

- 1154 - 1157
- 3 Rong R, Xijun X. Erythropoietin pretreatment suppresses inflammation by activating the PI3K/Akt signaling pathway in myocardial ischemia - reperfusion injury[J]. *Exp Ther Med*, 2015, 10(2): 413 - 418
 - 4 薛武超, 刘达兴, 梁贵友, 等. 促红细胞生成素对小鼠心肌缺血再灌注损伤后慢性纤维化的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2015, 32(1): 203 - 205
 - 5 王琛, 司瑞, 张明明, 等. 促红细胞生成素衍生肽抑制大鼠心肌微血管内皮细胞缺血再灌注损伤的作用研究[J]. *中国循环杂志*, 2015, 3(24): 280 - 284
 - 6 Simon FH, Erhart P, Vcelar B, *et al.* Erythropoietin preconditioning improves clinical and histologic outcome in an acute spinal cord ischemia and reperfusion rabbit model[J]. *J Vasc Surg*, 2015, 14(15): 2047 - 2049
 - 7 Kai - lan W, Si Z. Pretreatment with erythropoietin attenuates intestinal ischemia reperfusion injury by further promoting PI₃K/Akt signaling activation[J]. *Transplant Proc*, 2015, 47(6): 1639 - 1645
 - 8 徐建平, 张俐, 郑忠, 等. 人参皂甙改善 Hsp70/Bax 及 EAAS 表达在脊髓缺血再灌注损伤中作用的实验研究[J]. *生物骨科材料与临床研究*, 2014, 11(6): 6 - 11
 - 9 陈树杰. 辛伐他汀后适应对血脂正常大鼠缺血再灌注心肌保护作用[J]. *中国心血管病研究*, 2015, 13(4): 372 - 375
 - 10 Foley LS, Fullerton DA, Bennett DT, *et al.* Spinal cord ischemia - reperfusion injury induces erythropoietin receptor expression[J]. *Ann Thorac Surg*, 2015, 100(1): 41 - 46
 - 11 王钟兴, 黄雄庆, 刘卫锋, 等. 阿司匹林对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及其机制[J]. *中华实验外科杂志*, 2015, 32(2): 349 - 351
 - 12 董建新, 杨牟, 张居文, 等. 线粒体通透性转换孔在缺血后适应减轻兔肠缺血再灌注损伤中的作用[J]. *中华实验外科杂志*, 2015, 32(2): 327 - 329
 - 13 Liu QS, Cheng ZW, Xiong JG, *et al.* Erythropoietin pretreatment exerts anti - inflammatory effects in hepatic ischemia/reperfusion - injured rats via suppression of the TLR2/NF - κ B pathway[J]. *Transplant Proc*, 2015, 47(2): 283 - 289
 - 14 欧军, 赵红, 谢红, 等. 七氟醚预处理对脊髓缺血再灌注大鼠 5 脂氧合酶表达的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2015, 25(25): 12 - 15
 - 15 滕宏涛, 葛明旭, 孔大伟, 等. 促红细胞生成素预处理对脑缺血再灌注损伤的保护作用及机制研究[J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2015, 19(8): 20 - 22
 - 16 Chen X, Wang CC, Song SM, *et al.* The administration of erythropoietin attenuates kidney injury induced by ischemia/reperfusion with increased activation of Wnt/ β - catenin signaling[J]. *J Formos Med Assoc*, 2015, 114(5): 430 - 437
 - 17 高广生, 张福森. 促红细胞生成素对心肺复苏后大鼠神经功能及脑细胞凋亡的影响[J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2014, 23(5): 402 - 404
 - 18 刘彩树, 李为朋, 闫合燕, 等. 促红细胞生成素对大鼠肢体缺血再灌注后肾血流的影响[J]. *天津医药*, 2014, 7(9): 661 - 663

(收稿日期: 2015 - 12 - 15)

(修回日期: 2015 - 12 - 23)

