

DOI: 10.13602/j.cnki.jcls.2020.01.03

PCR-RFLP 在 VVC 相关念珠菌菌种鉴定中的应用

丁文静, 渠巍, 文田甜 (贵阳市妇幼保健院检验科, 贵阳 550003)

摘要:目的 用限制性片段长度多态性聚合酶链反应 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 技术快速准确鉴定外阴阴道念珠菌病 (VVC) 相关念珠菌菌种, 并对科玛嘉显色培养法、Vitek 2 YST 鉴定卡和 PCR-RFLP 3 种方法鉴定念珠菌菌种的效果进行方法学评价。方法 收集贵阳市妇幼保健院 VVC 患者感染的念珠菌菌种 100 株, 用十六烷基三甲基溴化铵法 (cetyltrimethylammonium bromide, CTAB) 法提取念珠菌 DNA, PCR 扩增念珠菌 DNA 的 ITS 片段并进行测序分析确定念珠菌菌种; 分别采用科玛嘉显色培养法、Vitek 2 YST 鉴定卡和 PCR-RFLP 3 种方法对其进行鉴定, 以测序结果为“金标准”, 比较 3 种方法鉴定念珠菌菌种的正确率。结果 科玛嘉显色培养法中 5 株葡萄牙念珠菌与 2 株酿酒念珠菌显色错误, 均显淡紫色; Vitek 2 YST 鉴定卡中, 1 株白念珠菌与 2 株热带念珠菌鉴定不出, *Cyberlindnera fabianii*、*Candida orthopsilosis* 与 *Candida metapsilosis* 鉴定错误; PCR-RFLP 采用内切酶 *Msp I* 可成功鉴定念珠菌中除 *Candida metapsilosis*、*Candida orthopsilosis* 与近平滑念珠菌之外的其他菌种, 进一步采用内切酶 *Apa I* 与 *Nco I* 可将 *Candida metapsilosis*、*Candida Orthopsilosis* 与近平滑念珠菌三者鉴别开。科玛嘉显色培养法对白念珠菌、克柔念珠菌、热带念珠菌等 3 种念珠菌鉴定正确率 100%, 对光滑念珠菌的鉴定正确率为 73.1%; Vitek 2 YST 鉴定卡可鉴定常见念珠菌且正确率较高, 不能鉴定 *Cyberlindnera fabianii*、*Candida orthopsilosis* 与 *Candida metapsilosis* 等非常见念珠菌; PCR-RFLP 技术可快速准确鉴定所有念珠菌菌种。结论 PCR-RFLP 技术为早期准确鉴定临床念珠菌感染提供了新的选择, 具有很好的应用前景。

关键词: 限制性片段长度多态性聚合酶链反应; 念珠菌; 方法学评价

中图分类号: R446.5

文献标志码: A

Application of PCR-RFLP in identification of vulvovaginal candidosis-related *Candida* strains

DING Wenjing, QU Wei, WEN Tiantian (Department of Clinical Laboratory, Guiyang Maternal and Child Health Care Hospital, Guiyang 550003, Guizhou, China)

Abstract: Objective To identify rapidly and accurately the vulvovaginal candidosis (VVC)-related *Candida* species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technology, and compare the results of CHROMagar chromogenic method, Vitek 2 YST identification card and PCR-RFLP to evaluate its methodological quality. **Methods** A total of 100 strains of *Candida* species were collected from VVC infected subjects in Guiyang Maternal and Child Health-Care Hospital. *Candida* DNA was extracted by cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) method. The ITS fragments of *Candida* DNA were amplified and sequenced, and the sequence was considered as the “gold standard” for the detection. The accuracy, sensitivity and specificity of three methods, i.e., CHROMagar chromogenic method, Vitek 2 YST identification card and PCR-RFLP, in the identification for *Candida* species were compared. **Results** In the results of identification by CHROMagar chromogenic method, 5 strains of *Portuguese yeasts* and 2 strains of *Saccharomyces cerevisiae* showed wrong lilacy colour. By Vitek 2 YST identification card, 1 strain of *Candida albicans* and 2 strains of *Candida tropicalis* could not be identified and the identification results of *Cyberlindnera fabianii*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* were wrong. By using endonuclease *Msp I* enzyme PCR-RFLP method could successfully identify all the *Candida* species except *Candida albicans*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* which could be differentiated further by using endonuclease *Apa I* and *Nco I*. The accuracy rates of identification results by CHROMagar chromogenic method was all 100% for *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida tropicalis*, but low specificity (73.1%) for *Candida glabrata*. Vitek 2 YST identification card could identify common *Candida* with high accuracy, but could not identify the rare *Candida*, such as *Cyberlindnera fabianii*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis*. PCR-RFLP technique could identify all *Candida* species quickly and accurately. **Conclusion** PCR-RFLP technique may provide a new option for early and accurate identification of clinical *Candida* infection, which should have good application prospect.

