

## 185株白念珠菌25S rDNA基因型分布特点\*

王梅竹<sup>1</sup>, 王颜颜<sup>1</sup>, 曹煜<sup>2</sup>, 赵亮<sup>1</sup>, 李小玲<sup>1</sup>, 刘涛华<sup>1</sup>, 康颖倩<sup>1\*\*</sup>

(1. 贵阳医学院微生物学教研室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵阳医学院附院皮肤性病科, 贵州 贵阳 550004)

**[摘要]** 目的: 研究临床不同来源白念珠菌25S rDNA基因型分布特点, 探讨白念珠菌不同基因型与感染部位或不同感染类型之间的联系。方法: 特异性扩增不同来源的185株白念珠菌25S rDNA基因I型内含子序列, 再经过琼脂糖凝胶电泳方法对扩增条带进行基因分型, 并对不同感染部位、不同感染类型的白色念珠菌的基因型进行比较。结果: 185株白念珠菌中, A型122株(65.9%)、B型35株(18.9%)和C型28株(15.1%), 未发现D型与E型菌株; 外阴阴道念珠菌病(VVC)来源与深部组织来源的白念珠菌25S rDNA基因型差异具有统计学意义( $P=0.000$ ); 深部组织来源菌株中, 艾滋病相关性和非艾滋病相关性白念珠菌基因型差异无统计学意义( $P=0.680$ )。结论: VVC来源和深部组织来源的白念珠菌25S rDNA基因型不同, 而深部组织来源的艾滋病相关性和非艾滋病相关性白念珠菌25S rDNA基因型相同。

**[关键词]** 念珠菌, 白色; 基因型; 基因扩增; 念珠菌, 外阴阴道; 感染; 25S rDNA

**[中图分类号]** R379 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2014)05-0630-03

### Genotype Distribution of 185 *Candida albicans* 25S rDNA

WANG Meizhu<sup>1</sup>, WANG Yanyan<sup>1</sup>, CAO Yu<sup>2</sup>, ZHAO Liang<sup>1</sup>, LI Xiaoling<sup>1</sup>, LIU Taohua<sup>1</sup>, KANG Yingqian<sup>1</sup>

(1. Department of Microbiology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Department of Dermatology and Venereal Disease, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate genotype distribution of *Candida albicans* (*C. albicans*) 25S rDNA, and to probe the relationship between different genotypes and infection types or parts. **Methods:** Specific amplification of 185 *C. albicans* 25S rDNA Type I intron sequences, genotyping were carried out after agarose gel electrophoresis, and statistics comparison was conducted on the genotype of *C. albicans* on different infectious parts or types. **Results:** 185 *C. albicans* were classified into three genotypes: 122 were genotype A (65.9%), 35 were genotype B (18.9%) and 28 were genotype C (15.1%), but the genotype D and genotype E were not found. There was statistical significance of the differences of *C. albicans* 25S rDNA genotypes between vulvovaginal candidiasis (VVC) sources and invasive infection sources ( $P=0.000$ ), but for the invasive infection sources, there was no significant difference of *C. albicans* 25S rDNA genotypes among the HIV/AIDS-related and non HIV/AIDS-related strains ( $P=0.680$ ). **Conclusions:** There are different characteristics between VVC sources and invasive infection sources strains by 25S rDNA genotype, but for the invasive infection sources, the HIV/AIDS-related and non HIV/AIDS-related strains by 25S rDNA genotypes have the similar distribution characteristics.

**[Key words]** *Candida albicans*; genotypes; gene amplification; candidiasis, vulvovaginal; infection; 25S rDNA

白念珠菌是重要的条件致病性真菌, 可以引起浅表感染(口腔、阴道和皮肤念珠菌病)或深部组织感染(肺部、胃肠道、泌尿道念珠菌病和念珠菌血症)。临床上, 恶性肿瘤患者, 长期使用抗生素

\* [基金项目] 国家自然科学基金地区科学基金项目(31060006, 31260029); 贵州省科技厅社会发展科技攻关项目[黔科合SY字(2011)3017号]; 贵州省卫生厅科技项目(gzkwj2010-1-025); 贵阳市科技局社会发展与民生计划[筑科合同(2011)10316号]

\*\* 通信作者 E-mail: joycekangetokyo@gmail.com

网络出版时间: 2014-09-23 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20140923.1719.048.html>

