

· 论著 ·

核酸质谱技术检测常见念珠菌血症病原菌

李航逸¹ 郭超敏² 王成彬¹¹温州医科大学检验医学院(生命科学学院),温州 325000; ²解放军总医院第一医学中心检验科,北京 100853

通信作者:王成彬, Email: wangcbin301@163.com

【摘要】 目的 联合聚合酶链反应与基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)技术,构建检测 5 种临床常见念珠菌血症病原菌的高通量检测方法。方法 方法学建立。以白色念珠菌、近平滑念珠菌、光滑念珠菌、克柔念珠菌、热带念珠菌为目标菌株,以内转录间隔区为靶基因,设计特异的单碱基延伸引物,在同一反应体系内进行单碱基延伸反应,用 MALDI-TOF MS 检测各目的菌特征峰;使用模拟血流感染样本验证上述构建的检测体系敏感度、特异度;前瞻性收集 2021 年 10 月至 2022 年 9 月解放军总医院第一医学中心检验科 108 例疑似或确诊念珠菌血症患者血液样本并检测;将核酸质谱检测结果与金标准血培养方法进行比较。结果 用所建立的核酸质谱检测体系同时检测 5 种临床常见念珠菌,各菌种均可产生特异的产物峰且各菌种之间不存在相互干扰。白色念珠菌的最低检测限可达 100 CFU/ml,近平滑念珠菌、光滑念珠菌、克柔念珠菌、热带念珠菌的最低检测限可达 10 CFU/ml。对 108 份血液样本进行检测,核酸质谱的敏感度为 94.74%(36/38),特异度为 97.14%(68/70),阳性预测值为 92.31%(36/39),阴性预测值为 98.55%(68/69),配对四格表的 χ^2 检验显示 2 种方法无显著差异($P>0.05$),Kappa 一致性检验显示 2 种方法一致性良好($Kappa=0.9, P<0.05$)。结论 成功构建了适用临床念珠菌检测的核酸质谱检测体系,方法验证结果与临床血培养具有一致性。

【关键词】 光谱法, 质量, 基质辅助激光解吸电离; 念珠菌属; 分子诊断技术

基金项目:国家自然科学基金(81871731)

Detection of common candidemia pathogens based on PCR combined with MALDI-TOF MS

Li Hanyu¹, Guo Chaomin², Wang Chengbin¹¹School of Laboratory Medicine and Life Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China; ²Department of Laboratory Medicine, the 1st Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: Wang Chengbin, Email: wangcbin301@163.com

【Abstract】 **Objective** A high-throughput assay for the detection of five common clinical Candidaemia pathogens was established by combining polymerase chain reaction (PCR) and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). **Method** Establishment of methodology. We selected *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis* to be the target pathogens and the internal transcribed spacer (ITS) region as the target gene. Specific single base extension primers were designed to perform single base extension reaction in the same reaction system. MALDI-TOF MS was used to detect the characteristic peaks of each target pathogen. The sensitivity and specificity of the detection system were verified by using spiked blood samples. Totally 108 blood samples from proven or suspected candidaemia patients were collected from October 2021 to September 2022 in a hospital in Beijing. The results of nucleic acid mass spectrometry were compared with those of

DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20221028-00630

收稿日期 2022-10-28 本文编辑 武昱

引用本文:李航逸,郭超敏,王成彬.核酸质谱技术检测常见念珠菌血症病原菌[J].中华检验医学杂志,2023,46(4):402-409. DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20221028-00630.



clinical blood culture. **Results** The established nucleic acid mass spectrometry detection system can simultaneously detect five common clinical *Candida* species. Each strain can produce specific product peaks and there is no mutual interference between the strains. The detection limit of *Candida albicans* was 100 CFU/ml. The detection limit of *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* and *Candida tropicalis* was 10 CFU/ml. For the 108 blood samples, the sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of nucleic acid mass spectrometry were 94.74% (36/38), 97.14% (68/70), 92.31% (36/39) and 98.55% (68/69), respectively. The McNemar χ^2 test showed no significant difference between the two methods ($P>0.05$), and the Kappa consistency test showed good consistency between the two methods ($Kappa=0.9$, $P<0.05$). **Conclusion** A nucleic acid mass spectrometry detection system suitable for clinical candida detection was successfully constructed, and the method validation results were consistent with the clinical blood culture.

【Key words】 Spectrometry, mass, matrix-assisted laser desorption-ionization; *Candida*; Molecular diagnostic techniques

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81871731)

念珠菌血症是全球最常见的机会性真菌感染之一,占目前医院血流感染总数的10%,具有较高的发病率和死亡率^[1-2]。念珠菌血症已经给医疗保健系统带来了巨大的经济负担^[3-4]。随着重症住院患者、恶性肿瘤患者等免疫抑制患者的人数不断增加,此类患者更容易并发念珠菌血流感染,其血培养报阳后30 d内死亡率最高可达58.3%^[1]。

目前临床念珠菌血症病原学检测的常用方法是血培养后采用核糖体蛋白基质辅助激光解吸飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass, MALDI-TOF MS)技术进行鉴定,尽管被称为金标准方法,但由于其具有检出率低、需要样本量大、检测时间长等不足^[5],可能导致临床的经验性用药或不合理用药,从而影响疾病的及时诊治,导致死亡率的增加^[6]。荧光定量聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)、液滴数字PCR等分子技术应用于念珠菌只能进行单个菌核酸检测,效率不高^[7-9]。

