论著

文章编号:1000-5404(2010)03-0206-04

中国和巴西临床新生隐球菌格鲁比变种菌株的种群和基因型比较分析

朱 键[1],刘 莹[2],大楠悦子[2],三上襄[2] (550004 贵阳,贵阳医学院附属医院消化内科[1];日本 千叶,日本千叶大学真菌医学研究中心[2])

[摘要] **目的** 了解新生隐球菌格鲁比变种(*Cryptococcus neoformans var. grubii*)临床菌株在国内和巴西多位点微卫星位点定型(multilocus microsatellite typing MLMT)的种群分布特征,探讨并分析两国新生隐球菌格鲁比变种 MLMT 基因型差异。**方法** 对已鉴定的69株新生隐球菌格鲁比变种进行 DNA 提取,采用3个微卫星位点(CNG1、CNG2、CNG3)的正反序列引物对相应的微卫星位点基因片段进行扩增后测序;测序后计算出每一菌株位点基序重复数(CNG1 对应 TA 重复,CNG2 对应 GA 重复,CNG3 对应 CAT 重复);结合不同基序重复数判定各菌株的基因型。应用 SPSS 11.5 统计软件进行统计学分析。**结果** 在33株被 MLMT 基因分型的国内新生隐球菌 grubii 变种菌株中有5种基因型被鉴定,其中29株为 MLMT-17,占87.88%;而在36株巴西临床菌株中有10种基因型被鉴定,其中19株为 MLMT-13,占52.78%。**结论** 两国间新生隐球菌格鲁比变种临床菌株的主要基因型分布存在显著差异。巴西临床菌株的基因型分布表现为多样性。

[关键词] 新生隐球菌变种格鲁比;临床菌株;多位点微卫星灶分型

[中图法分类号] R372;R397.5;R394 **[文献标志码]** A

Multilocus microsatellite typing of clinical *Cryptococcus neoformans var. grubii* strains from China and Brazil

Zhu Jian[1], Liu Ying[2], Etsuko Ohkusu[2], Yuzuru Mikami[2] ([1]Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Guiyang Medical University, Guiyang, Guizhou Province, 550004; [2]Medical Mycology Research Center (MMRC), Chiba University, 1-8-1 Inohana, Chiba 260-8673, Japan)

[Abstract] **Objective** To understand the genotype distribution of clinical *Cryptococcus neoformans var. grubii* strains from China and Brazil using multilocus microsatellite typing (MLMT) method and to study the difference in their MLMT genotyping. **Methods** DNA was extracted from the identified 69 clinical *Cryptococcus neoformans var. grubii* strains. DNA fragments covering microsatellite loci (CNG1, CNG2, and CNG3) were amplified by PCR and sequenced. The number of each motif repeats in 3 microsatellite regions ("TA", "GA", and "CAT" repeats for CNG1, CNG2, and CNG3, respectively) was calculated. The MLMT types of 69 clinical *Cryptococcus neoformans var. grubii* strains were determined according to the repeat number of different motifs. Data were analyzed using SPSS 11.5 software. **Results** Five genotypes were identified in 33 clinical strains from China. Of these strains, 29 were MLMT-17, accounting for 87.88% of the total strains. Ten genotypes were identified in 36 clinical strains from Brazil. Of the 36 strains, 19 were MLMT-13, accounting for 52.78% of the total strains. **Conclusion** The difference is great in major genotype distributions of the clinical *Cryptococcus neoformans var. grubii* strains from China and Brazil. The genotype of clinical strains from Brazil is diversely distributed.

