

白色念珠菌 TaqMan- 小沟结合物探针实时荧光定量聚合酶链式反应快速检测及抗真菌药物敏感性分析*

高正琴, 岳秉飞**

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要 目的: 建立 TaqMan- 小沟结合物探针实时荧光定量聚合酶链式反应方法, 快速定量检测临床标本中的白色念珠菌并进行抗真菌药物敏感性分析。**方法:** 针对白色念珠菌内转录间隔区和 26S 核糖体核糖核酸基因设计特异性引物和探针, 构建含有上述基因的标准质粒进行定量分析, 建立 TaqMan- 小沟结合物探针实时荧光定量聚合酶链式反应检测方法, 评价其特异性、灵敏度、重复性和稳定性。对 1 185 份临床标本中的白色念珠菌进行检测, 同时进行真菌培养、普通 PCR、基因克隆和测序鉴定。对所有真菌分离株进行抗真菌药物敏感性试验。**结果:** 研究结果显示, 建立的白色念珠菌 TaqMan- 小沟结合物探针实时荧光定量聚合酶链式反应检测方法专属性强, 能准确检出白色念珠菌, 而与其他念珠菌属真菌、非念珠菌属真菌、细菌、寄生虫和病毒均无交叉反应, 特异性为 100%。该技术灵敏度高, 能精确定量检测白色念珠菌 DNA 线性范围达 11 个数量级, 白色念珠菌最低检测限度为 5 个菌落形成单位。该方法重复性非常好, 组内和组间相对标准偏差均小于 2%。测试中相关系数、斜率和效率没有显著变化, 表明该方法稳定性好, 精密度高。将其成功应用于临床标本中白色念珠菌载量的定量检测, 用普通 PCR 和基因克隆测序分析进行了确证。整个检测过程可在 2 h 内完成, 可以用作定量分析快速诊断方法。应用 TaqMan- 小沟结合物探针实时荧光定量聚合酶链式反应从 1 185 份临床标本中检出 94 份白色念珠菌阳性标本, 真菌培养获得 8 株存活的白色念珠菌, 抗真菌药物敏感性试验分析结果显示: 这些白色念珠菌分离株对制霉菌素、咪康唑、克霉唑、益康唑、氟康唑、沃尔康唑均敏感, 但对两性霉素 B、酮康唑、特比萘芬、氟胞嘧啶已经产生了耐药性。**结论:** 本研究新开发评价的 TaqMan- 小沟结合物探针实时荧光定量聚合酶链式反应, 可以快速简易, 精准稳定, 特异灵敏地定量检测白色念珠菌, 适用于动物源性产品中白色念珠菌检测、食品药品生物制品医疗器械安全检查、环境监测、流行病学调查。**关键词:** 白色念珠菌; 内转录间隔区; 26S 核糖体核糖核酸 (26S rRNA); TaqMan- 小沟结合物探针; 实时荧光定量聚合酶链式反应; 快速检测; 抗真菌药物敏感性分析

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793 (2017) 06-1071-10

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.06.20

Rapid detection of *Candida albicans* by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction using TaqMan-minor groove binder probe and analysis of antifungal susceptibility*

GAO Zheng-qin, YUE Bing-fei**

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract Objective: To develop a TaqMan-minor groove binder (TaqMan-MGB) probe based real-time

* 国家科技支撑计划 (2013BAK11B01) 资助项目

** 通信作者 Tel: (010) 67095401; E-mail: y6784@126.com

第一作者 Tel: (010) 67095670; E-mail: gaozhengqin@126.com

fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RTFQ-PCR) assay that can rapidly quantify, detect and identify *Candida albicans* from clinical specimen, and analyze antifungal susceptibility. **Method:** Primers and probes specific to internal transcribed spacer (ITS) and 26S ribosomal RNA (26S rRNA) genes of *Candida albicans* were designed. Standard plasmid containing the sequence of ITS and 26S rRNA genes were constructed for quantitative analysis. A TaqMan-MGB probe based RTFQ-PCR assay was developed. The sensitivity, specificity, reproducibility and stability of the assay were assessed. Then, the developed TaqMan-MGB probe based RTFQ-PCR assay was applied to detecting *Candida albicans* in 1 185 clinical specimens, and fungal culture, conventional PCR, gene cloning and sequencing were concurrently performed. Antifungal susceptibility test was done on all fungi isolates. **Results:** It is shown that the developed TaqMan-MGB probe based RTFQ-PCR assay could accurately detect *Candida albicans* with 100% specificity, and other *Candida* species, non-*Candida* species, bacteria, parasites and viruses had no cross reaction. The technology was demonstrated to be highly sensitive, allowing a precise *Candida albicans* DNA quantitation over a range of eleven orders of magnitude, and the limit of detection (LOD) of the assay was determined to be 5 Colony-Forming Units (CFU) for *Candida albicans*. The reproducibility of this method was excellent with the relative standard deviation (RSD) within and between groups of less than 2 percent. Correlation coefficient, slope and efficiency did not vary significantly among the tests, suggesting good stability and high precision of the method. The TaqMan-MGB probe based RTFQ-PCR assay was successfully applied to quantitative detection of *Candida albicans* genomic load in clinical specimens, and was confirmed using conventional PCR and gene cloning and sequence analysis. The assay described in this report generates complete result in 2 h and can be used as a quantitative analytical and fast diagnostic method. The TaqMan-MGB probe based RTFQ-PCR assay was used to detect *Candida albicans* in 1 185 clinical specimens, in which 94 specimens were positive, while only eight specimens were positive for *Candida albicans* obtained by fungal isolation method. The determination of the antifungal sensitivity showed that these *Candida albicans* isolated were susceptible to nystatin, miconazole, clotrimazole, econazole, fluconazole and voriconazole. However, their resistance to amphotericin B, ketoconazole, terbinafine and fluorocytosine were found. **Conclusion:** The novel TaqMan-MGB probe based RTFQ-PCR developed and evaluated in this study is considered as a rapid and simple, accurate and stable, specific and sensitive method for quantitative determination and identification of *Candida albicans*, and it is suitable for *Candida albicans* detection in animal origin products, for safety inspection of food, drug, biological product and medical instrument, and for environmental monitoring and epidemiology investigation. **Keywords:** *Candida albicans*; internal transcribed spacer (ITS); 26S ribosomal RNA (26S rRNA); TaqMan-minor groove binder (TaqMan-MGB) probe; real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RTFQ-PCR); rapid detection; analysis of antifungal susceptibility