核酸质谱是一种新型的高通量分子诊断技术,具有检测灵敏度高、相对样品用量少、可同时开展多种病原菌核酸检测、检测效率高等优点^[10]。本研究选取真菌鉴定常用的内转录间隔区为靶基因^[11],建立了一种灵敏快速的念珠菌核酸质谱检测方法,可检出菌种包括白色念珠菌、近平滑念珠菌、光滑念珠菌、克柔念珠菌、热带念珠菌。

材料与amp;方法

一、材料

1. 菌株来源:标准菌株白色念珠菌 CMCC(F) 98001、光滑念珠菌 ATCC15126、热带念珠菌

ATCC13803、黑曲霉 CMCC(F)98003 购自北京索莱宝生物科技有限责任公司;标准菌株近平滑念珠菌 ATCC22019、克柔念珠菌 ATCC6258、大肠埃希菌 ATCC25922、金黄色葡萄球菌 ATCC25923、粪肠球菌 ATCC29212、肺炎克雷伯菌临床分离菌株、鲍曼不动杆菌临床分离菌株来自解放军总医院第一医学中心检验科。以上菌株均经过 VITEK-MS 全自动微生物质谱检测系统(法国生物梅里埃公司)鉴定。

2. 临床样本:前瞻性收集解放军总医院第一医学中心 2021 年 10 月至 2022 年 9 月的 108 例疑似或确诊念珠菌血症患者送检的乙二胺四乙酸抗凝全血,同期送检血培养瓶利用全自动血培养仪进行血培养。同时收集本院体检的健康人全血制备模拟感染血流样本进行备用。本研究通过了解放军总医院伦理委员会的批准(伦理号 S2018-207-02),免除患者知情同意。所有临床样本检测前均放置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱保存。

3. 试剂与仪器:沙氏葡萄糖琼脂培养基平板购自广东环凯微生物有限公司;PCR 试剂盒(KP213)、酵母菌基因组 DNA 提取试剂盒(DP307)购自中国天根生化科技有限公司;细菌基因组提取试剂盒(D1600)购自北京索莱宝科技有限公司;核酸基因分型试剂盒购自融智生物科技(青岛)有限公司;血液病原菌 DNA 提取试剂盒 Molysis™ Complete5 购自北京百奥创新科技有限公司;L 型病原菌裂解管购自凯杰企业管理(上海)有限公司;QuanNUA 核酸分型质谱系统由融智生物科技(青岛)有限公司提供;Verti Dx PCR 扩增仪购自美国 Applied Biosystems 公司;全自动血培养仪购自法国梅里埃生物公司。

二、方法

1. 核酸质谱探针设计:本研究纳入 5 种临床常见的念珠菌。针对每种念珠菌从美国国家生物技术信息中心的 Nucleotide 数据库中下载经过注释的参考基因组以及同菌种不同菌株的 ITS 区片段,片段要求包含完整且连续的 ITS1 区、5.8S 区和 ITS2 区。将所得的 ITS 区片段同时导入到 DNAMAN 软件中进行多序列比对,保留该菌种位于 ITS1 区或 ITS2 区的保守片段用于质谱探针的设计。然后将对比所得的保守片段导入基因位点分析设计系统(融智生物科技(青岛)有限公司)设计质谱探针。要求每条质谱探针和探针延伸产物的相对分子质量差异不小于 30。

2. 样本制备与 DNA 提取:将各念珠菌标准菌株分区划线接种至沙氏葡萄糖琼脂培养基平板,放置在 30 °C 生化培养箱中培养 48 h 后挑取单个菌落接种至沙氏液体培养基中,置于 30 °C 恒温摇床约 1 ×g 增菌 24 h。将增菌后的培养基约 2 795 ×g 离心 10 min,弃上清,再用无菌磷酸缓冲盐溶液重悬,重复 3 次。将所得的菌液适量稀释滴加至血细胞计数板中计数,确定菌液浓度,每个样本需重复计数 3 次。然后将菌液梯度稀释至 10⁶、10⁵、10⁴、10³、10² 和 10 CFU/ml;再将稀释后的菌液与健康人新鲜血液按比例混合,配制成浓度梯度分别为 10⁵、10⁴、10³、10²、10 和 1 CFU/ml 的血液模拟样本。按照核酸提取试剂盒 Molysis Complete5 的说明书提取模拟样本与临床疑似念珠菌血症样本 DNA。将提取的 DNA-20 °C 冻存。

3. 念珠菌靶基因 PCR:查阅文献后选择真菌通用引物 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')进行质谱前 PCR 扩增。由于质谱检测通过检测核酸相对分子质量来区分单碱基延伸引物及其产物,需在 2 条 PCR 引物的 5' 端各添加 10 个碱基对的保护碱基 ACGTTGGATG,以确保引物足够长,不会在后续质谱检测中干扰单碱基延伸引物及其产物(表 1)的检测。结合相关文献及天根 PCR 试剂盒说明书,经

过优化后确定 PCR 反应体系总体积为 20 μl,其中 2× PCR 预混液 10 μl、各引物终浓度 0.3 μmol/L、模板体积 4 μl;PCR 反应程序设定为 94 °C 预变性 3 min、94 °C 变性 30 s、54 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 1 min,共进行 40 个循环后 72 °C 再次延伸 5 min。PCR 扩增产物可直接进行后续质谱前处理实验。

