

## • 临床检验研究论著 •

阴道光滑念珠菌耐药性及氟康唑耐药相关基因的表达<sup>\*</sup>方小龙<sup>1</sup>, 资捷<sup>1</sup>, 陈志芳<sup>2</sup>, 王莉平<sup>1</sup>

(广东省深圳市福田区妇幼保健院:1. 检验科;2. 妇产科 518045)

**摘要:**目的 研究阴道中光滑念珠菌耐药性及氟康唑耐药相关基因的表达。方法 分离、鉴定阴道分泌物中的光滑念珠菌,并进行药敏实验。抽提光滑念珠菌总 RNA,通过 RT-PCR 检测耐药基因 CDR1、CDR2 和 ERG11 的相对表达量。结果 光滑念珠菌对制霉菌素、两性霉素 B 的药物敏感性最好,5-氟胞嘧啶次之,对唑类药物的耐药率(41.00%~67.00%)较高;对氟康唑的耐药率为 44.00%。RT-PCR 结果显示,光滑念珠菌氟康唑耐药组 CDR1、CDR2 和 ERG11 基因高表达。结论 光滑念珠菌对常用抗真菌药物的耐药率呈上升趋势。光滑念珠菌耐药基因 CDR1、CDR2 和 ERG11 的高表达,与临床光滑念珠菌对氟康唑耐药有关。

**关键词:**念珠菌,光滑; 耐药性; 基因; 氟康唑

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.13.009

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)13-1559-02

Drug resistance and expression of gene related to fluconazole resistance in *Candida glabrata* isolated from vagina<sup>\*</sup>Fang Xiaolong<sup>1</sup>, Zi Jie<sup>1</sup>, Chen Zifang<sup>2</sup>, Wang Liping<sup>1</sup>

(1. Department of Laboratory; 2. Department of Gynaecology and Obstetrics, Women and Children

Health Care Hospital of Futian District, Shenzhen, Guangdong 518045, China

**Abstract: Objective** To explore the drug resistance and expression of fluconazole-resistant genes in *Candida glabrata* clinical isolates from vagina. **Methods** *Candida glabrata* in vaginal secretions were isolated, identified and detected for drug resistance. Total RNA of *Candida glabrata* isolates were extracted, the expression of CDR1, CDR2 and ERG11 were detected by real-time polymerase chain reaction(PCR). **Results** *Candida glabrata* were more sensitive to nystatin and amphotericine B, followed by 5-fluorocytosine, but resistant to azoles antifungal drugs, with resistant rate from 41.00% to 67.00%. The resistant rate of *Candida glabrata* clinical isolates to fluconazole was 44.00%. The drug resistance genes CDR1, CDR2 and Erg11 were overexpressed in fluconazole resistant strains. **Conclusion** The drug resistance of *Candida glabrata* to commonly used antifungals might be with an ascending trend. CDR1, CDR2 and ERG11 could be overexpressed in drug resistant strains of *Candida glabrata*, which might be closely correlated with fluconazole resistance.

**Key words:** *Candida glabrata*; drug resistance; gene; fluconazole

外阴阴道念珠菌病(VVC)是一种高发的女性生殖道酵母菌感染性疾病,光滑念珠菌是该病的主要病原菌之一。近年来由于广谱抗菌剂、皮质类固醇激素、免疫抑制剂的滥用,及不良生活习惯等因素使 VVC 尤其是复发性 VVC 的发病率进一步上升,而抗真菌药物的使用又使治疗后的耐药问题日渐突出<sup>[1]</sup>。因此,作者对从 VVC 患者阴道分泌物中分离的光滑念珠菌进行了耐药性及耐药基因 CDR1、CDR2、ERG11 的相对表达量的研究,探讨其与唑类药物耐药性的关系,现报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 菌株来源与药敏实验** 2009 年 10 月至 2010 年 5 月从本院妇科门诊 VVC 患者阴道分泌物中分离的光滑念珠菌 100 株。采用 VITEK-32 微生物鉴定系统及其配套测试板进行菌株鉴定。参考 1998 年美国 NCCLS 真菌体外药敏实验标准,对氟康唑、5-氟胞嘧啶、两性霉素 B、制霉菌素、咪康唑、酮康唑、伊曲康唑、特比萘芬进行药物敏感实验,从中选取 46 株氟康唑敏感株和耐药株进行耐药基因的相对表达分析。质控菌株为白色念珠菌 ATCC90028、光滑念珠菌 ATCC15126,由广东医学院微生物学教研室赠送。

