

· 综述 ·

光滑念珠菌及其相似种的鉴定、流行病学和抗真菌药物敏感性研究

冯晓博 姚志荣 廖万清

念珠菌病是由念珠菌属的某些种所致的原发或继发感染,可侵犯皮肤、黏膜和脏器,是最重要的机会性感染之一。近年来,由于广谱抗菌药物、糖皮质激素与免疫抑制剂的广泛应用,器官移植、导管技术、静脉高营养等治疗手段的开展以及肿瘤、白血病、严重烧伤、艾滋病等病种的增多,使得念珠菌所致院内感染呈上升趋势。据报道,念珠菌血症为住院患者最常见的侵袭性真菌病,病死率显著高于其他致病菌所致血流感染^[1]。据报道,白念珠菌仍为念珠菌血症中的主要致病菌,其次为光滑念珠菌、近平滑念珠菌和热带念珠菌。其中,光滑念珠菌所致疾病病死率最高,达 50.1%^[2]。1997~2007年,全球 ARTEMIS 监控项目对来自全球不同地区不同临床标本来源的念珠菌进行了流行病学分析,结果显示光滑念珠菌仅次于白念珠菌,成为第 2 位致病菌,其次为热带念珠菌和近平滑念珠菌。体外药敏结果显示,这 4 种念珠菌中,光滑念珠菌对三唑类药物的耐药率最高^[2]。故临床工作中对光滑念珠菌进行准确鉴定、开展流行病学和抗真菌药物敏感性分析对指导临床诊治和评估患者预后非常重要。

随着系统分类学研究的深入,更多的念珠菌种被发现与疾病相关。研究显示,一些常见的致病念珠菌如白念珠菌、近平滑念珠菌、光滑念珠菌中,可分离出表型上相似或相同的菌株,但其在系统分类上已被列为新的菌种^[3-4]。研究表明,这些新种与其相似种在生物膜形成、致病性及对抗真菌药物敏感性上存在显著差异^[5-7],使得在临床上鉴定这类新发现的致病菌逐渐显示其重要性。近年来,国外相继报道在临床中发现光滑念珠菌相似种 *Candida nivariensis* 和 *Candida bracarensis* 所致感染病例,另有研究对初步鉴定的光滑念珠菌进行大规模的新种排查,并评价了这些新种抗真菌药物敏感性特点^[8-11]。本文就光滑念珠菌及其相似种的鉴定方法、流行病学和抗真菌药物敏感性研究近况作一综述。

一、表型鉴定

念珠菌菌种的常规和生化鉴定通常包括尿素酶试验、芽管试验、厚壁孢子试验、碳源同化和发酵试验以及商品化的念珠菌显色培养、API20C AUX、ID32C 和 VITEK 2 全自动微生物分析系统等。但对光滑念珠菌及其相似种 *C. nivariensis* 和 *C. bracarensis* 通过表型上进行区分,主要通过以下两种方法。

科玛嘉显色培养基 (CHROMagar) 是一种通过在该培养

基上念珠菌菌落显色不同来区分临床常见念珠菌的方法。在该培养基上,白念珠菌、热带念珠菌和克柔念珠菌可显示相对特殊的菌落颜色,光滑念珠菌在该培养基上多表现为粉紫色。临床检验中,科玛嘉显色平板上显示白色菌落的念珠菌较少见。Alcoba-Florez 等^[9]发现 *C. nivariensis*、*C. bracarensis* 在该培养基上菌落呈白色,凭此可与光滑念珠菌相鉴别,之后有众多报道证实了该方法的可靠性^[12-17]。然而,由于上述报道中涉及的菌株数较少, Bishop 等^[13]在大样本的研究中对 154 株 (7 个种) 念珠菌进行检测发现,菌落在 30℃ 和 37℃ 下培养 48 h 后,最适宜判读结果。其中,8 株光滑念珠菌、1 株 *C. nivariensis*、6 株 *C. bracarensis*、2 株平常念珠菌和 1 株挪威念珠菌均显示白色菌落。Lockhart 等^[18]对全球范围内分离的 1598 株初步鉴定为光滑念珠菌的菌株进行筛查,发现 11 株光滑念珠菌、2 株 *C. bracarensis* 和 1 株 *C. nivariensis* 在科玛嘉显色平板上呈现白色菌落。因此,科玛嘉显色平板判读时存在假阳性可能,可作为初筛工具,显示白色菌落的菌株须结合其它方法进一步鉴定是否为 *C. nivariensis* 或 *C. bracarensis*。

