

## 应用 M13 引物 PCR 指纹法分析假丝酵母菌氟康唑耐药性

王应斌<sup>1</sup> 袁宏<sup>1</sup> 袁辉玉<sup>2</sup> 袁永忠<sup>1</sup> 袁深秋<sup>1</sup> 渊第一军医大学细胞生物学教室袁广东广州 510515 中山大学中山医学院微生物教研室袁广东广州 510180 冤

**摘要**目的 探讨 M13 微卫星引物 PCR 指纹法用于假丝酵母菌氟康唑耐药性基因分型的可行性遥方法 采用纸片扩散法分析假丝酵母菌氟康唑耐药性袁进一步对 41 株假丝酵母菌进行 M13 引物 PCR 指纹分析袁采用 RAPD200 软件邻接法渊neighbour joining 冤NJ 聚类分析电泳带型模式遥结果 41 例主要从痰液和阴道分泌物中分离的假丝酵母菌标本中袁氟康唑药物敏感 11 株(26.8%)袁依赖 8 例(19.5%)袁耐药 22 例(53.7%)袁CR 指纹分析至少可检测到 12 种不同的条带袁条带数目从 2 条到 12 条不等袁电泳带型模式与感染部位和氟康唑药物反应性有关遥结论 假丝酵母菌氟康唑耐药性菌株所占比例较大袁M13 微卫星引物 PCR 指纹法可用于假丝酵母菌的分子流行病学调查和氟康唑耐药性基因分型遥

**关键词**假丝酵母菌 PCR 指纹 氟康唑耐药

中图分类号 院789 文献标识码 院 文章编号 院000-2588(2003)12-1303-04

## Fluconazole resistance in *Candida albicans* assayed by PCR fingerprinting with M13 primer

WANG Ying-bin<sup>1,2</sup>, WANG Hong<sup>1</sup>, GUO Hui-yu<sup>2</sup>, ZHAO Yong-zhong<sup>1</sup>, LUO Shen-qi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Cell Biology, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China; <sup>2</sup>Department of Microbiology, Medical School of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510180, China

**Abstract:** Objective To understand the molecular and genetic mechanism underlying fluconazole resistance in *Candida albicans* by PCR fingerprinting with M13 primer. Methods Paper disc diffusion method was employed for assay of fluconazole resistance in 41 clinical isolates of *Candida albicans*, followed by PCR fingerprinting with M13 primer to study the gel patterns with cluster analysis using neighbor joining (NJ) method performed with RAPD200 software. Results Of the 41 clinical isolates, 11 strains (26.8%) were fluconazole-sensitive, 8 (19.5%) fluconazole-dependent and 22 (53.7%) fluconazole-resistance. Two to twelve bands could be observed among these strains, and the gel patterns revealed by cluster analysis were associated with the reactions of the strains against fluconazole and the location of infection. Conclusion There is high prevalence of fluconazole resistance in clinical *Candida albicans* isolates, and PCR fingerprinting with M13 primer is convenient for assay of fluconazole resistance and molecular epidemiological study of *Candida albicans*.

**Key words:** *Candida albicans*; PCR fingerprinting; fluconazole drug resistance

随着真菌感染患者的增多及抗真菌药物应用的频繁袁真菌耐药现象也越来越普遍遥在耐药真菌中袁最常见的致病真菌为假丝酵母菌 *Candida albicans* 袁而假丝酵母菌氟康唑耐药性袁为最常见的真菌耐药现象遥但假丝酵母菌氟康唑耐药性的微生物遗传机理仍不明遥遥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袁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袁然后应用 M13 引物进行 PCR 指纹分析袁最后应用 RAPD200 软件进行邻接法渊neighbour joining, NJ 冤聚类分析袁报告如下遥

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验菌株

临床菌株共 41 株袁系 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渊a-01~Va-08 冤尧尿渊-01 冤尧痰渊-01~S-27 冤尧血渊-01 冤尧胃液渊t-01 冤尧中心动脉管渊-01 冤尧脓渊-01 冤尧脑脊液渊f-01 冤等标本中分离袁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遥

#### 1.2 实验材料

引物 M13 袁'-GAGGGTGGCGGTTCT-3' 购自上海博亚生物技术有限公司袁ensi-disc<sup>TM</sup> 试剂盒购自美国 BD 公司袁CR 试剂盒尧琼脂糖尧 Marker 均购自大连宝生物工程公司袁氯化苄购自上海凌峰化学试剂有限公司袁琼脂尧 Nase 尧 DS 尧 ris 均购自 Sigma 公司袁蛋白胨和酵母提取液购自 Oxoid 公司袁重蒸苯酚购自第一军医大学化学教研室袁其它试剂均为国产分析纯遥

