

临床分离一株具有荚膜的白假丝酵母菌

马廉兰¹, 钟有添¹, 曾祥凤², 李坊贞¹, 刘志春¹, 张文平¹

(1. 江西赣南医学院微生物学教研室, 江西 赣州 341000; 2. 暨南大学组织移植与免疫教育部重点实验室, 广东 广州 510632)

摘要:【目的】观察白假丝酵母菌临床菌株的荚膜结构并探讨其形成条件。【方法】临床标本直接涂片染色镜检和用沙保氏琼脂平板、琼脂斜面及沙保氏液体培养基培养、用涂片革兰染色和 Hiss 荚膜染色镜检、出芽试验、厚膜孢子形成试验、糖发酵试验、小白鼠与家兔试验、扫描电镜与透射电镜观察等进行鉴定。【结果】(1)该临床分离菌为革兰阳性、念珠状菌;能形成芽管、假菌丝、厚膜孢子;能发酵葡萄糖和麦芽糖产酸又产气;发酵蔗糖产酸不产气;不发酵乳糖。(2)人阴道分泌物涂片、感染小白鼠及家兔体内及沙保氏液体培养基培养均可形成荚膜, 荚膜层的厚度可因不同环境及培养时间的长短而有差异, 但均 $\geq 0.2 \mu\text{m}$, 边界明显。沙保氏液体培养物经离心(1 500 r/min, 15 min, 3 次)荚膜层仍然可见。【结论】该菌株可被鉴定为具有荚膜的白假丝酵母菌。

关键词: 白假丝酵母菌/分离; 白假丝酵母菌/超微结构; 荚膜; 临床门诊, 医院

中图分类号: R379.4

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2005)04-封 2-03

Clinical Isolation of *Candida albicans* with Capsule

MA Lian-lan¹, ZHONG You-tian¹, ZENG Xiang-feng², LI Fang-zhen¹, LIU Zhi-chun¹, ZHANG Wen-ping¹

(1. Department of Microbiology, Jiangxi Gannan Medical College, Ganzhou 341000, China; 2. Key Laboratory of Ministry of Education for Tissue Transplantation and Immunology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: 【Objective】To observe and confirm the capsule structure of a clinical strain of *Candida albicans*. 【Methods】A clinical vagina specimen of a female patient with venereal disease was smeared on slides and meanwhile cultured on sabouraud agar medium by streak-plate method. Then the isolated colony was incubated in slant and liquid sabouraud medium. The yeast-like cells were identified by Gram staining and Hiss capsule staining microscope observation, and by budding development, clamydospore formation, sugar fermentation, animal test. In addition, electron microscopy of the organism was studied. 【Results】(1) The clinical strain was Gram staining positive and assumes prayer beads shaped. It can produce germ tubes, pseudohyphae and clamydospore, and can ferment glucose and maltose with acid and gas produced, can ferment sucrose with acid but no gas. But it can not ferment lactose. (2) Capsular structure with a thickness of $\geq 0.2 \mu\text{m}$ and a distinct borderline can be seen in the yeast-like cells on the smear from clinical vaginal specimen, infected mouse and rabbit tissues, liquid sabouraud medium. But the formation of the capsule was apparently related to culture environment and culture time. The capsule structure could still be seen after the liquid sabourard culture was centrifuged for 3 times at a speed of 1 500 r/min for 15 min. 【Conclusion】The clinical strain of *Candida albicans* has been identified with a capsule-like structure.

Key words: *Candida albicans* / isolation; *Candida albicans* / ultrastructure; capsule; out-patient clinics, hospital

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2005, 26(4):inside cover-back cover]

白假丝酵母菌(*Candida albicans*)即白色念珠菌是常见的条件致病性真菌。过去认为其不具荚膜^[1], 近来报道白假丝酵母菌可能具有荚膜结构^[2]。现从一女性性病患者的阴道分泌物中分离到一菌株也具有荚膜结构, 并对其荚膜的形成条件作了对比观察, 现报告如下。