白色念珠菌 (*Candida albicans*) 是第 1 个完成全基因组测序的致病性真核生物 (2004 年 6 月, 白色念珠菌标准株 SC5314 的全序列测定完成并公布, <http://www.candidagenome.org>), 目前在基因组信息研究、基因功能、转录组、蛋白质组等方面均取得了重要进展。白色念珠菌, 又称为白色假丝酵母, 是一种重要的人兽共患病原, 也是临床上最主要的侵袭性真菌之一, 侵犯皮肤、粘膜, 引起内脏或全身感染, 早产新生儿、癌症患者、艾滋病

患者、免疫抑制个体、器官移植者、导管术者感染后具有较高的致死率^[1-7]。因此, 选用合适可靠的技术方法, 快速检测、精准鉴定白色念珠菌是一个值得重视的问题。在实验室诊断中, 尽管分离培养是确诊白色念珠菌感染的可靠方法, 但操作烦琐耗时费力, 不适合大批标本检测。直接涂片镜检操作简便, 但敏感性和特异性不高。血清学方法不适合免疫抑制个体检测, 难以做出早期诊断且特异性欠佳^[8-10]。电泳核型分析 (electrophoretic

karyotype)、限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)、随机扩增多态性 DNA (randomly amplified polymorphic DNA, RAPD) 和脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)仅囿于菌株分型鉴定^[11-13]。对于动物源性食品、药品、生物制品或医疗器械等新兴产品中微量或痕量白色念珠菌的精准检定而言上述方法均不适合。

随着现代分子生物学技术在临床检验诊断学中的应用,疾病诊断已深入到基因水平。聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)、基因测序(gene sequencing)、生物芯片(biochip)、蛋白质组(proteome)、代谢组学(metabonomics)等基因诊断(gene diagnosis, 又称为分子诊断 molecular diagnosis)技术在感染性疾病、遗传性疾病、肿瘤性疾病等的诊断中发挥着愈发重要的作用。TaqMan 探针(TaqMan probe)实时荧光定量 PCR(real-time fluorescence quantitative PCR, RTFQ-PCR)是在普通 PCR 基础上加入荧光标记 TaqMan 探针,将核酸扩增、杂交及光谱技术有机结合起来,对目的基因进行准确定量检测。与普通 PCR 相比,Real-time PCR 在单管中扩增检测靶 DNA,这不仅避免了 PCR 后操作的时间浪费还减少了潜在的污染,但 Real-time PCR 检测体系也存在非特异性反应,主要是因为荧光染料(如 SYBR green)非特异性结合,而灵敏度高的 TaqMan-小沟结合物(TaqMan-minor groove binder probe, TaqMan-MGB probe)探针能有效避免核苷酸错配,比传统的 TaqMan 探针更精确稳定结合^[14-16]。至今,国内外还未见用 TaqMan-MGB 探针 RTFQ-PCR 检测白色念珠菌的研究报道。本研究建立了白色念珠菌 TaqMan-MGB 探针 RTFQ-PCR 检测方法,联合真菌培养和基因克隆测序鉴定及抗真菌药物敏感性试验分析,成功应用于临床标本中白色念珠菌的快速定量检定,为白色念珠菌感染的早期诊疗提供病原学依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和参考株及质粒标准品 TaqMan Universal PCR Master Mix(TaqMan 通用型 RTFQ-PCR 预混合溶液)购自美国 Life Technologies 公司。Nuclease-Free Water(无核酸酶的水)购自美国 ProgeMa 公司。QIAamp DNA Mini Kit(QIAamp DNA 小量提取试剂盒)购自德国 Qiagen 公司。dNTP

Mixture(脱氧核糖核苷三磷酸混合溶液, deoxy-ribonucleoside triphosphate 包括 dATP、dGTP、dTTP、dCTP,是 PCR 扩增、荧光定量等反应所需的基本原料)、EX Taq(具有 3' → 5' Exonuclease 活性的耐热性 DNA 聚合酶。在普通 PCR 条件下,与 Taq DNA Polymerase 相比,具有扩增效率高、错配率低的优良性能)、Agarose(琼脂糖)、DNA Ladder Marker(DAN 分子量标准)购自日本 TaKaRa 公司。白色念珠菌、光滑念珠菌(*Candida glabrata*)、东方伊萨酵母(*Issatchenkia orientalis*)、卵形毛孢子菌(*Trichosporon ovoides*)、泰泽氏菌(*Clostridium piliforme*)、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)、空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*)、刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)、蓝氏贾第鞭毛虫(*Giardia lamblia*)、隐匿管状线虫(*Syphacia obvelata*)、鼠痘病毒(Ectromelia virus)、日本乙型脑炎病毒(Japanese encephalitis virus)、淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒(Lymphocytic choriomeningitis virus)核酸由本实验室保存。含白色念珠菌内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)和 26S 核糖体 RNA(26S ribosomal RNA, 26S rRNA)基因的质粒标准品由本实验室制备,标准质粒 DNA 浓度定量为 5×10^{10} 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

1.2 临床标本中白色念珠菌分离和抗真菌药物敏感性试验分析及 DNA 提取 69 例临床肝癌肝硬化病人腹水和血清由首都医科大学附属北京佑安医院提供。60 只小型猪来自国家实验用小型猪种质资源基地,采血分离血清,采集鼻拭子、颌下淋巴结、气管、心、肺、肝、脾、肾、肠、脑标本。60 只野生成年树鼩来自云南、65 只长爪沙鼠来自浙江,采血分离血清。60 只灰仓鼠(*Cricetulus migratorius*)来自新疆,采血分离血清,采集毛、气管、肠。112 只猴和 55 只犬,来自北京,采血分离血清,采集毛、新鲜粪便。122 只地鼠、160 只豚鼠、40 只大鼠、382 只小鼠来自全国各地,采血分离血清,采集毛、肺、肝、肠,部分为基因修饰小鼠胎儿、脚和尾巴皮肤溃烂者标本。

在负压生物安全柜内,将采集的标本作特定处理后分别接种沙氏琼脂斜面,置 35 °C 培养 2 d。选取类酵母型菌落进行鉴定,涂片镜检,实时动态显微摄屏摄录有卵圆形孢子和假菌丝者,转种沙氏琼脂和皮肤病原真菌鉴别培养基,初步鉴定的菌株经过 3 次反复分离纯化后,参考文献[17-19]鉴定临床标本中分