[Key words] *Cryptococcus neoformans var. grubii*; clinical strains; multilocus microsatellite typing

Supported by Special Coordination Funds for Promoting Science and Technology of Japan MEXT (2008). Corresponding author: Zhu Jian, Tel: 86-851-6855119-3026, E-mail: zhujian1972@163.com

新生隐球菌是威胁人类生命的重要致病性真菌,尤其对有免疫功能损害的患者,可引起6% ~8%的艾滋病患者的严重感染[1]。已发现新生隐球菌有3个变种,格鲁比变种(*Cryptococcus neoformans var. grubii* 血清型 A),新生变种(*Cryptococcus neoformans var. neoformans* 血清型 D)和格特变种(*Cryptococcus neoformans var. gattii* 血清型 B,C),此外还发现格鲁比变种和新生变种的杂合体(血清型 AD)[2]。格鲁比变种主要引起有免疫缺陷宿主的隐球菌病[3]。格鲁比变种多从陈旧鸽粪及被鸽粪污染的土壤中分离出[4]。几

[基金项目] 日本文部省资助项目(2008)

[通信作者] 朱 键,电话:(0851)6855119-3026,E-mail: zhujian1972@163.com

种分子学定型方法,例如限制性片段长度多态性(RFLP),扩增片段长度多态性(AFLP),DNA 指纹分析,ITS 等已运用于新生隐球菌格鲁比变种的基因定型。但不同于上述几种方法,微卫星位点又被称为简单序列重复或短串联重复,有高度多态性,可存在于所有基因组中,包括人类、低等真核生物及真菌[5]。在先前的研究中,我们成功的应用 3 个微卫星位点(CNG1,CNG2 和 CNG3)对格鲁比变种的菌株进行分子分型,而且证实其分辨率高,可以用于格鲁比变种的个体菌株定型[6],因此可以更具体的对格鲁比变种种群结构进行研究。本研究中,我们采用该方法分别对我国 33 株,巴西 36 株格鲁比变种的临床菌株进行多位点微卫星位点分型,以了解国内及巴西格鲁比变种种群基因型分布特征。

1 材料与方法

1.1 菌种来源

从国内临床患者分离出的 33 株新生隐球菌,自 2003 年 6 月至 2007 年 12 月分别由北京大学第一附属医院分离出 7 株,广州中山大学第二附属医院分离出 14 株,上海,南京及台湾(具体医院不详)各分离出 5 株、4 株、3 株。标本有 11 例来自于 HIV 患者脑脊液中,1 例来自于 HIV 患者的支气管肺泡灌洗液中,10 例来自于脑炎患者脑脊液中,余 11 例具体疾病及采样部位不详。巴西临床患者由 1999 年 5 月至 2003 年 5 月由巴西 Camapinas 大学附属医院分离出的 36 株菌. 其中 16 例来自于 HIV 患者脑脊液,余 20 例具体疾病及采样部位不详。菌株均存放于日本千叶大学真菌研究中心。

DNA 的提取、PCR 扩增及 DNA 测序 具体方法参见前研究[7],简要叙述如下:对所有 69 株菌经 CGB 培养基鉴定为格鲁比变种。对所提取 DNA 进行 PCR 扩增,扩增后并行 DNA 测序。PCR 扩增后产物长度范围分别为:CNG1 位点:256 ~ 294 bp;CNG2 位点:408 ~ 438 bp;CNG3 位点:577 ~ 676 bp。

1.2 基因定型分析

相关具体基因分型方法参见前研究[7],其中各位点基序重复组合为 9,10,7 对应 MLMT-2;11,11,9 对应 MLMT-12;11,11,12 对应 MLMT-13; 11,12,12 对应 MLMT-14 ;12,11,7 对应 MLMT-16;12,12,7 对应 MLMT-17;11,8,9 对应 MLMT-31; 8,6,7 对应 MLMT-32;10,8,7 对应 MLMT-33;9,10,5 对应为 MLMT-34;4,6,5 对应 MLMT-37; 14,12,7 对应 MLMT-39。

1.3 统计学处理

应用 SPSS 11.5 统计软件对数据进行 χ^2 检验和 Wilcoxon 秩和检验。

2 结果

2.1 国内和巴西新生隐球菌格鲁比变种菌株的基因型和 MLMT 分布

经 MLMT 将 33 株国内临床分离出的新生隐球菌格鲁比变种菌株分为 5 个基因型, 其中 MLMT-17 占 87.88%。36 株从巴西临床分离出的新生隐球菌格鲁比变种菌株被 MLMT 鉴定为 10 个基因型, MLMT-13 占 52.78%,国内和巴西临床菌株的 MLMT 分布具体见表 1。

