

DOI:10.13350/j.cjpb.220315

• 临床研究 •

外阴阴道念珠菌病患者感染致病真菌的分布特点 及基因型分析*

潘小虹, 郭亮生, 刘利芬, 张亚慧, 贾素红**

(苏州大学附属第二医院妇产科, 江苏苏州 215000)

【摘要】 目的 研究外阴阴道念珠菌病(VVC)患者感染致病真菌的分布特点及基因型。方法 本院2018年1月至2021年1月收治的VVC患者112例,其中单纯VVC60例,复杂VVC52例。采集患者阴道分泌物,培养、分离并鉴定致病菌株,应用微卫星基因分型技术对鉴定为白念珠菌的菌株进行基因分型,确定白念珠菌的基因型。结果 共采集112份标本,分离出念珠菌112株,其中白念珠菌99株,占88.39%;非白念珠菌13株,占11.61%,包括光滑念珠菌11株,近平滑念珠菌2株。对99株白念珠菌进行基因分型,共得到25种基因型,主要基因型为30-45、32-45及31-45,三者占白念珠菌的61.62%。60例单纯性VVC患者的阴道分泌物共分离出60株致病菌,全部为白念珠菌,分为19种基因型。52例复杂性VVC患者的阴道分泌物共分离出52株致病菌,其中39株为白念珠菌,分为16种基因型。复杂性VVC及单纯性VVC患者感染的白念珠菌主要基因型均为30-45、32-45及31-45。16-16、17-17及22-22基因型白念珠菌均分离自单纯性VVC患者,可能为单纯VVC的优势基因。99株白念珠菌中有16株对氟康唑耐药,对其进行基因分型,共得到10种基因型,以30-45、32-45两种基因型菌株较多。有11株白念珠菌对伏立康唑耐药,对其进行基因分型,共得到8种基因型,以31-45基因型菌株较多。结论 VVC患者感染的病原菌多为白念珠菌,主要基因型为30-45、32-45及31-45,且氟康唑、伏立康唑耐药白念珠菌以及复杂性VVC白念珠菌主要为上述3种基因型。

【关键词】 外阴阴道念珠菌病;致病菌分布;微卫星基因型分析技术;基因分型

【中图分类号】 R379

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)03-0321-04

[*Journal of Pathogen Biology*. 2022 Mar;17(3):321-324.]

Distribution characteristics and genotype analysis of pathogenic bacteria in patients with Vulvovaginal candidiasis

PAN Xiao-hong, GUO Liang-sheng, LIU Li-fen, ZHANG Ya-hui, JIA Su-hong (*Obstetrics and Gynecology, Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215000, China*)***

【Abstract】 **Objective** To investigate the distribution characteristics and genotype analysis of pathogenic bacteria in patients with vulvovaginal candidiasis (VVC). **Methods** A total of 112 patients with VVC in our hospital from January 2011 to January 2016 were enrolled, including 60 cases of simple VVC and 52 cases of complex VVC. The vaginal secretion of VVC patients was collected, and the pathogens of VVC patients were cultured, isolated and identified. The strains identified as *Candida albicans* were genotyped by microsatellite genotyping technology. **Results** A total of 112 pathogenic strains were isolated from 112 specimens, including 99 strains of *Candida albicans* (88.39%) and 13 strains of non-*Candida albicans* (including 11 strains of *Candida glabrata* and 2 strains of *Candida parapsilosis*), accounting for 11.61%. All 99 strains of *Candida albicans* were genotyped and a total of 25 genotypes were obtained. The major genotypes of *Candida albicans* were 30-45, 32-45 and 31-45, with the three accounting for 61.62%. A total of 60 pathogenic strains were isolated from the vaginal secretions of 60 patients with simple VVC, all of which were *Candida albicans* with a total of 19 genotypes; A total of 52 pathogenic strains were isolated from the vaginal secretions of 52 patients with complex VVC, 39 of which were *Candida albicans* with a total of 16 genotypes. The predominant *Candida albicans* genotypes in patients with complex VVC and simple VVC were 30-45, 32-45 and 31-45. The 16-16, 17-17 and 22-22 genotypes of *Candida albicans* were all derived from simple VVC, suggesting that the three might be the dominant genes of simple VVC. A total of 16 strains of 99 *Candida albicans* were resistant to fluconazole, and 10 genotypes were found by analysis, among which the strains located in 30-45 and 32-45 genotypes were the most. A total of 11 strains of *Candida albicans* were resistant to voriconazole. Analysis of their genotypes showed that a total of 8 genotypes were obtained from 11 strains of drug-resistant bacteria, among which 31-45 genotypes were the most. **Conclusion** The main vaginal pathogens of VVC patients

