

· 临床研究 ·

30 例复发性外阴阴道念珠菌病患者致病菌株分析*

高飞¹, 曹萍^{1△}, 吴颖¹, 董跃兰², 霍克克³, 王亚倩³

(1. 云南省第一人民医院皮肤科, 云南昆明 650032; 2. 云南省第一人民医院妇科, 云南昆明 650032; 3. 复旦大学生命科学院, 上海 200433)

摘要:目的 探讨复发性外阴阴道念珠菌病(RVVC)患者阴道和肛管念珠菌的异同。方法 收集 30 例 RVVC 患者阴道和肛管的菌株, 三色荧光分别标记保守基因 CDC3、EF3 和 HIS3 微卫星序列引物, PCR 扩增, 产物行聚丙烯酰胺凝胶电泳。Gene Scan 软件扫描获取片段精确长度, Genotype 软件基因分型。结果 30 例患者中, 有 17 例患者阴道和肛管的菌株为白色念珠菌, 且基因型彼此相同。结论 RVVC 患者阴道的菌株可能从肛管移行而来, 这可能是导致该病反复发作的重要因素之一。

关键词: 念珠菌病, 外阴阴道; 基因型; 微卫星

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.13.009

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)13-1466-02

Analysis of pathogenic strains isolated from 30 cases of RVVC*

Gao Fei¹, Cao Ping^{1△}, Wu Ying¹, Dong Yuelan², Huo Keke³, Wang Yaqian³

(1. Department of Dermatology, Yunnan Provincial First People's Hospital, Kunming, Yunnan 650032, China; 2. Department of Gynecology, Yunnan Provincial First People's Hospital, Kunming, Yunnan 650032, China; 3. Life Science College, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Objective To compare the genotypes of candida strains isolated from the vagina and anal tube in the patients with recurrent vulvovaginal candidiasis (RVVC). Methods Candida stains isolated from the vagina and anal tube in 30 cases of RVVC were collected. The 3-color fluorescence was adopted to label the conservative gene CDC3, EF3 and HIS3 microsatellite sequence primers for amplification by PCR. Then, the PCR products were performed the electrophoresis by polyacrylamide gel, the sizes of products were read with GeneScan software and followed by genotyping with Genotyper software. Results Among 30 cases, 17 strains in vagina and anal tube were candida albicans with same genotype each other. Conclusion For the patient with RVVC, the bacterial strains can migrate from anal tube to vagina, which might be one of important factors causing disease recurrence.

Key words: candidiasis, vulvovaginal; genotype; microsatellite

复发性外阴阴道念珠菌病(RVVC)是顽固难治的疾病之一, 主要致病菌是白色念珠菌, 少数为非白色念珠菌。导致 RVVC 复发的危险因素较多。阴道与肛管的解剖位置临近, 可能发生同一致病菌株在二者间移行, 这可能是造成该病反复发作的重要因素之一。本研究借鉴已经建立的白色念珠菌基因分型方法, 以白色念珠菌 3 个保守基因 CDC3、EF3 和 HIS3 的微卫星序列多态性为分型标记, 结合聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE), 对阴道和肛管的白色念珠菌进行基因分型, 分析两处来源的菌株是否相同, 探讨肠道菌库理论的合理性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2007 年 10 月至 2010 年 10 月在云南省第一人民医院妇科门诊就诊的女性 RVVC 患者 30 例, 年龄 20~50 岁, 平均 33.5 岁; 病程 1~11 年, 平均 3.6 年。入选标准: 具有典型临床症状, 近一年发作 4 次或 4 次以上; 真菌镜检有假菌丝, 真菌培养可见奶酪状菌落; 患者在院外至少接受了 1 次治疗, 包括系统抗真菌药物和(或)外用抗真菌药物, 无效。排除标准: 有自身免疫性或免疫缺陷疾病者; 妊娠或合并其他生殖器感染性疾病者; 有特殊药物和食物服用史者; 1 周内阴道给药和阴道灌洗者; 2 周内接受抗生素和抗真菌治疗(包括系统用药和外用药)。

1.2 方法

1.2.1 实验菌株取材方法 外阴和肛管(齿线以下)消毒后将

无菌生理盐水浸湿的棉拭子留置 30 s, 棉拭子取材后接种到含氯霉素的沙氏培养基上, 分离纯化得到菌株。白色念珠菌标准株由中国医学科学院皮肤病研究所真菌科惠赠。

1.2.2 鉴别白色念珠菌的 PCR 在每个菌株长出的单菌落中随机挑取 3 个, 参照文献[1-2]应用白色念珠菌特异性引物进行煮菌 PCR, 能扩增出 257 bp 片段的菌株为白色念珠菌, 继续进行下一步实验。不能扩增出 257 bp 片段的菌株为非白色念珠菌, 终止实验。

