

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2024.06.01

不同来源白色念珠菌的基因型及耐药性分析

迟灵芝,毛红彦,李婧,王洪利*

(山东畜牧兽医职业学院 山东潍坊 262601)

[收稿日期] 2023-11-07 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2024) 06-0001-06 [中图分类号] S859.79

[摘要] 为了研究不同来源白色念珠菌的基因型及耐药性情况,试验对患病鸡、鸭、鹅进行白色念珠菌的分离,用特异性引物扩增分离株的 25S rDNA 分析其基因型,用抗真菌药物伊曲康唑、制霉菌素、两性霉素 B 等对分离株进行耐药性分析。结果显示:从鸡、鸭、鹅中分离得到三株白色念珠菌 CaJ、CaY 和 CaE,其基因型分别为 A 型、A 型和 B 型,耐药性试验结果显示三株分离株对制霉菌素和两性霉素 B 均表现出了较高的敏感性,但对其它药物表现出不同程度的耐药性。说明部分药物临床中可能使用过多,来自不同家禽的白色念珠菌在耐药性方面有所不同。

[关键词] 白色念珠菌;基因型;耐药性;分离;抗真菌药物

Genotypes and Drug Resistance Analysis of *Candida Albicans* with Different Sources

CHI Ling-zhi, MAO Hong-yan, LI Jing, WANG Hong-li*

(Shandong Vocational Animal Science and Veterinary College, Weifang, Shandong 261061, China)

Corresponding author: WANG Hong-li, E-mail: 642910124@qq.com

Abstract: To study the genotypes and drug resistance of *Candida albicans* with different sources, *Candida albicans* were isolated and identified from diseased chicken, duck and goose, specific primers were used to amplify the 25S rDNA of *Candida albicans* to analyze the genotypes, and antifungal drugs such as itraconazole, nystatin and amphotericin B were used to analyze the drug resistance of the isolates. The results showed that three strains of *Candida albicans* CaJ, CaY and CaE were isolated from chicken, duck and goose, and their genotypes were type A, type A and type B, respectively. The drug resistance test results showed that the three isolates showed high sensitivity to nystin and amphotericin B, but showed different resistance to other drugs. These results indicated that some drugs may be overused in clinical, *Candida albicans* from different poultry varies in terms of resistance.

Key words: *Candida albicans*; genotype; drug resistance; isolate; antifungal drugs

基金项目:潍坊市科技惠民计划项目(2020KJHM23);潍坊市科技发展计划项目(2021GX035)

作者简介:迟灵芝,讲师,研究方向为动物传染病。

通讯作者:王洪利。E-mail:642910134@qq.com

白色念珠菌为一种共生性真菌,多寄生于健康人及动物的口腔和消化道中,通常无致病性^[1],能在宿主体内和有利于其生长繁殖的环境中长期生存。如果条件有利,则诱发机体发病^[2],是念珠菌中寄生范围最广,致病性最强的真菌^[3],也是所有入侵人类的真菌中发病率最高的^[4]。

多种动物对白色念珠菌病都表现出易感性,尤以禽类的易感性最高,鸡、鸭、鹅、火鸡等都可发病,患病家禽主要以消化道黏膜形成乳白色斑片或溃疡为特征^[5]。近年来,随着养殖规模的扩大,禽白色念珠菌病有日趋增多的趋势^[6-7],但目前国内外对禽白色念珠菌病的研究主要以其检测和诊断为对象,而对白色念珠菌的基因型及耐药性研究较少^[8]。为更好防控本病,应进一步从反应疾病病原的基因层面进行研究,此外,抗真菌药物的长期使用,使得白色念珠菌的耐药问题也日趋严重。为此,试验对不同家禽进行白色念珠菌的分离,检测其基因型并进行药物敏感性分析,旨在分析目前引起不同家禽发病的白色念珠菌的主要基因型及其耐药性情况,为临床患病家禽准确的基因分型及合理用药提供指导意义。