白色念珠菌 ITS2 的实时荧光定量 PCR 快速检测方法的建立及评价

郭 毅 杨靖娴 邵冬华 刘 静 梁国威

摘 要 **目的** 建立一种快速鉴定白色念珠菌的实时荧光定量 PCR 检测方法。**方法** 在白色念珠菌核糖体 RNA 编码基因(rDNA)中的内转录间隔区 2(ITS2)上设计特异性引物和 TaqMan - MGB 探针, 通过实时荧光定量 PCR 分析系统建立白色念珠菌的检测方法, 对其敏感度、重复性和特异性进行方法学评价, 并在模拟白色念珠菌血症的血标本中初步探讨其应用价值。**结果** 所建方法对白色念珠菌纯菌液的准确检测下限为 10^1 CFU/ml, 相应的批内、批间变异系数(CV)分别为 1.57% 和 2.20%。对 135 株白色念珠菌临床分离株、其他非白念菌株、细菌临床分离株和血液标本进行检测, 结果显示该方法特异性为 100%。另外, 对于模拟白色念珠菌血症的血标本, 该方法的最低检测下限为 10^2 CFU/ml。**结论** 所建方法具有特异性和敏感度高、重复性好的特性, 可适用于临床上白色念珠菌引起的血流感染的快速鉴定。

关键词 白色念珠菌 实时荧光定量 PCR 内转录间隔区 2(ITS 2) 血流感染

中图分类号 R4 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.07.022

基金项目: 北京大学航天临床医学院科研基金资助项目(YN201322)

作者单位: 100049 北京大学航天临床医学院检验科

通讯作者: 梁国威, 电子信箱: LGW721@163.com

A Novel Real – time PCR Assay Based on the Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) for Rapid Identification of Candida Albicans. Guo Yi, Yang Jingxian, Shao Donghua, et al. Department of Clinical Laboratory, Peking University Aerospace School of Clinical Medicine, Beijing 100049, China

Abstract Objective To develop a novel real – time PCR for rapid identification of *Candida albicans* (*C. albicans*). **Methods** Unique primers and the TaqMan – MGB probe were designed on the internal transcribed spacer 2 (ITS2) of rRNA gene(*rDNA*) in *C. albicans*. The sensitivity, specificity and reproducibility of the method were then evaluated. Meanwhile, clinical applicability to detect candidemia of the assay was tested in simulated *C. albicans* infection blood samples. **Results** The lowest amount of *C. albicans* that the assay can measure accurately in suspensions was 10^1 CFU/ml. The coefficients of variability (CV) for the detection limit were 1.57% and 2.20% in inter – assay and intra – assay respectively. The reaction specificity was 100 % when evaluating the assay using DNA samples from clinical isolates of 135 *C. albicans* strains, other *Candida* spp. strains, bacterial strains and human blood. For simulated infection blood samples, the detection limit of *C. albicans* was 10^2 CFU/ml. **Conclusion** The newly developed method was a highly sensitive and specific assay, which could also be applied to rapid diagnosis of blood stream infection induced by *C. albicans*.

Key words *Candida albicans*; Quantitative real – time PCR; Internal transcribed spacer 2 (ITS2); Blood stream infection (BSI)

近些年来, 抗生素的不合理使用使得真菌引起的机会性感染患病率增加^[1]。念珠菌仍然是首要的致病真菌, 特别是在血流感染 (bloodstream infections, BSI) 中^[2]。其中, 白色念珠菌是念珠菌属中引起 BSI 的最常见菌种, 临床分离率可达到 50.0% ~ 61.9%^[2~7]。目前, 通过培养的方法鉴定白色念珠菌仍是确定患者感染的主要手段, 但其所需的检测时间长, 不利于抗真菌治疗的早期进行^[8]。另外, 培养方法还存在敏感度欠佳的问题, 如有报道显示模拟念珠菌血症的血培养检出率仅为 56%, 且对于接受过抗生素治疗的患者, 检测阳性率更低^[9,10]。使用 PCR 及其衍生的分子生物学方法可有效解决上述问题^[11]。目前, 针对白色念珠菌不同靶基因, 以及特异性引物和探针设计位点的选择皆可显著影响检测结果, 仍存在较大的争议^[11~15]。

因此, 本研究选择白色念珠菌 rRNA 编码基因 (*rDNA*) 中的内转录间隔区 2 (ITS2) 作为靶基因设计特异性引物和探针, 建立检测白色念珠菌的实时荧光定量 PCR 方法, 并对该方法的临床应用价值进行初步评价。

材料与方法

1. 材料: 标准菌株: 白色念珠菌 (ATCC 10231) 1 株, 购自中国普通微生物菌种保藏中心; 都柏林念珠菌 1 株, 来自卫生部质控中心。临床分离菌株: 来自航天中心医院微生物室菌种保存库, 包括 135 株白色念珠菌、102 株光滑念珠菌、61 株热带念珠菌、24 株近平滑念珠菌、12 株克柔念珠菌、24 株大肠杆菌、24 株肺炎克雷伯菌、24 株变形杆菌、24 株黏质沙雷菌、24 株铜绿假单胞菌、24 株鲍曼不动杆菌以及 24 株金黄色葡萄球菌。以上菌株经微生物鉴定仪 (Vitek II,

