

新生隐球菌的酚氧化酶及用于 菌种鉴定的研究*

李安生 吴绍熙

(中国医学科学院、协和医科大学皮肤病研究所 南京 210042)

摘 要 采用 4% 玉米浸汁咖啡酸琼脂 (CACA) 培养基, 观察了具不同生物学特性的新生隐球菌的酚氧化酶活性, 并对临床常见的多种酵母和酵母样真菌作了该酶的检测。结果, 受试的 3 个变种、5 种血清型和尿素酶阴性新生隐球菌均呈明确的阳性反应; 150 株常见酵母和酵母样真菌中 43 株新生隐球菌全部呈酚氧化酶阳性, 107 株其它酵母和酵母样真菌全部阴性。具各种不同生物学特性的新生隐球菌均特异性地产生酚氧化酶, 用检测该酶的方法作该菌鉴定的特异性和敏感性均为 100%, 且可于 72 小时内得到结果。此外, 结合尿素酶试验可以准确的鉴定出尿素酶阴性的新生隐球菌。

关键词 新生隐球菌, 酚氧化酶, 菌种鉴定

新生隐球菌 (*Cryptococcus neoformans* (Sanfelice) Vuillemin) 是引起隐球菌病的最主要病原菌。感染多发生于免疫受损者, 且病情危险不易治愈。目前, 由于该菌在受人类免疫缺陷病毒 (HIV) 感染的人群中致病和致死情况逐年增加, 已经成为 AIDS 治疗过程中面临的难题之一, 因而受到国际医学界的广泛关注^[1]。

对隐球菌病的诊断除密切注意临床表现外, 实验诊断有重要意义, 其中血清学方法如荚膜多糖的检测等可有助于早期诊断和监测疗效, 但是病原菌的分离和真菌鉴定仍然是不可忽略和难以取代的重要真菌诊断内容^[2]。此外, 在进行有关新生隐球菌的病原学、生态学和流行病学研究时也需较为可靠、快速的菌种鉴定方法。

随着对新生隐球菌研究的不断深入, 已发现该菌具有明显的生物学多态性。如有 5 种血清型; 有新生变种、格特变种和上海变种; 有无荚膜变异株以及尿素酶阴性株^[3-8]等。这些发现给传统鉴定方法带来了冲击, 提出了建立更加特异、可靠并能普遍采用的鉴定方法的问题。

1962 年 Staib 发现新生隐球菌可以在 *Guizotia abyssinica* 种子浸汁培养基上产生棕色色素^[9], 随后发现该菌特异性地产生酚氧化酶 (phenoloxidase)^[10], 并在该菌的鉴定中得到了应用^[11,12], 但尚未见有系统观察具不同生物学特性的新生隐球菌产生该酶活性的报告, 在国内该鉴定方法还未能普及使用。据此, 本文报告使用 CACA 培养基检测具不同生物学特性的新生隐球菌酚氧化酶的结果, 及 CACA 培养基应用于鉴定新生隐球菌的敏感性和特异性的结果。

* 获中国医学科学院、协和医科大学青年科学研究基金资助。

本文于 1993 年 12 月 25 日收到。

1 材料和方法

1.1 培养基制备

1.1.1 沙保弱氏琼脂 (SDA) (%)：葡萄糖 2、蛋白胨 1、琼脂 2，121℃ 高压灭菌制成斜面，用于菌株的扩增和保存^[13]。

1.1.2 尿素琼脂 (%)：蛋白胨 0.1、葡萄糖 0.1、NaCl 0.5、KH₂PO₄ 0.2、酚红 0.0012、尿素 2、琼脂 1.5，按 Moor's 方法制成斜面^[13]。用于尿素酶检测，接种菌后置 25℃ 培养，观察 7 天。

1.1.3 4% 玉米浸汁咖啡酸琼脂 (CACA)：4% 玉米浸汁 (4g 玉米粉于 100ml 蒸馏水中，90℃ 浸出 15 分钟后，用尼龙布过滤) 100ml，加入琼脂 2g，121℃ 高压灭菌。咖啡酸 (上海试剂一厂出品) 0.04g 酒精助溶后用孔径 0.22μm 醋纤膜过滤到冷至 50℃ 左右的 4% 玉米琼脂中，混匀，制成斜面备用。接种后于 25℃ 培养，酚氧化酶阳性时生长菌落呈棕色。

1.2 菌株

共 150 株临床常见的酵母或酵母样真菌，其中新生隐球菌 43 株，浅白和罗伦隐球菌各 2 株，8 种念珠菌共 88 株，酿酒酵母 8 株，赭色掷孢酵母、白地霉、地霉、白吉尔丝孢酵母、皮状丝孢酵母、汉逊酵母、球形拟酵母各 1 株，分别来自全国医学真菌保藏管理中心 (ID)、日本千叶大学病原真菌和真菌毒素研究中心 (IFM) 及部分临床分离菌株。