1 材料

念珠菌培养基购自青岛海博生物技术有限公司;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、真菌基因组 DNA 提取试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司;pMD18-T 载体、DNA Marker 等均购自天根生化科技(北京)有限公司;真菌药敏片两性霉素 B (10 μg)、制霉菌素(50 μg)、酮康唑(15 μg)、咪康唑(10 μg)、伊曲康唑(8 μg) 购自 ROSCO 公司;感受态细胞 DH5α 购自康为世纪生物科技有限公司,白色念珠菌阳性对照来自本实验室保存菌种。

2 方法

2.1 样品的来源及采集 样品来自到我校动物医院就诊的,患疑似白色念珠菌病的 4 月龄海兰蛋鸡、28 d 樱桃谷肉鸭及 75 d 朗德鹅,患病家禽发病率分别为鸡 35%、鸭 30%、鹅 65%,临床表现精神沉郁、采食量下降,口腔和食道形成白色假膜或溃疡。据养殖户介绍,家禽患病后,部分禽场曾用伊曲康唑、咪康唑进行过治疗,效果不理想。

样品采集时,先将无菌棉棒沾取少量灭菌盐水,轻轻擦取患病鸡、鸭、鹅的口腔及食道分泌物,然后立即将棉棒均匀涂布于念珠菌显色培养基中。

2.2 病原的分离培养 将上述涂布的念珠菌显色培养基,培养于 26 ℃ 真菌培养箱中,倒置培养。2~3 d 后挑取念珠菌显色培养基中呈现绿色的单个菌落进一步纯化及革兰染色镜检,观察分离株的染色特性。

2.3 分离株的 PCR 鉴定 挑取念珠菌显色培养基中呈现绿色的单个菌落,纯化培养后,无菌 PBS 洗脱菌苔,收集其洗脱液。用试剂盒提取分离株基因组 DNA,并以此为模板按本实验室建立的方法扩增不同分离株的 ITS 序列,进行 PCR 鉴定,目的条带大小约 530 bp,同时用本实验室已鉴定保存的白色念珠菌作为阳性对照。

2.4 分离株的测序鉴定 回收上述 PCR 扩增产物,与 pMD18-T 载体链接,用热激法转化感受态细胞 DH5α,筛选阳性克隆,送生工生物工程(上海)股份有限公司测定分离株序列。BLAST 比对分离株序列与 GenBank 库中已有序列,找出相似性最高的菌株,确定分离株是否为白色念珠菌,然后用 DNA Star 软件进行核苷酸序列相似性比较。

2.5 分离株基因型的鉴定 按文献方法^[9]合成一对特异性引物,对经鉴定为阳性的白色念珠菌分离株,扩增其 25S rDNA I 型内含子序列,分析分离株的基因型。引物序列为:上游引物 5'-ATAAGG-GAAGTCGGCAAAATAGATCCGTAA-3';下游引物 5'-CCTTGGCTGTGGTTTCGCTAGATAGTAGAT-3',由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。反应条件 94 ℃ 3 min;95 ℃ 1 min;62 ℃ 1 min;72 ℃ 30 s;扩增 35 个循环,最后 72 ℃ 延伸 10 min。20 μL PCR 扩增体系为:模板 DNA 1.5 μL,上、下游引物各 1 μL,ddH₂O 6.5 μL,2 × EsTaqMasterMix 10 μL。取 5 μL PCR 产物,琼脂糖凝胶电泳观察扩增结果,根据扩增产物的大小确定其基因型:基因 A 型片段大小为 480 bp,基因 B 型片段大小为 840 bp,基因 C 型片段大小为 840 bp 和 480 bp,基因 D 型片段大小为 1080 bp,基因 E 型片段大小为 1400 bp^[10]。