生物梅里埃公司, 法国) 鉴定确认。血标本 10 例, 来自健康志愿者。

2. 方法: (1) 白色念珠菌计数: 血平板上过夜培养白色念珠菌标准菌株, 之后挑取 5 ~ 6 个菌落置入 1ml DNA 提取液 I (中山大学达安基因股份有限公司) 中配成菌悬液, 采用改良牛鲍式血球计数板, 按标准操作规程计数。其中念珠菌芽体体积小于母体 1/2 计数为 1 个, 大于母体 1/2 计数为 2 个。(2) 临床分离菌株及人基因组 DNA 提取: 菌株 DNA 提取: 采用热休克法提取菌株 DNA。具体步骤: 菌悬液 100℃ 加热 15min, -80℃ 冷冻 10min, 重复 3 次, 12000r/min 离心 15min, 上清即为菌株 DNA 粗提液, -80℃ 保存备用。人基因组 DNA 提取: 按照血液基因组 DNA 提取试剂盒 (天根生化科技有限公司) 操作步骤, 从健康志愿者血液标本中提取人基因组 DNA, -80℃ 保存备用。(3) 白色念珠菌标准菌株 DNA 提取: 取浓度为 $10^7 \sim 10^1$ CFU/ml 的纯菌液各 100μl, 分别注入 900μl DNA 提取液 I 中, 然后采用上述热休克法提取 DNA。上清液经过酵母菌基因组 DNA 提取试剂盒 (天根生化科技有限公司) 中的过滤柱处理, 50μl 洗脱, -80℃ 保存备用。(4) 白色念珠菌模拟感染血标本的配置及 DNA 提取: 取浓度为 $10^7 \sim 10^1$ CFU/ml 的白色念珠菌标准菌株悬液各 100μl, 分别注入 900μl EDTA 抗凝的健康人血液中, 制成梯度模拟感染血标本。将 3 倍体积的细胞裂解液 CL (天根生化科技有限公司) 加入上述标本中, 室温 10min, 5250 × g 离心 15min 后弃上清; 再次加入 3 倍体积细胞裂解液 CL, 室温 30min, 5250 × g 离心 15min, 弃上清; 向沉淀中加入与血标本等体积白细胞裂解液 (10mmol/L Tris [pH 7.6]、10mmol/L EDTA

[pH 8.0]、50mmol/L NaCl, 0.2% SDS、200μg/ml 蛋白酶 K), 65℃ 90min, 5250 × g 离心 15min, 弃上清。400μl DNA 提取液 I 重悬沉淀后, 按热休克法提取 DNA, 上清液经过滤柱, 20μl 洗脱, -80℃ 保存备用。

(5) 引物和探针设计: 在 Pubmed 的 Nucleotide 数据库中检索 ATCC 10231 白色念珠菌 ITS2 序列 (GenBank: FJ159643.1)。通过 ITS2 序列比对, 使用 Primer 5.0 软件设计引物和探针。上游引物: 5′-GTTTG-GTGTGAGCAATACGACT-3′ (序列位置: 322~344)、下游引物 5′-CCTAAGCCATTGTCAAAGCGA-3′ (序列位置: 381~401), TaqMan-MGB 探针: 5′-FAM-CGCCTTACCACTACCGT-MGBNFQ-3′ (序列位置: 361~377), 扩增片段长度为 80bp。

(6) 实时荧光定量 PCR 反应体系与扩增条件: PCR 反应体系为 20μl, 包括基因组 DNA 2μl, 上下游引物各 2μl (0.5μmol/L) (北京赛百盛基因技术有限公司, 中国), TaqMan-MGB 探针 1μl (0.25μmol/L) (ABI 公司, 美国), 2.5 × Master Mix 8μl 和 20 × Probe Enhancer solution 1μl (天根生化科技有限公司, 中国), 水 1μl。循环参数为 95℃ 2 min, 95℃ 15s 和 60℃ 1min, 进行 45 个循环。循环阈值 (Ct 值) 设定在 0.03, 基线设定为自动设定, 测定仪器为 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪 (ABI 公司, 美国)。

