

12 例播散型组织胞浆菌病病原学调查

李霞 李杰 冯国琴 桂希恩 曾宪昌

【摘要】 目的 调查湖北地区播散型组织胞浆菌病(PDH)的流行情况。方法 将分布在湖北省 8 地市 12 例原诊断为黑热病患者的骨髓片重新镜检,部分患者外周血及骨髓制片镜检,骨髓、外周血及肝脾组织接种梅里埃双相培养基(MLI),获单个菌落后转种 BHIB、SDA、CMA 培养基置 25℃ 和 35℃ 孵育。将骨髓、外周血或分离培养的酵母相组织胞浆菌(*H. cap*)制成浓菌液腹腔接种昆明种小鼠和裸鼠,待其发病后取其脾组织镜检及培养,观察其特征。用菌丝相和酵母相 *H. cap* 接种尿素酶(URE)、明胶(GEL)25℃ 和 35℃ 培养;采用组织胞浆菌素皮下注射患者,观察反应;应用两性霉素 B(AmB)治疗。结果 12 例患者骨髓片中单核-巨噬细胞内未见桑葚状细胞团、腊肠状细胞,1 例发现杜利体,11 例真菌孢子的胞浆中无动基体,未发现横隔;*H. cap* 的 URE 反应阳性,不液化 GEL,25℃ 孵育时为菌丝相,未见帚状枝及孢子链,发现特征性齿轮状大分生孢子,不产生红色色素,35℃ 孵育时为酵母相,未见腊肠状孢子及横隔,镜下可见酵母相孢子。昆明种小鼠和裸鼠的脾组织可分离培养出 *H. cap*,其与马尔尼菲青霉菌、杜波伊斯胞浆菌等双相型真菌的菌丝相和酵母相菌落特征、镜下形态及生化反应有不同特点。结论 湖北地区有 PDH 的散发流行,且东南部发现率高于西北部,其临床诊断的金标准是真菌培养及动物接种,在其治疗时应首选 AmB。

【关键词】 组织胞浆菌病 播散型;真菌;双相型真菌

A primary investigation on disseminated histoplasmosis in Hubei LI Xia, LI Jie, FENG Guo-qin, GUI Xi-en, ZENG Xian-chang. The Clinic Laboratory of Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, China

【Abstract】 Objective To investigate the epidemiologic features of disseminated histoplasmosis (PDH) in Hubei province. **Methods** Bone marrow smears of 12 patients diagnosed as Kala-azer in Hubei province including 4 patients in Jingsan, 2 patients in Shashi and each 1 in Yichang, Jinmen, Zhongxiang, Luotian, Xianning and Guanghua respectively were re-examined under microscope. Peripheral blood and bone marrow smears of several patients were detected. After inoculated the bone marrow, peripheral blood, liver and spleen tissue of patients in MLI, the single colony was trans-inoculated in BHIB, SDA and CMA and incubated at 25℃ and 35℃. Bone marrow, peripheral blood and bacterial fluid of yeast-phase *Histoplasma capsulatum* (*H. cap*) were injected into the abdominal cavity of Kunming mice and nude mice. When symptoms and signs developed, the spleen tissue was separated, then observed under microscope and cultured. Mycelium-phase and Yeast-phase *H. cap* were inoculated in urase and gelatin medium, then incubated at 25℃ and 35℃. Histoplasmin was injected subcutaneously into patients, and then followed for 48-72 hours. Amphotericin B was selected to treat the PDH patients. **Results** Moriform cell cluster and sausage-shaped cell were not observed in mononuclear-macrophages in the bone marrow smears from 12 patients. Leishman-Donovan body was found only in one patient. There wasn't kinetoplast in the cellular plasm of spores in 11 patients and no transeptae was found. The reaction of *H. cap* to urease was positive and *H. cap* did not liquefy the gelatin. It appeared to be mycelium-phase at 25℃ but no penicillus and catenulate conidia was found. The characteristic denticle macroconidia was observed but produced red coloring matter. It also appeared to be yeast-phase at 35℃. Yeast-phase spores were observed under microscope. No sausage-shaped spore and transeptae were identified. *H. cap* could be acquired in the spleen tissue in Kunming mice and nude mice. Bacterium forms, characteristics under microscope and biochemical reaction of mycelium-phase and yeast-phase *H. cap* were different from some other kinds of dimorphic fungi such as *Penicillium marneffei* and *Histoplasma duboisii* etc. **Conclusion** There were scattered epidemics of PDH in Hubei province. The detection rate of PDH was higher in the southeast area than in the northwest area. The golden standards of clinic diagnosis were mycological culture and inoculation to animals. Amphotericin B was recommended as the first choice for treatment.

