌药物, 减少耐药真菌的产生有特别意义。

[关键词] 艾滋病; 真菌感染; 抗药性; 微生物; 医院感染; 抗真菌药物

[中图分类号] R512.91 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2011)05-0351-04

Species and drug-resistance of fungi causing deep infections in AID patients

ZHANG Si-xing, KOU Jian-qiong, LI Hui-qin, LI Jia-jia, FENG Ju, LAO Yun-fei, LOU Jin-cheng (Yunnan Provincial Hospital of Infectious Diseases/Yunnan AIDS Care Center, Kunming 650301, China)

[Abstract] **Objective** To explore the characteristics and drug sensitivity of fungi causing deep fungal infections in AIDS patients, so as to provide evidence for clinical choice of drugs. **Methods** Fungi were cultured and tested by Bact /ALERT 3D120 blood culture system, and were identified and analyzed by Yeast Biochemical Card (YBC card) according the colony growth characteristics; sensitivity of fungi to antifungal drugs were detected by ATB FUNGUS 3 strip. **Results** Two hundred and eight fungal strains were isolated from 2 868 different specimens, the constituent ratios of fungi-positive specimens were as follows: sputum 34.13% (71 isolates), cerebrospinal fluid 27.40% (57 isolates), blood 12.50% (26 isolates), excrement 10.10% (21 isolates), bone marrow 7.21% (15 isolates), urine 4.81% (10 isolates), and the other sites 3.85% (8 isolates). Fourteen critically ill patients were isolated 2-3 different strains from multiple sites. Among all isolates, the top five constituent ratios were *Cryptococcus neoformans* 34.13% (71 isolates), *Candida albicans* 33.65% (70 isolates), *Penicillium marneffei* 14.90% (31 isolates), *Candida glabrata* 5.77% (12 isolates), and *Candida tropicalis* 3.85% (8 isolates). *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* were highly sensitive to amphotericin B and 5-fluorocytosin (sensitive rate was 90.63% - 100.00%); 45.45% - 57.82% of *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida tropicalis* were resistant to fluconazole and voriconazole. *Penicillium marneffei* was sensitive to amphotericin B and itraconazole, sensitive rate was 95.80% and 84.11% respectively. **Conclusion** Deep fungal infection is specially distributed among AIDS patients. In order to use anti-fungal drugs rationally and reduce the emergence of resistant strains, it is important to

[收稿日期] 2010-10-08

[基金项目] 十一五科技重大专项“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”(2008ZX10001-008)

[作者简介] 张嗣兴(1963-), 男(汉族), 广东省梅州市人, 副主任医师, 主要从事艾滋病医院感染控制研究。

[通讯作者] 张嗣兴 E-mail: kmzhangsx@163.com

strengthen the detection and surveillance of pathogens from samples at different sites of AIDS patients.

[Key words] acquired immunodeficiency syndrome; fungal infection; drug resistance, microbial; nosocomial infection; antifungal agent

[Chin Infect Control, 2011, 10(5): 351 - 353, 356]

艾滋病是人免疫缺陷病毒(HIV)引起的慢性致死性疾病,主要造成人体的免疫功能缺陷。当人体的免疫功能下降时,原本定植在人体中的一些非致病菌可能造成感染,笔者对本院收治的艾滋病患者真菌感染现状及病原真菌的耐药性进行分析,旨在为临床及时诊断疾病和经验用药提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 标本来源 本院 2009 年 8 月—2010 年 9 月住院患者送检的 2 868 份各类标本,包括血、尿、粪、痰、骨髓、咽拭子、脓液、分泌物、胸腔积液、腹腔积液和脑脊液等,其中分离并经鉴定的致病真菌共计 208 株(剔除同一患者相同部位先后分离的重复菌株)。

1.2 仪器与试剂 Bact /ALERT 3D120 全自动血培养仪及专用需氧血培养瓶、厌氧培养瓶; VITEK232 全自动微生物分析系统及配套试剂, VITEK232 专用细菌鉴定卡,包括 GNI、GPI、YBC; 沙氏培养基、厌氧培养盒、厌氧菌分离斯氏培养基均为法国生物梅里埃公司产品;血平板为贝瑞特郑州生物公司提供,有效期内使用。

