

# 广西贵港地区 2009—2012 年新生隐球菌和格特隐球菌临床分离株基因分型与毒力特性研究

边富宁 吴媛 于栓宝 车洁 李文革 邵祝军 朱兵清 卢金星

**【摘要】** 目的 研究广西贵港地区新生隐球菌和格特隐球菌临床分离株,在种、基因型和交配型的构成及毒力特性。方法 收集 2009—2012 年广西贵港地区临床分离的新生隐球菌株 20 株,PCR 扩增转录间隔区(ITS)序列进行分子生物学验证,通过特异性引物进行 PCR 扩增,鉴定血清型、交配型。利用 M13-PCR 指纹图谱法和 URA5-限制性片段长度多态性分析法,鉴定和验证基因型。表型研究包括 37 °C 生长试验、黑色素生成试验和尿素酶试验。结果 20 株有 19 株为新生隐球菌格鲁比变种,血清型为 A 型,α 交配型,基因型为 VN I 型。1 株为格特隐球菌,属 α 交配型,基因型 VG I。毒力特性研究结果显示,所有临床分离株 37 °C 正常生长,黑色素试验、尿素酶试验阳性。结论 广西贵港地区隐球菌致病菌株中绝大多数(95%)为新生隐球菌格鲁比变种、血清型为 A 型,α 交配型,基因型为 VN I 型,并发现格特隐球菌菌株。

**【关键词】** 新生隐球菌; 格特隐球菌; 基因型; 交配型; 毒力特性

**Study on genotype and virulence of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* clinical isolates in Guigang, Guangxi Zhuang Autonomous Region** Bian Funing, Wu Yuan, Yu Shuanbao, Che Jie, Li Wenge, Shao Zhujun, Zhu Bingqing, Lu Jinxing. State Key Laboratory for Communicable Disease Prevention and Control, Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Collaborative Innovation Center for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Corresponding author: Lu Jinxing, Email: lujinxing@icdc.cn

This work was supported by grants from the National Science and Technology Major Project of China (No. 2013ZX10004203-002), National Natural Science Foundation of China (No. 81301409) and National Science and Technology Support Project of China (No. 2012BAI11B05).

**【Abstract】 Objective** To understand the species, genotypes and mating types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolated from clinical samples in Guigang, Guangxi Zhuang Autonomous Region. **Methods** A total of 20 *Cryptococcus* strains were isolated from clinical samples in Guigang from 2009 to 2012. The biological identification was conducted by polymerase chain reaction (PCR) to amplify internal transcribed spacer (ITS) sequences. The serotypes and mating types of *C. neoformans* and *C. gattii* were identified by PCR with serotype-specific and mating type-specific primers. The genotype was characterized by PCR fingerprinting and URA5 gene restriction fragment length polymorphism (URA5-RFLP). Phenotype study included growth test at 37 °C, melanin production test and urease test. **Results** Among the 20 strains, 19 (95%) were identified as *C. neoformans* varieties (*var.*) *grubii* (serotype A, mating type α, genotype VN I), and only 1 was identified as *C. gattii* (mating type α, genotype VG I). The results of virulence test showed that all the strains grew well at 37 °C and positive in both urease test and melanin production test. **Conclusion** *C. neoformans var. grubii* (serotype A, genotype VN I and mating type α) was the predominant pathogen causing cryptococcosis in Guigang, and *C. gattii* strain was also detected.

**【Key words】** *Cryptococcus neoformans*; *Cryptococcus gattii*; Genotype; Mating type; Characteristics of virulence

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2015.05.017

基金项目: 国家科技重大专项(2013ZX10004203-002); 国家自然科学基金(81301409); 国家科技支撑计划(2012BAI11B05)

作者单位: 102206 北京, 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所 传染病预防控制国家重点实验室 感染性疾病诊治协同创新中心 边富宁、吴媛同为第一作者

通信作者: 卢金星, Email: lujinxing@icdc.cn

新生隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)和格特隐球菌(*Cryptococcus gattii*)主要侵犯人类或哺乳动物的中枢神经系统,引起致命脑膜脑炎(cryptococcal meningitis),亦可侵犯人体肺、皮肤、血液等组织器官,引起严重疾病,死亡率高达 18%~37%,是目前临床上最重要的致病真菌之一<sup>[1-2]</sup>。国内外研究显示,隐球菌临床分离株主要为新生隐球菌格鲁比变种,A 血清型, VN I 基因型, α 配型,在 AIDS 患者中该型别分离率高于 99%<sup>[3-4]</sup>。我国隐球菌病呈散发性,多数患者无明显的基础疾病<sup>[5-6]</sup>。本研究旨在分析广西贵港地区新生隐球菌和格特隐球菌种、变种、血清型、交配型和基因型的构成及生物学特征,以期阐明该地区两种隐球菌临床株的分子流行病学特征。