**1.2 仪器与试剂** 菌落分离用沙保弱琼脂培养基(Oxoid, 英国),科玛嘉显色培养基(广州迪景微生物科技有限公司)。Trizol 及逆转录试剂(Invitrogen 公司), Maxima SYBR Green RT-PCR 试剂盒(凯基生物科技发展有限公司), LightCycler 定量 PCR 扩增仪及专用毛细管由 Roche 公司提供,实验所用的引物均由大连宝生物公司合成。

## 1.3 RT-PCR 检测三个耐药基因的表达

**1.3.1 实验菌株 RNA 的提取和 cDNA 的合成** 取过夜培养的菌液转种于 YEPD 培养液中,置于恒温振荡培养箱中(30 °C, 200 r/min)培养 16~18 h,使菌株处于对数生长期。采用小量酵母菌总 RNA 抽提试剂盒进行总 RNA 抽提。用紫外分光光度计测定其浓度和纯度,  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  比值大于或等于 1.8 为纯度合格。按操作说明书的步骤,用总 RNA 进行逆转录反应,逆转录的 cDNA 用于 PCR 反应。

**1.3.2 引物设计与合成** 参照文献[2]设计 4 对特异性引物,见表 1。以 ACT1 基因作为内参照,定量测定 CDR1、CDR2、ERG11 三个基因的表达水平。

**1.3.3 RT-PCR 反应** 按 PCR 试剂盒标准操作步骤进行操

\* 基金资助:广东省深圳市福田区公益性科研计划项目(FTWS049)。

作。RT-PCR 反应条件:94 ℃ 预变性 5 min, 94 ℃ 15 s, 59 ℃ 60 s, 72 ℃ 10 s, 40~50 次循环, 72 ℃ 延伸 5 min。实时荧光定量 PCR 仪监测记录数据, 并计算出 CT 值, 目的基因的 CT 值减去管家基因 ACT1 的 CT 值即得到  $\Delta CT$  值。 $\Delta CT$  值越大, 目的基因的表达量就越低; 反之,  $\Delta CT$  值越小, 目的基因的表达量就越高。

**1.4 统计学处理** 所有实验数据均用 Stata11.0 软件包进行处理, 结果用  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间采用成组设计的两样本均数的比较(*t* 检验),  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

表 1 RT-PCR 反应的引物

靶基因	引物序列(5'-3')
ACT1	CGC TTT GGA CTT CGA ACA AGA A GTT ACC GAT GGT GAT GAC TTG AC
CDR1	TTA AAA GTT CAA GCC AGT ATT TCC AAA TTT GAT AAC CAT CGT AAA GCA
CDR2	GTG CTT TAT GAA GGC TAC CAG ATT TCT TAG GAC AGA AGT AAC CCA TCT
ERG11	ATT GGT GTC TTG ATG GGT GGT C TCT TCT TGG ACA TCT GGT CTT TCA

## 2 结 果

**2.1** 100 株光滑念珠菌对 8 种抗真菌药物的药敏结果, 见表 2。

表 2 100 株光滑念珠菌药敏实验结果

抗菌剂	敏感[n(%)]	中介[n(%)]	耐药[n(%)]	耐药率(%)
5-氟胞嘧啶	88(88.00)	3(3.00)	9(9.00)	12.00
两性霉素 B	93(93.00)	2(2.00)	5(5.00)	7.00
制霉菌素	94(94.00)	1(1.00)	5(5.00)	6.00
咪康唑	59(59.00)	11(11.00)	30(30.00)	41.00
伊曲康唑	33(33.00)	15(15.00)	42(42.00)	67.00
特比奈酚	62(62.00)	10(10.00)	28(28.00)	38.00
酮康唑	52(52.00)	11(11.00)	37(37.00)	48.00
氟康唑	56(56.00)	9(9.00)	35(35.00)	44.00

