

三种方法联合检测在非 HIV 感染儿童 马尔尼菲青霉病的临床应用*

何维娜¹, 苏丹虹², 吕东月¹, 丁 华¹, 华建江¹, 何 玥¹, 梁 鸿¹

(1. 广州医科大学附属深圳沙井医院, 广东深圳 518104; 2. 广州医科大学附属第一医院, 广州 518102)

摘要:目的 探讨联合检测曲霉菌半乳甘露聚糖、真菌(1-3)- β -D 葡聚糖及血液培养在非 HIV 感染儿童马尔尼菲青霉病的临床应用价值。方法 对 1 例非 HIV 感染儿童马尔尼菲青霉病患儿静脉血进行曲霉菌半乳甘露聚糖及真菌(1-3)- β -D 葡聚糖定量检测, 同时对患儿静脉血进行血液培养, 血培养仪阳性报警后对培养液进行真菌双相培养, 肉眼观察菌落形态, 显微镜下观察菌体特征。结果 曲霉菌半乳甘露聚糖检测结果 14.45 μ g/L; 真菌(1-3)- β -D 葡聚糖检测结果 77.14 pg/ml; 血液培养检出马尔尼菲青霉菌, 培养液 25℃ 菌落为菌丝相, 沙保氏培养基上有水溶性酒红色色素产生, 35℃ 为酵母相, 菌落可见脑回样皱褶, 显微镜下菌体见典型的扫帚状分枝和分隔菌丝。结论 曲霉菌半乳甘露聚糖、真菌(1-3)- β -D 葡聚糖定量检测联合血液培养, 有助于马尔尼菲青霉病的早期诊断及治疗。

关键词:非 HIV 感染; 儿童; 马尔尼菲青霉病; 联合检测

中图分类号: R379; R446.5 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2015)04-087-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2015.04.024

Clinical Application of Combined Detection of Pencilliosis Marneffeii in a Non-HIV-infected Child

HE Wei-na¹, SU Dan-hong², LÜ Dong-yue¹, DING Hua¹, HUA Jian-jiang¹, HE Yue¹, LIANG Hong¹

(1. Shenzhen Shajing Hospital Affiliated to Guangzhou Medical University, Guangdong Shenzhen 518104, China; 2. the First Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 518102, China)

Abstract: **Objective** To study the diagnostic value of pencilliosis marneffeii (PM) in a non-HIV-infected child with the combined detection of aspergillosis galactomannan, fungus Glucan(1-3)- β -D and blood culture. **Methods** The venous blood specimen from the child was collected for the quantified detection of aspergillosis galactomannan, fungus Glucan(1-3)- β -D. The growth and colonial morphology of fungus was inspected with the positive blood culture and the characteristics of fungus smear were observed under microscope. **Results** The result of aspergillosis galactomannan was 14.45 μ g/L and fungus Glucan (1-3)- β -D 77.14 pg/ml. *Penicillium marneffeii* was identified using blood culture. It was mycelia form under 25℃ and the salouraud medium produced water soluble claret-red pigment produced. It was mycelia form under 35℃ and the colony was gyri creases, the characteristic broom-like hypha and separation hypha could be found under microscope. **Conclusion** It is effective for the early diagnosis and therapy of PM with the combination detection of aspergillosis galactomannan, fungus Glucan (1-3)- β -D and blood culture and have better clinical diagnosis value.

Keywords: non-HIV-infection; child; pencilliosis marneffeii; combined detection

马尔尼菲青霉病(penicilliosis marneffeii, PSM)是由马尔尼菲青霉菌(*penicillium marneffeii*, PM)感染所致。PM 属于青霉菌属, 是条件致病菌, 是青霉菌中唯一的温度依赖性双相型真菌^[1], 主要在人类免疫力低下时致病, 多见于艾滋病患者, 儿童感染较少见, 因 PSM 临床表现无特异性, 容易误诊和漏诊, 且病情发展快, 死亡率极高, 现将广州医科大学附属第一医院 2014 年 1 例非 HIV 感染儿童 PSM 病例经过联合曲霉菌半乳甘露聚糖、真菌(1-3)- β -D 葡聚糖定量检测以及血液培养, 获得早期诊断并且成功治疗的病例报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床资料: 男性患儿, 2 岁, 28 天, 因“反复发热 24 天, 咳嗽 2 周”于 2014 年 6 月 6 日收入广州医科大学附属第一医院。体格检查: 体温 38.0℃, 脉搏 140 次/min, 呼吸 32 次/min, 血压 95/52 mmHg。心率 140 次/min, 心律齐, 心音有力, 未闻及病理性杂音。神志清醒, 无发绀。未见三凹征, 全身散在性皮疹。双侧眼睑无浮肿, 浅表淋巴结未触及肿大。颈软, 无抵抗。咽充血, 无杨梅舌, 双侧扁桃体无肿大, 未见脓点。呼吸尚平顺, 双肺呼吸间增粗, 未闻及干湿啰音。腹平软, 无压

