

DOI:10.3969/j.issn.1671-9638.2016.10.011

· 论 著 ·

阿萨希毛孢子菌和头状地霉菌血流感染的鉴别诊断初探

钱雪峰, Krupakar Jyothi, 赵 晔, 凌春华, 黄建安, 季 成

(苏州大学附属第一医院, 江苏 苏州 215006)

[摘 要] **目的** 为临床微生物实验室建立少见类酵母样真菌血流感染诊断和鉴别诊断方法提供参考。**方法** 采用临床资料分析、形态学检查、生化反应和分子生物学技术相结合的方法, 对阿萨希毛孢子菌和头状地霉菌血流感染进行诊断和鉴别诊断。**结果** 病例 1 和病例 2 类酵母样真菌血流感染均发生于患者白血病化疗后粒细胞缺乏期, 患者病情严重, 相似度高。挑取病例 1、2 血平皿上培养菌落进行革兰染色镜检, 前者可见菌丝、关节孢子和小分生孢子, 菌丝分枝分隔粗细不等, 关节孢子长短不一, 多呈矩形和桶型; 后者可见中隔透明的菌丝断裂成关节孢子, 呈长方形, 不产生芽生分生孢子。API 20C AUX 鉴定, 提示分别为阿萨希毛孢子菌、头状地霉菌。所得序列在 NCBI 上进行比对, 结果分别为阿萨希毛孢子菌、头状双足囊菌-头状地霉菌的有性期。**结论** 综合应用多种技术手段有助于提高类酵母样真菌血流感染诊断的准确性。将毛孢子菌和地霉菌鉴定到种水平有利于提高临床对该类少见真菌感染的认识, 合理选择抗真菌药物和改善预后。

[关 键 词] 血流感染; 阿萨希毛孢子菌; 头状地霉菌; 类酵母样真菌; 鉴别诊断

[中图分类号] R379 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2016)10-0764-05

Differential diagnosis in bloodstream infection with *Trichosporon asahii* and *Geotrichum capitatum*

QIAN Xue-feng, Krupakar Jyothi, ZHAO Ye, LING Chun-hua, HUANG Jian-an, JI Cheng
(The First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China)

[Abstract] **Objective** To provide reference for establishing diagnosis and differential diagnosis methods of rare yeast-like fungal bloodstream infection for clinical microbiology laboratory. **Methods** *Trichosporon asahii* (*T. asahii*) and *Geotrichum capitatum* (*G. capitatum*) bloodstream infection was diagnosed and differentially diagnosed through clinical data analysis, morphological examination, biochemical reactions, and molecular biology technology. **Results** Two types of yeast-like fungal bloodstream infections in case 1 and case 2 both occurred in leukemia agranulocytosis phase after chemotherapy, such infections were serious and highly similar. The cultivated colonies on blood agar plates of case 1 and case 2 were performed gram stain and microscopic examination. Hyphae, arthrospores and microconidia were visible in the former, thickness of hyphae branches and length of arthrospores were different, most presented rectangular and barrel shape; the latter can be seen hyphae with transparent septum broken up into arthrospores, presented rectangular shape, did not produce blastoconidia. Identification with API 20C AUX showed that they were *T. asahii* and *G. capitatum*. The PCR product sequences were compared with NCBI, suggesting that *T. asahii* and *G. capitatum* were at sexual stage. **Conclusion** Comprehensive application of a variety of technical methods is helpful for improving the diagnosis accuracy of bloodstream infection with yeast-like fungi, identifying *Trichosporon* and *Geotrichum* to the species level may help physicians to understand such rare fungal infection, choose antifungal agents rationally, and improve clinical prognosis.