3. 方法学评价: (1) 使用紫外分光光度计 (UV -

2100, 尤尼柯 (上海) 仪器有限公司, 中国) 于波长 260 和 280nm 处检测白色念珠菌 DNA 提取液吸光度 (A), 确定 DNA 的浓度和纯度。(2) 10⁶ ~ 10⁰ CFU/ml 各浓度纯菌液提取的 DNA 批内重复 10 次测定, 以评价检测敏感度。(3) 将上文中所述各种 DNA 标本进行实时荧光 PCR 检测, 评价该方法的特异性。(4) 10⁶ ~ 10¹ CFU/ml 各浓度样本进行 10 次批内、批间检测, 计算 CV 值评价重复性。(5) 以 10⁶ CFU/ml 的白色念珠菌悬液中提取 DNA 进行系列稀释作为 DNA 梯度稀释标本, 以 10⁶ ~ 10¹ CFU/ml 菌悬液中提取的 DNA 作为菌液梯度稀释标本, 比较 DNA 提取方法是否影响检测结果;(6) 在 10⁶ ~ 10¹ CFU/ml 浓度梯度的模拟感染白色念珠菌感染的血标本中重复测定 2 次, 初步评价该方法在血流感染中的应用。

4. 统计学方法: 采用 SPSS 10.0 统计软件进行统计分析, 计量资料使用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 不同样本中提取 DNA 的浓度和纯度测定: 使用紫外分光光度计于波长 260nm 测得个各样本吸光度 (A) 后, 通过公式: 样本 DNA 浓度 (μg/ml) = A260 × 稀释倍数 × 50 (μg/ml), 计算出各样本中 DNA 的含量。于波长 280nm 测得个各样本吸光度 A 后, 通过公式 A260/A280 计算各样本中 DNA 的纯度 (表 1)。

表 1 不同样本中提取 DNA 的浓度和纯度

浓度 (CFU/ml)	菌液梯度稀释标本		DNA 溶液梯度稀释标本		模拟感染梯度稀释标本	
	浓度 (μg/ml)	A260/A280	浓度 (μg/ml)	A260/A280	浓度 (μg/ml)	A260/A280
10 ⁶	48.0	1.62	48.0	1.61	31.5	1.45
10 ⁵	43.0	1.46	41.5	1.54	26.5	1.57
10 ⁴	35.5	1.59	33.0	1.61	21.0	1.76
10 ³	28.5	1.67	25.0	1.45	18.5	1.53
10 ²	19.5	1.83	18.0	1.68	11.5	1.52
10 ¹	13.5	1.69	10.5	1.70	8.0	1.42
10 ⁰	7.5	1.48	7.0	1.40	3.5	1.67

2. 检测方法敏感度评价: 从浓度为 10⁶ ~ 10¹ CFU/ml 的白色念珠菌悬液中分别提取 DNA 后, 以其作为模版同时进行 10 次重复测定。其中 10⁶ ~ 10¹ CFU/ml 所对应结果皆为阳性 (其中 10¹ CFU/ml 的 Ct 值为 32.96 ± 0.52); 浓度为 10⁰ CFU/ml 菌液 10 次 PCR 反应中出现 6 次阳性结果 (Ct 值为 36.46 ± 0.77), 4 次阴性结果 (Ct 值 > 45)。显示本方法对菌液梯度稀释标本的最低检测限为 10⁰ CFU/ml, 准确检测下限为 10¹ CFU/ml (图 1A)。10⁶ ~ 10¹ CFU/ml 浓度梯度扩增

标准曲线的斜率 = -3.162, R² = 0.995 (图 1B)。

3. 检测方法特异性评价: 笔者采用所建方法检测了不同来源 DNA, 以评价其特异性, 其中 135 株白色念珠菌临床分离菌株检出率为 100%。其他非白色念珠菌来源的 DNA 检测结果均为阴性, 具体目录见前文中临床分离菌株部分。结果显示该方法检测白色念珠菌的特异性达到 100%。

