

# 小型无绿藻的分离及形态特征

陈世平 索继江 虞瑞尧 冯 峥 谢 灵 胡冬梅 许 晖

(中国人民解放军总医院 北京 100853)

**摘要** 无绿藻 (*Prototheca*) 是一种少见的条件致病菌<sup>[1]</sup>, 可引起人畜共患的无绿藻病。在其所致人类疾病中, 主要有三种临床类型: 皮肤损害、局限性感染、系统性无绿藻病<sup>[2]</sup>。本文于 1997 年从一名女患者面部丘疹处的皮肤结节活检, 分离培养出一株无绿藻菌, 并进行了分离培养鉴定, 利用光学显微镜、电子显微镜对其形态特征和超微结构进行观察, 并通过直接组织压片和组织病理切片观察和生化试验特性, 确定为一例由小型无绿藻 (*Prototheca wickerhamii*) 引起面部感染的无绿藻病。并对无绿藻的生物学特性及其所引起的人类疾病, 进行了多方面的讨论。

**关键词** 条件致病菌, 无绿藻, 分离鉴定, 致病性

**分类号** Q936 **文献标识码** A **文章编号** ISSN-0253-2654(1999)-01-33-37

## PROTOTHECOSIS AND EXPERIMENTAL RESEARCH ON *PROTOTHECA WICKERHAMII*

Chen Shiping, Suo Jijiang, Yu Ruiyao, Feng Zheng, Xie Ling, Hu Dongmei, Xu Hui

(Chinese PLA General Hospital Beijing 100853)

**Abstract** *Prototheca* is a rare opportunistic pathogenic fungus, which can cause animal and human disease

known as protothecosis. There are three clinical types in human protothecosis: dermal lesion, meningitis and systematic protothecosis. A strain of *Prototheca* was isolated from a biopsied nodule specimen on the face of a woman patient in 1997, which was isolated and cultured on the basis of experimental studies of its physiological characters, examined under optic and electronic microscopes for its morphological and ultra-structural characteristics. The organism was also examined biochemically through direct tissue tableting and histopathologic section and this case of face infection was finally identified as protothecosis caused by *Prototheca wickerhamii*. The biological characters of *Prototheca* and the relating human diseases were also discussed in many aspects.

**Key words** Opportunistic pathogen, *Prototheca*, Isolation and identification, Pathogenicity

无绿藻(*Prototheca*)是一种单细胞生物,是绿藻的一种变种,广泛分布于世界各地,是一种少见的条件致病菌。自 Davies 等(1964)首次报道中型无绿藻(*P. zopfii*, 当时称 *P. segbwema*)所致人类无绿藻病后<sup>[3]</sup>,至1992年 Iacoviello 等综述时,已报道有60例无绿藻病的病例<sup>[4]</sup>。国内只见一例中型无绿藻感染致病的报道<sup>[5]</sup>。据文献统计,无绿藻中与人类及动物致病有关的只有小型无绿藻(*P. wickerhamii*)、中型无绿藻和大型无绿藻(*P. stagnora*)<sup>[1]</sup>。本文作者于1997年3月发现一例小型无绿藻病的病例,对其病原菌进行分离鉴定。并对无绿藻的生物学特性及其致病性进行了讨论。

## 1 材料与方法

24岁女性患者,左面部苹果酱色丘疹,小结节,融合成大斑块状。对病灶部皮肤及皮肤结节用2%碘酒和75%酒精消毒后,用环钻取皮肤及皮肤结节标本。分别直接压片、涂片后,在光学显微镜下进行观察,镜下可见皮下结节内有大量圆形、卵圆形或椭圆形孢子,大小不一,菌体透明,壁厚,内有1~8个分隔。无菌丝、芽孢及芽生现象,有空泡状孢子。