2.6 分离株耐药性分析 念珠菌显色培养基中接

种来自不同家禽的白色念珠菌,26 ℃ 培养 24 h 进行活化,无菌挑取单个菌落划线于沙氏琼脂平板,划线完成后,贴上各真菌药敏片,26 ℃ 培养 24 h,观察白色念珠菌的耐药情况,卡尺测量抑菌圈直径大小,按表 1 标准判读结果。

表 1 ROSCO 纸片扩散法抑菌圈判读标准

Tab 1 Standard of ROSCO disk diffusion method for inhibition zone interpretation

抗真菌药名称	敏感	中介	耐药
伊曲康唑	≥20 mm	10 - 14 mm	≤11 mm
制霉菌素	≥15 mm	10 - 14 mm	无抑菌圈
两性霉素 B	≥15 mm	10 - 14 mm	无抑菌圈
咪康唑	≥20 mm	12 - 19 mm	≤11 mm
酮康唑	≥20 mm	12 - 19 mm	≤11 mm

3 结果与分析

3.1 患病鸡、鸭、鹅的食道病变 患病鸡、鸭、鹅的食道均表现出不同程度的溃疡,并且有豆腐渣样物假膜覆盖,见图 1。

3.2 分离株的分离结果 从患病鸡、鸭、鹅中分离到疑似白色念珠菌各一株,分离株在显色培养基中呈现绿色、边缘整齐、表面光滑、中央隆起的圆形菌落(图 2A),革兰染色镜检分离株呈现革兰阳性、卵圆形大菌落(图 2B)。

3.3 分离株的 PCR 鉴定 将上述各疑似白色念珠菌分离株,按本实验室建立的方法扩增 ITS 序列进行 PCR 鉴定,结果均得到约 530 bp 左右的目的条带,见图 3。

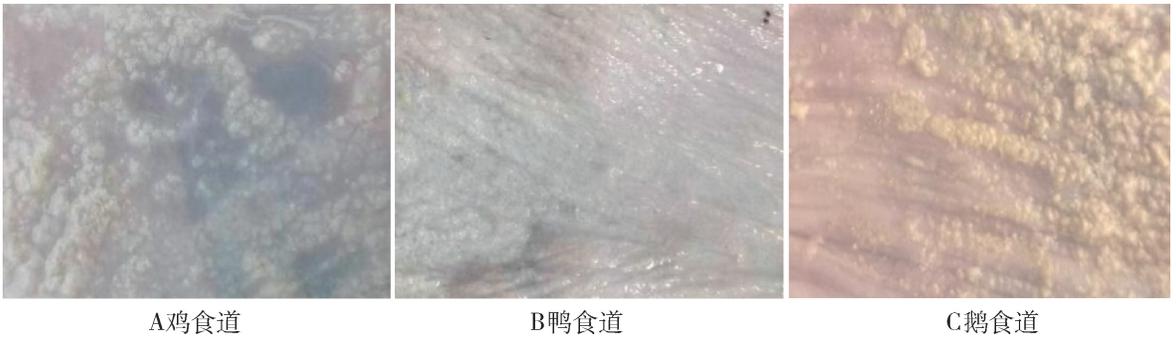
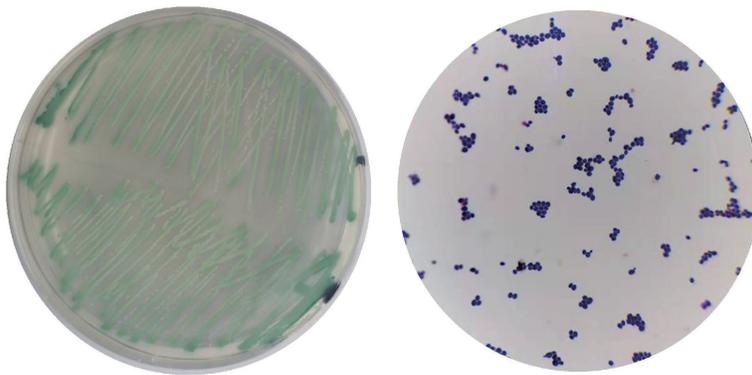


