

26S rDNA 单链构象多态性分析在临床酵母菌菌种鉴定中的应用

李娟^{1,2}, 白逢彦^{2*}

(¹中国疾病预防控制中心传染病预防控制所, 传染病预防控制国家重点实验室, 北京 102206)

(²中国科学院微生物研究所, 真菌地衣系统学重点实验室, 北京 100101)

摘要 【目的】探讨酵母菌临床分离株 26S rDNA D1/D2 区序列种内相似性和种间差异性的快速检测方法, 为临床酵母菌菌种鉴定方法的改进奠定基础。调查北京地区临床酵母菌的种群多样性, 为国内酵母菌感染的流行病学研究提供新的基础数据。【方法】用 5 种常见临床酵母菌的模式和权威菌株作为标准参考菌株, 从北京四家综合性医院收集临床酵母菌 260 余株, PCR 扩增其 26S rDNA D1/D2 区, 对扩增产物进行单链构象多态性 (Single-Strand Conformation Polymorphism, SSCP) 分析和序列测定分析。【结果】常见病原酵母菌 26S rDNA D1/D2 区的 SSCP 图谱具有明显的种间差异性和种内相似性, 可以通过该方法对菌株进行初步的菌种鉴定。D1/D2-SSCP 和序列分析相结合, 对 260 余株临床酵母菌进行了菌种鉴定, 共鉴定有 10 个属 20 个种, 优势属为念珠菌属 (*Candida*), 优势种及其所占比例分别是: *C. albicans* (57.7%), *C. parapsilosis* (10.0%), *C. tropicalis* (9.2%), *C. glabrata* (6.7%) 和 *C. krusei* (5.8%), 并发现过去从未或很少报道致病的酵母菌种, 愈来愈多地出现在临床分离菌株中。【结论】26S rDNA D1/D2 区的 SSCP 图谱分析为临床酵母菌株的快速鉴定提供了新的方法, 北京地区酵母菌临床分离株呈种群多样性分布, *C. albicans* 虽然仍占优势, 但其它念珠菌种的比例已达 42%。

关键词: 病原酵母菌; 菌种鉴定; 单链构象多态性; 26S rDNA D1/D2

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2009) 08-1011-07

近年来, 随着激素、广谱抗生素的广泛使用甚至滥用, 肿瘤患者放化疗, 器官、骨髓移植后大量免疫抑制剂造成的免疫功能低下; 以及免疫缺陷 AIDS 患者的增多, 酵母菌感染尤其是深部酵母菌感染的发病率呈明显上升趋势。美国疾病预防控制中心发现, 酵母菌感染占医院真菌感染的 80%, 1% ~ 8% 住院病人发生侵入性酵母菌感染, 已成为血中分离出的第四位病原菌^[1]。同时, 酵母菌的菌相分布也发生了明显变化。白色念珠菌 (*Candida albicans*) 虽

然仍是主要病原菌, 但其它种, 如光滑念珠菌 (*Candida glabrata*)、热带念珠菌 (*Candida tropicalis*) 等 10 多个种愈来愈常见^[2]。同时一些新的致病酵母菌种类也时有报道^[3]。致病酵母菌对抗真菌药物的敏感性因菌种的不同而有很大的差异, 如白色念珠菌一般对唑类药物敏感, 而光滑念珠菌、克柔念珠菌 (*Candida krusei*)、葡萄牙念珠菌 (*Candida lusitanae*) 和皱褶念珠菌 (*Candida rugosa*) 对一种或多种抗真菌药物先天性或获得性耐

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (30770048)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-10-64807406; E-mail: baiyf@im.ac.cn

作者简介: 李娟 (1977 -), 女, 山东菏泽人, 助理研究员, 博士, 主要从事病原微生物分子流行病学研究。E-mail: lijuan_enjoyment@sohu.com

收稿日期: 2008-12-09; 修回日期: 2009-02-17

药^[4-5]。因此酵母菌临床分离株菌种的正确鉴定对酵母菌感染的有效治疗和预防具有重要意义。

目前临床应用的酵母菌鉴定方法主要是商业化的鉴定系统,其理论基础是不同菌种间形态特征或生理生化特征存在差异。如 API 和 Bio-Log 系统基于碳氮源化合物同化反应等生理生化特征,其鉴定标准和数据库的建立依赖于常规酵母菌分类学研究结果。由于酵母菌新种的不断被发现以及近年来分子分类学研究引起的酵母菌种概念的重新界定,使这类系统需要不断升级和改进。Chromagar 培养基鉴定依靠菌落不同的颜色反应,可区别白色念珠菌、热带念珠菌和克柔念珠菌等最常见的致病念珠菌^[6]。由于致病酵母菌种类的不断增多,以及呈中间颜色反应的临床酵母菌新种的出现,这一方法的局限性也愈来愈明显。上述方法已不能满足临床准确、快速鉴定菌株的需求,改进现有菌种鉴定方法、发展新的鉴定方法是目前临床真菌工作迫切需要解决的问题。

