

· 病例报告 ·

构巢曲霉致肺曲霉病患者二例临床特征和病原学分析

王育英 曹敬荣 兰贺 赵越 谢威 王岩 闵嵘 王培昌

【摘要】目的 探讨构巢曲霉致肺曲霉病的临床及病原学特点。方法 收集首都医科大学宣武医院2017年1月2例住院慢性阻塞性肺疾病患者的病例信息,分析患者的临床资料和实验室对病原菌的分离鉴定并复习相关文献。结果 两例患者均有慢性阻塞性肺部疾病史及多种基础疾病,临床表现为发热、咳嗽、喘息等,胸部影像学显示肺部斑片状高密度影;实验室检测G试验和GM试验均为阳性;痰液直接涂片镜检可见隔菌丝,分支45°角,分离菌经质谱和测序分析确定为构巢曲霉。临床根据病原学结果改用伏立康唑治疗后患者症状及体征好转出院。结论 构巢曲霉致肺曲霉病相对少见,病原学诊断对临床早期有效治疗肺曲霉病很重要。

【关键词】构巢曲霉;肺曲霉病;基质辅助激光解析电离飞行时间质谱

Clinical characteristics and etiological analysis on two cases with pulmonary aspergillosis caused by *Aspergillus nidulans* Wang Yuying, Cao Jingrong, Lan He, Zhao Yue, Xie Wei, Wang Yan, Min Rong, Wang Peichang. Department of Laboratory, Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Beijing 100053, China
Corresponding author: Cao Jingrong, Email: 13683581168@126.com

【Abstract】Objective To investigate the characteristics of clinic and pathogen of pulmonary aspergillosis caused by *Aspergillus nidulans*. Methods Data of two hospitalized patients with chronic obstructive pulmonary disease in Xuanwu Hospital of Capital Medical University in January 2017 were collected. The clinical and laboratory data of the two cases were analyzed, respectively. The isolation and identification of pathogenic fungus were determined, and the literature was reviewed. Results Two patients both had a history of long-term chronic obstructive pulmonary disease and a variety of underlying diseases. Clinical manifestations were high fever, cough, wheezing and so on. Chest imaging showed that pulmonary patchy high-density shadow. The isolate was identified as *Aspergillus nidulans* by sequencing and matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Patients' symptoms and signs improved after treatment by voriconazole. Conclusions Pulmonary aspergillosis caused by *Aspergillus nidulans* is relatively rare, and etiological diagnosis is important to early effective treatment.

【Key words】*Aspergillus nidulans*; Pulmonary aspergillosis; Matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry

曲霉属是一种常见的真菌,近年来,曲霉已成为引起侵袭性真菌感染的第二位条件致病真菌和真菌感染的第一位死因,曲霉感染主要导致肺曲霉病(约占80%~90%)^[1]。构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)是曲霉的一种,广泛存在于土壤中,为存在于环境中的条件致病菌,较曲霉其他种属引起的感染相对少见^[2-3],可导致肺、脑、骨、眼睛、鼻窦及皮肤等^[3]各部位感染及全身播散性感染。2017年1月首都医科大学宣武医院于2例慢性阻塞性肺部疾病患者中分离出构巢曲霉,现将其临床和病原学特征报道如下。

一、病例的临床资料

1. 病例1:患者,男性,88岁,因“发热、咳嗽、咯痰1月余,加重伴咯血5 d”于2017年1月6日入院。患者于1月余前出现发热,体温高达38.4℃,并出现咳嗽,呈阵发性,夜间加重,伴咯痰,自诉黑色黏液痰,并伴有流鼻涕打喷嚏症状,无盗汗、乏力、胸闷、胸痛咯血、活动后气促症状。

胸片示右肺下野可见斑片状模糊影。给予哌拉西林/舒巴坦5 g、1次/8 h,抗感染后体温恢复正常,咳嗽、咯痰症状缓解。5天前晚上无明显诱因出现发热(38℃),伴轻微畏寒、无寒战;咳嗽咯痰加重,自诉咯黑色黏痰,易咯出,无胸闷、胸痛,无喘息、气短,无夜间阵发性呼吸困难。胸片示两肺间质纤维化改变,符合慢性支气管炎的临

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2018.04.019

基金项目:首都医科大学校长基金(No.2016JYY96);

