

• 论 著 •

致外阴阴道假丝酵母菌病白假丝酵母菌对 9 种抗真菌药物最低抑菌浓度测定

何 亮,郝建华,张建华,徐 丹,鲁绍琴,张丽芬,蒋 莉,罗 历,于文超,涂彩霞,沈化清,张小红,王 娟
(广东省深圳市第六人民医院 518052)

摘要:目的 检测引起外阴阴道假丝酵母菌病(VVC)的白假丝酵母菌对 9 种抗真菌药物的耐药性,为临床治疗 VVC 提供参考依据。**方法** 常规培养分离真菌,并鉴定到种,采用最低抑菌浓度法对白假丝酵母菌进行体外药物敏感试验。**结果** 培养分离的 41 株菌中,白假丝酵母菌占 87.8%,光滑假丝酵母菌占 4.87%,季也蒙假丝酵母菌占 2.43%,近平滑假丝酵母菌占 2.43%,热带假丝酵母菌占 2.43%;36 株白假丝酵母菌耐药率由高到低依次是伊曲康唑、氟康唑、咪康唑、酮康唑、益康唑、5-氟胞嘧啶、克霉唑、两性霉素、制霉菌素,其中 7 种药物耐药率大于 50%。**结论** 白假丝酵母菌仍是造成 VVC 的最常见致病菌,耐药现象较为普遍,应根据临床实验室的体外药敏试验结果,指导临床合理用药。

关键词:念,珠菌病,外阴阴道; 抗真菌药; 微生物敏感性试验; 白假丝酵母菌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.04.007

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)04-0446-02

Minimum Inhibitory Concentration detection of 9 antifungal drugs to *Candida albicans* from Vulvovaginal Candidiasis

He Liang, Hao Jianhua, Zhang Jianhua, Xu Dan, Lu Shaoqin, Zhang Li fen,

Jiang Li, Luo Li, Yu Wenchao, Tu Caixia, Shen Huaqing, Zhang Xiaohong, Wang Juan

(Shen Zhen Sixth Hospital, Shenzhen, 518020, China)

Abstract: Objective To detect the 9 antifungal drugs' MIC of *Candida albicans*, isolated from vulvovaginal Candidiasis, and provide reference to VVC treatment. **Methods** The *Candida* were cultured and identified conventionally. The medical susceptibility test was performed by MIC methods to *Candida albicans*. **Results** Among 41 strains of *Candida*, the most common organisms were *Candida albicans* (87.8%), then *Candida glabrata* (4.87%), *Candida guilliermondii* (2.43%), *Candida parapsilosis* (2.43%), *Candida tropicalis* (2.43%). Drug resistance rate from high to low was itraconazole, fluconazol, miconazole, ketoconazole, econazole, flucytosine, clotrimazole, amphotericin and mycostatin respectively, and the drug resistance rate was greater than fifty percent in 7 drugs of total. **Conclusion** *Candida albicans* is the most common cause of vulvovaginal candidiasis, and multi-drug resistance is general. It is important to use the antifungal drug according the result of drug sensitive test.

Key words: candidiasis, vulvovaginal; antifungal agents; microbial sensitivity tests; candida albicans

外阴阴道假丝酵母菌病(vulvovaginal Candidiasis, VVC)是最常见的外阴和阴道炎症之一,主要症状有外阴瘙痒、白带增多、豆渣样或凝乳状白带等,也称外阴阴道念珠菌病,治疗时间长且容易复发,严重影响到妇女的正常生活。据报道,在美国所有外阴阴道炎症中其发病率最高(39%)^[1],而白假丝酵母菌是造成 VVC 最常见的致病菌(88.14%)^[2]。如何正确合理地选用抗真菌药物及对抗真菌药物敏感性的评价,已成为临床一个突出而且急待解决的问题。本文采用微量稀释法对 36 株分离自 VVC 患者的白色假丝酵母菌作了 9 种抗真菌药物的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)测定。现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 标本来源 选取 2008 年 3 月至 2009 年 11 月,深圳市南山人民医院及深圳市慢性病防治中心妇科门诊 VVC 患者,临床表现外阴瘙痒、灼痛,还可伴有尿痛以及性交痛等症状,阴道内可见较多的白色豆渣样分泌物,可呈凝乳状;实验室检查悬滴法镜检菌丝阳性。年龄 23~42 岁,平均年龄 32 岁。