Key words: polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism; *Candida*; methodological evaluation

外阴阴道念珠菌病 (vulvovaginal candidosis, VVC) 是妇科常见的感染性疾病, 反复感染极易发

展成为复发性外阴阴道念珠菌病 (recurrent vulvovaginal candidiasis, RVVC), 是临床研究和治疗的重

作者简介: 丁文静, 1985 年生, 男, 技师, 硕士, 主要从事临床微生物检验工作。

通信作者: 渠巍, E-mail: 306255115@qq.com。

点和难点^[1]。VVC 及 RVVC 的主要致病菌为白念珠菌,但是随着免疫缺陷人群的增多,免疫抑制剂在临床上的使用频率增加,常规抗真菌药物的广泛使用等因素使非白念珠菌引起的念珠菌病越来越多,白念珠菌分离率呈明显下降趋势。然而,不同念珠菌对抗真菌药物的敏感性存在差异,研究发现,非白念珠菌对同种药物的敏感性明显低于白念珠菌,光滑念珠菌对两性霉素 B 和三唑类抗真菌药物的耐药性较高,克柔念珠菌对氟康唑天然耐药^[2-3]。所以,早期、准确鉴定念珠菌菌种(特别是非白念珠菌)将有利于指导临床治疗。

近年来,分子生物学的飞速发展微生物的鉴定工作提供了新的途径,其中,限制性内切酶片断长度多态性 PCR (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 因其操作简便,灵敏度和特异性较高等特点,广泛应用于多种微生物的鉴定。本研究期望应用 PCR-RFLP 分析法对多个念珠菌菌种进行鉴定,并且以念珠菌 ITS 区段测序结果为“金标准”,对科玛嘉显色培养法、Vitek 2 YST 鉴定卡、PCR-RFLP 3 种方法对念珠菌菌种的鉴定效果进行比较分析,进而选择一种简单、快速、准确的鉴定方法。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源 收集贵阳市妇幼保健院 2015 年 6 月—2016 年 5 月 VVC 相关念珠菌培养阳性菌株 100 株。白念珠菌 ATCC 90028、近平滑念珠菌 ATCC 22019、克柔念珠菌 ATCC 6258 由贵州医科大学南校区临床医学研究中心馈赠,热带念珠菌 ATCC 13803、光滑念珠菌 ATCC 15126 购于北京中科质检有限公司。临床菌株和标准菌株均用石蜡油保存法保存菌种。

1.2 主要试剂与仪器 PCR mix、引物(ITS1:5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'/ITS4:5'-TCCTCCGC TTATTGATATGC-3')、*Msp* I 酶、*Apa* I 酶、*Nco* I 酶(贵州宏达尔生物科技有限公司),沙保罗琼脂平板(郑州安图生物工程公司),科玛嘉显色培养基(法国 Chromagar 公司),Vitek 2 YST 鉴定卡(法国生物梅里埃公司);Vitek 2 Compact 仪(法国生物梅里埃公司),9700 PCR 扩增仪(美国 ABI 公司),电泳仪和凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 方 法

