

一株尿素酶阴性的新生隐球菌

李安生 吴绍熙

(中国医学科学院皮肤病研究所, 南京 210042)

本文报告从鸽粪标本中分离出一株尿素酶试验阴性、咖啡酸玉米吐温琼脂培养呈棕色菌落的酵母样真菌。根据该菌株的生理、生化特性及致病力, 认为是尿素酶阴性的新生隐球菌。此外, 应注意这种菌在自然界中的存在和对人类造成感染的可能。这是关于从自然环境中分离出尿素酶阴性新生隐球菌的首次发现和报告。

关键词 新生隐球菌; 尿素酶

新生隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*) 是一种可以引起人类浅表或深部组织感染的病原真菌, 内脏和中枢神经系统的感染严重可以导致死亡。最易受该菌侵犯的是免疫缺损人群, 尤其是 AIDS 患者^[1]。尽管目前已有乳胶凝集试验等方法可以提供新生隐球菌感染的诊断信息, 但最可靠的、有决定意义的还是分离和鉴定病原菌。以往, 大部分临床实验室都根据隐球酵母属真菌可产生尿素酶的特点, 将尿素酶试验作为隐球菌鉴定的筛选项目^[2]。但是 Ruane 等 1988 年首次从一例 AIDS 患者分离鉴定出一株尿素酶阴性新生隐球菌^[3]。最近, 我们从鸽粪标本中也分离到一株具类似特点的菌株。本文报告有关该菌的分离、鉴定和致病力试验的研究结果。

材料和方法

(一) 新生隐球菌的分离

鸽粪标本采集于南京市一养鸽户鸽笼。称取 1g 鸽粪放入无菌试管, 加入 9ml 含青霉素、链霉素(各 100u/ml)的无菌生理盐水, 振荡混匀后直立于室温 15 分钟。用无菌棉签沾取上层液划线接种于含

5mg/dl 氯霉素的 SDA 平板上, 37℃ 培养 48 小时, 择取酵母样菌落作进一步鉴定。

(二) 新生隐球菌的鉴定

1. 咖啡酸玉米吐温琼脂^[4]: 将经高压灭菌的玉米吐温琼脂冷至 60℃, 加入经过滤除菌的咖啡酸(化学纯, 上海试剂一厂出品)水溶液, 终浓度为 30mg/dl, 充分混匀后倒平板。使用时按点植法接种。室温培养 48 小时, 新生隐球菌长成棕色菌落。

2. 尿素酶试验: 将 Christensen's 尿素酶试验培养基^[5]经高压灭菌后制成斜面。使用时于表面划线接种, 30℃ 培养观察 1 周, 培养基变红色为阳性。每次试验均设已知阴性(白念珠菌)和阳性(新生隐球菌)的对照。

3. GCP 琼脂生长试验^[6]: GCP 培养基中含 1.0% 甘氨酸、1.6μg/ml 放线菌酮、0.1% MgSO₄·7H₂O、0.01% CaCl₂、0.1% KH₂PO₄、0.02% 酚红、2% 琼脂。高压灭菌后制斜面。使用时于表面划线接种, 室温培养 5 天。B/C 血清型新生隐球菌可出现生长(培养基变红色), 而 A/D 血清型新生隐球菌不生长。

本文于 1991 年 1 月 25 日收到。

4. 其它鉴定试验: 碳源同化、发酵试验, 硝酸盐同化试验, 淀粉样化合物形成试验; 血清芽管形成试验及玉米吐温琼脂培养试验均参见文献[5]。

(三) 动物致病性试验

取纯种 20—25g CFW 小鼠, 将纯培养菌种用无菌生理盐水制为 2×10^7 个菌/ml 的菌悬液, 由尾静脉注射 0.1ml。饲养 1 个月后解剖, 取肝、肾、肺、脑、脾组织分别作直接涂片镜检, 分离培养和病理切片检查。另取 0.01ml 菌悬液作小鼠颅内接种, 1 周后取脑组织作镜检及培养观察。将由解剖的小鼠组织中分离的菌种重新进行菌种鉴定, 并与原接种菌的鉴定结果比较。

结 果

(一) 菌株分离

将从鸽粪标本中分离出的酵母样真菌在 SDA 斜面上扩增, 然后分别接种于尿素酶试验培养基和咖啡酸玉米吐温琼脂。标准新生隐球菌这两项试验均为阳性, 而尿素酶阴性新生隐球菌则仅于咖啡酸玉米吐温琼脂上形成棕色菌落; 尿素酶试验虽经多次重复, 直至培养 30 天仍为阴性结果(图版 1-1、1-2)。

(二) 生理生化特性

在 SDA 培养基上, 室温与 37℃ 均生长良好, 初为细小的乳白色细菌样菌落, 长时间培养菌落呈光滑润酪黄的酵母样菌落。斜面培养时菌落流向管底。玉米吐温琼脂培养镜检可见到圆形芽生孢子, 不形成假菌丝和厚壁孢子。碳源利用情况: 该菌株可以同化葡萄糖、蔗糖、半乳糖、纤维二糖、鼠李糖、麦芽糖、棉子糖、肌醇、木糖、果糖、甘露糖、羧糖、山梨醇、木糖醇、N-乙酰葡萄糖胺、 α -甲基-D-葡萄糖苷; 不同化乳糖、山梨糖、赤藓草醇。不发酵葡萄糖、蔗糖、半乳糖、麦芽糖和果糖。不同化硝酸

