

· 病例报告 ·

一例格特隐球菌感染引起脑膜脑炎患者的临床表现
与实验室鉴定分析曹敬荣¹ 陈静^{1,2} 高世超¹ 闵嵘¹ 王培昌¹

【摘要】目的 探讨格特隐球菌引起脑膜脑炎的临床及病原学特点,为临床和实验室认识及诊疗该类疾病提供帮助。方法 分析患者的临床资料、实验室辅助检查、诊疗经过和实验室对病原菌的分离鉴定、药敏试验及18S rRNA序列测定并复习相关文献。结果 该患者有慢性肝炎的消耗性、免疫力低下病史,临床表现为头痛、发热和呕吐等,脑部影像学显示病变侵及脑膜和脑实质,一度发生脑疝,病情凶险。实验室检测血常规显示白细胞、中性粒细胞及CRP升高;脑脊液压力明显升高,脑脊液细胞总数、白细胞数、单核细胞及蛋白升高,葡萄糖和氯化物降低,墨汁染色阳性;脑脊液真菌培养在显色培养基上生长为白色菌落,在豆氨酸-甘氨酸-溴麝香草酚蓝(CGB)培养基生长使其变蓝色;分离菌经Vitek-2 Compact鉴定为新型隐球菌(99%),最终经18S rRNA测序和系统发育分析确定为格特隐球菌(相似度>99.0%)。药敏试验结果显示,该菌株对5-氟尿嘧啶、两性霉素B、氟康唑、伊曲康唑和伏立康唑均敏感。临床应用两性霉素B联合氟康唑和5-氟尿嘧啶治疗后患者症状及体征好转,回当地继续治疗。结论 CGB培养基可作为格特隐球菌的初筛培养基,分子学方法较自动化仪器鉴定格特隐球菌更准确可靠;治疗应以两性霉素B和5-氟尿嘧啶为主的联合治疗,早诊断、早治疗、足量和足疗程是治疗隐球菌病的关键。

【关键词】 格特隐球菌; 脑膜脑炎; 鉴定; 序列分析; 系统发育树

Clinical presentation and laboratory identification analysis for a case of cryptococcal meningoencephalitis caused by *Cryptococcus gattii* Cao Jingrong¹, Chen Jing^{1,2}, Gao Shichao¹, Min Rong¹, Wang Peichang¹.

¹Department of Laboratory, Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Beijing 100053, China; ²Jiangxi Health Occupation College, Nanchang 330201, China

Corresponding author: Wang Peichang, Email: pcw1905@126.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the characteristics of clinic and pathogen of cryptococcal meningoencephalitis caused by *Cryptococcus gattii* and to provide assistance for clinical diagnosis and therapy. **Methods** The clinical data, laboratory examination, diagnosis and treatment were analyzed, respectively, and the isolation and identification of pathogenic fungus, antimicrobial susceptibility testing and 18S rRNA sequence were determined to the isolate. **Results** The patient had a history of long-term chronic hepatitis and immunodeficiency. Clinical manifestations were strenuous headache, high fever and vomiting. Brain imaging showed that parenchymal was damaged. The detection results of cerebrospinal fluid showed that CSF pressure, the white blood cell count, and protein increased significantly, but the glucose and chloride reduced. The ink staining result of CSF was positive. The isolate of CSF in Chromogenic medium was white colonies and Canavanine-glycine-bromthymol blue (CGB) medium showed blue. The isolate was identified as cryptococcus neoformans by Vitek-2 Compact, which was identified as *Cryptococcus gattii* by 18S rRNA sequencing (similarity > 99%) and phylogenetic analysis. Drug susceptibility results showed that *Cryptococcus gattii* was sensitive to the 5-fluorouracil, amphotericin B, fluconazole, itraconazole and voriconazole. Patients symptoms and signs improved after combined application of fluconazole, amphotericin B and 5-fluorouracil. **Conclusions** Molecular method for identification of *Cryptococcus gattii* was rapid and accurate. Early pathogenic diagnosis, early combined treatment with amphotericin B and 5-fluorouracil,

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2017.02.020

基金项目: 首都临床特色重点专项课题 (No. Z141107002514012)

作者单位: 100053 北京, 首都医科大学宣武医院检验科¹; 330201 南昌市, 江西卫生职业学院²

通信作者: 王培昌, Email: pcw1905@126.com

sufficient and full course of treatment are the key for treatment of cryptococcal meningoencephalitis.

