

无绿藻病的现状与发病原因分析

章强强

(复旦大学附属华山医院皮肤科, 上海 200040)

【摘要】 目的 了解我国无绿藻病的发病现状及流行病学特征。**方法** 通过对国际及国内已报道的无绿藻病相关文献的分析, 归纳其病因、发病机制、临床表现、诊断治疗及预后, 并对病原菌的分类、鉴定及体外药敏试验作描述。**结果** 根据众多对无绿藻病相关文献的综合分析, 导致人与动物致病的无绿藻现被确认为有 3 个种: 大型无绿藻、中型无绿藻及小型无绿藻。而与人类疾病相关的仅是中型及小型两种。无绿藻病的临床表现主要分为 3 类: 皮肤及皮下组织感染、滑膜炎及其纤维组织炎、系统性感染。**结论** 随着各种原因导致的免疫缺陷患者的增多, 无绿藻病的发病在全球有上升趋势, 此病呈慢性、无痛性, 未发现有自愈倾向。我国无绿藻病的诊断率可能远低于实际感染率, 无绿藻病的治疗至今尚无明确的方案及标准。

【关键词】 无绿藻; 抗真菌药物; 真菌鉴定

【中图分类号】 R 756 **【文献标识码】** B **【文章编号】** 1673-3827(2008)05-0260-05

无绿藻病是一种条件致病真菌无绿藻引起的较罕见疾病, 该菌作为绿藻的一个变种, 为一单细胞生物广泛存在于自然界, 可引起人与动物的感染。1964 年 Davies 首次报告 1 例中型无绿藻 (*Prototheca zopfii*) 所致的皮肤无绿藻病^[1], 患者为非洲农民, 由于足底反复外伤导致一个边界清晰的隆起性斑块, 在 3 年中皮损播及足底 1/3 的皮肤。我国大陆地区曾先后报道 5 例无绿藻病^[2-7], 其中皮肤型 3 例, 均为中型无绿藻引起; 小型无绿藻 (*Prototheca wickerhamii*) 所致脑膜炎 2 例。另有 1 例中型无绿藻波多黎各变种所致淋巴结炎待发表。台湾及香港区也相继报道过 10 例^[8-11], 均为皮肤型。在台湾农村无绿藻病显示了高发病率, 尤其以 30 岁以上的农民更为多见。

1 病因及感染途径

无绿藻病的病原体是一类属于条件致病真菌

的无绿藻属。目前, 其包括大型无绿藻 (*Prototheca stagnora*), 中型无绿藻, 小型无绿藻, *Prototheca ulmea*, *Prototheca blaschkeae* 5 个种^[12,13], 在生物学上处于真核生物 (*Eukaryota*)、绿色植物界 (*Viridiplantae*)、绿藻门 (*Chlorophyta*)、*Trebouxioleaceae* 纲、绿藻目 (*Chlorellales*)、绿藻科 (*Chlorellaceae*)、无绿藻属 (*Prototheca*)。无绿藻为直径约 3 ~ 30 μm 的单细胞微生物, 其细胞壁不含一般真菌所具有的葡糖胺, 生活周期又类似于绿藻, 由于它缺乏叶绿素可区别于藻类, 且在电镜下细胞壁是两层, 而非三层。无绿藻为无性繁殖, 通过生成内孢子进行不断繁殖, 在营养条件合适的情况下, 每 5 ~ 6 h 增殖一代。小型无绿藻的孢子囊直径约 3 ~ 10 μm , 中型无绿藻为 7 ~ 30 μm , 小型无绿藻的孢子囊为桑葚状, 有多分隔的结构, 内孢子常对称排列。而其他如中型无绿藻不形成这些结构。此菌广泛存在于污水、土壤、植物、生牛奶及动物身上, 对于人体其可寄居于指甲、皮肤、呼吸及消化道, 但在正常情况下不引起致病, 只有在创伤或机