另外,有研究报道 *C. nivariensis*、*C. bracarensis* 能发酵海藻糖,而光滑念珠菌则不能,据此可区分;但 3 者均能同化海藻糖^[8-9]。然而,不同的是, Borman 等^[14]报道 16 株 *C. nivariensis* 均不能同化海藻糖,而光滑念珠菌却能同化。Chowdhary 等^[17]报道 3 株 *C. nivariensis*、1 株光滑念珠菌、1 株 *C. bracarensis* 均能发酵海藻糖。在应用快速海藻糖试验进行判读时, Warren 等^[12]报道 *C. bracarensis* 呈阳性,而 *C. nivariensis* 为阴性。Bishop 等^[19]报道不同的 *C. bracarensis* 菌株在海藻糖同化和快速海藻糖试验中呈现不同结果,而 *C. nivariensis* 均为阴性结果。Fraser 等^[20]通过快速海藻糖试验发现,30/39 (77%) 的光滑念珠菌呈阳性,但次代培养 24 h 后,原先的阳性结果可发生变化。其余 9 株 (23%) 光滑念珠菌呈阴性反应,且反复转种培养后仍为阴性;而 6 株 *C. nivariensis*、1 株 *C. bracarensis* 和其它念珠菌均呈阴性反应,未发现假阳性反应。以上数据表明,海藻糖试验结果可变,报道不一。

二、分子鉴定

1. PCR 相关鉴定手段:多重 PCR 方法为在同一 PCR 体系中加入 2 对或以上引物,可实现同时鉴定多种病原体的目的。Romeo 等^[4]以核糖体 DNA 中的内转录间隔区 (ITS) 1 区和 5.8S 区为靶点,建立用于鉴定这 3 种相似种的多重 PCR 方法,通过对 59 株光滑念珠菌、3 株 *C. nivariensis* 和 4 株 *C. bracarensis* 进行该方法的验证,光滑念珠菌、*C. nivariensis*、*C. bracarensis* 经扩增分别获得 397 bp、293 bp 和 223 bp 不同大小的 DNA 片段。且受试的白念珠菌、近平滑念珠菌、季也蒙念珠菌等均扩增阴性,显示了引物的特异性。

对致病真菌的核糖体 DNA (rDNA) 进行序列和系统发育

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2013.01.032

基金项目:上海市医学真菌分子生物学重点实验室开放课题 (No. 20110001);上海市科委基金资助项目 (No. 10dz2220100)

作者单位:200092 上海,上海交通大学医学院附属新华医院皮肤科 (冯晓博,姚志荣);第二军医大学附属长征医院病原真菌分子生物学研究所 (廖万清)

通讯作者:姚志荣, Email: zyaosmu@sohu.com; 廖万清, Email: liaowanqing@sohu.com

分析,可用于鉴定致病菌的种属和估算相互间的进化关系。其中,对 ITS 区和 26S 大亚基的 D1/D2 区进行序列分析,常用于致病真菌种水平的鉴定,该方法已作为分子鉴定致病真菌的金标准。大部分研究均采用对 ITS 区^[21]、D1/D2 区^[19]或结合两者^[9,11-12,14-15,17,22]进行序列分析来鉴别光滑念珠菌及其相似种 *C. nivariensis* 和 *C. bracarensis*。另外,焦磷酸测序(Pyrosequencing)技术是新一代 DNA 序列分析技术,该技术无须电泳,DNA 片段也无须荧光标记,操作极为简便。Borman 等^[23]结合该技术分析 ITS2 区的部分区域,结果显示 16 株 *C. nivariensis* 均具有相同的特征性序列,以此区别于光滑念珠菌、白念珠菌、近平滑念珠菌和克柔念珠菌等其他念珠菌。