[收稿日期] 2015-11-01
[基金项目] 国家自然科学基金(81501425)
[作者简介] 钱雪峰(1974-), 男(汉族), 江苏省苏州市人, 副主任检验师, 主要从事病原生物检测和医院感染预防与控制相关研究。
[通信作者] 季成 E-mail: jichengsky@hotmail.com

[Key words] bloodstream infection; *Trichosporon asahii*; *Geotrichum capitatum*; yeast-like fungus; differential diagnosis

[Chin J Infect Control, 2016, 15(10): 764-768]

随着医学技术的发展和有效治疗措施的不断推出,许多疾病病死率得到不同程度的控制,患者生命得以延长。但同时也造成患有严重基础疾病和免疫功能受损的患者数量的明显增加,特别是在重症监护病房(ICU)、血液科和肿瘤科病房,医院获得性真菌感染的机会明显上升^[1-3]。对法国 300 个 ICU 的调查显示,侵袭性假丝酵母菌感染的病死率高达 45.9%^[4]。特别是非白假丝酵母菌感染的比例有逐渐增高的趋势。既往不常见的丝状真菌、暗色丝状真菌和其他类酵母样真菌在致命性侵袭性感染中所占的比重越来越大^[5-6]。普通假丝酵母菌通常可通过显色平皿和自动化微生物鉴定仪酵母菌鉴定卡进行分析,但一些少见类酵母样真菌却无法完全依此进行鉴定。如对毛孢子菌和地霉菌种属的鉴定,传统的 API 20C AUX system 和 VITEK 2 Compact YST system 确鉴率仅为 70.8%、56.3%,误鉴率高^[7],目前临床尚缺乏统一标准化的检测方法。我们通过分析阿萨希毛孢子菌(*Trichosporon asahii*)和头状地霉菌(*Geotrichum capitatum*)血流感染的临床资料,结合病原形态学检查、生理生化反应和分子生物学技术,对两种类酵母样真菌血流感染进行诊断和鉴别诊断。现将结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 资料 病例 1,患者男性,48 岁,初治急性红白血病,于 2010 年 6 月 1 日入住本院,血常规白细胞计数(WBC) $2.05 \times 10^9/L$,中性粒细胞(N) $0.38 \times 10^9/L$,血红蛋白(Hb) 122g/L,血小板计数(PLT) $29 \times 10^9/L$ 。6 月 3 日经外周静脉置入中心静脉导管(PICC),化学治疗(化疗)后血白细胞未见明显下降。6 月 22 日复查骨髓穿刺提示未缓解,改予 IA 方案再次诱导化疗,7 月 10 日出现发热 39.2℃,WBC $0.19 \times 10^9/L$,N $0.01 \times 10^9/L$,血 CMV-DNA 和 PP65 检查阴性,7 月 14 日起连续两次血培养真菌生长,疑似阿萨希毛孢子菌。给予脂质体两性霉素 B 联合亚胺培南/西司他丁钠、利奈唑胺抗感染治疗,粒细胞集落刺激因子(G-CSF)及促红细胞生成素(EPO)促进造血恢复。

病例 2,患者男性,13 岁,初治急性单核细胞白

血病,2010 年 8 月 9 日因间断中等度发热入院。查血常规:WBC $346.87 \times 10^9/L$,Hb $10^9 g/L$,PLT $52 \times 10^9/L$ 。骨髓穿刺示急性单核细胞白血病。先后给予白细胞清除 3 次,羟基脲降白细胞治疗,但白细胞仍维持在 $200 \times 10^9/L$ 左右,8 月 10 置入股静脉导管,给予 IA 方案诱导化疗,8 月 19 日复查骨髓穿刺:急性单核细胞白血病化疗后未缓解伴骨髓抑制(幼稚单核细胞 45%)。8 月 20 日再予 Ara-C $100mg/m^2/d$,2 d 化疗。期间反复出现高热,予亚胺培南/西司他丁钠联合替考拉宁、米卡芬净热峰不降。8 月 24 日起给予 G-CSF 刺激粒系造血。9 月 6 日起外周血培养连续两次真菌生长,考虑为真菌败血症,两性霉素 B 加量至 3 mg/kg/d,并联合伏立康唑口服加强抗真菌治疗。9 月 12 日起脱离粒细胞缺乏期,WBC $4.32 \times 10^9/L$,N $3.12 \times 10^9/L$,体温降至基础体温。9 月 13 日起连续 3 次血培养回报无菌生长,提示真菌败血症得到有效控制。9 月 15 日复查骨髓穿刺提示本病缓解,幼单核细胞 1%。