1.2 标本收集 所有患者在治疗前,取阴道分泌物镜检(湿片法)诊断的同时行分泌物真菌培养。

1.3 培养方法 阴道分泌物接种于含氯霉素和放线菌酮的沙

氏培养基(广州迪景公司),每管最少接种 5 点,放 30℃ 恒温箱培养,每天观察培养情况。4 d 以上无菌落生长判定为阴性。

1.4 菌种鉴定及药物敏感性分析 假丝酵母菌鉴定采用显色培养基(法国 CHROM)及 Bact-IST 细菌鉴定仪(珠海黑马公司);药物敏感性试验采用 Bact-IST 细菌鉴定仪及配套试剂(珠海黑马公司)。

1.5 抗真菌药物选择及药物敏感试验结果判断标准 测试 9 种药物包括两性霉素 B(AMB)、伊曲康唑(ITR)、氟康唑(FCA)、益康唑(ECO)、咪康唑(MIC)、5-氟胞嘧啶(5-FC)、制霉菌素(NYS)、酮康唑(KET)、克霉唑(CLO),结果参照美国临床实验室标准化协会提出的 M-27-A 标准进行判别^[3],敏感判断标准为:AMB≤1 μg/mL、ITR≤1 μg/mL、FCA≤8 μg/mL、ECO≤4 μg/mL、MIC≤1 μg/mL、5-FC≤4 μg/mL、NYS≤4 μg/mL、KET≤1 μg/mL、CLO≤1 μg/mL;耐药判断标准为 AMB>4 μg/mL、ITR>1 μg/mL、FCA>64 μg/mL、ECO>8 μg/mL、MIC>8 μg/mL、5-FC>32 μg/mL、NYS>8 μg/mL、KET>8 μg/mL、CLO>8 μg/mL。

1.6 质控菌株 ATCC90028 白假丝酵母菌购买自卫生部生物制品鉴定所菌株保管中心。

2 结 果

2.1 假丝酵母菌检出分类 46 例 VVC 患者标本镜检全部阳性, 41 例酵母菌培养阳性, 培养阳性率 89.13%。在 41 株假丝酵母菌中, 白假丝酵母菌 36 株(87.8%), 光滑假丝酵母菌 2 株(4.87%), 季也蒙假丝酵母菌 1 株(2.43%), 近平滑假丝酵母菌 1 株(2.43%), 热带假丝酵母菌 1 株(2.43%), 具体菌种分布见表 1。

表 1 41 例假丝酵母菌菌株构成比

菌种名称	菌株数(n)	构成比(%)
白假丝酵母菌	36	87.8
光滑假丝酵母菌	2	4.87
季也蒙假丝酵母菌	1	2.43
近平滑假丝酵母菌	1	2.43
热带假丝酵母菌	1	2.43

2.2 白假丝酵母菌药物敏感性实验结果 从检测结果可见, VVC 患者致病菌以白假丝酵母菌为主; 故在本试验中, 分别选取 AMB、ITR、FCA、ECO、MIC、5-FC、NYS、KET、CLO 等 9 种抗真菌药物, 采用微量稀释法对培养出的 36 株白假丝酵母菌进行体外药物敏感性试验, 试验结果见表 2。

表 2 白假丝酵母菌对 9 种抗真菌药物 MIC 测定结果[n(%)]

抗菌剂	敏感菌株	中介菌株	耐药菌株
AMB	15(41.67)	7(19.44)	14(38.89)
ITR	2(5.56)	0(0.00)	34(94.44)
FCA	2(5.56)	0(0.00)	34(94.44)
ECO	5(13.89)	5(13.89)	26(72.22)
MIC	3(8.33)	1(2.78)	32(88.89)
5-FC	15(41.67)	2(5.56)	19(52.78)
NYS	24(66.67)	7(19.44)	5(13.89)
KET	1(2.78)	6(16.67)	29(80.56)
CLO	10(27.78)	8(22.22)	18(50.0)

