

## ·论 著·

## 海口市273例体检人群阴道中假丝酵母菌种类的初步研究

陈锦龙<sup>1</sup>, 蒋淮蔚<sup>2</sup>, 李文广<sup>1</sup>, 王华民<sup>1\*</sup>

**摘要:**目的 研究妇科体检人群中阴道假丝酵母菌的分布情况。方法 将收集的273例妇检阴道拭子保存在含有抗生素的YEPD液体培养基中,然后接种到YEPD平板上分离培养。分离出的酵母菌通过菌落形态、制片革兰染色,乳酸酚棉蓝染色及显色培养基作初步鉴定,并通过芽管形成试验、厚膜孢子、假菌丝生成试验及DNA ITS序列分析进行菌种鉴定。结果 273例标本中分离出47株(17.2%)假丝酵母菌,其中白假丝酵母菌24株(51.1%),光滑假丝酵母菌13株(27.7%),克柔假丝酵母菌8株(17.0%),热带假丝酵母菌1株(2.1%),其他假丝酵母菌1株(2.1%)。进一步分析显示,不同年龄段和不同妇科疾病的假丝酵母菌检出率差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。结论 体检人群外阴阴道中的假丝酵母菌致病菌种类以白假丝酵母菌为主,其次是光滑假丝酵母菌。假丝酵母菌感染与年龄、妇科疾病种类的关系不明显。

**关键词:** 外阴阴道;假丝酵母菌;分布

中图分类号 R379.4 文献标识码 A 文章编号:1009-9727(2012)11-1354-04

Preliminary study of distribution of Candida species in the vulvovaginal of women for health checkup in Haikou .CHEN Jin-long<sup>1</sup>, JIANG Wei-wei<sup>2</sup>, LI Wen-guang<sup>1</sup>, et al. (1.School of Tropical and Laboratory Medicine, Hainan Medical College, Haikou, 571101; 2. Laboratory department of Hainan Provincial People's Hospital, Haikou, 571100, Hainan, P. R.China)

**Abstract:** Objective To study the distribution of Candida species in the vulvovaginal of women for health checkup. Methods The 273 vaginal swabs were kept in YEPD liquid medium containing antibiotics, and then transferred onto YEPD Agar for culture and isolation of yeasts. Preliminary identification of the isolated yeasts was performed by colony morphology, Gram stain, lactic acid phenol cotton blue stain and chromogenic medium, and strain identification was tested by germ tube, chlamydospore test and pseudohypha production test and DNA ITS sequence analysis. Results There were 47 Candida stains (17.2%) in 273 specimens, including 24 C. albicans (59.1%), 13 C. glabrata (27.7%), 8 C. Kmsei (17.0%), and 1 C. tropicalis (2.1%) and other Candida strains (2.1%). There were no statistical significance in infection rate of Candida among different age groups and different gynecologic diseases ( $P>0.05$ ). Conclusion C. albicans is the main strain of vulvovaginal pathogenic bacteria in women for health checkup., followed by C. glabrata. No obvious relationships between Candida infection and age or gynecologic diseases were observed.

**Key words:** Vulvovaginal; Candida; Distribution

假丝酵母菌(Candida)是人体的正常菌群成员之一,也是目前临床常见的条件致病菌。临床常见的假丝酵母菌中,白假丝酵母菌的致病性最强,引起的假丝酵母菌病也较多,近20年来白假丝酵母菌感染增长了20倍以上,已成为医院感染的主要病原体之一<sup>[1]</sup>。外阴阴道假丝酵母菌病(VVC)是由假丝酵母菌感染引起的外阴阴道炎症,是最常见的妇女外阴阴道炎症之一。美国疾病控制中心2006年资料显示约75%的女性一生中至少患过一次VVC,约40%~45%的妇女患过2次或以上,约10%~20%的妇女患复杂性VVC<sup>[2]</sup>。近年来,随着抗生素和皮质醇药物的广泛应用及人群中性行为的变化,其发病率在世界各地呈明显上升趋势,严重影响妇女的工作及生活,给妇女造成身体和精神上的痛苦<sup>[3]</sup>。有资料显示,引起VVC的

假丝酵母菌以白色假丝酵母菌为主,但随着抗真菌药物的广泛应用,VVC的假丝酵母菌谱有了一定的变化,非白色假丝酵母菌的比例在逐渐上升<sup>[4]</sup>。国内有关外阴阴道感染假丝酵母菌的菌种组成情况目前尚无较全面的报道,本研究主要针对体检人群,研究外阴阴道假丝酵母菌的分布情况,为临床预防和诊断假丝酵母菌病提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 标本来源 2009年2月~2010年2月开始,采集海医附属医院绿卡中心妇检阴道拭子273例标本。