1.2 方法

1.2.1 形态学鉴定 分别接种血平皿、假丝酵母菌显色平皿和 SDA 平皿,进行革兰染色镜检。

1.2.2 生化反应鉴定 采用法国生物梅里埃 VITEK2 Compact 鉴定仪 YST 卡鉴定和 API 20C AUX 鉴定。

1.2.3 分子生物学鉴定 使用天根生化酵母基因组 DNA 试剂盒提取基因组 DNA。真菌核糖体大亚基 26SD1/D2 区引物: NL-1F: GCATAT-CAATAAGCGGAGGAAAAG; NL-4R: GGTC-CGTGTTTCAAGACGG^[8];核糖体 DNA 的内转录间隔区(ITS)引物: ITS1: TCCGTAGGTGAACCT-GCGG; ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC。PCR 扩增 26S 和 ITS 序列: 反应体系 50 μL , dd H₂O 41.25 μL , 10× Buffer(含 2.0 mmol/L MgCl₂) 5 μL , dNTP(10mmol/L) 1 μL , primer(10 mol/L) 各 1 μL , Taq 酶 0.25 μL , 模板 DNA 0.5 μL 。反应程序: 94℃ 4 min; 94℃ 0.5 min, 56℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 7 min。PCR 产物回收: 按生工生物 SK1131 试剂盒说明。目的片段连接反应: 5 μL T4 DNA 连接酶 2×快速连接缓冲液, 1 μL Pgem-T Vector, 4 μL PCR product, 16℃ 连接过夜。连接产物转

化:50 μ L 感受态细胞置于冰上,解冻后将细胞均匀悬浮。加入 10 μ L 连接液冰上放置 30 min,42 $^{\circ}$ C 水浴 90 s,冰上放置 15~20 min。加 400 μ L SOC 培养基,37 $^{\circ}$ C 200~250 r/mim 振荡培养 1 h。室温下 4 000 r/mim 离心 5 min,吸去 400 μ L 上清,用剩余的培养基将细胞悬浮。将细菌涂布在预先用 20 μ L 100 mmol/L IPTG 和 100 μ L 20 mg/mL X-gal 涂布的氨苄西林平板上。37 $^{\circ}$ C 下正向放置 1 h,倒置培养过夜。选择白色菌落,挑至 5 mL 含氨苄西林 LB 试管,37 $^{\circ}$ C 摇床过夜。使用生工 SK1191 UNIQ-10 柱式质粒小量抽提试剂盒提取质粒 DNA,M13 + / - 测序,所得序列在 NCBI 上进行比对。

1.2.4 抗真菌药物体外敏感性试验 采用丹麦 Rosco 公司药敏纸片和改良 Shadomy 琼脂,检测两类酵母样真菌对氟康唑、酮康唑、伊曲康唑、两性霉素 B、咪康唑和 5-氟胞嘧啶 6 种抗真菌药物的敏感性。标准菌株 ATCC 64548 和 ATCC 64550 白假丝酵母菌作药敏试验质控菌株。

2 结果

2.1 病原表型鉴定结果 病例 1,血平皿上菌落形态:35 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后,菌落白色、干燥、边缘不整齐,牢固黏附于培养基上,边缘触之易碎,菌落较小,48 h 后顶部呈粉末状。假丝酵母菌显色平皿上生长产绿色色素的菌落。SDA 上形态:27 $^{\circ}$ C 培养 24 h,奶油色、稍干燥、表面呈粉状、边缘有宽而深的裂隙。镜检:革兰染色后可见菌丝、关节孢子和小分生孢子,菌丝分枝分隔粗细不等,关节孢子长短不一,多呈矩形和桶型。见图 1。VITEK2 Compact 鉴定仪 YST 卡:87%为阿萨希毛孢子菌。API 20C AUX 鉴定:30 $^{\circ}$ C 孵育 24、48 h,提示为阿萨希毛孢子菌。