**2.2 耐药基因 CDR1、CDR2、ERG11 的相对表达** 在转录水平上, 氟康唑耐药组和敏感组 CDR1、CDR2、ERG11 基因的表达差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ), 耐药组的表达量要高于敏感组, 统计结果见表 3。

表 3 敏感组和耐药组耐药基因  $\Delta CT$  值的比较

目的基因	$\Delta CT$ 值( $\bar{x} \pm s$ )		<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
	敏感组( <i>n</i> =19)	耐药组( <i>n</i> =27)		
CDR1	8.92±2.74	6.81±2.68	2.605 2	0.006 2
CDR2	7.98±2.65	6.39±2.71	1.977 1	0.027 2
ERG11	9.51±2.88	7.26±3.02	2.535 4	0.007 4

## 3 讨 论

光滑念珠菌是外阴阴道念珠菌病的主要病原菌之一, 药敏实验表明光滑念珠菌对两性霉素 B、制霉菌素、5-氟胞嘧啶的

敏感性较高, 敏感率分别为 93.00%、94.00%、88.00%, 与 Richter 等<sup>[3]</sup>报道的结果相似; 而对四种唑类药物的耐药率较高, 可能与唑类药物在临床上的广泛应用及光滑念珠菌较易获得耐药性有关<sup>[4]</sup>; 对氟康唑的耐药率达 44.00%, 明显高于国内其他文献报道<sup>[5]</sup>。也说明作为主要治疗药物的唑类药物的耐药及多重耐药问题日益突出, 已成为临床上 VVC 治疗失败和复发性 VVC 的发病率进一步上升的主要原因, 要引起临床上的高度重视。

目前认为, 许多机制参与了念珠菌耐药现象的发生, 光滑念珠菌的药物外排能力增强导致胞内药物浓度降低, 可能是光滑念珠菌最主要的耐药机制, 目前发现的与光滑念珠菌耐药有关的外排泵 ATP 结合盒转运子(ABCT)包括 Cdr1p 和 Cdr2p, 它们依赖 ATP 进行主动运输, CDR1 和 CDR2 是编码这两个蛋白的基因。本研究采用 RT-PCR 方法检测了临床分离的光滑念珠菌氟康唑耐药株和敏感株 CDR1、CDR2 基因的表达情况。实验结果表明, 两组菌株 CDR1、CDR2 基因在 mRNA 水平上差异有统计学意义, 耐药组的表达量显著高于敏感组, 可见这 2 个基因的高度表达与对氟康唑产生耐药有密切关系, 与 Bennett 等<sup>[6]</sup>的研究结果一致。而 Posteraro 等<sup>[7]</sup>发现, 氟康唑耐药菌株 CDR1 和 CDR2 mRNA 的表达上调分别达到了 12.4~483 倍和 3.9~70.6 倍。有研究表明, 光滑念珠菌 CDR1 与 CDR2 所编码的 ABCT 在氨基酸序列上有 70% 以上的同源性, 所转运的底物也高度相似, 但 Cdr1p 的药物外排能力更强, 在耐药性形成中起主导作用<sup>[8]</sup>。目前有关 CDR1 和 CDR2 表达的调控机制还不是很清楚。Vermitsky 和 Edlind<sup>[9]</sup>认为, CDR1 与 CDR2 的表达具有相同的转录调节因子 PDR1, 它们由一个共同的机制来进行调控。Tsai 等<sup>[10]</sup>研究也发现 PDR1 突变可引起 PDR1 mRNA 表达的上调, 进而上调 CDR1 的表达, 在光滑念珠菌耐药性形成中起到重要的作用。