* **【基金项目】** 青年职工预研基金项目(No. SDFEYQN1907)。

** **【通讯作者】** 贾素红, E-mail: panjingshi2020@163.com

【作者简介】 潘小虹(1987-), 女, 江苏苏州人, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事妇科工作。E-mail: 574545501@qq.com

are *Candida albicans*, and the microsatellite gene analysis technology indicates that the main genotypes of *Candida albicans* are 30-45, 32-45 and 31-45, and the genotypes of *Candida albicans* resistant to fluconazole, voriconazole, as well as the complex VVC *Candida albicans* genotypes are mainly distributed in the three main genotypes.

【Key words】 vulvovaginal candidiasis; distribution of pathogenic bacteria; microsatellite marker technology; genotyping

外阴阴道念珠菌病 (vulvovaginal candidiasis, VVC) 是世界范围内常见的妇科炎症疾病, 患者有外阴瘙痒的症状, 该病虽不会造成生命危险, 但给患者带来极大的精神压力, 并影响性生活。若不及时治疗, VVC 还将引起盆腔炎、月经紊乱等问题^[1-2]。白念珠菌与光滑念珠菌是引起 VVC 的常见致病菌, 研究 VVC 的病原菌结构及基因型, 在 VVC 临床管理与治疗中具有积极意义^[3-4]。随着分子生物学技术的不断进步, 病原菌基因型的检测方式也逐渐丰富化。微卫星位点具有短串联重复序列, 拥有较高的长度变异性及高度的多态性, 而白念珠菌与光滑念珠菌的基因组中已确定了很多有意义的微卫星多态性位点^[5-7]。故微卫星长度多态性在检测 VVC 致病菌基因型中具有可行性。本研究通过分析 112 例 VVC 患者感染念珠菌种类及分布情况, 并采用微卫星技术检测致 VVC 念珠菌的基因型, 为临床有针对性地治疗与管理 VVC 感染提供参考。

对象与方法

1 病例

2018 年 1 月-2021 年 1 月本院妇科收治的 VVC 患者 112 例, 年龄 22~55 岁, 平均年龄 (34.58±9.72) 岁。

2 主要仪器及试剂

CO₂ 恒温培养箱 (上海捷呈实验仪器), 紫外线照相分析系统 (上海天能科技), EC250-90 型电泳仪以及离心机 (美国 Thermo 公司), 光学显微镜 DS-U3 (日本 Nikon 公司), Fast-Pred 快速核酸提取仪 (美国 MP 公司), SDA 培养基 (杭州百思生物技术公司), 真菌 DNA 提取试剂盒 (美国 Omega 公司), PCR Master Mix (上海生物工程有限公司), DL2000 DNA ladder (天津薄美科生物技术公司), Goldview 核酸染料 (北京泛博生物化学有限公司)。

3 方法

3.1 标本采集与念珠菌培养 使用无菌棉拭子从患者阴道后穹窿处沾取白色凝固样、奶酪形阴道分泌物, 接种于科马嘉显色培养基 (郑州博赛生物技术公司产品), 置 28 °C 恒温箱培养 24~48 h。