1.1.2 培养基制备 (1)YEPD液体培养基 酵母提取物4g,蛋白胨8g,葡萄糖8g,蒸馏水400mL,115℃ 10min灭菌,冷却后加入氯霉素,使其终浓度为50μg/

基金项目 国家自然科学基金资助(No.30760001)

作者单位 1.海南医学院热带医学与检验医学院 海南 海口 571101; 2.海南省人民医院检验科 海南 海口 571100

作者简介 陈锦龙(1981~) 男,汉族 海南文昌 本科,讲师,主要从事病原生物学教学与研究工作。

\*通讯作者 E-mail:hmwang58@yahoo.com.cn

mL,分装到冻存管中,每管1mL,用于标本采集;(2)YEPD固体培养基:酵母提取物4g,蛋白胨8g,葡萄糖8g,琼脂6.5g,蒸馏水400mL,115℃10min灭菌,待冷却至45~50℃时加入氯霉素,使其终浓度为50μg/mL,倾倒入直径为70mm无菌平皿制成YEPD平板培养基,凝固后置于37℃的恒温箱中24h,将污染的培养基废弃,合格的用于接种分离标本;(3)玉米培养基:玉米粉40g Tween80 10mL 琼脂16g 蒸馏水1000mL先将玉米粉溶于500mL水,65℃水浴1h,过滤,然后加入需要量的Tween80,琼脂,500mL蒸馏水,121℃15min灭菌,冷却至45~50℃后,倾倒入直径为70mm无菌平皿制成玉米Tween80培养基,用于厚膜孢子形成试验;(4)显色培养基:购自郑州博赛生物技术研究室的CHROMagar假丝酵母菌显色培养基,按照4.77g干粉溶于100mL蒸馏水的比例配制,加热至100℃完全溶解后,待冷却至45~50℃后倾倒入无菌平板,直径为70mm培养皿按10mL/平皿量倾注,用于初步鉴定假丝酵母菌种类。

## 1.2 方法

1.2.1 采集方法 从体检中心妇检取得阴道拭子标本,用消毒后的剪刀,剪取棉签头端放到装有1mL含有氯霉素的YEPD液体培养基的冻存管中保存。

1.2.2 假丝酵母菌分离 在无菌的条件下,将标本接种于YEPD固体培养基,37℃培养2d后,每天观察结果,直至14d。对疑似菌落,观察菌落的大小、形状、边缘、表面和颜色,涂片进行革兰染色、乳酸酚棉蓝染色后镜检,观察细胞、假菌丝、孢子形态和染色性,确定为假丝酵母菌后转种YEPD斜面得到纯种备用。

1.2.3 显色培养基鉴定 将培养的假丝酵母菌划线接种到已经制备好的显色培养基上,按照使用说明书在37℃下培养48h,根据菌落大小和颜色判断结果。白假丝酵母菌显绿色,热带假丝酵母菌显蓝色,光滑假丝酵母菌显紫色,克柔假丝酵母菌显粉红色,白色为其他假丝酵母菌。

1.2.4 芽管形成试验 在96孔细胞培养板上,每孔加入兔血清0.2mL,将适量经24~48h培养的假丝酵母菌接种于灭活的兔血清中,37℃培养2~3h制成压滴片观察结果。

1.2.5 厚膜孢子形成试验 根据《中华医学检验全书》中的方法<sup>[5]</sup>,将经过24~48h培养的假丝酵母菌,接种到玉米Tween80培养基上,25℃培养3d后,长出可见菌落,用无菌刀片将琼脂和菌落一同挖取,放在载玻片上,用盖玻片压平,镜下观察厚膜孢子和假菌丝。

1.3 DNA ITS序列分析 用菌落PCR扩增目的DNA,用真菌通用引物,ITS-1和ITS-4进行DNA ITS序列扩增、测序。PCR反应程序为:95℃变性5min,

94℃变性30s,56℃退火30s,72℃延伸30s,共35个循环。72℃保持5min延伸。ITS1~ITS4区域的PCR产物送北京诺赛基因组研究中心有限公司进行测序。将测序获得ITS序列通过Blast程序与GenBank中核酸数据进行比对分析。

1.4 统计学方法 应用SPSS13.0统计软件进行统计学处理。采用R×C列联表资料的 $\chi^2$ 检验分析不同年龄和妇科疾病的假丝酵母菌检出率。上述分析均采用双侧检验,以 $\alpha=0.05$ 为显著性水准。