表 1 中国和巴西新生隐球菌格鲁比变种临床菌株的 MLMT 基因型分布[例数(%)]

国别	MLMT											
	2	12	13	14	16	17	31	32	33	34	37	39
中国				1(3.03)	1(3.03)	29(87.88)				1(3.03)		1(3.03)
巴西	3(8.3)	2(5.6)	19(52.78)	1(2.78)		5(13.89)	1(2.78)	2(5.6)	1(2.78)	1(2.78)	1(2.78)	

2.2 中国和巴西临床菌株各位点基序不同重复数的频数分布比较

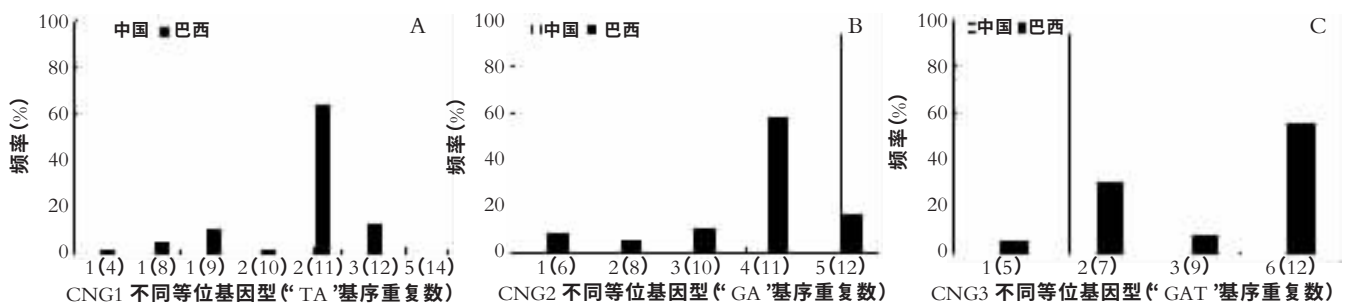
CNG1 位点,中国临床菌株中的 TA 重复 12 多见(90.91%),巴西临床菌株中的 TA 重复 11 多见(63.89%);CNG2 位点,中国临床菌株中的 GA 重复 12 多见(93.94%),巴西临床菌株中的 GA 重复 11 多见(58.33%); CNG3 位点,中国临床菌株中的 CAT 重复 7 多见(93.94%),巴西临床菌株中的 GA 重复 11 多见(55.56%)。见图 1。

2.3 发现的新的 MLMT 基因型

在分型中,共发现 6 个新的 MLMT 基因型 (MLMT-31,-32,-33,-34,-37,-39)。在 CNG1 微卫星灶位点发现 4 个新的等位基因型 (TA 重复数):1(4)、1(8)、2(10)、5(14),日本国际基因数据(DDBJ)登录号:AB478353、AB478355、AB478356、AB488809;在 CNG2 微卫星灶位点发现 2 个新的等位基因型(GA 重复数):1(6)、2(8)。DDBJ 登录号:AB478354 和 AB478357。

2.4 Wilcoxon 符号秩和检验

对国内和巴西临床患者感染新生隐球菌格鲁比的 3 个微卫星位点 CNG1、CNG2、CNG3 等位基因型及 MLMT 基因型进行 Wilcoxon 符号秩和检验,Z 值分别为 -5.980、-5.817、-3.988、-4.067,$P<0.01$。



A:CNG1; B:CNG2; C:CNG3

图 1 中国和巴西临床菌株 3 个微卫星位点不同等位基因型的频数比较

3 讨论

新生隐球菌是担子菌纲隐球菌属的重要的机会性致病菌,是威胁艾滋病及免疫力低下患者生命的重要原因之一。格鲁比变种和新生变种已经在世界范围内被分离出,而不同国家和地区两变种流行情况不同[2,8-11]。在巴西,临床上最为常见是格鲁比变种,占65%[12]。在我国,格鲁比变种同样也是临床上最常见的变种[13,14]。为了更深入的了解两国格鲁比变种基因型分布上的差异,我们应用多位点微卫星位点分型(MLMT)[6],对临床上分离出的69株格鲁比变种进行基因分型。

