

4 例少见丝状真菌深部感染实验室检测

孙继梅, 王艳玲, 周秀珍, 郑 伟, 张智洁, 刘 勇

(中国医科大学附属盛京医院, 辽宁 沈阳 110004)

[摘要] 目的 报告 4 例少见丝状真菌深部感染病例的临床及实验室检测资料, 为相关真菌病的诊断提供参考。方法 取患者感染部位分泌物或血液标本直接涂片和真菌培养, 根据真菌培养的菌落特点和镜下形态, 鉴定至菌种。结果 分别从 4 例患者的伤口分泌物和血培养标本中分离出 4 株丝状真菌, 经鉴定为申克孢子丝菌、串珠镰刀菌、马尔尼菲青霉和尖端赛多孢子菌。结论 申克孢子丝菌、串珠镰刀菌、马尔尼菲青霉和尖端赛多孢子菌引起的临床感染少见, 且检测困难, 应加强对少见真菌感染的认识和实验室检测, 提高诊断和治疗水平。

[关键词] 申克孢子丝菌; 串珠镰刀菌; 马尔尼菲青霉; 尖端赛多孢子菌; 真菌; 深部感染

[中图分类号] R756.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2010)06-0414-06

Laboratory detection of deep infections caused by rare filamentous fungi

SUN Ji-mei, WANG Yan-ling, ZHOU Xiu-zhen, ZHENG Wei, ZHANG Zhi-jie, LIU Yong
(Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China)

[Abstract] **Objective** To report the clinical and laboratory detection data of 4 cases of rare deep infections caused by *Sporothrix schenckii*, *Fusarium moniliforme*, *Penicillium marneffe* and *Scedosporum apiospermum*. **Methods**

Secretion and blood specimens from patients' infected sites were taken for direct smear and culture, fungi were identified according to colony features and appearance under microscope. **Results** Four strains of filamentous fungi isolated from the wound secretion and blood specimens were *Sporothrix schenckii*, *Fusarium moniliforme*, *Penicillium marneffe* and *Scedosporum apiospermum*. **Conclusion** Infection caused by *Sporothrix schenckii*, *Fusarium moniliforme*, *Penicillium marneffe* and *Scedosporum apiospermum* in clinic are very rare, and the detection is also difficult. The knowledge and laboratory detection on the rare fungi infection should be strengthened to improve the level of diagnosis and therapy.

[Key words] *Sporothrix schenckii*; *Fusarium moniliforme*; *Penicillium marneffe*; *Scedosporum apiospermum*; fungi; deep infection

[Chin Infect Control, 2010, 9(6): 414-418, 422]

丝状真菌深部感染多发生于艾滋病、器官移植、淋巴瘤、白血病、肿瘤、糖尿病、长期应用抗菌药物及肾上腺糖皮质激素或免疫抑制剂等免疫功能受损患者;也少发于免疫功能正常者,如外伤、污水淹溺者等^[1-3]。本实验室从伤口分泌物和血培养标本中分别分离出申克孢子丝菌、串珠镰刀菌、马尔尼菲青霉和尖端赛多孢子菌各 1 株,现分析报告如下。

1 临床资料

病例 1: 男性, 37 岁。6 个月前不慎被木刺刺伤右手桡侧, 伤后未经处置, 几天后出现右手肿胀、疼

痛、化脓, 在当地医院简单处置后未见好转, 于 2009 年 3 月 23 日入住本院手外科。入院检查发现右手桡侧第 1 基底处可见约 2.0 cm × 1.5 cm 大小肿胀, 有脓液渗出, 右前臂桡侧及上臂可见多处沿淋巴走向皮损, 部分皮肤破溃。于 23 日、25 日 2 次取原创部位黑色结痂下深部分泌物行真菌培养, 均分离出丝状真菌, 经鉴定为申克孢子丝菌。患者经抗真菌治疗, 病情好转后出院并继续用药治疗。

病例 2: 女性, 44 岁。入院前 1 周因感冒在当地医院给予阿米卡星及头孢菌素抗感染治疗, 感冒好转后出现齿龈及舌出血, 伴咽痛, 影响进食。4 d 前患者出现全身乏力伴心悸, 于当地医院行血常规