* 作者简介: 何维娜(1981—), 女, 本科, 主管技师, 从事微生物检验, Tel: 0755-29230600, E-mail: 347013598@qq.com。

痛、反跳痛,肝肋下约2 cm可触及,脾肋下未触及,肠鸣音正常。生理性反射存在,病理症未引出。四肢肢端无肿胀及脱皮。肛周潮红、脱屑。实验室辅助检查:胸部CT:双肺多发结节样、斑片样高密度影。血常规:白细胞 $4.3 \times 10^9/L$,中性粒细胞百分比0.589,淋巴细胞百分比0.397,血红蛋白92 g/L,血小板 $245 \times 10^9/L$;降钙素原检测6.15 ng/ml;C反应蛋白18.51 mg/L;血沉98 mm/h;铁蛋白938.1 ng/ml;谷丙氨酸氨基转移酶32 U/L,清蛋白25.3 g/L;生化、凝血未见明显异常。IgM 2.23 g/L,HIV抗体、结核抗体、外斐氏、肥达氏、九项呼吸道病毒抗体检测均阴性。考虑患儿入院前在老家曾用抗生素(具体不详)治疗近20天,病情反复发作,为排除真菌感染,检测曲霉菌半乳甘露聚糖、真菌(1-3)- β -D葡聚糖及血液培养。6月7日~6月14日真菌(1-3)- β -D葡聚糖定量检测结果分别为77.14 pg/ml,80.15 pg/ml,曲霉菌半乳甘露聚糖定量检测结果分别为14.45 μ g/L,13.89 μ g/L;6月6日送检血液培养于6月16日报告检出马尔尼菲青霉菌,对伏力康唑及两性霉素B敏感。骨髓报告:考虑粒系反应性增生型骨髓象,NAP积分升高,请结合临床考虑。患儿经使用伏力康唑对症治疗病情明显好转,7月5日和7月7日血培养均阴性,7月5日、7月10日、7月14日真菌(1-3)- β -D葡聚糖及曲霉菌半乳甘露聚糖定量检测逐渐下降至正常范围,于2014年7月15日好转出院。

1.1.2 主要试剂与仪器:曲霉菌半乳甘露聚糖定量检测试剂ELISA法(天津贻诺);真菌(1-3)- β -D葡聚糖定量检测仪MB-80及配套试剂GKT-1M光度法(北京金山川);Bact/Alert-3D血培养仪,儿童专用血培养瓶(法国梅里埃);25℃和35℃普通培养箱(上海精宏);沙保氏培养基及血琼脂培养基(法国梅里埃);美兰染色液及快速革兰染液(台湾BASO);显微镜,一次性无菌无热原真空采血管,一次性无菌无热原肝素抗凝真空采血管,9 mm \times 65 mm标准无热原平底试管,水浴箱,离心机。所有试剂均在有效期,仪器质控均在控。

1.2 方法

1.2.1 曲霉菌半乳甘露聚糖定量检测:采集患儿静脉血3 ml注入一次性无菌无热原真空采血管,3 000 r/min离心10 min分得血清,300 μ l血清加100 μ l处理液,漩涡震荡10 s后100℃水浴3 min,10 000 r/min离心10 min,取上清液。在离心管中加入上清液和半乳甘露聚糖抗体各60 μ l,震荡10 s,37℃孵育30 min,为待测标本。在酶标板中加入100 μ l待测标本和样本稀释液,封板,37℃孵育30 min,洗涤3次,加酶标抗体100 μ l,封板,37℃孵育

30 min洗涤3次,加入底物液100 μ l,避光37℃孵育15 min,加入50 μ l终止液,混匀后在450 nm波长的酶标仪上读数,根据标准曲线计算血清中半乳甘露聚糖浓度。