### 材料与方法

1. 实验菌株:20 株隐球菌临床菌株分离于 2009—2012 年广西贵港市人民医院、贵港市港南区医院、桂平市人民医院、桂平市妇幼保健院、平南县人民医院等 5 家医院的 20 例隐球菌病患者,其中 19 株分离自脑脊液,1 株分离自血液。8 株隐球菌标准株(MYA4560、MYA4561、MYA4562、MYA4563、MYA4564、MYA4565、MYA4566、MYA4567)及白色念珠菌标准株 ATCC6258 购于美国菌种保藏中心(ATCC)。血清型及 α、a 配型标准株:H99(Aα)、KN99(Aa)、JEC21(Dα)、JEC20(Da)、WM276(Bα)、E566(Ba)为美国杜克大学医学中心 J. Heitman 教授馈赠。

2. 主要试剂:沙保氏培养基购自英国 OXOID 公司、酵母基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司、PCR 相关试剂购自宝生物工程(大连)有限公司、限制性内切酶购自美国 NEB 公司。

#### 3. 研究方法:

(1)隐球菌的普通 PCR 鉴定:将菌株接种于沙保氏琼脂培养基,25 °C 培养 48 h,按试剂盒说明书提取基因组 DNA,分光光度计测定提取 DNA 浓度及 A260/A280 比值,-20 °C 保存备用。利用转录间隔区(ITS)的引物(上游:5' -TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3',下游:5' -TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')扩增隐球菌 rDNA 的 ITS 区,扩增产物经纯化后双向测序,并经 DNASTar 软件拼接,在 NCBI 中的 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) 进行比对,鉴定至变种水平<sup>[7-8]</sup>。

(2)血清型和配型分析:参照 Bovers 等<sup>[9]</sup>的研究

方法,用新生隐球菌血清型和交配型特异性引物,对受试菌株 DNA 进行 PCR 扩增,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳,与标准株比较确定血清型,引物序列见表 1。

表 1 隐球菌血清型、配型特异性引物序列

引物名称	序列(5'~3')	血清型	交配型
JOHE 3241	CATCGCTCCACATCTTCGTT	A	-
2596	GCCAGAGAGATTCGATGTTG	D	-
3240	TCCACCCCATTCATACCCG	A	a
2596	GCCAGAGAGATTCGATGTTG	A	α
7270	ATCAGAGACAGAGGAGGAGCAAGAC	D	a
7272	TCCACTGGCAACCTGCGAG	D	α
7264	AGCTGATGCTGTGGATTGAATAC	-	α
7265	GTTCAATTAATCTCACTACCTGTAG	-	α
7273	GTTTCATCAGATACAGAGGAGTGG	-	α
7275	CTCCACTGTCAAACCTACGGC	-	α
7267	ATAGGCTGGTGTGTGAATTAAG	-	α
7268	GTTCAAGTAATCTCACTACATGCC	-	α
MFaU	TTCCTGCGCATCTTACCACC	-	α
MEaL	TCTAGGCGATGACACAAAGGG	-	α
STE12aU	CAATCTCAAAGCGGGGACAG	-	α
STE12aL	CTTTGTTTCGGTCTTAATACAGCC	-	α

(3)基于 PCR 指纹分型和 URA5-RFLP (restriction fragment length polymorphism)的分子分型:PCR 指纹分型参照 Meyer 等<sup>[10-11]</sup>的反应体系及反应条件,比较受试菌株与 8 种基因型标准株电泳图谱结果,仅比较条带的有无,不比较亮度,进行分型归类。URA5-RFLP 分子分型方法:采用引物 URA5 (5' -ATG TCC TCC CAA GCC CTC GAC TCC G-3') 和 SJ01 (5' -TTA AGA CCT CTG AAC ACC GTA CTC-3')<sup>[10]</sup>,PCR 扩增 URA5 基因,取 9 μl 扩增产物,加入 5 μl 的 10×限制酶消化缓冲液,加入 30 U 的 Sau96I,60 U 的 HhaI,补加灭菌蒸馏水至 50 μl,37 °C 酶切 3 h,置于 65 °C,20 min 终止反应。酶切产物经 3%的琼脂糖凝胶电泳,紫外线成像系统摄像后,与标准菌株的酶切谱型进行比较,分析酶切谱型。

