

# 对两种新生隐球菌选择性培养基的比较研究\*

李安生 吕桂霞 沈永年 陈伟 吴绍熙

(中国医学科学院皮肤病研究所 南京 210042)

**摘要:** 比较鸟籽琼脂 (GASA, *Guizotia abyssinica* seed agar) 和咖啡酸玉米琼脂 (CACA, Caffeic acid commmeal agar) 对新生变种和格特变种的培养效果, 再同时用两种培养基分离鸽粪和澳洲赤桉标本中的新生隐球菌。结果表明, CACA 对新生隐球菌的培养和选择性分离效果与 GASA 相同, 能够用于新生隐球菌的选择性分离。

**关键词:** 新生隐球菌, 培养基

**中图分类号:** R379    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0253-2654 (2001) 05-0069-05

## COMPARISON OF *GUIZOTIA ABYSSINICA* SEED AGAR WITH CAFFEIC ACID CORNMEAL AGAR TO SELECTIVELY ISOLATE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS*

LI An-Sheng LU Gui-Xia SHEN Yong-Nian CHEN Wei WU Shao-Xi

(*Institute of Dermatology, Chinese Academy of Medical Sciences, Nanjing 210042*)

**Abstract:** The two varieties of *Cryptococcus neoformans* were first observed as well growing with brown color changes on *Guizotia abyssinica* seed agar (GASA) and caffeic acid commmeal agar (CACA). Then, *C. neoformans* var. *neoformans* was found in 18/26 pigeon droppings by both two media. *C. neoformans* var. *gattii* was not isolated by the two media in 76 *Eucalyptus camaldulensis* samples. However, an overgrowth of fil-

\* 国家自然科学基金资助项目 (No. 39670044)

Project Granted by Chinese national Natural Sciences Fund (No. 39670044)

收稿日期: 2000-03-03, 修回日期: 2000-10-15

amentous fungus was more frequently seen on GASA. Our results suggest that CACA be capable of selectively isolating *C. neoformans* with the advantages of less interference from the overgrowth of filamentous fungi.

**Key words:** *Cryptococcus neoformans*, Medium

新生隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*) 是一种可引起人类系统性感染和导致艾滋病患者死亡的致病性真菌<sup>[1,2]</sup>。快速分离和鉴定菌种是新生隐球菌感染的早期诊断和实验研究中的重要环节。GASA 和 CACA 是两种可选择性分离新生隐球菌的培养基, 新生隐球菌在这些培养基上生长呈棕色菌落, 极大地方便了对此菌的分离<sup>[3,4]</sup>。GASA 培养基的主要成分是 *Guizotia abyssinica* 种子 (又称 Niger birdseed, 鸟籽) 的抽提物, CACA 则是在玉米抽提液中直接添咖啡酸制成<sup>[5,6]</sup>。虽然, GASA 是国际上应用最广泛的分离新生隐球菌的选择性培养基, 但是由于缺乏 *G. abyssinica* 种籽和制作比较复杂一直未能在我国应用。本实验对两种培养基选择性分离新生隐球菌的效果进行了比较。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 菌种: 本实验使用的新生隐球菌新生变种 (CDC551) 和格特变种 (NIH18) 为中国医学真菌保藏中心保存的标准参考菌株。

1.1.2 培养基: ①GASA<sup>[7]</sup>: 将 5.0g 鸟籽, (由澳大利亚 David H. Ellis 教授赠送) 置于 1L 蒸馏水中, 用组织粉碎机制成匀浆后隔水煮沸 20min, 以定性滤纸过滤上清液, 补充蒸馏水至 1L。加入 0.1g 磷酸二氢钾, 1.0g 肌酐, 1.0g 葡萄糖, 氯霉素 (125mg%) 和 20.2g 琼脂。1 × 10<sup>5</sup> Pa 高压灭菌 15min 后制成 GASA 平板 (直径: 100mm)。②CACA<sup>[8]</sup>: 取 40.0g 玉米粉放入 1L 蒸馏水中, 水浴加热 80℃ 20min 后用尼龙布过滤, 补充蒸馏水至 1L 后加入 300mg 咖啡酸, 氯霉素 (125mg%) 和 20g 琼脂, 按前法制成 CACA 平板。

### 1.2 方 法

1.2.1 参考菌株在两种培养基上培养效果比较: 用新生隐球菌两个变种的参考菌株, 分别制成 1 × 10<sup>3</sup> 细胞/mL 的无菌生理盐水悬液, 按每平板 100μL 接种到两种培养基上。经 25℃ 培养后观察两种培养基上的菌落数和棕色菌形成情况。