[收稿日期] 2010-05-06

[作者简介] 孙继梅(1957-), 女(汉族), 辽宁省鞍山市人, 副主任技师, 主要从事临床微生物耐药性研究。

[通讯作者] 孙继梅 E-mail: sunjm@sj-hospital.org

检查:白细胞 $0.8 \times 10^9/L$, 血红蛋白 163 g/L, 血小板 $17 \times 10^9/L$; 经头孢曲松抗感染治疗及对症营养支持治疗, 症状无明显好转, 于 2009 年 2 月 19 日转入我院血液内科。入院诊断: 白细胞、血小板减少原因待查; 既往 2 型糖尿病病史。入院当日完善各项检查并采血培养, 血培养仪在血培养 55 h 时阳性报警, 转种的同时涂片染色, 可见粗大菌丝, 疑似丝状真菌生长, 经培养后进一步鉴定为串珠镰刀菌。患者病情危重, 入院第 2 天转入重症监护室 (ICU), 患者病情持续加重, 家属放弃治疗, 于 2 月 21 日自动出院。

病例 3: 男性, 32 岁。以发热伴乏力、恶心 10 d 为主诉, 于 2009 年 7 月 7 日入院。入院体格检查: 体温 $38.9^\circ C$, 脉搏 110 次/min, 呼吸 24 次/min, 一般状态差, 神志清楚, 无颜面充血, 全身未见皮疹及出血点。实验室检查: 白细胞 $6.2 \times 10^9/L$, 中性粒细胞 0.87, 红细胞 $4.3 \times 10^{12}/L$, 血红蛋白 118 g/L, 血小板 $26 \times 10^9/L$, 清蛋白 28.7 g/L, 血清丙氨酸转氨酶 192 U/L, 天门冬氨酸转氨酶 399 U/L, 尿蛋白 +++; 肝胆脾彩超: 脾稍大, 胆囊壁增厚。入院诊断: 流行性出血热、中毒性肝炎、胆系感染、低钾血症、轻度贫血、败血症。入院后予盐酸莫西沙星抗感染治疗, 后加用头孢曲松, 患者多次出现血压下降, 补液治疗后好转。先后 2 次于发热时采血培养, 并完善肝炎病毒、人免疫缺陷病毒 (HIV) 等项目检测。血培养仪在血培养 33.2 h 时阳性报警, 分离培养的同时涂片革兰染色, 发现粗大菌丝, 2 次培养经鉴定均为马尔尼菲青霉。患者 HIV 抗体初筛阳性, 后经确证试验亦为阳性, 为 HIV 携带者。该患者各项免疫指标均低下, 淋巴细胞减少, 持续高热, 体温高达

$40.2^\circ C$, 家属要求出院, 回当地治疗。

病例 4: 男性, 46 岁。5 年前无明显诱因左侧鼻塞, 近 1 年加重, 无脓涕、鼻出血及嗅觉下降, 无视力下降及复视, 无溢泪, 无张口受限。1 个月前行鼻窦 CT 检查显示“左侧鼻腔、上颌窦口处及上颌窦占位病变可能性大”。遂于 2009 年 7 月 22 日在全身麻醉下行鼻内镜左上颌窦筛窦开放, 左上颌窦囊肿切除术, 术中见疑似真菌团块, 送真菌培养和病理检查。真菌培养经鉴定为尖端赛多孢子菌。病理诊断: (1) 组织被纤毛柱状上皮, 其下炎细胞浸润; (2) 见真菌菌丝团。

2 真菌学检测

病例 1: 取患者原创病损黑色结痂下分泌物涂片和细菌培养、真菌培养。直接涂片可见大量白细胞, 未见菌丝。标本接种血平板、中国蓝平板、沙堡弱平板, 于 $37^\circ C$ 、 $25^\circ C$ 培养 72 h, 见生长灰色绒毛样小菌落, 革兰染色可见粗大菌丝, 疑似丝状真菌。转种沙堡弱培养基、马铃薯葡萄糖培养基、脑心浸液琼脂培养基, 于 $37^\circ C$ 、 $25^\circ C$ 培养观察。25 $^\circ C$ 生长迅速, 初为灰色, 随着时间的延长逐渐变为褐色至黑褐色菌落, 很快菌落形成皱褶、绒毛样菌落。脑心浸液琼脂培养基 $37^\circ C$ 10 d 呈酵母样菌落。小培养 1 周后乳酸棉酚蓝染色, 显微镜下可见纤细分枝分隔菌丝, 分生孢子梗内菌丝侧成锐角长出, 分生孢子球形、椭圆形, 如花朵样分布在菌丝两侧, 形成套袖样菌丝结构。该菌为双相真菌, 其形态特征、培养特征和临床特征均符合申克孢子丝菌鉴定特点^[4], 确定为申克孢子丝菌 (见图 1~4)。