#### 1.3 主要仪器

PE480 热循环仪袁高速冷冻离心机渊ORVALL RC5C Plus 冤尧凝胶图象分析仪渊YNGENE 冤尧 IV-1601

收稿日期 院003-04-13

作者简介 院王应斌 渊963- 冤男 袁副教授 袁主任医师 袁中山大学微生物教研室在读博士研究生 袁E-mail: wangybgz@163.net

型紫外分光光度计 HIMADZU

1.4 酵母菌纸片扩散法敏感实验

按试剂盒说明书进行... 挑取大约 5 个菌落至 5 ml 生理盐水中... 将 25 滴/片氟康唑... 培养 18~24 h... 测量抑菌环直径... 质控允许范围为 28~39 mm...

1.5 假丝酵母菌 DNA 制备

假丝酵母菌基因组 DNA 的抽提... 代替了昂贵的细胞壁溶解酶... 提取液... 0.1 mol/L Tris-HCl... 0.04 mol/L EDTA... 10% SDS... 400 滴... 50 滴 TE... 0 mmol/L Tris-HCl... 7.4 mmol/L EDTA... 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 滴 DNA/ml 为标准... 估算 DNA 含量... 将提取的 DNA 配制成 50 滴/ml...

1.6 PCR 指纹法

参考 Xu 等... 总反应总体积... 00 ng 基因组 DNA... 5mmol/L dNTP 混合液... 4 滴... 伊 CR 缓冲溶液 12.5 滴... 聚合酶 1.25 U... M13 引物 0.25 滴... 00 pmol/ 滴... 蒸馏水补至总反应体积 25 滴... 0 滴矿物油覆盖... 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 益 3 min 预变性... 然后进入热循环... 4 益变性 30 s... 0 益退火 1 min... 2 益延伸 1 min... 共 40 个循环... 最后 72 益 5 min 延伸... 10 滴 PCR 产物于 1.2% 琼脂糖凝胶电泳... 溴化乙啶染色... L-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... 株痰... 株脓... 株尿... 1 例为依赖... 株痰... 株中心动脉管... 2 例表现为耐药... 2 株痰... 株脑脊液... 株白带... 株血... 如表 1 所示... 值得一提的是... 1 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

Table with 3 columns: Results, Cases(%), Meandiameter(mm). Rows: Sensitive (11, 26.8%, 33.63), Dependent (8, 19.5%, 16.37), Resistant (22, 53.7%, 6.90).

2.2 M13 PCR 指纹结果

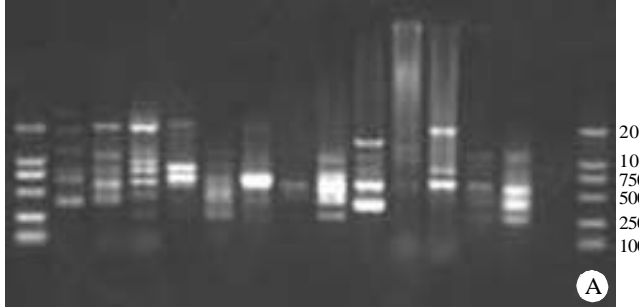
如图 1 中的 A 和 C 所示... 应用 M13 引物 PCR 指纹法... 在痰液和阴道分泌物为主要来源的 41 例标本中... 条带数目从 2 条到 12 条不等... 大小介于 250 bp 到 2 000 bp 之间... 结合感染部位和和纸片扩散法药敏实验鉴定结果可知... 大部分样品在 520 bp 左右存在典型带... 其中 8 株依赖株全有... 大部分样品在 2 000 bp 左右有特征带... 而阴道炎只有 1 株有... 可见电泳模式... el pattern... 与感染部位和氟康唑药物反应性有关...

图 2 所示为应用 RAPD200 聚类分析结果... J 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... 1 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... 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... /a-04... Va-05... /a-08... /a-01... /a-07... 为一类... 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... 1 例敏感... 例依赖... 1 例耐药... 其中 S-05... 敏感... S-13... 耐药... S-04... 依赖... S-12... 依赖... S-07... 耐药... 带型类似... 提示可能来源于

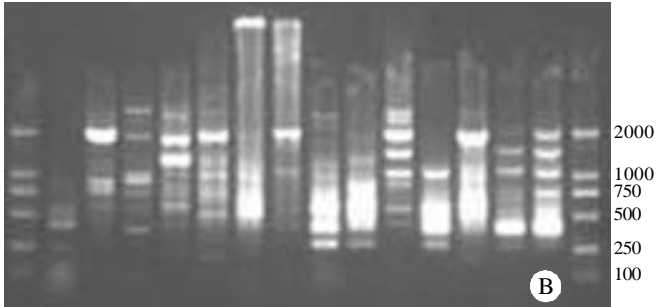
同一菌株但因耐药情况分布无规律,另外 S-09、S-18、S-19 和 S-08 归为一类,情况与之类似,这提示部分肺部感染的菌株同一起来源,因标本取自同一医院,提示院内感染的可能性,从其他部位分离的 7 例标本 3 例敏感,例依赖,例耐药,分别属于不同的类别,因这些标本多取自动脉或静脉插管,提示感