核糖体 RNA 基因(rDNA)存在于所有细胞生物中并具有相同的起源和功能,因而可以反映所有物种间具有可比性的进化史。而且 rDNA 中有些片段具有高度的序列同源性或保守性,从而可为不同物种间的系统学比较提供研究参考点。Kurtzman & Robnett^[7-8]和 Fell 等^[9]测定了所有已知酵母种类的 26S rDNA D1/D2 区序列,发现在这一 600 bp 左右的片段中,种内序列变异小于等于 1%,而种间序列差异大于 1%。目前这一标准已被国际酵母分类学界普遍接受,从而也使酵母菌的菌种鉴定变得相对容易。但这一标准目前主要应用在基础科学研究中,在临床菌株的鉴定中并没有得到广泛的推广使用。主要原因是 26S rDNA D1/D2 区序列比对基于 DNA 序列测定,技术的复杂性和高额的测序费用限制了其在临床样品快速鉴定中的应用。

单链构象多态性(Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP)技术是基因突变分析中最常用的方法之一。其理论基础是单链 DNA 具有序列特异性的二级或三级构象。一个或多个碱基的差异能影响其构象,在非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳中,构象的改变表现为单链 DNA 迁移率的改变,根据各样品的单链迁移率,就可以把突变体和非突变体区分开。该方法最初应用于人类基因点突变的检测中^[10-11],由于其在检测碱基差异方面的高分辨力,而广泛应用于人类和植物病原真菌种的鉴定和菌株分析中^[12-13]。本研究中,我们将 SSCP 引入到临床酵母

菌 rDNA 序列的分析中,通过 26S rDNA D1/D2 区 SSCP 图谱分析,探讨临床主要酵母菌 D1/D2-SSCP 图谱种内相似性和种间差异性,为临床菌株快速鉴定方法的改进奠定基础。同时结合 26S D1/D2 区测序对来自北京地区临床酵母菌进行分子系统学研究,调查北京地区临床酵母菌的种群多样性,为国内酵母菌感染的流行病学研究,提供新的基础数据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源:来自北京朝阳医院、北京协和医院、北京大学第三医院、中国人民解放军总医院第二附属医院检验科的临床分离酵母菌菌株 260 余株;作为标准和参考菌株,征集自美国典型菌种保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)的模式和权威菌株共 3 株,分别为白色念珠菌 ATCC 90028、近平滑念珠菌(*Candida parapsilosis*) ATCC 22019 和光滑念珠菌 ATCC 90030。

1.1.2 主要试剂和仪器:胰化蛋白胨(Tryptone)、酵母提取物(Yeast Extrat)、琼脂(Agar)购自英国 Oxoid 公司;所用生化试剂及 pfu DNA 聚合酶、dNTP、PCR 产物纯化试剂盒购自上海 Sangon 公司;DCode™ 突变检测电泳仪购自 Bio-Rad 公司;所涉及菌株的 26S rDNA D1/D2 区测序由上海 Sangon 公司用 ABI PRISM 377 DNA Sequencer 和 ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer 完成。

1.2 PCR 扩增和测序

1.2.1 总 DNA 提取:临床标本直接涂布沙堡罗固体培养基平板,挑取单菌落再划线纯化,分离纯的酵母菌株。用 Makimura et al^[14]方法提取菌体总 DNA。

1.2.2 PCR 扩增 26S rDNA D1/D2 区:PCR 扩增反应所用引物参照 Kurtzman & Robnett^[8]:正向引物 NL1: 5'-GCATATCGGTAAGCGGAGCAAAG-3',反向引物 NL4: 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'。PCR 采用 50 μL 体系,扩增反应条件:95℃ 5 min;94℃ 1 min, 52℃ 1 min, 72℃ min, 循环 36 次, 72℃ 8 min。

1.2.3 PCR 反应产物的琼脂糖电泳检测:取 2 μL PCR 扩增原液点样于 1% 的琼脂糖凝胶,电泳,溴化已锭(EB)染色后在紫外灯照射下确定是否扩出所要片段。26S D1/D2 区扩增出单一明亮条带,片段大小约为 500~600 bp。

