

真菌性阴道炎患者的假丝酵母菌感染及耐药性研究

杨 柳,李鹏宇,王 智(武警北京总队医院检验科,北京 100027)

【摘要】 目的 探讨真菌性阴道炎假丝酵母菌的感染及其耐药性。**方法** 选取 2011 年 11 月至 2014 年 12 月该院 128 例真菌性阴道炎患者,分离其阴道分泌物中的假丝酵母菌并进行耐药性检测;采用实时定量-聚合酶链式反应(RT-PCR)检测和比较咪康唑敏感株、中介株和耐药株的多药耐药基因 MDR1、FLU1、CDR1 的表达水平。**结果** 128 例患者共分离出 132 株(6 种),84 例(63.64%)检测出假丝酵母菌,4 例(3.13%)患者有 2 种菌株的重叠感染。特比萘芬的耐药率为 44.70%,制霉菌素的耐药率为 0.00%,敏感率为 96.21%。3 组菌株的 MDR1 和 FLU1 表达水平差异有统计学意义($P<0.05$);但 CDR1 表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 真菌性阴道炎的假丝酵母菌感染呈现复杂化趋势,临床应根据患者具体情况选择抗菌药物。

【关键词】 真菌性阴道炎; 假丝酵母菌; 耐药性
DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.12.028 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)12-1730-03

The infection and drug-resistance of Candidas in patients with colpitismycotica YANG Liu, LI Peng-yu, WANG Zhi (Department of Clinical Laboratories, Armed Police Beijing Corps Hospital, Beijing 100027, China)

【Abstract】 Objective To analyze the infection and drug-resistance of Candidasin patients with colpitis mycotica. **Methods** From November 2011 to October 2014, 128 patients with colpitismycotica were chosen as study objects. The candidas in vaginal fluid of patients were isolated, and the expression level of MDR1, FLU1 and CDR1 were compared among miconazole-sensitive, miconazole-medium and miconazole-resistant strains. **Results** In 128 patients, 4 patients(3.13%) were infected with two kinds of Candidas, and 132 strains (6 kinds) were isolated and 84 strains (63.64%) were Candida albicans. The resistant rate of terbinafine was 44.70%; the resistant rate of naystatin was 0.00% and its sensitive rate was 96.21%. The expression level of MDR1, FLU1 had statistical difference among miconazole-sensitive, miconazole-medium and miconazole-resistant strains ($P<0.05$), and that of CDR1 had no statistical difference($P>0.05$). **Conclusion** The infection of Candidas in patients with colpitis has become more complexing, and the use of antifungals should be chosen according to condition of patients.

【Key words】 colpitismycotica; Candidas; drug-resistance

真菌性阴道炎是由假丝酵母菌(又称白色念珠菌)感染引起的外阴阴道炎性^[1]。随着广谱抗菌药物、激素、化疗药物等的大量应用,真菌性阴道炎的发病率逐渐升高^[2]。同时,感染菌株的变化和耐药细菌的出现对其治疗带来困难^[3]。现通过分析 128 例真菌性阴道炎患者的假丝酵母菌感染情况及其耐药性,为临床提供实验室数据。报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2011 年 11 月至 2014 年 12 月该院妇产科收治的 128 例真菌性阴道炎患者,年龄 19~61 岁,平均年龄(39.5±13.9)岁。本研究经过伦理委员会审批和患者知情同意。

1.2 标本采集 严格按照妇科检查的操作规范采集患者阴道后穹窿分泌物,消毒患者外阴,使用消毒的窥阴器扩张患者阴道,将专用的 11093461 号无菌棉拭子(深圳市华晨阳科技有限公司)经阴道置于后穹窿,采集分泌物后于无菌试管中,标记送检。

1.3 病原菌检测及耐药性分析 将标本接种于 TTC-沙保罗琼脂培养基(天津市金章科技发展有限公司)上培养,35℃5%的 CO₂ 恒温箱中培养 24~48 h,对可疑菌株进行快速革兰染色(上海远慕生物科技有限公司)并镜检。分离并纯化可疑菌株,采用 VITEK-23 系统(法国梅里埃生物公司)进行鉴定。

药敏试验采用 ROSCO 抗真菌纸片扩散法进行,操作严格按照 CLSL 的标准进行药敏试验结果判断标准^[4]。待检药物包括特比萘芬、咪康唑、克霉唑、氟康唑、伊曲康唑、制霉菌素。见表 1。

表 1 药敏试验结果抑菌圈判断标准(mm)			
抗菌药物	敏感	中介	耐药
特比萘芬	—	—	—
咪康唑	—	—	—
克霉唑	—	—	—
氟康唑	≥20	12~19	≤11
伊曲康唑	—	—	—
制霉菌素	≥15	9~14	≤9