1.3.1 PCR 扩增 十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)法提取 DNA,使用真菌通用引物 ITS1 和 ITS4 进行 PCR 扩增。PCR

反应体系为 13 μ L PCR mix, 10 μ L ddH₂O, 1 μ L ITS1 引物, 1 μ L ITS4 引物, 1 μ L DNA 样品。扩增条件:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。扩增产物送往生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,将测序结果提交 NCBI 的 Blast 软件进行比对分析(Nucleotide BLAST),确定念珠菌菌种。

1.3.2 PCR-RFLP 技术鉴定念珠菌 PCR 方法同 1.3.1。用限制性核酸内切酶 *Msp* I、*Apa* I 与 *Nco* I 对筛选出的 100 株念珠菌及 5 株标准菌株的 PCR 扩增产物进行酶切分析。将 PCR 扩增产物用限制性核酸内切酶 *Msp* I 进行酶切,37 $^{\circ}$ C 反应 2 h,同时,对疑似近平滑念珠菌的菌株分别采用 *Apa* I 与 *Nco* I 进行二次酶切,37 $^{\circ}$ C 反应 2 h。酶切产物于 20 g/L 琼脂凝胶电泳后在凝胶成像系统中显像,比较酶切后的电泳条带,确定念珠菌菌种。不同念珠菌种的 ITS 核苷酸序列不同,限制性核酸内切酶能够识别并附着特定的核苷酸序列,并对特定部位的核苷酸进行酶切,不同菌种就会产生不同大小的酶切片段。

1.3.3 科玛嘉显色培养基鉴定念珠菌 采用沙保罗琼脂培养基对 105 株念珠菌进行复苏,传代培养后挑选单个菌落接种于科玛嘉显色培养基,25 $^{\circ}$ C 培养 48 h 后观察结果。显色结果判读标准:生长呈绿色菌落为白念珠菌,蓝灰色或铁蓝色菌落为热带念珠菌,粉红色(绒毛状)菌落为克柔念珠菌,淡紫色菌落为光滑念珠菌,白色为其他念珠菌。

1.3.4 Vitek 2 YST 鉴定卡鉴定念珠菌 将 105 株念珠菌复苏至沙保罗琼脂平板,传代培养后,按照 Vitek 2 Compact 仪(version 7.01)的标准操作规程,挑取纯菌落进行生化鉴定,并记录鉴定结果。

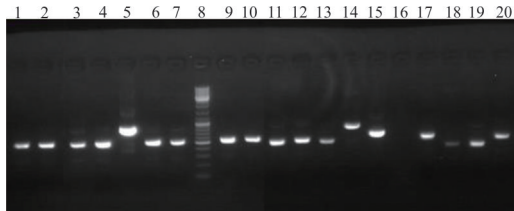
2 结 果

2.1 105 株念珠菌的测序结果 5 株标准菌株测序结果分别为白念珠菌、近平滑念珠菌、克柔念珠菌、热带念珠菌和光滑念珠菌各 1 株。100 株临床菌株测序结果为白念珠菌 41 株,光滑念珠菌 18 株,克柔念珠菌 8 株,热带念珠菌 10 株,近平滑念珠菌 5 株,挪威念珠菌 3 株,葡萄牙念珠菌 6 株,酿酒念珠菌 2 株,*Cyberlindnera fabianii* 5 株,*Candida orthopsilosis* 1 株,*Candida metapsilosis* 1 株。

2.2 PCR-RFLP 法鉴定结果

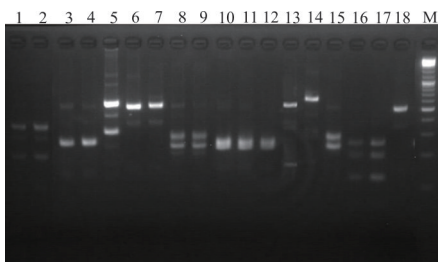
2.2.1 *Msp* I 酶切结果 PCR-RFLP 法中被 *Msp* I 酶切割为 271 bp、240 bp 左右的 2 条条带的白念珠菌 42 株(包含标准菌株 1 株),被切割为 533 bp、