盐。可产生淀粉样化合物。芽管形成试验阴性。在 GCP 培养基上不生长表明该菌为 A/D 血清型。

(三) 动物致病力试验

将作尾静脉接种的小鼠 1 月后解剖, 检查结果除肝、脾、肾脏没有阳性发现外, 在肺和脑组织的直接涂片中用墨汁染色可见具有荚膜的菌体, 可分离出与原接种菌具相同特性的尿素酶阴性新生隐球菌。病理切片检查可见肺部组织中有大量单个核细胞浸润, 可找到 PAS 染色阳性的菌体。脑部病理切片中可见到许多大小不等的坏死病灶, 其中有大量菌体(图版 1-3)。颅内接种一周作脑组织涂片的墨汁负染检查可见大量具荚膜的菌体(图版 1-4)。

讨 论

由结果可见, 这株酵母样真菌除尿素酶阴性外, 其它生理、生化特性均符合新生隐球菌的分类特点, 是一株尿素酶阴性新生隐球菌。该菌同时经日本千叶大学真核微生物研究所 Miyaji 和美国佛吉尼亚大学 Shadomy 鉴定, 得到相同的结论, 且确定属 A 血清型。新生隐球菌在自然界分布广泛, 从鸽粪中分离的阳性率很高^[4], 但尚未见从鸽粪中分离出尿素酶阴性的新生隐球菌的报告。

从小鼠致病力试验的初步结果可见, 该菌株形成荚膜, 在肺和脑部可观察到扩散感染的证据, 参考 Ruane 等从 AIDS 患者分离出尿素酶阴性新生隐球菌的报告, 表明该菌有一定的致病力。随着广谱抗生素、免疫抑制剂的广泛使用, 条件致病性真菌感染的机会也在增多, 诸如 AIDS 等各种免疫缺损人群更易受到侵犯。因为尿素酶阴性新生隐球菌的存在, 不可避免地会造成人类的感染, 对此应当引起足够的重视。

在临床医学实验室鉴定新生隐球菌的方法中,大多非常重视尿素酶试验。作为隐球菌属的筛选试验,尿素酶阴性菌一般不作为新生隐球菌鉴定^[2,5]。现在看来,这样就有可能漏检尿素酶阴性新生隐球菌。据作者的实验结果,使用咖啡酸玉米吐温琼脂与尿素酶试验相结合的方法可以避免这样的问题。其结果,一方面可以较快地鉴定出新生隐球菌,另一方面还可以检出其它隐球菌属的真菌。其中,咖啡酸玉米吐温琼脂培养还可以同时观察酵母菌生长的特殊形态^[4]。这两项试验的试剂来源方便,结果易于判别,可以在普通实验室进行。尽管现在已无法估计以往临床尿素酶阴性新生隐球菌的感染情况,但相信随着对此菌的认识以及鉴定方法的完善,会有助于早期检出这类病原菌,及时采取有效的防治措施。

此外,关于这种尿素酶阴性新生隐球菌在致病力方面的特点,对抗真菌药物的敏感性以及遗传基因有何变化等问题还有待今后深入研究。

参 考 文 献

- [1] Chandler, F. W.: Current Topics in Medical Mycology. Vol 1, ed. McGinnis, M. R., Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo, p. 1. 1984.
- [2] AL-Doory, Y.: Laboratory Medical Mycology, Lea and Feibiger, Philadelphia, p. 246, 1980.
- [3] Ruane, P. J. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 26(10): 2224--2225, 1988.
- [4] Kaufmann, C. S. et al.: *ibid.*, 15(2): 339--341, 1982.
- [5] Moor, G. S. & D. M. Juciw: *Mycology for the Clinical Laboratory*, Reston Publishing Company Virginia, p. 169, 1978.
- [6] Salkin, I. F. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 15(1): 169--171, 1982.
- [7] Bulmer, G. S.: *Mycopathologia*, 109(2): 111--122, 1990.

AN UREASE NEGATIVE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*

Li Ansheng Wu Shaoxi

(Institute of Dermatology, Chinese Academy of Medical Science, Nanjing 210042)

We report an urease negative *Cryptococcus neoformans* derived from pigeon dropping. This isolate produced brown pigmented colonies on corneal Tween-80 agar with 300 µg/ml caffeic acid, but was failure to hydrolyze urea. More identification tests were performed for this isolate, such as assimilation and fermentation of carbonhydrates, nitrate assimilation, production of starch like compound, growth on GCP medium, germ tube formation and inoculation of mice, ect. Most of the results showed that the microbiological characteristics of the isolate were typical of *C. neoformans* except for negative urease test.

Even though there has been a report about an urease negative *C. neoformans* derived from an AIDS patient, but we have never found any report about isolation from pigeon dropping or nature environment. We should pay attention to the exist of this atypical strain of *C. neoformans* in nature environment and the possibility of infection to human being. Additionally, we also be aware of the possibility of neglect when this urease negative *C. neoformans* is identified with urease test.

Key words

Cryptococcus neoformans; Urease