

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2018.08.003

· 论 著 ·

新生儿科分离白假丝酵母菌多位点序列分型研究

王双杰¹, 黄海锋¹, 余尚扬¹, 岑贞娇¹, 曾尚娟¹, 阮佳玲¹, 余夏²

(1 广西壮族自治区妇幼保健院, 广西 南宁 530021; 2 广西南宁市第二人民医院, 广西 南宁 530031)

[摘要] **目的** 分析白假丝酵母菌多位点序列分型(MLST)与标本来源、药物敏感性之间的关系,探讨菌株间的亲缘关系及其分子流行病学特征。**方法** 收集 2015 年 4—5 月某院新生儿科病房分离的白假丝酵母菌,采用试剂盒对菌株进行体外药物敏感性测试,并采用 MLST 方法对菌株进行分型,分析菌株间的同源性及其分子流行病学特征。**结果** 共分离 15 株白假丝酵母菌,来自 4 例患儿和 1 名医务人员,15 株白假丝酵母菌经 MLST 获得 3 个序列型(ST),其中 13 株为 ST 1997,另外 2 株分别为 ST 1359 和 ST 1933。经 eBURST 软件对 ST 分型进行聚类分析,ST 1997 菌株属于 Group 13,ST 1359 菌株属于 Group 1,ST 1933 菌株属于 Group 20。同一患者外周血和外周静脉导管分离的白假丝酵母菌属于同一克隆株。**结论** 新生儿科病房存在白假丝酵母菌血流感染的暴发,应积极制定相应的预防控制措施,加强对新生儿科病房的医院感染管理。

[关键词] 白假丝酵母菌; 血流感染; 多位点序列分型; 新生儿科; 暴发

[中图分类号] R181.3⁺2 R379.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2018)08-0665-05

Multilocus sequence typing of *Candida albicans* isolated from neonatal department

WANG Shuang-jie¹, HUANG Hai-feng¹, SHE Shang-yang¹, CEN Zhen-jiao¹, ZENG Shang-juan¹, RUAN Jia-ling¹, YU Xia² (1 The Maternal and Child Health Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China; 2 The Second Nanning People's Hospital, Nanning 530031, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the relationship between multilocus sequence typing(MLST) and sources of specimens as well as antimicrobial susceptibility of *Candida albicans* (*C. albicans*), and explore the relationship among strains and their molecular epidemiological characteristics. **Methods** *C. albicans* isolated from neonatal department in a hospital from April 2015 to May 2015 were collected, in vitro susceptibility testing was carried out by a kit, strains were typed by MLST, homology and molecular epidemiological characteristics of strains were analyzed. **Results** A total 15 *C. albicans* strains were isolated from 4 children and 1 health care worker, these strains were divided into 3 sequence types (ST) through MLST, 13 of which were ST 1997, and the other 2 were ST 1359 and ST 1933 respectively. Phylogenetic analysis of strains was carried out by eBURST software. ST 1997, ST 1359, and ST 1933 were in Group 13, Group 1, and Group 20 respectively, *C. albicans* isolated from peripheral blood and peripheral venous catheter of the same patient belonged to the same clone. **Conclusion** There is an outbreak of *C. albicans* bloodstream infection in the neonatal department, corresponding preventive and control measures should be formulated to strengthen the management of healthcare-associated infection in neonatal department.

[Key words] *Candida albicans*; bloodstream infection; multilocus sequence typing; neonatal department; outbreak

[Chin J Infect Control, 2018, 17(8): 665-669]

[收稿日期] 2017-11-05

[作者简介] 王双杰(1986-),男(汉族),广西鹿寨县人,主管技师,主要从事临床微生物检验及细菌耐药监测研究。黄海锋同为第一作者。

[通信作者] 余夏 E-mail:40011635@qq.com

白假丝酵母菌是一种侵袭性条件致病菌,可引起体表及机体深部多个部位感染。白假丝酵母菌深部感染可侵犯肺、肠道,严重时甚至入血引起败血症,导致患者死亡,具有感染率高、病死率高等特点,因此,白假丝酵母菌已经成为引起医院感染的重要病原菌之一^[1-3]。有报道^[4-5]指出白假丝酵母菌引起的血流感染具有明显的地区差异和科室聚集性特征。医院新生儿科病房收治的主要为免疫功能不全的危重新生儿,这些患儿使用广谱抗菌药物、接受侵入性诊疗操作均较多,是发生白假丝酵母菌血流感染的高危人群。

