

应用M13引物PCR指纹法分析假丝酵母菌氟康唑耐药性

随着真菌感染患者的增多及抗真菌药物应用的频繁,真菌耐药现象也越来越普遍[1]。在耐药真菌中,最常见的致病真菌为假丝酵母菌(*Candida albicans*),而假丝酵母菌氟康唑耐药性,为最常见的真菌耐药现象[2]。但假丝酵母菌氟康唑耐药性的微生物遗传机理仍不明[3]。为在整体基因组水平探讨假丝酵母菌氟康唑耐药性的微生物遗传机制,我们首先采用酵母菌纸片扩散法对经生物学鉴定为假丝酵母菌的41例标本进行了耐药分析,然后应用M13引物进行PCR指纹分析,最后应用RAPD200软件进行邻接法(neighbor joining, NJ)聚类分析,报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

临床菌株共41株,系2001年1月~2002年10月从第一军医大学珠江医院皮肤科门诊送检的白带(Va-01~Va-08)、尿(U-01)、痰(S-01~S-27)、血(B-01)、胃液(St-01)、中心动脉管(A-01)、脓(P-01)、脑脊液(Bf-01)等标本中分离,所有菌株均通过血清芽管形成试验和科嘉玛培养基显色生长试验为假丝酵母菌。

1.2 实验材料

引物M13, 5'-GAGGGTGGCGTTCT-3'购自上海博亚生物技术有限公司, Sensi-disc™试剂盒购自美国BD公司, PCR试剂盒、琼脂糖, 如Marker均购自大连宝生物工程公司, 氯化苄购自上海凌峰化学试剂有限公司, 琼脂、RNase、SDS、Tris均购自Sigma公司, 蛋白胨和酵母提取液购自Oxoid公司, 重蒸苯酚购自第一军医大学化学教研室, 其它试剂均为国产分析纯。

1.3 主要仪器

PE480热循环仪, 高速冷冻离心机(SORVALL RC5C Plus), 凝胶图象分析仪(SYNGENE), UV-1601型紫外分光光度计(SHIMADZU)。

1.4 酵母菌纸片扩散法敏感实验

按试剂盒说明书进行, 简述如下: 挑取大约5个菌落至5 ml生理盐水中, 旋摇成均匀的菌悬液; 用无菌生理盐水调整比浊至0.5号麦氏管浊度; 用无菌棉签蘸取已校正的菌液, 再将多余菌液在液面上的管壁上轻轻旋转挤出, 然后用棉签的侧面从3个不同的方向(每次旋转平皿60°)密涂2%葡萄糖0.5 μg/ml美兰的Mueller-Hinton(M-H)的琼脂平皿, 每株酵母菌用一块平皿, 此平皿加盖放置室温干燥至少3 min, 但不得超过15 min, 使水吸干; 将25 μg/片氟康唑(纸片打开前应在室温平衡20 min, 使外冷凝水蒸发干; 未用完的放回冰箱)贴在涂好菌的平皿上, 用镊子轻压纸片使之紧贴琼脂表面; 平皿底朝上, 35 °C 孵育18~24 h; 用卡尺测量抑菌环直径(达mm水平), 在抑菌圈内部或边缘的极微小菌落(<20%)可忽略不记。氟康唑对ATCC90028的抑菌环直径(mm)的质控允许范围为28~39 mm, 实验前2个月检查质控结果, 至少每周作1次。