1.3 方法

1.3.1 菌种鉴定：除标准参考株外，临床分离株均经鉴定，方法参见文献^[13, 14]。全部新生隐球菌菌株均用 CGB 培养法及血清分型试剂 (8 种因子血清，Iatron Laboratories, INC, Japan) 确定血清型。

1.3.2 检测新生隐球菌标准参考株酚氧化酶试验：受试新生隐球菌包括 5 种血清型 (10 株，其中 A、D 和 AD 型为新生变种；B 和 C 型为格特变种)、上海变种 (1 株) 和尿素酶阴性株 (2 株)。用 2 株白念珠菌为对照。先于 SDA 上 25℃ 培养 72 小时，再分别接种到 CACA 和尿素酶培养基上，检测酚氧化酶和尿素酶活性。

1.3.3 特异性和敏感性试验：将 150 株临床常见的酵母和酵母样真菌于 SDA 上 25℃ 培养 72 小时，再分别接种于 CACA 和尿素酶培养基，观察 CACA 培养基用于新生隐球菌鉴定时的敏感性 (酚氧化酶阳性的新生隐球菌数/受试的新生隐球菌数×100) 和特异性 (酚氧化酶阳性的非新生隐球菌数/受试的非新生隐球菌的总数×100)，同时观察 24、48 和 72 小时的反应结果，并记录各受试菌株的尿素酶活性。

2 结果

2.1 不同生物学特性的新生隐球菌酚氧化酶和尿素酶活性分析

检测新生隐球菌标准参考株的酚氧化酶和尿素酶的结果 (表 1) 表明，新生隐球菌的新生变种 (A、D 和 AD 血清型菌株)、格特变种 (B 和 C 血清型菌株)、上海变种 (B 血清型) 及尿素酶阴性菌株 (A 血清型) 全部于 CACA 培养基上呈酚氧化酶阳性反应 (菌落呈棕色)。由表 1 还可见，新生隐球菌尿素酶阴性株无尿素酶活性。结果表明：尽管受

试的新生隐球菌具有不同的生物学特性，但均具有酚氧化酶活性，进而表明该特性可作为菌种鉴定的有用指征，而尿素酶试验不能作为新生隐球菌的筛选项目。

表 1 具不同生物学特性的新生隐球菌酚氧化酶和尿素酶检测结果
Table 1 The examination results of phenoloxidase and urease for *Cryptococcus neoformans* isolates with different biological features

菌 株 Strains	数 目 Number	酚氧化酶* Phenoloxidase			尿素酶* Urease	菌株来源 Source
		24h	48h	72h		
新生隐球菌 <i>Cryptococcus neoformans</i>						
新生变种 var. <i>neoformans</i>						
血清型						
Serotype A	2	2	2	2	2	IFM5854, 5833
D	2	2	2	2	2	IFM5844, 5857
AD	2	2	2	2	2	IFM5889, PCN 1-4b**
格特变种 var. <i>gattii</i>						
血清型						
Serotype B	2	2	2	2	2	IFM5851, 5855
C	2	2	2	2	2	IFM5856, 5849
上海变种 var. <i>shanghai</i>						
	1	1	1	1	1	ID00047
尿素酶阴性株 Urease negative strains						
	2	2	2	2	0	IFM41470, ID00061
白念珠菌 <i>Candida albicans</i>						
	2	0	0	0	0	IFM5728, 40102

* 表中所示为阳性结果的菌株数；** PCN 1-4b 为鸽粪分离株（参见文献 [15]）。
Positive results were shown in the table; ** PCN 1-4b was isolated from pigeon dropping (see reference [15]).

2.2 酚氧化酶和尿素酶活性分析

检测 150 株临床常见的酵母和酵母样真菌的酚氧化酶和尿素酶的结果见表 2。结果表明，受试的 43 株新生隐球菌于 CACA 培养基上全部呈阳性结果（敏感性为 100%）；受试的其它 107 株酵母和酵母样菌全部呈阴性反应（特异性为 100%）。使用 CACA 培养基检出酚氧化酶的效率为 24 小时 65%（28/43）、48 小时 95%（41/43）及 72 小时 100%（43/43）。尿素酶检测结果表明，该试验对新生隐球菌无特异性，其阳性反应可见于其它菌种。

表 2 150 株临床常见酵母或酵母样菌酚氧化酶和尿素酶检测结果

Table 2 The examination results of phenoloxidase and urease for 150 medically important yeast isolates