## 2 结果

2.1 假丝酵母菌的菌种分布情况 从绿卡中心妇检标本共273份,其中分离出假丝酵母菌菌株47株,总分离率为17.2%。假丝酵母菌分布情况见表1。由表1可知,47株假丝酵母菌的菌种分布情况为:白假丝酵母菌为51.1%,光滑假丝酵母菌为27.7%,克柔假丝酵母菌为17.0%,热带假丝酵母菌和其他菌种均为2.1%。

表1 47株假丝酵母菌菌种分布情况

Table 1 47 strains of Candida strain distribution

菌种 Strain	例数 No.sample	百分比(%)Percent
白假丝酵母菌( <i>C.albicans</i> )	24	51.1
光滑假丝酵母菌( <i>C.glabrata</i> )	13	27.7
克柔假丝酵母菌( <i>C.krusei</i> )	8	17.0
热带假丝酵母菌( <i>C.tropicalis</i> )	1	2.1
其他(others)	1	2.1

2.2 不同年龄段假丝酵母菌感染情况 由表2可以看出,≤20岁人群未检测出假丝酵母菌,21~30岁人群假丝酵母菌的检出率为22.7%,31~40岁为23.5%,41~50岁为14.8%,51~60岁为10.9%,61~70岁为10.5%,≥71岁为33.3%。统计分析显示,不同年龄段假丝酵母菌的检出率差异无统计学意义( $\chi^2=6.101$ ,  $P=0.412$ ),即各年龄段的检出率无显著性差异。

表2 不同年龄段假丝酵母菌的检出率情况[n(%)]

Table 2 The relevance ratio of candida at different age[n(%)]

年龄 Age	假丝酵母菌 Candida	
	阴性(%)No.negative	阳性(%)No.positive
≤20岁 ≤20 years old	1(100)	0
21~30岁 21~30 years old	17(22.7)	5(22.7)
31~40岁 31~40 years old	65(22.7)	20(23.5)
41~50岁 41~50 years old	75(22.7)	13(14.8)
51~60岁 51~60 years old	49(22.7)	6(10.9)
61~70岁 61~70 years old	17(22.7)	2(10.5)
≥71岁 ≥71 years old	2(22.7)	1(33.3)
合计 Total	226(82.2)	47(17.3)

注  $\chi^2=6.101$ ,  $P=0.412$

2.3 不同妇科疾病假丝酵母菌感染情况 由表3可以看出,宫颈糜烂的假丝酵母菌的检出率为13.3%,应用BPM红外光疗仪治疗宫颈炎术后(BPM术后)的检出率为12.5%,滴虫性阴道炎为100.0%,其他疾病均未检测出假丝酵母菌。统计分析显示,不同妇科疾病假丝酵母菌的检出率差异无统计学意义( $\chi^2=9.985$ ,  $P=0.076$ ),即不同妇科疾病的检出率无差异。

表3 不同妇科疾病假丝酵母菌感染情况[n(%)]

Table 3 The infection of candida different Gynecological disease [n(%)]

疾病 Disease	假丝酵母菌 <i>Candida</i>	
	阴性(%)	阳性(%)
	No.negative	No.positive
宫颈糜烂 Cervical erosion	39(86.7)	6(13.3)
BPM术后 BPM Postoperation	7(87.5)	1(12.5)
炎症 Inflammation	8(100.0)	0
子宫肌瘤 Uterine fibroid	6(100.0)	0
子宫切除术 Hysterectomy postoperation	2(100.0)	0
滴虫性阴道炎 Trichomonas vaginitis	0	1(100.0)
合计 Total	62(88.6)	8(11.4)

注  $\chi^2=9.985$ ,  $P=0.076$

### 3 讨论

假丝酵母菌为条件致病菌,在人体免疫功能完善的情况下,与机体处于共生状态,并不致病。当机体免疫功能低下或寄存环境出现微生态环境失调时,假丝酵母菌病容易发作。近年来,女性生殖道假丝酵母菌感染在我国的发病率呈持续上升趋势。严重影响了妇女的工作和生活。因此,研究假丝酵母菌的分布规律,对于有效预防和诊断,治疗等有重要意义。科玛嘉显色培养基是通过菌落的不同颜色和不同形态来进行快速鉴定的培养基,使用此培养基可对假丝酵母菌作出初步鉴定。本研究应用科玛嘉显色培养基进行假丝酵母菌的分离鉴定,操作方法简单并且价格适中,与ID32C鉴定卡对假丝酵母菌鉴定符合率高<sup>[6,7]</sup>。本研究中体检人群阴道假丝酵母菌的分离率17.2%,略高于Fidel等<sup>[8]</sup>报道的正常人群无症状带菌率17.0%,而国内对于体检人群阴道假丝酵母菌的分离率尚无相关报道。同时本研究结果显示体检人群阴道假丝酵母菌的分离率明显低于李丹等<sup>[9]</sup>对妇科门诊2231例疑似VVC患者进行阴道分泌物假丝酵母菌的检出率81.98%。而Bauters<sup>[10]</sup>等对612例妇科门诊VVC患者的检出率为20.1%。本研究分离率较低可能的原因是与检测对象选择是正常的体检人群以及样本量小等有关。