图 1 患病鸡、鸭、鹅的食道病变

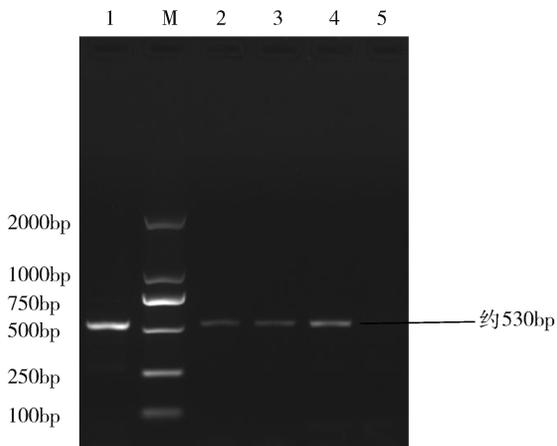
Fig 1 Esophageal lesions of diseased chicken, duck and goose



A 分离株显色培养基中菌落形态 B 分离株革兰染色形态(100×)

图 2 分离株的分离结果

Fig 2 The isolation results of the isolates



1. 阳性对照;2. 鸡源白色念珠菌;3. 鸭源白色念珠菌;
4. 鹅源白色念珠菌;5. 阴性对照;M. DL2000 DNA Marker

图 3 ITS 序列 PCR 扩增结果

Fig 3 Results of PCR amplification of ITS sequences

3.4 分离株的测序鉴定 将上述不同来源的分离株,测序得到的序列与 GenBank 中已发布序列进行 BLAST 比对,结果与各分离株相似度最高的均为白色念珠菌,用 DNA Star 软件将分离株与参考序列进行核苷酸序列相似性比较,其核苷酸序列相似性为 94.0% ~ 99.6% (图 4),分别将鸡源、鸭源和鹅源白色念珠菌命名为分离株 CaJ、CaY、CaE。

3.5 分离株的基因型 利用特异性引物,对不同源白色念珠菌 25S rDNA I 型内含子序列进行 PCR 扩增,结果显示分离株 CaJ 扩增产物大小为 840 bp,分离株 CaY 扩增产物大小为 840 bp,分离株 CaE 扩增产物大小为 480 bp(图 5),根据 2.5 中的判定方法,确定分离株 CaJ、CaY、CaE 基因型分别为 A 型、A 型和 B 型。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	█	96.3	96.1	99.8	97.0	99.6	94.9	99.4	99.4	100.0	99.6	99.6	1	MT131348.seq
2	3.9	█	99.8	96.1	93.3	95.9	92.0	95.8	96.3	96.3	96.3	96.3	2	MT314274.seq
3	4.1	0.2	█	95.9	93.1	95.7	91.8	95.6	96.1	96.1	96.1	96.1	3	MT314424.seq
4	0.2	4.1	4.3	█	96.8	99.4	94.8	99.2	99.3	99.8	99.4	99.4	4	MT411329.seq
5	3.1	7.1	7.3	3.2	█	97.0	94.0	96.6	96.4	97.0	96.6	96.6	5	caE.seq
6	0.4	4.3	4.5	0.6	3.1	█	95.3	99.4	99.4	99.6	99.6	99.6	6	caJ.seq
7	5.2	8.6	8.8	5.4	6.2	4.8	█	94.7	95.1	95.0	95.3	95.3	7	caY.seq
8	0.6	4.4	4.5	0.8	3.5	0.6	5.5	█	99.6	99.4	99.4	99.4	8	EF192231.seq
9	0.6	3.9	4.1	0.8	3.6	0.6	5.0	0.4	█	99.4	99.8	99.8	9	FJ662402.seq
10	0.0	3.9	4.1	0.2	3.1	0.4	5.2	0.6	0.6	█	99.6	99.6	10	JN606310.seq
11	0.4	3.9	4.1	0.6	3.4	0.4	4.8	0.6	0.2	0.4	█	100.0	11	KY101880.seq
12	0.4	3.9	4.1	0.6	3.4	0.4	4.8	0.6	0.2	0.4	0.0	█	12	LC612900.seq
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		