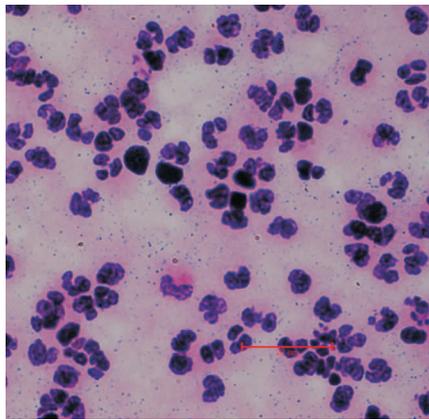


图 1 申克孢子丝菌感染患者原创病损黑色结痂下分泌物涂片革兰染色大量白细胞

Figure 1 Gram-stained smear of leukocytes in secretion under scab at *Sporothrix schenckii* infected sites

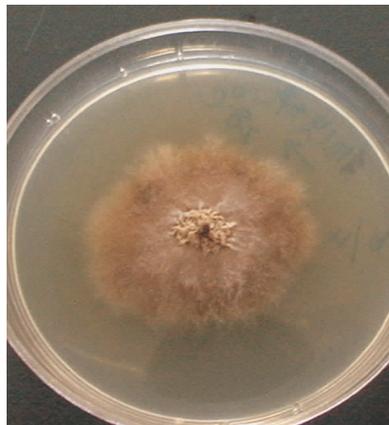


图 2 申克孢子丝菌 25 $^\circ C$ 培养菌丝相菌落
Figure 2 Hyphal form of *Sporothrix schenckii* cultured at 25 $^\circ C$



图 3 申克孢子丝菌 37℃培养酵母相菌落

Figure 3 Yeast form of *Sporothrix schenckii* cultured at 37°C

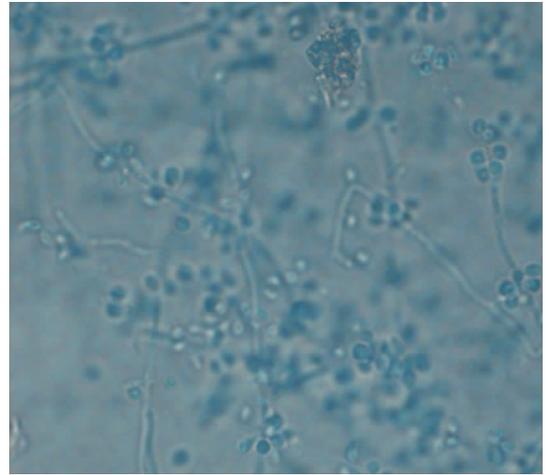


图 4 申克孢子丝菌小培养乳酸棉酚蓝染色镜下结构

Figure 4 Lactophenol cotton blue staining of *Sporothrix schenckii* in small culture

病例 2: 患者血培养 55 h 时仪器阳性报警, 转种的同时涂片染色, 可见粗大菌丝, 疑似丝状真菌生长。接种血平板、中国蓝平板 37℃, 沙堡弱培养基 25℃培养, 48 h 时 3 种平板均可见大量同一种丝状真菌生长。转种马铃薯葡萄糖培养基、沙堡弱培养基 25℃培养 1 周后, 菌落正面生长呈白色棉絮状, 背面呈亮红色菌落。分别进行小培养和采用透明胶

带法粘取菌落上产孢位置乳酸棉酚蓝染色, 置于显微镜下观察, 可见有隔菌丝, 产孢细胞为简单瓶梗, 小分生孢子呈短棒状或椭圆形, 成长串状, 无厚壁孢子, 未见大分生孢子。根据培养特性及镜下形态鉴定, 均符合串珠镰刀菌鉴定特点^[4], 确定为串珠镰刀菌(见图 5~6)。