#### 4. 毒力特性研究:

(1)37 °C 生长试验:以标准菌株新生隐球菌 H99 作为阳性对照,将活化 48 h 后的受试菌接种于沙保氏培养基,37 °C 培养 3 d,观察菌落生长情况,培养基见典型的酵母样菌落生长为阳性,否则为阴性。

(2)黑色素生成试验:将受试菌与阴性对照白色念珠菌(ATCC6258),阳性对照新生隐球菌(ATCC4563)分别接种于多巴培养基,25 °C 培养 3 d,观察菌落颜色变化。菌落变黑为阳性,未变色者为阴性。

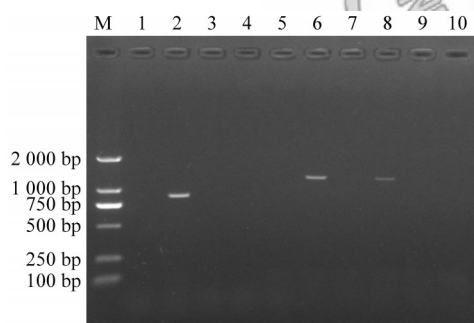


(3) 尿素酶试验:将受试菌与阴性对照白色念珠菌(ATCC6258)和阳性对照新生隐球菌(ATCC4563)分别接种于尿素培养基,25℃培养3d,观察培养基颜色变化。培养基变为桃红色者为阳性,未变色者为阴性。

## 结 果

1. 菌株鉴定:ITS区扩增后双向测序,经DNASar软件拼接,在NCBI中的BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)进行比对鉴定,20株临床株中,19株为新生隐球菌格鲁比变种,1株为格特隐球菌。

2. 血清型和配型:经引物JOHE 3241、2596扩增,19株获得目的条带,1株为阴性。再以引物JOHE 3240、2596、7270、7272、7264、7265、7273、7275、7267、7268扩增19株菌的DNA模板,仅JOHE 7264、7265扩增获得目的条带,其余均无扩增产物。提示该19株均为A血清型,配型为 $\alpha$ 型。余下1株经引物MF $\alpha$ U、MF $\alpha$ L、STE12 $\alpha$ U、STE12 $\alpha$ L扩增,可获得目的条带,鉴定为 $\alpha$ 交配型。部分菌株血清型鉴定扩增产物电泳结果见图1。



注:M:2 000 DNA Marker; 1~5:GX1、KN99(Aa)、H99(A $\alpha$ )、ATCC6258(阴性对照)、空白对照(检测Aa血清型及配型);6~10:GX1、KN99(Aa)、H99(A $\alpha$ )、ATCC6258(阴性对照)、空白对照(比较配型);GX1与H99扩增条带一致,故血清型配型为A $\alpha$