注:—表示无数据。

1.4 耐药基因表达水平 采用实时定量-聚合酶链式反应(RT-PCR)检测耐药基因表达水平,根据对咪康唑的耐药性将菌株分为 3 组:敏感组、中介组、耐药组。(1)挑取 TTC-沙保罗琼脂培养基上的单菌落接种于 3 mL 的 YEPD 液体培养基(成都明升生物科技有限公司)中,置于 ZHP-100 恒温振荡培养箱(常州国立研究所)中培养 24 h,35℃,200 r/min。使用 MP

RNA 快速提取试剂盒(上海研卉生物科技有限公司)提取总 RNA,应用 OSE-260 超微量分光光度计[天根生化科技(北京)有限公司]测量并计算 RNA 浓度。(2)DNA 模板 5 μ L,PCR 缓冲液 2 μ L,dNTP 2 μ L,MgCl₂ 2 μ L,引物 1(upward,上海生物工程公司)0.5 μ L,引物 2(downward,上海生物工程公司)0.5 μ L,dH₂O 7.75 μ L,Tag 0.25 μ L,共 20 μ L 配成反应体系。反转录条件:94 $^{\circ}$ C 变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 1 min,5 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min,循环 35 次,72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min,4 $^{\circ}$ C 保存。扩增方法:取 3 μ L 反转产物作为模板,采用 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒(TaKaRa 公司)进行扩增,所有反应均同时使用 3 个复孔,循环 50 次,扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 2 min,然后 95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 10 s。内参选择 miR-16。溶解曲线 Melt curve:65.0~95.0 $^{\circ}$ C,increment 0.5 $^{\circ}$ C for 0.05 min+plate read。采用 Biorad 公司的 CFX 962.1 实时定量 PCR 仪进行检测。Galectin-3 的表达量应用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}表示^[5]。见表 2。

表 2 耐药基因引物序列

目的基因		引物序列(5'~3')
MDR1	upward	ATTATTATATCGCAAGGCTAA
	downward	GGGAATGATAATGTTAATCAA
FLU1	upward	TGGATAGTCCCCGTCATTGG
	downward	GGCAAAAAGTGGGAAAACAGC
CDR1	upward	TGAATTAGTTGCCAAACCTA
	downward	AAACTCAGGCATAATAAGTGC
ACT1	upward	GGCGGTGACGACGGTCCAAGACCTC
	downward	CCGTGTTCAATTGGTATCTCAAGGTC

1.5 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析,计量资料使用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间资料比较应用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 菌种鉴定结果比较 128 例患者中共有 84 例检测出假丝酵母菌,4 例患者存在 2 种菌株的重叠感染,共分离出 6 类假丝酵母菌,共 132 株。见表 3。

表 3 假丝酵母菌检测结果比较

病原菌	株数(n)	构成比(%)
白色假丝酵母菌	84	63.64
光滑假丝酵母菌	19	14.39
热带假丝酵母菌	17	12.88
近平假丝酵母菌	5	3.79
克柔假丝酵母菌	3	2.27
清酒假丝酵母菌	4	3.03
合计	132	100.00

表 4 真菌耐药性结果比较[n(%)]

抗菌药物	耐药	中介	敏感
特比萘芬	59(44.70)	35(27.34)	38(28.79)
咪康唑	24(18.18)	22(16.67)	86(65.15)
克霉唑	9(6.82)	22(16.67)	101(76.52)
氟康唑	5(3.79)	8(6.06)	119(90.15)
伊曲康唑	2(1.51)	15(11.36)	115(87.12)
制霉菌素	0(0.00)	5(3.79)	127(96.21)

2.2 真菌耐药性结果比较 特比萘芬的耐药率最高,制霉菌

素的耐药率最低、敏感率最高。见表 4。
2.3 真菌耐药基因表达水平比较 3 组菌株的 MDR1 和 FLU1 表达水平差异有统计学意义($P<0.05$);但 CDR1 的表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 5。

表 5 真菌耐药基因表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	MDR1	FLU1	CDR1
敏感组	86	0.82 $\pm$ 0.17	1.02 $\pm$ 0.26	1.23 $\pm$ 0.38
中介组	22	1.12 $\pm$ 0.08	1.17 $\pm$ 0.13	1.45 $\pm$ 0.37
耐药组	24	3.11 $\pm$ 0.39	1.97 $\pm$ 0.25	1.82 $\pm$ 0.41
P		<0.05	<0.05	>0.05

3 讨 论

真菌性阴道炎是假丝酵母菌引起的外阴阴道炎性疾病,具有难以根治,容易反复发作的特点。目前,临床抗真菌的有效药物较少,而致病菌种的变迁及耐药菌株的出现给真菌性阴道炎的治疗造成更大的困难^[6]。