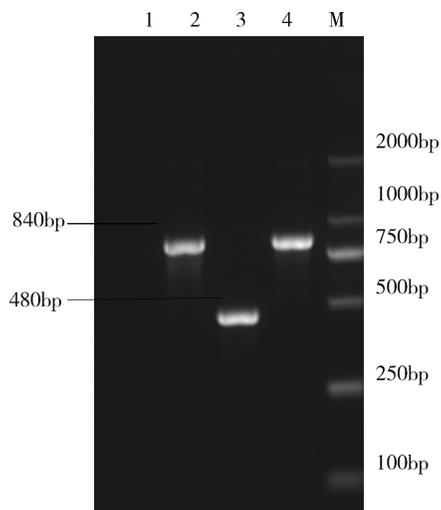
图 4 分离株与参考序列核苷酸同源性比较图

Fig 4 Comparison of nucleotide homology between isolates and reference sequences

3.6 分离株的耐药性分析 选用抗真菌药物伊曲康唑、制霉菌素、两性霉素 B、酮康唑、咪康唑对从鸡、鸭、鹅中得到的分离株 CaJ、CaY、CaE 进行药物敏感性试验,结果显示分离株 CaJ、CaY、CaE 对制霉菌素和两性霉素 B 均表现出了较高的敏感性,而 CaJ 和 CaY 分离株对伊曲康唑、咪康唑和酮康唑却出现了不同程度的耐药,但分离株 CaE 对上述药物均表现出良好的敏感性(图 6)。

4 讨论

白色念珠菌作为一种人畜共患病的病原菌,不仅可以导致家禽发病,人也可以感染,并且不同宿主间可能存在交叉感染^[11],李景媛^[12]等的研究还发现不同基因型白色念珠菌对抗真菌药物的耐药性有差异,因此研究不同家禽白色念珠菌的基因型和分布特点对禽白色念珠菌病的准确诊断和有效防治具有非常重要的意义。本研究通过基因分型方法确定了来自鸡、鸭、鹅的白色念珠菌 CaJ、CaY、



1. 阴性对照;2. CaJ 分离株扩增产物;3. CaE 分离株扩增产物;
4. CaY 分离株扩增产物;M. DL2000 DNA Marker

图 5 25S rDNA I 型内含子序列 PCR 扩增结果
Fig 5 PCR amplification of 25S rDNA type I intron sequence

CaE 分离株其基因型分别为 A 型、A 型和 B 型,对本地区禽白色念珠菌病的防控具有指导性意义。

随着养殖规模的扩大,近年来,禽白色念珠菌病的发病明显增多^[13-14],抗真菌药物长期使用,使得白色念珠菌的耐药问题日趋严重,对唑类耐药性尤为突出,甚至出现多重耐药菌株^[15]。因此,通过药敏试验选择出对家禽敏感性较强的药物,对于禽念珠菌病的防控起到越来越大的作用。目前,真菌药物敏感性的检测方法有纸片扩散法、微量肉汤稀释法和多种商品化试剂盒,其中微量肉汤稀释法 CLSLM27 是 1997 年美国临床和实验室标准协会(CLSL)公布的参考法案,称之为是在体外进行药敏检测的金标准,但该方法操作繁琐,判读困难,难以推广^[16]。商品化的真菌药敏检测试剂盒因价格昂贵,也限制了其在临床中的应用。而本研究选用的 ROSCO 纸片扩散法具有操作简单,判读方便,成本低的特点,此外,金兰^[17]等证实此方法与微量肉汤稀释法结果具有很好的一致性,适合在临床中进行大规模推广。