图1 GX1与标准株血清型、配型PCR扩增凝胶电泳

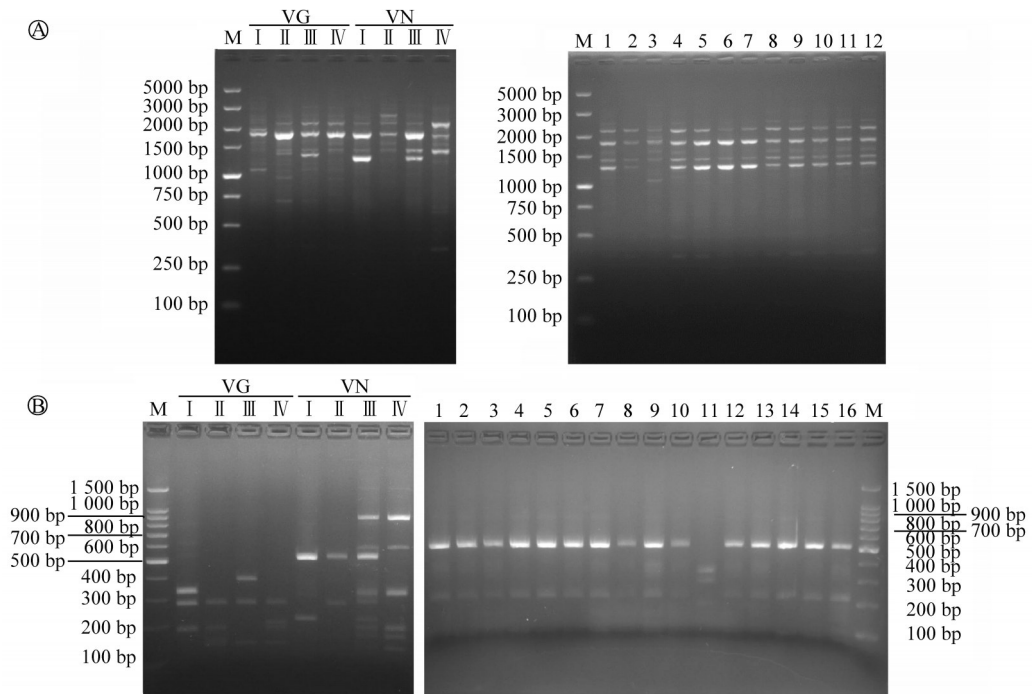
3. PCR指纹图谱、URA5-RFLP电泳:基因型标准株经M13-PCR指纹图谱分型电泳后呈现8种不同条带谱型,差异明显。分析受试株电泳条带,不考虑条带亮度的强弱,19株新生隐球菌格鲁比变种电泳条带一致,与1株格特隐球菌条带有显著不同。与标准株电泳结果比较分析表明,19株新生隐球菌格鲁比变种电泳条带与VN I基因型标准株(MYA4564)一致,其基因型为VN I,1株格特隐球菌(GX11)电泳条带与VG I基因型标准株(MYA4560)一致,其基因型为VG I。

URA5-RFLP电泳结果经与标准菌株的酶切谱型比较,19株新生隐球菌基因型均为VN I,1株格特隐球菌(GX11)基因型为VG I。根据M13-PCR指纹图谱与URA5-RFLP方法,均可将待测菌株鉴定至不同基因型别,且两者鉴定结果一致,提示临床分离隐球菌95%(19株)为VN I基因型,5%(1株)为VG I基因型。部分临床株及标准株M13-PCR指纹图谱和URA5-RFLP酶切谱型凝胶电泳图见图2。

4. 毒力特性:37℃生长试验显示,20株隐球菌临床株均形成典型酵母样型菌落;黑色素生成试验显示,20株隐球菌临床株均可生成黑色素;尿素酶试验显示,20株隐球菌临床株均培养后均为桃红色,隐球菌GX1毒力特性研究结果见图3。

## 讨 论

新生隐球菌包括3个变种:格鲁比变种、新生变种和2个变种的杂合体,有A、D、AD三种血清型,基因型包括VN I、VN II、VN III和VN IV;格特隐球菌包括B、C两种血清型,基因型有VG I、VG II、VG III和VG IV。变种、血清型和基因型之间存在对应关系:格鲁比变种=A血清型=VN I、VN II;新生变种=D血清型=VN IV;杂合子=AD血清型=VN III;格特隐球菌=B/C血清型=VG I~VG IV。研究表明,新生隐球菌和格特隐球菌不同变种及不同基因型之间,在耐药性、易感染对象、感染临床特点及流行病学等方面均有显著差异<sup>[1,10,12-13]</sup>。Barchiesi等<sup>[14]</sup>研究证实,不同交配型对动物的致病性有差异, $\alpha$ 配型强于a配型。本研究结果显示,新生隐球菌格鲁比变种中的VN I基因型和 $\alpha$ 交配型菌株为贵港地区隐球菌病常见的致病菌,其流行特征与我国其他地区及国外文献报道流行趋势无明显差异<sup>[3,5,13]</sup>。新生和格特隐球菌存在 $\alpha$ 和a两种交配型(mating type, MAT),本研究临床分离株均为 $\alpha$ 交配型,支持已有关于 $\alpha$ 交配型致病性强于a交配型的研究结果<sup>[15]</sup>。有研究表明,新生隐球菌交配型分析在菌种鉴定、流行病学、生态学、生物学等方面有着重要意义<sup>[16]</sup>。本研究患者年龄范围为9~81岁,发现1例9岁儿童隐球菌病且无基础疾病,分离鉴定为VN I型新生隐球菌格鲁比变种感染。研究表明,儿童隐球菌病较为少见,Zhu等<sup>[17]</sup>回顾了上海长征医院近10年间约150例隐球菌病例,仅发现11例儿童隐球菌病,平均年龄7.25岁,且全部HIV感染阴性,儿童隐球菌病发生较低的原因尚不清楚,需进一步研究。