1.5 假丝酵母菌DNA制备

假丝酵母菌基因组DNA的抽提, 用氯化苄法代替了昂贵的细胞壁溶解酶(lyticase), 同时省略了蛋白酶K的使用, 参照文献[5]的方法, 简述如下: 收集菌落于1.5 ml的微量离心管内, 加1ml灭菌的双蒸水, 离心, 沉淀物悬于500 μl提取液(0.1 mol/L Tris-HCl, pH 9.0; 0.04 mol/L EDTA)、100 μl 10%SDS和400 μl氯化苄中, 混匀, 50 °C 孵育30 min(每隔5 min振摇1次, 使两相混匀); 然后置冰水中15 min, 离心, 取上层液体, 加RNase(50 μg/ml)在37 °C下作用60 min; 用等体积苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提1次, 氯仿:异戊醇(24:1)抽提1次, 上清液加3 mol/L醋酸钠, 使终浓度为0.3 mol/L及2.5倍体积无水乙醇, -20 °C过夜; 离心沉淀物用无水乙醇洗2次, 自然干燥后, 溶于50 μl TE(10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 1 mmol/L EDTA), 4 °C保存待用。DNA定量及纯度分析: 紫外分光光度计法测D₂₆₀和D₂₈₀, 计算D₂₆₀与D₂₈₀的比值, 若比值≥1.7, 说明DNA纯, 若比值<1.7, 说明样品中含蛋白质等杂质; 以D₂₆₀=1相当于含有50 μg DNA/ml为标准参照, 估算DNA含量, 将提取的DNA配制成50 μg/ml。

1.6 PCR指纹法

参考Xu等[6]的方法, 25 μl总反应总体积, 100 ng基因组DNA, 2.5mmol/L dNTP混合液4 μl, 2×PCR缓冲液12.5 μl, Taq聚合酶1.25 U, M13引物0.25 μl(100 pmol/μl), 蒸馏水补至总反应体积25 μl, 30 μl矿物油覆盖, 所有组分的混合均在冰上进行。应用PE-480热循环仪上进行PCR扩增。PCR热循环参数为97 °C 3 min预变性, 然后进入热循环, 94 °C变性30 s, 50 °C退火1 min, 72 °C延伸1 min, 共40个循环, 最后72 °C 5 min延伸。10 μl PCR产物于1.2%琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙啶染色, DL-2000 DNA Marker为分子量标准, 电泳结果在紫外灯下观察并用凝胶图象分析仪记录结果, 采用RAPD200软件进行邻接法 NJ聚类分析。

2 结果

2.1 纸片扩散法药敏实验结果

41例临床标本均已鉴定为假丝酵母菌, 其中11例为敏感(8株痰, 1株脓, 1株尿), 8例为依赖(7株痰, 1株中心动脉管), 22例表现为耐药(12

株痰，1株脑脊液，8株白带，1株血)。如表1所示。值得一提的是，8例阴道分泌物标本均表现为耐药，这表明念珠菌性阴道炎多表现为耐药，而肺部真菌感染的耐药情况表现不一，较为复杂。

表 1 42 例临床标本纸片扩散法药敏实验结果
Tab.1 Result of drug sensitivity test of 42 clinical isolates of *Candida albicans* using paper diffusion method

Results	Cases (%)	Mean diameter (mm)
Sensitive	11 (26.8%)	33.63±4.21
Dependent	8(19.5%)	16.37±2.81
Resistant	22 (53.7%)	6.90±0.99

2.2 M13 PCR指纹结果

如图1中的A、B和C所示，应用M13引物PCR指纹法，在以痰液和阴道分泌物为主要来源的41例标本中，条带数目从2条到12条不等，大小介于250 bp到2 000 bp之间，结合感染部位和纸片扩散法药敏实验鉴定结果可知，大部分样品在520 bp左右存在典型带，其中8株依赖株全有，大部分样品在2 000 bp左右有特征带，而阴道炎只有1株有，可见电泳模式(gel pattern)与感染部位和氟康唑药物反应性有关。

图2 所示为应用RAPD200聚类分析结果，NJ法的原理是最小距离分类，图中所示的小数为相对距离值，距离近的标本提示可能来自同一爆发菌株。图2提示，41株临床株可分为两大类，虽然从阴道分离的8例标本均表现为耐药，但其中Va-03和Va-02带型类似，提示可能为同一来源，而另有5株(Va-04, Va-05, Va-08, Va-01, Va-07)归为一大类，但带型差别仍较大，提示阴道感染的源菌来源可能较为复杂；从痰液中分离的26例标本中，8例敏感，7例依赖，11例耐药，其中S-05(敏感)，S-13(耐药)，S-04(依赖)，S-12(依赖)和S-07(耐药)带型类似，提示可能来源于同一菌株，但因耐药情况分布无规律，另外S-09, S-18, S-19和S-08归为一类，情况与之类似，这提示部分肺部感染的菌株同一来源，因标本取自同一医院，提示院内感染的可能性；从其他部位分离的7例标本3例敏感，1例依赖，4例耐药，分别归属于不同的类别，因这些标本多取自动脉或静脉插管，提示感染源多渠道；值得注意的是，某些从阴道和肺部分离的标本带型类似，提示肺部和阴道可交叉感染。总之，假丝酵母菌的耐药机制在基因组水平上表现为非常复杂，但部分耐药菌株或同一部位感染的菌株归为一类，可见M13引物PCR指纹可用于分子流行病学和耐药性分析，但仅供参考。