菌 株 Strains	数 目 Number	酚氧化酶* Phenoloxidase			尿素酶* Urease
		24h	48h	72h	
新生隐球菌 <i>Cryptococcus neoformans</i>					
新生变种 var. <i>neoformans</i>	34	25	31	34	34
格特变种 var. <i>gattii</i>	7	1	7	7	7
尿素酶阴性株 urease negative strains *	2	2	2	2	0
浅白隐球菌 <i>C. albidus</i>	2	0	0	0	2
罗伦隐球菌 <i>C. laurentii</i>	2	0	0	0	2
白念珠菌 <i>Candida albicans</i>	28	0	0	0	0
李也蒙念珠菌 <i>C. guilliermondii</i>	17	0	0	0	0
乳酒念珠菌 <i>C. kerfy</i>	4	0	0	0	0
克柔氏念珠菌 <i>C. krusei</i>	14	0	0	0	2
近平滑念珠菌 <i>C. parapsilosis</i>	10	0	0	0	0
热带念珠菌 <i>C. tropicalis</i>	10	0	0	0	0
光滑念珠菌 <i>C. glabrata</i>	3	0	0	0	0
类星形念珠菌 <i>C. stellatoidea</i>	2	0	0	0	0
酿酒酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8	0	0	0	0
球形球拟酵母 <i>Torulopsis globosa</i>	1	0	0	0	0
赭色掷孢酵母 <i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	1	0	0	0	0
白吉尔丝孢酵母 <i>Trichosporon beigelii</i>	1	0	0	0	1
皮状丝孢酵母 <i>T. cutaneum</i>	1	0	0	0	1
白地霉 <i>Geotrichum candidum</i>	1	0	0	0	0
地霉 <i>G. geotrichum</i>	1	0	0	0	0
汉逊酵母 <i>Hansenula</i> sp.	1	0	0	0	0

* 表中所示为阳性结果的菌数。2 株尿素酶阴性株同表 1。
Positive results were shown in the table. Two urease negative strains were the same as those in Table 1.

3 讨论

酚氧化酶是新生隐球菌所特有的胞内酶,可作用于包括多巴、多巴胺、甲基多巴、咖啡酸、儿茶酚和肾上腺素等单酚或双酚化合物产生黑色素(melanin)。当菌在含有这些底物的培养基上生长时,可形成棕色菌落。利用新生隐球菌此独特的生物学特性,可进行该菌的鉴定试验^[8-12]。虽然该试验在国外已应用多年,在我国仍未广泛开展,其原因主要是受方法的限制。CACA 培养基是作者研制的全部采用国产试剂的检测酚氧化酶活性的培养基,曾用于尿素酶阴性新生隐球菌和血清分型的研究^[8,15]。本文是对 CACA 培养基检测新生隐球菌的酚氧化酶和在菌种鉴定中应用的较为系统的研究报告。

当代微生物学研究日益注重微生物的生物学多态性(biodiversity)问题,新生隐球菌就是一明显实例,表现为多种血清型、多个变种、尿素酶阴性及无荚膜变异株等等,而作为一种可以在临床应用的鉴定方法必须对具有多种生物学特性的菌株都具有检出能力。为此,作者首先使用 CACA 培养基对具代表性的新生隐球菌标准参考株的酚氧化酶活性进行检测,结果全部受试菌株均在 72 小时内显示酚氧化酶活性(见表 1)。该结果表明,所试具有已知生物学特性的菌株均具有酚氧化酶活性,并表明 CACA 培养基可以敏感地检出不同血清型、不同变种以及尿素酶阴性的新生隐球菌的酚氧化酶活性。虽然国外报告过许多关于该菌酚氧化酶研究结果,但尚未见对具有多种生物学特性的菌株的较系统的研究报告。

自 1988 年以来,全世界已报告了 3 株尿素酶阴性的新生隐球菌^[7,8,16],其中 2 株为本试验所使用,分别为从美国 AIDS 患者分离株(菌号: IFM 41470 即 ATCC 64538)和从中国环境分离株(菌号: ID 00061)。由试验结果(表 1)可见,尿素酶试验已不再适于作为新生隐球菌鉴定的筛选试验,但受试菌株均呈酚氧化酶阳性,表明该酶的检测可以更好地取代尿素酶试验,结合尿素酶试验可以有效地鉴定尿素酶阴性株,从而解决了对此菌作出快速鉴定的问题。

