

复发性外阴阴道假丝酵母菌病的菌种及药物敏感度研究

胡红珍 王丽娟 李丽萍 罗丽娅

【摘要】 目的 分析复发性外阴阴道假丝酵母菌病(RVVC)患者阴道分泌物假丝酵母菌菌种和菌株基因型以及其对临床抗真菌药物的敏感度,为临床诊治提供依据。**方法** 选择 50 例 RVVC 患者(RVVC 组)及 50 例外阴阴道假丝酵母菌病(VVC)患者(VVC 组),采集患者的阴道分泌物标本进行菌种鉴定,使用微卫星 CAI 位点单链构象多态性(CAI-SSCP)及基因扫描相结合的方法对菌种进行基因型鉴定,用纸片法对菌种进行药物敏感度试验。**结果** 2 组患者阴道分泌物共培养出 155 株假丝酵母菌,其中白假丝酵母菌占 83.2%,非白假丝酵母菌占 16.8%;RVVC 组中白假丝酵母菌占 78.4%;VVC 组中白假丝酵母菌占 92.5%,RVVC 组白假丝酵母菌比例低于 VVC 组($P < 0.05$)。2 组患者阴道分泌物培养的白假丝酵母菌 CAI 区序列分析中共获得 32 种 CAI 基因型,其中 CAI 30-45 和 CAI 32-46 为最常见的基因型,2 组患者白假丝酵母菌优势基因型菌株比例差异无统计学意义($P > 0.05$)。RVVC 对抗真菌药物的敏感度依次为伊曲康唑(96.2%)、制霉菌素(91.2%)、酮康唑(82.5%)、氟康唑(76.5%)、克霉唑(59.8%)、咪康唑(53.9%)。**结论** RVVC 患者阴道分泌物中假丝酵母菌的菌种分布与 VVC 患者不一致。RVVC 患者阴道来源的白假丝酵母菌基因型呈现优势基因型分布。假丝酵母菌对临床常用抗真菌药物存在一定的耐药性,治疗 RVVC 应该根据药物敏感度试验结果实施个体化治疗方案。

【关键词】 假丝酵母菌;菌种鉴定;基因型;单链构型多态性;耐药性

Strain identification and drug susceptibility of vaginal isolates from patients with recurrent vulvovaginal candidiasis Hu Hongzhen, Wang Lijuan, Li Liping, Luo Liya. Department of Obstetrics and Gynecology, Maternal and Children Care Hospital of Futian District, Shenzhen 518019, China

Corresponding author, Hu Hongzhen, E-mail: huhongzhen929@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the strain identification, genotyping and drug susceptibility of *Candida* from the vaginal isolates from patients with recurrent vulvovaginal candidiasis(RVVC), aiming to provide evidence for diagnosis and treatment of RVVC. **Methods** Vaginal isolates were obtained from 50 RVVC patients and 50 with vulva vagina candidiasis(VVC) for strain identification. Strain genotyping was carried out using combined methods of CAI-single strand conformation polymorphism(CAI-SSCP) and Genescan analysis. Drug susceptibility test was performed by disk diffusion method. **Results** In total, 155 *Candida* strains were obtained from the vaginal isolates in two groups, consisting of *Candida albicans*(83.2%) and non-*Candida albicans*(16.8%). In the RVVC group, the proportion of *Candida albicans* was 78.4%, significantly lower compared with 92.5% in the VVC group ($P < 0.05$). Thirty two CAI genotypes of the *Candida albicans* were identified from the vaginal isolated between two groups, CAI 30-45 and CAI 32-46 as the dominant genotypes. The proportion of *Candida albicans* strains with dominant genotypes did not significantly differ between two groups ($P > 0.05$). The antifungal drug susceptibility of RVVA for Itraconazole was 96.2%, 91.2% for Nystatin, 82.5% for Ketoconazole, 76.5% for Fluconazol, 59.8% for Clotrimazole and 53.9% for Miconazol, respectively. **Conclusions** The distribution of vaginal *Candida* species in RVVC patients is differed from VVC patients. In the vaginal isolates from RVVC patients, dominant genotype is distributed in the *Candida albicans*