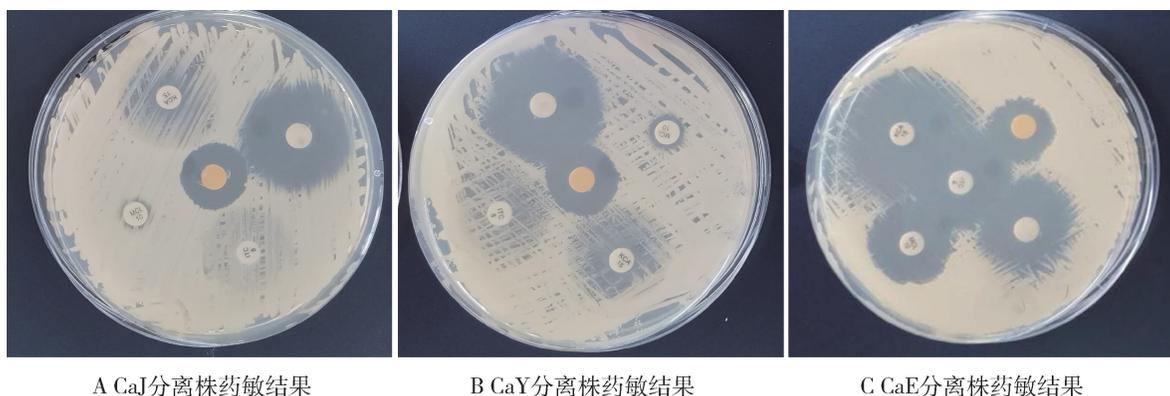


图 6 分离株的药敏试验结果

Fig 6 The results of drug sensitivity test of the isolates

不同来源白色念珠菌分离株 CaJ、CaY、CaE 的药物敏感性试验结果说明,CaJ、CaY 分离株对酮康唑、咪康唑和伊曲康唑产生了一定程度的耐药性,说明此三种药物在临床中存在使用过多或过量的问题,在今后的药物选择和使用中应引起重视。CaJ、CaY 分离株同属于基因 A 型,药物敏感性结果与基因型的一致性,说明其基因型和药物敏感性可

能存在一定的关联性。此外,三种分离株对制霉菌素和两性霉素 B 都表现出较高的敏感性,可用于本地区白色念珠菌病的治疗。此结果也进一步说明不同来源、不同基因型的白色念珠菌分离株对药物的敏感性存在一定的差异,在临床中应根据药敏试验的结果合理选取药物。

参考文献:

- [1] 于原玲. 不同来源白色念珠菌的分离鉴定及其致病性分析 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2015.
Yu Y L. Isolation of candida albicans strains from different origins and analysis their virulence [D]. Tai an: Shandong agricultural university, 2015. (in Chinese)
- [2] Erdogan A, Rao S S. Small intestinal fungal overgrowth [J]. *Current Gastroenterology Reports*, 2015, 17(4): 16.
- [3] Wang H, Xiao M, Chen S C, *et al.* In vitro susceptibilities of yeast species to fluconazole and voriconazole as determined by the 2010 National China Hospital Invasive Fungal Surveillance Net (CHIF - NET) study [J]. *Journal of clinical microbiology*, 2012, 50(12): 3952 - 3959.
- [4] Oeser C, Vergnano S, Naidoo R, *et al.* Neonatal invasive fungal infection in England 2004 - 2010 [J]. *Clinical microbiology and Infection*, 2014, 20(9): 936 - 941.
- [5] 祖全成, 靳兆江, 张庆德. 肉用仔鸡白色念珠菌病的诊治 [J]. *中国兽医科技*, 2000, 30(12): 50.
Zu Q C, Jing Z J, Zhang Q D. Diagnosis and treatment of candida albicans in broiler chickens [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2000, 30(12): 50. (in Chinese)
- [6] Moretti A, Piergili Fioretti D, Boncio L, *et al.* Isolation of Candida rugosa from turkeys [J]. *Journal of veterinary medicine B, Infectious diseases and veterinary public health*, 2000, 47(6): 433 - 439.
- [7] Wang H Z, Liu X D, Wang D X, *et al.* Isolation, identification and genotyping of Candida albicans from Landes geese [J]. *Transboundary and emerging diseases*, 2022, 69(2): 349 - 359.
- [8] 刘建钊, 马邯生, 柳焕章, 等. 肉鸡白色念珠菌的分离鉴定与基因分型 [J]. *中国兽医科学*, 2015, 45(10): 1005 - 1012.
Liu J C, Ma G S, Liu H Z, *et al.* Isolation, identification and genotyping of candida albicans from broilerchicke [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2015, 45(10): 1005 - 1012. (in Chinese)
- [9] 赵红, 王红健, 梁炜, 等. 口腔感染白色念珠菌的基因分型及药敏分析 [J]. *标记免疫分析与临床*, 2014, 21(3): 294 - 297.
Zhao H, Wang H J, Liang W, *et al.* Genotyping and Antifungal Susceptibility Test of Candida Albicans from Patients with Candidosis [J]. *Labeled Immunoassays and Clinical Medicine*, 2014, 21(3): 294 - 297. (in Chinese)
- [10] 王梅竹, 王颜颜, 曹煜, 等. 185 株白色念珠菌 25S rDNA 基因型分布特点 [J]. *贵阳医学院学报*, 2014, 39(5): 630 - 632.
Wang M Z, Wang Y Y, Cao Y, *et al.* Genotype Distribution of 185 Candida albicans 25S rDNA [J]. *Journal of Guizhou Medical University*, 2014, 39(5): 630 - 632. (in Chinese)
- [11] Kim J, Sudbery P. Candida albicans, a major human fungal pathogen [J]. *Journal of microbiology*, 2011, 49(2): 171 - 177.
- [12] 李景媛, 孙红英, 章强强. 萎缩糜烂型口腔扁平苔藓患者不同基因型白色念珠菌的药敏研究 [J]. *上海口腔医学*, 2011, 20(3): 300 - 303.
Ling J Y, Sun H Y, Zhang Q Q. Antifungal susceptibility test of genotypes of Candida albicans from patients with atrophic or erosive oral lichen planus [J]. *Shanghai Journal of Stomatology*, 2011, 20(3): 300 - 303. (in Chinese)
- [13] Gabaldon T, Martin T, Marcet - Houben M, *et al.* Comparative genomics of emerging pathogens in the Candida glabrata clade [J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 623.
- [14] Mugale M, Bhat A A, Gavhane D S, *et al.* Outbreaks of thrush in pigeons in Punjab State of India [J]. *Comparative clinical pathology*, 2015, 24(3): 635 - 638.
- [15] 纪凌云, 周爱萍, 马俊, 等. 白念珠菌唑类药物耐药机制研究进展 [J]. *中国感染与化疗杂志*, 2019, 19(2): 218 - 223.
Ji L Y, Zhou A P, Ma J, *et al.* Research updates on the mechanism of azole resistance in Candida albicans [J]. *Chinese Journal of Infection and Chemotherapy*, 2019, 19(2): 218 - 223. (in Chinese)
- [16] Ishida A, Ohto H, Yasuda H, *et al.* Anti - M antibody induced prolonged anemi following hemolytic disease of the newborn due to erythropoietic suppression in 2 siblings [J]. *Journal of Pediatr Hematology/ Oncology*, 2015, 37(6): e375 - e377.
- [17] 金兰, 蒋新良, 张荣. Rosco 纸片扩散法检测酵母样真菌对氟康唑药敏试验的评价 [J]. *中华检验医学杂志*, 2004, 27(1): 46 - 48.
Jin L, Jiang X L, Zhang R. The evaluation of rosco disk diffusion on fluconazole susceptibility test of yeast - like fungi [J]. *Chinese Journal of Laboratory Medicine*, 2004, 27(1): 46 - 48. (in Chinese)

(编辑: 陈希)