1 材料与方 法

1.1 病例资料和菌株的分离与鉴定

患者王某, 女性, 23 岁。因阴道搔痒反复发作一年余, 长期药物治疗效果不佳于 2001 年 3 月 16 日就诊, 拟诊性病。用无菌棉拭子采集该女性阴道分泌物作淋球菌(GN)、衣原体(CT)、溶脲脲原体(UU)、人型支原体(MH)、单纯疱疹病毒 II-IgM (HSV-II-IgM)、霉菌等检测。结果显示: GN(-)、CT(-)、UU(-)、MH(-)、HSV-II-IgM(-); 涂片染色镜检可见 G-杆菌、多形核白细胞、大量 G+酵母样菌、长假菌丝, 经分离培养酵母样菌鉴定为白色念珠菌。鉴定程序参照“深部

(下转封 3 to inside back cover)

收稿日期: 2004-12-20

基金项目: 赣南医学院科研重点课题基金资助项目(200015)

作者简介: 马廉兰(1952-), 女, 江西赣州人, 教授。E-mail: malianlan@163.com

(上接封2 from inside front cover)

感染真菌的检验方法”^[3]进行鉴定,作出芽试验、玉米琼脂培养、糖发酵试验等。

1.2 荚膜的证实及其形成条件的观察

1.2.1 分泌物直接涂片染色镜检 用无菌棉拭子采集阴道分泌物直接涂片数张,分别进行革兰染色和 Hiss 荚膜染色^[4]。

1.2.2 沙保氏琼脂平板及液体培养物观察 按常规方法配制3种含糖量不同的培养基,葡萄糖含量分别为20、40、60 g/L。接种该临床分离菌株后37℃培养36~96 h。培养产物进行涂片染色镜检及压滴法镜检(沙保氏液体培养物同时作离心前后对比观察)。

1.2.3 动物体内荚膜形成实验 将该菌株沙保氏琼脂纯培养物用生理盐水配成约含 6×10^8 个/mL的细菌悬液(比浊法),昆明种小白鼠腹腔注射,0.5 mL/只;同时家兔耳缘静脉注射,1 mL/只,72 h后解剖动物,分别取小鼠腹腔液涂片,家兔肾组织印片进行 Hiss 荚膜染色后镜检。

1.2.4 电镜观察 沙保氏琼脂培养物作扫描电镜观察,该菌株感染的家兔肾组织内菌细胞作超薄切片透射电镜观察。

2 结果

2.1 分离菌株的形态与培养特征

阴道分泌物直接涂片,革兰染色镜检可见大量革兰阳性酵母样菌及长假菌丝;沙保氏培养物涂片染色镜检也呈革兰阳性,念珠状菌(图1,2)。

沙保氏斜面培养基培养,可见假菌丝伸入培养基深层。该菌在人血清中明显出芽,在玉米粉培养基中产生多量厚膜孢子(图3,4)。

2.2 生化反应

发酵葡萄糖和麦芽糖产酸又产气;发酵蔗糖产酸不产气;不发酵乳糖。

2.3 荚膜特点

经实验观察该菌株在人体内、沙保氏液体培养基中、小白鼠及家兔体内均可形成荚膜,但荚膜层的厚度可因不同环境而有差异,其具有如下特点:①在人、动物体内及沙保氏液体培养基中均可形成明显荚膜,荚膜的厚度均 $\geq 0.2 \mu\text{m}$,边界明显(图5,6,7)。在固体培养基中荚膜形成较差。②体内生长菌无论酵母型细胞还是假菌丝周围均可见不着色的透明圈(图6)。③沙保氏液体培养物经1500 r/min,15 min,离心3次,离心沉淀物很粘稠,涂片染色镜检在部分细胞周围仍可见透明圈(图8)。④培养基中葡萄糖含量在2%~6%之间对荚膜的形成无明显影响,但培养时间过短(少于48 h)或过长(超过96 h),荚膜层不明显。⑤扫描电镜观察细胞表面疏松状,细胞间有粘着物(图9);该菌株感染的家兔肾组织内菌细胞作超薄切片在透射电镜下观察,可见菌细胞由内向外依次有4层结构:细胞质、细胞膜、透亮区(细胞壁)、最外层的荚膜结构(图10)。