4. 检测方法重复性评价: 将白色念珠菌 (ATCC 10231) 10⁶ ~ 10¹ CFU/ml 菌液梯度稀释标本进行 10

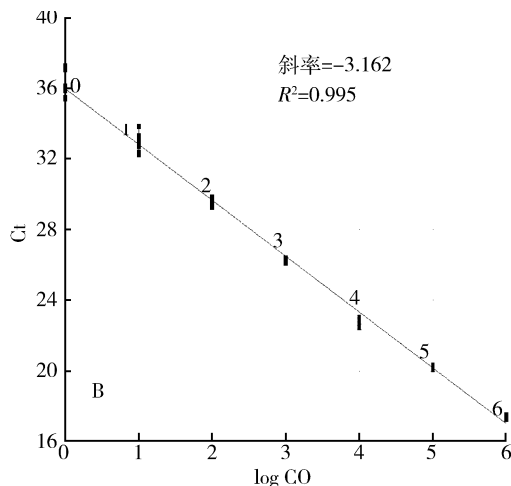
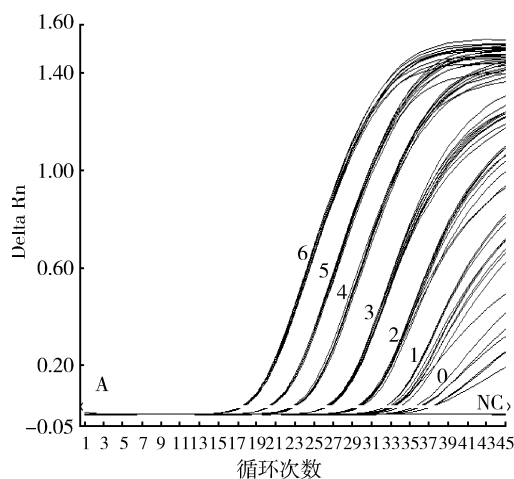


图1 白色念珠菌标准菌株菌液梯度 PCR 扩增曲线及标准曲线

A. PCR 扩增曲线; B. PCR 扩增标准曲线; 图中 0~6 代表浓度为 $10^6 \sim 10^1$ CFU/ml 白色念珠菌纯菌液; NC 代表阴性对照

次批内、批间重复性检测。批内 CV 值变化范围为 0.38% ~ 1.57%。其中, 10^1 CFU/ml 菌液所对应的 CV 值最大 (1.57%); 批间 CV 值的变化范围为 1.68% ~ 2.20%, 同样 10^1 CFU/ml 菌液所对应的 CV 值最大 (2.20%)。结果显示检测下线的总体重复性良好 (CV 值 < 5%, 表 2)。

5. DNA 提取方法评价: 将 10^6 CFU/ml 的白色念珠菌悬液中提取 DNA 进行系列稀释作为 DNA 梯度稀释标本, 将 $10^6 \sim 10^1$ CFU/ml 菌悬液中提取的 DNA 作为菌液梯度稀释标本, 以评价 DNA 提取方法的影

表 2 各浓度菌液批内和批间试验 Ct 值 [$\bar{x} \pm s$, CV (%)]

浓度 (CFU/ml)	批内 (n=10)		批间 (n=10)	
	Ct 值	CV	Ct 值	CV
10^6	17.41 $\pm$ 0.08	0.46	17.99 $\pm$ 0.30	1.68
10^5	20.09 $\pm$ 0.08	0.38	20.64 $\pm$ 0.31	1.51
10^4	22.67 $\pm$ 0.11	0.47	23.18 $\pm$ 0.26	1.13
10^3	26.23 $\pm$ 0.12	0.44	27.19 $\pm$ 0.49	1.80
10^2	29.51 $\pm$ 0.15	0.50	29.90 $\pm$ 0.31	1.05
10^1	32.96 $\pm$ 0.52	1.57	33.91 $\pm$ 0.75	2.20

响。扩增曲线结果见图 2A, 标准曲线见图 2B, 显示两种方法的检测结果差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

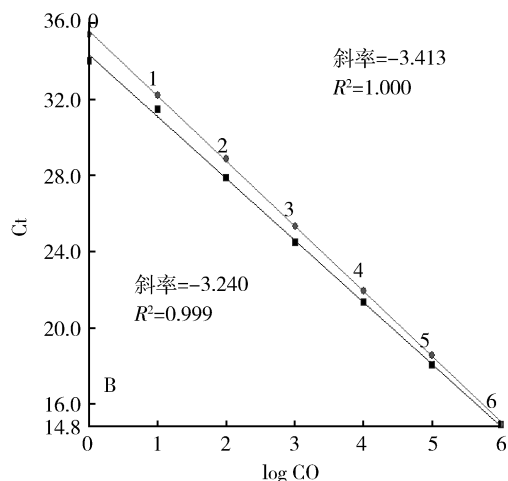
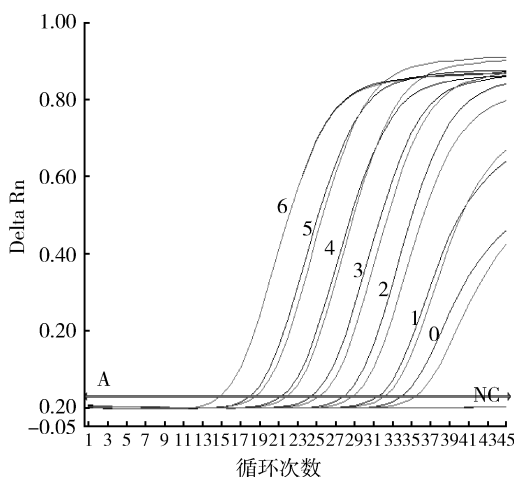