离的白色念珠菌并进行抗真菌药物敏感性试验。使用 QIAamp DNA mini kit 提取临床标本和白色念珠菌分离株 DNA。

1.3 白色念珠菌 TaqMan-MGB 探针和 RTFQ-PCR 引物设计及反应体系优化 为了避免 TaqMan-MGB 探针 RTFQ-PCR 检测白色念珠菌的假阳性和假阴性结果,特异性引物和探针的选择设计显得非常重要。通过前期大量的文献检索和扫描现行可供参考的基因库数据再经计算机核查比对,本研究针对白色念珠菌 ITS 和 26S rRNA 基因设计种特异性探针引物(表 1)。白色念珠菌 TaqMan-MGB 探针和 RTFQ-PCR 引物由美国 Life technologies 公司合成。

表 1 白色念珠菌 TaqMan-MGB 探针和 RTFQ-PCR 引物序列

Tab. 1 Sequences of TaqMan-MGB probe and RTFQ-PCR primers for *Candida albicans*

名称 (name)	序列 5' → 3' (sequence 5' → 3')
GZQCA-ITSTF	GCTTGAAAGACGCTAGTGGAAGG
GZQCA-ITSTR	CCGCCGCAAGCAATGTTTT
GZQCA-ITSTMP	FAM-CCTAAGCCATTGTCAAAGC-MGB-NFQ
GZQCA-26STF	GGCCTTGAGATCAGACTTGCTATT
GZQCA-26STR	TGCTGGCCCGGTAAACC
GZQCA-26STMP	FAM-TTGCATGCTGCTCTCTC-MGB-NFQ

对白色念珠菌 TaqMan-MGB 探针 RTFQ-PCR 反应体系进行优化,采用 20 μ L 的总反应体积,依次加入 TaqMan Universal PCR Master Mix 10 μ L,探针引物 1 μ L,模板 DNA 1 μ L, Nuclease-Free Water 8 μ L。TaqMan-MGB 探针 RTFQ-PCR 反应参数:50 $^{\circ}$ C 2 min, 1 个循环;95 $^{\circ}$ C 10 min, 1 个循环;95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 共 40 个循环。每次试验均以 Nuclease-Free Water 为阴性对照,白色念珠菌核酸为阳性对照。用 ABI 7500 Fast 全自动荧光定量 PCR 仪检测。通过仪器自带 SDS 软件实时观察 PCR 荧光扩增曲线并采集数据。

1.4 白色念珠菌 TaqMan-MGB 探针 RTFQ-PCR 标准曲线的构建、特异性、灵敏度试验 将白色念珠菌标准质粒 (5×10^{10} 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) 以 Nuclease-Free Water 按 10 倍倍比稀释,各取 1 μ L 系列标准模板 ($5 \times 10^{10} \sim 5 \times 10^0$ 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) 加入反应管中,每个标准浓度平行重复 3 次试验,按优化后的 TaqMan-

MGB 探针 RTFQ-PCR 体系进行反应。通过实时检测反应管中的荧光信号,计算出反应过程中荧光信号变化量。当荧光信号增强到某一阈值时,标准模板反应管所用的循环次数 (Ct 值, C 代表 Cycle 循环数, t 代表 threshold 阈值) 就被记录下来。Ct 值与标准模板数量的对数值之间有严格的线性关系,利用系列标准模板的 Ct 值,制成标准曲线,根据待测样品的 Ct 值,就可在标准曲线中确定待测样品起始的 DNA 数量。

以白色念珠菌、光滑念珠菌、东方伊萨酵母、卵形毛孢子菌、泰泽氏菌、幽门螺杆菌、空肠弯曲杆菌、刚地弓形虫、蓝氏贾第鞭毛虫、隐置管状线虫、鼠痘病毒、日本乙型脑炎病毒、淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒的核酸为模板,按优化后的 TaqMan-MGB 探针 RTFQ-PCR 体系进行反应,确定该方法的特异性。

将白色念珠菌 ATCC 10231 标准菌株悬液调整为 0.6 麦克斯兰标准浊度,每毫升 5×10^9 个菌落形成单位 (Colony-Forming Units, CFU, 指单位体积中的活菌个数),以无菌生理盐水进行梯度稀释,分别抽提 DNA,各取 1 μ L 作为 TaqMan-MGB 探针 RTFQ-PCR 模板,按优化后的体系进行反应,测定检出最低限 (LOD, limit of detection),确定该检测方法的灵敏度。

1.5 白色念珠菌 TaqMan-MGB 探针 RTFQ-PCR 重复性和稳定性试验 将白色念珠菌 TaqMan-MGB 探针和 RTFQ-PCR 引物、标准质粒、TaqMan Universal PCR Master Mix、Nuclease-Free Water 等配套试剂分别置 -70、-20、4 $^{\circ}$ C 冰箱中存放 90、180、360 d,分别取 1 μ L 稀释后的标准质粒 ($5 \times 10^6 \sim 5 \times 10^2$ 拷贝 $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) 作为模板,按优化后的 TaqMan-MGB 探针 RTFQ-PCR 体系进行反应。在同一个试验中,每个稀释度标准质粒做 3 个复孔,用于统计计算组内相对标准偏差 (RSD, relative standard deviation)。再以相同标准质粒为模板,连续 3 d 进行 3 次独立的重复试验,用以统计计算出组间 RSD,确定该方法的重复性和稳定性。

1.6 白色念珠菌 TaqMan-MGB 探针 RTFQ-PCR 和普通 PCR 检测临床标本 为了评价本研究建立的 TaqMan-MGB 探针 RTFQ-PCR 方法对临床标本中白色念珠菌检测的实用性,分别以上述临床标本和白色念珠菌分离株 DNA 为模板,按优化后的 TaqMan-

MGB 探针 RTFQ-PCR 体系进行反应。同时用白色念珠菌普通 PCR 和基因克隆测序分析方法对白色念珠菌阳性标本进行检定验证。

白色念珠菌普通 PCR 引物见表 2。优化后的白色念珠菌普通 PCR 总反应体积为 50 μL , 具体包括 10 $\times$ Buffer (Mg²⁺ Plus) 5.0 μL , dNTP Mixture 4.0 μL ,

正、反向引物各 0.5 μL , EX Taq 0.25 μL , 模板 DNA 3.0 μL , Nuclease-Free Water 37.25 μL 。普通 PCR 反应参数: 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 1 个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 1 个循环。琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。阳性标本进一步做克隆测序分析鉴定。