1.2.2 真菌(1-3)- β -D葡聚糖定量检测:采集患儿静脉血4 ml注入一次性无菌无热原肝素抗凝真空采血管,3 000 r/min离心15 min分得血清,取100 μ l血清加入900 μ l样品处理液中,混匀后70℃孵育10 min,取出后立刻放入冷却槽冷却5 min,即为待测血清。取200 μ l待测血清直接加入酶反应主剂中,溶解后立即用微量加样器转移到9 mm \times 65 mm标准无热原平底试管中,插入MB-80微生物快速动态检测系统中进行反应,反应结束后检测系统自动计算出待测血清中(1-3)- β -D葡聚糖含量。

1.2.3 血液培养:严格无菌操作采集患儿静脉血5 ml注入儿童专用血液培养瓶,轻轻颠倒混匀后放置血液培养仪进行培养。血液培养仪阳性报警后立即对培养液进行涂片革兰染色镜检,发现菌丝和孢子立即转种沙保氏培养基及血琼脂培养基各2份,分别放置25℃和35℃进行培养,观察不同培养时间的菌落特征。并用透明胶纸粘取菌落块进行美兰染色,油镜下观察菌体形态特征。

2 结果

2.1 曲霉菌半乳甘露聚糖检测 参考值 <0.75 μ g/L。6月7日及6月14日检测结果均升高,分别为14.45,13.89 μ g/L;7月5日、7月10日、7月14日检测结果均下降至正常范围,分别为0.61,0.42,0.22 μ g/L。

2.2 真菌(1-3)- β -D葡聚糖检测 参考值 <60 pg/ml。6月7日及6月14日检测结果均升高,分别为77.14,80.15 pg/ml;7月5日、7月10日、7月14日检测结果均下降至正常范围,分别为50.21,35.24,17.30 pg/ml。

2.3 血液培养特征

2.3.1 菌落特征:血液培养于培养第6天阳性报警,培养液直接涂片染色镜检可见分枝、分隔菌丝,腊肠样孢子。25℃呈菌丝相,沙保氏培养基培养2天长出菌落,初呈灰白色绒毛状菌落,第4天菌落产生水溶性红色色素,继续培养红色色素逐渐加深扩散将培养基染成酒红色(图1)。35℃呈酵母相,沙保氏培养基培养2天菌落呈圆形、灰白色、表面光滑、边缘整齐的奶酪色酵母样菌落,第4天菌落可见脑回样皱褶(图2),继续培养部分菌落可转变为青霉相。血琼脂培养基菌落25℃与35℃培养基本一致,呈灰褐色短绒毛菌落。

2.3.2 镜下菌体特征:使用透明胶纸粘取25℃培

养的菌落块进行美兰染色,镜下可见蓝色透明的分隔菌丝,大量扫帚状分枝,两轮生或单轮生(图3)。35℃培养菌落块镜下圆形或卵圆形、大小不一的酵

母样菌体,见少许短菌丝,部分菌体变长,两端钝圆稍弯曲呈腊肠样(图4)。

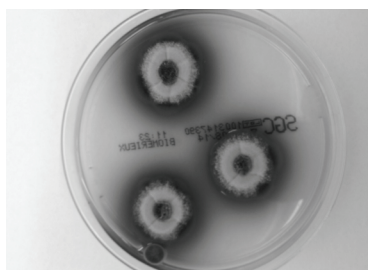


图1 25℃培养沙保氏培养基上菌丝相菌落,见特征性酒红色色素产生

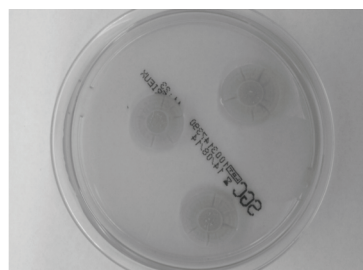


图2 35℃培养沙保氏培养基上酵母相菌落,见脑回样皱褶



图3 25℃培养菌体经美兰染色见扫帚状分枝,双轮生或单轮生(1 000×)



图4 35℃培养菌体经美兰染色见长形腊肠样孢子(1 000×)