2.3 白假丝酵母菌耐药率统计 36 株白假丝酵母菌对 9 种抗真菌药物的耐药率依次为: ITR 94.44%、FCA 94.44%、MIC 88.89%、KET 80.56%、ECO 72.22%、5-FC 52.78%、CLO 50%、AMB 38.89%和 NYS 13.89%。

3 讨论

假丝酵母菌包括白假丝酵母菌和非白假丝酵母菌两大类, 在 VVC 中以白假丝酵母菌为主, 近年来报道非白假丝酵母菌致病比例有所上升^[4]。国内研究的数据显示, 白假丝酵母菌仍是造成 VVC 最常见的致病菌, 近几年先后克隆和分离了与白假丝酵母菌菌丝形成相关的基因, 证实了其最重要的毒力因素就是对机体上皮细胞的黏附和随后出现的假菌丝形成以及胞外蛋白酶(天门冬氨酸蛋白酶)^[5]。国外资料报道 VVC 中白假丝酵母菌占 85%~90%, 光滑假丝酵母菌占 5%~10%, 热带假丝酵母菌占 5%^[6]。本研究中, 引起 VVC 的假丝酵母菌中, 白假丝酵母菌占 87.8%, 光滑假丝酵母菌占 4.87%, 热带假丝酵母菌占 2.43%, 与国内、国外资料报道相似。

本组资料显示, 耐药率较高的药物由高到低依次为: ITR、

FCA、MIC、KET、ECO、5-FC、CLO、AMB、NYS。在 9 种抗真菌药物中, 有 7 种药物耐药率大于 50%, 而耐药率在 80% 以上的药物也达到了 4 种, 其中 ITR 和 FCA 耐药率更高达 94.44%。ITR 和 FCA 都是第 3 代咪唑类抗真菌药, 自 20 世纪 90 年代进入我国, 因其疗效好、不良反应小、抗真菌谱广而用于各种真菌病治疗。ITR 主要是选择性地与真菌细胞壁的细胞色素 P2450 结合, 从而抑制真菌麦角固醇合成。VVC 患者中菌株对 ITR 的敏感性较低(5.56%), 可能与人群中广泛大量使用 ITR 治疗其他真菌病从而引起敏感性降低有关; 而 FCA、MIC、KET、ECO、CLO 等唑类药物具有生物利用度高、广泛的组织穿透力、半衰期长、使用方便和安全性好等特点, 常常成为临床经验治疗假丝酵母菌感染的首选药物, 且唑类药物为非处方药物, 增加了滥用药物的机会。其广泛使用诱导耐药菌株的产生而造成耐药率的上升。AMB 和 5-FC 一般在临床上多用于深部念珠菌感染, 而且有报道 AMB 在体外药敏试验中耐药率很高^[7], 但本试验从 VVC 患者中分离的白假丝酵母菌对 AMB 产生的耐药性相对较低, 可能和体外药敏试验与体内的药物活性有一定差异有关。这些因素提示当给予其他常用口服抗真菌药物治疗无效时, 可考虑 AMB 的使用; NYS 是在 9 种抗真菌药物中, 唯一一个敏感率超过 50% 的药物, 其可与假丝酵母菌菌膜上的固醇类物质结合, 从而改变菌膜的渗透性, 破坏菌体。但其不良反应较大, 临床应用主要以局部用药为主。

随着抗真菌类非处方药的出现, 患者自我诊断, 自行购买抗真菌药的现象愈来愈普遍, 再加上经验性用药等因素都增加了耐药菌株的产生^[8]。国外有报道假丝酵母菌的耐药是复发 VVC(RVVC)的病因^[9], 国内有学者对 RVVC 的追踪研究发现, 在治疗及随访过程中 RVVC 患者中, 原发株均为白假丝酵母菌, 而复发分离株 90% 以上也为白假丝酵母菌^[10]。中华妇产科学分会感染性疾病协作组 2003 年 8 月通过了外阴阴道念珠菌病诊治规范(草案), 其治疗原则指出: 首次发作或首次就诊是规范化治疗的关键时期^[11]。所以应根据临床实验室的体外药敏试验结果, 指导临床合理用药, 以防止真菌耐药性的进一步发展及 VVC 向 RVVC 发展。

