

• 个案分析 •

西弗射盾子囊霉引起外耳道炎 1 例*

张媛媛, 潘李燕, 鲁 莉, 智深深, 鄢文燕[△]

重庆大学附属中心医院/重庆市急救医疗中心检验科, 重庆 400014

关键词: 西弗射盾子囊霉; 病原菌培养; 菌种鉴定; 外耳道炎

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2022.24.026

文章编号: 1673-4130(2022)24-3070-03

中图法分类号: R446.5

文献标志码: C

西弗射盾子囊霉属于囊菌类酵母菌,其可通过有性繁殖在子囊中产生子囊孢子,虽与孢子丝菌属和念珠菌属同源,但二者形态与生长属性有明显区别^[1]。西弗射盾子囊霉是一种少见的机会致病真菌,目前对其致病性的研究较少^[2-3]。相关文献报道,西弗射盾子囊霉可能为人体表面或肠道中的正常菌群,当机体免疫力低下时,可引起甲沟、外耳道等部位的感染,严重时可导致患者腹膜、脑膜等部位的深部感染和系统性感染^[4-5]。本文报道了 1 例由西弗射盾子囊霉引起双耳疼痛、听力下降的病例,从该菌的形态学、培养鉴定技术、药物敏感性等方面阐述现代检验技术对临床少见病原菌菌种的鉴定和实施精准治疗的重要性。

1 病例资料

患者,男,64 岁,因“掏耳后双耳疼痛、听力下降、流液 5 d”就诊于本院耳鼻喉科门诊。患者双侧外耳道充血,可见白色分泌物附着,内部结构窥视不清。耳镜检查可见右耳道大量脓性分泌物,耳道皮肤充血,鼓膜充血水肿,下方小穿孔可见波动,表面分泌物附着;左耳道壁见白色霉菌附着,鼓膜充血。左耳分泌物真菌涂片荧光染色查见菌丝(图 1),故以真菌性外耳道炎收治入院。



注:箭头所示为真菌菌丝、孢子。

图 1 左耳分泌物显微镜检查结果(荧光染色,×400)

患者既往有高血压史,口服硝苯地平 1 片/天降压治疗,自诉血压控制尚可。入院后测血压 116/78 mm Hg,根据患者既往病史诊断为高血压。患者否认有糖尿病史,入院时查随机血糖为 11.57 mmol/L,完善口服葡萄糖耐量试验(OGTT)及糖化血红蛋白

等检查进一步明确诊断。OGTT 提示餐后 2 h 血糖显著升高,达糖尿病诊断标准,胰岛素及 C 肽释放试验结果提示患者存在胰岛素抵抗及胰岛素释放延迟,考虑为 2 型糖尿病。相关实验室检查结果:降钙素原(PCT) 0.08 ng/mL,白细胞介素-6(IL-6) < 0.01 pg/mL,糖化血红蛋白 6.8%,甘油三酯(TG) 3.74 mmol/L,尿酸 436 μmol/L,乳酸 2.72 mmol/L,尿糖++++,尿蛋白+。血常规、凝血功能、肝功能指标检测未见异常。

2 病原菌培养与鉴定

2.1 菌落形态及镜下形态 将左耳分泌物接种于哥伦比亚血琼脂培养基、嗜血杆菌巧克力琼脂选择培养基,于 35℃、5%CO₂ 条件下培养。24 h 后血平板可见未溶血葡萄球菌生长,巧克力平板未见菌落生长,将原始血平板、巧克力平板放入 CO₂ 孵箱继续培养。48 h 后巧克力平板上可见 2 个直径约 2 mm、表面干燥的白色菌落生长,经革兰染色,镜下可见真、假菌丝和孢子,菌体周围可见一层透明浅荚膜带(图 2)。

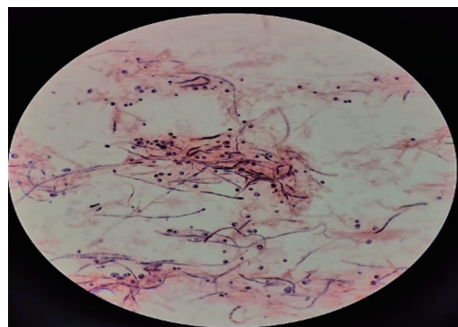


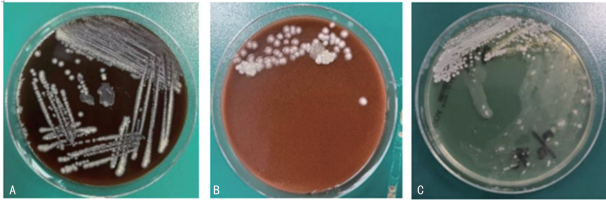
图 2 西弗射盾子囊霉孢子、菌丝(革兰染色,×1 000)