317 bp 左右的 2 条条带的光滑念珠菌 19 株(包含标准菌株 1 株),被切割为 316 bp、187 bp 左右的 2 条条带的热带念珠菌 11 株(包含标准菌株 1 株),被切割为 250 bp、232 bp 左右的 2 条条带的克柔念珠菌 9 株(包含标准菌株 1 株),被切割为 527 bp、148 bp 左右的 2 条条带的酿酒念珠菌 2 株,被切割为 230 bp、119 bp 左右的 2 条条带的葡萄牙念珠菌 6 株,被切割为 227 bp、231 bp 左右的 2 条条带的挪威念珠菌 3 株,没有酶切位点、电泳产生 596 bp 左右的 1 条条带的 *Cyberlindnera fabianii* 5 株,电泳产生 500 bp 左右的 1 条条带的菌株 8 株(包含近平滑念珠菌标准菌株 1 株)。见图 1、图 2。



注:1,2,热带念珠菌 2 株;3,4,挪威念珠菌 2 株;5,光滑念珠菌 1 株;6,近平滑念珠菌 1 株;7, *Candida metapsilosis* 1 株;8, DNA marker; 9、10,白念珠菌 2 株;11、12、13,克柔念珠菌 3 株;14,酿酒念珠菌 1 株;15, *Cyberlindnera fabianii* 1 株;16,空白对照;17,白念珠菌 1 株;18、19,葡萄牙念珠菌 2 株;20, *Candida orthopsilosis* 1 株。

图 1 18 株念珠菌 PCR 产物电泳分析



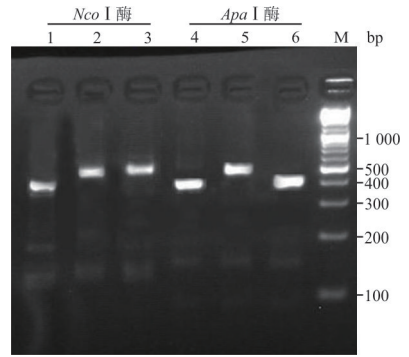
注:1—18,分别为热带念珠菌 2 株、挪威毕赤念珠菌 2 株、光滑念珠菌 1 株、近平滑念珠菌 1 株、*Candida metapsilosis* 1 株、白念珠菌 2 株、克柔念珠菌 3 株、酿酒念珠菌 1 株、*Cyberlindnera fabianii* 1 株、白念珠菌 1 株、葡萄牙念珠菌 2 株、*Candida orthopsilosis* 1 株;M, DNA marker。

图 2 18 株念珠菌 *Msp* I 酶切结果

2.2.2 疑似近平滑念珠菌的 *Apa* I、*Nco* I 酶切结果

经 *Msp* I 酶切后产生 500 bp 左右的菌株进行二次酶切,被 *Apa* I 酶、*Nco* I 酶均切割为 408、78 bp 左右的 2 条条带的 *Candida orthopsilosis* 1 株,仅被 *Apa* I 酶切割为 414、89 bp 左右的 2 条条带的 *Candida metapsilosis* 1 株;均不被 *Apa* I 酶、*Nco* I 酶切的近平滑念珠菌 6 株(包含标准菌株 1 株)。见图 3。

2.3 显色培养基、Vitek 2 YST 鉴定卡结果及 3 种方法比较分析



注:1~6,分别为 *Candida Orthopsilosis* 1 株、近平滑念珠菌 1 株、*Candida metapsilosis* 1 株、*Candida Orthopsilosis* 1 株、近平滑念珠菌 1 株、*Candida metapsilosis* 1 株;M, DNA marker。

图 3 疑似近平滑念珠菌的 *Apa* I、*Nco* I 酶切结果

2.3.1 法国科玛嘉显色培养基(CHROMagar)鉴定结果 105 株念珠菌中,白念珠菌、热带念珠菌、克柔念珠菌在法国科玛嘉显色培养基上均显色正确。鉴定错误的 7 株菌落显紫色的菌株,经 PCR 扩增结果为 5 株葡萄牙念珠菌,2 株酿酒念珠菌。见表 1。