图2 白色念珠菌标准菌株菌液梯度稀释和 DNA 梯度稀释扩增曲线其标准曲线

A. PCR 扩增曲线; B. PCR 标准曲线; 图中 0~6 代表浓度为 $10^6 \sim 10^1$ CFU/ml 白色念珠菌纯菌液, NC 代表阴性对照; 黑线代表菌液梯度稀释结果, 红线代表 DNA 梯度稀释结果

6. 检测白色念珠菌标准菌株模拟感染血标本: 含菌量为 $10^6 \sim 10^1$ CFU/ml 模拟感染血标本的 PCR 扩增情况见图 3A。两次重复的结果显示对于血流感染

标本, 该方法的检测下限可达到 10^2 CFU/ml (Ct 值分别为 34.18 和 34.13)。其标准曲线的斜率 = -3.280, $R^2 = 0.996$ (图 3B)。

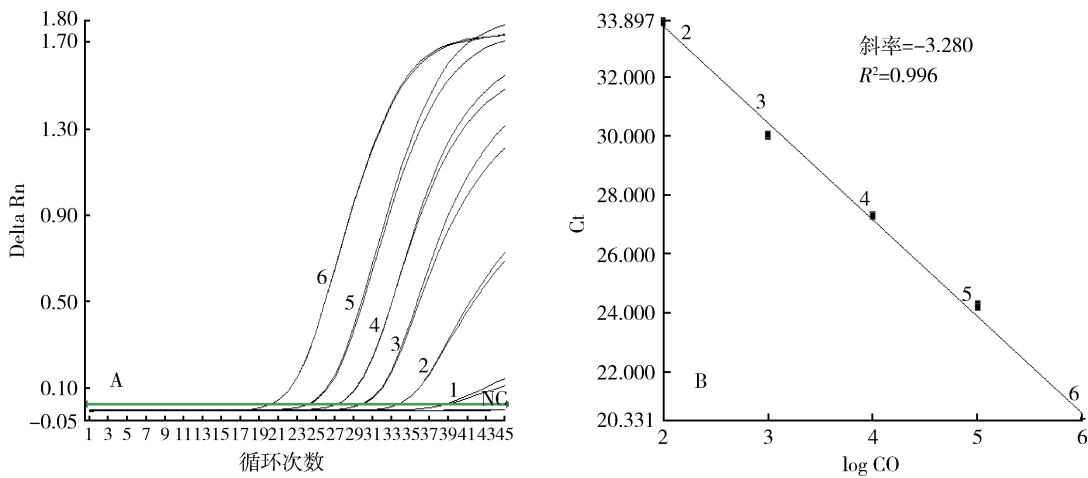


图 3 白色念珠菌标准菌株模拟感染血标本扩增曲线及其标准曲线

A. PCR 扩增曲线;B. PCR 标准曲线;图中 1~6 代表含菌量为 $10^1 \sim 10^6$ CFU/ml 的模拟感染血标本,NC 代表阴性对照

讨 论

本研究选择白色念珠菌的 ITS2 区作为扩增的靶位点。通过序列比对,筛选出特异性序列设计引物和 Taq Man-MGB 探针,从而成功建立了实时荧光定量 PCR 检测白色念珠菌的方法。该方法在白色念珠菌菌液梯度稀释标本中准确检测限为 10^1 CFU/ml,其批内和批间变异系数分别为 1.57% 和 2.20%。特异性评价显示,135 株白色念珠菌临床分离株检出率为 100%,且与研究所纳入的其他念珠菌、细菌以及人基因组 DNA 标本无交叉反应。念珠菌模拟感染血标本的检测结果显示,该方法的检测下限为 10^2 CFU/ml,适用于念珠菌血症的快速诊断。