作者单位:100053 北京,首都医科大学宣武医院检验科

通信作者:曹敬荣,Email:13683581168@126.com

床表现,以慢性支气管炎并感染收入院。患者既往有慢性阻塞性肺病史20余年,冠心病史20年,7年前面部皮肤鳞癌术后,症状性癫痫5年,前列腺增生病史多年,1年前胸部CT可见“肺气肿、肺大疱”征象,诊断为慢性支气管炎。

入院查血常规结果显示:WBC: $11.05 \times 10^9/L$,中性粒细胞: $9.83 \times 10^9/L$,给予哌拉西林/舒巴坦5 g、1次/8 h抗感染治疗,患者咳嗽、咯痰症状有所好转,但仍发热,最高体温37.8℃。查胸部CT示双肺斑片状密度增高模糊影,两肺上叶小片状透亮区,两肺上叶尖段多发条索影,右肺中下叶及左肺下叶斑片状高密度影(图1A)。改用米诺环素、头孢哌酮/舒巴坦抗感染治疗。1月9日痰涂片找见真菌菌丝,痰培养结果为曲霉属,查1,3- β -D葡聚糖(G试验)和半乳甘露聚糖(GM试验)阳性后多次痰培养均为曲霉生长,给予伏立康唑200 mg、1次/12 h抗曲霉治疗,患者症状好转,咳嗽、咯痰减轻,无胸闷、喘息和气短。考虑患者高龄,1月16日减量为100 mg、1次/12 h抗曲霉治疗。1月18日患者胸部CT示右肺上叶片状模糊影较前范围扩大,右肺前裂增厚,密度增高同前,余两肺上叶小囊状透亮区及双肺多发条索影大致同前(图1B)。于2017年1月20日出院,继续口服伏立康唑100 mg、1次/12 h,疗程至少3个月。

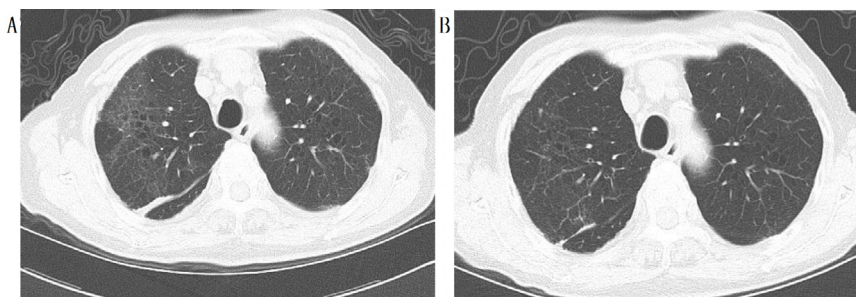
2. 病例2: 患者,女性,60岁,因“发作性喘息25年,下肢水肿10年,加重1周”于2017年1月7日入院。患者于25年前感冒后出现喘息,伴有胸闷、气短及心悸,吸气尚可,呼气费力,伴有咳嗽,咯白色黏痰、量少,查肺功能确诊支气管哮喘,后上述症状反复发作,多于冬春季节发作,性质同前,每年发作1~3次。10年前喘息发作后出现下肢水肿,呈凹陷性,服用利尿药后水肿消退。1周前感冒后再次出现喘息,性质同前,喘息症状较前加重,吸入异丙托溴铵后缓解不明显,就诊于本院呼吸门诊且诊断为慢性阻塞性肺病,给予头孢曲松等抗炎对症治疗,自觉症状无明显缓解就诊急诊科,以肺部感染收住院。既往有高血压病史10年,血压控制在150/80 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa),2型糖尿病病史10年,血糖控制不佳。

入院查体T: 37.1℃,胸廓呈桶状胸,肋间隙增宽,双肺呼吸音粗,双肺闻及湿性啰音及弥漫性呼气末哮鸣音,心律齐,未闻及异常杂音,腹软无压痛,无下肢水肿。查血常规、C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)均正常,给予低流量吸氧、哌拉西林/舒巴坦+依替米星抗炎、甲泼尼龙琥珀酸钠(甲强龙)平喘等治疗,患者仍间断咳嗽、喘息。查胸部CT示双肺纹理清晰,左肺尖斑片状钙化灶,右肺上叶后段条片状高密度影,邻近胸膜增厚牵拉改变,右下胸膜增厚。1月9日送检痰涂片找见真菌菌丝,痰培养结果为曲霉属,查G+GM试验阳性,之后多次痰培养均为曲霉生长,加用伏立康唑200 mg,1次/12 h抗曲霉治疗,患者喘息症状好转,咳嗽、咯痰较前减轻,于2017年1月23日出院,继续口服伏立康唑100 mg,1次/12 h至少3个月。