作者简介: 章强强, 男 (汉族), 教授, 硕士研究生导师。E-mail: zhangqq8@163.com

体免疫力下降时,无绿藻可入侵致病^[14]。也有报道通过昆虫叮咬被感染^[15,16]。医院内获得性感染已有报道,均为外科及矫形手术时创口接触含致病菌的器械或溶液,或由于皮肤创伤后接触污染的水所致^[15,17]。据报道本病的潜伏期长短尚不十分明了,综合文献报道约 10 d~4 个月,但就创伤植入而言,一般在 2 周左右^[18]。现认为中性粒细胞的质与量在抗无绿藻的感染中发挥了重要的作用,多形核白细胞具有吞噬和杀灭此菌的功能,超微结构实验研究证实在有特异性 IgG-Ab 及热稳定血清调理素存在的情况下,病原菌被多形核白细胞吞噬后 60 min 被杀^[19,20]。目前认为使用糖皮质激素可以抑制淋巴细胞的活力,减弱中性粒细胞及巨噬细胞的吞噬作用^[16]。文献记载^[8,21] 农民、渔民、海产品处理工及水族馆的养护工更易感染无绿藻。

导致人与动物致病的无绿藻现今被确认为有 3 个种:大型无绿藻、中型无绿藻及小型无绿藻。现认为与人类疾病相关的仅是中型和小型两种^[14],且小型无绿藻更为常见。全球至今已有 117 例无绿藻病报道^[22],其中 77 例(66%)为皮肤及皮下组织感染,22 例(19%)为系统性感染,18 例

(15%)为滑膜炎及其纤维组织炎。在系统性感染病例中,59%治愈。无绿藻病可以是外源性也可以是内源性,通常不会传播。无绿藻病在欧洲,亚洲,非洲,大洋洲,南、北美洲均有发病报道。特别是南美洲发病较多。

2 真菌学特征及鉴定

无绿藻培养通常在 30℃ 72 h 可见菌落完全形成,但有些需在 25℃ 培养长达 1 周。其适温在 25~30℃ 之间,需氧或微需氧。菌落形态:潮湿、灰白色乳酪样,镜下结构呈圆形或椭圆形孢子,壁厚、无菌丝及芽孢,内含特征性的内孢子,酷似桑葚状或草莓状,这是一个重要特征,其数量与大小取决于培养基种类及培养时间。API 20C AUX、API 50、Vitek 酵母鉴定系统及 RapidID Yeast Plus test 等商业化酵母鉴定试剂板可帮助鉴定菌种,对海藻糖的利用是鉴别常见的中型无绿藻及小型无绿藻的主要手段。荧光抗体技术可以检验无绿藻属的感染,但不能确定种^[23]。但近年来发展的分子生物学的鉴定方法可将菌株鉴定至亚种或变种^[24]。碳源同化试验及相关的鉴别试验见表 1。

表 1 无绿藻属鉴别表^[22]

Tab.1 Identification and differentiation of *Prototheca*

特征	<i>P. wickerhamii</i>	<i>P. zopfii</i>	<i>P. blaschkeae</i>	<i>P. stagnora</i>
菌落形态	半球型,边缘光滑	平坦,中央纽扣状,边缘皱褶	平坦,中央纽扣状,边缘皱褶	平坦,边缘光滑
孢子直径	3~10 μm	7~30 μm		7~14 μm
甘油利用	+	+	-	+
蔗糖	-	-		+
海藻糖	+	-	-	-
丙醇	-	+		-
精氨酸	+	+	-	+
葡萄糖	+	+	+	+
半乳糖	±	-		+
克霉唑 (50 μg)	-	+		+
37℃	+	+	+	-
荚膜	-	-	-	+

