

DOI: 10.13602/j.cnki.jcls.2021.04.16

· 临床研究 ·

外阴阴道念珠菌病患者白念珠菌分离情况及 *ERG5* 基因位点突变分析

金蕾¹, 史伟峰² (1. 无锡市妇幼保健院检验科, 江苏无锡 214000; 2. 苏州大学附属第三医院检验科, 江苏常州 213000)

摘要: **目的** 了解外阴阴道念珠菌病(VVC)患者白念珠菌分离及 *ERG5* 基因突变情况。**方法** 收集无锡市妇幼保健院 2018 年 6—12 月妇产科门诊 VVC 患者阴道分泌物 500 例, 通过镜下观察菌丝及孢子选取可疑标本, 经沙保弱琼脂平板增菌后接种科玛嘉显色平板, 进行基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)鉴定; 用真菌快速培养鉴定药敏试剂盒对白念珠菌进行药敏试验; PCR 扩增部分白念珠菌 *ERG5* 基因并进行测序分析。**结果** 显色平板鉴定结果显示, VVC 病原以白念珠菌最多(54.7%), 其次为光滑念珠菌(22.5%)、热带念珠菌(16.5%)、克柔念珠菌(4.2%)和其他真菌(2.1%); 156 株显色平板鉴定结果为白念珠菌的菌株中, 经 MALDI-TOF MS 鉴定为白念珠菌共 155 株。155 株白念珠菌对 5-氟尿嘧啶均敏感, 对各类唑类药物呈现不同水平耐药性; 对 7 株(3 株唑类药物耐药菌株, 3 株唑类药物敏感菌株和 1 株质控菌株)进行 *ERG5* 扩增测序, 检出 2 个突变位点(1 个同义突变位点 G528A, 1 个错义突变位点 G528C)。**结论** 外阴阴道念珠菌以白念珠菌为主, 并对各类唑类药物表现出不同的耐药率, 耐药菌株中 *ERG5* 基因在 G528C 位点突变可能与耐药有关。

关键词: 外阴阴道念珠菌病; 白念珠菌; *ERG5* 基因; 基因突变; 耐药

中图分类号: R446.5

文献标志码: A

外阴阴道念珠菌病(vulvovaginal candidiasis, VVC)是一种临床常见妇科疾病, 感染率仅次于细菌性阴道炎, 极大地影响妇女生殖健康^[1]。白念珠菌是该病常见的致病菌, 感染率约为 80%^[2]。唑类药物是目前临床治疗 VVC 的首选药^[3], 但随着唑类药物的广泛使用, 耐药菌株日益增多。减少以及预防耐药株的出现, 已经成为医学领域的研究热点。唑类药物通过抑制 14- α 去甲基酶, 从而抑制麦角甾醇合成, 破坏真菌细胞膜, 从而发挥抗真菌作用^[4]。目前, 麦角甾醇合成通路中活性药物靶酶基因 *Ergosterol* (简称 *ERG*) 的突变或者高表达, 被认为是白念珠菌耐唑类药物的主要机制之一^[5]。本研究旨在了解 VVC 患者白念珠菌的检出情况, 并探究唑类药物耐药率及 *ERG5* 基因突变情况, 为临床抗真菌药物的选择提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象及菌株 收集无锡市妇幼保健院 2018 年 6—12 月妇产科门诊 VVC 患者阴道分泌物共 500 例, 患者年龄 25~49 岁。患者临床症状为外阴红肿瘙痒, 分泌物增多, 并且呈白色豆腐渣样。

白念珠菌 ATCC 10231 购自于郑州安图生物公司。

1.2 主要仪器与试剂 PCR 仪(美国 ABI 公司); 凝胶成像仪(上海复日科技公司); 电泳仪、电泳槽(北京六一仪器厂); 质谱仪(德国布鲁克公司); 真菌快速培养鉴定药敏试剂盒(郑州安图生物公司); dNTP、10×PCR Buffer(含 Mg^{2+})、Taq Plus DNA 聚合酶、Ezup 柱式基因组 DNA 抽取试剂盒、B600090 PCR 扩增试剂盒(上海生工生物工程公司)。

1.3 真菌镜检及培养 将采集的阴道分泌物标本均匀涂抹于载玻片上, 滴加 50 μ L 10% KOH 溶液, 盖上盖玻片, 加热固定, 冷却后在显微镜下观察标本有无菌丝或者孢子。将镜下见菌丝或孢子的样本接种沙保弱琼脂平板, 35 $^{\circ}$ C 培养 24~48 h, 若平板上呈现乳白色或者淡黄色、表面光滑湿润呈奶油状菌落, 可以初步判断为念珠菌属。