1.2.2 由环境标本中分离新生隐球菌效果比较: 将 1.0 鸽粪标本和 10mL 生理盐水制成悬液之后按每平板 100μL 接种到两种培养基上。取澳洲赤桉标本 5.0g 于 30mL 蒸馏水中振摇后用 4 层纱布过滤, 2, 000r/min 离心 10min, 将沉淀物接种到两种培养基上 (100μL/皿)。接种后于 25℃ 培养, 每天观察菌落生长情况。棕色菌落被择取到 SDA 斜面, 作菌落纯度分析后进行菌种鉴定<sup>[7,8]</sup>。以上鸽粪标本 (共 26 份) 由南京市养鸽户的鸽舍采集; 赤桉植物标本 (共 72 份, 包括花、叶、树皮和腐木屑) 由江西省贵溪市林业局林场采集。

## 2 结 果

### 2.1 新生隐球菌标准菌种在两种培养基上的生长效果比较

新生隐球菌的 2 个变种各 1 株分别接种到两种培养基上, 置 30℃ 培养 3d 后均可见在两种培养基上生长为典型的棕色菌落, 且相同菌量的接种物生长出的菌落量没有明显的差别。菌落呈现棕色的时间大致相同。比较新生变种和格特变种在两种培养基上形成的菌落外观没有见到明显差异, 均呈现棕色乃至深棕色菌落 (图 1)。

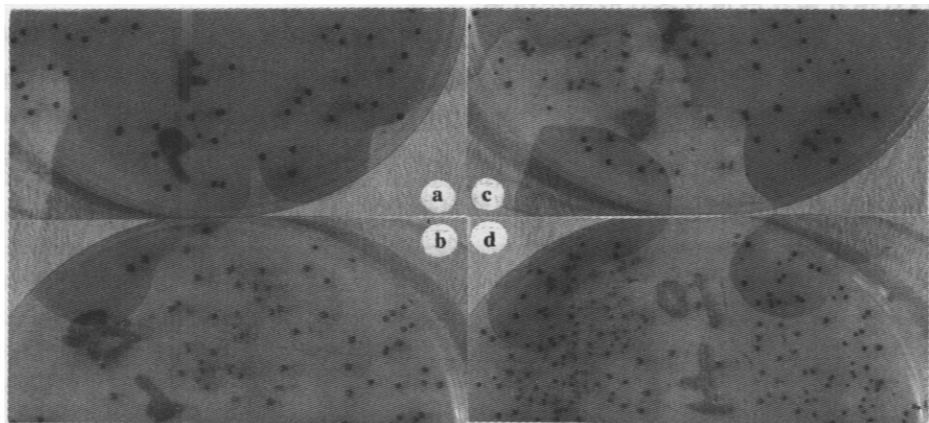


图1 新生隐球菌参考菌株在2种培养基上的生长

a 新生变种 CDC551(CACA), b 格特变种 NIH18(CACA),  
c 新生变种 CDC551(GASA), d 格特变种 NIH18(GASA)

## 2.2 两种培养基分离新生变种的结果比较

总共采取 26 份鸽粪标本, 经处理后同时接种于两种培养基上。按 3d 和 7d 观察酚氧化酶阳性 (棕色) 菌落的结果见表 1。由表 1 可见, 两种培养基对新生隐球菌新生变种的分离效果完全相同。但观察两种培养基上其它直菌的生长情况则明显可见 GASA 上丝状真菌生长较为旺盛, 到第 3d 时丝状真菌已经覆盖大部分培养皿的表面 (图 2a)。与 GASA 相比, 在 CACA 上丝状真菌的生长相对较慢, 至第 7d 仍然未见明显覆盖性生长 (图 2b)。

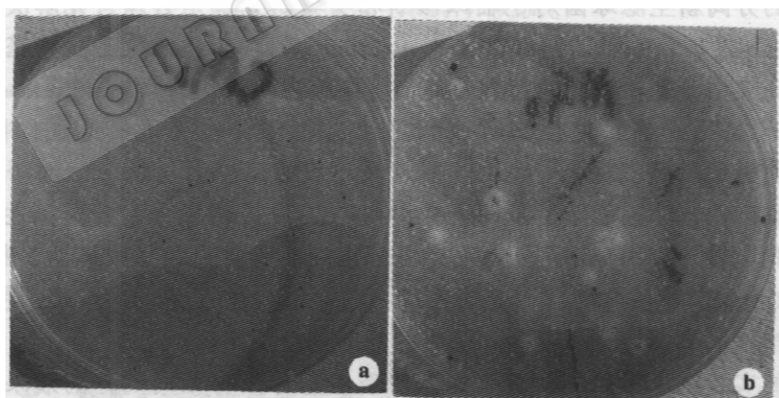


图2 由鸽粪标本分离新生隐球菌

a CACA, b GASA

表1 GASA 和 CACA 分离环境标本中新生隐球菌的结果比较

标本	CACA						GASA						
	3d		OC**	7d		OG	3d		OG	7d		OG	
	+	-		+	-		+	-		+	-		
鸽粪*	26	18	8	4	18	8	8	18	8	14	18	8	26
赤桉	72	0	72	4	0	72	4	0	72	47	0	72	70