1.2.3 荧光引物 PCR 扩增 玻璃珠法抽提各酵母菌标准株基因组 DNA 作为 PCR 模板备用, 参照文献[3], 由 Invitrogen 英潍捷基(上海)贸易有限公司合成 CDC3、EF3 和 HIS 基因位点微卫星序列引物, 并于各位点上游引物 5' 端标记不同显色的荧光(表 1)。以荧光引物扩增三位点微卫星序列, 目标 DNA 片段为 100~400 bp。20 μL PCR 体系: 10×PCR 缓冲液(加 Mg²⁺) 2.5 μL, 三磷酸脱氧核糖核苷(dNTP, 10 mmol/L) 0.4 μL, 引物(20 μmol/L)各 2.0 μL, Taq 酶(5 U/μL) 0.2 μL, DNA 模板 2.5 μL, ddH₂O 平衡至 20 μL。94 °C 预变性 10 min; 94 °C 变性 30 s, 53 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 30 s, 共 30 个循环; 最后 72 °C 再延伸 7 min, 4 °C 保温。取 10 μL PCR 产物于 1.0% 琼脂糖凝胶中 150 V 电泳 20 min, 紫外灯下观察。

1.2.4 PAGE 及基因分型 参照文献[4-5], 将 3 个基因位点的 PCR 产物混合, 取 0.1 μL 扩增产物与 GeneScan 500 LIZ 相

* 基金项目: 云南省科技厅应用基础研究计划资助项目(2009ZC161M)。 作者简介: 高飞(1973~), 主治医师, 硕士研究生, 主要从事皮肤病与性病学及医学真菌学研究。 △ 通讯作者, Tel: (0871)63638787; E-mail: kmcp62@163.com。

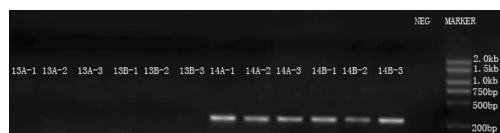
表 1 白色念珠菌 3 保守基因微卫星序列及 PCR 荧光引物

位点(基因库代码)	染色体	引物	荧光(颜色)
CDC3(Z25869)	1	5'-CAG ATG ATT TTT TGT ATG AGA AGA A-3'	FAM(蓝)
		5'-CAG TCA CAA GAT TAA AAT GTT CAA G-3'	
EF3(Z11484)	5	5'-TTT CCT CTT CCT TTC ATA TAG AA-3'	TET(黑)
		5'-GGA TTC ACT AGC AGC AGA CA-3'	
HIS3(AF006605)	3	5'-TGG CAA AAA TGA TAT TCC AA-3'	HEX(绿)
		5'-TAC ACT ATG CCC CAA ACA CA-3'	

对分子质量标准混合,95 °C 预热 5 min,基因分析仪 ABI Prism3700 Genetic Analyzer 上 1 200 V 电泳 1.5 h。GeneScan Analysis 3.7 软件进行数据收集、泳道线矫正、迁移片段大小测量,Genotype 3.7 软件进行基因分型。蓝、黑和绿色荧光扩增峰分别对应于 CDC3、EF3 和 HIS3 基因位点扩增产物。单峰为纯合子,双峰为杂合子。

2 结 果

2.1 PCR 鉴别白色念珠菌的情况 以部分菌株为例,13A-1、13A-2、13A-3 表示菌株 13A 的 3 个菌落,均未扩增出 257 bp 片段,属于非白色念珠菌。14A-1、14A-2、14A-3 表示菌株 14A 的 3 个菌落,均能扩增出 257 bp 片段,确定为白色念珠菌。见图 1。



13A-1~13B-3:非白色念珠菌;14A-1~14B-3:白色念珠菌。

图 1 白色念珠菌特异引物扩增后电泳图

2.2 菌株及基因分型情况 30 例患者中,有 18 例阴道和肛管的菌株均为白色念珠菌,其中有 17 例阴道和肛管的菌株基因型彼此相同,1 例的菌株基因型彼此不同;有 1 例患者阴道菌株为白色念珠菌,肛管菌株为非白色念珠菌;1 例患者肛管菌株为白色念珠菌,阴道菌株为非白色念珠菌;10 例患者阴道和肛管菌株均为非白色念珠菌。从 17 例白色念珠菌患者中分离得到的 34 株白色念珠菌的基因型出现频率,见表 2。

表 2 34 株白色念珠菌的基因型出现频率

CDC3	EF3	HIS3	菌株(n)
115:123	120:129	158:202	12
115:123	120:129	158:198	8
115:123	120:129	158:210	4
115:123	120:129	158:455	4
115:119	130:133	345:357	2
115:123	120:129	158:204	2
119:119	124:127	150:150	2