表 2 白色念珠菌普通 PCR 引物序列

Tab. 2 Sequences of conventional PCR primers for *Candida albicans*

名称 (name)	序列 5' $\rightarrow$ 3' (sequence 5' $\rightarrow$ 3')	产物大小 (product size)
GZQCA-ITSF	GAAGGATCATTACTGATTTCCTTAATTGCACCAC	498 bp
GZQCA-ITSR	TTAAGTTCAGCGGGTAGTCCTACCTGATTGAGGTC	
GZQCA-26SF	TGCCTCAGTAGCGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTC	524 bp
GZQCA-26SR	AAAAACCGCAGTCCTCGGTCTAGGCTGGCAGTATC	

2 结果

2.1 白色念珠菌 TaqMan-MGB 探针 RTFQ-PCR 标准曲线、特异性、灵敏度试验 将白色念珠菌不同浓度的标准质粒分别与其 Ct 值进行回归分析, 经对数拟合作图形成标准曲线, 回归方程:

$$Y = -3.299X + 38.945 \quad R^2 = 0.986$$

斜率 (slope) 为 3.299, 效率 (efficiency) 为 100.974%, 线性范围达 11 个数量级 ($10^{10} \sim 10^0$ 拷贝), 标准曲线显示白色念珠菌标准质粒 Ct 值与其拷贝数的对数具有良好的线性关系。

TaqMan-MGB 探针 RTFQ-PCR 检测白色念珠菌时出现典型 S 型扩增曲线, 且 Ct 值小于 28, 结果判定为阳性; 而光滑念珠菌、东方伊萨酵母、卵形毛孢子菌、泰泽氏菌、幽门螺杆菌、空肠弯曲杆菌、刚地弓形虫、蓝氏贾第鞭毛虫、隐匿管状线虫、鼠痘病毒、日本

乙型脑炎病毒、淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒均未见典型 S 型扩增曲线, Ct 值一栏显示为 “Undetermined”, 结果判定为阴性。特异性试验结果表明, 本研究建立的 TaqMan-MGB 探针 RTFQ-PCR 检测方法专属性强, 能准确检出白色念珠菌, 而与其他念珠菌属真菌、非念珠菌属真菌、细菌、寄生虫和病毒均未产生交叉反应, 特异性为 100%。

TaqMan-MGB 探针 RTFQ-PCR 检测 $5 \times 10^9 \sim 5 \times 10^0 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 白色念珠菌 ATCC10231 标准株时, 均有特异性光滑荧光扩增曲线出现, 且 Ct 值均小于 38。灵敏度试验结果显示, 本研究建立的 TaqMan-MGB 探针 RTFQ-PCR 方法检测白色念珠菌最低检测限为 5 CFU, 灵敏度较高。

白色念珠菌 TaqMan-MGB 探针 RTFQ-PCR 标准曲线、特异性、灵敏度试验结果见图 1。

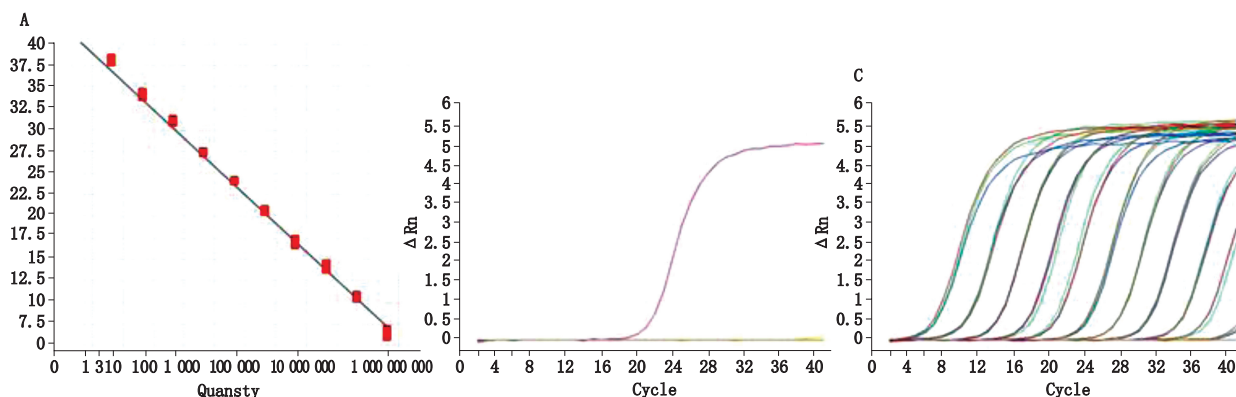


图 1 白色念珠菌 TaqMan-MGB 探针 RTFQ-PCR 标准曲线、特异性、灵敏度试验

Fig. 1 Standard curve, specificity and sensitivity test of TaqMan-MGB probe based RTFQ-PCR for *Candida albicans*

2.2 白色念珠菌 TaqMan-MGB 探针 RTFQ-PCR 重复性和稳定性分析 将 TaqMan-MGB 探针 RTFQ-PCR 配套试剂在不同温度放置近 1 年均能有效用于白色念珠菌定量检测,由表 3 可知,组内 RSD 在 0.09%~0.8% 之间,组间 RSD 在 0.03%~1.8% 之间,组

内和组间 RSD 均小于 2%。在本研究的重复性和稳定性测试中 TaqMan-MGB 探针 RTFQ-PCR 相关系数、斜率和效率没有显著变化,表明该方法稳定性好、精密度高。

表 3 白色念珠菌 TaqMan-MGB 探针 RTFQ-PCR 重复性试验

Tab. 3 Reproducibility test results of TaqMan-MGB probe based RTFQ-PCR for *Candida albicans*

组别 (group)	定量分析 (quantitative analysis)	Ct					
		Ct 值 1 (Ct value 1)	Ct 值 2 (Ct value 2)	Ct 值 3 (Ct value 3)	平均值 (mean)	SD	RSD/%
组内 (intra-group)	5×10^6	16.93	16.81	16.69	16.81	0.12	0.7
	5×10^5	20.58	20.9	20.57	20.68	0.18	0.8
	5×10^4	24.12	23.85	24.16	24.04	0.16	0.6
	5×10^3	27.38	27.40	27.43	27.4	0.025	0.09
	5×10^2	31.25	30.93	31.28	31.15	0.19	0.6
组间 (inter-group)	5×10^6	16.94	17.35	17.44	17.24	0.26	1.5
	5×10^5	21.54	20.86	20.83	21.07	0.4	1.8
	5×10^4	23.83	24.11	24.31	24.08	0.24	0.9
	5×10^3	27.52	27.54	27.53	27.53	0.01	0.03
	5×10^2	30.64	30.88	29.87	30.46	0.52	1.7