4. 核酸质谱检测:首先进行 PCR 产物的虾碱性磷酸酶(shrimp alkaline phosphatase, SAP)消化,吸取 5 μl 的 PCR 产物至新的 0.2 ml 的 PCR 管中,加入 0.3 μl 的 SAP 酶、0.17 μl 的 SAP 缓冲液、1.53 μl 去离子水,轻轻涡旋混匀,约 112 ×g 离心 1 min,将 PCR 管转移至 PCR 仪中,启动 SAP 消化程序,37 °C 40 min、85 °C 5 min、4 °C 保持。随后进行单碱基延伸反应。将单碱基延伸引物配制成一定浓度的单碱基延伸引物预混液,在每个 PCR 管中加入 0.6 μl 的单碱基延伸酶、1.4 μl 的单碱基延伸缓冲液、1 μl 的单碱基延伸引物预混液和 1 μl 双脱氧核苷三磷酸,启动最后一步 PCR 程序:95 °C 预变性 30 s、95 °C 变性 5 s、52 °C 退火 5 s、80 °C 延伸 5 s、内部循环 5 次、外部循环 40 次,最后 72 °C 变性 3 min。反应完成后在每个 PCR 管中加入 14 μl 超纯水、一次性树脂,瞬时离心后放置在 DNA 混匀仪上、约 0.05 ×g 混匀 30 min,混匀结束后样品约 447 ×g 离心 1 min,吸取 2 μl 上清液与 2 μl 基质液混匀,再吸取 0.6 μl 样品点样在靶板上,进行上机检测,根据质谱峰图鉴别念珠菌。

5. 空白对照与阴性对照:将无菌水和健康人基因组 DNA 分别作为空白和阴性对照;观察中各单碱基延伸引物之间是否产生产物峰。

6. 特异度实验:将 5 种念珠菌的基因组 DNA 等浓度等体积混匀后作为阳性对照,观察各单碱基延伸引物的产物峰生成情况;分别检测 5 种目标菌的基因组 DNA,观察各单碱基延伸引物系统内特异度;分别检测材料中其他细菌与真菌的基因组 DNA,观察各单碱基延伸引物系统外特异度。

7. 灵敏度实验:检测各目标菌种的梯度模拟样本 DNA,各浓度设置 3 个平行实验,以无菌水和健

表 1 念珠菌单碱基延伸引物及延伸碱基

菌株	引物位置	引物序列	引物名称	引物相对分子质量	延伸碱基	延伸产物相对分子质量
白色念珠菌 CMCC(F)98001	ITS1 区	CCAATTTTTATCAACTTGTC	Caal	6 321.2	A	6 618.2
近平滑念珠菌 ATCC22019	ITS2 区	AGTATAAACTAATGGATAG	Capa	5 883.8	G	6 196.8
光滑念珠菌 ATCC15126	ITS1 区	ACAGTGGAGTTTACTTTACTA	Cagl	6 435.2	C	6 708.2
克柔念珠菌 ATCC6258	ITS2 区	GACTCGCCTGAAAGGGA	Cake	5 244.4	G	5 557.4
热带念珠菌 ATCC13803	ITS1 区	GCCACCAAAGAAATTTGT	Catr	5 491.6	A	5 833.6

康人基因组 DNA 为空白和阴性对照。核酸质谱各步骤反应条件与前面相同,以确定各菌种在血液样本中的实际检出限。

8. 临床样本验证:收集 2021 年 10 月至 2022 年 9 月的 108 例疑似或确诊念珠菌血症患者送检的乙二胺四乙酸抗凝全血,提取 DNA 后进行检测。将检测结果与临床传统血培养结果进行比较。

9. 统计学分析:使用 SPSS 25.0 软件,应用配对四格表的 χ^2 检验,比较核酸质谱法与临床血培养方法对同一批样本的阳性检出率与多重检出率之间的差异,以双侧 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义;应用

Kappa 一致性检验,比较 2 种方法的一致性,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。质谱原始数据导出成文本格式后导入 R 4.2.2 平台,使用 MALDIquant 包与 ggplot2 包绘制质谱峰图。

结 果

一、各单碱基延伸引物空白对照与阴性对照峰图

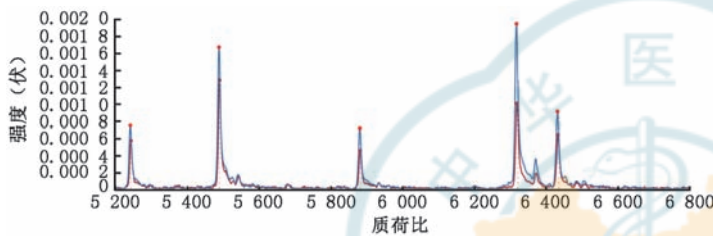
空白对照与阴性对照结果显示(图 1),各延伸引物未发生延伸反应,不产生延伸后产物峰,只产生延伸引物峰。表明本方法设计的扩增引物和延伸引物在空白背景及宿主背景下不会相互假阳性干扰,可用于后续验证实验。

二、各单碱基延伸引物阳性对照峰图

阳性对照结果显示(图 2),当 5 种念珠菌基因组 DNA 均存在时,5 条单碱基延伸引物均能正常延伸,延伸产物峰信号足够强。当单独检测目标菌株 DNA 时,所对应单碱基延伸引物正常产生的延伸引物峰。