1.4 真菌鉴定及药敏试验 挑取念珠菌属单个菌落, 转种于科玛嘉显色培养基, 35 $^{\circ}$ C 培养 24~48 h, 进行初步鉴定。对于翠绿色菌落采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)鉴定: 滴加 70% 甲酸溶液 1 μ L 至

作者简介: 金蕾, 1987 年生, 女, 主管技师, 硕士, 主要从事临床检验诊断工作。

通信作者: 史伟峰, 主任技师, E-mail: swf67113@163.com。

靶板,取少量待测菌均匀涂抹,干燥后滴加 1 μL 基质溶液,采用 Microflex 质谱仪进行鉴定。依据仪器说明书进行结果判读。采用真菌快速培养鉴定药敏试剂盒进行药敏试验,依据说明书进行操作及药敏结果判读。

1.5 基因扩增及测序 采用 Ezup 柱式基因组 DNA 抽取试剂盒从目的菌株中提取 DNA,经 PCR 扩增试剂盒对 *ERG5* 基因进行扩增。用 Primer Premier 5 软件设计引物,引物序列 F:5'-ATGAATTCAACAGAGGTCGATAA-3';R:5'-CTATAAACTCTTTAATGGGTCTCT-3',由上海生工生物公司合成。PCR 扩增反应总体积 50 μL ,包括模板 DNA 2 μL ,上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 2 μL ,dNTP 2 μL ,Taq 酶 1 μL ,10 $\times$ PCR Buffer 5 μL ,ddH₂O 36 μL 。扩增反应参数:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 50 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。取 PCR 产物 5 μL 经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳观察,目的条带切胶回收后送至上海生工生物工程公司进行双向测序。PCR 测序反应总体积 20 μL :纯化的 PCR 产物(10 ng/ μL)1 μL ,2.5 $\times$ BigDye 4 μL ,5 $\times$ BigDye Seq Buffer 2 μL ,3.2 pmol/ μL 测序引物 1 μL ,灭菌去离子水 12 μL 。在美国 ABI 公司 3730XL 测序仪上按以下条件反应:96 $^{\circ}\text{C}$ 1 min;96 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,50 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 4 min,25 个循环;4 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。所得 DNA 片段测序长度 512 bp。将序列与 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中的标准序列比对,通过 BLAST 软件分析,寻找突变位点。

2 结果

2.1 菌种分布 500 例 VVC 患者阴道分泌物中 313 例镜下可见菌丝或孢子,其中 285 例检出念珠菌属,经显色培养基鉴定,白念珠菌占比最高,为 54.7% (156 株),其次为光滑念珠菌 22.5% (64 株),热带念珠菌 16.5% (47 株),克柔念珠菌 4.2% (12 株),其他真菌 2.1% (6 株)。156 株经显色培养鉴定为白念珠菌的菌株经质谱鉴定为白念珠菌(评分>1.8)155 株,余 1 株评分 1.685 分。

2.2 药敏结果 155 株白念珠菌菌株对 5-氟尿嘧啶均敏感,2 株菌株对制霉菌素耐药(耐药率 1.2%),67 株对酮康唑耐药(耐药率 43.2%),97 株对氟康唑耐药(耐药率 62.5%),80 株对酮康唑耐药(耐药率 51.6%)。

2.3 测序分析 选取 3 株对多种唑类药物(氟康唑、酮康唑、咪康唑)耐药菌株(编号分别为 CA21、

CA73、CA81)、3 株对唑类药物均敏感菌株(编号分别为 CA17、CA33、CA90)以及 1 株质控菌株 ATCC 10231 进行 *ERG5* 扩增后测序。将测序序列与已知基因序列(NC_032095.1)进行比对和分析,在敏感菌株 CA33 检出 1 个同义突变位点 G528A(176 位氨基酸谷氨酸无变化),在耐药菌株 CA81 检出 1 个错义突变位点 G528C(176 位氨基酸谷氨酸突变为天冬氨酸)。见图 1。