3 讨论

从分离菌沙保氏液体培养物经离心后,部分细胞周围透明圈消失,提示此结构在细胞表面粘着不够牢固,是细胞分泌的物质,非细胞的固定结构,可与厚壁孢子相区别。用本文分离菌株感染家兔,对家兔肾组织内的菌细胞表面结构采用光镜与电镜进行观察,将家兔肾组织印片作 Hiss 荚膜染色,光镜下可见菌细胞周围有一不着色的透明圈,即一般概念的“荚膜”层;肾组织经一定方法处理,作超薄切片,在透射电镜下观察,可见菌细胞由内向外依次有4层结构:细胞质、细胞膜、透亮区(细胞壁)、最外层的松散结构。据 Chaffin 等^[5]描述,白假丝酵母菌细胞壁的外层为分泌到细胞外的糖蛋白等成分。又据细菌荚膜的概念^[6],是细菌分泌的粘性物质,经染色 $\geq 0.2 \mu\text{m}$,边界明显者为荚膜,因此可认为该菌株确实具有荚膜。

某些细菌及真菌具有荚膜,因荚膜可抵抗吞噬细胞的吞噬作用,因此具有荚膜的菌一般毒力较强。白假丝酵母菌为酵母型真菌,其具有酵母型及菌丝相两种形态,现认为白假丝酵母菌的芽管及形成的假菌丝是其重要的致病物质^[7-9]。体外试验发现假菌丝长度大于20 μm 时具有抗吞噬作用。本文分离菌株无论酵母型还是菌丝型,菌细胞周围均有荚膜结构,此结构是否与该菌的假菌丝一样也为致病物质?其性质如何?均有待进一步探讨研究。

(本文图见封4 Figures were shown in back cover)

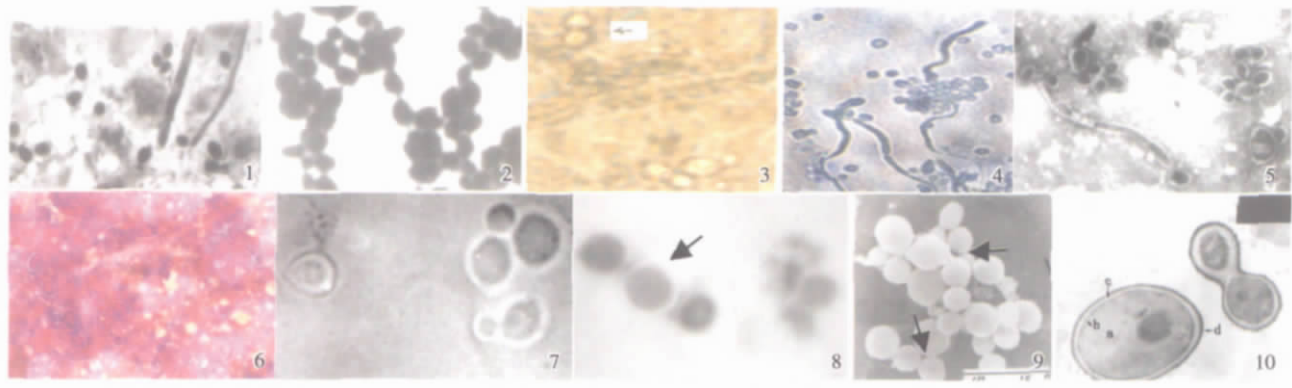
参考文献:

- [1] 谭世熹.白色念珠菌的鉴定[A].见:上海市立医学化学研究所主编.实用临床检验[M].上海:上海科学技术出版社,1965.689-1.
- [2] 李绣辉,马廉兰,曾祥凤.白念珠菌可能具有荚膜[J].中华微生物学和免疫学杂志,2000,20(3):202-3.
- [3] 吕乃群.深部感染真菌及其检验方法[A].见:李影林.中华医学检验全书(下卷)[M].北京:人民卫生出版社,1996.1995-2003.
- [4] 孙萌.细菌形态检查[A].见:冯仁书.实用医学检验学[M].北京:科技出版社,1996.591-3.
- [5] Chaffin WL, Lopez-Ribot JL, Casanova M, et al. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 1998, 62(1):130-80.
- [6] 陈锦英.细菌的形态结构[A].见:陆德源.医学微生物学[M].第5版.北京:人民卫生出版社,2001.19-21.
- [7] 陆德源.条件致病性微生物[A].见:闻玉梅,陆德源.现代微生物学[M].上海:上海医科大学出版社,1990.202-4.
- [8] Rodrigues AG, Mardli PA, Pina-Vaz C, et al. Germ tube formation changes surface hydrophobicity of *Candida* cells [J]. Infect Dis Obstet Gynecol, 1999, 7(5):222-6.
- [9] Lanco MT, Blanco J, Sanchez-Benito R, et al. Incubation temperatures affect adherence to plastic of *Candida albicans* by changing the cellular surface hydrophobicity [J]. Microbiology, 1997, 89(358):23-8.