组织病理学特征为孢子囊形态:圆形、卵圆形、椭圆形,内含数个厚壁内孢子,不出芽。HE 染色不明显,PAS 染色明显可见。小型无绿藻感染组织病理可见到桑葚样、草莓样孢子囊,当孢子囊内有许多分隔的母细胞(内孢子)就构成雏菊,轮柄样之车轮状排列,而中型无绿藻无上述特点。无绿藻须与罗伯罗伯菌(*Lacazia loboi*)、粗球孢子菌(*Coccidioides immitis*)、非洲型组织胞浆菌(*Histoplasma duboisii*)、皮炎芽生菌(*Blastomycos dermatitidis*)鉴别,罗伯罗伯菌可见多芽生繁殖,且芽生孢子与母细胞以窄颈连接,不能人工培养。球孢子菌的孢子囊较大(10~100倍),但其内孢子比无绿藻内孢子小,且量多。非洲型组织胞浆菌及皮炎芽生菌也为多芽生,但前者芽颈较细,而后的芽颈呈现宽基底。粗球孢子菌的厚壁球体直径为20~200 μm,不出芽,其含内孢子较无绿藻多而小,但其孢子囊却比无绿藻大10~100倍。

3 临床表现及诊断

无绿藻病的临床表现主要分为3类^[23,25,26]:皮肤及皮下组织感染、滑膜炎及其纤维组织炎、系统性感染。皮肤损害可表现为红斑、丘疹、结节、斑块等多种形态,也可呈浅表溃疡、疣状增生、疱疹样损害,多发生于暴露部位,如四肢与面部,为局灶性,多与创伤后病原菌侵入有关,有细胞免疫缺陷者损害易播散。滑膜损害通常发生于非开放性的损伤后或者肘部擦伤,数周后逐渐在局部呈现轻度红肿热痛,多发生在免疫系统正常的人群。系统性感染大多发生于糖尿病、慢性肾功能衰竭、器官移植、长期应用皮质类固醇、艾滋病、恶性肿瘤等细胞免疫低下或缺陷的患者。但在非免疫低下或缺陷的人群发病也有报道。据众多文献总结,严重的或播散性的病例多发生于细胞免疫低下或缺陷的患者。现认为无绿藻病中局限性皮肤型及关节型多发生于免疫系统正常的患者,播散性皮肤型及累及内脏主要发生于免疫系统缺陷的患者,细胞免疫的缺陷是系统性无绿藻病发病的基础。

据统计,至今虽大多报道都为皮肤型无绿藻病,但无绿藻甲病也已有报道^[27-29]。播散型脏器累及相对较为罕见。总之,该病进程发展较为缓慢,约50%的患者与上述内在疾病相关^[30,31](见表2)。

无绿藻病的症状尚无特异性,其诊断主要依靠

表2 无绿藻病与主要内在疾病的相关性^[22]

Tab. 2 Relationship between *Prototheca* infections and systemic diseases

内在因素	例数
局部或全身使用激素	24
血液恶性肿瘤或癌症	16
糖尿病	13
艾滋病	7
器官移植	6
外科手术	6
酒精中毒	4
腹膜透析	3

真菌学检查。标本的直接镜检、真菌培养及组织病理检查是主要手段。对无绿藻菌种的鉴定除了菌落形态、镜下结构外(含内孢子的孢子囊是无绿藻属的重要特征),糖类、醇类的同化利用,温度试验都有助于菌种的鉴定。组织病理学检查中,组织反应特征为炎性肉芽肿,伴坏死;巨大细胞、浆细胞、淋巴细胞、组织细胞的混合浸润;角化过度及假性上皮瘤性增生、局灶性角化不全、淋巴样组织增生、大量的慢性炎性细胞浸润,在真皮乳头层中部或其他感染组织可见孢子囊。在播散性感染病例中,胆囊、十二指肠及肝门可呈现嗜酸性细胞浸润及纤维化。PAS染色可清晰分辨病原菌的形态与结构,也可采用Gridley真菌染色法(Gridley fungus stain)或Grocott-Gomori氏六胺银改良法。

4 治疗及预后

近年来,随着各种原因导致的免疫缺陷患者的增多,无绿藻病的发病在全球有上升的趋势,此病呈慢性、无痛性,未发现有自愈倾向。作者曾经报道的1例小型无绿藻所致脑膜炎采用两性霉素B及伊曲康唑静脉滴注获得良好疗效^[6]。Takaki报告1例病程长达6年的小型无绿藻慢性脑膜炎,伴有播散性多脏器受累,经多种抗真菌治疗未见痊愈,但仍存活^[32]。吴绍熙^[33]及张金松^[5]分别报道1例皮肤无绿藻病,采用伊曲康唑静脉滴注及口服都获得良好疗效。Krcmery^[34]总结了108例无绿藻病,死亡率仅为2.2%。目前动物实验证实无绿