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。

M Va-4S-24S-23S-28S-27Va-8 Va-7Va-6 Va-5 S-22 Bf-01 S-21 S-20CM bp



M B-01S-15S-14S-13S-12S-11S-10S-09S-08S-07S-16S-17S-18S-19 M bp



M S-06S-05S-04S-03S-02S-01Va-3Va-2Va-1P-01U-01B-01A-01St-01 M bp

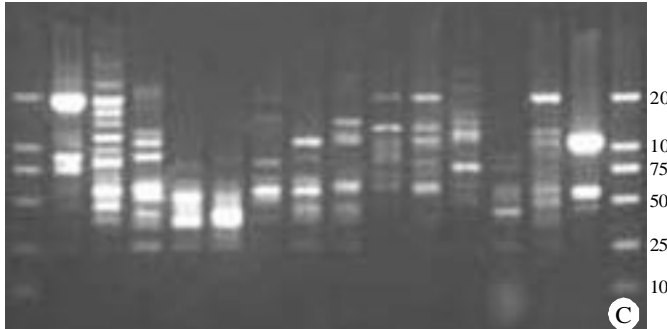


图 1 M13 PCR 指纹法分析假丝酵母菌  
Fig.1 PCR fingerprinting analysis of the clinical isolates of *Candida albicans*

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

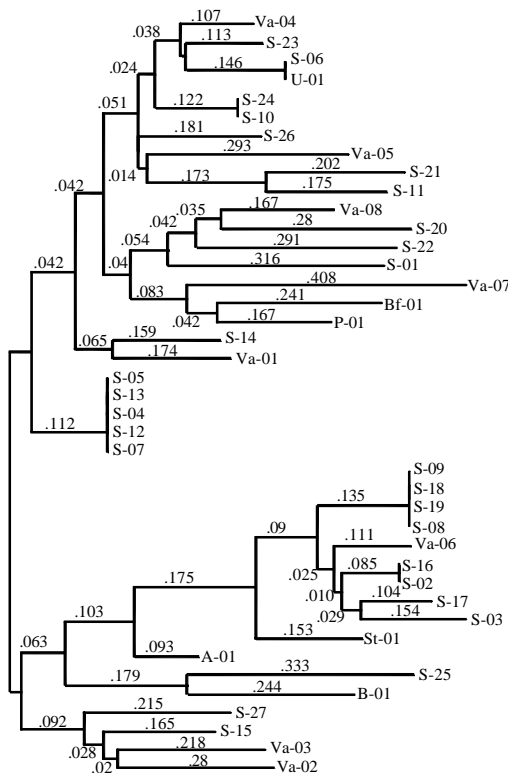


图 2 RAPD200 软件邻接法聚类结果

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。假丝酵母菌肺感染最近备受重视,其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 (CYP51A) 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,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,这些技术对鉴定菌株间差异具有一定意义,实验方法繁琐,耗时,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<sup>1</sup>遥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遥

PCR 指纹技术能迅速扩增未知序列靶细胞基因组片段<sup>2</sup>获得大量多态性信息<sup>3</sup>目前被广泛用于生物分类鉴定<sup>4</sup>临床标本诊断<sup>5</sup>基因定位<sup>6</sup>谱系分析<sup>7</sup>多态性分析和流行病学调查等多个领域遥作者应用 PCR 指纹技术研究假丝酵母菌耐药性与基因型关系<sup>8</sup>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遥

参考文献

咱暂 Bossche HV, Marichal P, Odds FC. Molecular mechanisms of drug resistance in fungi咱暂 Trends Microbiol, 1994, 2: 393-400.  
 咱暂 Bossche HV. Mechanisms of antifungal resistance咱暂 Rev Iberoam Micol, 1997, 14(1): 44-9.  
 咱暂 Pfaller MA, Lockhart SR, Pujol C, et al. Hospital specificity, region specificity, and fluconazole resistance of candida albicans bloodstream isolates咱暂 J Clin Microbiol, 1998, 36(6): 1518-29.  
 咱暂 Tamura M, Watanabe K, Mikami Y, et al. Molecular characteri-