(编辑 张敏瑞)

临床分离一株具有荚膜的白假丝酵母菌(正文见封2)

Clinical Isolation of *Candida. albican* with Capsule(Textin inside front cover)



- | | |
|---|--|
| <p>图1 阴道分泌物涂片,革兰染色(×1 000)</p> <p>图2 沙保琼脂培养物涂片,革兰染色(×1 000)</p> <p>图3 芽管,美兰染色(×1 000)</p> <p>图4 玉米琼脂玻片培养,美兰染色(×400)</p> <p>图5 人阴道分泌物涂片,Hiss 荚膜染色(×1 000)</p> <p>图6 分离培养菌感染的兔肾病灶组织印片,Hiss荚膜染色(×1 000)</p> <p>图7 沙保液体培养物涂片,Hiss 荚膜染色(×1 250)</p> <p>图8 沙保液体培养物离心后涂片,Hiss 荚膜染色(×1 250)(箭头所指:菌细胞周围透明圈)</p> <p>图9 分离培养菌扫描电镜观察(×3 500)(箭头所指:菌细胞表面粘着物)</p> <p>图10 分离培养菌透射电镜观察(×10 000)(a.细胞质;b.细胞膜;c.细胞壁;d.荚膜)</p> | <p>Fig.1 The smear of vaginal secretion, Gram staining (×1 000)</p> <p>Fig.2 The smear of sabouraud agar culture specimen, Gram staining (×1 000)</p> <p>Fig.3 Germinal stub of <i>C.albicans</i>, Methylene blue staining (×1 000)</p> <p>Fig.4 <i>C.albicans</i> cultured in medium corn agar on glass, slide methylene blue staining (×400)</p> <p>Fig.5 Smear of vaginal secretion , Hiss capsule staining (×1 000)</p> <p>Fig.6 Tissue impressed slide prepared from <i>C.albicans</i> infected rabbit kidney, Hiss capsule staining (×1 000)</p> <p>Fig.7 The smear of <i>C.albicans</i> cultured in liquid sabouraud culture, Hiss capsule staining (×1 250)</p> <p>Fig.8 The smear of <i>C.albicans</i> from liquid sabouraud culture medium after centrifugation liquid, Hiss capsule staining (×1 250)
(The arrow point the transparent enclose of the cell)</p> <p>Fig.9 Scanning electron microscopic observation of the organism (×3 500)
(The arrow point the surface substances of the cell)</p> <p>Fig.10 Transmission electron microscopic observation of the organism (×10 000)
(a. Cytoplasm; b. cell membrane; c. cell wall; d. capsule)</p> |
|---|--|

中山大学学报(医学科学版)
ZHONGSHAN DAXUE XUEBAO YIXUE KEXUE BAN

JOURNAL OF SUN YAT-SEN UNIVERSITY (MEDICAL SCIENCES)
[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci)]

双月刊(1980年2月创刊)
2005年7月第26卷第4期(总114期)
主办单位 中山大学
编辑出版 中山大学学报(医学科学版)
编辑委员会 (510080 广州市中山二路74号)
主 编 陈汝筑(兼)
责任副主编 张敏瑞
印 刷 中山大学印刷二厂
国内发行 广东省报刊发行局
国内订阅 全国各地邮局
国外发行 中国国际图书贸易总公司(北京399信箱)

Bimonthly(Established in February 1980)
July 2005 Volume 26 Number 4 (114 in total)
Sponsored by SUN Yat-sen University
Edited & Published by Editorial Board of J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 74 Zhongshan Road II , 510080, Guangzhou, P. R. China
Editor in Chief CHEN Ru-zhu
Vice-Editor in Chief ZHANG Min-rui
Printed by The Second Printing House of SUN Yat-sen University, Guangdong
Subscriptions Domestic: Local Post Offices
Overseas: China International Book Trading Corporation (P. O. Box 399, Beijing, China), Code No: Q1232

刊号 ISSN 1672-3554
CN 44-1575/R

国内邮局代号 46-141

国外发行代号 Q1232

定价 10.00元

广告经营许可证号: 穗工商广字 440100400001

E-mail: med@zxb-med.com