【Key words】 Histoplasmosis, disseminated; Fungi; Dimorphic fungi

组织胞浆菌病是一种具有传染性的深部真菌病,经呼吸道传播,常致肺损害,严重者可引起全身播散累及单核巨噬细胞系统,称播散型组织胞浆菌病¹(disseminated histoplasmosis, PDH),而组织胞浆菌病的进行性肺部感染型、粟粒型、慢性型及进展性 PDH 若不及时有效治疗,多数致命。近年湖北省发现的黑热病患者,大多数锑剂治疗无效²。我们对其作了进一步调查和研究,发现绝大多数均为 PDH,现报告如下。

材料与方法

1. 材料:

(1)调查对象:湖北省疾病预防控制中心及湖北省医学科学院近年登记的 12 例“黑热病”患者,内脏型 11 例,皮肤型 1 例,其中男性 8 例,女性 4 例,年龄 16~50 岁,平均 27.7 岁;农民 4 例,工人 3 例,学生 2 例,兽医、教师、干部各 1 例,部分患者与狗有密切接触史。12 例患者均为当地居民,除 2 例外其余 10 例均无外出史。12 例患者分布在京山 4 例,沙市 2 例,宜昌、荆门、钟祥、罗田、咸宁、光化各 1 例。发现率较高的京山地区初步调查未发现中华白蛉。10 例曾用五价锑治疗,其中 9 例无效,1 例疗效不肯定,有 3 例转至外省治疗,本省死亡 5 例,所有患者均有长期发热、肝脾肿大、全血细胞减少症,其骨髓片由原诊治医院提供,患者取骨髓、外周血液及尸检肝、脾组织真菌培养和动物接种,均由我院进行。

(2)培养基:①梅里埃双相培养基(MLI)(BioMerieux,法国产品),脑心浸液血培养基(BHIB),按脑心浸液琼脂粉(美国 DIFCO 公司产品)配方说明,制成含 5%羊血高层斜面;沙保罗培养基(SDA)、玉米培养基(CMA),按传统配方配制成高层斜面。②尿素酶、明胶培养基(浙江省军区后勤部卫生防疫检验所产品)。

(3)动物模型:昆明种小鼠和裸鼠由武汉大学医学院动物室提供。

(4)利什曼抗原皮试液及抗体测试条:前者购自中国疾病预防控制中心(CDC);后者由中国 CDC 寄生虫病预防控制所管立人研究员惠赠(美国产品)。

(5)组织胞浆菌素:购自美国 Park-Davis 公司。

2. 实验室检查:

(1)骨髓片镜检:将原诊断为黑热病患者的骨髓片重新镜检,部分患者取骨髓制片,瑞氏染色,显微镜观察真菌孢子的结构特点。

(2)真菌培养及生化反应:取患者的标本接种于 MLI 中,25℃培养,获单个菌落后转种 SDA、CMA、BHIB 各 2 份,25℃和 35℃培养。将其菌丝相和酵母相接种于尿素酶及明胶中,25℃和 35℃培养。

(3)动物接种:将从 2 例患者的肝、脾组织分离培养出的酵母相制成浓菌液,取 0.5 ml 采用腹腔接种法接种昆明种小鼠;1 例患者的血液接种裸鼠及骨髓接种昆明种小鼠。