表 1 法国科玛嘉显色培养基(CHROMagar)鉴定结果

菌种	株数	CHROMagar 鉴定结果	鉴定错误株数
白念珠菌	42	42	0
光滑念珠菌	19	26	7
热带念珠菌	11	11	0
克柔念珠菌	9	9	0
其他念珠菌	24	17	7

2.3.2 Vitek 2 YST 鉴定卡鉴定结果 105 株菌株中,1 株白念珠菌与 2 株热带念珠菌 Vitek 2 YST 鉴定卡鉴定不出, *Cyberlindnera fabianii*、*Candida orthopsilosis* 与 *Candida metapsilosis* 鉴定错误,其余菌株均鉴定正确。鉴定错误菌株均进行 2 次重复试验,结果一致。见表 2。

表 2 Vitek 2 YST 鉴定卡鉴定结果

菌种	株数	Vitek 2 YST 鉴定卡结果	鉴定错误株数
白念珠菌	42	41	1
光滑念珠菌	19	19	0
热带念珠菌	11	9	2
克柔念珠菌	9	9	0
近平滑念珠菌	6	8	2
挪威念珠菌	3	3	0
葡萄牙念珠菌	6	6	0
酿酒念珠菌	2	2	0
<i>Cyberlindnera fabianii</i>	5	0	5
<i>Candida orthopsilosis</i>	1	0	1
<i>Candida metapsilosis</i>	1	0	1

2.3.3 3 种方法比较及方法学评价 科玛嘉显色培养基对白念珠菌、克柔念珠菌、热带念珠菌等 3 种念珠菌鉴定正确率 100%,对光滑念珠菌的鉴定正确

率为 73.1%; Vitek 2 YST 鉴定卡可鉴定常见念珠菌且正确率较高,不能鉴定 *Cyberlindnera fabianii*、*Candida orthopsilosis* 与 *Candida metapsilosis* 等非常见念珠菌; PCR-RFLP 技术可准确鉴定所有念珠菌菌种。见表 3。

表 3 3 种方法鉴定 105 株念珠菌的比较分析

菌种	正确率(%)		
	显色	YST 鉴定卡	PCR-RFLP
白念珠菌	100.0	97.6	100.0
光滑念珠菌	73.1	100.0	100.0
热带念珠菌	100.0	81.8	100.0
克柔念珠菌	100.0	100.0	100.0
近平滑念珠菌	0	75.0	100.0
挪威念珠菌	0	100.0	100.0
葡萄牙念珠菌	0	100.0	100.0
酿酒念珠菌	0	100.0	100.0
<i>Cyberlindnera fabianii</i>	0	0	100.0
<i>Candida orthopsilosis</i>	0	0	100.0
<i>Candida metapsilosis</i>	0	0	100.0

3 讨论

临床实验室主要是通过直接镜检、显色培养基、生化鉴定等方法来鉴定念珠菌菌种,其中,显色培养基具有操作简便、快速的优点,且试剂材料价格适中,便于临床使用。研究发现,光滑念珠菌、白念珠菌在科玛嘉显色培养基上也会显白色,汉逊念珠菌和酿酒念珠菌在显色培养基上绝大部分呈紫色^[4]。显色培养基对光滑念珠菌的鉴定效果也存在一定的争议。本研究使用科玛嘉显色培养法能准确鉴定白念珠菌、克柔念珠菌、热带念珠菌等 3 种念珠菌,对光滑念珠菌的鉴定敏感性高,但特异性较低。但由于本次研究的菌株数较少,需进一步增加实验数据进行验证。