【Key words】 *Cryptococcus gattii*; Meningoencephalitis; Identification; Sequence analysis; Phylogenetic tree

隐球菌病是人类最常见的侵袭性真菌病之一, 发病率约为0.15%~6.5%^[1-3], 引起隐球菌病的最主要病原菌是新型隐球菌和格特隐球菌, 其诊断目前主要依靠脑脊液墨汁染色、隐球菌抗原检测和真菌培养与鉴定等。新型隐球菌有新生变种和格鲁比变种两种型别, 在全球各地均有大量分离和报道^[1-6], 该菌曾认为与鸽粪有关, 免疫功能缺陷患者易感染; 格特隐球菌于1999年在加拿大^[2]和美国引起暴发流行后逐渐引起临床注意和重视, 不断有该菌引起感染的报道^[7-12], 其亦可感染免疫功能正常者, 主要分布在热带和亚热带地区。我国虽有格特隐球菌引起感染的报道^[4, 10-12], 但有关其临床特征和实验室鉴定的数据相对较少, 本文报道一例由格特隐球菌引起脑膜脑炎病例的临床特点及其实验室鉴定, 为提高该病的诊治水平提供经验。

一、临床病历资料

患者, 男性, 21岁, 来自福建, 因无明显诱因出现头痛(以前额、后枕部胀痛为著)、不规则发热(最高体温39℃)16 d, 疼痛加重至全脑部伴恶心、非喷射性呕吐11 d, 发作性抽搐伴意识障碍1 d以“脑膜脑炎”收入院。当地医院曾以“病毒性感冒”和“病毒性脑膜脑炎”行抗病毒、抗感染、降颅压、补液、止痛等治疗, 疗效欠佳。腰椎穿刺脑脊液示压力为330 mmH₂O, 细胞总数为730 × 10⁶/L, 白细胞720 × 10⁶/L, 单核粒细胞94%, 多核粒细胞6%, 葡萄糖2.49 mmol/L, 氯化物117 mmol/L, 蛋白34.8 mg/dl, 脑脊液ADA(+); 脑脊液涂片未见异常; 头颅MRI强化示脑膜强化。1 d前突发烦躁、呼吸急促、双上肢强直、口吐白沫、呼之不应, 查体双侧瞳孔不等大(左右瞳孔比例为3:5), 右侧对光反射消失, 考虑脑疝, 给予甘露醇降颅压、地西洋和苯巴比妥肌注后意识恢复, 仍嗜睡, 可简单回答问题。脑脊液培养回报为新型隐球菌, 为求进一步诊治来本院。

既往有10年慢性乙型肝炎病史, 家中无饲养鸽子, 饲养狗、鸭子。入院后体温波动于36.4℃~39℃, 嗜睡, 颈项抵抗, 右侧腹壁反射减退, 右侧病理征阳性, 眼底视乳头水肿, 双眼外展受限。实验室检查HIV-P24、HIV-Ab、

