

新型隐球酵母的生物学特性及其微生物学检查法

汪秀明 曹庆如

(湖南医学院微生物学教研组,长沙)

隐球酵母属(*Cryptococcus*)包括17种,其中新型隐球酵母(*Cryptococcus neoformans*)可使人和家畜致病,此外,浅白隐球酵母(*Cryptococcus albidus*)也有致病性,其余为非致病菌^[1]。由于抗细菌抗菌素、免疫抑制剂等广泛使用,真菌病渐趋增多。例如新型隐球酵母致脑膜炎,过去以为少见,现了解其发病率并不低。如我院第一附属医院一年收治10例以上。此病的病情较严重,需特殊抗真菌药物治疗,需要早期诊断与尽早治疗。因此有必要探讨新型隐球酵母的特性及其检查方法。现结合我组近两年临床

检验的初步实践,对此做一概述。

新型隐球酵母生物学性状

一、形态结构

为球形或卵圆形菌体,壁厚,具多糖体荚膜,厚薄不一,直径为5—30微米,出芽生殖,与母细胞由一狭窄收缩相连。在麦芽汁培养基中于25℃培养三天后,菌体大小不同,大者为(3.5—7.0)×(3.7—7.9)微米;小者为(3.0—5.2)×(3.3—5.5)微米,还有些菌株的大小介乎两者之间^[2]。除极少数菌株外,无假菌丝。无

子囊孢子。在两性霉素 B 影响下菌体变小、荚膜变薄。组织切片标本可用阿尔新蓝 (Alcian blue) 或粘液卡红使荚膜着色^[1]。有人认为荚膜由淀粉样物质构成,用 Lugol 氏液染色,荚膜呈蓝色^[3]。

二、培养

营养要求不高,于 Sabouraud 氏培养基上,在室温或 37℃ 下培养 2—10 天长出菌落,直径 1—3 毫米,白色,培养较久后由乳酪色转为黄褐色,表面光泽、平滑,结构呈粘液状,使生长物流至斜面培养基的底部。边缘整齐,无假菌丝。在鸟种 (bird seed) 培养基*上菌落棕色。不产生胡萝卜素。患者病程愈长所取标本中的病菌在培养基中生长愈慢,常因受血清因素、细菌、组织抑制物影响而需 2—4 周才长出菌落^[1]。

三、生化特性

利用尿素 (37℃ 及室温下),借此可与光滑球拟酵母 (*Torulopsis glabrata*) 及某些酵母菌相区别 (表 1)。糖发酵试验在 25℃ 下进行,观察 10—14 天。对葡萄糖、麦芽糖、乳糖等不发酵。同化肌醇、葡萄糖、半乳糖、木糖、蔗糖、麦芽糖等,不同化乳糖^[1-4]。能合成淀粉^[3]。

四、致病性

本菌为外源性获得性亲神经性致病菌^[4],过去曾误认为是内源性感染。本菌不是人体的正常菌群之一,可存在于土壤、水果及人体皮肤表面。存在于鸽类中较多。最常见的感染方式,可能主要是吸入污染有鸽粪的尘埃而侵入

人体^[5]。有时由皮肤接种进入体内^[4]。此菌可致肺、中枢神经系统或原发的皮肤感染,扩散时可侵及骨、肾等其他器官,呈亚急性或慢性深部感染。荚膜多糖有抑制白细胞吸附、吞噬隐球酵母的作用^[6]。荚膜愈厚,抗白细胞吞噬的能力愈强^[7]。小白鼠对它敏感,脑内接种 0.2 % 菌液 0.05 毫升,4—5 天后死亡,脑部胶样渗出物几乎全为有荚膜的新型隐球酵母。也可感染家畜。

五、型别、抗原性与免疫原性

一般依荚膜多糖抗原分为四型。A 型占绝大多数。因交叉抗原成分各型都有,故型间交叉广泛。我组分离的 12 株隐球酵母,都与其中的一株 (新张株) 的免疫血清呈高效价的凝集,说明交叉广泛,也说明体外凝集原性较强。但免疫原性因菌株而异。有的学者认为本菌免疫原性低^[8]。有的文献报道薄荚膜株可免疫家兔产高效价抗体。如 Bennett 等用 9 株本菌免疫家兔,仅 1 株薄荚膜株 (30℃ 下培养菌体不大于 0.5 微米) 用大剂量免疫家兔,抗体效价达 1:1600^[9]。我们曾选用三株分离菌株免疫家兔,仅新张株可使其产生抗体,其效价达 1:2560,另一荚膜较宽的菌株 (芦株),虽大剂量免疫家兔,也不能使之产生抗体。其机理有待探讨。