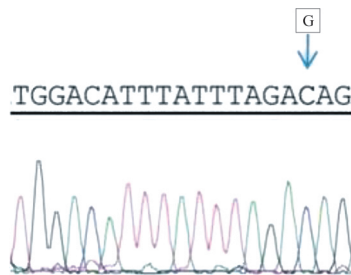


图 1 CA81 菌株碱基突变位点

3 讨论

本研究 500 例 VVC 患者阴道分泌物中 313 例镜下可见菌丝或孢子,其中 285 例检出念珠菌属,其余 28 例检出酵母菌类菌属,从 285 例标本中分离出菌种分布以白念珠菌为主(54.7%),其次为光滑念珠菌(22.5%)、热带念珠菌(16.5%)、克柔念珠菌(4.2%)和其他真菌(2.1%)。非白念珠菌比例为 45.3%,稍低于国外文献报道的 46.8%~68.9%^[6],可能与菌种地域性差异有关^[7]。经涂片镜检结合显色培养基可实现常见念珠菌的快速鉴定,本文采用该模式实现 285 例样本的检测,而对于白念珠菌的显色鉴定亦经过质谱技术进行复核,虽然存在 1 株质谱鉴定低分值菌株,但仍具有较高的鉴定一致率。

Martel 等^[8]发现 1 株耐唑类抗真菌药物白念珠菌菌株同时存在 *ERG5* 和 *ERG11* 基因双重突变。有研究提出 *ERG5* 基因突变可能导致了麦角甾醇合成途径受阻,使白念珠菌菌株对唑类抗真菌药物产生耐药性^[9]。本研究结果显示白念珠菌临床敏感株和耐药株的 *ERG5* 基因均存在突变,其中编号为 CA33 的敏感株,发生了 1 个同义点突变,位点为 528 bp,突变前碱基所在的密码子为 GAG,编码的氨基酸为谷氨酸(Glu),突变后未引起氨基酸的变化;编号为 CA81 的耐药株,发生了 1 个错义点突变,使其第 528 位碱基由 G 突变为 C,发生了氨基酸置换,导致第 176 位氨基酸由谷氨酸(Glu)变成了天冬氨酸(Asp)。第 528 号位点是较容易突变的

位点,耐药菌株在该位点发生了错义突变,引起了氨基酸的置换,提示与耐药的产生有关^[10]。

但白念珠菌对唑类抗真菌药物的耐药机制比较复杂,有可能是某种关键基因突变或者高表达导致菌株产生耐药性,也可能是多种机制共同作用的结果。本研究进行测序的菌株有限,因此后期将增加测序的菌株,深入研究 *ERG5* 基因突变与真菌药物关系,为治疗白念珠菌感染提供一定的理论依据。

4 参考文献

[1] 沈宇. 阴道炎五联检验对阴道炎病原体诊断与白带清洁度检测的应用效果[J]. 中国现代医药杂志, 2017, 19(3): 95-97.

[2] 杨心茹, 罗伟, 邢丽枝, 等. 妊娠期念珠菌性阴道炎与不良妊娠结局关系的研究进展[J]. 中国真菌学杂志, 2019, 14(5): 313-315.

[3] Calabrese D, Bille J, Sanglard D. A novel multidrug efflux transporter gene of the major facilitator superfamily from *Candida albicans* (FLU1) conferring resistance to fluconazole[J]. Microbiol, 2000, 146 (pt11): 2743-2754.

[4] Basma R, Basma G, Ojaimi N, et al. Susceptibility of *Candida albicans* to common and novel antifungal drugs, and relationship be-

tween the mating type locus and resistance, in Lebanese hospital isolates[J]. Mycoses, 2009, 52(2): 141-148.

[5] 王峥, 周学东, 任彪. 白色念珠菌麦角甾醇通路影响变异链球菌致龋力的研究[J]. 四川大学学报(医学版), 2020, 51(6): 742-748.

[6] Lehmbecher T, Frank C, Engels K, et al. Trends in the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital [J]. Infect, 2010, 61(3): 259-265.

[7] 乔祖莎, 冯文莉, 杨静, 等. 临床无菌体液侵袭性真菌感染的病原学及危险因素分析[J]. 中华全科医师杂志, 2012, 11(3): 156-159.

[8] Martel CM, Parker JE, Bader O, et al. A clinical isolate of *Candida albicans* with mutations in *ERG11* (encoding sterol 14 α -demethylase) and *ERG5* (encoding C22 desaturase) is cross resistant to azoles and amphotericin B[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(9): 3578-3583.

[9] 高晓阳, 黄宏君, 吴白平. 医院内真菌感染的分布及药物敏感性分析[J]. 实用预防医学, 2012, 19(2): 269-271.

[10] 王钰婷, 刘锦燕, 史册, 等. 白念珠菌 *ERG3* 基因敲除及其对耐药性的影响[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2020, 40(2): 163-170.

(收稿日期:2020-11-16)
(本文编辑:周万青,刘群)