图 5 串珠镰刀菌棉絮状菌落

Figure 5 Cotton wool-like colony of *Fusarium moniliforme*

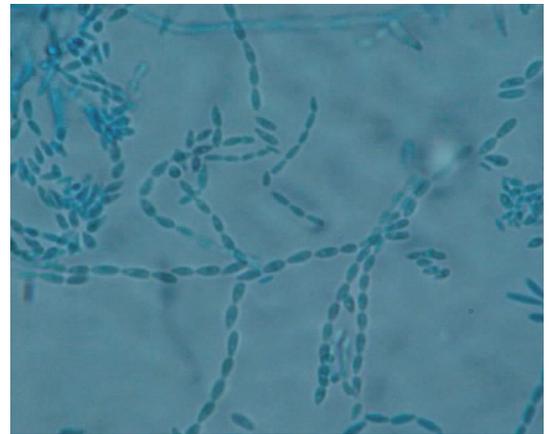


图 6 串珠镰刀菌小培养乳酸棉酚蓝染色镜下结构

Figure 6 Lactophenol cotton blue staining of *Fusarium moniliforme* in small culture

病例 3: 无菌操作取静脉血注入血液增菌培养液中, 美国 BD 全自动血液增菌培养仪上机后 33.5 h 阳性报警。转种同时涂片染色, 可见粗大菌丝, 疑似丝状真菌, 转沙堡弱培养基 37℃ 和 25℃每日观察培养。37℃培养 1 周, 长出有脑回样皱褶、奶酪色酵母样菌落; 25℃培养 3 d, 长出青霉菌样菌

落, 菌落最初呈浅灰褐色, 中央气生菌丝白色绒毛样, 向周围扩散, 继续培养产生酒红色色素并渗透整个培养基。小培养 1 周后乳酸棉酚兰染色镜下观察, 可见菌丝分隔, 分生孢子梗表面光滑, 有典型帚状枝, 瓶梗 3~6 个, 分生孢子椭圆形或球形, 光滑; 酵母相可见圆形、长形酵母样孢子并混有少许短菌

丝,两端钝圆有分隔的腊肠形孢子。该菌为双相真菌,其形态特征、培养特征和临床特征均符合马尔尼

菲青霉鉴定特点^[4],确定为马尔尼菲青霉菌(见图 7~9)。

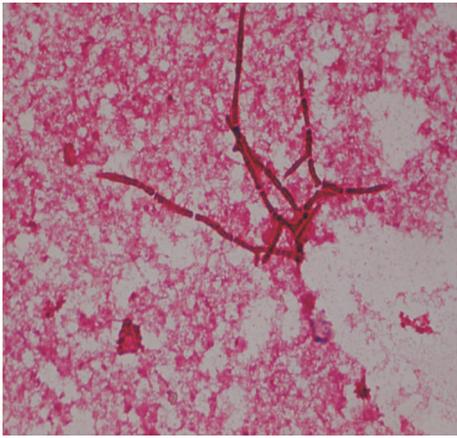


图 7 马尔尼菲青霉菌血培养直接涂片革兰染色粗大分隔菌丝
Figure 7 Gram-stained smear of mycelium of *Penicillium marneffei* in blood culture

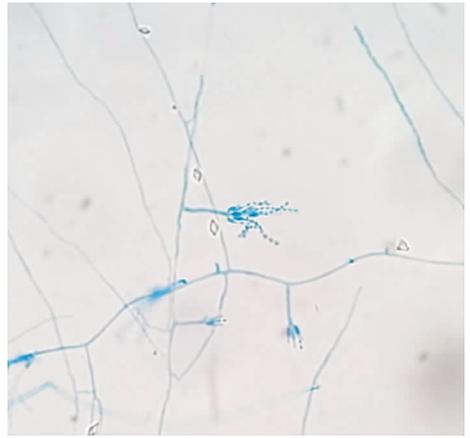


图 8 马尔尼菲青霉菌小培养乳酸棉酚蓝染色帚状枝
Figure 8 Lactophenol cotton blue staining of *Penicillium marneffei* in small culture