HCV-Ab均阴性, HBsAg(+). 头颅CT及MRI检查均提示脑膜及脑实质受损。入院后行两次腰椎穿刺, 测颅压均> 330 mmH₂O, 脑脊液细胞总数、白细胞数、单核细胞及脑脊液蛋白水平均升高, 葡萄糖和氯化物均降低; 脑脊液墨汁染色阳性, 未找到细菌及抗酸杆菌; 脑脊液病毒抗体10项均为阴性; 脑脊液培养为新型隐球菌, 诊断为“隐球菌性脑膜脑炎”。药敏试验结果显示, 该菌株对5-氟尿嘧啶、两性霉素B、氟康唑、伊曲康唑和伏立康唑均敏感, 给予两性霉素B联合氟康唑和5-氟尿嘧啶治疗, 患者头痛明显减轻。患者共住院42 d, 出院时神清语利, 双眼各向运动正常。出院后建议继续给予两性霉素B 30 mg/d和5-氟尿嘧啶1.0 g/6 h治疗。患者治疗用药详见表1。

二、病原菌实验室鉴定与药敏试验

1. 实验室常规鉴定: 脑脊液接种沙宝弱培养基25℃培养48 h后, 菌落接种Chromagar显色培养基(郑州博赛公司)和豆氨酸-甘氨酸-溴麝香草酚蓝(Canavanine-glycine-bromthymol blue, CGB)培养基(由解放军总医院参考相关文献^[7]配制), 35℃培养后根据颜色进行初步鉴定; 使用全自动微生物鉴定仪Vitek-2 Compact鉴定仪(生物梅里埃公司)及配套的YST酵母菌鉴定卡上机鉴定。质控菌株为白假丝酵母菌ATCC10231和新型隐球菌ATCC32069(解放军总医院微生物科惠赠)。

2. 分子生物学检测和鉴定: DNA提取使用天根真菌DNA提取试剂盒。真菌通用引物ITS1、ITS4和IGS(P1、P2)进行PCR扩增, 反应条件参考文献^[4, 13]进行。引物序列为ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3', ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'和P1: 5'-ATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3', P2: 5'-CTCTGGCTTC ACCCTATTC-3'。引物合成和PCR产物序列测定委托上海英潍捷基(Invitrogen)公司, 所测序列提交至GenBank进行BLAST比对和同源分析, 并用MEGA 5.0软件构建系统发育树。

3. 真菌药敏试验: 参照ATB FUNGUS 3(生物梅里埃公司)操作说明对研究菌株进行药敏试验, 测定该菌对5-

表1 患者住院期间抗真菌治疗情况

抗真菌药物	治疗天数(d)								
	1	1	1	1	3	12	5	7	11
两性霉素B用量(mg)	2	5	7	10	12	15	20	25	30
两性霉素B累积量(mg)	2	7	14	24	60	240	340	515	845
氟康唑(mg)	400	200	200	200	200	0	0	0	0
5-氟尿嘧啶(g)	1.5 Tid	1.5 Tid	1.5 Tid	1.5 Tid	1.5 Tid	1.0 Q6h	1.0 Q6h	1.0 Q6h	1.0 Q6h

注: Tid: 3次/d, Q6h: 1次/6h

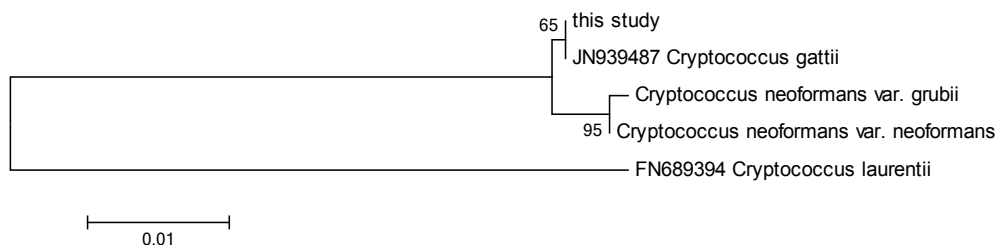


图1 MEGA分析不同种隐球菌的系统发育树分析

氟尿嘧啶、两性霉素B、氟康唑、伊曲康唑和伏立康唑的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。

三、实验室常规鉴定

白假丝酵母菌接种Chromagar显色培养基35℃培养48 h后为绿色菌落,研究菌株和新型隐球菌质控菌为白色菌落;白假丝酵母菌和新型隐球菌接种CGB培养基35℃培养5 d后培养基为黄色,而接种研究菌株者为蓝色;研究菌株用Vitek-2 Compact鉴定为新型隐球菌(99%)。