1.2.4 PCR 产物的纯化、测序:所得 26S D1/D2 区 PCR 扩增原液经过 PCR 纯化试剂盒纯化回收后得到纯 DNA 样品,电泳再次检测后送交测序公司,通

过自动测序仪得到供试菌株 PCR 扩增片段的原始序列。

1.3 DNA 序列分析方法

1.3.1 DNA 序列分析:用 DNA Star 软件并结合 DNA 正反向序列图谱对 DNA 序列进行拼接和校正。将校正后的序列在国际核酸数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)中进行同源序列搜索,初步确定受试菌株的分类地位,一般在 D1/D2 区可以按如下经验值判断(1)与最近缘种的模式菌株相似率为 100%,可确定为同一种;(2)与最近缘种的模式菌株的相似率 < 98%,可初步确定为新种;(3)与最近缘种的模式菌株的相似率在 99% ~ 100% 之间,它们的关系要视不同的情况而定,除考虑序列差异外,还应考虑生理生化性状差异。

1.3.2 SSCP 分析:用 DCode™ 突变检测电泳仪进行 SSCP 检测。参照使用说明配置丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺(37.5:1)的 8% 凝胶。把 PCR 产物稀释 2 ~ 5 倍,取 5 μ L (大约 150 ~ 300 ng)与等量的上样缓冲液(0.05% 溴酚兰,0.05% 二甲苯青,95% 甲酰胺,4% 0.5 mol/L EDTA, pH 8.0)混匀,在 95℃ 下变性 10 min,迅速放在冰上,放置 15 min。把变性后的样品依次加入到点样孔中,200 V 电压 10℃ 电泳 16 小时。电泳结束后将凝胶按照 Wallace^[15]的方法进行硝酸银染色。用 Alphamager™ 2200 照相保存。

2 结果

2.1 临床常见致病酵母菌 D1/D2-SSCP 图谱比较

2.1.1 临床常见致病酵母菌 D1/D2-SSCP 图谱种间差异性分析 选取白色念珠菌、光滑念珠菌、热带念珠菌、近平滑念珠菌和克柔念珠菌五种常见致病酵母菌标准菌株或已明确鉴定的临床分离株各 9 株,PCR 扩增 26S rDNA D1/D2 区后,丙烯酰胺凝胶电泳 SSCP 图谱分析和序列测定分析。如图 1 所示:每株菌 D1/D2-SSCP 图谱都包括两条泳动慢的单链和一条泳动快的双链。双链位置的不同反映菌株间 26S rDNA D1/D2 区片段长度的差异,碱基序列的差异通过单链位置及两单链位置关系的差异反映在 SSCP 图谱上。上述 5 种酵母菌中,白色念珠菌(614 bp)、热带念珠菌(613 bp)和近平滑念珠菌(613 bp)D1/D2 区片段长度基本相同,碱基序列有明显的差异。白色念珠菌和热带念珠菌有 42 个碱基的差异,热带念珠菌和近平滑念珠菌有 23 个碱基的差异,白色念珠菌和近平滑念珠菌有 45 个碱基的差异。在 SSCP 图谱上 3 种菌株双链位置基本相同。白色念珠菌菌

株与热带念珠菌、近平滑念珠菌菌株单链位置及形态差异较大,可以明显的彼此区分开。热带念珠菌与近平滑念珠菌单链形态比较相似,但热带念珠菌两单链位置均稍高于近平滑念珠菌,两单链间距也较近平滑念珠菌间距窄,通过单链的位置关系可以将热带念珠菌和近平滑念珠菌区分开。光滑念珠菌(624 bp)和克柔念珠菌(607 bp)与上述 3 种菌株 D1/D2 区片段大小差异较大,从双链的位置和单链的形态上可以容易的将它们区分开。总之,5 个不同种菌株间 SSCP 图谱有明显的差异,彼此可以容易的区分开来。

2.1.2 临床常见致病酵母菌 D1/D2-SSCP 图谱种内一致性分析:如图 1 所示:光滑念珠菌、热带念珠菌、近平滑念珠菌和克柔念珠菌每种菌的不同菌株之间 D1/D2-SSCP 图谱完全相同,对上述菌株 D1/D2 测序分析显示同菌种不同菌株间 26S rDNA 区序列也完全相同。对于白色念珠菌菌株,A2 ~ A4 菌株 SSCP 图谱完全相同,A1 菌株与上述 3 株菌 SSCP 图谱稍有差异,表现在双链和一条单链位置相同,另一条单链的位置滞后于另 3 株菌的相应单链。序列分析显示,A2、A3、和 A4 菌株的 D1/D2 区序列完全相同,A1 菌株的相应序列与上述 3 株菌碱基数目相同,但有 2 个碱基的替换,这 2 个碱基的差异显示在 SSCP 图谱上即菌株间单链位置的细小差别。因此,同一种内不同菌株间 26S rDNA D1/D2 区序列高度相似,SSCP 图谱也非常相似,有很高的种内一致性。