将巧克力平板上白色小菌落转种至沙保罗平板,原始血平板、巧克力平板继续于 35℃、5%CO₂ 条件下培养。96 h 后血平板上可见葡萄球菌与小菌落混合生长(图 3A),巧克力平板上见毛绒状菌落生长(图 3B);24 h 后沙保罗平板上见白色圆形菌落生长(图 3C)。将沙保罗平板继续于 35℃、5%CO₂ 条件下培养,至 11 d 时菌落逐渐变得干燥,表面可见脑回状皱褶,菌落与培养基镶嵌,不易挑取和研磨,见图 4。将沙保罗平板培养的菌落进行革兰染色涂片、镜检,镜

* 基金项目:重庆市渝中区基础研究与前沿探索项目(20210169)。

[△] 通信作者, E-mail: wwy_86@163.com。

下可见革兰阳性酵母样真菌及细长菌丝,孢子呈圆形或卵圆形,周围可见浅透明带,见图 5。



注:A 为血平板培养结果;B 为巧克力平板培养结果;C 为沙保罗平板培养结果。

图 3 病原菌培养结果



图 4 沙保罗平板培养 11 d 结果

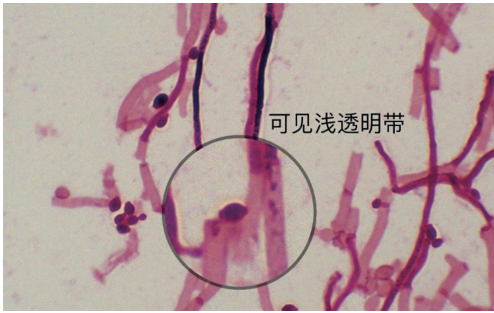


图 5 沙保罗平板培养 11 d 后菌落镜下形态 (革兰染色, $\times 1\,000$)

2.2 菌种鉴定

2.2.1 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱技术 (MALDI-TOF MS) 鉴定 取沙保罗平板上培养的纯菌落,将其点在质谱靶板上,加 $1\,\mu\text{L}$ 70% 甲酸溶液进行蛋白裂解,干燥后加 $1\,\mu\text{L}$ CHCA 基质液充分混匀,静置、干燥后在质谱仪上进行鉴定。质谱鉴定结果为西弗射盾子囊霉(置信度 75 分)。

2.2.2 Vitek 2 Compact 全自动微生物分析系统及配套 YST 鉴定卡鉴定 取沙保罗平板上培养的菌落,用 0.45% NaCl 溶液中配制成 2.0 麦氏浊度的菌悬液,采用 Vitek YST 卡进行鉴定,鉴定结果为西弗射盾子囊霉,可信度为 93.0%。

2.2.3 16S DNA 测序 采用 EasyPure[®] Genomic DNA Kit 试剂盒提取分离菌株的 DNA。使用真菌通用引物 ITS1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3', ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC -3' 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 $50\,\mu\text{L}$, 包括 $2\times\text{PCR Mix}$ $25\,\mu\text{L}$, 上、下游引物各 $2\,\mu\text{L}$, DNA 模板 $2\,\mu\text{L}$, ddH₂O $19\,\mu\text{L}$ 。阳性产物送重庆默赛乐生物技术有限公司测序,测序

结果经 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> 网站 BALST 比对,同源性为 99.74%。

2.3 药敏试验 采用 Sensititre YeastOne 进行真菌药敏试验,取沙保罗平板上的菌落制备成为 0.5 麦氏浊度的菌悬液,取 $20\,\mu\text{L}$ 菌悬液加入真菌药敏液中混匀,试剂板每孔加入混匀后的真菌药敏液 $100\,\mu\text{L}$,密封后于 $35\,^{\circ}\text{C}$ 孵育 48 h 后测得体外最低抑菌浓度 (MIC) 分别为阿尼芬净 $0.03\,\text{mg/L}$ 、米卡芬净 $0.03\,\text{mg/L}$ 、卡泊芬净 $0.03\,\text{mg/L}$ 、5-氟胞嘧啶 $2\,\text{mg/L}$ 、泊沙康唑 $0.25\,\text{mg/L}$ 、伏立康唑 $0.12\,\text{mg/L}$ 、伊曲康唑 $0.5\,\text{mg/L}$ 、氟康唑 $32\,\text{mg/L}$ 、两性霉素 B $2\,\text{mg/L}$ 。参照美国临床实验室标准化协会 (CLSI) M60S2、CLSI M59 和欧洲药敏试验委员会 (EUCAST) Version 9.0 中念珠菌药敏试验结果判定规则,该菌对氟康唑耐药。