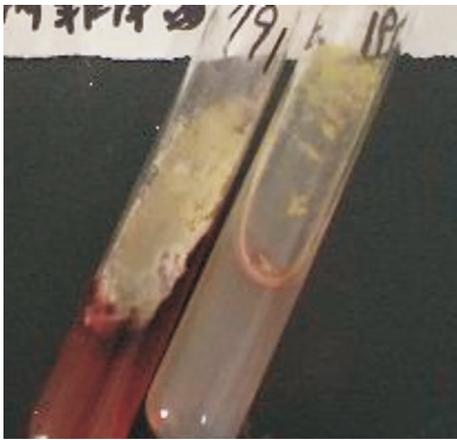


图 9 马尔尼菲青霉菌 25°C、37°C 培养
Figure 9 Culture of *Penicillium marneffei* at 25°C and 37°C

病例 4:患者手术中取出干酪样团块送检。涂片染色镜检,可见粗大菌丝,疑为丝状真菌。同时接种沙堡弱、马铃薯葡萄糖、显色培养基真菌培养,25°C 每日观察。在沙堡弱培养基上培养 48 h,生长出白色棉絮状菌落,继续培养菌落充满整个培养基,中心为黑色并呈年轮样,日久变为烟灰色,背面变为黄褐色。小培养 1 周后乳酸棉酚蓝染色显微镜下见菌丝较粗、分隔,分生孢子梗有长有短,分生孢子卵圆形,单个着生于分生孢子梗顶端,有时可以产生数个孢子。其形态特征、培养特征均符合尖端赛多孢子菌^[4],确定为尖端赛多孢子菌(见图 10~12)。

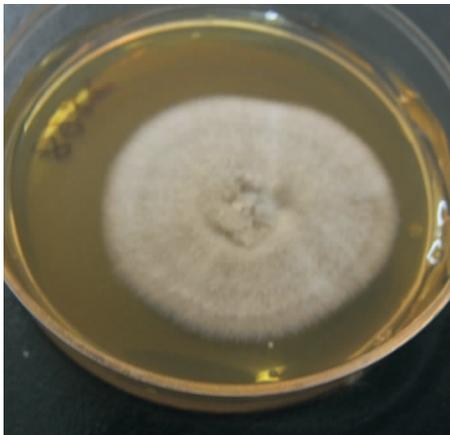


图 10~11 尖端赛多孢子菌培养
Figure 10 and 11 Culture of *Scedosporium apiospermum*

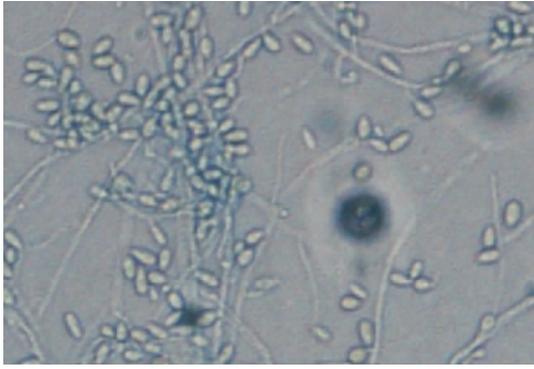


图 12 尖端赛多孢子菌小培养乳酸棉酚蓝染色镜下结构

Figure 12 Lactophenol cotton blue staining of *Scedosporum apiospermum* in small culture

3 讨论

3.1 申克孢子丝菌 为条件致病菌,广泛存在于自然界,可从土壤和腐烂植物中分离出,常暴露于此环境的人群属高危人群^[5]。该菌为双相真菌,在自然界呈菌丝相,体内呈酵母相,主要通过破损的皮肤或黏膜、上呼吸道或消化道进入机体而致病^[6]。感染特点是形成沿淋巴走向分布的特征性结节,可引起化脓、溃烂及渗出,极少数患者发生系统感染^[7]。本病例 1 就是由不经意的轻微外伤引起皮肤播散性感染。轻微皮损易被忽视,该病潜伏期长,检测周期长且较难鉴定,提醒实验室应结合临床,加强孢子丝菌病的病原学检测,为疾病诊断和治疗提供科学依据。

3.2 串珠镰刀菌 种类繁多,分布广,多为腐生菌,主要引起植物病变。对人类的危害主要是镰刀菌常引起角膜感染^[8];偶见皮肤感染^[9];血行播散感染未见报道。播散性镰刀菌病最常见于中性粒细胞减少症和骨髓移植接受者^[5]。本病例 2 的白细胞及血小板均减少,有 2 型糖尿病史,可能是造成血行播散性感染的先决条件。该患者病情危重,入院第 2 天转入 ICU,治疗 1 d 后,家属要求放弃治疗,自动出院。