白假丝酵母菌既可以是患者体内的定植菌株,也可以通过医院内传播而获得。分子生物学分析联合流行病学调查及基因分型可以区分社区感染和医院感染^[6]。目前,运用较多的分子生物学分析方法包括:(1)基于电泳图谱分析的分型方法,如脉冲场凝胶电泳(PFGE);(2)以核苷酸序列为基础的分型方法,如多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)。PFGE 方法曾被广泛用于白假丝酵母菌及其他假丝酵母菌分型;但是,PFGE 方法耗时长,操作步骤较为复杂,易受缓冲液的种类、浓度、温度及电泳时脉冲角度、时间、电压梯度的影响,区分分子量相近的 DNA 较为困难,不同实验室之间的数据不能进行对比,这些原因限制了 PFGE 方法的应用^[7-9]。MLST 方法结合了高通量测序与群体遗传学的生物信息技术,操作相对简单,可以通过公共网络进行分析比对,具有较高的鉴别力和可操作性,可用于病原菌和耐药菌株的溯源追踪,反映菌株的生物进化学关系^[10]。

目前,国内一些白假丝酵母菌流行病学研究报道显示,白假丝酵母菌 MLST 主要根据 7 个管家基因(housekeeping gene)片段进行,每个管家基因几乎都有保守性,但不同种或菌株间存在一定差异^[5-6, 10-12]。根据 MLST 方法对新生儿科病房分离的白假丝酵母菌进行分子生物学分型,对于医院感染监控和流行病学调查有重要意义。目前,国内针对医疗单位特定区域(如新生儿科、ICU、手术室等)分离菌株的分子分型研究相对较少。本研究拟收集中国南方某妇女儿童专科医院短期内分离自新生儿科病房的 15 株白假丝酵母菌进行体外抗菌药物敏感试验和 MLST 研究,为及时有效控制医院内感染的流行、指导临床用药提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验菌株 收集 2015 年 4—5 月中国南方某妇女儿童医院新生儿科病房分离的白假丝酵母菌。

1.2 菌株鉴定及药敏试验 采用酵母菌 YST 鉴定卡(法国生物梅里埃公司)对菌株进行鉴定,采用珠海迪尔酵母样真菌药敏试剂盒(DL-96FUNGUS)对菌株进行药敏试验,试验药物包括两性霉素 B、氟康唑、伏立康唑、氟胞嘧啶、伊曲康唑。药敏结果判断参照美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)抗真菌药物敏感性试验解释标准(M27-S4)。体外药物敏感试验质控菌株为白假丝酵母菌 ATCC 90029,为本实验室保存的标准菌株。

1.3 MLST

1.3.1 白假丝酵母菌总 DNA 提取 应用 Ezup 柱式酵母基因组 DNA 抽提试剂盒(上海生工)并严格按照操作步骤提取基因组 DNA。同时测定 DNA 浓度(NanoDrop 2000, Thermo Scientific),并将提取 DNA 保存于 -20 °C 备用。

1.3.2 MLST 分析 根据 MLST 数据库(<http://calbicans.mlst.net/>)方案设计白假丝酵母菌 7 对管家基因(AAT1a, ACC1, ADP1, MPIb, SYA1, VPS13, ZWF1b)的引物序列。具体引物序列见表 1。

1.3.3 PCR 扩增产物分析 采用聚合酶链反应(PCR)分别对 7 对管家基因进行扩增,PCR 反应体系(50 μ L): DNA 模板 2 μ L,正反向引物各 2 μ L, PCR Master Mix 25 μ L, ddH₂O 19 μ L。PCR 反应条件:预变性 94 °C 5 min;变性 94 °C 30 s,退火 55 °C 60 s,延伸 72 °C 1 min,共 30 个循环;终末延伸 72 °C 5 min。PCR 产物扩增后进行电泳验证,然后将扩增产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

测序后的序列采用 chormas 软件进行分析,首先将测序结果提交至白假丝酵母菌 MLST 数据库(<http://calbicans.mlst.net/>)中进行分析,分别获得 7 个管家基因的等位基因数值,然后将管家基因等位基因数值与数据库中的等位基因进行比较,获得白假丝酵母菌临床分离株的序列分型(sequence type, ST)。

表 1 白假丝酵母菌 MLST 分型中 7 对管家基因引物序列**Table 1** Primer sequences of 7 pairs of housekeeping genes in *C. albicans* MLST