二、病原菌培养与鉴定

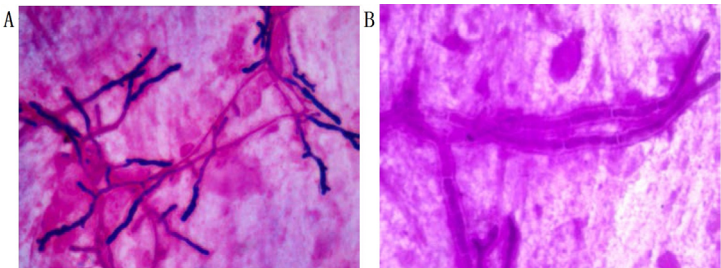
1. 病原菌培养与形态学检查: 痰标本均均匀涂抹玻片进行革兰染色镜检,观察白细胞数及细菌形态学特点,取黏稠部分接种于哥伦比亚血平板、中国蓝平板和沙保弱平板(sabouraud agar, SDA),分别置于培养箱35℃和28℃培养24~48 h后观察菌落特征,纯培养菌落进行乳酸酚棉兰染色观察镜下形态,根据菌落与镜下形态特点初步判定丝状真菌种类。

2. 病原菌鉴定: 采用质谱Biotyper 3.1(布鲁克公司)和PCR扩增测序进行鉴定。质谱鉴定方法为将纯培养菌落用湿棉签刮取1~2 cm直径重悬于70%乙醇900 μ l,12 000 r/min离心2 min(离心半径r = 6 cm),弃上清。加入50 μ l新鲜配制的70%甲酸混匀,加入50 μ l乙腈涡旋混匀,12 000 r/min离心2 min。取上清1 μ l点样于靶板上,室温干燥后加1 μ l基质,室温干燥后将靶板放入质谱仪进行检测。分值>2.00分鉴定到种水平;1.70~1.99分鉴定到属水平;<1.70分表示鉴定结果不可靠。基因组DNA提取按天根酵母基因组DNA提取试剂盒与破壁酶进行,合成引物ITS1和ITS4(上海Invitrogen公司合成)进行PCR扩增和测序,Taq PCR Master Mix(天根生化科技有限公司),测序结果登录GenBank进行Blast比

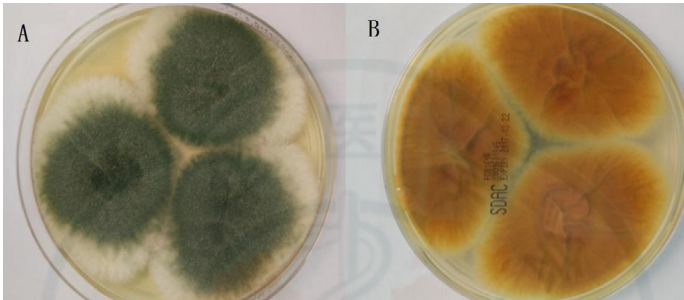


注: A: 2017年1月6日胸部CT,双肺斑片状密度增高模糊影,两肺上叶小片状透亮区,两肺上叶尖段多发条索影,右肺中下叶及左肺下叶斑片状高密度影;B: 2017年1月18日胸部CT,右肺上叶片状模糊影较前范围扩大,右肺前裂增厚,密度增高同前,余两肺上叶小囊状透亮区及双肺多发条索影大致同前