3.2 念珠菌的分离与纯化 活化收集到的念珠菌菌株, 接种于 SDA 培养基, 37 °C 培养 24~48 h 后观察菌落形态, 并进行分离纯化。

3.3 念珠菌的鉴定 将分泌物接种于科马嘉显色培养基后, 通过培养基显色初步判断菌种, 显绿色为白色念珠菌, 蓝色为热带念珠菌, 紫色为光滑念珠菌, 粉红色为克柔假丝酵母菌, 白色为不能鉴定。取显色为绿色、紫色及白色的菌落, 使用 VITEK2 全自动微生物分析仪 (法国梅里埃公司) 鉴定菌种。

3.4 念珠菌的基因分型

3.4.1 DNA 提取 取 0.5~2 mg 纯化的菌落, 充分研磨后再加入 50 μL Lysis Buffer A (上海钦诚生物科技有限公司), 95 °C 水浴 10 min, 冷却后 12 000 r/min (离心半径 3 cm) 离心 5 min, 取上清液即为 DNA 溶液。

3.4.2 微卫星基因分型检测 根据文献^[8]设计引物, 由上海吉凯基因有限公司合成, 引物序列见表 1。扩增体系 (总体积 25 μL): 2×Taq 绿酶 12 μL, FP 1 μL, RP 1 μL, 模板 DNA 1 μL, ddH₂O 10 μL。反应程序: 98 °C 预变性 30 min; 98 °C 变性 10 s, 54 °C 退火 10 s, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min。取 PCR 产物进行 1% 琼脂糖电泳鉴定, 确定产物中的 DNA 含量, 并将其稀释至所需浓度后进行基因型检测: 在 96 孔板孔内加入 9.5 μL Hi-Di, 并在对应孔内加入 0.5 μL 稀释产物, 混合均匀后在加热器中 95 °C 预变性 5 min, 置于 -20 °C 冰箱冷藏 2 min 后取出, 4 000 r/min (离心半径 3 cm) 离心 1 s, 上机检验。使用 Genemapper 软件分析片段大小。

表 1 PCR 引物
Table 1 Primer sequences

引物名称或位点 Primer name or locus	引物序列 (5'-3') Primer sequences	荧光标记 Fluorescence labeling
白色念珠菌		
CAI-F	ATGCCATTGAGTGGAAATTGC	HEX
CAI-R	AGTGGCTTGTGTGGGTTTT	HEX
光滑念珠菌		
RPM2	ATCTCCCAACTTCTCGTAGCC ACTTGAACGACTTGAACGCC	5'FAM 无
ERG3	AGTGGCAGTGTATGTAAAGAATG CGTATACCTTATCTCCGTTCAA	5'FAM 无
MTI	CAGCAATAATAGCTTCTGACTGAC- TATGAC GACAGGAGCAACCGTTAGGA	5'FAM 无

3.5 药敏试验 采用生物梅里埃 ATB-Fungus3 微量肉汤稀释法^[9], 选择氟康唑、伏立康唑两种临床常用抗真菌药进行念珠菌的药敏试验。取 VITEK 菌悬浮液管, 加入 2 ml 无菌蒸馏水, 用无菌棉签湿润后沾取

菌落制备 2McF 浊度均匀的菌悬液。取 200 μ l 稀释的菌悬液加入 ATB F2 培养基安瓶内,充分混匀后取 135 μ l 加入到反应条检测杯内,37 $^{\circ}$ C 需氧孵育 24~54 h。根据美国临床化学委员会 M27-S4^[10] 判断白色念珠菌 VRC 耐药菌株。质控菌株为白色念珠菌 ATCC 14053,由中国医学真菌保藏管理中心提供。