管家基因	引物序列(5'-3')	扩增产物大小(bp)
AAT1a	ACTCAAGCTAGATTTTGGC CAGCAACATGATTAGCCC	478
ACC1	GCAAGAGAAATTTAATTCAATG TTCATCAACATCATCCAAGTG	519
ADP1	GAGCCAAGTATGAATGATTTG TTGATCAACAAACCCGATAAT	537
MPIb	ACCAGAAATGGCCATTGC GCAGCCATGCATTCAATTAT	486
SYA1	AGAAGAATTGTTGCTGTACTG GTTACCTTTACCACCAGCTTT	543
VPS13	TCGTTGAGAGATATTGCACTT ACGGATGGATCTCCAGTCC	741
ZWF1b	GTTTCATTGATCCTGAAGC GCCATTGATAAGTACCTGGAT	702

2 结果

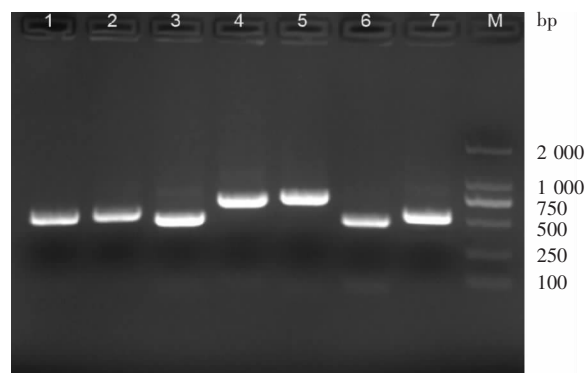
2.1 菌株来源 2015 年 4—5 月该院新生儿科病房共分离白假丝酵母菌 15 株。菌株来源标本分布: 患儿血(8 株), 患儿外周静脉导管(4 株), 患儿外周血静脉导管留置针穿刺点(2 株), 医务人员手(1 株)。新生儿病房临床分离的 15 株白假丝酵母菌中 10 株来自于 4 例患者, 其中 6 株菌(菌株编号 C6、C12、C13; C3、C14、C15)分别来源于 2 例患者的外周血、留置针穿刺点和外周静脉导管, 4 株菌(C5、C10; C4、C11)分别来源于另外 2 例患者的外周血和外周静脉导管, 1 株分离自医护人员手(C9), 其余 4 株(C1、C2、C7、C8)分别来自不同的患者外周血。

2.2 药敏结果 新生儿科病房 15 株菌株经过生化鉴定后均确认为白假丝酵母菌。药敏试验结果显示 14 株白假丝酵母菌对伊曲康唑表现为中介(I), 仅 1 株(编号 C1)来源于患儿外周血的白假丝酵母菌对伊曲康唑表现为敏感(S); 15 株白假丝酵母菌对两性霉素 B、氟康唑、伏立康唑和氟胞嘧啶均表现为敏感(S)。

2.3 MLST 结果

2.3.1 管家基因扩增结果 按照 MLST 官网(<http://calbicans.mlst.net/>)提供的引物进行扩增, 白假丝酵母菌 7 对管家基因均能扩增出特异性的 PCR 产物, 电泳结果显示 7 个管家基因对应不同大小的条带, 且无明显二聚体。琼脂糖凝胶电泳结果见图 1。

2.3.2 ST 分型结果 分离的 15 株白假丝酵母菌 7 个管家基因的等位基因数值提交至 MLST 数据



1-7: ACC1; ADP1; MPIb; ZWF1b; VPS13; AAT1a; SYA1; M: DNA Marker-D2000

图 1 白假丝酵母菌 MLST 7 对管家基因 PCR 扩增产物电泳结果

Figure 1 Electrophoresis results of PCR amplification product of 7 pairs of housekeeping genes in *C. albicans* MLST

库中获取对应 ST 值。ST 结果显示, 临床分离的 15 株白假丝酵母菌可分为 3 个 ST 型别, 其中 ST 1997 为主要流行菌株, 具体结果见表 2。

2.3.3 MLST 同源性分析结果 应用 eBURST 程序对分离菌株进行同源性分析, 结果显示, ST 1997 属于 Group 13 克隆组; ST 1933 属于 Group 20; ST 1359 属于 Group 1; 3 个 ST 型别均位于不同的克隆组。