(4)黑热病皮试抗原试验及血清抗体检查:按其规定皮内注射并观察反应,抗体测试按其说明及判断标准进行。

(5)组织胞浆菌素试验:按说明书操作并观察反应。

结 果

1. 骨髓制片:

(1)11 例骨髓片中,光镜下大单核细胞内外未见腊肠状细胞、桑葚状细胞团,可见直径 3~5 μm,大小一致的圆形或卵圆形孢子,其边缘有未染色的空晕形似荚膜,是由于在染色过程中其细胞壁皱缩而形成,实际上并无荚膜,孢子内均未见横隔及动基体。

(2)1 例骨髓片内,光镜下可见巨噬细胞内有直径 2.9~4.0 μm,呈圆形或椭圆形的杜利体,经瑞氏染色后,细胞质呈浅蓝色,细胞核一个,呈淡紫色,有一个呈紫红色、细小杆状的动基体,结合利什曼抗原皮试、抗体检查结果及流行病学资料、锑剂治疗痊愈结果确诊为黑热病患者。

2. 真菌培养及生化反应:

(1)25℃呈菌丝相:SDA 及 CMA 上约 2 周可形成直径 3~4 mm 的白色绒毛状菌落,背面棕色,不产生红色色素,未见其渗入培养基现象,镜检可见细长、分枝、分隔的菌丝及大小分生孢子,未见帚状枝及孢子链;约 4~5 周可发现直径 10~17 μm 的具有齿轮状大分生孢子(图 1)。

(2)35℃呈酵母相: BHIB 及 MLI 上约 4 周可见直径 3~4 mm 的圆形、隆起、光滑、棕黄色菌落,镜检可见直径 3~5 μm,梨形孢子,单芽,芽颈细,未见腊肠状孢子及横隔(图 2)。

(3)25℃及 35℃尿素酶约 96 h 可出现弱阳性,而明胶 24~96 h 不液化,至第 20 天仍不液化。

3. 动物接种:腹腔接种后的昆明种小鼠和裸鼠,约 2 周发病死亡,其脾脏大单核细胞内均发现直径

约 3 ~ 5 μm 卵圆形孢子, 胞浆中未见横隔或动基体。

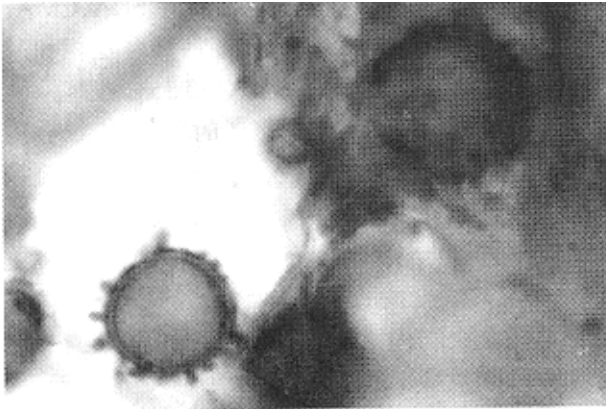


图1 荚膜组织胞浆菌菌丝相的特征性齿轮状分生大孢子(瑞氏染色, ×4 000)

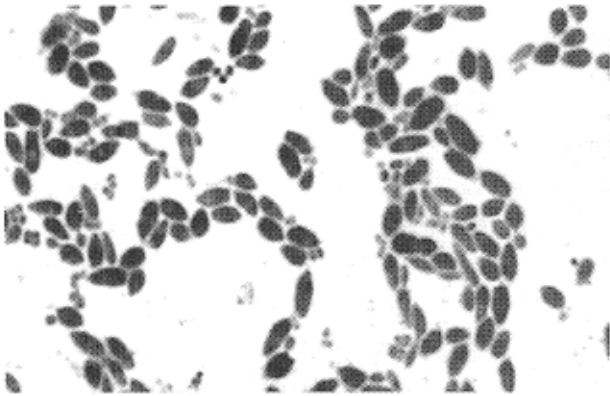


图2 荚膜组织胞浆菌酵母相,大小均匀的孢子(复红染色, ×4 000)