2.3 临床标本中白色念珠菌的定量检测结果 本研究建立的 TaqMan-MGB 探针 RTFQ-PCR 检测临床标本中白色念珠菌的判定标准: 标本 Ct ≤ 35 且有典型 S 型扩增曲线者判为阳性; 标本 Ct > 35 或无典型 S 型扩增曲线者判为阴性; 每次试验在阴性对照、阳性对照均成立的情况下结果方有效。1 185 份临床标本经 TaqMan-MGB 探针 RTFQ-PCR 检测, 结果显示有 94 份标本 Ct ≤ 35 且呈现典型 S 型扩增曲线判为白色念珠菌阳性(图 2)。定量 PCR 检测结果表明阳性标本中白色念珠菌核酸载量范围为 $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^2$ CFU $\cdot$ mL $^{-1}$ 。临床病人、小型猪阳性标本白色念珠菌核酸载量较高, 猴、灰仓鼠、地鼠、豚鼠、大鼠和小鼠标本中白色念珠菌载量较低。如临床病人 12 例白色念珠菌阳性 Ct 值: Y14 腹水 23.02, 血清 27.72, Y20 腹水 24.60, Y27 腹水 23.83, Y29 腹水 26.62, Y30 腹水 26.19, Y31 腹水 27.68, Y32 腹水 28.18, Y35 腹水 21.95, Y38 腹水 29.30, Y42 腹水 23.91, Y43 腹水 30.72, Y44 腹水 28.88。小型猪 31 头阳性 Ct 值:

P1 血清 21.58, 肝 25.54; P2 肝 27.39; P3 鼻 24.80; P4 心 28.37; P5 淋巴结 29.43; P6 鼻 25.69; P7 鼻 22.13; P8 鼻 21.78; P9 鼻 21.41; P11 鼻 21.09; P12 鼻 21.26, 肝 28.15; P13 脑 29.97; P14 鼻 19.51; P15 鼻 21.52; P16 血清 23.51, 鼻 23.97, 肝 30.39; P17 鼻 22.38, 肠 25.85; P18 鼻 21.38; P19 鼻 23.57; P20 淋巴结 29.18; P21 血清 23.49; P23 脑 30.29; P26 血清 23.06; P31 血清 22.39; P36 血清 21.87; P43 血清 23.14; P(1) 血清 29.32, 淋巴结 29.71, 肺 27.75, 脾 29.95, 肾 29.74, 肠 30.19, 脑 28.67; P(2) 血清 24.39, 气管 30.57, 淋巴结 26.86, 心 28.48, 肺 29.1, 肝 25.375, 肝 28.73, 脾 30.38, 肾 26.57, 肠 28.59, 脑 27.85; P(3) 淋巴结 27.96, 心 24.28, 肝 29.61, 脾 28.53, 肾 26.19, 肠 25.27, 脑 29.61; P(4) 血清 29.11, 气管 24.99, 淋巴结 26.48, 心 25.59, 肺 25.32, 脾 27.73, 肾 27.6, 肠 28.502, 脑 28.3; P(5) 气管 29.39, 淋巴结 28.72, 心 27.99, 肺 27.73, 肝 29.17, 脾 28.56, 肾 25.91, 肠 24.51, 脑 26.31。灰仓鼠 10 只阳性 Ct 值: HCS8 毛 30.35, HCS9 毛 29.03, HCS39 毛 28.11,

HCS47 毛 30.25, HCS49 毛 30.92, HCS50 毛 30.90, HCS52 毛 30.74, HCS55 毛 29.98, HCS56 毛 25.81, HCS57 毛 28.50。临床病人、猴、小型猪、灰仓鼠、地鼠、豚鼠、大鼠和小鼠标本中的白色念珠菌阳性检出率分别为 17.3% (12/69)、4.4% (5/112)、51.6% (31/60)、16.6% (10/60)、5.7% (7/122)、1.25% (2/160)、7.5% (3/40) 和 6.2% (24/382) (表 4)。同时,应用白色念珠菌普通 PCR 方法对这 94 份阳性标本进行验证检测,均能获得 ITS (498 bp) 和 26S rRNA (524 bp) 基因特异性目的条带,显示普通 PCR 检测与 TaqMan-MGB 探针 RTFQ-PCR 检测结果相一致。然而,上述 94 份阳性标本经真菌培养鉴定,仅从猴、灰仓鼠、豚鼠阳性标本中分离获得 8 株存活的白色念珠菌,菌株编号为 GZQCA1、GZQCA2、GZQCA3、GZQCA4、GZQCA5、GZQCA6、GZQCA7、GZQCA8,其菌落特征卵圆形孢子假菌丝形态显微摄录照片见图 3。采用白色念珠菌普通 PCR 方法均可扩增出这 8 株白色念珠菌 ITS (498 bp) 和 26S rRNA (524 bp) 基因特异性

片段,对其 ITS 和 26S rRNA 基因分别进行克隆测序,将本研究获得的白色念珠菌基因测序数据,在线提交 NCBI (National Center of Biotechnology Information, 美国国家生物技术信息中心),通过 BLAST (Basic Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 进行比对分析,结果显示本研究自临床标本中分离获得的白色念珠菌 ITS、26S rRNA 序列,与国际上已公布的不同国家不同物种来源的白色念珠菌 ITS、26S rRNA 基因核苷酸同源性高达 100% (GenBank accession number: JN882316.1、HQ014713.1、GU319987.1、FN652297.1、GQ376070.1、EU266569.1、KJ624035.1、KF214375.1、KP780462.1、AF156537.1、JX094790.1、FJ627953.1),测序结果证实这 8 个菌株确为白色念珠菌。本研究将 TaqMan-MGB 探针 RTFQ-PCR 成功应用于临床标本中白色念珠菌核酸载量的定量检测,用普通 PCR 和基因克隆测序进行确证。整个检测过程可在 2 h 内完成,可以用作定量分析快速诊断方法。