3.3 马尔尼菲青霉 属于青霉属,在人机体抵抗力下降时,可引起马尔尼菲青霉病。该病主要累及肺、肝、肠、淋巴结、皮肤、骨髓、肾、脾等。马尔尼菲青霉病分为局限型和进行性播散型 2 类。绝大多数为后者,其临床特点是:畏寒、发热(时间长、易反复),肝脾和全身淋巴结大,大部分患者呼吸系统可受累,皮肤(黏膜)出现损害,有些患者骨关节有病变,血液系统最大特点是贫血(100%)^[10]。本病例 3 在 2009

年 7 月 7 日入院时轻度贫血,血红蛋白 118 g/L,7 月 10 日出院前已降至 105 g/L;白细胞可高可低,也可在正常范围。部分患者有腹痛、腹泻、稀便或血便。

马尔尼菲青霉病的分布呈地方性,多分布在东南亚地区;我国多报道在广东、广西地区。本病高发于获得性免疫缺陷综合征(AIDS)患者,被认为是 AIDS 的指示性疾病,其他人群偶有报道^[11]。该病临床表现复杂,易导致漏诊和误诊,因此,加强病原学检测工作是当务之急。本病例 3 为临床确诊 AIDS 病例,免疫功能低下,为艾滋病合并马尔尼菲青霉菌血行播散性感染。

3.4 尖端赛多孢子菌 即波氏假性阿利什霉的无性期,是一种侵袭性较强的条件致病菌。该菌在土壤、污水、腐物等受污染的环境中广泛存在,以前的研究认为尖端赛多孢子菌主要引起外伤部位的感染、皮下感染和无症状的肺部定植。但是近年来发现尖端赛多孢子菌引起的感染大多为深部感染,特别是在系统应用大量糖皮质激素,接受实体器官和骨髓移植以及有基础肺病的患者,可侵犯人体多种器官导致疾病,并常引起致死性感染;污水淹溺是此菌感染的易感因素^[1,5]。诊断尖端赛多孢子菌感染非常困难,因其临床特征和组织病理学与曲霉、镰刀菌病以及其他相对常见的透明丝孢霉病非常相似。由于诊断困难,可能仍存在大量的潜在病例未被发现。传统的抗真菌药对尖端赛多孢子菌无效或效果很差,因此目前对尖端赛多孢子菌感染的治疗仍不理想^[12]。

尖端赛多孢子菌可在引流不畅的支气管、鼻窦等空腔内定植,而不引起播散性感染,当免疫功能严重受损时,定植的真菌即可引起致命性的侵袭性真菌感染^[13]。本病例 4 即为鼻腔、上颌窦口处及上颌窦内尖端赛多孢子菌定植引起 CT 下疑似肿瘤样改变,病灶局限,术中取出完整,未经治疗,患者痊愈出院。该患者未查到有免疫功能缺欠或污水淹溺史,如何引起尖端赛多孢子菌鼻内定植不详。

[参考文献]

- [1] 王澎,徐英春,窦洪涛,等. 尖端赛多孢和多育赛多孢所致的深部真菌感染 2 例并文献复习[J]. 中国真菌学杂志,2007,2(4): 210-213.
- [2] 徐艳,郝飞,钟白玉,等. 尖端赛多孢子菌所致肺部感染 1 例[J]. 中国真菌学杂志,2008,3(5):292-294.

最下层的包裹,空气显然不容易被排除,蒸汽的穿透面积变小,路径少,穿透性受到严重阻碍。超满载装载方式可能会导致灭菌包包裹内的温度达不到灭菌温度,影响灭菌质量。

压力蒸汽灭菌器操作程序包括灭菌前准备、灭菌物品装载、灭菌操作、无菌物品卸载和灭菌效果的监测等步骤^[5]。在灭菌过程中,灭菌器的装载技巧容易被忽视。灭菌器的装载对于灭菌过程的成功与否有很大的影响,而且由装载问题引起的灭菌失败是比较难以确定的,因此,从操作上规范好灭菌器的装载很有必要。ANSI/AAMI ST79:2006 美国医疗机构蒸汽灭菌及灭菌保障综合指南^[6]和美国消毒供应中心操作手册对蒸汽灭菌器的装载有明确规定,装载的物品不能触及腔壁;敷料包应该摆放在在灭菌器架子上,留出空气和蒸汽循环的空间(物品之间至少有足够的空间可以插入伸直的手);器械包不应叠放;如果敷料及金属物品混装,金属类物品应放在下层,使金属上的冷凝水不会打湿其他物品;盆、碗类物品和其他不易排出冷空气、容易集聚冷凝水的物品(如纸塑包装袋)应侧放;灭菌器不得超载,必须留有空间,使蒸汽能在包裹之间、上下及包裹内循环。