ITS2 位于真核生物 5.8S 和 28S rDNA 之间,在种间表现出高度的特异性,可作为设计种特异性引物和探针的靶序列,因此分析此片段已经成为目前常用鉴定念珠菌的种或属的分子生物学方法^[16-20]。在本研究中,白色念珠菌 ATCC10231 菌株的 ITS2 序列就被选择作为比对标准序列。在 Pubmed 的 Nucleotide 数据库中的种间比对结果显示,白色念珠菌的 ITS2 序列与其他真菌,各种细菌以及人基因组 DNA 序列皆无显著重叠序列。实际检测结果也证实本方法白色念珠菌以外各种生物来源的 DNA 皆无显著性扩增曲线。但进一步比对显示,都柏林念珠菌(*Candida dubliniensis*)与白色念珠菌具有高度同源性,其同源百分比达到 76%。因此在设计下游引物的时候,保证其 3'端-2 和-5 位碱基与都柏林念珠菌序列不匹配,以增加引物的特异性。另外,探针序列 3'端的-2 和-4 位碱基也与都柏林念珠菌序列不匹配,根据 TaqMan-MGB 探针 3'端-1~-7 位碱基不匹配将

显著降低其 Tm 值的特点,检测的特异性进一步得到了优化。实际检测结果也证实,本方法不能扩增都柏林念珠菌 DNA,对白色念珠菌表现出高度特异性。而 Schell 等在 ITS2 序列上建立的白色念珠菌种检测方法却不能将这两种念珠菌区分开来。然后,笔者进行了白色念珠菌种内 ITS2 序列比对,选择种内变异的序列区间设计引物和探针。在比对 468 条参考序列后,笔者发现所设计上游引物与存在 1 株白色念珠菌不能完全匹配,下游引物存在 4 株匹配缺陷,而探针能与列出的所有菌株完全匹配。据此计算的检测理论灵敏度为 98.9%。而在实际中检测 135 株白色念珠菌临床分离株,结果显示检出率为 100%,没有出现未检出的情况。

对于白色念珠菌纯菌液来说,本方法的检测下限可达到 10^1 CFU/ml,优于 Foongladde 等^[11]所设计方法检测下限(146CFU/ml)。这可能与扩增位点的选择和 PCR 检测系统使用的不同有关,而这种多复制 ITS2 位点和高效的荧光定量 PCR 的组合也使得检测平台对于纯度不高的 DNA 样本有较好的响应(表 1)。另外,批内、批间的重复性试验显示,浓度为 10^1 CFU/ml 对应的检测变异率最大,分别为 1.57% 和 2.20%,但可满足临床要求($<5\%$),且不会影响在该浓度上定量的准确性。另外,在纯菌液试验中,笔者还探讨了热休克方法提取 DNA 的效率。将浓度为 10^6 CFU/ml 的菌液经过热休克法处理后提取到 DNA,10 倍连续稀释得到梯度稀释 DNA 溶液后再进行 PCR 扩增。扩增曲线图显示该结果与浓度为 $10^6 \sim 10^1$ CFU/ml 菌液分别经过热休克提取到 DNA 后扩增得出结果相似,说明本研究中所用的 DNA 提

取方法不影响扩增。

本方法还可以直接从全血中检测白色念珠菌,用于血流感染的诊断。对于模拟白色念珠菌感染血标本,该方法学的敏感度可达到 10^2 CFU/ml。Loonen 等^[15] 同样报道,称他们建立的检测方法在血液中白色念珠菌浓度为达到 10^2 CFU/ml 时才可达到 100% 检出率。而 Gosiewski 等^[10] 和 Goldschmidt 等^[14] 所建方法对于血标本中白色念珠菌的检测下限只达到 10^3 CFU/ml。而最为敏感的方法是由 Loonen 等^[15] 所报道,其所建方法可将检测下限降低至 10^0 CFU/ml,且所对应的 Ct 值均保持在 35 之内。究其原因,很大程度上得益于他们自主研发的去除血液中红、白细胞的方法。有文献称血红蛋白会造成 DNA 聚合酶的解离,从而影响 PCR 反应的进行。而白细胞的残留也会使得大量人基因组 DNA 释放到样本中,干扰引物和探针与低浓度模板的配对。尽管在本实验也有处理血标本的步骤,但是并没有完全裂解红、白细胞, DNA 提取方法使得检测敏感度受限。除了血细胞对 PCR 敏感度产生影响外,模板 DNA 的用量也与之有所关联。有报道称 Roche 公司 SeptiFast 试剂盒对于血流中白色念珠菌的检测下限为 30CFU/ml,主要是其 DNA 模板用量达到 50 μ l 的原因。

综上所述,本研究所建立的基于 ITS2 序列的白色念珠菌荧光定量 PCR 检测方法,具有敏感度和特异性高、重复性好等优点。由于荧光定量 PCR 时间短(1.5h 完成),在进一步优化从血液标本中提取 DNA 的基础上,该方法可直接完成血标本中白色念珠菌的检测,适用于临床上白色念珠菌引起的血流感染的快速鉴定。

