

• 论 著 •

烟曲霉的微管蛋白基因鉴定及唑类抗真菌药物的耐药性研究

邹自英, 刘媛[#], 曾平, 朱冰
(成都军区总医院检验科, 成都 610083)

摘要:目的 建立烟曲霉临床分离菌株的微管蛋白基因鉴定方法, 并分析烟曲霉对唑类抗真菌药物的耐药性。方法 对表型鉴定为烟曲霉的菌株, 采用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)方法提取烟曲霉菌株 DNA, 并采用对微管蛋白基因进行 PCR 扩增和测序的方法对烟曲霉菌株进行分子生物学鉴定, 采用琼脂稀释法检测烟曲霉菌株对伊曲康唑和伏立康唑的耐药性。结果 91 株临床分离菌株表型鉴定为烟曲霉, 这些菌株在 35 ℃ 和 48 ℃ 生长。其中 88 株(96.70%)经微管蛋白基因鉴定为烟曲霉。87 株烟曲霉菌株对 4 μg/mL 伊曲康唑和 1 μg/mL 伏立康唑敏感, 检出 1 株对 4 μg/mL 伊曲康唑和 1 μg/mL 伏立康唑耐药菌株。结论 微管蛋白基因鉴定方法可以对烟曲霉进行准确鉴定。

关键词: 烟曲霉; 伊曲康唑; 伏立康唑; 耐药性

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.14.009 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)14-1927-02

Identification of *Aspergillus fumigatus* through tubulin gene amplification and drug resistance to antifungal azoles agents

ZOU Ziying, LIU Yuan, ZENG Ping, ZHU Bing

(Department of Clinical Laboratory, PLA Chengdu Military Aera Command General Hospital, Chengdu, Sichuan 610083, China)

Abstract: **Objective** To identify *Aspergillus fumigatus* through method of tubulin gene amplification and analyse drug resistance to azole antifungal agents. **Methods** By using cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) method, genomic DNA from *aspergillus fumigatus* were extracted. Tubulin gene was amplified by polymerase chain reaction amplification assay and series analysis. Drug resistance of *aspergillus fumigatus* to antifungal azoles agents were determined by agar dilution method. **Results** A total of 91 strains separated from specimen were identified as *aspergillus fumigatus* through phenotypic identification, which grew at 35 ℃ and 48 ℃. Through tubulin gene amplification, 88 (96.70%) of the 91 strains were confirmed as *aspergillus fumigatus*. And 87 strains of the 88 *Aspergillus fumigatus* were confirmed sensitive to 4 μg/mL itraconazole and 1 μg/mL voriconazole, and 1 strain was resistant to 4 μg/mL itraconazole and 1 μg/mL voriconazole. **Conclusion** *Aspergillus fumigatus* could be identified by method of tubulin gene amplification accurately.

Key words: *Aspergillus fumigatus*; itraconazole; voriconazole; drug resistance

曲霉菌感染是侵袭性真菌感染的常见病原菌, 其中以烟曲霉感染最为常见。实验室日常使用的表型鉴定方法可以对大多数烟曲霉进行正确鉴定, 采用微管基因鉴定方法可以把烟曲霉精确鉴定到种, 避免表型鉴定的误差。美国感染病协会的曲霉菌治疗指南指出: 对于侵袭性曲霉菌病, 尤其是威胁生命的严重感染, 首选伏立康唑进行治疗; 对于慢性空洞型肺曲霉菌病、变应性支气管曲霉菌病及曲霉菌引起的鼻窦炎首选伊曲康唑进行治疗。为了解成都军区总医院烟曲霉菌对唑类抗真菌药物的耐药性现状及可能原因, 本研究对临床标本分离的 91 株烟曲霉菌的唑类药物耐药性进行了检测, 探讨医院烟曲霉菌株唑类药物耐药现状。

1 材料和方法

1.1 菌株来源 2014 年 4 月至 2015 年 6 月临床标本分离烟曲霉菌株 91 株, 质控菌株烟曲霉 AF 293 和伊曲康唑耐药株为军事医学科学院解放军疾病预防控制中心所保存菌株。

1.2 烟曲霉菌株表型鉴定 菌株接种 2 个 SDA 平板, 分别放置 35 ℃ 和 48 ℃ 孵箱培养, 16% KOH 和 1% 棉兰染色液 40 倍显微镜下观察。

1.3 烟曲霉 DNA 提取 将摇好的菌丝体过滤后用吸水纸吸干, 液氮研磨后的粉末装入离心管并加入十六烷基三甲基溴化铵(CTAB) 65 ℃ 孵育 30 min, 每 10 min 颠倒混匀 1 次。酚氯仿抽提, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上层用酚氯仿再抽提 1