DOI: 10.3969/j.issn.0253-9802.2016.09.007

基金项目:深圳市福田区卫生公益性科研项目(FTWS201340)

作者单位:518019 深圳,深圳福田区妇幼保健院妇产科(胡红珍,李丽萍,罗丽娅);510120 广州,中山大学孙逸仙纪念医院妇科(王丽娟)

通讯作者,胡红珍, E-mail: huhongzhen929@163.com

strain. *Candida albicans* yields certain drug resistance to antifungal agents commonly used in clinical practice.

Individualized therapy should be implemented based upon the outcomes of drug susceptibility testing.

【Key words】 *Candida*; Strain identification; Genotype; Single strand conformation polymorphism; Drug resistance

根据流行病学研究数据, 全球约 75% 的已婚妇女一生中至少患有 1 次外阴阴道假丝酵母菌病 (VVC), 其中约半数患者发作 2 次或以上, 而这些患者中约 5% 发展成复发性外阴阴道假丝酵母菌病 (RVVC)^[1]。RVVC 指 VVC 经过治疗后虽然临床症状和体征消失, 且真菌学检查为阴性, 但随后症状复发及真菌学检查又呈阳性, 1 年中反复 4 次或以上者, 该病由于具有反复发作又顽固不愈的特点, 成为临床治疗的障碍, 是一种严重干扰女性身心健康的常见妇科病^[2]。本研究采用微卫星 CAI 位点单链构象多态性 (CAI-SSCP) 与基因扫描相结合分别对 RVVC 和 VVC 患者阴道来源的酵母菌株进行基因型鉴定, 研究菌株基因型和 RVVC 发病之间的相互关系, 并且分析 RVVC 患者菌株的药敏特点, 旨在为临床诊治和合理用药提供直接依据。

对象与方法

一、研究对象

连续纳入 2013 年 6 月至 2014 年 12 月在深圳福田区妇幼保健院门诊就诊的 50 例 RVVC 患者 (RVVC 组) 以及 50 例 VVC 患者, 患者年龄 (32.5 ± 6.5) 岁。RVVC 指 1 年中症状发作次数超过 4 次, 就诊时阴道分泌物涂片假丝酵母菌阳性; VVC 组为具有典型的临床症状, 且为初发者, 近期内未进行任何药物治疗, 直接镜检见假菌丝和芽生孢子, 培养分离出假丝酵母菌^[3]。所有纳入研究的患者在就诊前 1 个月内均未使用过激素、免疫抑制剂、抗生素, 排除伴有导致自身免疫力下降的疾病及糖尿病患者、孕妇、性工作者、吸毒者。本研究经医院伦理委员会批准, 所有患者均对研究知情, 并同意留取标本。

二、主要试剂及仪器

主要试剂: ROSCO Neo-Sensitab 抗真菌药敏纸片 (深圳优康生物技术有限公司), 蛋白胨、葡萄糖、丙稀酯胺和巯基乙醇 (北京鼎国生物技术有限公司), 甘油、过硫酸铵、乙醇、冰醋酸、甲醛、醋酸钾、氯仿、醋酸钠、异戊醇和异丙醇 (北京现代东方精细化学品有限公司), DNA 聚合酶 $MgCl_2$ 缓冲液 (上海申能博彩生物技术有限公司)。

主要仪器: 电子天平 (浙江温州医疗器械三厂), 生物安全柜 (ESCO 公司, 美国), 智能生化培养箱 (浙江宁波海曙赛福实验仪器厂), 振荡培养箱 (SHAKER 公司, 德国), 离心机 (TIACHI 公司, 日本), 水浴锅 (上海森信实验仪器有限公司), 酸碱度调节仪 (HANNA 公司, 意大利), PCR 仪 (Eppendorf 公司, 德国), DCode™ 突变检测电泳仪、琼脂糖凝胶成像系统 (Bio-Rad 公司, 美国), 培养皿、试管 (北京中创先锋科技有限公司)。