(致谢! 感谢深圳市慢性病防治中心张丽君医生, 赖志南医生在试验中给予的帮助与支持。)

参考文献

- [1] Walker pp, Reynolds MT, A shbee HR, et al. Vaginal yeasts in the era of "over the counter" antifungals[J]. Sex Trdnsm Infect, 2000, 76 (6): 437-438.
- [2] 刘朝晖, 廖秦平. 外阴阴道假丝酵母菌病的致病菌研究[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2005, 21 (3): 1492-1511.
- [3] NCCLS. National committee for clinical laboratory standards reference method broth dilution antifungal susceptibility testing for yeast Document M-27-A[S]. USA: Villanova, 1992, 2.
- [4] Richter SS, Galask RP, Messer SA, et al. Antifungal susceptibilities of Candida species causing vulvovaginitis and epidemiology of recurrent cases[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43 (5): 2155-2162.
- [5] 王丹敏, 韩景田, 董小青, 等. 白色念珠菌蛋白酶与其毒力关系的研究[J]. 中国微生物学杂志, 2000, 12(4): 215-220. (下转第 450 页)

3 讨 论

喹诺酮类药物作为治疗鲍曼不动杆菌感染的抗菌剂之一,在临床已应用多年,具有良好的体外抗菌活性和组织渗透性等优点^[5]。本试验分别选用第三代、第四代喹诺酮类药物,结果显示分离菌株对喹诺酮类药物耐药率为 63.3% 和 60.0%,但二者位于敏感范围内的菌株数相同,提示细菌对第四代喹诺酮类药物的耐药情况已经接近第三代喹诺酮类药物,值得临床密切关注。

鲍曼不动杆菌是重要的医院感染病原菌之一。同源性分析结果显示其中以 B 型数目明显高于其他类型,表明本院可能存在某一基因型鲍曼不动杆菌的感染流行,估计该型菌株能以克隆株的形式播散。另外,同一基因型中不同亚型的耐药表型存在差异,而有些非同一基因的菌株出现了相同的表型,这种差异可能是由于抗菌剂的选择压力所致。

细菌对喹诺酮类药物耐药机制非常复杂,包括了染色体基因突变、整合子、灭活酶、钝化酶等。其中 QRDR 相应基因(*gyrA* 和 *parC*)的突变,导致喹诺酮类药物作用的拓扑异构酶 II 和拓扑异构酶 IV 发生突变是产生耐药的重要途径。国内外报道的不动杆菌 *gyrA* 基因突变位点主要集中在 N 端核苷酸序列为 199~318 (编码氨基酸的 67~106) 的区间内,并发现编码氨基酸 83 位点上的碱基突变最为频繁。*parC* 基因的此区域与 *gyrA* 有同源性,主要突变发生在 80 位氨基酸处^[6-7]。试验中 3 种表型耐药株的测序结果 *gyrA* 和 *parC* 均分别在 83 位和 80 位氨基酸发生突变,提示目前这 2 个位点依然是最常见的突变位点。

DHPLC 是一种新的高通量筛选 DNA 序列变异的新技术,这一技术最先由美国 Stanford 大学 Oefner 创立,其原理是采用离子对反向高效液相色谱法分离并检测异源双链^[8]。Hannachi 等^[9]运用 DHPLC 技术检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌所编码的对喹诺酮类抗菌剂耐药的基因,是最早成功地把 DHPLC 运用于细菌耐药方面的研究。William 等^[10]通过不同谱系 39 种细菌进行 DHPLC 检测,成功地把 DHPLC 应用于细菌菌种的鉴定。作为一种新的筛查耐药基因突变的方法,其具有灵敏度高、操作简便、直观等优点,对于发生突变的基因(无论是突变位点已知还是未知),哪怕只有 1 个碱基的错配,也能在图谱中直观地反映出来。但由于其不能确定碱基的改变是真正的突变还是基因多态性,因此仍需测序证实。本研究中我们运用 DHPLC 检测筛查鲍曼不动杆菌耐药基因(*gyrA* 和 *parC*)的突变,其中表型耐药株均出现异常双峰或者多峰,