本研究我们发现两国格鲁比变种临床菌株的基因型分布存在显著性差异($P<0.01$)。巴西的临床菌株基因型以MLMT-13为主(52.78%);而中国的临床菌株基因型以MLMT-17为主(87.88%)。两国临床菌株中,各微卫星位点基序重复数出现频数最高的等位基因型也有显著性差异($P<0.01$)。此现象可能与两国临床患者对2种基因型的易感性和免疫不同 相关。因此,对于MLMT-13及MLMT-17毒力及两基因型的免疫上的差异尚待进一步研究。此次研究我们未曾在国内的临床菌株中分离出MLMT-13,这可能与有限的样本量有关。

结合先前研究[6],巴西临床菌株共有22种基因型;在我国临床菌株中共有5种基因型被发现,巴西菌株的基因型多于国内菌株基因型,此现象与先前报道相符[12,14]。考虑可能是由于二国不同的地理位置,湿度,温度为格鲁比变种提供了不同的生存环境。巴西位于赤道线与南回归线之间,以热带气候为主,平均湿度大,可能为各基因型格鲁比变种,提供了良好的生长环境。同时,不同的历史背景也可能是一种合理的解释。由于巴西曾是殖民地国家,大量来自欧洲、非洲移民的涌入,各种动植物也随之输入到该国,为各型格鲁比变种进入巴西提供了良好的途径。目前已成功的从土壤、腐烂的树木[15]及鸟类粪便分离出[2,4]。虽然,人与人间传播格鲁比变种还缺乏依据,但有证据表明以鸟粪为传染源的动物源性传播的存在[16]。在两国的自然环境中是否可分离出相应的基因型,还需进一步对环境菌株进行分型。

此外,我们对3个微卫星灶重复基因序列进行进一步分析发现,在国内临床菌株的基因型中,MLMT-16在CNG2位点重复基因序列(GA),MLMT-39在CNG1位点重复基因序列(TA)重复数与MLMT-17在该位点重复基因序列重复数非常接近。而这两型的其余位点重复基因序列重复数与MLMT-17一样。同样,在巴西临床菌株的基因型中,MLMT-12在CNG3位点重复基因序列(CAT),MLMT-14在CNG2位点重复基因序列(GA)重复数与MLMT-13在该位点重复基因序列重复数非常接近。而这两型的其余位点重复基因序列重复数与MLMT-13一样。格鲁比变种在体内外有着超强的微进化能力可能是最合理的解释[17,18]。正如以上讨论所提到,新生隐球菌格鲁比变种可生长在不同的微生态环境中,例如鸟粪,土壤,腐烂的树木[2,4,15]。是否这些不同的微生态环境可引起格鲁比变种的微进化及微进化的程度还待进一步研究。

目前,随着艾滋病及免疫力低下的患者日益增多,人口流动的增加,新生隐球菌格鲁比变种的种群分布也将发生改变。随着MLMT方法的进一步开展,将会为我们对隐球菌病的防治提供有效信息。

参考文献:

[1] Currie B P, Casadevall A. Estimation of the prevalence of cryptococcal infection among patients infected with the human immunodeficiency virus in New York City[J]. Clin Infect Dis, 1994, 19(6): 1029-1033.

[2] Casadevall A, Perfect J R. Cryptococcus neoformans[M]. Washington: ASM Press, 1998: 41-70.

[3] Imai T, Watanabe K, Tamura M, *et al*. Geographic grouping of *Cryptococcus neoformans var. gattii* by random amplified polymorphic DNA fingerprint patterns and ITS sequence divergence[J]. Clin Lib, 2000, 46(7-8): 345-354.

[4] Levitz S M. The ecology of Cryptococcus neoformans and epidemiology of cryptococcosis[J]. Rev Infect Dis, 1991, 13(6): 1163-1169.