A1 A2 A3 A4 G1 G2 G3 G4 T1 T2 T3 P1 P2 P3 K1 K2 K3 K4

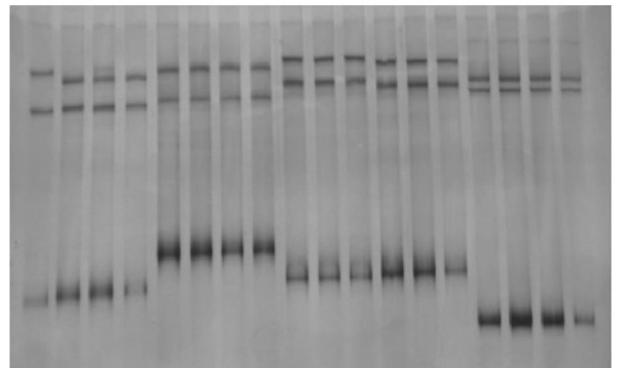


图 1 五种临床常见酵母菌的 26S rDNA D1/D2 区的 SSCP 图谱

Fig.1 SSCP patterns of the 26S rDNA D1/D2 domain of five common clinical yeast species. A1-A4: *C. albicans*; G1-G4: *C. glabrata*; T1-T3: *C. tropicalis*; P1-P3: *C. parapsilosis*; K1-K4: *C. krusei*.

2.2 临床酵母菌的 D1/D2-SSCP 图谱分析

2.2.1 临床鉴定为白色念珠菌菌株的 D1/D2-SSCP 图谱分析:随机挑选 20 株临床用 Chromagar 显色培

养方法鉴定为白色念珠菌的菌株进行 SSCP 电泳分析,结果显示:20 株菌株中有 13 株菌株图谱与白色念珠菌标准菌株图谱一致,可以判定其是白色念珠菌;余 7 株菌与白色念珠菌标准菌株图谱明显不同,可以排除其为白色念珠菌的可能性(图 2)。对上述 20 株菌进行 D1/D2 区序列分析,证实了 SSCP 图谱分析的结果。SSCP 图谱和白色念珠菌标准菌株图谱差异大的 7 株菌株中有 3 株是季也蒙念珠菌(*Pichia guilliermondii*) 2 株是热带念珠菌,另 2 株分别是酿酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)和 *Pichia ohmeri*(图 2)。

2.2.2 北京地区临床酵母菌的鉴定:对来自北京 4 所医院的 260 株临床检验科来源的酵母菌进行 D1/D2 区 SSCP 图谱分析,每张凝胶板中均以 5 种常见酵母菌标准菌株的 D1/D2 区 PCR 产物为标准。根据 SSCP 图谱可以判定菌株是否属于 5 种常见酵母菌以及是其中的哪一种。结果显示:白色念珠菌、近平滑念珠菌和热带念珠菌是临床最常见的 3 种酵母菌。260 株菌株中白色念珠菌 150 株(57.7%)、近平

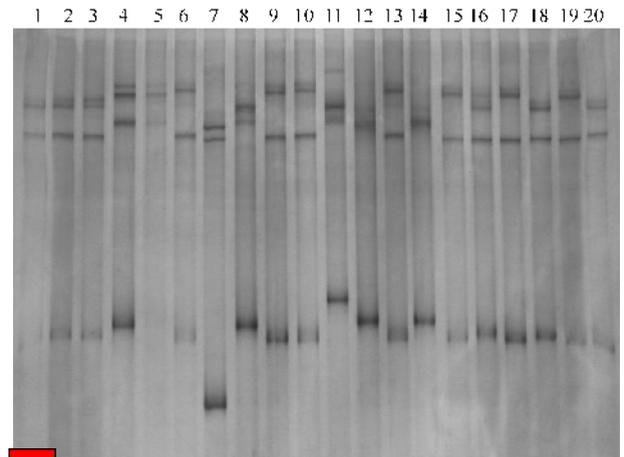


图 2 临床 Chromagar 方法鉴定为 *C. albicans* 菌株的 D1/D2-SSCP 图谱分析

Fig.2 SSCP patterns of the 26S rDNA D1/D2 domain of strains identified as *C. albicans* by Chromagar in clinical laboratories, showing the remarkable differences of strains 4, 5, 7, 8, 11, 12 and 14 from the other strains with typical SSCP patterns of *C. albicans*. (The former seven strains were then reidentified by D1/D2 sequencing as: 4, *C. tropicalis*; 5, *C. tropicalis*; 7, *Pichia ohmeri*; 8, *Pichia guilliermondii*; 11, *Saccharomyces cerevisiae*; 12, *Pichia guilliermondii*; and 14, *Pichia guilliermondii*).