3 讨论 由PM感染所致的PSM是一种深部真菌感染性疾病,主要发生于东南亚和我国南部地区^[2],好发于免疫力低下及艾滋病患者,侵犯部位广泛,具有2种临床表现:局限性和播散性^[3],临床症状无特征性,甚至易被其它疾病症状所掩盖,极易造成临床误诊误治。PSM病情凶险,发展迅速,死亡率极高,治疗成败关键在于能否早期诊断^[4],因此探讨早期可靠的诊断方法已成为临床的迫切需求。在本病例中显示,曲霉菌半乳甘露聚糖及真菌(1-3)- β -D葡聚糖定量检测联合血液培养有助于PSM的早期诊断及治疗。

半乳甘露聚糖分布于大多数曲霉属及青霉属真菌胞壁中^[5],在此类真菌侵犯组织早期就可释放入血,可持续1~8周,在真菌对数生长期释放量最大,虽然目前半乳甘露聚糖检测主要用于诊断曲霉菌感染,在PSM中是否会升高暂未见有文献报道,但是就其分布来看,理论上青霉菌感染半乳甘露聚糖浓度也应该同样会升高。本病例检测结果显示,患儿在入院第2天及第8天曲霉菌半乳甘露聚糖结果分别为14.45和13.89 $\mu\text{g/L}$,均超出参考范围,而在使用伏立康唑等对症治疗后的三次结果均下降至正常,结果与理论推测一致,本病例虽然只

有1例,但是却提示了在PSM中半乳甘露聚糖浓度会升高,在临床应用中如果半乳甘露聚糖检测结果超过参考值时除需考虑曲霉菌感染外还应考虑是否PM感染。半乳甘露聚糖在临床应用中引起假阳性的因素,如使用半合成青霉素制剂、自身免疫性肝炎等,应多次(≥ 2 次)定量检测以排除。

(1-3)- β -D葡聚糖是真菌细胞壁的组成成分之一,广泛存在于除隐球菌及接合菌以外的真菌细胞壁中,不存在于人体细胞、病毒和原核细胞中,具有真菌特异性。当真菌侵入人体组织或血液时经巨噬细胞吞噬、消化后,(1-3)- β -D葡聚糖可从真菌细胞壁释放入血液或其他体液,使得其含量在血液或其他体液中增高而被检测出来,而真菌定植和浅表真菌感染时则无类似现象,因此,当(1-3)- β -D葡聚糖在血液或其他体液中的含量增高可视为深部真菌感染的标志。本病例检测结果显示,患儿在入院第2天及第8天(1-3)- β -D葡聚糖结果分别为77.14和80.15 pg/ml ,均超出参考范围,升高程度与黄素钦等^[6]报道的数值($530.61 \pm 263.24 \text{ pg/ml}$)不一致,可能与马尔尼菲青霉菌的感染数量以及经吞噬细胞吞噬、消化后(1-3)- β -D葡聚糖从真菌细胞壁释放入血的浓度高低有关;使用伏立康唑

等对症治疗后的三次结果均下降至正常。由此可见,在马尔尼菲青霉菌感染时,血液中的(1-3)- β -D葡聚糖浓度可升高,但升高程度不一。值得注意的是,应多次(≥ 2 次)定量检测以排除(1-3)- β -D葡聚糖检测出现假阳性的因素,如应用纤维素膜进行血透患者,注射含葡聚糖的静脉制剂,抗肿瘤类药物,磺胺类药物,蘑菇类食物等。(1-3)- β -D葡聚糖联合半乳甘露聚糖检测结果可在3 h内发出,而且两者联合检测的灵敏度和特异度分别为93%和78%^[7],均高于两者单独检测。笔者认为,从本病例中可见在排除假阳性因素外,前者升高提示深部真菌感染,后者升高提示曲霉菌或青霉菌感染,两者均升高不仅提示深部真菌感染,而且可认为感染的真菌类型范围可缩小为曲霉菌属或PM,可在血液培养结果发出之前临床医生就进行经验用药,为PSM患者争取了宝贵的治疗时间。

PSM以真菌培养或组织病理发现PM为金标准^[8],对可疑PSM患者应进行骨髓或血液的真菌培养^[9],血液培养不仅利于PM生长及检出,而且还可进行药敏试验,本病例中患儿血液培养于第6天阳性报警,经过转种沙保氏培养基及血琼脂培养基进行双相培养,根据菌落菌体的特殊形态,于第10天报告检出马尔尼菲青霉菌,药敏试验对伏力康唑及两性霉素B敏感。可见,血液真菌培养虽然不能在短时间内检出结果,但可寻找到病原菌,可验证(1-3)- β -D葡聚糖及半乳甘露聚糖的检测结果是PSM的确诊依据。根据血液培养阳性报警时间,提示在实际工作中怀疑真菌感染时应延长血液培养的时间至少6天以上,以免漏检。