3.6 VVC 分类及白念珠菌基因型比较分析 根据 VVC 分类标准^[11],将患者分为单纯 VVC 和复杂性 VVC。其中单纯性 VVC 是指偶发 VVC,临床症状为轻中度,患者免疫功能正常,且多为白念珠菌感染;复杂性 VVC 包括复发性 VVC(RVVC)、严重性 VVC(SVVC)、非白念珠菌感染及妊娠期 VVC、非控制的糖尿病 VVC 以及免疫抑制剂使用所致的 VVC。本组患者中单纯性 VVC 60 例,复杂性 VVC 共 52 例,包括 RVVC 19 例,SVVC 16 例,妊娠期 VVC 17 例。分析比较各类 VVC 患者感染白念珠菌的基因型特点。

结 果

1 VVC 致病菌的种类及分布

112 份标本中共分离出 112 株念珠菌,其中白念珠菌 99 株,占 88.39%;非白念珠菌 13 株,包括光滑念珠菌 11 株,近平滑念珠菌 2 株,占 11.61%。

2 白念珠菌基因型分布

通过微卫星基因座的两个等位基因中 CAA 重复单元数目的组合来制定分离菌株的 CAI 基因型,根据菌株扩增片段大小进行判断。为方便起见,以等位基因自动测序仪计算出的碱基对长度命名^[11]。99 株白念珠菌经 Genescan 软件分析共得到 25 种基因型,其中 30-45 基因型的菌株数较多,共 32 株;其次为 32-45 基因型共 16 株,31-45 基因型共 13 株。白念珠菌的主要基因型为 30-45、32-45 及 31-45,三者占白念珠菌的 61.62%。其余基因型菌株数量较少(表 2)。

3 单纯 VVC 与复杂 VVC 白念珠菌基因型比较

60 例单纯性 VVC 患者阴道分泌物中共分离出 60 株念珠菌,全部为白念珠菌,基因型共 19 种;52 例复杂性 VVC 患者阴道分泌物中共分离出 52 株念珠菌,其中 39 株为白念珠菌,基因型共 16 种。

比较两组患者感染白念珠菌的优势基因型,在复杂性 VVC 及单纯性 VVC 患者主要白念珠菌基因型均为 30-45、32-45 及 31-45。16-16、17-17 及 22-22 基因型白念珠菌均分离自单纯性 VVC,可能是单纯 VVC 的优势基因。

4 念珠菌的耐药性

99 株白念珠菌中有 16 株对氟康唑产生耐药。对其进行基因型分析,共得到 10 种基因型,其中 30-45、32-45 两种基因型分别为 6 株和 5 株,32-46、17-47、18-

22、30-47 及 32-48 基因型各 1 株。

有 11 株白念珠菌对伏立康唑产生耐药。对其进行分析基因型,共得到 8 种基因型,其中 31-45 基因型 5 株,30-47 基因 2 株,30-46 基因型 1 株。

表 2 白念珠菌基因型分布
Table 2 Genotype distribution of *Candida albicans*

基因型 Genotype	数量(株) No. of strain	占比(%) Percentage
30-45	32	32.32
32-45	16	16.16
31-45	13	13.13
30-46	6	6.06
32-46	4	4.04
16-16	3	3.03
22-22	3	3.03
17-17	2	2.02
39-45	2	2.02
32-32	1	1.01
30-47	1	1.01
18-22	3	3.03
22-33	2	2.02
34-45	1	1.01
38-45	2	2.02
33-33	3	3.03
其他	5	5.05
合计 Total	99	100.00

讨 论

念珠菌在自然界中分布广泛,可定植于人类泌尿道、生殖道、呼吸道等多种部位的黏膜表面,当宿主免疫力下降或发生其他改变时,念珠菌会转化为定植感染,VVC 的发生便是念珠菌由定植于外阴阴道转化为感染所致。本组 112 例 VVC 患者的阴道分泌物中共培养出 112 株念珠菌,其中白念珠菌共 99 株,占 88.39%;非白念珠菌 13 株,包括光滑念珠菌共 11 株,近平滑念珠菌共 2 株,占 11.61%。由此可见,VVC 的发生主要由白念珠菌所致。有研究认为,非白念珠菌感染与复杂性 VVC 间存在密切的联系^[12]。本研究中 60 例单纯性 VVC 患者的阴道分泌物培养结果全为白念珠菌,而 52 例复杂性 VVC 患者阴道分泌物中共分离出 39 株白念珠菌,其余 14 株分别为 11 株光滑念珠菌与 2 株近平滑念珠菌。表明反复 VVC 和严重 VVC 的发生可能也与光滑念珠菌和近平滑念珠菌感染有关。近年研究发现,非白念珠菌所致的 VVC 患者数量也在不断增加^[13]。提示明确 VVC 感染菌种对于抗菌药物的选择和指导 VVC 治疗具有重要意义。