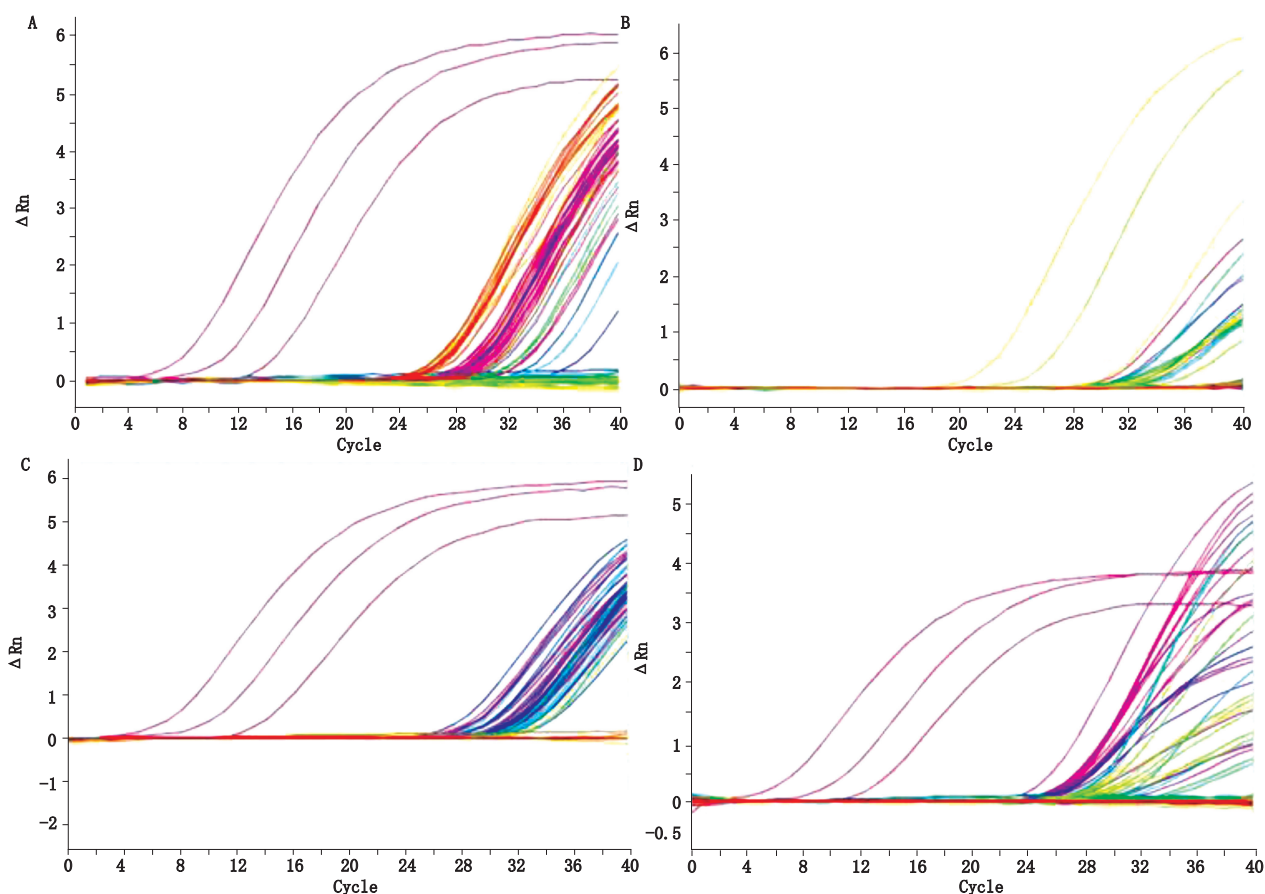


图 2 TaqMan-MGB 探针 RTFQ-PCR 检测临床标本中白色念珠菌

Fig. 2 Detection of *Candida albicans* in clinical specimens by TaqMan-MGB probe based RTFQ-PCR assay

表4 TaqMan-MGB 探针 RTFQ-PCR 检定多种临床标本中白色念珠菌阳性

Tab. 4 Numbers of clinical specimen positive for *Candida albicans* identified by TaqMan-MGB probe based RTFQ-PCR assay

标本类型 (阳性标本数 / 检测标本数) [specimen types (no. of positive specimens/no. tested)]	阳性标本总数 (阳性率) [total no. of specimens positive (positive rate)]	标本类型 (阳性标本数 / 检测标本数) [specimen types (no. of positive specimens/no. tested)]	阳性标本总数 (阳性率) [total no. of specimens positive (positive rate)]
病人腹水 (12/69) [patient ascites (12/69)]	12 (17.3%)	灰仓鼠血清 (0/60) [Cricetulus migratorius serum (0/60)]	10 (16.7%)
病人血清 (1/69) [patient serum (1/69)]		灰仓鼠毛 (10/60) [Cricetulus migratorius hair (10/60)]	
猴血清 (0/112) [monkey serum (0/112)]	5 (4.4%)	灰仓鼠气管 (0/60) [Cricetulus migratorius trachea (0/60)]	
猴粪便 (5/112) [monkey faeces (5/112)]		灰仓鼠肠 (0/60) [Cricetulus migratorius intestine (0/60)]	
小型猪血清 (10/60) [minipig serum (10/60)]	31 (51.6%)	长爪沙鼠血清 (0/65) [Mongolia gerbil serum (0/65)]	0
小型猪鼻 (13/60) [minipig nose (13/60)]		地鼠血清 (0/122) [hamster serum (0/122)]	7 (5.7%)
小型猪气管 (3/60) [minipig trachea (3/60)]		地鼠肠 (5/122) [hamster intestine (5/122)]	
小型猪颌下淋巴结 (7/60) [minipig submaxillary lymph node (7/60)]		地鼠肺 (2/122) [hamster lung (2/122)]	
小型猪心 (5/60) [minipig heart (5/60)]		地鼠肝 (1/122) [hamster liver (1/122)]	
小型猪肺 (4/60) [minipig lung (4/60)]		豚鼠血清 (0/160) [Guinea pig serum (0/160)]	2 (1.25%)
小型猪肝 (8/60) [minipig liver (8/60)]		豚鼠肠 (2/160) [Guinea pig intestine (2/160)]	
小型猪脾 (5/60) [minipig spleen (5/60)]		大鼠血清 (3/40) [rat serum (3/40)]	3 (7.5%)
小型猪肾 (5/60) [minipig kidney (5/60)]		大鼠肠 (0/40) [rat intestine (0/40)]	
小型猪肠 (6/60) [minipig intestine (6/60)]		小鼠血清 (3/382) [mouse serum (3/382)]	24 (6.2%)
小型猪脑 (7/60) [minipig brain (7/60)]		小鼠毛 (0/382) [mouse hair (0/382)]	
犬血清 (0/55) [dog serum (0/55)]	0	小鼠肠 (16/382) [mouse intestine (16/382)]	
犬粪便 (0/55) [dog faeces (0/55)]		小鼠溃疡皮肤 (2/382) [mouse skin ulcer (2/382)]	
数鼯血清 (0/60) [tree shrew serum (0/60)]	0	小鼠胎儿 (3/382) [mouse fetus (3/382)]	