而表型敏感株只出现单峰,经测序证实表型耐药株中存在突变位点。这与有关文献报道 DNA 片段在 198~732 bp 时, DH-PLC 的灵敏性和准确性为 92%~100% 相符^[11],可见 DHPLC 在检测耐药基因突变方面具有其特有的高灵敏度,加上其耗时短,费用少,因此在临床上具有广泛的应用前景。

参考文献

- [1] 钱雪琴,张军,沈芳. Chelex-100 法和碱性裂解法提取细菌 DNA 的比较[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(8): 1565-1566.
- [2] Grundmann HJ, Towner KJ, Dijkshoorn, et al. Multicenter Study Using Standardized Protocols and Reagents for Evaluation of Reproducibility of PCR-Based. Fingerprinting of *Acinetobacter* spp [J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(12): 3071-3077.
- [3] Lee JK, Lee YS, Park YK, et al. Mutations in the *gyrA* and *parC* genes in Ciprofloxacin-Resistant Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* in Korea [J]. Microbiol Immunol, 2005, 49(7): 647-653.
- [4] Xu L, Evans J, Ling T, et al. Rapid Genotyping of CTX-M Extended-Spectrum-Lactamases by Denaturing High-Performance Liquid Chromatography [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(4): 1446-1454.
- [5] 马静. 喹诺酮类药物的合理应用[J]. 现代中西医结合杂志, 2008, 19(8): 1039-1040.
- [6] 刘丁, 练向群, 王政, 等. 耐环丙沙星鲍曼不动杆菌 *gyrA* 和 *parC* 突变模式分析[J]. 中国感染控制杂志, 2008, 7(1): 12-14.
- [7] 史伟峰, 王玉月, 郑为平, 等. 多重耐药性鲍曼不动杆菌耐药基因及菌株聚类分析[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(5): 390-392.
- [8] Oefner PJ, Underhill PA. Comparative DNA sequencing by denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) [J]. Am J Hum Genet, 1995, 7(Suppl): 226.
- [9] Hannachi-M'zali F, Ambler JE, Taylor CF, et al. Examination of single and multiple mutations involved in resistance to quinolones in *Staphylococcus aureus* by a combination of PCR and denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) [J]. J Antimicrob Chemother, 2002, 50(5): 649-655.
- [10] William H, Dadid S, Erik H, et al. Denaturing HPLC for identifying bacteria [J]. Biotechniques, 2002, 33(8): 386-391.
- [11] 张晓燕, 刘朝晖. 变性高效液相色谱技术在细菌耐药基因检测中的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(8): 743-745.

(收稿日期: 2010-05-04)

(上接第 447 页)

- [6] Lanchared JL, Hernandez ML. Recurrent Vaginal Candidiasis changes in etiopathogenical patterns [J]. Int J Gynaecol Obstet, 2000, 71(1): 29-35.
- [7] De repentigny, Phaneuf L M. Gastrointestion colonization and systemic dissemination by *Candida albicans* and *Candida tropicalis* intact and immune-compromised mice [J]. Infect Immun, 2002, 60(12): 4907-4912.
- [8] 汤俊峰, 李小霞, 叶芬. 137 株真菌的鉴定及药敏分析 [J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(07): 108-110.

- [9] Sobel JD, Zervos M, Reed BD, et al. Fluconazole susceptibility of vaginal isolates obtained from with complicated candida vaginitis: clinical implications [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(1): 34-38.
- [10] 冯佩英, 陆春, 朱国兴, 等. 复发性阴道念珠菌病念珠菌的菌种及药敏分析 [J]. 临床皮肤科杂志, 2005, 34(4): 215-216.
- [11] 中华妇产科学分会感染性疾病协作组. 外阴阴道念珠菌病诊治规范(草案) [J]. 中华妇产科杂志, 2004, 39(2): 430-431.

(收稿日期: 2010-05-04)