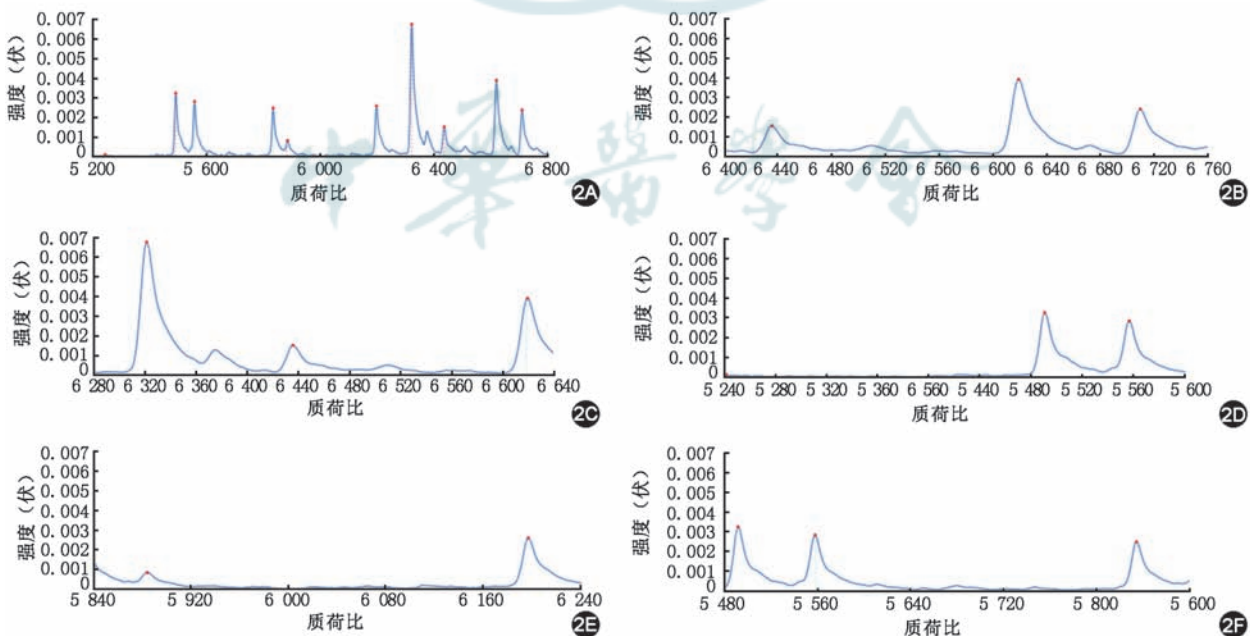
三、各单碱基延伸引物特异度实验峰图

5 种念珠菌的质谱检测结果表明,各单碱基延伸引物只会对相应菌种的 PCR 产物发生延伸反应,不同菌种引物与模板之间不存在



注:蓝色实线:空白对照;红色实线:阴性对照;Caal:白色念珠菌引物峰($m/z=6321.2$);Caal_A:白色念珠菌产物峰($m/z=6618.2$);Capa:近平滑念珠菌引物峰($m/z=5883.8$);Capa_G:近平滑念珠菌产物峰($m/z=6196.8$);Cagl:光滑念珠菌引物峰($m/z=6435.2$);Cagl_C:光滑念珠菌产物峰($m/z=6708.2$);Cake:克柔念珠菌引物峰($m/z=5244.4$);Cake_G:克柔念珠菌产物峰($m/z=5557.4$);Catr:热带念珠菌引物峰($m/z=5491.6$);Catr_A:热带念珠菌产物峰($m/z=5833.6$)

图 1 各目标菌株空白对照与阴性对照



注:2A 为阳性对照总峰图;2B 为光滑念珠菌引物($m/z=6435.2$)及产物($m/z=6708.2$)峰图;2C 为白色念珠菌引物($m/z=6321.2$)及产物($m/z=6618.2$)峰图;2D 为克柔念珠菌引物($m/z=5244.4$)及产物($m/z=5557.4$)峰图;2E 为近平滑念珠菌引物($m/z=5883.8$)及产物($m/z=6196.8$)峰图;2F 为热带念珠菌引物($m/z=5491.6$)及产物($m/z=5833.6$)峰图

图 2 各目标菌株阳性对照

交叉反应(图3)。其他细菌和真菌的质谱检测结果表明,大肠埃希菌、鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌、粪肠球菌、金黄色葡萄球菌、黑曲霉菌不会对本方法产生干扰(图4)。