三、研究方法

1. 菌落培养

采集并分离上述 2 组患者在患病急性期阴道分泌物中的假丝酵母菌。采集方法见文献 [2]: 用消毒棉签取患者的阴道侧壁分泌物, 将分泌物涂片, 置于高倍镜下镜检, 可观察到菌丝或孢子。将新鲜标本直接接种于添加了氯霉素的酵母浸出粉胨葡萄糖琼脂 (YPD) 富集液体培养基, 培养至液体培养基呈浑浊状态, 后将浑浊的菌液均匀涂布于平板培养基, 置于 37℃、5% CO_2 培养 48 h 后取出观察, 肉眼可见乳酪样菌落生长, 挑取单菌落划线接种于平板培养基, 经过 3 次反复分离和纯化后, 最终挑选单个菌落接种于液体培养基进行活化后备用。

2. 菌种鉴定

根据文献 [4] 报告的方法提取假丝酵母菌的总 DNA, PCR 扩增内转录间隔 1 (ITS 1) 区。根据 ITS1 区 SSCP 电泳图谱, 将具有代表性的假丝酵母菌株进行 D1/D2 序列分析, PCR 产物由深圳华大基因技术有限公司完成测序, 根据 Blast 对比测序的序列并与 EMBL/DBJ/GenBank 基因数据库中已有的各假丝酵母菌原始序列之间的差异, 确定菌株种属。

3. 白假丝酵母菌基因型分析

先用 DCode™ 突变检测电泳仪进行 SSCP 电泳检测, 然后根据电泳图的结果进行归类, 并选出具有代表性泳道所对应的菌株, 用 6-梭基荧光素标记上游引物 C1, 并加入下游引物 C2, 以菌株的 DNA 为扩增模板, PCR 法扩增得到相应的序列, 行琼脂糖凝胶电泳检测, 可见到明亮条带。扩增产

物于 ABI370DNA 测序仪上样电泳, 用 Genescan3.7 软件自动分析扩增片段的大小以及其中重复片段的数目。以标准菌株 CC90028 的 CAI 中 2 个等位基因位点重复片段数 (27-38) 为标准, 确定待测菌株的 CAI 基因型 (具体操作由深圳华大基因技术有限公司完成)^[5]。

4. 药物敏感度试验

应用 ROSCO Neo-Sensitab 抗真菌药敏纸片, 对酮康唑、制霉菌素、氟康唑、伊曲康唑、咪康唑和克霉唑等 6 种药物进行抑菌试验, 按厂家说明书步骤操作, 根据抑菌圈直径判为敏感、中度敏感和耐药^[6]。以 ATCC90028 白假丝酵母菌为质控菌株。

四、统计学处理

使用 SPSS 16.0 软件处理和分析数据。计数资料采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、菌种的分类鉴定

RVVC 组和 VVC 组患者的阴道分泌物均养出假丝酵母菌。标本经过分离、纯化、培养后, 共获得 155 株较固定的单一菌落。对从样本中获得的菌株进行 ITS 1 区 PCR 扩增, 并对扩增的 ITS1 区序列进行 SSCP 电泳图分析后, 基本确定的菌株种类可分为 5 种类型, 从各类型菌株中再选取 2~4 株代表菌株进行 ITS 全段序列的 PCR 扩增, 扩增产物经测序分析, 结果共获得 5 种菌株, 包括白假丝酵母菌、光滑假丝酵母菌、近平滑假丝酵母菌、热带假丝酵母菌和季也蒙毕赤假丝酵母菌。155 株假丝酵母菌中, 白假丝酵母菌 129 株 (83.2%), 非白假丝酵母菌 26 株 (16.8%)。RVVC 组 102 株中, 白假丝酵母菌 80 株 (78.4%), 光滑假丝酵母菌 20