聚合酶链反应限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)分析已被广泛应用于致病真菌的鉴定和分型。作为鉴定手段,该方法具有简便、成本低和容易判读等优点。Mirhendi 等^[21]通过对核糖体 DNA 中的 D1/D2 区进行 PCR-RFLP 分析,采用 *TatI* 或 *AluI* 对扩增产物进行酶切后电泳,分析酶切谱型,准确鉴定 135 株光滑念珠菌、5 株 *C. nivariensis* 和 3 株 *C. bracarensis*。Cornet 等^[24]通过对核糖体基因间隔区(IGS)中的 IGS2 区进行 PCR-RFLP 分析,采用 *MlaIII* 对扩增产物进行酶切,并分析酶切谱型,准确鉴定 1 株 *C. bracarensis*、3 株 *C. nivariensis* 和 8 株光滑念珠菌。

通过 PCR 扩增,直接根据扩增片段大小进行菌种鉴定是更为简便的一种鉴定手段。有研究报道通过扩增 ITS1 区或 RPL31 基因部分片段,并分析扩增片段长度的不同来鉴别光滑念珠菌、*C. nivariensis* 和 *C. bracarensis*,而白念珠菌、近平滑念珠菌、热带念珠菌、克柔念珠菌等均扩增阴性^[21,25]。另外,Alcoba-Florez 等^[26]建立了一种特异扩增 PCR 即通过扩增条带的有无来鉴别相似种的方法。其根据 ITS 区核苷酸序列的差异,设计了扩增 *C. nivariensis* 的特异性引物,经对 *C. nivariensis* 和其余 32 株其它酵母菌进行扩增,仅 *C. nivariensis* 扩增获得 206 bp 大小片段,其余酵母菌均扩增阴性,显示了该引物良好的特异性。

2. 其他方法:肽核酸(peptide nucleic acid, PNA)是一种全新的 DNA 类似物,可以特异性地与 DNA 或 RNA 杂交,形成稳定的复合物。其与 DNA 或 RNA 分子的杂交能力远优于 DNA/DNA 或 DNA/RNA,表现在杂交稳定性、优良的特异序列识别能力、不被核酸酶和蛋白酶水解等特性。PNA 已被广泛用于病原体、遗传病检测的分子杂交中。肽核酸-荧光原位杂交法(peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization, PNA-FISH)便是将 PNA 作为探针应用于荧光原位杂交中。Bishop 等^[19]采用 *C. bracarensis* 的种特异性肽核酸探针进行 FISH,对 5 株 *C. bracarensis* 进行分子杂交,结果均呈阳性反应;且受试株未与 *C. nivariensis* 探针杂交,未显示交叉反应。Mirhendi 等^[21]亦采用该方法成功鉴定 135 株光滑念珠菌、5 株 *C. nivariensis* 和 3 株 *C. bracarensis*。

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF-MS)是近年来发展起来的一种新型的软电离生物质谱,具有简单、高效的优点。仪器主要由基质辅助激光解吸电离离子源(MALDI)和飞行时间质量分析器(TOF)两

部分组成。适用于混合物及生物大分子的测定。MALDI-TOF-MS 具有灵敏度高、准确度高及分辨率高等优点。已有报道将该方法用于致病真菌完整细胞的质谱分析,并显示其快速、准确的优点。Santos 等^[27]采用 MALDI-TOF-ICM 方法成功区分 6 株光滑念珠菌和 5 株 *C. bracarensis*。