Vitek 2 YST 鉴定卡可鉴定大部分念珠菌菌种,但操作较为繁琐且耗时长,对不同培养基上同一菌种的鉴定准确率也存在差异^[5]。同时,菌种数据库中没的少见念珠菌也不能得到准确的鉴定,且鉴定的前提是保证念珠菌的纯度,当遇到形态相似的混合念珠菌感染时,也可能被错当成 1 种念珠菌进行鉴定而导致结果错误。本次实验中,Vitek 2 YST 鉴定卡可准确鉴定 4 种常见念珠菌中的大部分菌株,而 1 株白念珠菌与 2 株热带念珠菌鉴定不出,其他念珠菌中,*Cyberlindnera fabianii* 被错误的鉴定为产脲念珠菌(产脲念珠菌为 Vitek 鉴定结果,*Cyberlindnera fabianii* 为基因测序结果),*Candida orthopsilosis* 与 *Candida metapsilosis* 鉴定为近平滑念珠菌,其他念珠菌均鉴定正确,因此,此方法可用作科玛嘉显色培养法的补充。但不能准确鉴定 *Cyberlindnera fabianii*、*Candida orthopsilosis* 和 *Candida metapsilosis*

等非常见念珠菌,可能是由于这 3 种念珠菌比较少见,细菌鉴定库不完善导致。

随着分子生物学技术的不断发展,各种分子生物学技术逐步应用于微生物的鉴定^[6]。PCR-RFLP 具有灵敏度和特异性高、操作简便等特点,广泛应用于多种微生物的鉴定。Pakshir 等^[7]实验证明念珠菌 ITS 基因是念珠菌鉴定较传统方法更准确可靠的材料。Leena 等^[8]已成功应用 PCR-RFLP 方法鉴定临床常见致病性念珠菌。本次实验中,使用限制性核酸内切酶 *Msp I* 进行酶切,可将大部分念珠菌扩增产物切开,电泳后产生不同大小的特异性条带,可据此进行念珠菌的鉴定,其中近平滑念珠菌、*Candida orthopsilosis* 与 *Candida metapsilosis* 没有 *Msp I* 的酶切位点,且其基因序列长度相近,无法应用 *Msp I* 酶切的方法进行鉴定,而应用 *Nco I* 酶可将 *Candida orthopsilosis* 与近平滑念珠菌、*Candida metapsilosis* 2 种菌鉴别开,*ApaI*酶可进一步将近平滑念珠菌与 *Candida metapsilosis* 鉴别开。PCR-RFLP 技术不仅有利于常见念珠菌的鉴定,也有利于 *Cyberlindnera fabianii* 等非常见念珠菌的鉴定,为早期准确鉴定临床念珠感染提供了新的选择,具有很好的应用前景。

4 参考文献

- [1] Donders GG, Sobel JD. *Candida* vulvovaginitis: a store with a butterfly and a show window[J]. Mycoses, 2017, 60(2): 70-72.
- [2] 陈凤燕, 张丽霞, 徐柏平. 阴道假丝酵母菌病的病原菌耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 24(9): 2133-2137.
- [3] 侯欣, 范欣, 肖盟, 等. 光滑念珠菌药物敏感性与基因分型[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(10): 2207-2209.
- [4] Nagashima M, Yamagishi Y, Mikamo H. Antifungal susceptibilities of *Candida* species isolated from the patients with vaginal candidiasis [J]. J Infect Chemother, 2016, 22(2): 124-126.
- [5] 黄梅会, 郑霄, 吴华, 等. Vitek 2 Compact GN 卡用于不同培养基生长类鼻疽伯克霍尔德菌鉴定结果分析[J]. 临床检验杂志, 2019, 37(7): 518-520.
- [6] Elfeky DS, Gohar NM, El-Seidi EA, et al. Species identification and antifungal susceptibility pattern of *Candida*, isolates in cases of vulvovaginal candidiasis[J]. Alexandria J Med, 2015, 52(3): 269-277.
- [7] Pakshir K, Ghasemi N, Zomorodian K, et al. Identification and antifungal activity profile of *Candida* species isolated from patients with pemphigus vulgaris with oral lesions[J]. Acta Dermatovenerol Croat, 2019, 27(3): 137-141.
- [8] Leena Sankari S, Mahalakshmi K, Naveen Kumar V. Chromogenic medium versus PCR-RFLP in the speciation of *Candida*: a comparative study[J]. BMC Res Notes, 2019, 12(1): 681.

(收稿日期:2019-06-03)

(本文编辑:刘群)