## 2 结果

### 2.1 培养及光学显微镜观察

在沙氏琼脂培养基、PDA培养基上,25℃、28℃、37℃、42℃分别培养,第2d开始生长,第3d生长出表面光滑湿润的酵母样菌落,白色或奶油色,呈乳酪样,第7d观察菌落逐渐丰满,而后表面出现少许皱褶,菌落背面为乳白色。而

42℃条件下培养和在含有放线菌酮的沙氏琼脂培养基中不生长。

光镜下观察未见菌丝及芽孢,见大量圆形、卵圆形或椭圆形单细胞孢子,大小不一,菌体透明,壁厚,内有1~10内生孢子,形如车轮状。见成熟的孢子囊壁破裂,内生孢子外溢,形成空泡状孢囊壳。无芽生现象(图1、2)。

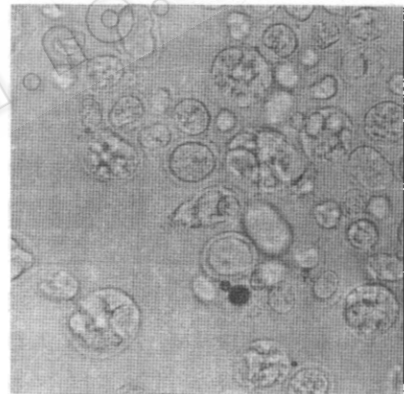


图1 培养物直接涂片,见小型无绿藻的孢子囊和孢子,孢子囊内有2~8个分隔(×340)

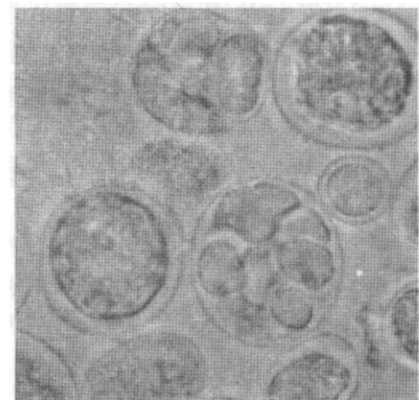


图2 油镜下可见透明的厚的孢囊壁和明显的分隔,内生孢子形态分明,见空孢子(×850)

## 2.2 电子显微镜观察

扫描电镜: 在低倍放大情况下表面尤似桑葚状或草莓状, 孢子大小不一, 表面凹凸不同。在稍高倍放大情况下可见一外孢子囊含有4个内孢子, 同时可观察到孢子分裂的胞壁形成。

透射电镜观察: 此菌缺少叶绿素, 有双层壁, 孢子囊直径2~12 $\mu\text{m}$ 和密度很高的胞壁及内生孢子导致内部的薄纱分层。单个内孢子的细胞壁较厚, 其内才是细胞膜, 胞浆内可见许多电子致密小体。孢子囊内有数个内生孢子, 孢子囊壁较厚, 透明, 折光性强(图3、4)。



图3 小型无绿藻单孢子壁厚, 胞浆内可见许多电子致密小体( $\times 10000$ )

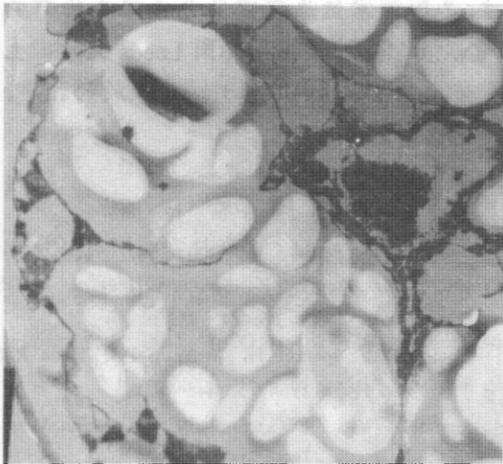


图4 母细胞壁厚, 透明, 内含多个单层膜子细胞( $\times 10000$ )