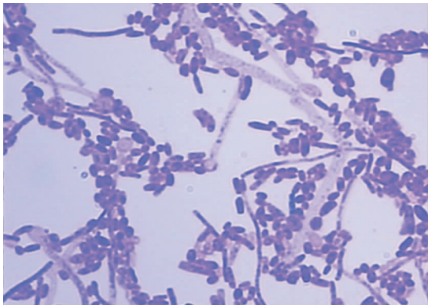


图 1 阿萨希毛孢子菌
Figure 1 *Trichosporon asahii*

病例 2,血平皿上菌落形态:35 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后,菌落白色、中小、偏干、边缘呈粉末状。假丝酵母菌显色平皿上呈淡粉红色、湿润柔软、边缘皱折。SDA 上形态:27 $^{\circ}$ C 培养 24 h,白色、表面堆积呈脑回状,边缘薄呈细小粉末状。镜检可见中隔透明的菌丝断裂成关节孢子,呈长方形,不产生芽生分生孢子。见图 2。VITEK2 Compact 鉴定仪 YST 卡:79%为头状地霉菌。API 20C AUX 鉴定提示为头状地霉菌。

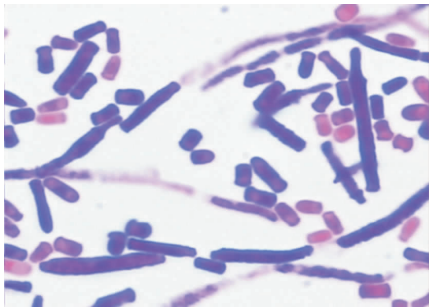


图 2 头状地霉菌
Figure 2 *Geotrichum capitatum*

2.2 病原体分子生物学鉴定结果 提取患者分离菌的质粒 DNA,测序所得序列在 NCBI 上进行比对,结果病例 1 为阿萨希毛孢子菌,26S rDNA D1/D2 区域序列为 642 bp,转录间区(ITS)为 543 bp;;病例 2 为头状双足囊菌-头状地霉菌(*Dipodascus capitatus*)的有性期,26S rDNA D1/D2 区域序列为 452 bp,ITS 为 466 bp。

2.3 抗真菌药物体外敏感性试验结果 阿萨希毛孢子菌对大多数抗真菌药物处于中介水平,仅对伊曲康唑和咪康唑敏感;而头状地霉菌对酮康唑、两性霉素 B 和 5-氟胞嘧啶敏感。见表 1。

表 1 2 株类酵母样真菌对抗真菌药物的体外药敏感结果
Table 1 In vitro antifungal susceptibility testing results of two kinds of yeast-like fungi

抗真菌药物	阿萨希毛孢子菌	头状地霉菌
氟康唑	I	I
酮康唑	I	S
伊曲康唑	S	I
两性霉素 B	I	S
咪康唑	S	I
5-氟胞嘧啶	I	S

I:中介;S:敏感

3 讨论

丝孢酵母属为半知菌亚门隐球菌科真菌,该菌可以引起表浅部位感染、深部侵袭性感染,患者预后极差。阿萨希毛孢子菌是近年由丝孢酵母属中新确定的一个种,也是临床侵袭性毛孢子菌属中最常见的致病菌,多见于粒细胞减少的白血病、淋巴瘤患者、器官移植,以及重度免疫缺陷患者^[9-11],病死率高达 42%~80%^[12]。

地霉菌属内孢霉纲,除具关节分生孢子外还具有由合轴延伸细胞产生的分生孢子,以前曾将此菌分类于毛孢子菌属,形态上有时难于与毛孢子菌区别。地霉属目前最常引起侵入性及系统性感染者为头状地霉菌,所引起的感染包括败血症、呼吸道感染、胃肠道感染、心内膜炎、肝肾感染、口腔感染、脑膜炎、骨髓炎和椎间关节盘炎,多见于急性白血病患者。90% 以上是侵袭性感染^[13],致死率超过 50%^[9]。