[5] Bretagne S, Costa J M, Besmond C, *et al*. Microsatellite polymorphism in the promoter sequence of the elongation factor 3 gene of Candida albicans as basis for a typing system[J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(7): 1777-1780.

[6] Hanafy A, Kaocharoen S, Jover-Botella A, *et al*. Multilocus microsatellite typing for *Cryptococcus neoformans var. grubii*[J]. Med Mycol, 2008, 46(7): 685-696.

[7] 朱键, 刘莹, 大楠悦子, 等. 新生隐球菌格鲁比变种国内菌株的多位点微卫星灶分型[J]. 基础医学与临床, 2009, 29(10): 1054-1058.

[8] Jian N, Wickes B L, Keller S M, *et al*. Molecular epidemiology of clinical Cryptococcus neoformans strains from India[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(11): 5733-5742.

[9] Meyer W, Castaneda A, Jackson S, *et al*. Molecular typing of IberoAmerican Cryptococcus neoformans Isolates[J]. Emerg Infect Dis, 2003, 9(2): 189-195.

[10] Viviani M A, Cogliati M, Esposto M C, *et al*. Molecular analysis of 311 Cryptococcus neoformans isolates from a 30-month ECMM survey of cryptococcosis in Europe[J]. FEMS Yeast Res, 2006, 6(4): 614-619.

[11] Tintelnot K, Lemmer K, Losert H, *et al*. Follow-up of epidemiologi-

cal data of cryptococcosis in Austria , Germany and Switzerland with special focus on the characterization of clinical isolates[J]. Mycoses, 2004, 47(11-12): 455-464.

[12] Barreto-de-Oliveira M T, Boekhout T, Theelen B, *et al*. Cryptococcus neoformans shows a remarkable genotypic diversity in Brazil[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(3): 1356-1359.

[13] Feng X, Yao Z, Ren D, *et al*. Genotype and mating type analysis of Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii isolates from China that mainly originated from non-HIV-infected patients[J]. FEMS Yeast Res, 2008, 8(6): 930-938.

[14] Chen J, Varma A, Diaz M R, *et al*. Cryptococcus neoformans strains and infection in apparently immunocompetent patients, China[J]. Emerg Infect Dis, 2008, 14(5): 755-762.

[15] Randhawa H S, Kowshik T, Chowdhary A, *et al*. The expanding host tree species spectrum of Cryptococcus gattii and Cryptococcus neoformans and their isolations from surrounding soil in India[J]. Med Mycol, 2008, 46(8): 823-833.

[16] Lagrou K, Van-Eldere J, Keuleers S, *et al*. Zoonotic transmission of Cryptococcus neoformans from a magpie to an immunocompetent patient[J]. J Intern Med, 2005, 257(4): 385-388.

[17] Franzot S P, Mukherjee J, Cherniak R, *et al*. Microevolution of a standard strain of Cryptococcus neoformans resulting in differences in virulence and other phenotypes[J]. Infect Immun, 1998, 66(1): 89-97.

[18] Sullivan D, Haynes K, Moran G, *et al*. Persistence, replacement, and microevolution of Cryptococcus neoformans strains in recurrent meningitis in AIDS patients[J]. J Clin Microbiol, 1996, 34(7): 1739-1744.

(**收稿**:2009-05-11;**修回**:2009-11-29)

(编辑 邓强庭)

(上接205页)

2.2 2组疗效比较

疗效显示,虽然2组总有效率相等,但治疗组的治愈率明显高于对照组($\chi^2=6.28$, $P<0.05$)。见表2。

表2 2组疗效比较[例数(%)]