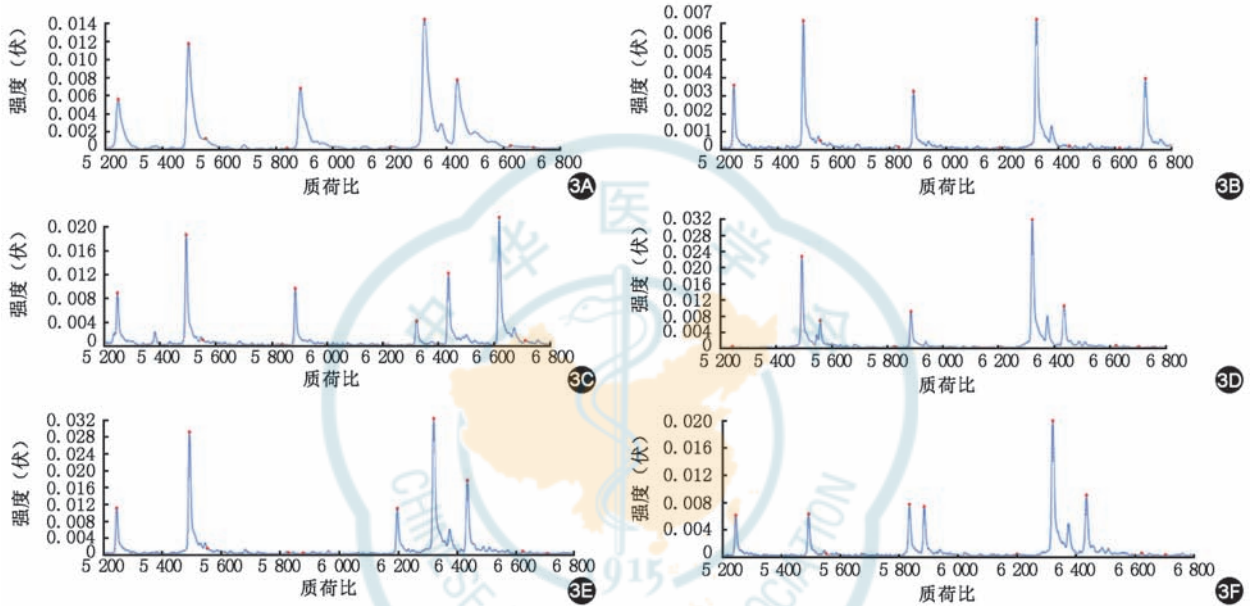
四、模拟样本的灵敏度检测

使用本方法检测各念珠菌的浓度梯度分别为 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、10和1 CFU/ml的血液模拟样本,

检测结果依照判读软件判读。结果显示白色念珠菌的最低检测限可达100 CFU/ml、近平滑念珠菌、光滑念珠菌、热带念珠菌、克柔念珠菌的最低检测限可达10 CFU/ml(图5)。

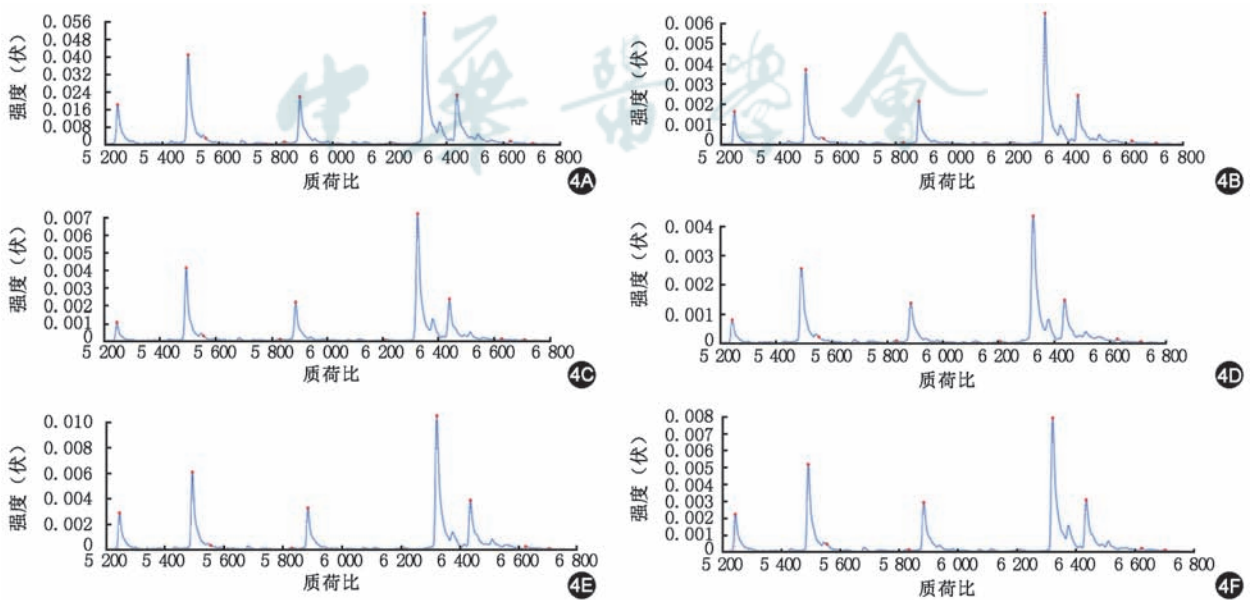
五、血培养方法与核酸质谱的结果比较

本研究共纳入108例念珠菌血症确诊或疑似患者。其中有38例患者血培养报阳后的分离菌落



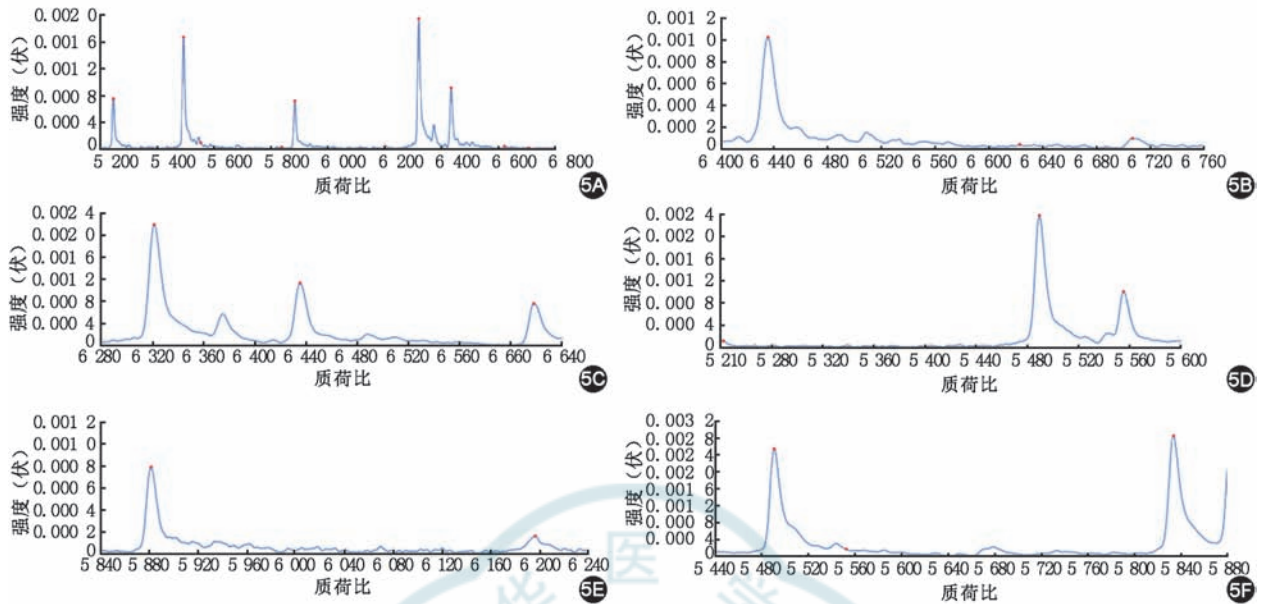
注:3A为单碱基延伸引物峰图;3B为光滑念珠菌的峰图(产物峰 $m/z=6708.2$);3C为白色念珠菌的峰图(产物峰 $m/z=6618.2$);3D为克柔念珠菌的峰图(产物峰 $m/z=5557.4$);3E为近平滑念珠菌的峰图(产物峰 $m/z=6196.8$);3F为热带念珠菌的峰图(产物峰 $m/z=5833.6$);各菌株峰图间均无非特异干扰