3 治疗

给予患者外耳道疳疔冲洗,蔡替芬酮康唑乳膏外用,口服抗菌药物伊曲康唑胶囊 $0.2\,\text{g/d}$,微波治疗 2 次/天,每次 10 min。同时给予二甲双胍缓释片 $0.5\,\text{g}$ 2 次/天及达格列净片 $10\,\text{mg}$ 1 次/天联合降血糖治疗。治疗 12 d 后,患者双耳无明显流液,听力较前提高,双耳疼痛明显好转,外耳道通畅,充血好转,水肿吸收,双耳未见异常分泌物。

4 讨论

西弗射盾子囊霉属于酵母菌亚门、酵母菌纲、酵母菌目、酵母菌科,需与念珠菌、隐球菌鉴别。本例患者左耳分泌物直接涂片查见菌丝,根据涂片中菌丝、孢子的形态特点,可大致对真菌种属进行区分,可为临床经验性用药提供重要参考。标本直接涂片法经济易行,在快速识别真菌感染中具有重要价值。白假丝酵母菌在科玛嘉显示平板上呈翠绿色,生长速度明显快于西弗射盾子囊霉,菌落呈光滑奶油样,延长培养时间不能形成脑回状菌落。西弗射盾子囊霉在科玛嘉显色平板上形成中心蓝色、边缘白色的脑回状菌落。镜下白假丝酵母菌呈椭圆形,菌丝为假菌丝,墨汁染色无透明带,而西弗射盾子囊霉革兰染色可见厚壁孢子、芽生孢子,可见真菌丝和假菌丝,墨汁染色可见一层透明浅荚膜带,与新型隐球菌的厚荚膜有明显差别。

本病例采用病原菌培养、涂片染色及传统的生化反应完成了菌株鉴定,同时采用质谱技术 (MALDI-TOF MS) 鉴定菌株,两种方法鉴定结果一致,且后者的报告时间较前者缩短 24 h。最后采用 16S DNA 测序分析,证实此菌株为西弗射盾子囊霉,进一步验证了各种鉴定技术结果的一致性。近年来,各种少见致病菌或新的菌种被检出和发现,不但需要微生物检验人员不断深入了解和研究菌株的生物学特性与致病性,同时也需要充分应用新的检测手段,协助临床对疾病实现快速诊治。

西弗射盾子囊霉检出率较低,目前尚未建立该菌的 MIC 标准,实验室大多参照念珠菌的判定标准^[2]。西弗射盾子囊霉菌落干燥,且镶嵌在平板里,菌落不易挑取和混匀,因此实施药敏鉴定时需将菌落研磨后

调整菌悬液浓度。西弗射盾子囊霉对抗真菌药物的耐药性较高,主要表现为对氟康唑耐药,本例患者检出的菌株对氟康唑耐药,与相关文献报道一致^[6-7]。研究表明,真菌耐药机制主要与膜通透性降低、细胞壁合成障碍等相关^[8-9],西弗射盾子囊霉的耐药机制是否与已知的耐药机制一致尚需进一步研究。近年来侵袭性真菌的耐药率逐年上升,对少见菌株进行快速、准确地鉴定及药敏试验,对临床精准抗真菌治疗具有重要意义。

西弗射盾子囊霉是一种条件致病真菌,在免疫力正常的个体中极少致病或仅出现浅表感染。随着激素及其他免疫抑制剂类药物的广泛使用,西弗射盾子囊霉等少见真菌引起的感染逐年增多,尤其是合并恶性肿瘤、糖尿病、粒细胞减少症等基础疾病的患者,可能出现深部感染,甚至系统性感染,导致严重后果^[10-11]。目前报道显示,西弗射盾子囊霉浅表感染以耳部、皮肤、足部等较为常见,深部感染及系统性感染以腹膜、脑膜等最为常见^[12-14]。该菌可导致新生儿血流感染,慢性阻塞性肺疾病患者肺部感染,免疫功能低下患者血流和中心静脉感染等。在一项针对慢性腹泻患者的研究中发现,该菌可加重身体衰弱、免疫功能低下、幼儿及老年人等免疫功能低下人群腹泻的严重程度,导致严重脱水、营养不良,甚至休克。西弗射盾子囊霉可引起肿瘤患者和粒细胞减少患者发生播散性念珠菌病这一严重并发症,可引发患者发生脓毒血症、多器官功能衰竭,甚至死亡。本例患者入院随机血糖检测结果为 11.57 mmol/L,结合 OGTT 等相关检测结果,符合 2 型糖尿病的诊断,属于西弗射盾子囊霉感染的高危人群。西弗射盾子囊霉相关的慢性化脓性中耳炎常表现为耳道流脓,脓液呈黄色略带臭味,常伴耳鸣,甚至引起听力下降,严重影响患者的生活质量。本病例中患者年龄>60 岁,随着年龄的增长,皮肤黏膜屏障功能下降,免疫及其调节功能减低,易出现感染等其他并发症^[15]。因此,须尽快明确病原菌,根据药敏试验结果开展精准治疗,降低严重系统性感染的发生风险。