组别	n	治愈	好转	无效	总效率
治疗组	43	42(97.7)[a]	1(2.3)	0(0)	100
对照组	42	34(81.0)	8(19.0)	0(0)	100

a:$P<0.05$,与对照组比较

3 讨论

婴儿重症肺炎是其较常见的危重症之一,婴儿肺炎很容易进展成为重症是与其生理结构有着密切的关系。婴儿由于气管黏膜娇嫩、淋巴丰富、气管径狭小、纤毛摆动差,所以如果发生呼吸道感染,很快发展成肺炎,甚至为重症肺炎。当婴儿重症肺炎时,内径相对较狭小支气管和娇嫩气管黏膜容易受到炎症刺激时引起黏膜水肿,导致气道更加狭窄,分泌物不易清除,故而导致通气障碍;加上肺泡壁充血、水肿、增厚、肺泡内被炎性出物充填,导致通气/血流比值失调和换气功能障碍。因此,婴儿重症肺炎存在很多并发症,如心力衰竭、呼吸衰竭、中毒性脑病、微循环障碍、休克和DIC等,其中心力衰竭为重症肺炎最常见的并发症,有学者统计占63.4%[1]。随着新技术的不断应用,重症肺炎的诊断方法及治疗也得到了不断的发展,对重症肺炎的定义也有新的观点。目前认为肺炎患儿出现严重的通、换气功能障碍或全身炎症反应,即可诊断为重症肺炎[3]。

虽然目前糖皮质激素在重症肺炎治疗中的应用尚存在一定的争议,但是有逐渐增多的趋势。我们通过短期使用小剂量甲强龙发现虽然总有效率2组没有差异,但治愈率治疗组(97.7%)远高于对照组(81.0%),并且没有出现副作用,由此可见甲强龙可以提高婴儿重症肺炎的治愈率。重症肺炎的发展与全身炎症反应紧密相关,当严重的感染、缺氧时,机体会释放大量释放炎症介质,从而导致了全身的炎症反应。糖皮质激素可减轻炎症反应。外国学者Confalonieri等[4]研究表明,小剂量糖皮质激素可加速重症肺炎的肺部炎症消退,减少重症肺炎患儿的并发症,提高肺炎的疗效,缩短住院时间。本组资料治疗组中43例婴儿重症肺炎在常规治疗基础上加用小剂量的甲强龙,在咳喘消失时间、肺部啰音吸收时间及住院时间(表1)均有明显缩短,故由此资料说明甲强龙可以缩短婴儿重症肺炎的疗程。

甲强龙是一种人工合成的中效糖皮质激素,具有抗炎、抗过敏、抗休克及免疫抑制药理作用。该药的抗炎作用较强,相当氢化可的松的5倍,强的松的1.4倍[5]。甲强龙利用强大的抗炎、抗过敏、抗休克及作用,抑制全身炎症反应综合征进一步加重,气管、肺泡水肿、充血减轻及分泌物减少,有效改善通气及换气功能,从而改善患儿的缺氧,阻止了一系列并发症的发生,为抗感染赢得了时间。甲强龙在体内可迅速达到较高血药浓度,与糖皮质激素受体的亲和力最强,而盐皮质激素样作用(如水、钠潴留)微弱,在临床使用副反应轻微,特别适用危重患儿[5]。本组资料在治疗中没有发现水钠潴留及病情加重的情况。因此在有效抗感染治疗的情况下,短期小剂量应用甲强龙是安全的,疗效确切,在婴儿重症肺炎的抢救中可以合理使用。

参考文献:

[1] 袁壮,薛辛东. 儿科急重症与疑难病例诊治评述[M]. 北京:人民卫生出版社,2003:84-85.

[2] 中华医学会儿科学分会呼吸组,《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童社区获得性肺炎管理指南(试行)(上)[J]. 中华儿科杂志,2007,45(2):83-90.

[3] 乔俊英,栾斌. 小儿重症肺炎的诊治策略[J]. 医学与哲学:临床决策论坛版,2007,28(5):36-38.

[4] Confalonieri M, Trevisan R. Prolonged infusion of hydrocortisone in patients with severe community acquired pneumonia[J]. Recenti Prog Med, 2006, 97(1): 32-36.

[5] 杨从荣,周咏梅,徐涛. 甲泼尼龙的临床应用[J]. 继续医学教育,2006,20(33):61-64.

(**收稿**:2009-07-08;**修回**:2009-07-25)

(编辑 王小寒)