三、流行病学研究

2005 年,Alcoba-Florez 等^[9]报道分别从肺脓肿患者的支气管肺泡灌洗液、胰腺炎合并肾功能衰竭患者的血标本中、腰痛患者的尿液标本中分离到表型类似光滑念珠菌的菌株,经对 ITS 和 D1/D2 区测序和系统发育分析并结合生化特征,命名其为新种:*C. nivariensis*。随后,Wahyuningsih 等^[22]报道在印度尼西亚的一例 HIV 感染者口咽部念珠菌病中分离到新种 *C. nivariensis*,并经测序证实。Fujita 等^[15]报道由 *C. nivariensis* 所致与导管有关的真菌血症 1 例。Chowdhary 等^[17]报道从 363 株临床分离酵母菌中分离到 2 株 *C. nivariensis*,分别来自患有肺炎的 HIV 感染者的痰液中和糖尿病患者血液中的。

2006 年,有研究报道从阴道分泌物和血标本中各分离到 1 株与光滑念珠菌表型相似的菌种,经对 26S D1/D2 区测序、系统发育分析并结合生化特征,首次命名其为新种:*C. bracarensis*^[8]。随后,Warren 等^[12]报道 1 例由 *C. bracarensis* 所致血流感染发生于慢性淋巴细胞白血病的骨髓移植患者。

随后,陆续有报道在初步鉴定为光滑念珠菌的大样本菌株库中筛查这些新种。Bishop 等^[19]对表型鉴定为光滑念珠菌(来源于尿液、粪便、咽部等标本)的 137 株菌株进行分子鉴定,结果显示 134 株为光滑念珠菌,3 株为 *C. bracarensis*。3 株 *C. bracarensis* 分别来源于急性粒细胞性白血病患者粪便标本、穿孔憩室炎患者的脓液标本和大 T 细胞淋巴瘤患者的咽部标本。西班牙的一项调查显示,143 株来自血液等标本初步鉴定为光滑念珠菌的菌株中,3 株(2%)为 *C. bracarensis*,未发现 *C. nivariensis*^[11]。Lockhart 等^[18]对全球范围内(包括北美、南美、欧洲、亚洲、澳洲、非洲)1598 株初步鉴定为光滑念珠菌的菌株进行筛查,发现 1 株 *C. nivariensis* 和 2 株 *C. bracarensis*。

四、药物敏感性试验

致病真菌的体外药物敏感性试验是临床治疗中药物选择的主要依据之一。在开展对光滑念珠菌相似种的临床分布和流行病学调查的同时,研究者对其体外抗真菌药敏特点进行了评价。Wahyuningsih 等^[22]对 HIV 感染者口咽部分离到的 1 株 *C. nivariensis* 进行药敏试验,结果显示其对氟康唑、伊曲康唑、伏立康唑均敏感,对两性霉素 B、氟胞嘧啶、泊沙康唑、艾沙康唑及卡泊芬净均显示低的 MICs 值。Fujita 等^[15]发现一株对氟康唑耐药的 *C. nivariensis* (MIC 值 > 128 μg/ml)。Chowdhary 等^[17]对 2 株 *C. nivariensis* 进行药敏检测,发现其对氟康唑、伊曲康唑、伏立康唑,两性霉素 B、氟胞嘧啶均敏感,对泊沙康唑、卡泊芬净显示低的 MICs 值。Warren 等^[12]发现 1 株 *C. bracarensis* 对伊曲康唑表现剂量依赖敏感,对其余受试三唑类及棘白菌素类药物均敏感。Bishop 等^[19]发现来源于咽部的 1 株 *C. bracarensis* 对所有三唑类药物均耐药,而其余 *C. bracarensis* 均显示敏感。

随后的研究中,研究者将新种与光滑念珠菌的药敏特点

进行了进一步的比较。Borman 等^[14]在评价 16 株 *C. nivariensis* 和 14 株光滑念珠菌对两性霉素 B、伏立康唑、伊曲康唑、泊沙康唑、卡泊芬净、氟胞嘧啶和氟康唑的药敏特征时,发现 *C. nivariensis* 较光滑念珠菌对三唑类及氟胞嘧啶敏感性低。Cuenca-Estrella 等^[11]发现 140 株光滑念珠菌和 3 株 *C. bracarensis* 显示相似的药敏结果。