1.3 微生物培养、鉴定及药敏试验

1.3.1 微生物培养 采用 Bact /ALERT 3D120 血培养仪进行震荡培养和自动检测,即利用细菌生长产生的代谢产物 CO₂ 被感应器内的荧光物质吸收后激发出荧光,仪器每 10 分钟读一次血培养瓶的荧光值,自动进行计算并分析荧光值,记录生长曲线。当荧光值增高与所产生的 CO₂ 量成正比时,仪器报警“阳性”。仪器的温度设置为(35 ± 1)℃。血液、胸腹腔积液标本阴性报警时限设定 7 d,脑脊液、骨髓标本阴性报警时限设定 14 d。发现生长可疑或仪器阳性报警后及时转种血平板和沙氏培养基,35℃进行需氧和厌氧培养、分离菌株,沙氏平板分别置于 25℃和 35℃分离培养。到所设定期限,阴性者转种血平板 35℃培养 2 d,无细菌生长报告阴性。

1.3.2 微生物鉴定 根据血平板上生长的菌落特征、培养特性、革兰染色及镜下形态,假丝酵母样菌以 YBC 鉴定卡,采用 VITEK232 进行菌种鉴定。

丝状真菌,用沙氏培养基分离培养,再做小培养,之后根据菌落特征、培养特性、革兰染色及镜下形态进行鉴定。

1.3.3 药敏试验 采用 ATB FUNGUS 3 试条,包括 16 对杯状凹 cupules 进行药敏试验。第 1 对不含任何抗真菌药物,用作阳性生长对照;另外 15 对包含不同稀释度的 5 种抗真菌药物,分别是两性霉素 B(AMB)、氟康唑(FCA)、伊曲康唑(ITR)、伏立康唑(VRC)、5 氟胞嘧啶(5FC),用于测定最低抑菌浓度(MIC)和/或区分临床敏感性。将准备好的待测酵母样真菌的悬浮液转移至培养基中,并接种到试条上。孵育后,应用 ATB 仪器判读杯状凹中液体的生长情况,获得 MIC,并输入 WHONET 5.3 软件。

1.4 统计方法 培养结果的录入、保存、统计以及微生物报告的发放,均用 WHONET 5.3 完成。培养分离率以患者计算,同一患者重复菌株仅以 1 株计算,同一患者不同标本种类另外计算。分离率的比较,采用 χ^2 检验。

1.5 质量控制 所用的培养基、染液、试剂等,均用标准菌株 ATCC 25922、ATCC 25923、ATCC 27853 每周进行质量控制。

2 结果

2.1 不同标本深部真菌的检出率 2 868 份不同标本的真菌分离阳性率为 7.25%,分离率较高者依次为痰、脑脊液、血、粪、骨髓及尿标本,见表 1。

表 1 不同标本真菌培养阳性情况

Table 1 Positive result of fungal culture of different samples

Samples	No. of samples	No. of positive samples	Positive rate(%)
Sputum	1 450	71	4.90
Cerebrospinal fluid	440	57	12.95
Blood	174	26	14.94
Excrement	164	21	12.80
Bone marrow	148	15	10.14
Urine	104	10	6.92
Other*	388	8	2.06
Total	2 868	208	7.25

Other: Pleural/ascitic fluid, vaginal secretion

2.2 菌种分布 在分离出的 208 株深部真菌中,构成比居前 5 位的菌株分别是:新生隐球菌 34.13% (71 株),白假丝酵母菌 33.65% (70 株),马内菲青霉菌 14.90% (31 株),光滑假丝酵母菌 5.77% (12 株),热带假丝酵母菌 3.85% (8 株)。

2.3 不同阳性标本分离真菌情况 见表 2。真菌

主要分离自痰、脑脊液及血标本中。有 10 例患者同时在痰、脑脊液、血及骨髓标本中分离出 2 种不同种类真菌;4 例患者同时在痰、脑脊液、血标本中分离出 3 种不同种类真菌。