藻是一种低毒性的条件致病性真菌。无绿藻病的治疗至今尚无明确的方案及标准。现今国外一线治疗推荐两性霉素 B 或其脂质体, 众多临床应用已证实其有效性, 但由于其不良反应使患者难以耐受, 不少患者不得不改用其他抗真菌药物。二线推荐的药物为伏立康唑、伊曲康唑、氟康唑、酮康唑, 这些唑类药物具有中等抑菌活力。对于不同类型的无绿藻病, 其治疗方案为①皮肤型: 较局限的可作手术切除, 配合两性霉素 B 或唑类药物的外用, 感染病灶较深的需系统用药。②滑膜炎及其纤维组织炎: 作黏液囊切除术, 局部注射两性 B, 配合唑类药物的系统应用。③系统性感染: 首选静滴两性霉素 B, 与导管相关的感染应去除导管, 也可加服强力霉素或氟康唑。对于无绿藻体外药敏试验, 至今尚无美国临床实验室标准化研究所 (CLSI) 的标准、质控及 MIC 折点, 但多数实验室数据 (参照酵母药敏试验 CLSIM27-A2) 显示: 对两性霉素 B 敏感; 而对唑类 (氟康唑、伊曲康唑、伏立康唑) 呈现不同结果的报道; 抗细菌药物 (四环素、庆大霉素、丁胺卡那霉素) 也有部分敏感的报道; 但对氟胞嘧啶是耐药的^[22]。Linares^[35]测定了 104 株无绿藻, 显示其对伏立康唑均敏感, MIC $\leq 0.5 \mu\text{g/ml}$ 。体外药敏试验显示两性霉素 B 与四环素对抑制无绿藻有协同作用, 临床上通过采用局部使用两性霉素 B 联合口服四环素治疗 5 例皮肤无绿藻患者获得良好疗效^[36]。自 70 年代以来, 我国大陆、台湾及香港地区相继报道 15 例无绿藻病, 按照我国的人口及环境状况, 实际的无绿藻病发病率可能远远超过目前的报道数, 主要由于各地医院的发展仍很不平衡, 真菌检测技术及水平的参差不齐, 不少地区的医院尚未开展真菌学常规检查, 临床真菌检验技术力量偏弱, 人员也不足, 对无绿藻这一特殊的条件致病菌缺乏足够的认识, 导致目前无绿藻病的诊断率远低于实际感染率。因此, 提高医务人员对本病的认识水平十分重要。我国的真菌菌种资源丰富, 发现与积累病例及新菌种对提高我国医学真菌的研究水平及学术地位具有重要作用和深远意义。

参考文献

- [1] Davies RR, Spencer H, Wakelin PO. A case of human protothecosis. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1964, 58:448-451.
- [2] 吕桂霞, 沈永年, 吴绍熙, 等. 面部皮肤型无绿藻病国内首例报告. 中华皮肤科杂志, 1994, 27:139-140.
- [3] Shaoxi W, Guixia L, Yongnian S, et al. The first case of Proto-

thecosis zopfii in China. Chin Med Sci J, 2000, 15(2): 121-123.