在长度为 500~600 bp 的 26S rDNA D1/ D2 区域和 rRNA 转录间区(ITS),绝大多数酵母菌种间具有明显的序列差异,而同一种内不同菌株间的碱基差异却 $\leq 1\%$ ^[14]。目前,几乎所有真菌 D1/ D2 区域的碱基序列已测定并公布,丝孢酵母属内所有种菌株的 ITS 序列也已测定并公布。DNA 序列数据为类酵母样真菌的鉴定提供了便利条件。当未知菌株的相应序列测定后,在数据库内进行同源性比对,就可判定该菌与哪个种的序列相同或最相近。文中 1 例阿萨希毛孢子菌和 1 例头状地霉菌血流感染均发生于化疗后粒细胞缺乏期间,并且连续多次血培养阳性,可确定为真菌血流感染,而非污染。综合临床资料分析,病原形态学检查、生理生化反应和分子生物学技术等多种手段,有助于提高类酵母样真菌血流感染检出的可靠性与准确性,有利于提高临床对该类少见真菌感染的认识,合理选择抗真菌药物和改善预后。

阿萨希毛孢子菌对伏立康唑最敏感,而对卡泊芬净耐药^[10, 15-16],对两性霉素 B 的敏感性存在地区差异,国外多数耐药^[10, 16],而国内大陆地区仍敏感。头状地霉菌则对两性霉素 B 高度敏感,其次是伏立康唑^[17]。体外药物敏感性试验表明,阿萨希毛孢子菌对大多数抗真菌药物处于中介水平,仅对伊曲康唑和咪康唑敏感;而头状地霉菌对氟康唑、伊曲康唑和咪康唑处于中介水平,对酮康唑、两性霉素 B 和

5-氟胞嘧啶敏感。临床治疗的结果也显示,病例 1 在给予两性霉素 B 经验性治疗后,尽管阿萨希毛孢子菌对两性霉素 B 处于中介水平,但随着粒细胞的回升,感染得到有效控制。病例 2 在给予米卡芬净后热峰不降,药敏也提示该头状地霉菌对米卡芬净不敏感,改予两性霉素 B 和伏立康唑后,真菌败血症得到控制。另一个不容忽视的事实是 2 例类酵母样真菌血流感染均发生在粒细胞缺乏期,而感染的控制均发生在粒细胞缺乏缓解期,提示患者自身免疫状况对感染控制的作用。另外,我们建议在确诊真菌败血症时拔除 PICC 或深静脉导管,有利于感染的控制。

近年来,临床上毛孢子菌病和地霉菌病的发病率呈上升趋势,但是对抗真菌药物敏感性的研究依然十分有限,且存在地区差异,目前尚缺乏可参考的经验性治疗方案。我们建议有条件的单位保存菌株,进一步研究,以期今后能为少见类酵母样真菌的治疗积累经验 and 提供数据。

[参 考 文 献]

- [1] Cruciani M, Serpelloni G. Management of Candida infections in the adult intensive care unit[J]. Expert Opin Pharmacother, 2008,9(2):175-191.
- [2] Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis; a persistent public health problem[J]. Clin Microbiol Rev, 2007, 20(1):133-163.
- [3] Guery BP, Arendrup MC, Auzinger G, et al. Management of invasive candidiasis and candidemia in adult non-neutropenic intensive care unit patients; Part I. Epidemiology and diagnosis[J]. Intensive Care Med, 2009,35(1):55-62.
- [4] Leroy O, Gangneux JP, Montravers P, et al. Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive Candida infections in critical care; a multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006) [J]. Crit Care Med, 2009, 37(5):1612-1618.
- [5] Dimopoulos G, Ntziora F, Rachiotis G, et al. *Candida albicans* versus non-albicans intensive care unit-acquired bloodstream infections; differences in risk factors and outcome[J]. Anesth Analg, 2008, 106(2):523-529.
- [6] Groll AH, Walsh TJ. Uncommon opportunistic fungi: new nosocomial threats[J]. Clin Microbiol Infect, 2001, 7 (Suppl 2):8-24.
- [7] Guo LN, Xiao M, Kong F, et al. Three-locus identification, genotyping, and antifungal susceptibilities of medically important *Trichosporon* species from China[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(11):3805-3811.
- [8] Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification of clinically impor-

tant ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene[J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(5): 1216 - 1223.

[9] Girmenia C, Pagano L, Martino B, et al. Invasive infections caused by *Trichosporon* species and *Geotrichum capitatum* in patients with hematological malignancies: a retrospective multicenter study from Italy and review of the literature[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43 (4):1818 - 1828.