图3 白色念珠菌临床分离株培养和形态特征

Fig. 3 Cultural characteristics and morphological photos of *Candida albicans* clinical isolates

2.4 白色念珠菌临床分离株药敏分析 本研究采用 Neo-Sensitabs 药片 (Rosco, 丹麦) 扩散法进行抗真菌药物敏感性试验分析, 在负压生物安全柜内, 用无菌生理盐水分别将各白色念珠菌悬液调整为 0.5 麦克斯兰标准浊度, 用灭菌棉签蘸取后均匀涂布于 4 mm 厚的改良 Shadomy 琼脂板 (广州 Detgerm 微生物科技有限公司产品) 表面。分别将 10 种药片: 两性霉素 B (amphotericin B; 10 μg)、制霉菌素 (nystatin; 50 μg)、酮康唑 (ketoconazole; 15 μg)、咪康唑 (miconazole; 10 μg)、克霉唑 (clotrimazole; 10 μg)、益康唑 (econazole; 10 μg)、氟康唑 (fluconazole; 25 μg)、伏尔康唑 (voriconazole; 1 μg)、特比萘芬 (terbinafine; 30 μg) 和氟胞嘧啶 (flucytosine; 10 μg) 放置在各接种板的表面, 经 35 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后, 准确记录各个抑菌圈直径的大小。药敏片检测结果参考试剂盒内所提供的标准。根据药片周围白色念珠菌被抑制的范围直径大小来确定抗真菌药物对白

色念珠菌的抑制作用。白色念珠菌 ATCC 64548 为质控菌株。对本研究分离获得白色念珠菌进行抗真菌药物敏感性分析(表 5),结果显示,这些菌株对制

霉菌素、咪康唑、克霉唑、益康唑、氟康唑、沃尔康唑均较敏感,但对两性霉素 B、酮康唑、特比萘芬、氟胞嘧啶已产生了耐药性。

表 5 白色念珠菌临床分离株药敏试验

Tab. 5 Antifungal susceptibility test of *Candida albicans* clinical isolates

项目 (item)	白色念珠菌临床分离株名称 (name of <i>Candida albicans</i> clinical isolates)							
	GZQCA1	GZQCA2	GZQCA3	GZQCA4	GZQCA5	GZQCA6	GZQCA7	GZQCA8
两性霉素 B (amphotericin B)	30, S ^{a)}	20, S	0, R ^{b)}	20, S	20, S	20, S	20, S	20, S
制霉菌素 (nystatin)	30, S	40, S	15, S	20, S	40, S	20, S	20, S	20, S
酮康唑 (ketoconazole)	50, S	40, S	25, I ^{c)}	12, R	50, S	40, S	40, S	40, S
咪康唑 (miconazole)	35, S	35, S	25, S	20, S	35, S	30, S	35, S	30, S
克霉唑 (clotrimazole)	45, S	40, S	30, S	25, S	35, S	35, S	35, S	30, S
益康唑 (econazole)	45, S	35, S	25, S	30, S	35, S	30, S	30, S	25, S
氟康唑 (fluconazole)	40, S	40, S	30, S	25, S	35, S	35, S	35, S	30, S
沃尔康唑 (voriconazole)	35, S	35, S	35, S	25, S	35, S	35, S	35, S	30, S
特比萘芬 (terbinafine)	30, S	30, S	0, R	40, S	30, S	20, S	20, S	0, R
氟胞嘧啶 (flucytosine)	35, S	50, S	0, R	0, R	50, S	30, S	30, S	35, S

^{a)}“S”指敏感 (“S” means sensitive); ^{b)}“R”指耐药 (“R” means resistant); ^{c)}“I”指中介 (“I” means intermediate)

3 讨论

在本研究中,将新近开发评价的白色念珠菌 TaqMan-MGB 探针 RTFQ-PCR 应用于检测,不但灵敏度和特异性大大提高,而且操作简便快捷,尤其适于白色念珠菌感染的早期诊断和临床标本的定量快检鉴定。本研究结果显示,白色念珠菌阳性临床标本主要来源为呼吸道、肠道和血液系统,与相关文献报道^[20]一致。通过对白色念珠菌分离株进行抗真菌药物敏感性试验分析发现,这些菌株对制霉菌素、咪康唑、克霉唑、益康唑、氟康唑、沃尔康唑敏感,但对两性霉素 B、酮康唑、特比萘芬、氟胞嘧啶已产生耐药性,与相关文献报道^[21]不同。

本研究应用 TaqMan-MGB 探针 RTFQ-PCR 和基因克隆测序联合真菌培养及抗真菌药物敏感性试验分析方法对白色念珠菌从分子水平、基因分布特点、表型特征、药敏特性等多方面进行分析鉴定。通过 TaqMan-MGB 探针 RTFQ-PCR、基因克隆测序鉴定、真菌分离培养鉴定、抗真菌药物敏感性试验分析方法的比较发现,真菌分离培养鉴定获得存活的白色念珠菌的数量是有限的,在临床标本中其实还存在着一些活的处于不可培养状态的白色念珠菌,分离

培养方法难以捕获到这些真菌,这在一定程度上影响了临床上致病真菌检查的敏感性。尽管 TaqMan-MGB 探针 RTFQ-PCR 检测临床病人、小型猪阳性标本中白色念珠菌的核酸载量较高,但真菌分离培养鉴定却并未获得存活的菌株。虽然猴、灰仓鼠、豚鼠阳性标本中白色念珠菌的核酸载量并不高,但却从中分离获得了生长状况良好的菌株。究其原因,可能是由于临床抗菌药物的应用,抑制了病人标本中白色念珠菌的发育;小型猪标本中白色念珠菌因受营养条件限制而繁殖受抑制。本研究结果显示实际临床标本中白色念珠菌的核酸定量检测结果并不一定与分离获得完整的存活的可培养的菌株结果相互吻合,因此在实际工作中全面合理分析比对参考甄别选用可信数据就显得非常重要^[22]。应用 TaqMan-MGB 探针 RTFQ-PCR 在小型猪多个组织脏器中检出白色念珠菌,血、鼻、气管、淋巴结、肺、心、肝、脾、肾、肠、脑中存在不同程度载量的白色念珠菌,这为进一步研究致病真菌对动物活体侵袭感染的动态分布提供了新的思路。今后,要更加科学地将分子快检技术有效地与病原体形态学鉴定方法结合起来应用,做到快速定量精准检定有效防控疫病,