本研究 128 例患者中 4 例出现重叠感染,共分离出 132 株菌株,其中 84 株为白色假丝酵母菌,占 63.64%;其次为光滑假丝酵母菌和热带假丝酵母菌,分别为 14.39%和 12.88%。与既往研究相比较,尽管白色假丝酵母菌仍然是真菌性阴道炎最主要的病原菌,但其构成比呈下降趋势^[7];同时,光滑假丝酵母菌和热带假丝酵母菌的检出率增加(均超过 10%)。本组部分患者出现克柔假丝酵母菌和清酒假丝酵母菌等罕见菌株感染;4 例患者甚至出现 2 种菌株的合并感染。提示随着抗菌药物的大量应用,真菌性阴道炎的菌株出现迁移,感染更加复杂化。

本组对分离菌株的耐药性分析表明,特比萘芬的耐药率最高。特比萘芬为广谱抗真菌药物,可以选择性地抑制真菌麦角鲨烯环氧化酶活性,从而阻断真菌细胞壁的合成作用;该药物不影响真菌的细胞色素 P450 系统^[8]。特比萘芬对假丝酵母菌主要发挥抑菌作用,在真菌性阴道炎的治疗中起重要作用^[9]。但近些年来,临床针对耐特比萘芬的假丝酵母菌的报道逐渐增多。本研究假丝酵母菌对特比萘芬的耐药率高达 4.90%,与赵辉等^[10]的研究结果较为相近。

咪康唑的耐药率居第 2 位,克霉唑的耐药率高达 6.82%,也应该引起临床重视;同时氟康唑和伊曲康唑也具有一定的耐药率,提示这 4 类药物可能存在交叉耐药的现象。唑类药物的作用机制与特比萘芬不同,该类药物主要作用于真菌的麦角固醇合成酶,通过抑制细胞色素 P450 系统的转移导致羊毛固醇的沉积和麦角固醇的缺乏,影响细胞壁的合成^[11]。有研究报道,真菌对唑类药物的耐药性主要是由细胞膜药物外泵蛋白的过度表达引起^[12]。本研究中耐药菌株的 MDR1 和 FLU1 表达水平明显升高,而 CDR1 表达水平轻度升高。MDR1 编码的 mdr1p 是异化扩散载体超家族中的 1 个成员,其可以通过被动扩散的方式将药物泵出细胞;而 FLU1 与 MDR1 具有高度的同源性,作用机制相当^[13]。CDR1 可以编码 ATP 结合区转运蛋白 cdr1p,还可以水解 ATP 释放能量而通过主动扩散的方式将药物泵出^[14]。本组尽管唑类药物均存在耐药菌株,但大部分菌株对该类药物较为敏感,故仍具有较高的应用价值。同时,由于唑类药物与特比萘芬通过作用与不同的关键酶而抑制真菌细胞壁的合成,因此,当单药应用效果不佳时,可考虑联合应用。

本研究制霉菌素的耐药率为 0.00%, 96.21% 的菌株对制霉菌素敏感, 故该药物可以在真菌性阴道炎的治疗中发挥重要作用。相关研究认为, 制霉菌素适用于长期应用广谱抗菌药物导致的真菌性二重感染, 可以用来治疗复杂性的真菌性阴道炎; 但该药物具有一定的肝肾毒性, 其临床应用受到一定的限制^[15]。