注:VG I ~ VNIV 为 8 种基因型标准株 MYA4560 (VG I)、MYA4561 (VG II)、MYA4562 (VG III)、MYA4563 (VG IV)、MYA4564 (VN I)、MYA4565 (VN II)、MYA4566 (VN III)、MYA4567 (VNIV); ①PCR 指纹图谱, M: 5000 DNA Marker, 1 ~ 12; GX9-GX20; ②URA5-RFLP 凝胶电泳, M: 200 bp Ladder DNA Marker, 1 ~ 16; GX1 ~ GX16

图2 部分隐球菌 PCR 指纹图谱、URA5-RFLP 凝胶电泳图



注:①37 °C 生长试验; ②黑色素生成试验; ③尿素酶试验

图3 隐球菌 GX1 毒力特性试验

新生隐球菌的流行病学特征与血清型有密切关系,如地理分布、生态位和临床特点等均与血清型有关<sup>[18]</sup>。Chen 等<sup>[5]</sup>研究了我国 16 个省(市)1980—2006 年间 120 株新生隐球菌,其血清型均为 A 型,交配型为  $\alpha$ ,反映了 A 血清型为我国大部分地区临床新生隐球菌主要流行血清型,但该研究未涉及广西分离的临床分离隐球菌。本研究中 19 株菌血清型均为 A 型,且  $\alpha$  交配型较 a 交配型呈优势分布,反映 A 血清型在广西贵港地区同样为优势血清型,与文献报道一致。本研究采用新生隐球菌血清型和交配型的特异性引物,用分子生物学方法鉴定血清型配型较之传统的血清学方法较为稳定,能够有效地区分

A、D 及 AD 血清型菌株<sup>[19]</sup>。通过对新生隐球菌和格特隐球菌毒力因子黑色素、尿素酶和 37 °C 生长试验结果进行比较,显示在生成黑色素方面,因作用底物不同,菌株产生黑色素时间略有不同,但最终均产生黑色素;在尿素酶产生和 37 °C 生长方面无显著差异。

格特隐球菌在流行病学和所致感染的临床特点上均与新生隐球菌有明显差异<sup>[12]</sup>。自 1999 年起,格特隐球菌在加拿大温哥华岛东部造成暴发感染,而此前不认为该地是格特隐球菌感染的活跃区域<sup>[20-21]</sup>。2010 年,日本报道了 1 例感染与加拿大温哥华岛格特隐球菌暴发流行主要高毒力 VG II a 型



菌株基因型一致的菌株,提示该高毒株可能已随着国际交流播散至亚太地区<sup>[22]</sup>。目前我国尚无高毒力型别菌株暴发感染的报道,本研究中发现 1 株 VG I 型格特隐球菌,毒力特征与新生隐球菌无显著差异,未发现与暴发流行株基因型一致的菌株,亦未发现格鲁比变种中的 VN II 及格特隐球菌的 VG II、VG III、VG IV 基因型,可能与收集的样本量有关,和基因型的分布与地域差异也有一定相关性。

利用 M13-PCR 指纹图谱和 URA5-RFLP 的方法均可将待测菌株分为 8 种基因型,其中 M13-PCR 指纹图谱方法利用单引物扩增出多个扩增产物,经电泳产生多个条带,对 DNA 样本质量要求较高且电泳时间长。采用 URA5-RFLP 方法可将一次 PCR 扩增产物,进行多次酶切电泳进行验证,酶切片段较小电泳时间短,可有效的区分 VN III 不同杂合子的构成。两种方法联合使用,对于有效区分隐球菌 8 种主要基因型及区分不同基因型别构成的杂合子具有重要意义。