株 (19.6%), 近平滑假丝酵母菌 1 株 (1.0%) 和季也蒙毕赤假丝酵母菌 1 株 (1.0%), 见图 1。VVC 组 53 株中, 白假丝酵母菌 49 株 (92.5%), 光滑假丝酵母菌 3 株 (5.7%), 热带假丝酵母菌 1 株 (1.9%)。RVVC 组和患者阴道分泌物中白假丝酵母菌比例差异有统计学意义 ($\chi^2 = 4.912, P = 0.027$)。

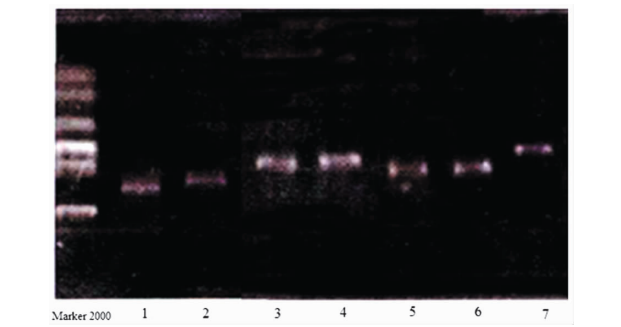


图 1 RVVC 及 VVC 患者阴道分泌物培养菌株的 ITS1 区 PCR 产物电泳图谱

泳道 1: 热带假丝酵母菌; 泳道 2: 近平滑假丝酵母菌; 泳道 3、4: 白假丝酵母菌; 泳道 5、6: 光滑假丝酵母菌; 泳道 7: 季也蒙毕赤假丝酵母菌

二、白假丝酵母菌的基因型鉴定

白假丝酵母菌 CAI 区 SSCP 结果见图 2A, CAI 区基因扫描结果见图 2B。147 株白假丝酵母菌 CAI 区分析共获得 32 种基因型, 最常见 2 种基因型分别为 CAI 30-45 (50 株, 占 34.0%) 和 CAI 32-46 (30 株, 占 20.4%), 这 2 种基因型在 CAI 片段上仅相差 2 个三碱基的重复片段, 即基因型为 30~32 和 43~47, 为优势基因型。VVC 组优势基因型所占比例为 71.7% (38/53 株), 而 RVVC 组优势基因型菌株所占比例为 73.5% (75/102), 2 组患者中白假丝酵母菌优势基因型菌株比例差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.059, P = 0.808$)。

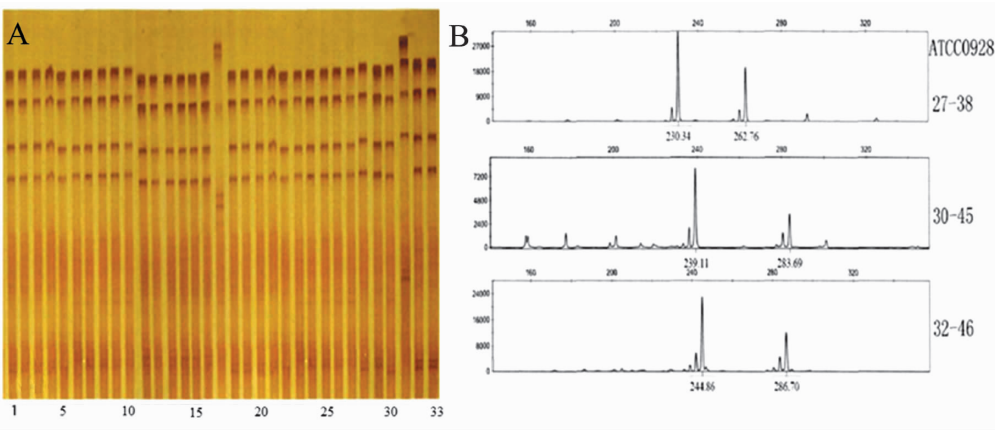


图 2 RVVC 患者白假丝酵母菌的基因型鉴定结果

A: 随机选取的 33 株 RVVC 白假丝酵母菌 CAI 区 SSCP 结果; B: RVVC 白假丝酵母菌 CAI 区基因扫描结果 (右边的序号 27-38、30-45、32-46 代表基因型)