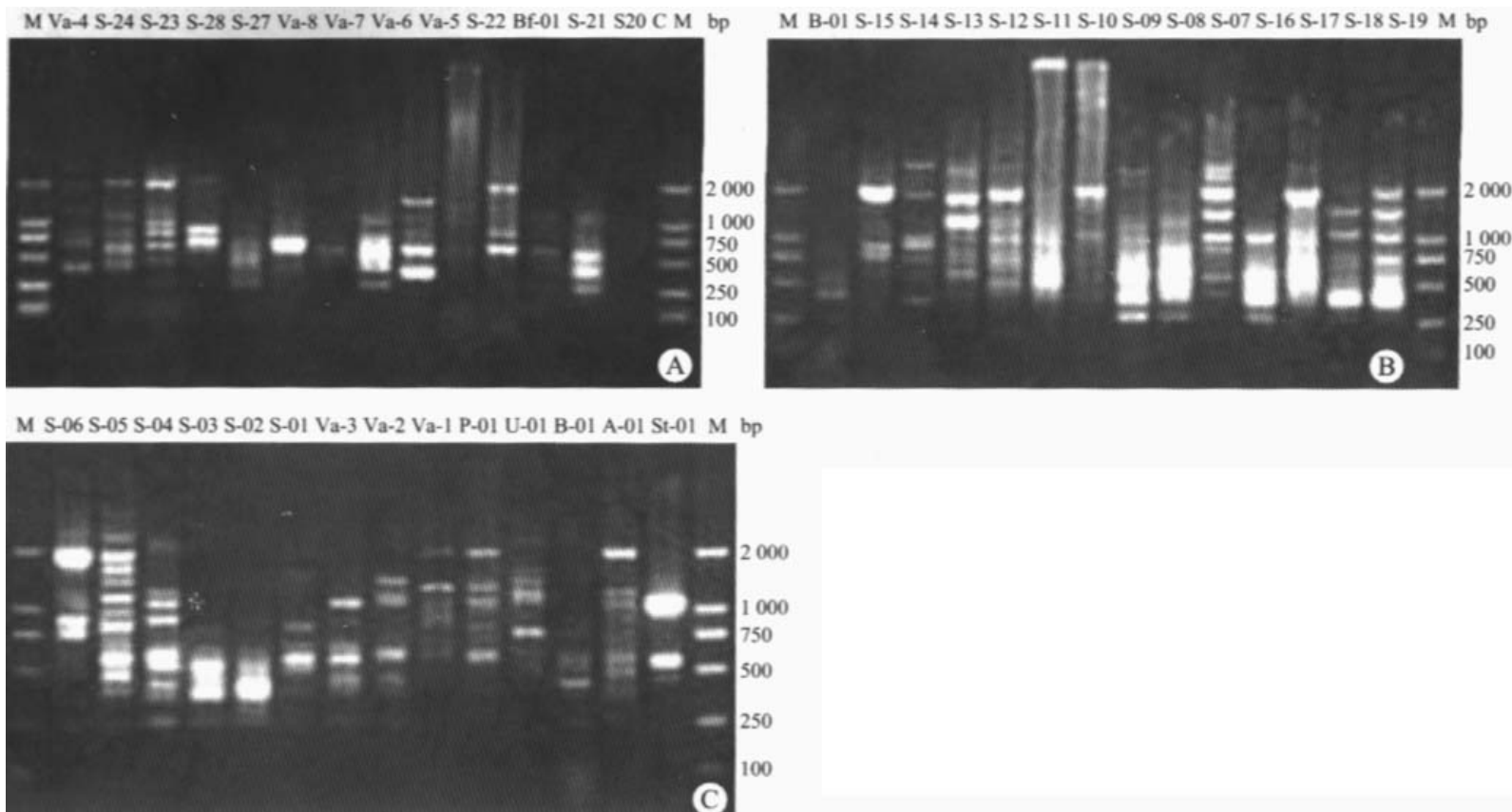


图1 M13 PCR指纹法分析假丝酵母菌

Fig.1 PCR fingerprinting analysis of the clinical isolates of *Candida albicans*

A, B and C show the results of electrophoresis performed on 1.2% agarose gel for 2 h, stained with ethidium bromide. The molecular marker is DL2000