或激素、接受放疗或化疗者,烧伤患者,老年伴有多器官功能不全者,接受各种导管介入性治疗以及艾滋病患者等,白念珠菌感染率较一般人群高<sup>[1]</sup>。白念珠菌在不同感染部位和不同感染类型中的基因型分布可能具有不同特点<sup>[2]</sup>。本文采用 McCullough 等<sup>[3]</sup>报道的针对白念珠菌基因组内高保守的 25S rDNA 基因序列设计特异性引物,对白念珠菌进行基因分型,探讨不同来源的白念珠菌的基因特点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 白念珠菌菌株来源 2009 年 6 月~2011 年 9 月贵州各地区医院门诊或住院患者中收集的 185 株白念珠菌,其中 90 株来源于外阴阴道念珠菌病(vulvovaginal candidiasis, VVC)女性患者,年龄 19~62 岁,平均(32±9)岁,标本均为阴道分泌物;95 株来源于深部组织感染患者,其中获得性免疫缺陷综合征(艾滋病)20 人,男性 15 人,女性 5 人,平均(32±8)岁;非艾滋病相关性患者 75 人,男性 50 人,女性 25 人,年龄 52~93 岁,平均(71±9)岁;标本来源有深部痰液、肺泡灌洗液、血液、尿液和粪便。185 株白念珠菌均经 CHROMagar 培养基和 ITS 区测序鉴定。

1.1.2 培养基和试剂 YPD 培养基(美国 Difco 公司),PCR Mix(上海生工),引物序列 CA-INT-L(5'-ATAAGGGAAGTCGGCAAAATAGATCCGTAA-3')、CA-INT-R(5'-CCTTGGCTGTGTTTCGCTAGATAGTAGAT-3',上海生工)<sup>[3]</sup>。

1.2 白念珠菌特异性扩增及基因分型

DNA 的提取按照 Avni 等<sup>[4]</sup>的方法进行,然后按照 McCullough 等<sup>[3]</sup>的方法行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 PCR Mix 13 μL,上、下游引物各 2.5 μL, DNA 样品 1 μL,超纯水 7 μL。PCR 反应条件为 94℃ 预变性 3 min;94℃ 变性 1 min、65℃ 退火 1 min、72℃ 延伸 2.5 min,循环 35 次;72℃ 延伸 10 min,取出 PCR 产物。经 PCR 反应特异性扩增白念珠菌 25S rDNA 基因的 I 型内含子序列,再经过琼脂糖凝胶电泳方法对扩增条带进行基因分型。

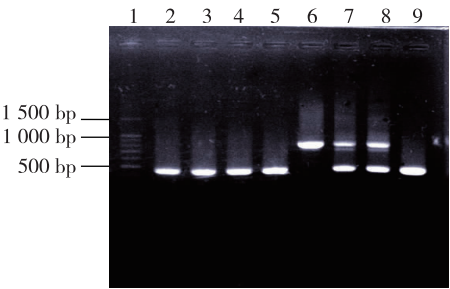
1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学处理,不同 25S rDNA 基因型菌株数量采用  $\chi^2$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 白念珠菌 25S rDNA 基因分型

185 株白念珠菌分为 3 型,单一约 450 bp 条带的 A 型,单一约 840 bp 的 B 型和含有约 450 bp 和 840 bp 两条带型的 C 型,未见 D 型和 E 型(D 型为单一的约 1 080 bp 条带, E 型为单一的约 1 400 bp 条带)。见图 1。



注:泳道 1 为 DNA marker,泳道 2、3、4、5、9 为单一 450 bp 扩增条带,鉴定为 A 型;泳道 6 约为单一 840 bp,鉴定为 B 型;泳道 7、8 为扩增条带 450 bp 和 840 bp,鉴定为 C 型

图 1 白念珠菌 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 1 Electrophoresis result of PCR amplification products of *C. albicans* strains

2.2 185 株白念珠菌 25S rDNA 基因分型分布

VVC 来源和深部组织来源的白念珠菌基因型差异有统计学意义( $P = 0.000$ )。深部组织来源菌株中,艾滋病相关性和非艾滋病相关性白念珠菌基因型相似,差异无统计学意义( $P = 0.680$ )。见表 1。

表 1 185 株白念珠菌 25S rDNA 基因型分布  
Tab. 1 The distribution of 25SrDNA genotype of 185 *C. albicans* strains

来源	25SrDNA 基因型(%)		
	A	B	C
VVC 来源	78(86.7)	7(7.8)	5(5.6)
深部来源	HIV(+) 11(55.0)	5(25.0)	4(20.0)
	HIV(-) 33(44.0)	23(30.7)	19(25.3)
总计	122(65.9)	35(18.9)	28(15.1)

3 讨论

白念珠菌是临床上分离率较高的条件致病菌,建立一种简单快速、分辨率和重复性好、便于临床实验室推广使用的白念珠菌分型方法,对于研究白

念珠菌种间、种内亲缘关系和致病性以及药物敏感性等均具有十分重要的意义<sup>[5]</sup>。白念珠菌 25S rDNA 分型是针对白念珠菌基因组内高度保守的 25S rDNA 基因序列设计特异性引物,采用常规 PCR 技术扩增其中的特定片段,根据产物分子量的大小或者 I 型内含子的有无进行分型,目前认为这种以内含子为基础的 PCR 基因分型方法是流行病学和分类学研究的有效方法<sup>[6]</sup>。