综上所述,正确有效的灭菌装载是灭菌质量的基本保障。灭菌物品应按以下要求进行装载:应使用专用灭菌架或篮筐装载灭菌物品,灭菌包之间应留间隙,利于灭菌介质的穿透;宜将同类材质的器

械、器具和物品置于同一批次进行灭菌,材质不相同,纺织类物品应放置于上层、竖放,金属器械类放置于下层;手术器械包、硬式容器应平放,盆、盘、碗类物品应斜放,包内容器开口朝向一致;玻璃瓶等底部无孔的器皿类物品应倒立或侧放,纸袋、纸塑包装应侧放,利于蒸汽进入和冷空气排出。下排气压力蒸汽灭菌器中,大包宜摆放于上层,小包宜摆放于下层;装载量不应超过柜室容积的 80%。预真空和脉动真空压力蒸汽灭菌器的装载量不应超过柜室容积的 90%,同时不应小于柜室容积的 10% 和 5%^[5],从而避免由于灭菌装载不当导致的灭菌失败,提高灭菌效果,保障无菌物品的质量安全。

[参考文献]

- [1] 张青,张金涛,高宏,等. 医用脉动真空高压蒸汽灭菌设备的验证[J]. 中华医院感染学杂志,2008,18(4):529-531.
- [2] European Committee for Standardization. Sterilization of medical devices-Validation and routine control of sterilization by moist heat;EN554[S]. 1994.
- [3] NHS Estates an Executive Agency of the Department of Health. Health Technical Memorandum (HTM) 2010 - Sterilization validation and verification[S]. British,1998.
- [4] 中华人民共和国卫生部. 消毒技术规范[S]. 北京,2002.
- [5] 中华人民共和国卫生部. 医院消毒供应中心第二部分:清洗消毒及灭菌技术操作[S]. 北京,2009.
- [6] ANSI/AAMI. 美国医疗机构蒸汽灭菌及灭菌保障综合指南 ST79[S]. 2006.

(上接第 418 页)

- [3] 栗方,曹彬,谷丽,等. 实验室诊断尖端赛多孢子菌感染一例[J]. 中华检验医学杂志,2009,32(5):591-592.
- [4] 王端礼. 医学真菌学—实验室检查指南[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:385-438.
- [5] 王侠生,廖康煌. 皮肤病学[M]. 上海:科学技术文献出版社,2005:220.
- [6] 杨鑫,李福秋,金学洙. 1 株引起皮肤播散型孢子丝菌病的申克孢子丝菌临床分离株的真菌学鉴定[J]. 吉林医学,2007,28(5):588-589.
- [7] 李福秋,杨鑫,包宝龙. 申克孢子丝菌及其研究现状与展望[J]. 吉林医学,2007,28(5):581-583.
- [8] 朱井丽,王守芹,马伯书,等. 茄病镰刀菌引起角膜溃疡 1 例[J]. 中国实验诊断学,2008,12(7):938.
- [9] 陈梅,李春阳. 小儿面部茄病镰刀菌感染 1 例[J]. 临床皮肤科杂志,2008,37(4):243.
- [10] 赵国庆,冉玉平,向耘. 中国大陆马内非青霉病的临床表现及流行病学特征的系统评价[J]. 中国真菌学杂志,2007,2(2):68-72.
- [11] 肖秀美,刘振英,张婕. 系统性红斑狼疮合并马内非青霉病 1 例[J]. 中华检验医学杂志,2009,32(4):469-471.
- [12] 常晶,栗方,刘敏,等. 浅谈尖端赛多孢子菌引起的侵袭性真菌感染[J]. 中国真菌学杂志,2008,3(6):364-367.
- [13] Symoens F, Knoop C, Schooyen M, et al. Disseminated *Scedosporium apiospermum* infection in a cystic fibrosis patient after double-lung transplantation[J]. J Heart Lung Transplant, 2006,25(5):603-607.