同时本研究中白假丝酵母菌的检出率为51.1%,

虽然小于王芳等研究的检出率75.5%<sup>[11]</sup>,但是还是说明了在VVC中白假丝酵母菌是优势菌株,其原因可能的为:①临床上,白假丝酵母菌是引起假丝酵母菌病的主要条件致病菌。在致病性假丝酵母菌中,白假丝酵母菌致病性最强,而引起人假丝酵母菌病的主要是白假丝酵母菌;②白假丝酵母菌与都柏林假丝酵母菌的表型特征非常相似<sup>[12]</sup>,而本研究未将二者区分,白假丝酵母菌中是否混有都柏林假丝酵母菌有待进一步鉴定;而非白假丝酵母菌占49.9%,其中光滑假丝酵母菌占27.7%、克柔假丝酵母菌17.0%、热带假丝酵母菌2.1%,低于刘小平等<sup>[13]</sup>对VVC研究发现白假丝酵母菌占91.3%、光滑假丝酵母菌占6.3%、克柔假丝酵母菌占0.8%和热带假丝酵母菌占1.6%。众多研究表明,非白假丝酵母菌所占比例逐渐上升,其中以光滑假丝酵母菌为主,克柔假丝酵母菌的比例有所上升。其原因可能的为:①抗真菌药物的滥用引起假丝酵母菌谱一定的变化,非假丝酵母菌的比例有所上升;②与机体局部免疫环境有关。

从年龄结构上看,假丝酵母菌感染以21~30岁和31~40岁年龄组为主,其检出率分别为22.7%和23.5%,虽然 $\geq 71$ 岁年龄组的检出率为33.3%,但是由于样本量小,只有3例,其结果可能存在误差。检查率差异的原因可能是:①妇女正常的阴道pH值范围为3.8~4.5,而绝经期妇女由于雌激素分泌减少,阴道上皮萎缩,糖原减少或缺失,致使阴道酸度减低,pH值升至6.0~7.5。所以本研究中51~70岁年龄段的假丝酵母菌的检出率降低。② $\leq 20$ 岁检查的人数较少,并且年幼期由于卵巢功能不完善,阴道上皮亦处于低雌激素影响状态,其pH值在7.2~8.0之间。所以无特殊原因,儿童和绝经期的妇女不易感染假丝酵母菌,而生育期的妇女易感染假丝酵母菌。在45例患有宫颈糜烂的妇女中,分离出6株假丝酵母菌,分离率是13.3%。也有部分人群为无症状带菌,其主诉并无不适,阴道分泌物外观性状也正常。分离率较少可能原因是本研究收集标本量较少。8例BPM术后仍有1例(12.5%)检出假丝酵母菌,说明有外阴阴道假丝酵母菌病史的女性再次发生外阴阴道假丝酵母菌病的机会增加。假丝酵母菌混合滴虫感染较为少见,本研究仅发现1例。一般认为假丝酵母菌易在酸性环境中生长,而滴虫则偏好生活在偏碱环境。相对于单纯感染,混合感染治疗难度更大一些。不同年龄分布以及不同妇科疾病的假丝酵母菌检出率统计学结果显示,不同年龄段和不同妇科疾病中的假丝酵母菌检出率均无统计学意义( $P>0.05$ ),可能是由于本研究采集的标本量相对较少,年龄分段过细导