图3 核酸质谱法系统内特异度实验



注:图4A为大肠杆菌的峰图;图4B为粪肠球菌的峰图;图4C为鲍曼不动杆菌的峰图;图4D为金色葡萄球菌的峰图;图4E为肺炎克雷伯菌的峰图;图4F为黑曲霉菌的峰图;各菌株无非特异峰产生

图4 核酸质谱法系统外特异度实验



注:图 5A 为阴性对照;图 5B 为光滑念珠菌在 10 CFU/ml 的峰图(产物峰 $m/z=6708.2$);图 5C 为白色念珠菌在 100 CFU/ml 的峰图(产物峰 $m/z=6618.2$);图 5D 为克柔念珠菌在 10 CFU/ml 的峰图(产物峰 $m/z=5557.4$);图 5E 为近平滑念珠菌在 10 CFU/ml 的峰图(产物峰 $m/z=6196.8$);图 5F 为热带念珠菌在 10 CFU/ml 的峰图(产物峰 $m/z=5833.6$)

图 5 各目标菌株在最低检测限时的峰图

经临床多肽质谱鉴定为念珠菌,其中白色念珠菌 14 例、近平滑念珠菌 12 例、光滑念珠菌 4 例、热带念珠菌 5 例,阳性确诊患者占比为 35.19%(38/108)。本次未检出克柔念珠菌,且有 2 例患者在前后两次血培养中检出 2 种不同的念珠菌。本研究建立的检测体系共检出阳性样本 39 份,阳性占比为 36.11%(39/108)。在血培养阳性的 38 例患者中,核酸质谱检出 36 例阳性,其中 2 例混合感染病例均同时检出,混合感染病例均为光滑念珠菌和热带念珠菌双重感染。在 70 例血培养阴性的疑似确诊患者中,核酸质谱法共检出 3 例阳性。2 种方法的阳性结果菌种分布见图 6。经计算得出,核酸质谱的灵敏度为 94.74%(36/38),特异度为 97.14%(68/70),阳性预测值为 92.31%(36/39),阴性预测值为 98.55%(68/69)。使用 SPSS 25.0 进行配对 χ^2 检验,得出 2 种检测方法结果差异无统计学意义($P>0.05$),Kappa 一致性检验显示 2 种方法一致性良好($Kappa=0.9, P<0.05$),见表 2。

讨 论

核酸质谱技术是一种新兴的分子诊断技术,目前已有商用的核酸质谱检测系统获得美国 FDA 批准用于临床的基因检测与分型。核酸质谱联合了 PCR 技术、单碱基延伸技术与 MALDI-TOF MS 技

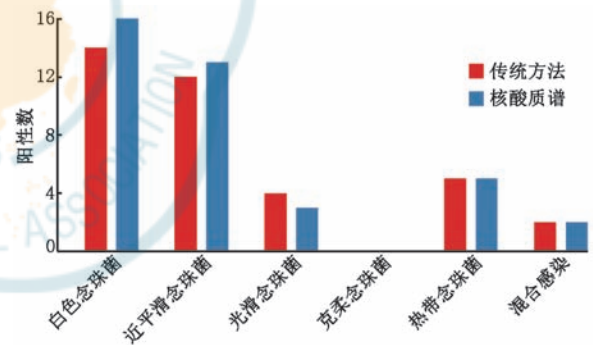


图 6 血培养方法与核酸质谱检测临床样本结果比较

表 2 血培养方法与核酸质谱检测临床样本结果比较(例)

核酸质谱法	血培养法		合计
	阳性	阴性	
阳性	36	3	39
阴性	2	68	69
合计	38	70	108

术,能同时拥有 PCR 的高灵敏度、单碱基延伸的高准确度、高特异度和 MALDI-TOF MS 的高分辨率、高通量的优点。在临床应用中,核酸质谱能够同时检测数十个不同的基因位点,检测位点包括但不限于基因单核苷酸多态性位点、甲基化位点、微生物基因组的特异基因位点等。