ERG11 是羊毛甾醇 14 $\alpha$ -去甲基化酶(14-DM)的编码基因, 本研究发现耐药组 ERG11 基因的表达与敏感组差异有统计学意义, 耐药组的表达量要高于敏感组, 说明光滑念珠菌耐药与 ERG11 基因的过度表达有关。Rogers 等<sup>[11]</sup>也报道, 耐药菌株 ERG11 的表达量高于敏感株, 说明光滑念珠菌可通过上调 ERG11 mRNA 的表达, 引起 ERG11 表达量增多而引起耐药。同时, 沈银忠等<sup>[12]</sup>发现光滑念珠菌 ERG11 基因序列存在多态性, 但未发现因 ERG11 基因突变引起靶酶氨基酸改变而导致的光滑念珠菌对氟康唑耐药。

本实验还发现, 并不是所有的氟康唑耐药菌株都会同时出现上述基因的高表达, 说明光滑念珠菌耐药性的产生同时存在许多不同的机制。因此, 加强对临床治疗失败案例的分析, 深入研究抗真菌药物的耐药机制, 对发现新的抗真菌药物治疗靶点, 增强现有治疗的效果和减少耐药的发生有着重要的意义。

## 参考文献

- [1] Martins HPR, Silva MLD, Paiva LCF, et al. Efficacy of Fluconazole and Nystatin in the Treatment of Vaginal Candida Species [J]. Acta Derm Venereol, 2012, 92: 78-82.
- [2] Gygax SE, Vermitsky JP, Chadwick SG, et al. Antifungal Resistance of Candida glabrata Vaginal Isolates and Development of a Quantitative Reverse Transcription-PCR-Based Azole Susceptibility Assay [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, (下转第 1564 页)

### 湿化学分析系统(7170)与干化学分析系统(VITROS 250)

不精密度( $CV$ )比较,  $P < 0.05$ , 差异有统计学意义, 干化学分析系统( $\bar{x}, 3.63$ )好于湿化学分析系统( $\bar{x}, 2.42$ )。计算分析总误差, 湿化学分析系统(9.24)与干化学分析系统(6.63)比较,  $P > 0.05$ , 差异无统计学意义。分析性能  $\sigma$  值: 干化学分析系统  $\sigma > 4$  为 10 项(66.7%), 其中  $\sigma > 6$  的 4 项,  $6 > \sigma > 5$  的 3 项,  $5 > \sigma > 4$  的 3 项;  $4 > \sigma > 3$  的 3 项,  $3 > \sigma > 2$  的 2 项。湿化学分析系统  $\sigma > 4$  为 3 项(20%), 其中  $\sigma > 6$  的 2 项,  $5 > \sigma > 4$  的 1 项;  $4 > \sigma > 3$  的 7 项,  $3 > \sigma > 2$  的 1 项,  $\sigma < 2$  的 4 项。 $\sigma_1$  与  $\sigma_2$  比较,  $P < 0.05$ , 差异有统计学意义, 干化学分析系统( $\bar{x}, 5.16$ )好于湿化学分析系统( $\bar{x}, 3.40$ )。由于计算项目分析总误差  $Z$  值取 2, 减小了  $CV$  在计算中的影响, 所以  $TE$  的比较差异无统计学意义, 同时说明  $CV$  在两个检测系统特别是湿化学分析系统需要进行高度关注, QGI 的计算也提示大多数项目需优先改进精密度。

$CV$ 、 $TE$  与分析  $F$  性能  $\sigma$  值受多种因素的影响, 因素涉及检验前、检验后及众多技术、质量及人员的影响。试剂(选用虽有溯源性声明但非原始配套系统)、仪器、校准品、SOP、质控品、人员、水质、环境温度及湿度等均可参与影响分析因素的计算, 但  $6\sigma$  质量管理体系的应用就是帮助实验室进行持续改进, 保证检验结果的质量。通过持续改进, 观察、分析指标的变化, 取得质量改进的证据; 或者发现即使通过改进仍无法获得满意的质量指标, 不能保证实验室质量目标的实现, 则是提示更换试剂或更换仪器或建立新的检测系统的标志。

$6\sigma$  质量管理方式不仅是临床实验室进行质量管理的重要工具, 而且其分析性能  $\sigma$  值与不精密度、分析总误差共同在评价同一实验室相同项目使用不同参考区间的检测系统或评估检测系统分析性能的衰减方面具有一定的参考价值, 为检测系统的更迭提供信号。

本文讨论的目的是进行质量改进。受选择数据及本实验室众多因素的影响, 本文的结论、数据不能说明具体目标试剂及目标仪器的优劣, 而且仪器购进使用的时间及保养的程度不尽相同, 仅仅是提供比较分析检测系统性能的方式。

(上接第 1560 页)

2008, 52(9): 3424-3426.