## 2.3 生化试验

采用标准化方法进行生化同化实验, 其结果: 半乳糖、蔗糖、麦芽糖、纤维二糖、木糖、海藻糖、松三糖、木糖醇、甘油、山梨醇、葡萄糖等生化反应阳性。而乳糖、甲葡萄糖苷、阿拉伯糖、棉子糖、乙酰葡萄糖胺、卫茅醇、侧金盏花醇、赤鲜醇、密二糖、放线菌酮、肌醇、硝酸盐、尿素等均均为阴性。后又用手工方法对半乳糖、蔗糖、海藻糖、甘油、葡萄糖、放线菌酮、肌醇等进行复查, 结果与仪器分析相同。

通过上述微生物学检查确定此病人所患疾病为面部皮肤无绿藻病, 其病原菌为小型无绿藻<sup>[1, 6~12]</sup>。

## 3 讨论

### 3.1 无绿藻病

此病由单细胞、需氧、无叶绿素的异养型的酵母样的无绿藻感染引起的人类及动物共患的慢性病<sup>[1]</sup>。从分类上讲, 最早描述无绿藻的是 Kruger 在 1894 年, 有 4 个种。Printz 在 1927 年始称为无绿藻。Ashford BK(1930)偶然从菌痢病人的粪便中分离无绿藻, 但未发现与人类疾病有关。最早发现无绿藻与动物疾病有关是在 1952 年由 Lerche M. 在牛乳腺炎中发现的<sup>[4]</sup>, 可感染动物: 马、猪、牛、狗、猫和实验动物。而使人类致病的报告最早是在 1964 年, 由 Davies 等从一稻农脚部活组织中分离培养获得的标本<sup>[3]</sup>, 确定为中型无绿藻 (*P. segbwema*) 引起的无绿藻病。

### 3.2 病例报道

据 Huerre-M 等人 1993 年综述了近 80 例无绿藻引起人类感染的病例, 分布为世界性的。主要在欧洲、亚洲(日本、泰国、中国等)大洋洲和美国(特别是在美国东南部)<sup>[2]</sup>。显示无绿藻病的发病有增加的趋势, 此后又有 10 余例病人被报道<sup>[5~6, 8~9]</sup>。据我们所知, 国人发现无绿藻病始于 1974 年前, 但未正式报道<sup>[4]</sup>。到目前共有五例, 其中香港(1976)一例, 台湾两例(1987, 1989)<sup>[12]</sup>, 大陆两例(1994、本例)<sup>[5]</sup>。但小型无绿藻所致无绿藻病在我国大陆尚属首次报道。

表1 无绿藻的常见种的生化反应特性<sup>[1, 5, 6, 12]</sup>

菌种类	葡萄糖	甘油	肌醇	半乳糖	海藻糖	丙醇	尿素	乳糖	硝酸盐	蔗糖	37℃生长
大型无绿藻 ( <i>P. stagnora</i> )	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-
中型无绿藻 ( <i>P. zopfii</i> )	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+
小型无绿藻 ( <i>P. wickerhamii</i> )	+	+	-	+ / W+	+	-	-	-	+	-	+

### 3.3 临床类型

从病例报道看,无绿藻致病有增长趋势,在临床上有三种类型<sup>[2]</sup>:皮肤或皮下感染:丘疹、斑、丘疹结节区;严格的局限型(占25%):如关节滑囊、筋膜、腱鞘炎,即无绿藻鹰咀滑液囊炎;系统性无绿藻病:罕见的播散性疾病,到目前为止,无绿藻可引起慢性脑膜炎、系统性红斑狼疮继发感染, AIDS 继发感染<sup>[11]</sup>,慢性腹膜透析病人感染,白血病人感染和结核病病人感染<sup>[11]</sup>等。其中有一半病例是局部或全身免疫受损的病人感染。一般传染发生在损伤接触后,无绿藻经常在人或动物的消化系统中<sup>[2]</sup>。