次。等体积异丙醇沉淀核酸, 静置 5 min, 加入 2 倍体积的无水乙醇及 0.1 倍体积的 3 mol/L 醋酸钠, -40 ℃ 沉淀 30 min。12 000 r/min 离心 10 min, 取沉淀; 70% 乙醇溶解, 离心后取沉淀, 再重复 2 次。置室温 30 min 挥发乙醇, 加入 50 μL TE 缓冲液溶解, -80 ℃ 保存。

1.4 微管蛋白基因鉴定 参照文献[1], 上游引物: 5'-AAT TGG TGC CGC TTT CTG G-3', 下游引物: 5'-AGT TGT CGG GAC GGA ATA G-3', 由华大基因有限公司合成。反应条件: 94 ℃ 预变性 3 min, 每循环 94 ℃ 变性 15 s, 52 ℃ 退火 30 s, 68 ℃ 延伸 30 s, 循环 30 次, 末次循环后 68 ℃ 延伸 3 min, 产物大小 470 bp, PCR 产物送华大基因公司测序。

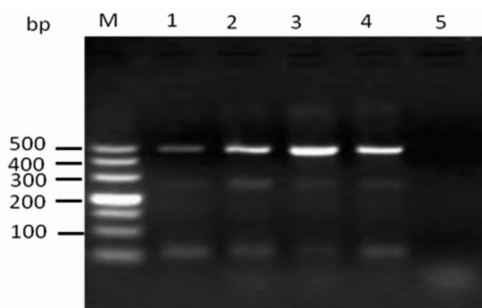
1.5 烟曲霉唑类耐药性检测 参照文献[2-3], 伊曲康唑和伏立康唑取自中国药检所, 利用 DMSO 溶解伊曲康唑和伏立康唑, 初始储存浓度为 16 mg/mL, 随后利用二甲基亚砜(DMSO)稀释为 1.6 mg/mL。为每株菌配置 2 个含药平板(伊曲康唑 4 μg/mL、伏立康唑 1 μg/mL)和 1 个不含药平板。培养基中包含 RPMI 1640 (Gibco, USA) + 2% 葡萄糖, 利用丙磺酸盐(MOPS)做缓冲液, 含 1.5% 的琼脂粉, 高压灭菌后, 在每个平板中加入相应浓度的药物和培养基, 混匀倒板。每个平板含药培养基 20 mL (含 0.05 mL 浓度为 1.6 mg/mL 的伊曲康唑)。烟曲霉接种于沙氏琼脂(SDA)固体培养基置 35 ℃ 培养 7 d。配置 0.5 麦氏浓度的烟曲霉, 用无菌棉签蘸取烟曲霉悬液, 并

将菌株涂布在含药和对照平板上。置于 35℃ 培养 48 h。根据菌株是否在含药和对照平板上生长,确定是否对伊曲康唑和伏立康唑耐药。

2 结果

2.1 烟曲霉表型鉴定结果 经显微镜检,91 株临床分离株表型鉴定为烟曲霉,35℃ 和 48℃ 生长良好,肉眼观察菌落呈深绿色或墨绿色。显微镜检烟曲霉分生孢子头短柱状,分生孢子梗壁光滑,顶囊呈烧瓶状,小梗单层,分布在顶囊的上半部分,分生孢子球形,绿色。

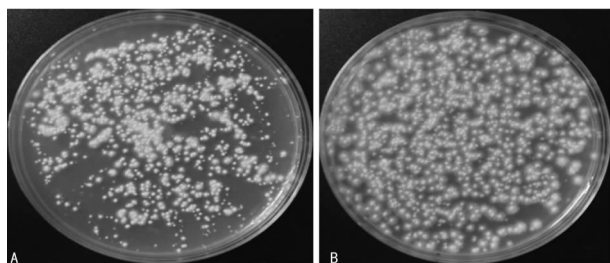
2.2 烟曲霉微管蛋白基因鉴定结果 经表型鉴定为烟曲霉的 91 株菌,其中 88 株(96.70%)经扩增微管蛋白基因,产物测序比对结果为烟曲霉,PCR 扩增结果见图 1。



注:M 为 DL500 DNA Marker;1~3 为烟曲霉临床菌株;4 为 AF293;5 为阴性对照。

图 1 烟曲霉微管蛋白基因 PCR 扩增结果

2.3 烟曲霉唑类耐药性检测结果 与不含药培养基的结果相比较,87 株烟曲霉菌株不能在伊曲康唑 4 μg/mL、伏立康唑 1 μg/mL 的含药培养基生长。检出 1 株伊曲康唑和伏立康唑耐药烟曲霉菌株,结果见图 2。