- [3] 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.
- [4] Borst A, Raimer MT, Warnock DW. Rapid acquisition of stable azole resistance by *Candida glabrata* isolates obtained before the clinical introduction of fluconazole[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(2): 783-787.
- [5] 周晓维, 张振国, 乐宏元, 等. 外阴阴道念珠菌病的病原检测及体外药敏试验[J]. 中国微生态学杂志, 2009, 21(8): 759-764.
- [6] Bennett JE, Izumikawa K, Marr KA. Mechanism of increased fluconazole resistance in *Candida glabrata* during prophylaxis[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(5): 1773-1777.
- [7] Posteraro B, Sanguineti M, Fiori B, et al. Caspofungin activity against clinical isolates of azole cross-resistant *Candida glabrata* overexpressing efflux pump genes[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2006, 58(2): 458-461.
- [8] Wada S, Tanabe K, Yamazaki A, et al. Phosphorylation of *Candida*

### 参考文献

- [1] 荣毅超, 张璐. 六西格玛管理理论及实践案例集[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 3-7.
- [2] 王治国.  $6\sigma$  质量标准在临床实验室质量控制的应用(I)[J]. 上海医学检验杂志, 2002, 17(2): 125-127.
- [3] 刘忠民, 高月亭, 肖洪广, 等.  $6\sigma$  质量标准在临床生化检验室内质量控制中的应用研究[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(3): 226-228.
- [4] 郝万鹏, 霍伊军. 六西格玛管理在临床生化检验项目中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(10): 1005-1006.
- [5] Westgard JO, Westgard SA. The quality of laboratory testing today: an assessment of  $\sigma$  metrics for analytic quality using performance data from proficiency testing surveys and the CLIA criteria for acceptable performance[J]. *Am J Clin Pathol*, 2006, 125(3): 343-354.
- [6] Coskun A. Six sigma and calculated laboratory tests[J]. *Clin Chem*, 2006, 52(4): 770-771.
- [7] 温志国, 王全哲, 安亮, 等.  $6\sigma$  质量管理体系在临床实验室质量持续改进中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(19): 2247-2249.
- [8] Nevalainen D, Berte L, Kraft C, et al. Evaluating laboratory performance on quality indicators with the six sigma scale[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2000, 124(4): 516-519.
- [9] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜, 等. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 78.
- [10] 王治国. 临床检验质量控制技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 101-102.
- [11] Westgard JO. Six sigma quality design and control[M]. 2nd ed. Madison: Westgard QC, 2006: 157-184.
- [12] 李萍, 刘小娟, 徐克和. 利用 Westgard 标准决定图判断测定方法性能[J]. 临床检验杂志, 2006, 24(1): 69-70.

(收稿日期: 2011-12-30)

*glabrata* ATP-binding cassette transporter Cdr1p regulates drug efflux activity and ATPase stability[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(1): 94-103.

- [9] Vermitsky JP, Edlind TD. Azole resistance in *Candida glabrata*: coordinate upregulation of multidrug transporters and evidence for a Pdr1-Like transcription factor[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(10): 3773-3781.
- [10] Tsai HF, Krol AA, Sarti KE, et al. *Candida glabrata* PDR1, a transcriptional regulator of a pleiotropic drug resistance network, mediates azole resistance in clinical isolates and petite mutants [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50(4): 1384-1392.
- [11] Rogers PD, Vermitsky JP, Edlind TD, et al. Proteomic analysis of experimentally induced azole resistance in *Candida glabrata*[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2006, 58(2): 434-438.
- [12] 沈银忠, 卢洪洲, 张永信. 耐氟康唑光滑念珠菌 ERG11 基因突变分析[J]. 中华传染病杂志, 2010, 28(6): 331-335.

(收稿日期: 2012-01-30)