参考文献

- 1 Yapar N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis [J]. Ther Clin Risk Manag, 2014, 10: 95 - 105
- 2 Arendrup MC. Candida and candidaemia. Susceptibility and epidemiology [J]. Dan Med J, 2013, 60(11): B4698
- 3 Pfaller MA, Diekema DJ, Jones RN, et al. International surveillance of bloodstream infections due to Candida species: frequency of occurrence and in vitro susceptibilities to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY antimicrobial surveillance program [J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(9): 3254 - 3259
- 4 Pfaller MA and Diekema DJ. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida* [J]. Clin Microbiol Infect, 2004, 10 (Suppl 1): 11 - 23
- 5 Quindos G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis: A changing face [J]. Rev Iberoam Micol, 2014, 31(1): 42 - 48
- 6 Wisplinghoff H, Ebbers J, Geurtz L, et al. Nosocomial bloodstream infections due to *Candida* spp. in the USA: species distribution, clinical features and antifungal susceptibilities [J]. Int J Antimicrob Agents, 2014, 43(1): 78 - 81
- 7 Orasch C, Marchetti O, Garbino J, et al. *Candida* species distribution and antifungal susceptibility testing according to European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing and new vs. old Clinical and Laboratory Standards Institute clinical breakpoints: a 6 - year prospective candidaemia survey from the fungal infection network of Switzerland [J]. Clin Microbiol Infect, 2014, 20(7): 698 - 705
- 8 Jekarl DW, Lee SY, Lee S, et al. Comparison of the Bactec Fx Plus, Mycosis IC/F, Mycosis/F Lytic blood culture media and the BacT/A-lert 3D FA media for detection of *Candida* species in seeded blood culture specimens containing therapeutic peak levels of fluconazole [J]. J Clin Lab Anal, 2012, 26(6): 412 - 419
- 9 Horvath LL, Hospenthal DR, Murray CK, et al. Detection of simulated candidemia by the BACTEC 9240 system with plus aerobic/F and anaerobic/F blood culture bottles [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(10): 4714 - 4717
- 10 Gosiewski T, Jurkiewicz - Badacz D, Sroka A, et al. A novel, nested, multiplex, real - time PCR for detection of bacteria and fungi in blood [J]. BMC Microbiol, 2014, 14: 144
- 11 Foongladda S, Mongkol N, Petlum P, et al. Multi - probe real - time PCR identification of four common *Candida* species in blood culture broth [J]. Mycopathologia, 2014, 177(5 - 6): 251 - 261
- 12 Xafranski H, Melo AS, Machado AM, et al. A quick and low - cost PCR - based assay for *Candida* spp. identification in positive blood culture bottles [J]. BMC Infect Dis, 2013, 13: 467
- 13 Alam MZ, Alam Q, Jiman - Fatani A, et al. *Candida* identification: a journey from conventional to molecular methods in medical mycology [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2014, 30(5): 1437 - 1451
- 14 Goldschmidt P, Degorge S, Merabet L, et al. Enzymatic treatment of specimens before DNA extraction directly influences molecular detection of infectious agents [J]. PLoS One, 2014, 9(6): e94886
- 15 Loonen AJ, Bos MP, van Meerbergen B, et al. Comparison of pathogen DNA isolation methods from large volumes of whole blood to improve molecular diagnosis of bloodstream infections [J]. PLoS One, 2013, 8(8): e72349
- 16 Lott TJ, Kuykendall RJ, Reiss E. Nucleotide sequence analysis of the 5.8S rDNA and adjacent ITS2 region of *Candida albicans* and related species [J]. Yeast, 1993, 9(11): 1199 - 1206
- 17 Fujita SI, Senda Y, Nakaguchi S, et al. Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains [J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(10): 3617 - 3622
- 18 Leaw SN, Chang HC, Sun HF, et al. Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions [J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(3): 693 - 699
- 19 Souza AC, Ferreira RC, Goncalves SS, et al. Accurate identification of *Candida parapsilosis* (sensu lato) by use of mitochondrial DNA and real - time PCR [J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(7): 2310 - 2314
- 20 Ieda S, Moriyama M, Takashita T, et al. Molecular analysis of fungal populations in patients with oral candidiasis using internal transcribed spacer region [J]. PLoS One, 2014, 9(6): e101156

(收稿日期:2015 - 08 - 05)

(修回日期:2015 - 09 - 14)