综上所述,对发生浅表感染的老年糖尿病患者进行病原学检测时应考虑少见真菌感染的可能。本研究通过镜下形态、菌落形态、生化反应初步识别病原菌,结合先进的检测技术快速鉴定病原菌并进行药敏试验,为临床早期开展精准治疗提供重要依据。同时,抗菌药物的敏感性降低不可避免,积极开展药敏试验,对发现和了解耐药性的传播以及降低耐药率也具有重要意义^[16]。因此实验室应综合利用多种检测方法,提高对少见病原菌的鉴定能力。

参考文献

[1] 马晓波,徐和平,房丽丽,等. 12 例慢性化脓性中耳炎分离

西弗射盾子囊霉的鉴定特征分析[J]. 临床检验杂志, 2017,35(10):770-772.

- [2] 唐秀雅,周万青. 西弗射盾子囊霉研究进展[J]. 中国真菌学杂志, 2021,16(5):351-355.
- [3] DANIELESCU C,CANTEMIR A,CHISELITA D. Successful treatment of fungal endophthalmitis using intravitreal caspofungin[J]. Arq Bras Oftalmol, 2017,80(3):196-198.
- [4] GUO P,WU Z,LIU P,et al. Identification and antifungal susceptibility analysis of stephanoascus ciferrii complex species isolated from patients with chronic suppurative otitis media[J]. Front Microbiol, 2021,12:680060.
- [5] GUARANA M,NUCCI M. Acute disseminated candidiasis with skin lesions;a systematic review[J]. Clin Microbiol Infect, 2018,24(3):246-250.
- [6] 贺文芳,周柯,周磊,等. 耳道分泌物分离出氟康唑不敏感西弗射盾子囊霉 1 例报道[J]. 检验医学, 2019,34(4):380-382.
- [7] AGIN H,AYHAN Y,DEVIRIM I,et al. Fluconazole, amphotericin B, caspofungin and anidulafungin resistant *Candida ciferrii*: an unknown cause of systemic mycosis in a child[J]. Mycopathologia, 2011,172(3):237-239.
- [8] CAPOTE-BAONTO F,BONATO D V, AYER I M, et al. Murine model for the evaluation of candiduria caused by *Candida tropicalis* from biofilm[J]. Microb Pathog, 2018,117:170-174.
- [9] EIX E F,NETT J E. How biofilm growth affects candida-host interactions[J]. Front Microbiol, 2020,11:1437.
- [10] DANIELESCU C,CANTEMIR A,CHISELITA D. Successful treatment of fungal endophthalmitis using intravitreal caspofungin[J]. Arq Bras Oftalmol, 2017, 80(3):196-198.
- [11] GARCÍA-MARTOS P,RUIZ-ARAGÓN J,GARCÍA-AGUDO L, et al. *Candida ciferrii* in an immunocompromised patient[J]. Rev Iberoam Micol, 2004,21(2):85-86.
- [12] DEMIRAY T,HAFIZOGLU T,KOROGLU M, et al. The first case of *Stephanoascus ciferrii* infection in a newborn and review of literature[J]. Nobel Medicus, 2015,2(3):97-100.
- [13] 宗春光,李军,闫妹妹,等. 腹透液中检出西弗射盾子囊霉 1 例[J]. 临床检验杂志, 2016,34(7):620.
- [14] 龚萍,王廷波,何锦屏,等. 西弗射盾子囊霉引起中耳炎 1 例[J]. 中国感染与化疗杂志, 2015,15(3):269-270.
- [15] 夏初,许向华,黄怡. 糖尿病合并侵袭性肺真菌感染的研究进展[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2021,44(2):128-131.
- [16] KARLOWSKY J A,LOB S H,DERYKE C A, et al. In vitro activity of ceftolozane-tazobactam, imipenem-relebactam, ceftazidime-avibactam, and comparators against *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected in United States hospitals according to results from the SMART surveillance program, 2018 to 2020[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2022,66(5):e0018922.

(收稿日期:2022-02-16 修回日期:2022-08-28)