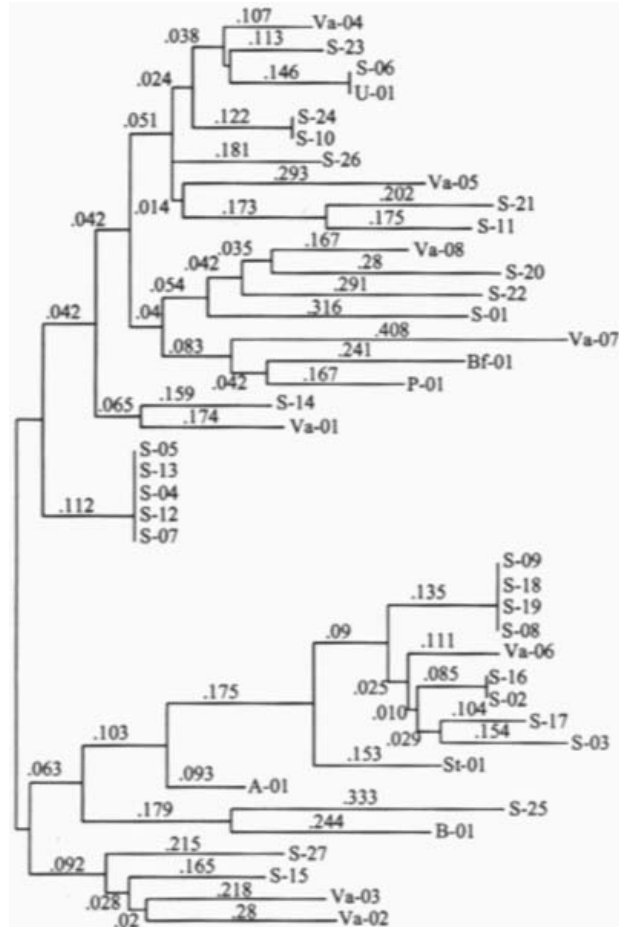


图2 RAPD200软件邻接法聚类结果
Fig.2 Cluster analysis of 41 clinical isolates with neighbor joining method using RAPD200 software

3 讨论

目前我国尚无对假丝酵母菌耐药的大规模流行病学调查数据，而本文药敏试验的样本数较小，样本来源多样，因此不能准确反映目前临床假丝酵母菌耐药的真实情况。但值得一提的是，在8例阴道分泌物分离的菌株均有氟康唑耐药性，对于性传播疾病的治疗和预防具有一定的提示意义。假丝酵母菌肺炎感染最近备受重视[7]，发病原因包括免疫低下，气管插管等，表现出的症状较多，而我们的结果提示就耐药性而言，假丝酵母菌肺炎感染表现多样，对于临床的治疗有一定的提示意义。

由于假丝酵母菌耐药的形成在分子水平是一个多基因、多步骤的发生发展过程。唑类药物的作用机制更为复杂。羊毛固醇14 脱甲基酶(14 DM)是麦角固醇生物合成的关键酶。唑类药物对14 DM有较强的亲和性，阻碍底物羊毛固醇同14DM接触，从而抑制其催化活性。目前已陆续有一些与假丝酵母菌耐唑类药物有关的基因被分离克隆[8]。目前用于假丝酵母菌基因分型的方法很多，如脉冲电泳核型、限制性片段长度多态性等，这些技术对鉴定念珠菌种间差异具有一定意义。实验方法繁琐、费时，需要熟知待鉴定菌的遗传背景知识，有的还需使用特殊探针[9]。诸多因素限制了这些技术在真菌常规鉴定和大规模流行病学研究中的应用。