总之,关于非HIV感染儿童感染PM的报道较少,本病例虽然只有一例,可能数据说服力尚不足,但可以给临床医生开拓思路。综上所述,在PM感染初期,半乳甘露聚糖和(1-3)- β -D葡聚糖在血中浓度即可升高,两者联合检测可作为PM感染的早期辅助诊断依据,临床医生可进行经验用药;而血液培养可作为PSM诊断的金标准,三者联合检测有助于综合分析,为临床提供PSM早期治疗及确诊依据,使患者争取到宝贵的治疗时间以提高治愈率,具有一定的临床应用价值。

参考文献:

- [1] 张馨予,陈集敏,梁 伶,等.几种抗真菌药物对马尔尼菲青霉菌的体外药敏试验[J].中华皮肤科杂志,2012,45(4):234-237.
Zhang XY,Chen JM,Liang L,et al. In vitro susceptibility testing of *Penicillium marneffe* against several antifungal agents[J]. Chinese Journal of Dermatology,2012,45(4):234-237.
- [2] 欧汝志,卢祥婵,李伟新.艾滋病合并马尔尼菲青霉菌死亡的危险因素研究[J].中国真菌学杂志,2011,6(3):158-161.
Ou RZ,Lu XC,Li WX. Death risk factors in AIDS patients complicated with *Penicilliosis marneffe* [J]. Chinese Journal of Mycology,2011,6(3):158-161.
- [3] 王文文,潘明安.艾滋病合并马尔尼菲青霉菌感染19例临床研究[J].中国当代医药,2012,19(28):19-20.
Wang WW,Pan MA. Clinical research on 19 AIDS cases complicated with *Penicilliosis marneffe* [J]. China Modern Medicine,2012,19(28):19-20.
- [4] 赵 勇,王 红,任爱民,等.血浆 β -1,3-D葡聚糖对深部真菌感染诊断的研究[J].中国真菌学杂志,2007,2(4):202-206.
Zhao Y,Wang H,Ren AM,et al. Study of β -1,3-D-glucan on the diagnosis of invasive fungal infection [J]. Chinese Journal of Mycology,2007,2(4):202-206.
- [5] 李 军,席丽艳.真菌抗原成分及代谢产物在系统性真菌感染诊断方面的应用进展[J].国外医学皮肤性病学分册,2004,30(4):253-255.
Li J,Xi LY. Application of fungal infection diagnosis in fungi antigen and metabolites [J]. Foreign Medical Sciences (Section of Dermatology and Venereology),2004,30(4):253-255.
- [6] 黄素钦,李圣聪,吴秋芳.(1,3)- β -D葡聚糖检测对AIDS患者真菌感染诊断的临床意义[J].国际检验医学杂志,2013,34(9):1169-1170.
Huang SQ,Li SC,Wu QF. Clinical implication of (1,3)- β -D-glucan test in the diagnosis of AIDS fungal infections [J]. International Journal of Laboratory Medicine,2013,34(9):1169-1170.
- [7] 郑 罡,余 进,李雪迎,等.(1,3)- β -D葡聚糖检测和半乳甘露聚糖抗原检测在侵袭性真菌诊断中的价值探讨[J].中国真菌学杂志,2012,7(3):132-135.
Zheng G,Yu J,Li XY,et al. Detection of (1,3)- β -D-glucan and galactomannan for diagnosis of invasive fungal disease [J]. Chinese Journal of Mycology,2012,7(3):132-135.
- [8] 中华医学会感染病学分会艾滋病学组.艾滋病诊疗指南[J].中华传染病杂志,2006,24(2):133-144.
AIDS Group, Society of Infectious Diseases, Chinese Medical Association. Guideline of diagnosis and treatment for AIDS [J]. Chinese Journal of Infectious Diseases,2006,24(2):133-144.
- [9] 谢永强,邓秋连,黄 勇,等.儿童马尔尼菲青霉菌病分析[J].中国医师进修杂志,2008,31(10):36-37.
Xie YQ,Deng QL,Huang Y,et al. Analysis of epidemiology of *penicillium marneffe* [J]. Chinese Journal of Postgraduates of Medicine,2008,31(10):36-37.