### 3.4 流行病学特征

关于无绿藻的流行病学特征目前知之甚少<sup>[1]</sup>,世界各地都有散在发现,但以沿海国家发病率为高;小型无绿藻比中型无绿藻发病多,但在感染动物上中型比小型的多;女性发病比男性多。在有水环境及有外伤或免疫功能受损者患病的机会大,总的说来本病比较少见。流行病学特点不明显。

### 3.5 鉴定与鉴别特征

无绿藻病的诊断与鉴别主要有三种方法:形态学方法,组织病理学方法和其它辅助方法,如生化实验,动物实验等。

**3.5.1 形态学方法:**在沙氏培养基上为白色或奶油色,呈乳酪样,光滑湿润酵母样菌落,37℃以上培养菌受抑制,在具有放线菌酮的沙氏培养基中受抑制,镜下可见有大量圆形、卵圆形或椭圆形孢子,大小不一,菌体透明,壁厚,内有1~8个分隔。无菌丝、芽生现象,有空泡状孢子。如用直接免疫荧光法染色更清楚<sup>[13]</sup>,种间

区别主要根据形态学大小和生化特性。

**3.5.2 组织病理方法:**在真皮层有大量的胶原纤维和炎症细胞,炎症细胞主要是淋巴细胞和嗜酸性粒细胞,其次为嗜中性粒细胞浸润,病原菌经 HE 染色在真皮浅层病灶区可见形如“桑葚状”或“雏菊样”大孢子,壁厚,大小不一,内可见1~6个内生孢子。孢子球形或卵圆形。

**3.5.3 生化特性:**主要看葡萄糖、甘油、肌醇、半乳糖、海藻糖、丙醇、尿素、乳糖、硝酸盐、蔗糖及37℃生长情况进行种和种间的分类(表1)。

鉴定本病要与白色念珠菌、新型隐球菌、白吉利毛孢子菌、红酵母菌、马拉色孢子菌、厚皮马拉色菌、和异常汉逊酵母菌、皮炎芽生菌、粗球孢子菌、鼻孢子菌、巴西副球孢子菌等鉴别,尤其是在组织病理切片观察时<sup>[5, 7]</sup>。

**致谢** 对西安杨森公司为病人治疗提供的伊曲康唑,美国国家健康研究所分子微生物部主任 KJ Kwon-Chung 教授和英国 Leeds 大学微生物科真菌参考实验室 EGV. Evans 教授的指导,表示衷心感谢。

### 参 考 文 献

- [1] Sudman MS. Am J Clin Pathol. 1974, 61(1):10~19.
- [2] Huerre M, Ramisse P, Solomon H et al. Bull Soc Pathol Exot. 1993, 86:484~488
- [3] Davies RR, Spencer H, Wakelin PO. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1964, 58:448~451.
- [4] Iacoviello VR, DeGirolami PC, Lucarini J et al. Clin Infect Dis. 1992, 15:959~967.
- [5] 吕桂霞,沈永年,吴绍熙等.中华皮肤科杂志, 1994, 27(3):139~140
- [6] Laeng RH, Egger C, Schaffner T et al. Am J Surg

- Pathol, 1994, 18(12):1261~1264.
- [7] 孙鹤龄. 医学真菌鉴定初编. 北京: 北京科学出版社, 1987, 340~341.
- [8] Mendez CM, Silva-Lizama E, Logemann H. Int J Dermatol, 1995, 34(8):554~555.
- [9] Matsumoto Y, Shibata M, Adachi A *et al.* Japan: Australas J Dermatol, 1996, 37:42~43.
- [10] Woolrich A, Koestenblatt E, Szaniawski W. J Am Acad Dermatol, 1994, 31:920~924.
- [11] Yip SY, Huang CT, Clark WH. J Dermatol, 1976, 3:309~315.
- [12] 官裕宗, 李育佳. 台湾医志, 1989, 88(7):747~751
- [13] Sudman MS, Kaplan W. Applied Microbiology, 1973, 25(6):981~990.