电泳分析法和微卫星等基因鉴定是真菌基因鉴定的常见方法。白念珠基因组中发现了多个多态性微卫星位点,位于非编码区的 CAI 基因座是最具多态性的基因座,其对基因型的分辨能力达到 0.97~0.99,故

微卫星基因鉴别是当前应用最为广泛的白念珠菌基因型鉴定方法。本研究采用微卫星基因鉴别法鉴定 99 株白念珠菌基因型,共得到 25 种基因型,其中 30-45 基因型的菌株数量最多,共 32 株;其次为 32-45,共 16 株,31-45 共 13 株。白念珠菌的主要基因型为 30-45、32-45 及 31-45,三者占白念珠菌的 61.62%。其余基因型菌株均有分布,检测结果与既往研究不太一致。Donders 等^[14]报道,南京地区 VVC 患者感染白念珠菌的常见基因型为 30-45、32-46、21-21。Gunther 等^[15]报道,日本 VVC 患者感染白念珠菌的主要基因型为 23-23 和 32-41。以上差异可能与研究对象的地域差异性、样本量等因素相关。此外,本研究纳入病例数尚少,需通过扩大样本量作进一步研究。

分析单纯性 VVC 及复杂性 VVC 患者感染白念珠菌的基因型,两组患者感染的白念珠菌主要基因型均为 30-45、32-45 及 31-45。而 16-16、17-17 及 22-22 基因型白念珠菌均分离自单纯性 VVC,可能是单纯 VVC 的优势基因。

临床上推荐使用氟康唑作为治疗 VVC 的主要药物,但不少患者在停药后又复发。本研究选择氟康唑及伏立康唑进行白念珠菌的耐药性测试,并对耐药白念珠菌进行基因型分析。结果显示,共 16 株白念珠菌对氟康唑产生耐药。16 株耐药菌共得到 10 种基因型,以 30-45、32-45 两种基因型菌株较多,32-46、17-47、18-22、30-47 及 32-48 基因型较少。共 11 株白念珠菌对伏立康唑产生耐药。11 株耐药菌共得到 8 种基因型,以 31-45 基因型菌株数较多,30-45 和 30-46 菌株数较少。由此可见,不同耐药株的基因型分布有所不同,但其均集中在出现频率较高的几种基因型。

综上所述,VVC 患者感染的念珠菌主要为白念珠菌,微卫星基因分析显示白念珠菌的主要基因型为 30-45、32-45 及 31-45,且氟康唑、伏立康唑耐药白念珠菌,以及复杂性 VVC 白念珠菌多为上述 3 种基因型,可为 VVC 的治疗提供参考。

【参考文献】

[1] Sobel JD. Recurrent vulvovaginal candidiasis[J]. Am J Obstet-

(上接 320 页)

- [10] Song M,Zhang Y,Li S,et al. A sensitive and rapid immunoassay for *Mycoplasma pneumoniae* in children with pneumonia based on single-walled carbon nanotubes[J]. Sci Rep,2017,7(1):16442.
- [11] 潘芬,张泓.肺炎支原体耐药性及分子流行病学研究进展[J].上海交通大学学报:医学版,2014,34(8):1248-1253.
- [12] 骆文龙,杨雨.肺炎支原体大环内酯类药物耐药机制研究[J].中国卫生检验杂志,2018,28(12):1457-1459.
- [13] Ma ZY,Zheng YJ,Deng JK,et al. Characterization of macrolide resistance of *Mycoplasma pneumoniae* in Children in Shenzhen,

Gynecol,2016,214(1):15-21.