zation of new clinical isolates of Candida albicans and C. dubliniensis in japan: analysis reveals a new genotype of C. albicans with group iintron咱暂 J Clin Microbiol, 2001, 39: 4309-15.  
 咱暂 McCullough MJ, Clemons KV, Stevens DA. Molecular and phenotypic characterization of genotypic Candida albicans subgroups and comparison with Candida dubliniensis and Candida stellatoidea 咱暂 J Clin Microbiol, 1997, 37: 417-21.  
 咱暂 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.  
 咱暂 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咱暂 Clin Lab, 2000, 46(7-8): 345-54.  
 咱暂 Franz R, Kelly SL, Lamb DC, et al. Multiple molecular mechanisms contribute to a stepwise development of fluconazole resistance in clinical candida albicans strains咱暂 Antimicrob Agents Chemother, 1998, 42: 3065-72.  
 咱暂 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咱暂 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咱暂 Chin Hosp Infec J, 2002, 12(11): 863-4.

渊 接 1302 页

本组 2 例研究的初步结果显示<sup>1</sup>尽管在外周干细胞动员前多次检查染色体和 I-FISH 检测 bcr/abl 融合基因阴性<sup>2</sup>但在移植后仍有复发<sup>3</sup>分析其主要原因仍然是残留白血病细胞所致遥本研究 CD34<sup>+</sup> 细胞纯化前后的结果显示<sup>4</sup>纯化后的 CD34<sup>+</sup> 细胞 I-FISH 检测 bcr/abl 融合基因平均阳性率比纯化前和动员前明显增高<sup>5</sup>2.5% 5% 遥<sup>6</sup>进一步证明 CD34<sup>+</sup> 造血干细胞含有 Ph 阳性克隆的成份<sup>7</sup>是慢性粒细胞白血病多系受累的关键机制遥此类细胞处于非增殖期<sup>8</sup>对放疗不敏感<sup>9</sup>难以清除<sup>10</sup>常常是白血病复发的根源遥又因 Ph 阳性细胞含量少<sup>11</sup>用染色体和 I-FISH 技术检测不敏感<sup>12</sup>通过动员富集 CD34<sup>+</sup> 细胞能够提高其检出率<sup>13</sup>但技术过程复杂<sup>14</sup>用于前瞻性诊断还不实际遥应用定量 PCR 技术检测 bcr/abl 融合基因能够提高敏感性<sup>15</sup>有助于指导选择进行自体干细胞移植的最佳时机遥格列卫对造血干细胞生物学行为的影响还在研究中<sup>16</sup>其对干细胞移植后造血重建的影响研究报告较少<sup>17</sup>本研究的初步结果显示<sup>18</sup>用格列卫治疗半年左右时进行外周血干细胞动员的效率及其在移植后造血重建时间均无影响<sup>19</sup>格列卫治疗后的患者可以按常规方法进行干细胞移植治疗遥

咱暂 杜庆锋, 周淑芸, 刘晓力, 等. 应用间期荧光原位杂交技术检测慢性髓系白血病患者肿瘤负荷咱暂 癌症, 2003, 22(6): 612-5.  
 Du QF, Zhou SY, Liu XL, et al. Application of interphase fluorescence in situ hybridization for determination of the tumor load in chronic myeloid leukemia咱暂 Chin J Cancer, 2003, 22(6): 612-5.  
 咱暂 林 芸, 孟凡义, 杨 艺, 等. 免疫磁珠纯化小鼠 CD34<sup>+</sup> 造血干细胞咱暂 第一军医大学学报, 2001, 21(12): 908-11.  
 Lin Y, Meng FY, Yang Yi, et al. Purification of murine CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cells using immunomagnetic beads 咱暂 J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2001, 21(12): 908-11.  
 咱暂 刘启发, 周淑芸, 伍柏松, 等. 激活骨髓自体移植治疗白血病和淋巴瘤的疗效分析咱暂 中华内科杂志, 2000, 39(8): 524.  
 Liu QF, Zhou SY, Wu BS, et al. Autologous transplantation with recombinant interleukin-2 activated bone marrow for leukemia and lymphoma: an analysis of factors influencing the effect咱暂 Chin J Intern Med, 2003, 39(8): 524.  
 咱暂 Kantarjian HM, Cortes JEO, Brien S, et al. Imatinib mesylate therapy in newly diagnosed patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia: high incidence of early complete and major cytogenetic response咱暂 Blood, 2003, 101(1): 97-100.  
 孟凡义, 郑维扬, 刘晓力, 等. ST1 571 治疗慢性粒细胞白血病的初步观察咱暂 第一军医大学学报, 2001, 21(12): 908-11.  
 Meng FY, Zheng WY, Liu XL, et al. ST1 571 for treating 19 patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia 咱暂 J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2001, 21(12): 908-11.

责任编辑 段咏慧

参考文献