\* 在两种培养基上的阳性标本相同, \*\* 覆盖性生长

### 2.3 两种培养基分离格特变种的结果比较

由表1可见同时使用两种培养基均未能从采集自赤桉的花、叶、树皮和腐木屑标本中分离出新生隐球菌格特变种菌株。虽然我们尚不能据此肯定由澳洲引进中国的赤桉植株中不存在新生隐球菌格特变种,但是从图3可见在GASA丝状真菌的覆盖性生长较CACA明显。经25℃培养3d后,GASA平板的表面已经基本为丝状真菌生长所覆盖(图3a),而CACA仍然可见单个的酵母菌落(图3b)。

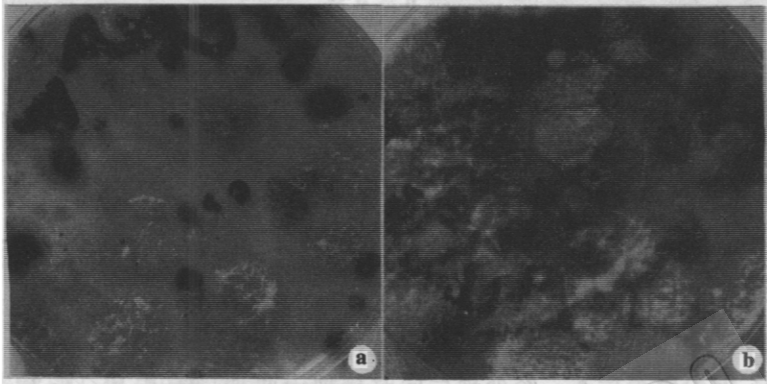


图3 由赤桉标本中分离新生隐球菌

a CACA,

b GASA

## 3 讨论

新生隐球菌在常规培养基无性期生长时呈现与其它酵母或酵母样真菌不能区别的酵母样菌落,对这些酵母样菌落必须作大量菌种鉴定工作。如何从环境或临床标本中快速、特异的分离新生隐球菌对于临床诊断和实验研究都是必须首先解决的问题。早在1963年Staib发现新生隐球菌在含*G. abyssinica*的种子提取物的培养基上可呈棕色菌落。后来证实由于新生隐球菌特异性地产生细胞内酚氧化酶(Phenoloxidase),当其生长基物中含有双酚或单酚化合物时该酶可使这些化合物氧化而形成细胞内黑色素(Melanin),使得菌落呈现棕色<sup>[9,10]</sup>。这些发现不仅为后来新生隐球菌的研究打下了基础,而且为临床快速诊断创造了条件。GASA和CACA是两种典型的选择性培养基,但至今尚未在我国普及应用,不利于对新生隐球菌的实验研究和临床早期诊断。与GASA相比较,CACA的制备较简便且不受缺乏鸟籽的限制,适宜于在我国推广使用。为此,我们对两种培养基选择性分离新生隐球菌的效果进行了比较。

由我们的实验结果可见,两种培养基对新生隐球菌有相同的分离效果。主要证据是:①新生隐球菌两个变种的参考标准菌株在两种培养在上都可以正常生长,产生黑色素(图1);②用两种培养基从鸽粪标本中分离新生隐球菌新生变种和由赤桉标本中分离新生隐球菌格特变种效果完全相同(表1)。此外,丝状真菌在GASA上容易发生覆盖性生长以致难以分离新生隐球菌的单纯菌落(图2b,图3b);相反,CACA则较少发生上述现象(图2a,图3a)。造成这种差别的原因可能是GASA培养基中添加了较丰富的、有利于丝状真菌生长的营养成分。根据以上结果,我们认为CCA与GASA对新生隐球菌不但选择性分离效果相同,而且更有利于分离单纯菌落,此外,CACA制作简单,可以在我国的医院和研究单位推广使用。

## 参 考 文 献

- [1] Sugar A M. *Mycopathologia*, 1991, 114: 153 ~ 157.
- [2] Hajjeh R A, Conn L A, Stephens D S, *et al.* *J Infect Dis*, 1999, 179: 449 - 454.
- [3] Staib F, Seibold M, Artweller E, *et al.* *Mycoses*, 1989, 32: 448 ~ 454.
- [4] Wang H S, Zeimis R T, Roberts G D. *J Clin Microbiol*, 1977, 6: 445 ~ 449.
- [5] Denng D W, Stevens D A, Hamilton J R. *J Clin Microbiol*, 1990, 28: 2565 ~ 2567.
- [6] Sukroongreung S, Eampokalap B, Tansuphaswadikul S, *et al.* *Mycopathologia*, 1998, 143: 131 ~ 134.
- [7] 李安生, 吴绍熙. *微生物学报*, 1995, 35: 97 ~ 102.
- [8] Williamson P R, Wakamatsu K, Ito S. *J Bacteriol*, 1998, 180: 1570 ~ 1572.
- [9] Staib F. *Mycopathol Mycol Appl*, 1963, 19: 143 ~ 145.
- [10] Polacheck I, Hearing V J, Kwon-Chung K J. *J Bacteriol*, 1982, 150: 1212 ~ 1220.