五、结语

随着念珠菌病在院内感染中发病率的逐渐上升以及致病菌种谱的变化,使得在临床工作中准确鉴定菌种并分析其流行病学特征日益重要。光滑念珠菌作为仅次于白念珠菌的第 2 位致病菌,多与高病死率、唑类药物耐药等临床特征相关,而其相似种 *C. nivariensis* 和 *C. bracarensis* 的发现,更促使科研和临床工作者对该致病菌及其相似种开展了进一步的鉴定和流行病学分析。根据已有资料表明,表型鉴定结果不一,仅科玛嘉显色平板可作为初筛试验。ITS 和 26SD1/D2 区的序列分析作为真菌分子鉴定的金标准,是最多应用于 3 种相似种间鉴别的分子手段。其余方法中涉及的菌株数偏少或未证明可同时鉴别 3 者,而应用受限。国外研究表明,新种 *C. nivariensis*、*C. bracarensis* 在表型鉴定为光滑念珠菌的菌株中占 0.2% ~ 2.2%,其可分离于血液、痰液和尿液等常见临床标本中,已有资料显示其多分离于免疫抑制患者。与光滑念珠菌相比,新种 *C. nivariensis* 对三唑类药物的敏感性较差,而大部分 *C. bracarensis* 则与光滑念珠菌的药敏结果相似。亦有对该两新种不同的药敏结果报道,可能与菌株遗传背景或来源不同有关,须更大样本的资料进一步阐明。目前对以上两种新种的地域研究尚局限,国内尚未见报道,今后的研究将进一步阐明这类致病真菌的流行病学和抗真菌药物敏感性特点。