六、对抗菌药物的反应

对两性霉素 B、5-氟胞嘧啶等敏感。大蒜

* 鸟种学名为 *Guizottia abyssinica*, 培养基成份为 *Guizottia abyssinica* 70 克,肌酐 0.78 克,葡萄糖 10 克,氯霉素 0.05 克,琼脂 20 克,蒸馏水 1000 毫升,联二苯 100 毫克。

表 1 新型隐球酵母与相似菌的鉴别特征

菌种	假菌丝	尿素利用	糖同化试验			糖发酵试验			其他
			葡萄糖	麦芽糖	乳糖	葡萄糖	麦芽糖	乳糖	
新型隐球酵母	偶有	利用	+	+	-	-	-	-	同化肌醇产棕色素
白色假丝酵母	有	不利用	+	+	-	+	+	-	
光滑球拟酵母	无	不利用	+	-	-	+	-	-	
酿酒酵母菌	有	不利用	+	+	-	+	+	-	
红酵母菌属	无	利用	+	+	-	-	-	-	不同化肌醇产红黄色素

注: “+”表示同化或发酵。“-”表示不同化或不发酵。

提取液、合成大蒜素对本菌有较好疗效,副作用也较轻。多粘菌素与两性霉素 B 对此菌有协同作用,前者可促进后者进入菌胞内。两性霉素 B 与 5-氟胞嘧啶有协同作用,疗效也提高。我组体外试验表明,大蒜提取液与两性霉素 B 有协同作用。

微生物学检查法

、新型隐球酵母脑膜炎的临床症状与结核性脑膜炎相似,常误诊为后者而延误治疗。故对疑似病例应及时做微生物学检查,做到早期诊断,以便早期治疗。

一、分离鉴定

可用脑脊液、痰、皮肤渗出物、活检作分离标本^[9]。现以脑脊液标本为例说明。

将脑脊液标本经 2000 转/分离心 10 分钟,上清液留做可溶性抗原或抗体测定之用(见下述)取沉淀物做墨汁染色检查及培养。

(一) 墨汁染色

用金属耳刮取管底(壁)沉淀物,加印度墨汁或过滤后的普通墨汁 1 小滴镜检。具明显荚膜的隐球酵母,易被识别,而且薄荚膜的菌株不易与淋巴细胞区别^[9]。经药物作用后形态结构可有改变(见前述)。

(二) 培养

将沉淀物滴种 2 管 Sabouraud 氏培养基,分置 37℃ 与 20℃ 下培养,新型隐球酵母在 37℃ 下生长较 20℃ 下为快^[9]。接种后逐日观察,菌落由白色转至褐色。培养 30 天未生长者即为培养阴性。培养的阳性率较高。有报告指出,极个别病例的脑脊液培养阴性,而脑室液培养获阳性结果^[10]。故对高度可疑病例脑脊液培养阴性者,仍不能完全排除感染本菌的可能性。

(三) 小白鼠接种

脑内接种脑脊液沉淀物 0.03 毫升,一般 4 天至 9 周发病,自鼠脑可分离出本菌。墨汁镜检为阳性。

(四) 鉴定

对分离培养物做墨汁染色及湿片镜检,注

意菌体大小、形态,荚膜有无,及有无假菌丝。需要时接种 McClary 氏培养基,培养 1 周后检查子囊孢子有无形成。本菌菌落可呈棕色,无胡萝卜素产生;尿素利用试验阳性,能同化肌醇,合成淀粉等。其他糖同化,发酵试验见表 1。我们试用本菌免疫血清与分离菌做玻片凝集试验,本菌呈阳性反应,而分离的光滑球拟酵母,白色假丝酵母、酵母菌各 1、2 株,与本菌免疫血清呈阴性反应。玻片凝集试验似有助于初步鉴定。

此外,有人报道测定脑脊液中酒精可辅助诊断本病。其原理是新型隐球酵母在厌氧条件下利用脑脊液中的葡萄糖,将丙酮酸脱羧产乙醛,后者再转化为酒精。而细菌在厌氧下分解糖则不产酒精。测定脑脊液中的酒精的方法是: 1 毫升脑脊液标本加 1 毫升饱和的重铬酸钾硫酸溶液,经 5 分钟、2 小时、24 小时看结果一次,有绿色出现时表示重铬酸钾被还原,即表明脑脊液中有酒精存在^[11]。但其产量小,又因菌株不同而异,且白色念珠酵母也可为阳性,故对鉴定并不实用^[12]。