综上所述, 目前真菌性阴道炎的病原菌感染呈现复杂化趋势, 临床应根据患者的药敏试验选择抗菌药物。

参考文献

- [1] 于霞, 蔡晓燕, 吴友惠, 等. 阴道炎五联检联合显微镜检查对常见阴道病的诊断价值[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 34(11): 1405-1406.
- [2] 黄艳冰. 150 例妇女阴道分泌物检验结果分析[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(11): 1361-1363.
- [3] 彭骏, 苏大林, 杭国琴, 等. 2 049 例白带常规检查结果分析[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(16): 2047-2048.
- [4] 张贤芝, 杨娜, 何淑霞, 等. 妇科门诊患者阴道分泌物病原体分布及耐药性分析[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(12): 1542-1544.
- [5] 雷云. 复发性外阴阴道假丝酵母菌病致病菌的药敏及其基因分布[J]. 广西医学, 2014, 28(3): 288-290.
- [6] Liu Q, Luyten W, Pellens K, et al. Antifungal activity in plants from Chinese traditional and folk medicine[J]. J Ethnopharmacol, 2012, 143(3): 772-778.
- [7] Nyirjesy P, Sobel JD, Fung A, et al. Genital mycotic infections with canagliflozin, a sodium glucose cotransporter 2 inhibitor, in patients with type 2 diabetes mellitus; a pooled analysis of clinical studies[J]. Curr Med Res Opin, 2014, 30(6): 1109-1119.
- [8] 张丽萍, 李妞妞, 李莉, 等. 特比萘芬阴道泡腾片与克霉唑阴道片治疗真菌性阴道炎的疗效比较[J]. 中国基层医药, 2012, 19(4): 586-587.
- [9] 苏洁慧, 雷艳梅, 罗洁元, 等. 特比萘芬对 Jukat E6-1 细胞株 TNFSF7 基因表达和启动子甲基化修饰的影响[J]. 广东医学, 2013, 34(4): 517-520.
- [10] 赵辉, 王群, 赵冰, 等. 真菌性阴道炎假丝酵母菌属临床感染及药敏结果分析[J]. 中国现代医生, 2014, 52(13): 78-79.
- [11] Sgherri C, Porta A, Castellano S, et al. Effects of azole treatments on the physical properties of *Candida albicans* plasma membrane: a spin probe epr study[J]. BBA-Biomembranes, 2014, 1838(1): 465-473.
- [12] Schneider S, Morschhe Muser J. Induction of *Candida albicans* drug resistance genes by hybrid zinc cluster transcription factors[J]. Antimicrob Agents Chem, 2015, 59(1): 558-569.
- [13] 史册, 刘锦燕, 魏冰, 等. 白色念珠菌对唑类药物耐药机制中生物膜作用的研究进展[J]. 检验医学, 2014, 33(6): 692-694.
- [14] 魏冰, 刘锦燕, 史册, 等. 白色念珠菌对唑类药物耐药机制的研究进展[J]. 检验医学, 2014, 29(9): 978-981.
- [15] 应杏芳. 克霉唑阴道片与制霉菌素栓治疗真菌性阴道炎的效果比较[J]. 中国基层医药, 2013, 20(8): 1202-1203.

(收稿日期: 2014-12-22 修回日期: 2015-02-14)

(上接第 1729 页)

- [2] 李天应. 耳鼻咽喉头颈肿瘤学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2007: 274.
- [3] 王天铎. 下咽癌的手术治疗现状[J]. 临床耳鼻咽喉科杂志, 2000, 14(6): 243-245.
- [4] 庾江东, 唐先龙, 王章锋, 等. 喉全切除术后并发咽瘘原因分析及预防[J]. 医学理论与实践, 2012, 25(15): 1876-1877.
- [5] Boscolo-Rizzo P, de Cillis G, Marchiori C, et al. Multivariate analysis of risk factors for pharyngocutaneous fistula after total laryngectomy[J]. Eur Arch Oto-Rhino-Laryngol, 2008, 265(8): 929-936.
- [6] 吴学愚. 耳鼻咽喉科全书——喉科学[M]. 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2000: 295.
- [7] Bailey BJ, Biller HF. Surgery of the larynx[M]. Philadelphia: WB Saunders, Co., 1999: 328-329.
- [8] Cavalot AL, Gervasio CF, Nazionale G, et al. Pharyngocutaneous fistula as a complication of total laryngectomy: review of the literature and analysis of case records[J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2000, 123(9): 587-592.
- [9] Herranz J, Saaranndeses A, Fernandez MF, et al. Complications after total laryngectomy in nonradiated laryngeal and hypopharyngeal carcinomas[J]. Otolaryngol Head Neck surg, 2000, 122(11): 892-898.
- [10] de Zinis L, Tomenzoli D, Nicolai P. Postlaryngectomy pharyngocutaneous fistula: incidence, predisposing factors, and therapy[J]. Head Neck, 1999, 21(2): 131-138.
- [11] Milisavljevic D, Stankovic M, Zivic M, et al. Factors affecting results of treatment of Hypopharyngeal Carcinoma[J]. Hippokratia, 2009, 13(3): 154-160.
- [12] 中华人民共和国卫生部. 医院感染诊断标准(试行)[J]. 中华医学杂志, 2001, 81(5): 314-320.
- [13] Qureshi SS, Chaturvedi P, Pai PS, et al. A prospective study of pharyngocutaneous fistulas following total laryngectomy[J]. J Cancer Res Ther, 2005, 1(1): 51-56.
- [14] 黄选兆, 汪吉宝. 实用耳鼻咽喉科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 517-518.
- [15] Tsou YA, Hua CH, Lin MH, et al. Comparison of pharyngocutaneous fistula between patients followed by primary laryngopharyngectomy and salvage laryngopharyngectomy for advanced hypopharyngeal cancer[J]. Head Neck, 2010, 32(11): 1494-1500.
- [16] 吴燕君. 综合辅助护理干预在喉癌术后患者中的应用[J]. 检验医学与临床, 2014, 11(23): 3379-3381.

(收稿日期: 2014-12-22 修回日期: 2015-02-16)