2.4 深部真菌药敏结果 5 种主要真菌对常用抗真菌药物的敏感率及耐药率见表 3。

表 2 不同阳性标本分离真菌情况

Table 2 The fungal isolation result of different positive samples

Samples	No. of isolated strains	Distribution of strain (No. of strains)	Constituent ratio(%)
Sputum	71	<i>Candida albicans</i> (53), <i>Candida glabrata</i> (6), <i>Candida tropicalis</i> (3), <i>Candida krusei</i> (3), <i>Penicillium marneffeii</i> (6)	34.13
Cerebrospinal fluid	57	<i>Cryptococcus neoformans</i> (57)	27.40
Blood	26	<i>Cryptococcus neoformans</i> (14), <i>Penicillium marneffeii</i> (11), <i>Filamentous fungi</i> (1)	12.50
Excrement	21	<i>Candida albicans</i> (10), <i>Candida glabrata</i> (4), <i>Candida tropicalis</i> (4), <i>Candida krusei</i> (3)	10.10
Bone marrow	15	<i>Penicillium marneffeii</i> (14), <i>Filamentous fungi</i> (1)	7.21
Urine	10	<i>Candida albicans</i> (7), <i>Candida glabrata</i> (2), <i>Candida tropicalis</i> (1)	4.81
Others	8	<i>Trichosporon beigelii</i> (4), <i>Candida lusitanae</i> (4)	3.85
Total	208		100.00

表 3 5 种主要真菌对抗真菌药物的敏感率及耐药率 (%)

Table 3 The sensitive and resistant rates of 5 species of fungi to antifungal agents (%)

Antifungal agents	<i>Cryptococcus neoformans</i>		<i>Candida albicans</i>		<i>Penicillium marneffeii</i>		<i>Candida glabrata</i>		<i>Candida tropicalis</i>	
	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S
AMB	0.00	100.00	3.12	96.88	4.20	95.80	9.09	90.91	8.98	91.02
5FC	2.50	97.50	9.38	90.63	22.20	77.80	9.09	90.91	9.19	90.81
FCA	22.55	77.45	54.69	45.31	-	-	54.54	45.46	54.54	45.46
VRC	-	-	57.82	42.19	-	-	45.45	54.55	45.45	54.55
ITR	-	-	64.07	35.94	15.90	84.10	81.81	18.18	81.81	18.18

R; Resistant; S; Sensitive

3 讨论

艾滋病患者 CD4 + T 细胞计数 < 100 个/μL 时,极易发生机会性感染。因为 CD4 + T 淋巴细胞是免疫反应的中心细胞,与各种机会性感染高度相关,而它是 HIV 感染的主要靶细胞。本院 2009 年 8 月—2010 年 9 月期间,共收治 1 078 例 CD4 + T 细胞计数低下的患者,各种不同部位的真菌感染因免疫受损宿主的不断增多而呈增长趋势。调查结果显示,本院艾滋病患者深部真菌分离标本主要为痰、脑脊液、血、粪和骨髓。说明对艾滋病患者,应加强呼吸系统、神经系统、血液系统的真菌感染监测。特别对于危重的艾滋病患者,更应重视多部位的真菌感染检测,才能使治疗有较好的效果^[1-2]。

在分离出的 208 株真菌中,主要以新生隐球菌 (71 株)、白假丝酵母菌 (70 株) 及马内菲青霉菌 (31

株) 为主,并且新生隐球菌感染及马内菲青霉菌感染有上升趋势。药敏结果显示,新生隐球菌、白假丝酵母菌对 AMB 及 5FC 非常敏感;马内菲青霉菌对 AMB 及 ITR 敏感,提示后期的巩固治疗阶段可考虑选用。而白假丝酵母菌、光滑假丝酵母菌及热带假丝酵母菌对 FCA 及 VRC 均显示 45%~55% 的耐药。近几年研究发现,真菌耐药株特别是对 FCA 耐药的菌株逐渐增多。Sanglard 等^[3]在免疫缺陷综合征患者中分离出的假丝酵母菌属超过 33.0% 是耐药菌株。Wolfger 等^[4]调查了 535 株假丝酵母菌属血液感染标本对 FCA 的敏感性,结果发现,白假丝酵母菌、热带假丝酵母菌、光滑假丝酵母菌、近平滑假丝酵母菌的耐药率分别为 1.8%、3.2%、5.2%、0.8%,可见假丝酵母菌属耐药现象存在明显的种间差异。Harry 等^[5]调查了 FCA、ITR 和 AMB 对 83 株真菌 (4 种假丝酵母菌和 3 种其他酵母菌) 的 MIC