PCR指纹技术能迅速扩增未知序列靶细胞基因组片段，获得大量多态性信息，目前被广泛用于生物分类鉴定、临床标本诊断、基因定位、谱系分析、多态性分析和流行病学调查等多个领域。作者应用PCR指纹技术研究假丝酵母菌耐药性与基因型关系，仅系初步尝试，其优缺点尚待大量流行病学调查数据的积累和更为详尽的分析。

参考文献：

- [1] Bossche HV, Marichal P, Odds FC. Molecular mechanisms of drug resistance in fungi[J]. Trends Microbiol, 1994, 2: 393-400.
- [2] Bossche HV. Mechanisms of antifungal resistance[J]. Rev Iberoam Micol, 1997, 14(1): 44-9.
- [3] Pfaller MA, Lockhart SR, Pujol C, et al. Hospital specificity, region specificity, and fluconazole resistance of candida albicans bloodstream isolates[J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(6): 1518-29.
- [4] Tamura M, Watanabe K, Mikami Y, et al. Molecular characterization of new clinical isolates of Candida albicans and C. dubliniensis in japan: analysis reveals a new genotype of C. albicans with group iintron[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39: 4309-15.
- [5] McCullough MJ, Clemons KV, Stevens DA. Molecular and phenotypic characterization of genotypic Candida albicans subgroups and comparison with Candida dubliniensis and Candida stellatoidea[J]. J Clin Microbiol, 1997, 37: 417-21.
- [6] National committee for clinical laboratory standards. 1997. Reference method for broth dilution antifungal

susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A. National committee for clinical laboratory standards, Wayne, Pa.

[7] Imai T, Watanabe K, Tamura YM, et al. Geographic grouping of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* by random amplified polymorphic DNA fingerprint patterns and its sequence divergence[J]. *Clin Lab*, 2000, 46(7-8): 345-54.

[8] Franz R, Kelly SL, Lamb DC, et al. Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 42: 3065-72.

[9] 彭敬红, 赵均秀, 周有利, 等. 136株念珠菌的临床分布及耐药性分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2002, 12(11): 863-4.

Peng J, Zhao J, Zhou Y, et al. Clinical distribution and drug resistance of 136 strains[J]. *Chin Hosp Infec J*, 2002, 12(11): 863-4.

参考文献:

[1] Bossche HV, Marichal P, Odds FC. Molecular mechanisms of drug resistance in fungi[J]. *Trends Microbiol*, 1994, 2: 393-400.

[2] Bossche HV. Mechanisms of antifungal resistance[J]. *Rev Iberoam Micol*, 1997, 14(1): 44-9.

[3] Pfaller MA, Lockhart SR, Pujol C, et al. Hospital specificity, region specificity, and fluconazole resistance of *Candida albicans* bloodstream isolates[J]. *J Clin Microbiol*, 1998, 36(6): 1518-29.

[4] Tamura M, Watanabe K, Mikami Y, et al. Molecular characterization of new clinical isolates of *Candida albicans* and *C. dubliniensis* in Japan: analysis reveals a new genotype of *C. albicans* with group I intron[J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39: 4309-15.

[5] McCullough MJ, Clemons KV, Stevens DA. Molecular and phenotypic characterization of genotypic *Candida albicans* subgroups and comparison with *Candida dubliniensis* and *Candida stellatoidea*[J]. *J Clin Microbiol*, 1997, 37: 417-21.

[6] National committee for clinical laboratory standards. 1997. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A. National committee for clinical laboratory standards, Wayne, Pa.

[7] Imai T, Watanabe K, Tamura YM, et al. Geographic grouping of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* by random amplified polymorphic DNA fingerprint patterns and its sequence divergence[J]. *Clin Lab*, 2000, 46(7-8): 345-54.

[8] Franz R, Kelly SL, Lamb DC, et al. Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* strains[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 42: 3065-72.

[9] 彭敬红, 赵均秀, 周有利, 等. 136株念珠菌的临床分布及耐药性分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2002, 12(11): 863-4.

Peng J, Zhao J, Zhou Y, et al. Clinical distribution and drug resistance of 136 strains[J]. *Chin Hosp Infec J*, 2002, 12(11): 863-4.