三、RVVC 的抗真菌药物药敏试验结果

RVVC 组 102 株假丝酵母菌对 6 种抗真菌药物的敏感度试验中, 敏感度由高至低依次为伊曲康唑 (96.2%)、制霉菌素 (91.2%)、酮康唑 (82.5%)、氟康唑 (76.5%)、克霉唑 (59.8%)、咪康唑 (53.9%), 见图 3。

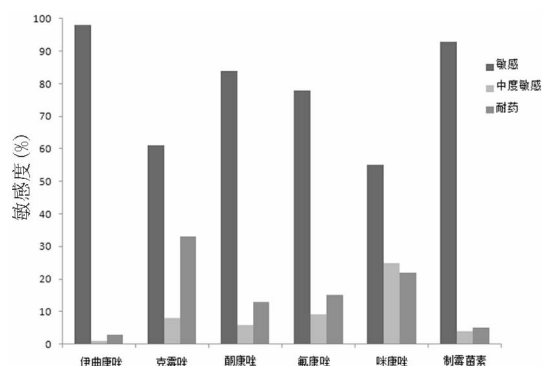


图 3 RVVC 患者白假丝酵母菌的抗真菌药物敏感度试验结果

讨 论

RVVC 的发病机制与多种因素有关, 但其病因可归因于两方面因素, 即宿主和致病菌。对于引起 RVVC 反复发作的致病菌源尚有争议, 主要是假丝酵母菌不仅在生殖系统, 而且在人体其他多器官广泛分布, 故造成其感染源的复杂性^[7]。因此, 致病假丝酵母菌菌株的基因鉴定对明确传染源、协助诊治具有非常现实的临床意义。国外研究显示, 阴道假丝酵母菌病主要由白假丝酵母菌引起 (占 70%~90%), 光滑假丝酵母菌和热带假丝酵母菌只占较少比例, 国内报道白假丝酵母菌比例约为 60%~80%。本研究显示, 白假丝酵母菌是 RVVC 及 VVC 的主要致病菌, RVVC 中白假丝酵母菌所占比例低于 VVC, 所分离的非白假丝酵母菌以光滑假丝酵母菌居多, 这也与既往报道一致^[8]。国外学者报道, 复发感染的假丝酵母菌菌株的基因型基本保持稳定, 仅不到 60% 菌株发生少量遗传变异, 且已建立克隆的菌株亚种在反复感染中发生的重组并非呈渐进式变化^[2]。

近年来, 分子生物学技术的突飞猛进, 白假丝酵母菌基因的鉴定分型方法不断取得质的进展^[9]。白假丝酵母菌 4 号染色体的非编码区的微卫星序列 CAI 有高度多态性, 进行基因扫描后可以获得单位点分析所能达到的最大分辨率, 且 CAI 区有很高的特异性和重复性。文献报道, SSCP 为基因突变分析中灵敏度较高的方法。本研究对 VVC 及 RV-

VC 患者阴道分泌物培养的白假丝酵母菌采用 CAI-SSCP 和基因扫描相结合进行基因型鉴定, 结果显示白假丝酵母菌基因型中存在优势基因, 分别为基因型 CAI 30-45 (32.3%) 和 CAI 32-46 (19.4%), 这与国外近期研究结果大致相同^[10]。本研究 RVVC 组 102 株白假丝酵母菌中, 优势基因型占 73.5%, 由此推测优势基因型菌株在 RVVC 中具有更强的致病力。