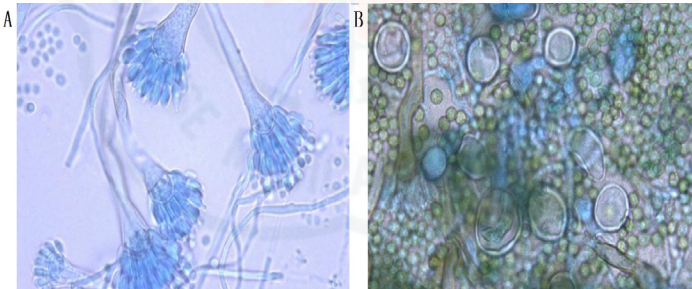
图1 病例1胸部CT



注：A：病例1痰标本，B：病例2痰标本
图2 痰标本直接镜检革兰染色（×1 000）



注：A：菌落正面；B：菌落背面
图3 SDA 28 °C 培养1周菌落



注：A分生孢子头，双层梗；B壳细胞
图4 乳酸棉酚兰染色（×1 000）

对鉴定丝状真菌种类。

三、结果

1. 病原菌形态学特点：痰标本直接镜检可见鹿角样分隔真菌菌丝，呈45°分叉（图2）。痰标本接种血平板和沙保弱平板（SDA）35 °C/28 °C培养24 h可见绒毛片状菌落生长。在SDA培养基上3~7 d可见中间墨绿色、边缘白色绒毛片样菌落（图3），闭囊壳形成为浅黄色到黄色或紫褐色，白边，并不规则沟纹（图3A），背面呈浅黄色、棕橙色或深紫红色（图3B）。乳酸棉酚兰染色镜下可见分生孢子梗光滑、短，顶囊半球形，双层瓶梗，梗基和瓶梗等长，仅在顶囊上半部分形成；分生孢子为圆形、光滑或稍粗糙（图4A），可见壳细胞（图4B），延长培养时间至14 d可见红色子囊孢子。

2. 病原菌鉴定：2例患者分离菌采用质谱鉴定均为构巢曲霉（分值为2.002和2.011）；PCR扩增测序分析可鉴定为构巢曲霉，与GenBank中Aspergillus nidulans（JN938911）

的同源性≥99%。

讨论 曲霉属是自然界广泛存在的一类腐物寄生真菌，使人类致病的曲霉主要包括烟曲霉（80%~90%），其次为黄曲霉和黑曲霉等^[1, 4-5]。构巢曲霉引起人类感染和侵袭性肺曲霉病的报道也较少^[2-3, 6]，本研究中2例构巢曲霉肺部感染病例为少见报道。

肺曲霉病是曲霉感染或人体吸入曲霉病原引起的一组急慢性肺部病变，临床表现多样，缺乏特异性表现。研究认为机体免疫力下降易受曲霉侵袭而感染^[4, 7-8]，其危险因素有糖皮质激素和免疫抑制剂的长期使用、恶性血液病、人类免疫缺陷病毒（human immunodeficiency virus, HIV）感染、慢性基础疾病（如哮喘、慢性阻塞性肺病以及糖尿病等）、创伤及大手术和长期广谱抗菌药物使用等。近年来，慢性阻塞性肺病（chronic obstructive pulmonary diseases, COPD）并发肺曲霉病的报道呈不断增加趋势。本研究中2例患者均存在引

起侵袭性肺曲霉病的高危因素:老年/高龄,存在多种基础疾病史(高血压、糖尿病等)、COPD病史及长期使用抗菌药物/糖皮质激素导致呼吸道菌群失调等。

因肺曲霉病危害大、病死率高,故早期快速准确的病原学诊断对临床有效诊治意义重大。2016年指南指出痰或支气管镜标本显微镜下发现菌丝有分隔、分支呈45°角、呈放射状或珊瑚状排列的真菌菌丝强烈提示曲霉感染^[7-8]。本研究2例患者痰标本均多次检测到分隔真菌菌丝,对临床早期诊治提供了帮助。病例一患者出现咯黑色痰,考虑为曲霉侵犯血管致血管壁损伤所致。研究发现真菌G试验+GM试验可提高诊断曲霉感染的灵敏性与特异性^[9],2016年新发布的曲霉治疗指南^[8]也将GM试验作为强推荐级别,本研究2例患者真菌G和GM试验均为阳性,为临床诊断提供了实验室支持。乳酸酚棉兰和透明胶带法^[10]可观察丝状真菌完整的典型真菌孢子形态特征,在真菌形态学鉴定中发挥重要作用。本研究2例构巢曲霉在培养3 d时形态学易于杂色曲霉混淆,当继续培养至7 d后观察到特征性孢子和壳细胞而确定病原诊断。有研究表明PCR扩增真菌通用引物(ITS)并测序可用来准确地鉴定曲霉属的不同种^[11],本研究2例患者病原真菌经测序并与GenBank中数据(JN938911)比较均鉴定为构巢曲霉,同时本研究2例构巢曲霉均经质谱鉴定(得分均>2.0分)^[12-14]。临床依照指南^[7-8]结合高危因素、临床表现、影像学、微生物学等检查结果诊断为肺曲霉病,使用伏立康唑抗真菌治疗,患者症状体征均由好转,提示治疗有效。