3 讨论

目前, 临床上由于广谱抗菌药物、糖皮质激素、免疫抑制剂等药物的广泛使用, 侵入性诊疗操作的不断增多, 多重耐药菌、真菌等引起的医院感染暴发流行也随之增加, 已经引起了临床医务工作者的重视^[13-14]。白假丝酵母菌为条件致病菌, 也是引起真菌血症的重要病原菌, 新生儿科患者由于具备出现医院感染的多种危险因素, 已经成为医院感染的高发人群和重点监控对象。采用抗菌药物敏感性表型分型方法初步判断医院感染暴发的操作相对简单, 比较适合基层医院。但是, 细菌在不同抗菌药物压力条件下, 可形成不同的抗菌药物药敏谱型, 因此, 结果不稳定, 重复性较差, 在对医院感染暴发的调查中结果并不准确。本研究除 C1(ST 1997)对伊曲康唑表现为敏感外, 其余 14 株(包括 ST 1997、ST 1359、ST 1933)对伊曲康唑均表现为中介, 所有菌株对两性霉素 B、氟康唑、伏立康唑和氟胞嘧啶均表现为敏感, 显示大部分白假丝酵母菌具有一致的抗

表 2 15 株白假丝酵母菌 MLST 的 7 对管家基因等位基因数值及 ST 型

Table 2 Allele and ST of 7 pairs of housekeeping genes in 15 strains of *C. albicans* MLST

菌株编号	标本来源	AAT1a	ACC1	ADP1	MPIb	SYA1	VPS13	ZWF1B	ST
C1	PB	5	32	10	34	7	55	5	1997
C2	PB	5	32	10	34	7	55	5	1997
C3	PB	5	32	10	34	7	55	5	1997
C4	PB	5	32	10	34	7	55	5	1997
C5	PB	5	32	10	34	7	55	5	1997
C6	PB	5	32	10	34	7	55	5	1997
C7	PB	5	32	10	34	7	55	5	1997
C8	PB	5	32	10	34	7	55	5	1997
C9	H	2	3	5	9	2	21	5	1359
C10	PVC	5	32	10	34	7	55	5	1997
C11	PVC	5	32	10	34	7	55	5	1997
C12	D	5	32	10	34	7	55	5	1997
C13	PVC	5	32	10	34	7	55	5	1997
C14	D	3	3	21	50	27	109	13	1933
C15	PVC	5	32	10	34	7	55	5	1997

注:PB 为外周血;PVC 为外周静脉导管;H 为手;D 为留置针穿刺点

菌药物药敏谱,但是,ST 分型有一定差异。有些病原菌的耐药谱多变,具有一定的指纹图谱功能,可简单作为同源性判断的依据;而有些病原菌耐药谱稳定,不同来源的菌株耐药谱差异很小,则不适宜用于同源性分析。

临床上目前常用基因分型方法来鉴定医院感染散发和暴发菌株、追踪感染源、了解传播途径。细菌基因组受环境选择压力和随机突变的综合作用呈多样性,MLST 采用多个管家基因进行分析,通过序列的变化反映菌株之间的进化关系,具有较高的分辨率,而且,可以通过公共数据库进行共享及比较,已广泛用于细菌基因分型研究^[15]。本研究对新生儿科病房分离的 15 株白假丝酵母菌进行 MLST,分别检测出 3 种不同的 ST。MLST 结果经 eBURST 进化分析可分为 Group 13(13 株);Group 20(1 株)和 Group 1(1 株),结果表明该医院新生儿科病房白假丝酵母菌血流感染的主要流行菌株属于 Group 13。本研究中,来自同一患儿外周血、外周静脉导管及静脉穿刺点的 3 株菌(C6、C12 和 C13)以及来自其他 3 例患儿外周血及外周静脉导管的 6 株菌(C3 和 C15;C4 和 C11;C5 和 C10),药敏试验和 MLST 均证实为同一克隆株,可诊断为导管相关白假丝酵母菌血流感染。

医院感染暴发是指在医疗机构或其他科室的患者中,短时间内发生 3 例以上同种同源感染病例的现象^[16]。本研究结果显示新生儿科病房白假丝酵母菌血流感染为同一克隆株,且具备在时间和空间上分布集中的特点,因此,初步判定为医院感染

暴发。

目前,国内关于医院特定区域的白假丝酵母菌感染的流行病学报道相对较少,肖玉玲等^[11]运用 MLST 方法对来自 ICU 的 15 例血流感染患者分离的 17 株白假丝酵母菌进行分型,共分为 15 个 ST 型别,其中 3 株菌为同一 ST 型,另外 14 株菌则分别为 14 个不同 ST 型;血流感染的主要流行菌株属于 Group 46 和 Group 47 克隆组。本研究中的 ST 型别与该研究报道的不同,且分属不同克隆组,这充分显示白假丝酵母菌有明显的地域差异。白假丝酵母菌既能以有性生殖方式进行繁殖,还能以无性生殖方式繁殖后代,因此具有较高的突变频率。目前,MLST 数据库已收集全球范围内经过研究证实的 3 320 个 ST 型白假丝酵母菌;可以通过不同的聚类分析方法将菌株进行种群结构分类。本研究所分离的 3 个 ST 型均属于已经发现并证实的 ST 型。