- [4] Zhao J, Liu W, Lv G, et al. Protothecosis successfully treated with amikacin combined with tetracyclines. Mycoses, 2004, 47(3-4): 156-158.
- [5] 张金松, 刘志梅, 张信江, 等. 皮肤中型原藻病. 临床皮肤科杂志, 2006, 35(11): 705-706.
- [6] 章强强, 翁心华, 朱利平, 等. 小型无绿藻性脑膜炎及其真菌学研究. 中华皮肤科杂志, 2006, 39(8): 445-447.
- [7] 廖康, 陈冬梅, 罗兰, 等. 脑脊液分离威克原藻菌 1 例. 中华检验医学杂志, 2003, 26:180-181.
- [8] Chao SC, Hsu MML, Lee JYY. Cutaneous protothecosis: report of five cases. Br J Dermatol, 2002, 146:688-693.
- [9] Kuo TT, Hsueh S, Wu JL, et al. Cutaneous protothecosis: a clinicopathologic study. Arch Pathol Lab Med, 1987, 111:737-740.
- [10] Liu ST, Kuan YZ, Chan HL, et al. Cutaneous protothecosis: report of a case. Derm Sin, 1990, 8:213-219.
- [11] 官裕宗, 李育佳. 皮肤型无绿藻病台湾首例报告. 台湾医志, 1989, 88:747-751.
- [12] Roesler U, Müller A, Hensel A, et al. Diversity within the current algal species *Prototheca zopfii*: a proposal for two *Prototheca zopfii* genotypes and description of a novel species, *Prototheca blaschkeae* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol, 2006, 56:1419-1425.
- [13] Ueno R, Hanagata N, Urano N, et al. Molecular phylogeny and phenotypic variation in the heterotrophic green algal genus *Prototheca*. J Phycol, 2005, 41:1268-1280.
- [14] Cornelia LF, Manfred F, Eberhard G, et al. Disseminated Infection with *Prototheca zopfii* after Unrelated Stem Cell Transplantation for Leukemia. J Clin Microbiol, 2004, 42:4907-4908.
- [15] Sirikulchayanonta V, Visuthikosol V, Tanphaichitra D, et al. Protothecosis following hand injury. A case report. J Hand Surg, 1989, 14:88-90.
- [16] Wirth F, Passalacqua J, Kao G. Disseminated cutaneous protothecosis in an immunocompromised host: a case report and literature review. Cutis, 1999, 63:185-188.
- [17] Torres HA, Bodey GP, Tarrand JJ, et al. Protothecosis in patients with cancer: case series and literature review. Clin Microbiol Infect, 2003, 9:786-792.
- [18] DiPersio JR. Prototheca and protothecosis. Clin Microbiol Newslett, 2001, 23:115-121.
- [19] Carey W, Kaykova Y, Bandres J, et al. Cutaneous protothecosis in a patient with AIDS and a severe functional neutrophil defect: successful therapy with amphotericin B. Clin Infect Dis, 1997, 25:1265-1266.
- [20] Phair J, Williams J, Bassaris H, et al. Phagocytosis and algicidal activity of human polymorphonuclear neutrophils against *Prototheca wickerhamii*. J Infect Dis, 1981, 144:72-77.
- [21] Tejada E, CM Parker. Cutaneous erythematous nodular lesion in a crab fisherman. Protothecosis. Arch Dermatol, 1994, 130:244-247.

- [22] Lass-Flihl C, Mayr A. Human Protothecosis. Clin Microbiol Rev, 2007, 20:230-242.
- [23] Iacoviello VR, DeGirolami PC, Lucarini J. Protothecosis complicating prolonged endotracheal intubation; case report and literature review. Clin Infect Dis, 1992, 15:959-967.
- [24] 刘素玲, 冉玉平, 曾蔚, 等. 一种适用于 PCR 反应的酵母菌、无绿藻及丝状真菌 DNA 提取方法. 中国真菌学杂志, 2006, 1(6):340-342.
- [25] Wuscher N. Human protothecosis and environment. Bull Soc Pathol Exot, 1993, 86:484-488.
- [26] Leimann B, Monteiro P, Lazera M, ET AL. Protothecosis. Med Mycol, 2004, 42:106.
- [27] Marciano C, Feo M. *Prototheca zopfii* colonizing the nail. Mycopathologia, 1981, 75:89-92.
- [28] Galan F, Garcia-Matos P, Beltran M, et al. Onychoprotechosis due to *Prototheca wickerhamii*. Mycopathologia, 1997, 137:75.
- [29] Zaitz C, Godoy AM, Maria-Sousa V, et al. Onychoprotechosis: Report of the first case in Brazil. Int J Dermatol, 2006, 45, 1071-1073.
- [30] Leimann B, Monteiro P, Lazera M, et al. Protothecosis. Med. Mycol, 2004, 42:106.
- [31] Walsh SV, Johnson RA, Tahan SR. Protothecosis: an unusual cause of chronic subcutaneous and soft tissue infection. Am J Dermatopathol, 1998, 20(4):379-382.
- [32] Takaki T, Okada K, Umeno M, et al. Chronic Prototheca meningitis. Scand J Infect Dis, 1996, 28:321-323.
- [33] 吴绍熙, 吕桂霞, 姜伟群, 等. 无绿藻病. 临床皮肤科杂志, 2007, 36(2):127-128.
- [34] Krcmery VJ. Systemic chlorellosis, an emerging infection in human caused by algae. Int J Antimicrob Agents, 2000, 15:235-237.
- [35] Linares, MJ, Solis F, Casal M. In vitro activity of voriconazole against *Prototheca wickerhamii*: Comparative evaluation of Sensititre and NCCLS M27-A2 methods of detection. J Clin Microbiol, 2005, 43: 2520-2522.
- [36] Tying S, Lee P, Walsh P, et al. Papular protothecosis of the chest. Immunologic evaluation and treatment with a combination of oral tetracycline and topical amphotericin B. Arch Dermatol, 1989, 125:1249-1252.