4. 黑热病抗原皮试试验及抗体检查 :4 例患者做了皮试试验,其中 1 例阳性,3 例阴性;5 例患者做了抗体检查,其中 1 例阳性,4 例阴性。

5. 组织胞浆菌素试验 :4 例患者皮下注射组织胞浆菌素 72 h 后,红肿硬结均 > 5 mm。

6. 治疗及愈后 :11 例 PDH 中有 3 例后转至外省治疗,本省死亡 5 例;有 3 例患者应用两性霉素 B (AmB) 治疗后均痊愈,随访 1 ~ 2 年均未复发。

讨 论

赵蓓蕾等^[3]、Wen 等^[4]报道南京地区、湖南省及四川省均存在组织胞浆菌人群感染。PDH 与肺结核临床症状相似,Zhao 等^[5]报道在 300 名正常人和 435 例住院患者(包括 246 例肺结核患者)中组织胞

浆菌素及结核菌素皮试均阳性者为 11.2%,提示同时感染两者的可能性较大,另一方面也可能是慢性肺组织胞浆菌的误诊。

感染的马、狗、猫、鼠及鸡、鸟、洞穴蝙蝠类排放的粪便是组织胞浆菌病的重要传染源,潮湿的土壤含有大量该菌并可以经呼吸道传染人类^[1],近年我省诊断的“黑热病”中,经确诊只有 1 例骨髓片中发现杜利小体,黑热病抗原皮试试验及抗体检查呈阳性反应且锑剂治疗痊愈,其余 11 例骨髓片所见病原体与杜利小体相似,但未见动基体或横隔、桑葚状细胞团、腊肠状细胞,发现酵母相的荚膜小孢子,真菌培养获得菌丝相的齿轮状分生大孢子,不产生红色色素,未见其渗入培养基现象;五价锑、戊烷脒、脾切除治疗均无效,临床症状体征符合 PDH 临床表现,而本组患者绝大多数无外出史且均生长在长江流域村镇,存在受感染机会,发现率较高的京山地区初步调查未发现中华白蛉并且湖北地区患者的骨髓、外周血或肝脾组织真菌培养、生化反应、动物接种均获完整资料,说明本地区存在 PDH 的散发流行。本组患者中有农民、工人、学生、兽医、教师、干部,部分患者与狗有密切接触史,推测病犬可能是主要传染源,也有可能是接触被组织胞浆菌菌丝相大小分生孢子污染的土壤(如耕地犁田、清扫鸡舍等),而经呼吸道感染发病。根据本组患者发病的区域来划分,湖北东南地区 PDH 的发现率高于西北部,此流行病学特点与 Wen 等^[4]、Zhao 等^[5]报道是一致的,而我国的组织胞浆菌病是由国外传入的还是国内原本就存在,还待进一步研究证实。

参 考 文 献

- 1 Bradsher RW. Histoplasmosis and blastomycosis. Clin Infect Dis, 1996, 22(suppl 2): s102-s111.
- 2 桂爱芳,胡乐群,左胜利. 湖北省黑热病流行与防治的回顾及现状. 中国寄生虫病防治, 1997, 10: 75-76.
- 3 赵蓓蕾,印洁,夏锡荣,等. 南京地区组织胞浆菌感染的流行病学调查. 中华流行病学杂志, 1998, 19: 215-217.
- 4 Wen FQ, Sun YD, Watanabe K, et al. Prevalence of histoplasmin sensitivity in healthy adults and tuberculosis patients in southwest China. J Med Vet Mycol, 1996, 34: 171-174.
- 5 Zhao B, Xia X, Yin J, et al. Epidemiological investigation of *Histoplasma capsulatum* infection in China. J Chin Med, 2001, 114: 743-746.

(收稿日期 2002-07-10)

(本文编辑:尹廉)