- [2] 托娅,赵杰,陈秀娟.蒙古族已婚妇女阴道念珠菌和滴虫感染状况及影响因素分析[J].中国病原生物学杂志,2017,12(7):663-665.
- [3] 徐炜新,孙杰.多位点序列分析法在白念珠菌性阴道炎唑类耐药菌株分子流行病学研究中的运用[J].检验医学,2018,33(3):233-238.
- [4] Fox G,Preziosi RF,Antwis RE,et al. Multi-individual microsatellite identification: A multiple genome approach to microsatellite design (MiMi)[J]. Mol Ecol Resour,2019,19(6):1672-1680.
- [5] 王景,李小梅,郑健宇,等.阴道炎患者感染白念珠菌的耐药性及基因突变研究[J].中国病原生物学杂志,2014,9(7):642-646.
- [6] 渠巍,丁文静,江明礼,等.育龄妇女 VVC 光滑假丝酵母菌基因多态性与药物敏感性相关性研究[J].中华检验医学杂志,2018,41(8):596-600.
- [7] Amouri I,Sellami H,Borji N,et al. Epidemiological survey of vulvovaginal candidosis in Sfax, Tunisia[J]. Mycoses,2011,54(5):499-505.
- [8] Li C,Wang L,Tong H,et al. Microsatellite analysis of genotype distribution patterns of *Candida albicans* vulvovaginal candidiasis in Nanjing,China and its association with pregnancy,age and clinical presentation[J]. Arch Gynecol Obstet,2016,294(2):291-297.
- [9] 胡明,李璐璐,赵敏,等.96 点琼脂稀释法与微量肉汤稀释法药敏试验结果的对比[J].中国抗生素杂志,2018,43(6):729-733.
- [10] 张晓云,姜利群,马巧玲.白色念珠菌 *upc2* 基因 G1927A 多态性与唑类药物耐药的关系[J].现代预防医学,2016,43(16):3016-3019.
- [11] 石一复.外阴阴道念珠菌病[M].北京:人民卫生出版社,2005.
- [12] Sampaio P,Nogueira E,Loureiro AS,et al. Increased number of glutamine repeats in the C-terminal of *Candida albicans* Rlm1p enhances the resistance to stress agents[J]. Antonie Van Leeuwenhoek,2009,96(4):395-404.
- [13] 杜海燕.110 例复杂性 VVC 患者阴道微生态状况分析[J].中国妇幼保健研究,2010,21(1):105-106.
- [14] Donders G,Bellen G,Byttebier G,et al. Individualized decreasing-dose maintenance fluconazole regimen for recurrent vulvovaginal candidiasis (ReCiDiFtrial)[J]. Am J Obstet Gynecol,2008,199(6):1-9.
- [15] Gunther LS,Martins HP,Gimenes F,et al. Prevalence of *Candida albicans* and non-*albicans* isolates from vaginal secretions: comparative evaluation of colonization,vaginal candidiasis and recurrent vaginal candidiasis in diabetic and non-diabetic women [J]. Sao Paulo Med J,2014,132(2):116-120.

【收稿日期】 2021-10-27 【修回日期】 2022-01-16

- China[J]. Pediatr Pulmonol,2014(49):695-700.
- [14] 景艳.小儿肺炎支原体感染的特点及危险因素探讨[J].淮海医药,2014,32(6):552-553.
- [15] 徐汉云.小儿肺炎支原体感染临床特点和危险因素分析[J].实用临床医学,2016,17(2):48-49.
- [16] 马丽.兰州市西固区儿童肺炎支原体感染流行病学分析[J].卫生职业教育,2017,35(1):129-130.

【收稿日期】 2021-12-22 【修回日期】 2022-02-01