核酸质谱理论上能够对所有的已知微生物进行鉴定。目前已有研究将核酸质谱用于冠状病毒、

结核分枝杆菌及其他细菌的鉴定和分型^[12-13]。质谱法采用的单碱基引物与定量 PCR 中的探针类似,特异性均由自身碱基组成决定;两者的区别在于反应过程中的信号显示,PCR 探针通过荧光的累积来放大 PCR 信号,而单碱基延伸引物通过质谱的峰图来显示信号。鉴定方法的特异性由 PCR 引物和单碱基延伸引物共同决定;PCR 引物确保了微生物靶片段的扩增,单碱基延伸引物与靶片段发生延伸反应,通过质谱读取信号峰完成信号方法。在定量 PCR 中已有研究采用通用 PCR 引物和特异荧光探针完成微生物的菌种鉴定^[14],而使用通用引物和特异单碱基延伸引物的核酸质谱法目前仍未见报道。

本研究成功建立了临床念珠菌血症常见病原菌的核酸质谱检测方法,能够在 7 h 之内快速检测临床血液样本中是否存在临床常见的 5 种念珠菌,并对其进行初步的分类鉴别。本方法首先采用经过广泛验证的真菌通用 PCR 引物对 (ITS1 和 ITS4) 对念珠菌基因组上多拷贝的 ITS 区进行指数级的扩增,然后设计物种特异的单碱基延伸引物用于延伸目的基因上的特异位点,最后采用高分辨率的 MALDI-TOF MS 检测单碱基延伸引物及其延伸产物的相对分子质量及信号强度,通过判断延伸产物是否产生,从而实现对念珠菌的检测及分类。从患者采样到样本核酸提取,再从 PCR 到核酸质谱检测,本方法能够在患者采血当日完成病原菌检测。

本研究团队此前已成功建立针对血流感染常见细菌的核酸质谱检测体系。相比细菌感染,真菌血流感染样本的病原菌载量更低。并且由于真菌细胞壁存在,提取真菌 DNA 时需要采用更复杂的方法^[15]。有文献报道,Moysis Complete5 试剂盒可有效用于念珠菌血症样本的核酸提取^[16]。本研究团队在比对 Moysis Complete5 试剂盒、凯杰 QIAamp BiOstic Bacteremia DNA 提取试剂盒和 Polaris 法后发现,针对全血样本,Moysis Complete5 试剂盒提取的 DNA 经过 PCR 验证后灵敏度更好,电泳后的条带也更清晰,因此最终选择了 Moysis Complete5 试剂盒用于临床全血样本核酸提取。在低病原菌载量样本中,过少的真菌基因组 DNA 拷贝数和相对过高的宿主背景 DNA 会抑制病原菌靶基因的 PCR 扩增。因此,本研究选择了在基因组中具有多个拷贝数的 ITS 区作为 PCR 靶基因,扩增此基因的通用引物对历史悠久,已经过了大量的文献验证。

ITS 区鉴定是目前真菌鉴定的一种常用方法。ITS 区片段由 18S、ITS1 区、5.8S、ITS2 区、28S 组成,

各亚单元之间首尾串联形成重复序列,在单个真菌基因组中可重复 60~200 次^[17]。靶基因多拷贝的优势可明显提高 PCR 在临床样本中灵敏度。各真菌之间的 18S、5.8S、28S 具有极大的保守性,在这些保守片段上设计引物,只需设计 1 对引物即可扩增绝大部分真菌的 ITS 片段。其片段中的 ITS1 区和 ITS2 区是中度保守片段,在序列上表现出种内相对一致,种间差异明显的特点,因此通过测序、熔解曲线分析或限制性内切酶片段长度多态性分析等技术即可完成真菌的 ITS 区鉴定^[18-20]。本研究设计的核酸质谱单碱基延伸引物能够区分扩增片段之间单个碱基的差异,只需筛选出目标物种 ITS1 及 ITS2 片段上的种内保守片段,针对保守片段进行设计,即可对白色念珠菌、近平滑念珠菌、光滑念珠菌、热带念珠菌、克柔念珠菌及其对应复合体进行区分。所包括的 5 种念珠菌已覆盖临床绝大部分的念珠菌血症病例,具有一定的临床应用价值。

通过比较临床传统鉴别方法与核酸质谱法结果发现,有 3 例患者血液核酸质谱检测念珠菌阳性而血培养阴性。回顾患者病例发现,这 3 例患者均已经过抗真菌药物治疗。可能是因为用药后患者血中病原菌的载量下降和活力减低,从而出现传统检测方法的漏诊。在 2 例接连 2 次检出不同念珠菌的患者中,核酸质谱法能同时检出 2 种念珠菌的存在,可能是由于临床检测中漏检了其中 1 种念珠菌,也可能是由于不同菌株先后感染,而普通方法存在检测窗口期。2 例传统方法阳性而核酸质谱法阴性病例,回顾病例后发现 2 例患者均为光滑念珠菌感染,光滑念珠菌的 PCR 产物与其他念珠菌相比要多大约 200 个碱基对,可能是产物的长度对 PCR 的扩增效率有一定的影响;同时这 2 例的血培养报阳时间极长,从样本接收到血培养报阳的时长均已超过 7 d,说明可能是采集的患者样本本身的念珠菌浓度太低,未达到核酸质谱的检测限,后续检测此类样本时可在提取 DNA 前增加病原菌富集、宿主背景核酸去除等步骤以提高检测阳性率。在所有病例中,2 种方法均未检出克柔念珠菌。可能是克柔念珠菌在血流中的检出率低于其他 4 种念珠菌;可能本研究在样本收集期间并未诊断出有患者血流感染克柔念珠菌,后续考虑开展多中心研究以进一步扩大样本量^[21]。