[收稿日期] 2008-08-02

[本文编辑] 顾菊林

(上接第 259 页)

- [8] Verduyn Lunel FM, Meis J and Voss A. Nosocomial fungal infection; candidemia. Diagn Microbial Infect Dis, 1999, 34:213-220.
- [9] 周莺, 李玉华, 朱铭, 等. 儿童化疗后继发肝脾肾霉菌感染的 CT 检查价值. 中华放射科杂志, 2005, 39(5):517-519.
- [10] 陈纯, 薛红漫, 方建培, 等. 60 例儿童异基因造血干细胞移植后早期感染的临床分析. 中华医院感染杂志, 2007, 17(8):942-944.
- [11] 顾菊林, 温海, 廖万清. 儿童隐球菌性脑膜炎. 第二军医大学学报, 2002, 23:1344-1347.
- [12] 侯幼红. 马尔尼菲青霉菌病的研究现状. 中国真菌学杂志, 2007, 2(1):49.
- [13] 叶冬青. 皮肤病流行病学. 第一版. 北京:北京人民卫生出版社, 2001:440.
- [14] 王万卷, 耿松梅, 陈庆秀. 461 例皮肤科医生手足真菌病调查分析. CME 系列培训教材, 2006, 2(9):58-59.
- [15] 张申, 沈波, 荣菊芬. 2000~2006 年住院患者医院感染调查分析. 中华医院感染学杂志, 2008, 18(3):359-362.
- [16] 陆军, 祝进, 徐礼锋, 等. 重症监护病房深部真菌感染回顾性分析. 中华医院感染杂志, 2008, 18(2):284-286.
- [17] Sandven P, Bevanger L, Digraanes A, et al. Candidemia in Norway (1991 to 2003): Results from a nationwide study. J Clin Microbiol, 2006, 44(6):1977-1981.
- [18] Wisplinghoff H, Seifent H, Wenzel R, P et al. Current trends in the epidemiology of nosocomial bloodstream infections in patients with hematological malignancies and solid neoplasms in hospital in the United States. Clin Infect Dis, 2003, 36:1103-1110.
- [19] 卫凤莲, 温海, 张卉, 等. 甲真菌病局部治疗及研究进展. 临床皮肤科杂志, 2008, 37(5):333-335.
- [20] 王文娟, 梁伶. 深部真菌感染治疗和耐药的研究进展. 医学综述, 2008, 14(5):762-764.
- [21] 李君惠, 师晓东, 陈静, 等. 儿童急性白血病并发曲霉病的临床诊断和治疗——附 7 例临床病例报告. 中国小儿血液与肿瘤杂志, 2006, 11(2):69-72.
- [22] 张国琴, 何威逊. 新生儿侵袭性霉菌感染早期诊断和治疗研究近况. 临床儿科杂志, 2006, 24(7):546-547.

[收稿日期] 2008-07-30

[本文编辑] 顾菊林