作为一种能用于临床的菌种鉴定方法,不仅要具备一定的敏感性而且要有特异性。为此,作者对多种临床常见的酵母和酵母样菌用 CACA 培养基检测了酚氧化酶的活性。结果(表 2),43 株新生隐球菌全部阳性;107 株酵母或酵母样菌全部阴性。由此可见 CACA 培养基鉴定新生隐球菌的敏感性和特异性均为 100%。同时检测的尿素酶试验结果(表 2)表明,其阳性结果除可能为新生隐球菌外,也可能是丝孢酵母(*Trichosporon* sp.)、隐球菌的其它种及少数克柔氏念珠菌。尽管其阴性结果不能完全排除不是新生隐球菌,但若同时检测酚氧化酶即可肯定地鉴定出尿素酶阴性的新生隐球菌。

表 2 所示结果还可见,CACA 培养基有较高的检测效率,72 小时阳性率可达 100%,表明可用于快速鉴定临床分离的新生隐球菌。此外,新生隐球菌在 CACA 培养基上形成的棕色菌落清晰易辨,观察结果明确可靠^[8],加上作者将 CACA 培养基的制备方法做到了尽可能的简化和全部采用了国产试剂,从而极大地方便了该鉴定实验的实际应用。

致谢 日本千叶大学病原真菌和真菌毒素研究中心西村和子教授赠送部分标准菌株;南京军区总医院微生物科李珍大副主任技师赠送临床菌株,谨此致谢。

参 考 文 献

- [1] Dupont B, Graybill J R, Armstrong D *et al.* *J Med and Veter Mycol*, 1992, **30** (Suppl. 1): 19—28.
- [2] Roberts D G, Pfaller M A, Gueho E *et al.* *J Med and Veter Mycol*, 1992, **30** (Suppl. 1): 241—248.
- [3] Ikeda R, Shinoda T, Fukazawa Y *et al.* *J Clin Microbiol*, 1982, **16** (1): 22—29.
- [4] Kwon-Chung K J, Polacheck I, Bennett J E. *J Clin Microbiol*, 1982, **15** (2): 535—537.
- [5] 廖万清, 邵经政, 李淑琴. 微生物学通报, 1983, **10** (3): 116—118.
- [6] Bulmer G S, Sans M D, Gunn C M. *J Bacteriol*, 1967, **94**: 1475—1479.
- [7] Ruane P J, Walker L J, George W L. *J Clin Microbiol*, 1988, **26** (10): 2224—2225.
- [8] 李安生, 吴绍熙. 微生物学报, 1992, **32** (1): 68—71.
- [9] Staib F. *Z Hyg*, 1962, **148**: 466—475.
- [10] Polacheck I, Hearing V T, Kwon-Chung K J. *J Bacteriol*, 1982, **150** (3): 1212—1220.
- [11] Kaufmann C S, Merz W G. *J Clin Microbiol*, 1982, **15** (2): 339—341.
- [12] Denning D W, Stevens D A, Hammilton J R. *J Clin Microbiol*, 1990, **28** (11): 2565—2567.
- [13] Moor G S, Jaciow D M. Yeast Identification. In: Moor G S *et al.* ed. *Mycology For The Clinical Laboratory*. Virginia: Reston Publishing Company, 1979. 169—198.
- [14] Adams E D. *Am J Med Tech*, 1974, **40** (9): 377—388.
- [15] Li A S, Nishimura K, Taguchi H *et al.* *Mycopathologia*, 1993, **124** (1): 1—5.
- [16] Bava A J, Negront R, Bianchi M. *J Med and Veter Mycol*, 1993, **31** (1): 87—89.

THE PHENOLOXIDASE TEST AND ITS APPLICATION TO IDENTIFY *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS* WITH VARIOUS BIOLOGICAL CHARACTERISTICS

Li Ansheng Wu Shaoxi

(Institute of Dermatology, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Nanjing 210042)

Abstract *Cryptococcus neoformans* strains with various biological characteristics were examined the phenoloxidase activity on the caffeic acid cornmeal agar (CACA). Other medically important yeasts were also included in this research. Firstly, thirteen reference strains of *Cryptococcus neoformans* were confirmly found positive phenoloxidase production on the CACA medium. Then, in total 150 isolates of yeasts, forty three *Cryptococcus neoformans* strains were phenoloxidase positive, other than that 107 other yeast strains were all negative. It is suggested that *Cryptococcus neoformans* strains with different biological features specifically and uniquely produce phenoloxidase, thus the phenoloxidase test can be applied as a useful tool to identify this pathogenic yeast. Our results also show that the culture on the CACA medium is an effective method to test the phenoloxidase activity within 72 hours. It is further approved that the urease test will not be able to be a screening test for *Cryptococcus neoformans* in the clinical laboratory, but it is still valuable to identify urease negative *Cryptococcus neoformans* when the test is used in combination with the phenoloxidase test.

Key words *Cryptococcus neoformans*, Phenoloxidase test, Identification