筑牢保护人民生命健康,保障人们用药安全的坚固屏障。

日益繁荣的全球贸易加速了外来物种的引入,加剧了病原体的远距离传播。尤其对于一些特殊稀少样品资源(如:基因修饰种子细胞动物、干细胞、植入性医疗器械等)的检验,如何快速准确无痛无创无破坏性定量定性捕获病原体?这对检定工作提出了新的精准时限要求,本研究新建立的 TaqMan-MGB 探针 RTFQ-PCR 检测方法,具有快速简便,特异性强,灵敏度高,重复性好的特性,适于动物源性产品中白色念珠菌检测、食品药品生物制品医疗器械安全检查、环境监测和流行病学调查,为临床标本中白色念珠菌的快速定量检测提供了一种特异有效的评价工具,值得推广应用。

参考文献

- [1] ROSSIGNOL T, LECHAT P, CUOMO C, *et al.* CandidaDB: a multi-genome database for Candida species and related Saccharomycotina [J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36 (Database issue): D557
- [2] ARENDRUP MC. Candida and candidaemia. Susceptibility and epidemiology [J]. Dan Med J, 2013, 60 (11): B4698
- [3] GUDUCUOGLU H, GULTEPE B, OTLU B, *et al.* Candida albicans outbreak associated with total parenteral nutrition in the neonatal unit [J]. Indian J Med Microbiol, 2016, 34 (2): 202
- [4] RAMLA S, SHARMA V, PATEL M. Influence of cancer treatment on the Candida albicans isolated from the oral cavities of cancer patients [J]. Support Care Cancer, 2016, 24 (6): 2429
- [5] MENEZES TO, GILLET LC, MENEZES SA, *et al.* Virulence factors of Candida albicans isolates from the oral cavities of HIV-1-positive patients [J]. Curr HIV Res, 2013, 11 (4): 304
- [6] QUERQUES G, MODORATI G, MISEROCCHI E, *et al.* Bilateral endogenous endophthalmitis caused by Candida albicans after breast implant surgery [J]. JAMA Ophthalmol, 2016, 134 (4): 467
- [7] SELEK MB, KULA ATIK T, BEKTÖRE B, *et al.* First report of macroscopic biofilm formation caused by Candida albicans on silver hydrogel-coated urinary catheters [J]. Am J Infect Control, 2016, pii: S0196-6553 (16) 30257
- [8] SHETH CC, JOHNSON E, BAKER ME, *et al.* Phenotypic identification of Candida albicans by growth on chocolate agar [J]. Med Mycol, 2005, 43 (8): 735
- [9] DUTTON S, PENN CW. Biological attributes of colony-type variants of Candida albicans [J]. J Gen Microbiol, 1989, 135 (12): 3363
- [10] ISHIGURO A, HOMMA M, TORII S, *et al.* Identification of Candida albicans antigens reactive with immunoglobulin E antibody of human sera [J]. Infect Immun, 1992, 60 (4): 1550
- [11] BEN ABDELJELIL J, SAGHROUNI F, EMIRA N, *et al.* Molecular typing of Candida albicans isolates from patients and health care workers in a neonatal intensive care unit [J]. J Appl Microbiol, 2011, 111 (5): 1235
- [12] ISIK N, WHITE L, BARNES R, *et al.* A simple PCR/RFLP analysis can differentiate between Candida albicans, Aspergillus niger, and Aspergillus fumigatus [J]. Mol Biotechnol, 2003, 24 (3): 229
- [13] BIERNASIUK A, KORONA-GLOWNIAK I, GRZEGORCZYK A, *et al.* Differentiation by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) of Candida albicans isolated from upper respiratory tract in patients with non-small cell lung cancer [J]. Acta Biochim Pol, 2014, 61 (4): 727
- [14] NABILI M, ASHRAFI M, JANBABAIE G, *et al.* Quantification and optimization of Candida albicans DNA in blood samples using real-time PCR [J]. Rep Biochem Mol Biol, 2013, 2 (1): 42
- [15] ARANCIA S, CARATTOLI A, LA VALLE R, *et al.* Use of 65 kDa mannoprotein gene primers in real time PCR identification of Candida albicans in biological samples [J]. Mol Cell Probes, 2006, 20 (5): 263
- [16] MAAROUI Y, HEYMANS C, DE BRUYNE JM, *et al.* Rapid detection of Candida albicans in clinical blood samples by using a TaqMan-based PCR assay [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41 (7): 3293
- [17] 高正琴,岳乘飞. 中国新疆灰仓鼠真菌多样性 [J]. 中国人兽共患病学报, 2014, 30 (7): 709
GAO ZQ, YUE BF. Diversity of fungi derived from the Cricetulus migratorius from the Xinjiang region of China [J]. Chin J Zoonoses, 2014, 30 (7): 709
- [18] ESPINEL-INGROFF A, CANTON E, FOTHERGILL A, *et al.* Quality control guidelines for amphotericin B, Itraconazole, posaconazole, and voriconazole disk diffusion susceptibility tests with nonsupplemented Mueller-Hinton Agar (CLSI M51-A document) for nondermatophyte filamentous fungi [J]. J Clin Microbiol, 2011, 49 (7): 2568
- [19] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts: approved guideline M44-A [S]. Wayne: NCCLS, 2004
- [20] BOUGNOUX M, DUPONT C, MATEO J, *et al.* Serum is more suitable than whole blood for diagnosis of systemic candidiasis by nested PCR [J]. J Clin Microbiol, 1999, 37 (4): 925
- [21] KIM K, ZILBERMINTZ L, MARTCHENKO M. Repurposing FDA approved drugs against the human fungal pathogen, Candida albicans [J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2015, 14: 32
- [22] 高正琴,邢进,冯育芳,等. 应用 TaqMan MGB 探针实时荧光定量 PCR 结合分离培养监测分析灰仓鼠细菌多样性 [J]. 药物分析杂志, 2014, 34 (2): 221
GAO ZQ, XING J, FENG YF, *et al.* Monitor and analysis bacterial diversity of Cricetulus migratorius by TaqMan MGB probe real-time fluorescence quantitative PCR and bacteria isolation culture [J]. Chin J Pharm Anal, 2014, 34 (2): 221

(本文于2016年6月20日收到)