目前,本方法能区分临床常见的几种念珠菌,可初步对临床疑似念珠菌血症的患者进行检测。所建立的方法灵敏、快速、高通量,能够在一张芯片

上同时进行数十个甚至上百个样本的检测。本研究团队后续考虑再纳入其他临床不常见的念珠菌、霉菌、隐球菌等真菌,并与已有的细菌检测体系相结合,构建出一个具有更宽检测谱的临床病原菌核酸质谱检测体系,后续再将此体系应用于临床其他样本。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 李航逸:标本收集、实验实施、论文起草;郭超敏:标本收集;王成彬:设计实验、论文修改

参 考 文 献

- [1] Lortholary O, Renaudat C, Sitbon K, et al. The risk and clinical outcome of candidemia depending on underlying malignancy[J]. *Intensive Care Med*, 2017, 43(5):652-662. DOI: 10.1007/s00134-017-4743-y.
- [2] Tsay SV, Mu Y, Williams S, et al. Burden of candidemia in the United States, 2017[J]. *Clin Infect Dis*, 2020, 71(9):e449-e453. DOI: 10.1093/cid/ciaa193.
- [3] Benedict K, Jackson BR, Chiller T, et al. Estimation of direct healthcare costs of fungal diseases in the United States[J]. *Clin Infect Dis*, 2019, 68(11):1791-1797. DOI: 10.1093/cid/ciy776.
- [4] Rayens E, Norris KA, Cordero JF. Mortality trends in risk conditions and invasive mycotic disease in the United States, 1999-2018[J]. *Clin Infect Dis*, 2022, 74(2):309-318. DOI: 10.1093/cid/ciab336.
- [5] Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, et al. Invasive candidiasis[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2018, 4:18026. DOI: 10.1038/nrdp.2018.26.
- [6] Gold J, Seagle EE, Nadle J, et al. Treatment practices for adults with candidemia at 9 active surveillance sites-United States, 2017-2018[J]. *Clin Infect Dis*, 2021, 73(9):1609-1616. DOI: 10.1093/cid/ciab512.
- [7] Chen B, Xie Y, Zhang N, et al. Evaluation of droplet digital PCR assay for the diagnosis of candidemia in blood samples[J]. *Front Microbiol*, 2021, 12:700008. DOI: 10.3389/fmicb.2021.700008.
- [8] Busser FD, Coelho VC, Fonseca CA, et al. A real time PCR strategy for the detection and quantification of *Candida albicans* in human blood[J]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 2020, 62:e9. DOI: 10.1590/S1678-9946202062009.
- [9] Vollmer T, Störmer M, Kleesiek K, et al. Evaluation of novel broad-range real-time PCR assay for rapid detection of human pathogenic fungi in various clinical specimens[J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(6):1919-1926. DOI: 10.1128/JCM.02178-07.
- [10] 常悦, 王瑜, 马艳宁, 等. 基于中部同序引物的多重 PCR 联合核酸质谱分析技术检测常见血流感染病原菌[J]. *中华检验医学杂志*, 2021, 44(5):413-420. DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20201029-00805.
- [11] 梁铮. ITS 测序分析方法在鉴定临床酵母样真菌中的应用[D]. 广州:广州中医药大学, 2015.
- [12] 王俊, 张栋, 陈晴晴, 等. PCR-核酸飞行时间质谱系统检测新型冠状病毒方法的建立及应用研究[J]. *中国全科医学*, 2020, 23(35):4430-4435, 4442. DOI: 10.12114/j.issn.1007-9572.2020.00.588.
- [13] 余艳芳, 赵开顺, 屠春林, 等. 核酸质谱检测结核分枝杆菌耐药方法的建立[J]. *临床肺科杂志*, 2021, 26(1):74-81. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6663.2021.01.017.
- [14] 李夫宏, 娄路平, 姜婷婷, 等. 鸡大肠杆菌、沙门氏菌、空肠弯曲杆菌和奇异变形杆菌 SYBR Green I 多重定量 PCR 方法建立[J]. *现代畜牧兽医*, 2022, (11):1-6.
- [15] Aboutalebian S, Ahmadikia K, Fakhim H, et al. Direct detection and identification of the most common bacteria and fungi causing otitis externa by a stepwise multiplex PCR[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11:644060. DOI: 10.3389/fcimb.2021.644060.
- [16] 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. DOI: 10.1371/journal.pone.0072349.
- [17] 陈剑山, 郑服丛. ITS 序列分析在真菌分类鉴定中的应用[J]. *安徽农业科学*, 2007, 35(13):3785-3786, 3792. DOI: 10.3969/j.issn.0517-6611.2007.13.011.
- [18] Leena Sankari S, Mahalakshmi K, Naveen Kumar V. Chromogenic medium versus PCR-RFLP in the speciation of *Candida*: a comparative study[J]. *BMC Res Notes*, 2019, 12(1):681. DOI: 10.1186/s13104-019-4710-5.
- [19] Asadzadeh M, Ahmad S, Al-Sweih N, et al. Rapid and accurate identification of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by real-time PCR and melting curve analysis [J]. *Med Princ Pract*, 2018, 27(6):543-548. DOI: 10.1159/000493426.
- [20] Usyk M, Zolnik CP, Patel H, et al. Novel ITS1 fungal primers for characterization of the mycobiome[J]. *mSphere*, 2017, 2(6):e00488-17. DOI: 10.1128/mSphere.00488-17.
- [21] 刘德华, 张红娟, 杜艳, 等. 14519 例血流感染病原菌构成及耐药分析[J]. *中国抗生素杂志*, 2016, 41(2):137-143. DOI: 10.3969/j.issn.1001-8689.2016.02.011.