#### 参 考 文 献

- [1] Kronstad JW, Attarian R, Cadieux B, et al. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box [J]. Nat Rev Microbiol, 2011, 9(3): 193-203.
- [2] Tay ST, Rohani MY, Hoo TS, et al. Epidemiology of cryptococcosis in Malaysia [J]. Mycoses, 2010, 53(6): 509-514.
- [3] Feng XB, Yao ZR, Ling B, et al. Analysis of the varieties, genotypes and mating types of 110 clinical cryptococcal isolates from China [J]. Chin J Microbiol Immunol, 2008, 28(3): 193-197. (in Chinese)  
冯晓博,姚志荣,凌波,等.国内 110 株新生隐球菌临床株变种、基因型和交配型分析[J].中华微生物学和免疫学杂志,2008, 28(3): 193-197.
- [4] Litvintseva AP, Thakur R, Vilgalys R, et al. Multilocus sequence typing reveals three genetic subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A), including a unique population in Botswana [J]. Genetics, 2006, 172(4): 2223-2238.
- [5] Chen J, Varma A, Diaz MR, et al. *Cryptococcus neoformans* strains and infection in apparently immunocompetent patients, China [J]. Emerg Infect Dis, 2008, 14(5): 755-762.
- [6] Yuchong C, Fubin C, Jianghan C, et al. Cryptococcosis in China (1985-2010): review of cases from Chinese database [J]. Mycopathologia, 2012, 173(5/6): 329-335.
- [7] Katsu M, Kidd S, Ando A, et al. The internal transcribed spacers and 58S rRNA gene show extensive diversity among isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex [J]. FEMS Yeast Res, 2004, 4(4/5): 377-388.
- [8] White T, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics// Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, et al. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications [M]. New York: Academic Press, 1990: 315-322.
- [9] Bovers M, Hagen F, Kuramae EE, et al. Six monophyletic lineages identified within *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by multi-locus sequence typing [J]. Fungal Genet Biol, 2008, 45(4): 400-421.
- [10] Meyer W, Castañeda A, Jackson S, et al. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates [J]. Emerg Infect Dis, 2003, 9(2): 189-195.
- [11] Meyer W, Marszewska K, Amirmostofian M, et al. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA — a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey [J]. Electrophoresis, 1999, 20(8): 1790-1799.
- [12] Speed B, Dunt D. Clinical and host differences between infections with the two varieties of *Cryptococcus neoformans* [J]. Clin Infect Dis, 1995, 21(1): 28-34.
- [13] Arsenijevic VA, Pekmezovic MG, Meis JF, et al. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility of Serbian *Cryptococcus neoformans* isolates [J]. Mycoses, 2014, 57(6): 380-387.
- [14] Barchiesi F, Cogliati M, Esposito MC, et al. Comparative analysis of pathogenicity of *Cryptococcus neoformans* serotypes A, D and AD in murine cryptococcosis [J]. J Infect, 2005, 51(1): 10-16.
- [15] Nielsen K, Cox GM, Litvintseva AP, et al. *Cryptococcus neoformans* α strains preferentially disseminate to the central nervous system during coinfection [J]. Infect Immun, 2005, 73(8): 4922-4933.
- [16] Chauarvedi S, Rodeghier B, Fan J, et al. Direct PCR of *Cryptococcus neoformans* MATα and MATα pheromones to determine mating type, ploidy, and variety: a tool for epidemiological and molecular pathogenesis studies [J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(5): 2007-2009.
- [17] Zhu YJ, Chen JH, Nan X, et al. Cryptococcal meningitis in immunocompetent children [J]. Mycoses, 2012, 55(2): 168-171.
- [18] Enache-Angoulvant A, Chandener J, Symoens F, et al. Molecular identification of *Cryptococcus neoformans* serotypes [J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(4): 1261-1265.
- [19] Viviani MA, Wen H, Roverselli A, et al. Identification by polymerase chain reaction fingerprinting of *Cryptococcus neoformans* serotype AD [J]. J Med Vet Mycol, 1997, 35(5): 355-360.
- [20] Kidd SE, Hagen F, Tschärke RL, et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada) [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(49): 17258-17263.
- [21] Galanis E, MacDougall L, Kidd S, et al. Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999-2007 [J]. Emerg Infect Dis, 2010, 16(2): 251-257.
- [22] Okamoto K, Hatakeyama S, Itoyama S, et al. *Cryptococcus gattii* genotype VG II a infection in man, Japan, 2007 [J]. Emerg Infect Dis, 2010, 16(7): 1155-1157.

(收稿日期: 2015-01-07)

(本文编辑: 万玉立)