总之,白假丝酵母菌是引起侵袭性真菌感染常见的病原菌,在引起医院血源性感染的微生物中位于第四位^[17]。医院特定区域(新生儿科、ICU 等)患者多为发生医院感染的高危人群,是医院感染管理重点监控的对象。通过 MLST 方法进行分析,可以更好的分析菌株的流行病学和进化特征,从而为预防和控制病原菌的传播提供实验室依据。同时,为了控制和减少医院内的交叉感染,应加强医院内的细菌监测,严格医务人员无菌操作,提高手卫生依从性,减少侵入性操作,合理使用抗菌药物,同时落实严格的病区和房间消毒隔离措施。

[参 考 文 献]

- [1] Miceli MH, Diaz JA, Lee SA. Emerging opportunistic yeast infections[J]. Lancet Infect Dis, 2011, 11(2): 142 - 151.
- [2] Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis; a persistent public health problem[J]. Clin Microbiol Rev, 2007, 20(1): 133 - 163.
- [3] Alastruey-Izquierdo A, Mandelblat M, Ben Ami R, et al. Multilocus sequence typing of *Candida albicans* isolates from candidemia and superficial candidiasis in Israel[J]. Med Mycol, 2013, 51(7): 755 - 758.
- [4] Pfaller MA, Lockhart SR, Pujol C, et al. Hospital specificity, region specificity, and fluconazole resistance of *Candida albicans* bloodstream isolates[J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(6): 1518 - 1529.
- [5] 郭雅莉, 李春莉, 刘原君, 等. 白念珠菌多位点序列分型研究[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2012, 26(3): 213 - 216.
- [6] Wu K, Luo T, Li L, et al. Multilocus sequence typing of pathogenic *Candida albicans* isolates collected from a teaching hospital in Shanghai, China: a molecular epidemiology study[J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0125245.
- [7] Heo SM, Sung RS, Scannapieco FA, et al. Genetic relationships between *Candida albicans* strains isolated from dental plaque, trachea, and bronchoalveolar lavage fluid from mechanically ventilated intensive care unit patients[J]. J Oral Microbiol, 2011, 3, doi: 10.3402/jom.v3i0.6362.
- [8] 靳颖, 刘锦, 张明华, 等. 白假丝酵母菌感染及分型方法的研究进展[J]. 武警医学院学报, 2009, 18(11): 987 - 989.
- [9] Davis MA, Hancock DD, Besser TE, et al. Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis as a tool for determining the degree of genetic relatedness between strains of *Escherichia coli* O157:H7[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(5): 1843 - 1849.
- [10] 廖亚玲, 邹全明. 病原微生物基因多位点序列分型的研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2007, 35(4): 65 - 68.
- [11] 肖玉玲, 谢轶, 康梅, 等. ICU 病房血流感染白色念珠菌的多位点序列分型研究[J]. 四川大学学报(医学版), 2012, 43(5): 697 - 701.
- [12] Bougnoux ME, Tavanti A, Bouchier C, et al. Collaborative consensus for optimized multilocus sequence typing of *Candida albicans*[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(11): 5265 - 5266.
- [13] St-Germain G, Laverdière M, Pelletier R, et al. Epidemiology and antifungal susceptibility of bloodstream *Candida* isolates in Quebec: report on 453 cases between 2003 and 2005[J]. Can J Infect Dis Med Microbiol, 2008, 19(1): 55 - 62.
- [14] Shimizu K, Hattori H, Adachi H, et al. Microsatellite-based genotyping of *Candida albicans* isolated from patients with superficial candidiasis[J]. Med Mycol J, 2011, 52(2): 129 - 138.
- [15] 王中强, 邱少富, 王勇, 等. 多位点序列分型技术及其研究进展[J]. 军事医学科学院院刊, 2010, 34(1): 76 - 79.
- [16] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 医院感染暴发控制指南: WS/T 524—2016[S]. 北京, 2016.
- [17] 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[J]. Clin Infect Dis, 2004, 39(3): 309 - 317.

(本文编辑:孟秀娟、陈玉华)