目前临床对 RVVC 的治疗主要依靠经验给药, 造成不同菌源感染均使用同样的药量和疗程, 既影响治疗效果也易诱导致病菌基因突变, 增加其对常用抗真菌药物的耐药性。近年有报道 RVVC 发病率持续上升, 其病原学表现为致病菌谱发生变化并出现了对常用抗真菌药物的耐药现象, 从而导致临床治疗的困难和复杂。本研究显示, RVVC 组 102 株假丝酵母菌对伊曲康唑和制霉菌素的敏感度最高, 其次为酮康唑和氟康唑, 而克霉唑和咪康唑敏感度较低, 但在 6 种抗真菌药物的敏感度试验中均出现耐药株。因此, 在 RVVC 临床诊治中应强调真菌培养和药物敏感度试验的重要性, 建议临床治疗 RVVC 必须规范化使用抗真菌药物, 根据药物敏感度试验结果选用敏感的抗真菌药物进行强化治疗, 并且要求治疗须足量、足疗程, 必要时采用联合用药。

综上所述, 本研究从基因水平研究 RVVC 的致病菌类型和鉴定其基因型, 了解引起 RVVC 反复发作的病源学原因; 临床诊治 RVVC 时应首先进行真菌培养, 根据药物敏感度试验进行个体化规范治疗, 避免耐药菌的产生, 以提高 RVVC 的治愈率。

参 考 文 献

- [1] Rathod SD, Klausner JD, Krupp K, Reingold AL, Madhivanan P. Epidemiologic features of Vulvovaginal Candidiasis among reproductive-age women in India. *Infect Dis Obstet Gynecol*, 2012, 2012: 859071.
- [2] Svobodová L, Lysková P, Hamal P. Vulvovaginal candidiasis. *Klin Mikrobiol Infekc Lek*, 2015, 21 (3): 74-81.
- [3] Nagashima M, Yamagishi Y, Mikamo H. Antifungal susceptibilities of *Candida* species isolated from the patients with vaginal candidiasis. *J Infect Chemother*, 2016, 22 (2): 124-126.
- [4] Xu J, Boyd CM, Livingston E, Meyer W, Madden JF, Mitchell TG. Species and genotypic diversities and similarities of pathogenic yeasts colonizing women. *J Clin Microbiol*, 1999, 37 (12): 3835-3843.
- [5] Gonczewicz A, Misiewicz A. The sequence diversity and expres-

sion among genes of the folic acid biosynthesis pathway in industrial *Saccharomyces* strains. *Acta Biochim Pol*, 2015, 62 (4): 841-850.

[6] 蒋仲霞, 黄钰华. 中西医结合治疗复发性外阴阴道假丝酵母病的疗效观察. *新医学*, 2011, 42 (5): 324-326.

[7] Rathod SD, Buffler PA. Highly-cited estimates of the cumulative incidence and recurrence of vulvovaginal candidiasis are inadequately documented. *BMC Womens Health*, 2014, 14 (1): 43.

[8] 刘朝阵, 王晓莉, 廖秦平. 复发性外阴阴道假丝酵母菌病的菌群分析与治疗. *实用妇产科杂志*, 2009, 25 (4): 730-732.

[9] Wu Y, Zhou HJ, Che J, Li WG, Bian FN, Yu SB, Zhang LJ, Lu J. Multilocus microsatellite markers for molecular typing of *Candida tropicalis* isolates. *BMC Microbiol*, 2014, 14: 245.

[10] Amouri I, Sellami H, Abbes S, Hadrich I, Mahfoudh N, Makni H, Ayadi A. Microsatellite analysis of *Candida* isolates from recurrent vulvovaginal candidiasis. *J Med Microbiol*, 2012, 61 (Pt 8): 1091-1096.

(收稿日期: 2016-07-06)
(本文编辑: 林燕薇)