二、可溶性抗原检查

国外用乳胶凝集试验,补体结合试验,对流免疫电泳等方法,检查脑脊液及其他体液中新型隐球酵母的荚膜多糖抗原^[3],认为乳胶凝集试验较敏感。这种方法是以前以乳胶颗粒为载体,将新型隐球酵母抗体球蛋白挂在其表面,做成致敏乳胶悬液,在与病人脑脊液作用时,如标本中有本菌荚膜多糖抗原(可溶性抗原)存在时,可产生肉眼可见的乳胶颗粒凝集。此法较补体结合试验敏感。有很少数病例靠此法获阳性诊断^[13]。且检查抗原量可帮助判断疗效,抗原量渐减少者,疗效较好。但此法有一定比例的假阳性^[14]。

我国首都医院检验科在探讨了补体结合试验与对流免疫电泳法检验本菌可溶性抗原后^[15],又探索用反向血凝试验检验此抗原。此法敏感、快速、简便、特异性较高。我们学习首都医院经验,对 5 例脑脊液标本试用,3 例墨汁

检验阳性者此法也呈阳性, 2 例(后确诊为结核性脑膜炎)为阴性。初步认为此法敏感性与特异性均较高, 值得推广。此外我们对 1 例用两性霉素 B 与大蒜提取液联合治疗前及治疗 10 天时隐球酵母脑膜炎患者的脑脊液标本, 进行反向血凝定量试验, 发现治疗后脑脊液中荚膜多糖含量较治疗前的下降 16 倍。看来此试验尚可作为观察疗效时的参考。

三、抗体检查

抗体检查可帮助诊断及判断病情、预后。有人认为墨汁检查阴性时, 血清抗体可常为阳性。血清抗体阳性者病情较抗原阳性者病情为轻, 且对两性霉素 B 的反应也轻些^[16]。血清抗体增多, 表明病情有好转^[17]。检查抗体常用的有凝集反应、间接荧光抗体检查法、补体结合试验以及间接血凝试验等。

凝集试验^[17]较简便, 不需特殊设备。用 1% 福尔马林盐水洗下并杀死的菌细胞作抗原, 浓度为 1500 万菌体/毫升。病人血清(脑脊液)经 56℃ 30 分钟灭活, 对倍稀释后加等量菌液, 37℃ 下作用 2 小时, 再置冰箱逐日观察, 共三天。本试验阳性率不高(1:2—1:5 阳性的占 33%)^[16]。我组对 6 例墨汁染色、培养检查为阳

性的病例做血清凝集试验, 仅 1 例为阳性, 且效价低(1:2.5)。

荧光抗体检查, 是把在 Sabouraud 氏培养基上生长 72 小时的培养物, 配成 2×10^8 个细胞/毫升悬液, 经 60℃ 1 小时杀菌后作为靶细胞。涂片后置 60℃ 电热板(我们用 57—60℃ 的烘箱代替)固定 1 小时, 然后按间接荧光抗体染色法染色、镜检。病人血清先做未稀释的, 出现阳性着色后再按对倍稀释来测定。有人报告用这种方法测定, 阳性率达 39%, 效价在 1:1—1:32^[16]。我们对 6 例已经墨汁检查及培养确诊的隐球酵母脑膜炎血清做本试验, 有 2 例为阳性。

也可应用补体结合试验、间接血凝试验等^[18]方法来检查, 后一方法较敏感, 但假阳性也较多(15—21.4%)^[16]。

四、我组一年来临床检验初步经验

根据我组一年来 12 例隐球酵母致脑膜炎微生物学检查结果(表 2), 我们认为:

1. 墨汁检查法快速简便, 阳性率也较高(12 例中 9 例为阳性, 占 75%), 且可检出药物治疗的影响(如对易××一例)对判定疗效及培养结果也可提供一定参考数据。在离心沉淀脑脊液

表 2 一年来 12 例隐球酵母脑膜炎微生物学检查结果

病 例	墨汁检查	分离培养 (长出时间)	其 他 检 查
李××	-	+(7 天)	小白鼠接种, 阳性(接种后 20 天发病)
张××	+	+(4 天)	
胡××	+	+(4 天)	小白鼠接种, 阴性 血清凝集 1:2.5 阳性; 荧光抗体检查阳性
肖××	+	+(4 天)	小白鼠接种阳性(接种后 19 天发病) 血清凝集阴性; 荧光抗体检查阳性
芦××	+	+(3 天)	
雷××	+	+(4 天)	血清凝集及荧光抗体检查阴性
毛××	+	+(4 天)	血清凝集阴性
陈××	+	+(4 天)	血清凝集及荧光抗体检查阴性
余××	-	+(14 天)	
李××	-	+(15 天)	血清凝集及荧光抗体检查阴性
易××			
77.12.19 标本	+	+(4 天)	反向血凝 1:2560
78.1.8 标本 (用药 10 天)	+	-	反向血凝 1:160
(荚膜变窄)(菌体变小)			
李××	+	+(3 天)	反向血凝 1:640