致 妇科疾病患者数目少 ,需要进一步进行大批量的研究分析进一步验证 ,得出相对可信的数据 ,为临床诊断治疗提供科学的理论依据。

#### 参考文献 :

- [1] Liao WQ,Wu SX.The research progresses of nosomycosis[M].Shang Hai: The Second Military Medical University Publishing House, 1998.87-116.(In Chinese)  
(廖万清,吴绍熙.真菌病研究进展[M].上海:第二军医大学出版社, 1998.87-116.)
- [2] S Kimberly A.Workowski, Stuart M. Berman.sexually transmitted disease treatment guidelines,2006.[J]. MMWR Recomm Rep. 2006 Aug 4; 55(RR-11):1-94.
- [3] Liu P,Liu Y,Chen F,etal.The epidemiological progress of Vulvovaginal candidiasis[J].Hebei Medocal, 2008,30(1):98-100.(In Chinese)  
(刘萍,刘艳,陈芳,等.外阴阴道假丝酵母菌病的流行病学进展[J].河北医药,2008,30(1):98-100.)
- [4] Fidel PL Jr,Vazquez JA, Sobel JD. Candida glabrata: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to C. albicans [J].Clin Microbiol Rev, 1999, 12(1):80-96.(In Chinese)
- [5] Li YL.China Medical Technology [M].Bei Jing:People's Medical Publishing House, 1997:1996-1997.(In Chinese)  
(李影林.中华医学检验全书[M].北京:人民卫生出版社,1997: 1996-1997.)
- [6] Zhu CB,Xia YX,Dou L.Clinical Evaluation on Application of CHROM agar Candida[J].Journal of Practical Medleal Techniques,2003,10(6): 570-571.(In Chinese)  
(朱成宾,夏永祥,窦露.科玛嘉念珠菌显色培养基的临床应用与评价[J].实用医技杂志,2003,10(6):570-571.)
- [7] Zhu JJ,Liang HJ,Song XL,etal.Application of CHROM agar Candida in rapid detection candida[J].Shanghai Journal of Medical Laboratory Sciences, 2001,16(15):303.(In Chinese)
- (祝建军,梁慧军,宋秀兰,等.科玛嘉显色培养基在快速检测念珠菌中的应用[J].上海医学检验杂志,2001,16(15):303.)
- [8] Fidel PL Jr,Barousse M,Espinosa T,etal.Local immune responsiveness following intravaginal challenge with Candida antigen in adult women at dif2 ferent stages of the menstrual cycle. [J]Med Mycol, 2003, 41(2): 97-109.
- [9] Li D,Zhau CJ,Peng LX,etal.Detection of Candida and Analysis of Drug Resistance on 2,231 Vaginal Samples[J].Practical Preventive Medicine, 2006, 13(6):1620-1621.(In Chinese)  
(李丹,周昌菊,彭丽秀,等.2231例阴道分泌物假丝酵母菌培养及耐药性分析[J].实用预防医学,2006, 13(6):1620-1621.)
- [10] Bauters TG, Dhont MA,Temmerman MI. Prevalence of vulvovaginal candidiasis and susceptibility to fluconazole in women [J]. Am J Obstet Gynecol, 2002, 187(3):569-574.
- [11] Wang F,Ran CL, Wang W.The strain and antifungal susceptibility of 197 Samples of recidivity Vulvovaginal candidiasis[J].Journal of Practical Obstetrics and Gynecology, 2012,28(06):505-507.(In Chinese)  
(王芳,冉崇兰,王薇.复发性外阴阴道假丝酵母菌病的菌种及药敏分析197例[J].实用妇产科杂志,2012,28(06):505-507)
- [12] Kim JO, Garofalo L, Blecker-Shelly D,et al. Candida dubliniensis infections in a pediatric population: retrospective identification from clinical laboratory isolates of Candida albicans [J].Journal of clinical microbiology,2003,41(7):3354-3357.
- [13] Liu XP, Fan SR,Li JW.Prevalence of vulvovaginal candidiasis and antifungal susceptibility in gynecologic clinic women[J].Chinese Journal of Clinical Obstetric and Gynecology, 2004,(02):95-98.112.(In Chinese)  
(刘小平,樊尚荣,李健武.妇科门诊患者外阴阴道念珠菌的检出率和抗真菌药物敏感性研究[J].中华妇产科临床杂志,2004,(02): 95-98.112.)

收稿日期 2012-10-20 编辑 吴中菲

## 摘要规范

一般文稿均要有摘要 ,摘要应具有独立性 ,便于读者获取必要的信息 ,应着重反映研究中的创新内容和作者的独到观点 ;中文摘要应从第三人称角度撰写 ,不加评论和解释。新术语或尚无合适汉语译名的术语 ,可使用原文或在译名后加括号注明原文。字数以400字左右为宜。

格式 论著类文章摘要 ,按照结构式摘要撰写。内容包括研究 目的(Objective) 、方法(Methods) 、结果(Results) 和 结论(Conclusion) 四部分(四要素小标题排小5号黑体 ,空1个字距 ,摘要内容排小5号宋体)。各要素英文小标题应根据实际情况确定单复数。

综述类文章摘要 ,其内容应包括综述的主要目的、资料来源、资料选择、数据提炼、数据综合和结论等。可以写成结构式摘要 ,也可写成指示性或报道性摘要(SAMMARY)。

本刊编辑部