参 考 文 献

- 1 Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*, 2007, 20(1): 133-163.
- 2 Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, et al. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24, 179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis*, 2004, 39(3): 309-317.
- 3 Feng X, Ling B, Yang G, et al. Prevalence and distribution profiles of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* responsible for superficial candidiasis in a Chinese University Hospital. *Mycopathologia*, 2011, 173(4): 229-234.
- 4 Romeo O, Scordino F, Pernice I, et al. A multiplex PCR protocol for rapid identification of *Candida glabrata* and its phylogenetically related species *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis*. *J Microbiol Methods*, 2009, 79(1): 117-120.
- 5 Melo AS, Bizerra FC, Freymuller E, et al. Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp. isolates, including strains of the *Candida parapsilosis* complex. *Med Mycol*, 2011, 49(3): 253-262.
- 6 Orsi CF, Colombari B, Blasi E. *Candida metapsilosis* as the least virulent member of the *C. parapsilosis* complex. *Med Mycol*, 2010, 48(8): 1024-1033.
- 7 Ge YP, Boekhout T, Zhan P, et al. Characterization of the *Candida parapsilosis* complex in East China: species distribution differs among cities. *Med Mycol*, 2012, 50(1): 56-66.
- 8 Correia A, Sampaio P, James S, et al. *Candida bracarensis* sp. nov., a novel anamorphic yeast species phenotypically similar to *Candida glabrata*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2006, 56(Pt 1): 313-317.
- 9 Alcoba-Florez J, Mendez-Alvarez S, Cano J, et al. Phenotypic and molecular characterization of *Candida nivariensis* sp. nov., a possible new opportunistic fungus. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(8): 4107-4111.
- 10 Peman J, Canton E, Quindos G, et al. Epidemiology, species distribution and in vitro antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey. *J Antimicrob Chemother*, 2012, 67(5): 1181-1187.
- 11 Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Isla G, et al. Prevalence of *Candida bracarensis* and *Candida nivariensis* in a Spanish collection of yeasts: comparison of results from a reference centre and from a population-based surveillance study of candidemia. *Med Mycol*, 2011, 49(5): 525-529.
- 12 Warren TA, McTaggart L, Richardson SE, et al. *Candida bracarensis* bloodstream infection in an immunocompromised patient. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(12): 4677-4679.
- 13 Bishop JA, Chase N, Lee R, et al. Production of white colonies on CHROMagar *Candida* medium by members of the *Candida glabrata* clade and other species with overlapping phenotypic traits. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(10): 3498-3500.
- 14 Borman AM, Petch R, Linton CJ, et al. *Candida nivariensis*, an emerging pathogenic fungus with multidrug resistance to antifungal agents. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(3): 933-938.
- 15 Fujita S, Senda Y, Okusi T, et al. Catheter-related fungemia due to fluconazole-resistant *Candida nivariensis*. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(10): 3459-3461.
- 16 Mirhendi H, Bruun B, Schonheyder HC, et al. Molecular screening for *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* among Danish *Candida parapsilosis* group blood culture isolates: proposal of a new RFLP profile for differentiation. *J Med Microbiol*, 2010, 59(Pt 4): 414-420.
- 17 Chowdhary A, Randhawa HS, Khan ZU, et al. First isolations in India of *Candida nivariensis*, a globally emerging opportunistic pathogen. *Med Mycol*, 2010, 48(2): 416-420.
- 18 Lockhart SR, Messer SA, Ghera M, et al. Identification of *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* in a large global collection of *Candida glabrata* isolates: comparison to the literature. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(4): 1216-1217.
- 19 Bishop JA, Chase N, Magill SS, et al. *Candida bracarensis* detected among isolates of *Candida glabrata* by peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization: susceptibility data and documentation of presumed infection. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(2): 443-446.
- 20 Fraser M, Borman AM, Johnson EM. Evaluation of the commercial rapid trehalose test (GLABRATA RTT) for the point of isolation identification of *Candida glabrata* Isolates in primary cultures. *Mycopathologia*, 2012, 173(4): 259-264.
- 21 Mirhendi H, Bruun B, Schonheyder HC, et al. Differentiation of *Candida glabrata*, *C. nivariensis* and *C. bracarensis* based on

- fragment length polymorphism of ITS1 and ITS2 and restriction fragment length polymorphism of ITS and D1/D2 regions in rDNA. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2011, 30(11):1409-1416.
- 22 Wahyuningsih R, SahBandar IN, Theelen B, et al. *Candida nivariensis* isolated from an Indonesian human immunodeficiency virus-infected patient suffering from oropharyngeal candidiasis. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(1):388-391.
- 23 Borman AM, Linton CJ, Oliver D, et al. Pyrosequencing analysis of 20 nucleotides of internal transcribed spacer 2 discriminates *Candida parapsilosis*, *Candida metapsilosis*, and *Candida orthopsilosis*. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(7):2307-2310.
- 24 Cornet M, Sendid B, Fradin C, et al. Molecular identification of closely related *Candida* species using two ribosomal intergenic spacer fingerprinting methods. *J Mol Diagn*, 2011, 13(1):12-22.
- 25 Enache-Angoulvant A, Guitard J, Grenouillet F, et al. Rapid discrimination between *Candida glabrata*, *Candida nivariensis*, and *Candida bracarensis* by use of a singleplex PCR. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(9):3375-3379.
- 26 Alcoba-Florez J, Arevalo MP, Gonzalez-Paredes FJ, et al. PCR protocol for specific identification of *Candida nivariensis*, a recently described pathogenic yeast. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(12):6194-6196.
- 27 Santos C, Lima N, Sampaio P, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight intact cell mass spectrometry to detect emerging pathogenic *Candida* species. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2011, 71(3):304-308.

(收稿日期:2012-05-19)

(本文编辑:孙荣华)

冯晓博,姚志荣,廖万清.光滑念珠菌及其相似种的鉴定、流行病学和抗真菌药物敏感性研究[J/CD].中华实验和临床感染病杂志:电子版,2013,7(1):125-128.