四、分子鉴定与序列分析

以真菌通用引物经PCR扩增均获得目的片段(ITS 750 bp, 18S 800 bp),序列分析比对后发现该菌与格特隐球菌序列相似度99.0%以上,用MEGA 5.0软件中Neighbor Joining方法构建系统发育树,最后鉴定为格特隐球菌。系统发育树见图1。

五、药敏试验

研究菌株对5种抗真菌药物的MIC为5-氟尿嘧啶 $\leq 4 \mu\text{g/ml}$;两性霉素B $\leq 0.5 \mu\text{g/ml}$,氟康唑 $\leq 1 \mu\text{g/ml}$,伊曲康唑 $\leq 0.125 \mu\text{g/ml}$ 和伏立康唑 $\leq 0.06 \mu\text{g/ml}$ 。

讨论 隐球菌30多个种属中以新型隐球菌和格特隐球菌引起人类颅内感染和肺部感染的报道最多^[1-12],目前实验室诊断主要依赖CSF墨汁染色、隐球菌抗原检测及真菌培养鉴定等传统方法。Chromagar显色培养基、Vitek-2 Compact全自动微生物鉴定仪和API 20C是微生物实验室用于鉴定酵母菌的常用手段,但本文和文献研究^[1-2, 7, 11]均发现新型隐球菌和格特隐球菌的生化表型相似,常规检测方法不能准确加以区分。而研究^[7, 11]发现CGB培养基鉴定格特隐球菌的特异性和敏感性均较高(93%~100%),因此,本研究将分离菌接种CGB后,CGB培养基变为蓝色,经测序分析鉴定为格特隐球菌,与研究^[7, 11]结果一致。可见CGB培养基可作为分离、鉴定格特隐球菌的初筛培养基。另外,有研究^[14]报道基质飞行质谱仪(MALDI-TOF MS)可准确区分隐球菌类型,可作为分子鉴定方法之一。

格特隐球菌和新型隐球菌因感染人群不同,临床表现上亦有差异,脑膜脑炎是隐球菌引起的最严重临床表现。有研究^[9]报道格特隐球菌感染的危险因素包括HIV/AIDS、慢性肺疾病、糖尿病或免疫抑制相关疾病和慢性肾脏病

等,其所致感染会产生比新型隐球菌更严重的中枢神经系统表现。本例患者急性起病、进展加重,既往有慢性肝炎消耗性、免疫力低下病史,病变侵及脑膜和脑实质,一度发生脑疝,病情凶险,为格特隐球菌引起的严重脑膜脑炎病例。但由于实验室检测条件的限制,格特隐球菌感染的临床特征及流行病学资料相对缺乏或低估。鸽粪是新型隐球菌的常见栖息地,但格特隐球菌则具有植物定植特性和动物毒性特点^[1]。因此,全面评估格特隐球菌感染有赖于微生物实验室精确的诊断,需要从试剂(培养基)及诊断流程等多方面改进。

虽然隐球菌不同种、基因型间的体外药敏差异不大^[1, 4, 6],但因不同种的毒力或致病性与临床预后密切相关,如治疗不当会造成不良后果,导致高病死率,尤其近有报道^[4]发现对5-氟尿嘧啶耐药的格特隐球菌,应引起临床重视。因此,抗真菌治疗应结合体外药敏给予足剂量、足疗程,不能因患者免疫功能正常放松警惕。本例患者联合使用两性霉素B+5-氟尿嘧啶和(或)氟康唑治疗42 d后患者症状体征明显转好。但目前对格特隐球菌感染研究多为小样本回顾性调查或病例报道,缺乏大样本前瞻性研究和针对格特隐球菌病明确的用药指南^[6],对于重症患者行脑室穿刺引流置管及鞘内给药并延长给药周期、早期使用类固醇等有利于改善症状。