本研究结果中,A 型的检出率最高(69.13%),这与国内其他学者的报道相似<sup>[7-8]</sup>,提示基因 A 型为贵州地区念珠菌感染常见基因型。本研究发现 VVC 来源与深部组织来源白念珠菌 25S rDNA 基因型有较大不同,VVC 来源的白念珠菌 A 型呈明显的优势(86.7%),B 型和 C 型所占比例较少;深部来源菌株除 A 型略多外,A、B、C 型呈分布较平均,两种不同部位来源菌株 25S rDNA 基因型的差异具有统计学意义,提示不同来源的菌株可能具有不同的遗传背景,从而对侵染对象具有选择性。VVC 来源的白念珠菌 25S rDNA 基因分布情况与国内其他研究者的结果相似<sup>[9-10]</sup>。深部来源菌株中,艾滋病相关性白念珠菌 A 型虽然较非艾滋病相关性菌株多,但 2 者的 25S rDNA 基因型分布的差异无统计学意义( $P>0.05$ ),说明相同来源的白念珠菌,虽然在个体不同的免疫条件下基因型的分布略有差异,但差异不大。本实验中未发现 D 型菌株,这可能与都柏林念珠菌在中国人群中以低频率存在有关<sup>[9,11]</sup>。

VVC 来源的白念珠菌 A 型呈明显的优势分布,可能与 A 型菌株具有更强的黏附力和侵袭力有关<sup>[1,5]</sup>。由于 25S rDNA 分型是以 I 型内含子的存在和缺失作为分型的基础,缺乏 I 型内含子的 A 型菌株具有积极阻止内含子获得的机制,内含子的插入可能影响到相关蛋白质的表达,导致白念珠菌对细胞的黏附力减弱<sup>[5-6]</sup>。同时,A 型对 5-氟胞嘧啶的敏感性较 B 型和 C 低,抗生素的使用可能也对菌株基因型的分布起到选择性作用<sup>[6,12]</sup>。女性阴道黏膜细胞的免疫系统其优势抗体是 IgG,同时阴道内酸性、低氧的环境可能对菌株有更强的选择性<sup>[2]</sup>。因此,阴道内定植菌株优势基因型的分布可能是多因素共同作用的结果。

综上所述,VVC 来源和深部组织来源的白念珠菌 25S rDNA 基因型分布具有不同的特点,而深部组织来源的艾滋病相关性和非艾滋病相关性白念珠菌 25S rDNA 基因型分布特点相似。

## 4 参考文献

- [1] Karahan ZC, Güriz H, Ağırbaşlı H, et al. Genotype distribution of *Candida albicans* isolates by 25S intron analysis with regard to invasiveness[J]. *Mycoses*, 2004 (11-12):465-469.
- [2] Li J, Fan SR, Liu XP, et al. Biased genotype distributions of *Candida albicans* strains associated with Vulvovaginal Candidosis and Candidal Balanoposthitis in China [J]. *Clin Infect Dis*, 2008(9):1119-1125.
- [3] 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 (2):417-421.
- [4] Avni T, Leibovici L, Paul M. PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis [J]. *J Clin Microbiol*, 2011(2):665-670.
- [5] 刘刚,卢光. 白假丝酵母菌 25SrDNA 基因分型与黏附力的相关性[J]. 华中科技大学学报:医学版, 2010 (2):243-245.
- [6] 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(12):4309-4315.
- [7] 王和,康颖倩,刘姝,等. 209 株临床分离的不同基因型白假丝酵母菌和丝状真菌的抗真菌药物敏感性及其耐药性趋势研究[J]. 中国抗生素杂志, 2012(37):711-715.
- [8] 罗振华,王和. 343 株致病性念珠菌的基因鉴定及药物敏感性检测[J]. 山东医药, 2012(27):33-36.
- [9] She XD, Wang XJ, Fu MH, et al. Genotype comparisons of strains of *Candida albicans* from patients with cutaneous candidiasis and vaginal candidiasis [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2008(15):1450-1455.
- [10] 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念珠菌基因型研究[J]. 中华皮肤科杂志, 2003(8):446-448.
- [11] Millar BC, Moore JE, Xu J, et al. Genotypic subgrouping of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by 25S intron analysis [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2002(2):102-106.
- [12] Balaban N, Karahan ZC, Mumcuoğlu I, et al. The relationship between *Candida albicans* 25S intron genotypes and antifungal susceptibilities [J]. *Mikrobiyol Bul*, 2007 (2):245-251.

(2014-06-10 收稿,2014-08-12 修回)

中文编辑: 文箬颖; 英文编辑: 赵毅