注:A 为伊曲康唑耐药;B 为伏立康唑耐药。

图 2 伊曲康唑和伏立康唑耐药结果

3 讨论

采用真菌核糖体 18S rRNA 作为检测的靶基因鉴定侵袭性真菌的方法,有些曲霉菌无法鉴定到种;采用种间特异性的 Mto1 基因作为靶基因进行鉴定可有效鉴定到种水平,但由于 Mto1 基因不是多拷贝基因,可能降低检测的灵敏度^[5-6]。有报道核糖体基因间的 ITS 区和微管蛋白基因法可区分曲霉菌不同种之间的差异^[7],本研究采用微管蛋白基因序列测定法可以有效鉴定烟曲霉菌。

由于唑类抗真菌药物的推广应用,耐药菌株的报道日益增多,唑类药物主要有以下耐药机制^[8]:天然耐药,由菌株的遗传特性决定,如烟曲霉对氟康唑和酮康唑天然耐药;获得性耐药,菌株本为敏感菌株,经长期使用唑类药物治疗过程中产生的耐药性;生物膜形成也是烟曲霉的重要耐药机制之一。甾醇 14-去甲基化酶(cyp51)是唑类抗真菌药物作用的靶酶,通过一种 cyp51 酶能抑制真菌细胞膜麦角固醇的生物合成,从而抑制真菌的生长。烟曲霉 cyp51 酶有 cyp51A 和 cyp51B 两种同源基

因,同时敲除 cyp51A 和 cyp51B 将导致烟曲霉死亡,仅敲除 cyp51A 则麦角固醇水平不再发生改变,且 cyp51B 的表达不会增加,文献报道 90% 的烟曲霉对唑类抗真菌药物的获得性耐药性与 cyp51A 基因的点突变有关,而与 cyp51B 关系不密切。在 cyp51A 基因突变导致烟曲霉对唑类药物耐药的研究中,cyp51 蛋白的 54、220 位点为突变的热点。G54 的突变可以诱导烟曲霉对唑类抗真菌药物耐药已得到公认^[8-9]。本研究所涉及菌株检出 1 株伊曲康唑和伏立康唑耐药菌株,可能与 cyp51A 基因突变有关。

曲霉病是仅次于假丝酵母菌的第二大深部致病真菌,而烟曲霉是引起侵袭性曲霉病的最主要病原菌,并且是侵袭性曲霉病患者最主要的死亡原因^[10]。目前唑类药物在农业和临床中广泛应用,可能诱导烟曲霉对唑类药物耐药性的产生,从而导致抗真菌治疗失败,因此研究烟曲霉对唑类药物的耐药现状,有利于采取预防措施减少耐药菌株的产生。

参考文献

- [1] Balajee SA, Gribskov JL, Hanley E, et al. *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus* [J]. *Eukaryot Cell*, 2005, 4(3): 625-632.
- [2] Morio F, Aubin GG, Danner-Boucher I, et al. High prevalence of triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*, especially mediated by TR/L98H, in a French cohort of patients with cystic fibrosis [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2012, 67(8): 1870-1873.
- [3] Fischer J, van Koningsbruggen-Rietschel S, Rietschel E, et al. Prevalence and molecular characterization of azole resistance in *Aspergillus* spp. isolates from German cystic fibrosis patients [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2014, 69(6): 1533-1536.
- [4] Snelders E, Karawajczyk A, Schaftenaar G, et al. Azole resistance profile of amino acid changes in *Aspergillus fumigatus* CYP51A based on protein homology modeling [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(6): 2425-2430.
- [5] 毛璞, 余志辉, 黄红川, 等. 荧光定量 PCR 法检测烟曲霉 DNA [J]. *临床检验杂志*, 2011, 29(3): 165-167.
- [6] 廖新辉, 易浔飞, 崔智慧, 等. 用重组酶介导等温核酸扩增技术检测烟曲霉 [J]. *临床检验杂志*, 2015, 33(3): 214-218.
- [7] 朱敏, 耿佳靖, 王玫, 等. ITS 和 β -微管蛋白基因序列鉴定曲霉菌的临床应用 [J]. *中华检验医学杂志*, 2011, 34(4): 353-357.
- [8] 张明, 孙文逵, 施毅. 烟曲霉对唑类抗真菌药物的耐药性 [J]. *中国真菌学杂志*, 2013, 13(2): 155-159.
- [9] 敖俊红, 廖勇, 郝震锋, 等. 烟曲霉伊曲康唑耐药株的体外诱导及与 cyp51A 基因相关性研究 [J]. *实用皮肤病学杂志*, 2014, 7(4): 253-258.
- [10] 王雪洁, 万喆, 李若瑜, 等. 耐氟康唑念珠菌和耐伊曲康唑烟曲霉对泊沙康唑的敏感性测定 [J]. *中国真菌学杂志*, 2014, 9(2): 75-78.