隐球菌病的菌种鉴定和分型研究常采用分子生物学方法^[1-2, 4, 10],可在2~3 d内得出准确的序列,特异性高且测序成本逐渐减低,不失为很好的鉴定方法,而早期准确的诊断和及时正确的抗真菌治疗对提高患者生存率至关重要。综上,对于格特隐球菌的鉴定,应结合多种方法综合判断,以获得科学、准确和可靠的鉴定结果^[15]。

致谢:感谢解放军总医院微生物科沈定霞教授在CGB显色培养基鉴定格特隐球菌研究方面的帮助。

参 考 文 献

- [1] Kwon-Chung KJ, Fraser JA, Doering TL, et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of Cryptococcosis[J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2014, 4(7):a019760.
- [2] 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.
- [3] Jarris JN, Bicanic T, Loyse A, et al. Determination of mortality in a combined cohort of 501 patients with HIV-associated *Cryptococcal meningitis* implications for improving outcomes[J]. Clin Infect Dis,2014,58(5):736-745.
- [4] 雷瑶, 肖玉玲, 何超, 等. 四川地区隐球菌临床分离株基因型和耐药性分析[J]. 四川大学学报(医学版),2015,46(1):82-86.
- [5] 关家龙, 李粤平, 蔡卫平. HIV感染与非HIV感染患者新型隐球菌脑膜炎临床特点比较[J]. 中华临床感染病杂志,2013,6(5):301-303.
- [6] 聂舒, 朱红梅, 温海. 隐球菌性脑膜炎诊治进展[J]. 中国真菌学杂志,2015,10(1):44-48.
- [7] Klech KR, Hall L, Drml SM, et al. Identification of *Cryptococcus gattii* by use of L-canavacine glycine bromothymol blue medium and DNA sequencing[J]. J Clin Microbiol,2009,47(11):3669-3672.
- [8] Linda MN, Philips P, Galanis E, et al. *Cryptococcus gattii*: a review of the epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and management of this endemic yeast in the Pacific Northwest[J]. Clinical Microbio Newsletter,2011,33(24):187-195.
- [9] Franco-Paredes C, Womack T, Bohlmeier T, et al. Management of *Cryptococcus gattii* meningoencephalitis[J]. Lancet Infect Dis,2015,15(3):348-355.
- [10] 冯晓博, 凌波, 付小花, 等. 格特隐球菌VGII基因型的快速鉴定和序列分型研究[J]. 中华临床感染病杂志,2012,5(1):1-4.
- [11] 窦红涛, 万喆, 杨启文, 等. 格特隐球菌在河北地区引起1例脑膜炎的临床与实验研究[J]. 中国真菌学杂志,2015,10(1):11-14.
- [12] 陈敏, 潘炜华, 邓淑文, 等. 格特隐球菌感染病例临床特征分析[C]. 2012年中国真菌学会学术年会会议摘要,2012:88.
- [13] Sandhu GS, Kline BC, Stockman L, et al. Molecular probes for diagnosis of fungal infections[J]. J Clin Microbiol,1995,33(11):2913-2919.
- [14] Firacative C, Trilles L, Meyer W. MALDI-TOF MS enables the rapid identification of the major molecular types within the *Cryptococcus neoformans/C. Gattii* species complex[J]. PLoS One,2012,7(5):e37506.
- [15] Chen M, Pan WH, Boekhout T. *Cryptococcus gattii* infections in China: extent of the problem?[J]. Chin Med J (Engl),2013,126(2):203-205.

(收稿日期: 2015-10-27)

(本文编辑: 孙荣华)

曹敬荣, 陈静, 高世超, 等. 一例格特隐球菌感染引起脑膜脑炎患者的临床与实验室鉴定分析[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版),2017,11(2):194-197.