[10] Chagas-Neto TC, Chaves GM, Melo AS, et al. Bloodstream infections due to *Trichosporon spp.*: species distribution, *Trichosporon asahii* genotypes determined on the basis of ribosomal DNA intergenic spacer 1 sequencing, and antifungal susceptibility testing[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(4): 1074 - 1081.

[11] Matsue K, Uryu H, Koseki M, et al. Breakthrough trichosporonosis in patients with hematologic malignancies receiving micafungin[J]. Clin Infect Dis, 2006,42(6):753 - 757.

[12] Ruan SY, Chien JY, Hsueh PR. Invasive trichosporonosis caused by *Trichosporon asahii* and other unusual *Trichosporon species* at a medical center in Taiwan[J]. Clin Infect Dis,2009,49(1):e11 - e17.

[13] Özkaya-Parlakay A, Cengiz AB, Karadağ-Öncel E, et al. *Geotrichum capitatum* septicemia in a hematological malignancy patient with positive galactomannan antigen: case report and review of the literature[J]. Turk J Pediatr, 2012, 54 (6): 674 - 678.

[14] Fell JW, Boekhout T, Fonseca A, et al. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2000, 50 (Pt 3):1351 - 1371.

[15] Hazirolan G, Canton E, Sahin S, et al. Head-to-head comparison of inhibitory and fungicidal activities of fluconazole, itraconazole, voriconazole, posaconazole, and isavuconazole against clinical isolates of *Trichosporon asahii* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(10): 4841 - 4847.

[16] Kalkanci A, Sugita T, Arikan S, et al. Molecular identification, genotyping, and drug susceptibility of the basidiomycetous yeast pathogen *Trichosporon* isolated from Turkish patients [J]. Med Mycol, 2010, 48(1):141 - 146.

[17] Girmenia C, Pizzarelli G, D'Antonio D, et al. In vitro susceptibility testing of *Geotrichum capitatum*: comparison of the E-test, disk diffusion, and sensititre colorimetric methods with the NCCLS M27-A2 broth microdilution reference method [J]. Antimicrob Agents Chemother,2003, 47, (12):3985 - 3988.

(本文编辑:左双燕)

(上接第 759 页)

【参 考 文 献】

[1] 牟霞,徐艳,王建怡,等. 贵州省 19 所基层医疗机构医院感染管理现状调查[J]. 中华医院管理杂志, 2014, 30(11):861 - 863.

[2] 杨俊华,王雪,彭丽蒙,等. 118 所基层民营医疗机构医院感染管理现状[J]. 中国感染控制杂志, 2015, 14(10):688 - 690.

[3] 李六亿,巩玉秀,张朝阳. 全国医院感染管理规范(试行)执行情况抽查调查报告[J]. 中华医院管理杂志, 2000, 16(9):526 - 530.

[4] 聂素梅. 132 家基层医疗机构医院感染现状及对策[J]. 中国公共卫生管理, 2009,25(1):66 - 68.

[5] 王金玉. 基层医疗机构医院感染管理现状与应对[J]. 现代妇女:医学前沿, 2015,(1):221 - 222.

[6] 殷群芳. 新形势下基层医疗机构医院感染管理工作难点及对策[J]. 江苏卫生事业管理, 2015, 26(3):61 - 62.

[7] 李燕,梁颖茹,贺征,等. 25 所基层医疗机构医院感染管理现状调查[J]. 中国消毒学杂志, 2015, 32(11):1094 - 1096.

[8] 郑敏娣. 基层医疗机构医院感染管理的薄弱环节及整改措施[J]. 当代医学, 2011, 17(4):25.

[9] 熊德华,李晓艳. 45 所基层医疗机构消毒灭菌状况分析[J]. 护理研究, 2014, 28(1):98 - 100.

[10] 刘灿兰,赵琳娜,秦元安. 手足口病及其医院感染控制[J]. 中国感染控制杂志, 2005, 4(4):331 - 332.

[11] 许燕卿,左亚沙,徐昕. 预防与控制 SARS 医院感染的体会[J]. 中华医院感染学杂志,2003, 13(11):1023 - 1025.

(本文编辑:孟秀娟)