标本时,用水平式离心机离心,菌细胞较易集中于管底;取沉淀标本时,应用金属耳于管底部刮取沉淀细胞做涂片。

2. 用 Sabouraud 氏培养基分离培养,阳性率较墨汁检查为高。一般 1 周内长出,少数需经半月左右,故以观察 1 月未生长者方可判为培养阴性。本菌在 37℃ 下较在 20℃ 下生长为快。所分离的培养物(12 株),均具荚膜、利用尿素、玻片凝集试验阳性、菌落褐色。

3. 用小白鼠进行接种检测,阳性率不一定较培养法为高(表 2);观察小白鼠发病或定期解剖分离病原菌所需时间较长(过去二年来我组仅遇一例培养为阴性,小白鼠脑内接种 49 天后始发病,分出新型隐球酵母),故未列入常规分离之用。

4. 首都医院检验科所用的反向血凝试验检查可溶性抗原的方法,值得推广,此法可助诊断,且可对抗原做定量检查,似可有助于判断疗效,预后等。

5. 检查抗体有助于诊断,且可辅助了解病人免疫状况,是其优点。凝集反应较简便,易推广,但敏感性有待提高。间接荧光抗体检查较凝集反应为敏感。

综上所述,隐球酵母致脑膜炎的确切诊断依赖于微生物学检查,对可疑病例进行病原菌分离鉴定,做可溶性抗原及抗体等检查,是必要的,应依据条件选择进行。不断改进检查法、探讨更多有效的抗菌药物、研究人体免疫性等,都是防治实践需要解决的问题。

参 考 文 献

- [1] Silva-Hutner and B. H. Cooper: *Manual of Clinical Microbiology* (ed. by Lennette, E. H., E. H. Spaulding and J. P. Truant), 2ed ed. Am. Soc. Microbiol., Washington, 1974, pp. 503—504.
- [2] Lodder, J.: *The Yeast, A Taxonomic Study*, 2nd and enlarged ed., North-Holland, Amsterdam, 1970, pp. 1133—1134.
- [3] 小酒井 望: 微生物検査, 臨床検査技術全書, 第 7 卷, 醫學書院, 東京, 1974, p. 286.
- [4] Wolf, P. L.: *Practical Clinical Microbiology and Mycology, Techniques and Interpretation*, John Wiley and Sons, Inc. USA, 1975, pp. 444—445.
- [5] Cruickshank, R., J. P. Duguid, B. P. Marmion and R. H. A. Swain (eds.): *Medical Microbiology*, Vol. 1 Microbial Infections, 12th ed., Churchill Livingstone, Edinburgh and London, 1973, pp. 547—548.
- [6] Kozel, T. R. and R. P. Mastroianni: *Inf. Immunity*, 14: 62—67, 1976.
- [7] Diamond, R. D., R. K. Root and J. E. Bennett: *J. Inf. Dis.*, 125: 367, 1965.
- [8] 戸田忠雄, 武谷健二(编者): 戸田新細菌学, 26 版, 南山堂, 東京, 1974, p. 667.
- [9] Bennett, J. E. and H. F. Hasenclever: *J. Immunol.*, 94: 916—920, 1965.
- [10] Berger, M. P.: *JAMA*, 236: 2517—2518, 1976.
- [11] Tyler, R.: *Am. J. Med. Sci.*, 232: 560—561, 1956.
- [12] Pappagianis, D.: *New Eng. J. Med.*, 275: 223, 1966.
- [13] Goodman, J. S., L. Kaufman and M. G. Koesing: *ibid.*, 285: 434—436, 1971.
- [14] Dolan, C. T.: *Am. J. Clin. Pathol.*, 58: 358—364, 1972.
- [15] 首都医院检验科细菌血清室: 微生物学报, 17: 239—246, 1977.
- [16] Bindeschadler, D. D. and S. E. Bennett: *Ann. Int. Med.*, 49: 45—52, 1968.
- [17] Gordon, M. A. and D. K. Vedder: *JAMA*, 197: 961, 1966.
- [18] Courath, B. T. (ed.): *Handbook of Microtitier Procedures*, Dynatech Corporation, Cambridge, Mass., 1972, pp. 184—185.

更正: 本刊 6 卷 2 期第 10—12 页“中性蛋白酶生产菌 AS 1.398

抗噬菌体菌株和选育和诱变”一文中,“马铃薯粉”均改为“甘薯粉”。