3 讨 论

RVVC 的反复发作给患者造成长期的身心痛苦,也是困扰临床治疗的难题。RVVC 的复发究竟是原来菌株“再燃”还是感染新菌株一直是国内外研究热点。本研究试图探讨肠道菌库因素对该病复发的影响。余晓东等[6]采用特异性片段扩增和限制性片段长度多态性(RFLP)两种种类分型方法,结果显示同一患者在多部位念珠菌感染时只含有一种基因型。有

研究采用随机扩增 DNA 多态性(RAPD)的方法,研究了 24 例外阴道念珠菌病(VVC)患者复发前后菌株的异同,结果显示半数以上患者复发前、后的菌株基因型完全相同,提示 VVC 的再次发作是由于原感染菌株的“再燃”[7-10]。有研究运用 PCR 扩增 25S rDNA 片段比较后发现,同一患者阴道及肠道念珠菌基因型基本相似[11-13]。

依据保守基因 CDC3、EF3、HIS3 具备微卫星特点[4-5],采用 6-羧基荧光素(FAM)、四氯荧光素(TET)、六氯荧光素(HEX)等荧光素标记的引物扩增出特异长度的片段,对二倍体的白色念珠菌进行基因分型。结果发现,半数以上的 RVVC 患者,其阴道及肛管念珠菌基因型彼此相同。白色念珠菌作为最常见的条件致病菌,可栖生在阴道、肛管等处。系统或局部抗真菌治疗,常常只能清除阴道的白色念珠菌,但无法清除肛管和直肠内的白色念珠菌,有研究者称其为肠道菌库[14-15]。治疗结束后,由于二者解剖位置临近,菌株逐渐又从肛管移行到阴道并定植,导致症状再次发作。本研究认为 RVVC 的再次发作是原来菌株“再燃”,而非感染新菌株。对于 RVVC 患者的治疗,既要考虑致病菌(念珠菌)方面,也要考虑宿主(患者)方面。仅仅采用抗真菌治疗可能并不完善,而提高患者的系统免疫力和阴道局部免疫力,防止肛管移行来的菌株在阴道定植,也可能成为治疗的重要措施。

(志谢:感谢中国医学科学院皮肤病研究所真菌科刘维达教授,沈永年、吕桂霞老师对本实验的支持和指导。)

参考文献:

[1] 刘军,刘维达. 聚合酶链反应检测深部致病真菌的实验研究[J]. 中华皮肤科杂志,2005,38(8):42-44.
 [2] Sandhu GS, Kline BC, Stockman L, et al. Molecular probes for diagnosis of fungal infections[J]. J Clin Microbiol, 1995,33(11):2913-2919.
 [3] Botterel F, Desterke C, Costa C, et al. Analysis of micro-satellite markers of Candida albicans used for rapid typing[J]. J Clin Microbiol, 2001,39(11):4076-4081.
 [4] 梅兴宇,施伟民,霍克克,等. 71 株白色念珠菌临床分离株微卫星基因分型[J]. 中华传染病杂志,2007,25(2):86-90.
 [5] 梅兴宇,施伟民,霍克克,等. 白色念珠菌三重保守基因微卫星快速分型[J]. 同济大学学报:医学版,2005,26(6):83-86.
 [6] 余晓东,王学军,符美华,等. 皮肤念珠菌病患者多部位分离菌株 DNA 分型研究[J]. 中华皮肤科杂志,2007,40(8):479-481.
 [7] 廉翠红,张书岭,梅红兵,等. 外阴阴道念珠菌病复发前后分离菌株基因型分析[J]. 中华皮肤科(下转第 1470 页)

断,为临床提供更准确的诊断依据。

参考文献:

- [1] Lee SW, Choi HY, Baek SY, et al. Role of color and power doppler imaging in differentiating between malignant and benign solid breast masses[J]. *J Clin Ultrasound*, 2002, 30(8):459-464.
- [2] Ozdemir A, Ozdemir H, Maral I, et al. Differential diagnosis of solid breast lesions; contribution of Doppler studies to mammography and gray scale imaging[J]. *J Ultrasound Med*, 2001, 20(10):1091-1101.
- [3] 何金. 小乳癌彩超诊断的初步探讨[J]. *临床超声医学杂志*, 2005, 7(4):242-244.
- [4] 张蒂荣, 鲁树坤, 王双双, 等. 乳腺肿块的彩色多普勒血流频谱形态与病理对照研究[J]. *中华超声影像学杂志*, 2004, 13(6):439-441.
- [5] 王迎, 陈小燕. 小乳癌高频声像图及血流显像分析[J]. *临床和实验医学杂志*, 2009, 8(1):57-58.
- [6] 赵峰, 邢虎, 张歆, 等. 高频超声对乳腺肿瘤内部微钙化灶的敏感度和特异度的研究[J]. *中国实验诊断学*, 2009, 13(1):75-76.
- [7] 颜玮, 冯炎, 马方, 等. 灰阶超声、彩色多普勒超声在早期乳腺癌诊断的应用价值[J]. *同济大学学报:医学版*, 2007, 28(3):52-54, 85.
- [8] Thitaikumar A, Ophir J. Effect of lesion boundary conditions on axial strain elastograms; a parametric study[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2007, 33(9):1463-1467.
- [9] Thomas A, Kümmel S, Fritzsche F, et al. Real-time sonoelastography performed in addition to B-mode ultrasound and mammography; improved differentiation of breast lesions[J]. *Acad Radiol*, 2006, 13(12):1496-1504.
- [10] 富丽娜, 王怡, 王涌. 超声弹性成像与常规超声联合应用在乳腺病灶良恶性鉴别上的价值[J]. *中国医学计算机成像杂志*, 2007, 13(2):124-126.
- [11] 庄承成, 肖莹. 超声弹性成像与钼靶 X 线成像对乳腺病灶临床诊断价值的比较[J]. *中南大学学报:医学版*, 2009, 34(1):67-71.
- [12] Zhi H, Ou B, Luo BM, et al. Comparison of ultrasound elastography, mammography, and sonography in the diagnosis of solid breast lesions[J]. *J Ultrasound Med*, 2007, 26(6):807-815.
- [13] 朱庆莉, 姜玉新, 刘赫, 等. 超声弹性成像与常规超声的病灶测值变化对乳腺病变的诊断价值[J]. *中华超声影像学杂志*, 2008, 17(6):508-512.
- [14] 范晓芳, 丁勇俊, 王卫理, 等. 实时组织弹性成像结合彩色多普勒超声诊断乳腺肿瘤的研究[J]. *徐州医学院学报*, 2009, 29(11):763-765.
- [15] 罗葆明, 曾婕, 欧冰, 等. 乳腺超声弹性成像检查感兴趣区域大小对诊断结果影响[J]. *中国医学影像技术*, 2007, 23(9):1330-1332.
- [16] Itoh A, Ueno E, Tohno E, et al. Breast disease: clinical application of US elastography for diagnosis[J]. *Radiology*, 2006, 239(2):341-350.
- [17] 刘洪军, 马新群, 陈建. 超声弹性成像对乳腺实性肿瘤的诊断价值探讨[J]. *实用临床医药杂志*, 2009, 13(23):149-150.
- [18] Giuseppetti GM, Martegani A, Di Cioccio B, et al. Elastosonography in the diagnosis of the nodular breast lesions; preliminary report[J]. *Radiol Med*, 2005, 110(1/2):69-76.
- [19] 张秀芳, 刘学明, 鲍晓峰, 等. 实时组织弹性成像在乳腺肿瘤诊断中的应用[J]. *浙江大学学报:医学版*, 2006, 35(4):444-447.
- [20] Righetti R, Ophir J, Ktonas P. Axial resolution in elastography[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2002, 28(1):101-113.
- (收稿日期:2012-09-08 修回日期:2012-12-22)
- (上接第 1467 页)
- 杂志, 2008, 41(2):94-96.
- [8] 廉翠红, 张正华, 赵敬军, 等. 外阴阴道念珠菌病患者临床分离菌株的菌种及基因型分析[J]. *中华皮肤科杂志*, 2004, 37(1):48-50.
- [9] Lockhart SR, Reed BD, Pierson CL, et al. Most frequent scenario for recurrent *Candida* vaginitis is strain maintenance with "substrain shuffling": demonstration by sequential DNA fingerprinting with probes Ca3, C1, and CARE2[J]. *J Clin Microbiol*, 1996, 34(4):767-777.
- [10] Maffei CM, Paula CR, Mazzocato TS, et al. Phenotype and genotype of *Candida albicans* strains isolated from pregnant women with recurrent vaginitis[J]. *Mycopathologia*, 1997, 137(2):87-94.
- [11] 朱晓芳, 汪清, 章强强, 等. 念珠菌性外阴阴道炎患者身体不同部位白色念珠菌基因型研究[J]. *中华皮肤科杂志*, 2003, 36(8):27-29.
- [12] 朱晓芳, 董乃俊, 陈菲菲, 等. 阴道念珠菌病患者与性伴侣白色念珠菌分离株基因相似性分析[J]. *扬州大学学报:农业与生命科学版*, 2008, 29(3):51-54.
- [13] 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*, 1999, 37(2):417-421.
- [14] Sampaio P, Gusmão L, Alves C, et al. Highly polymorphic microsatellite for identification of *Candida albicans* strains[J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(2):552-557.
- [15] Ferrer J. Vaginal candidosis; epidemiological and etiological factors[J]. *Int J Gynaecol Obstet*, 2000, 71 Suppl 1: S21-27.
- (收稿日期:2012-10-28 修回日期:2013-01-12)