丝状真菌感染的诊断技术不断提高和发展,但对医护人员和实验室人员仍面临巨大挑战,二者合作和沟通对正确的诊治至关重要。因此,实验室人员应提高鉴定水平,熟悉和掌握不同丝状真菌的特点,通过菌落形态、镜下形态(有分隔丝、曲霉头、双层瓶梗、闭囊壳、壳细胞等特殊镜下结构)结合多种鉴定手段(分子学方法和质谱技术等)综合分析,并及时与临床沟通,结合该类患者患病的危险因素^[15]及各种辅助检查,才能做到早期、准确的病原诊断,协助临床及时正确诊治。

王育英,曹敬荣,兰贺,等. 构巢曲霉致肺曲霉病患者二例临床特征和病原学分析[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版),2018,12(4):413-416.

参 考 文 献

- [1] Ksomidis C, Denning DW. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis[J]. Thorax,2015,70(3):270-277.
- [2] Prasanna S, Grover N, Bhatt P, et al. A case of aspergillus nidulans causing white granule mycetoma[J]. Med J Armed Forces India,2016,72(1):88-90.
- [3] 南海静,崔春莲,张萌,等. 构巢曲霉菌引起侵袭性真菌性鼻窦炎1例[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2016,30(18):1486-1487.
- [4] 尹秀云,梁钰英,于农,等. 临床少见丝状真菌的实验室诊断[J]. 军事医学,2015,39(11):855-858.
- [5] 施中凯,胡晓丽,张昌秋,等. 35例丝状真菌实验室诊断及药敏分析[J]. 中国继续医学教育,2017,9(7):45-47.
- [6] Negri CE, Goncalves SS, Xafranski H, et al. Cryptic and rare Aspergillus species in Brazil: prevalence in clinical samples and in vitro susceptibility to triazoles[J]. J Clin Microbiol,2014,52(10):3633-3640.
- [7] Denning DW, Cadranet J, Beigelman-Aubry C, et al. Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management[J]. Eur Respir J,2016,47(1):45-68.
- [8] 唐晓丹,李光辉. 2016年美国感染病学会曲霉病诊断处理实践指南[J]. 中国感染与化疗杂志,2017,17(4):456-462.
- [9] Cai XJ, Ni WT, Wei CI, et al. Diagnostic value of the serum galactomannan and (1, 3)- β -D-glucan assays for invasive pulmonary aspergillosis in non-neutropenic patients[J]. Intern Med,2014,53(21):2433-2437.
- [10] 冯长海. 改良透明胶带法在丝状真菌形态观察中的应用[J]. 临床检验杂志,2017,35(10):748-749.
- [11] Paholcsek M, Fidler G, Konya J, et al. Combining standard clinical methods with PCR showed improved diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematological malignancies and prolonged neutropenia[J]. BMC Infect Dis,2015,15(1):251-252.
- [12] 吴友伟,石红,刘万静,等. MALDI-TOF-MS技术快速鉴定丝状真菌的临床评价[J]. 检验医学与临床,2017,14(21):3155-3156, 3159.
- [13] Masih A, Singh PK, Kathuria S, et al. Identification by molecular methods and Matrix-Assisted laser desorption Ionization-Time of flight mass spectrometry and antifungal susceptibility profiles of clinically significant rare aspergillus species in a referral chest hospital in Delhi, India[J]. J Clin Microbiol,2016,54(9):2354-2364.
- [14] 王欢,贾天野,鲍春梅,等. 质谱仪在真菌鉴定中的应用与评价[J]. 传染病信息,2015,28(4):210-214.
- [15] 黄晨. 重症哮喘患者口腔真菌感染危险因素及护理经验[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版,2016,10(6):739-742.

(收稿日期:2017-12-21)

(本文编辑:孙荣华)