儿,我们均采用甘露醇减轻脑水肿;对于热峰高、症状重者积极加用丙种球蛋白、甲基强的松龙治疗,可明显改善患儿症状、体征,减轻或阻止神经系统损伤后综合征的出现。本组 81 例患儿中,80 例出院时临床治愈,1 例发生左上肢迟缓性瘫痪,随访 5 个月至今,肌力基本恢复,治疗效果满意。

综上所述,EV71 感染所致手足口病合并脑炎患儿均有发热、精神差表现,并合并呕吐、抖动、惊跳等神经系统症状。对于此类患儿,应早期行脑脊液检查确诊;治疗上积极降低颅内压,并酌情联合丙种球蛋白和肾上腺糖皮质激素治疗,从而降低致残率、病死率。

[参 考 文 献]

[1] 中华人民共和国卫生部. 手足口病诊疗指南(2010 年版)[EB/

OL]. (2010-04-21)[2011-01-15]. <http://www.moh.gov.cn.html>.

- [2] Chen C S, Yao Y C, Lin S C, *et al.* Retrograde axonal transport: A major transmission route of enterovirus 71 in mice[J]. *J Clin Virol*, 2007, 81(17): 8996-9003.
- [3] 刘映霞,周伯平. 肠道病毒 71 相关性手足口病新进展[J]. *中华实验与临床感染病杂志*, 2010, 4(1): 43-45.
- [4] 董晓楠,应剑,陈应华. 1970-2004 年全球肠道病毒 71 型分离株的分子流行病学分析[J]. *科学通报*, 2007, 52(9): 1021-1027.
- [5] 何颜霞,付丹. EV71 感染相关神经源性肺水肿和心肺衰竭[J]. *临床儿科杂志*, 2008, 26(12): 1089-1090.
- [6] 高子芬,陆敏. 肠道病毒 EV71 感染重症儿童的病理学特点[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2008, 24(5): 518-519.

(上接第 353 页)

值,结果发现酵母菌株对 4 种抗真菌药物的敏感性均 >95.0%。Coste 等^[6]研究了 80 例伴有假丝酵母菌菌血症癌症患者分离的假丝酵母菌属的耐药性,结果表明,AMB 在体外抗真菌活性最强,仅有 3.0%的菌株耐药;13.0%和 21.0%的菌株分别对 FCA 及 ITR 表现为剂量依赖性敏感;13.0%和 26.0%的菌株分别显示对 FCA 及 ITR 耐药。

临床治疗时,应根据药敏试验结果联合使用抗真菌药物并及时调整用药,以避免治疗失败。同时,由于入住本院的艾滋病患者大部分 CD4 细胞数很低,机体免疫力非常低下,常常合并全身多系统器官的严重感染,治疗困难,预后差,病死率高。因此,强调早期病原学检查,把细菌培养和药敏试验结果作为临床合理使用抗真菌药物的依据,意义非常大。

[参 考 文 献]

[1] 李丁,张文芳,郑珊,等. 肿瘤患者真菌感染的菌株分布及耐药

性分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2009, 19(17): 2355-2357.

- [2] 孟祥红,董梅,孙红宁,等. 328 株假丝酵母菌菌种分布及耐药性分析[J]. *中国真菌学杂志*, 2009, 4(5): 288-290.
- [3] Sanglard D, Ischer F, Parkkinson T, *et al.* *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47(8): 2404-2412.
- [4] Wolfger H, Mamnum Y M, Kuckler K, *et al.* Fungal ABC proteins: pleiotropic drug resistance, stress response and cellular detoxification[J]. *Res Microbiol*, 2001, 152(3-4): 375-389.
- [5] Harry J B, Oliver B G, Song J L, *et al.* Drug-induced regulation of the MDR1 promoter in *Candida albicans*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(7): 2785-2792.
- [6] Coste A T, Karababa M, Ischer F, *et al.* TAC1, transcriptional activator of CDR genes, is a new transcription factor involved in the regulation of *Candida albicans* ABC transporters CDR1 and CDR2[J]. *Eukaryot Cell*, 2004, 3(6): 1639-1652.