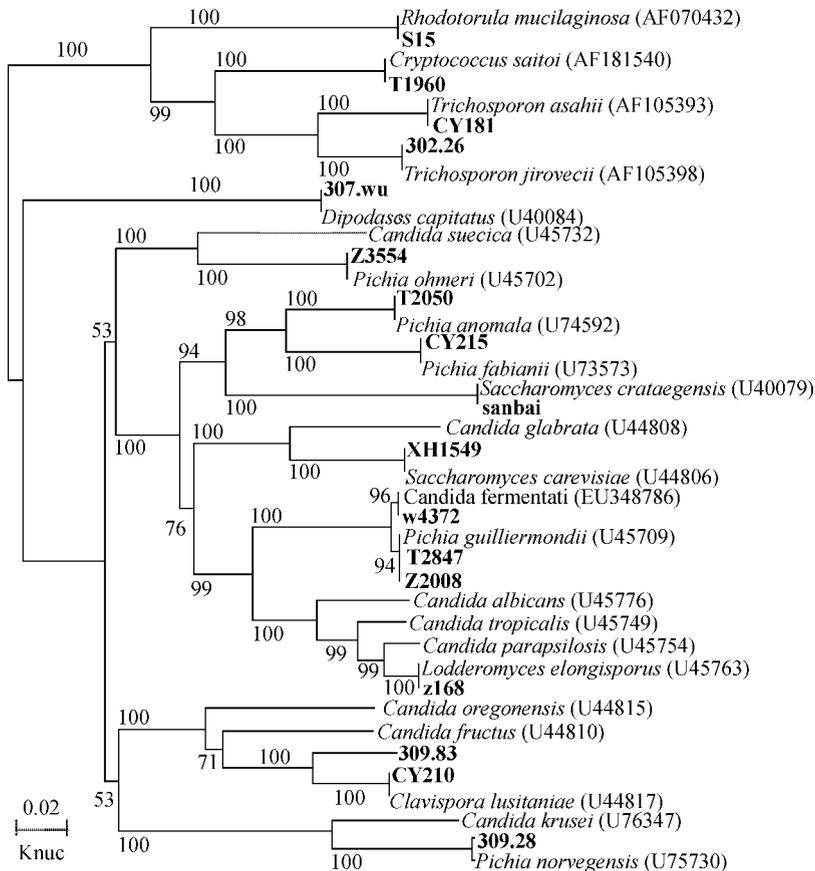


图 3 基于 26S rDNA D1/D2 区序列构建的 N-J 系统树

Fig.3 Phylogenetic tree drawn from neighbor-joining analysis, depicting the relationships of the uncommon yeast strains in clinical sources from Beijing with closely related reference species. Bootstrap percentages over 50% from 1 000 bootstrap replicates are shown. Reference sequences are from type strains under the GenBank accession numbers indicated. The marker bar denotes 2% base difference calculated from Kimura's two-parameter model.

滑念珠菌 26 株(10%);热带念珠菌 24 株(9.2%);光滑念珠菌 16 株(6%);克柔念珠菌 15 株(5.7%);另外还有 28 株(10.3%)菌株不属于这 5 种常见酵母菌。

2.2.3 非常见临床酵母菌株的鉴定:对上述 28 株非常见临床菌株进行 D1/D2 区序列测定,并将序列在 GenBank 数据库中进行 Blast 比对分析。发现一株菌的 D1/D2 区序列与亲缘关系最近的模式菌株的相似率小于 99%,再经过 ITS 区序列分析及生理生化鉴定,明确了其新种地位^[16]。其余 27 株的 D1/D2 区序列与已知种的相应序列完全相同或仅有一个碱基的差异,通过与近缘菌种模式菌株 D1/D2 区序列比对分析可以确定其种属地位(图 3)。这些非常见种的来源见表 1。

表 1 北京地区非常见临床菌株的鉴定结果

Table 1 The yeast species distributed rarely in clinical isolates from Beijing

Species	Number of Strains	Source
<i>Candida fermentati</i>	1	Sputum
<i>Candida pseudorugosa</i>	1	Sputum
<i>Clavispora lusitaniae</i>	5	Sputum
<i>Cryptococcus saitoi</i>	1	Nail
<i>Dipodascus capitatus</i>	2	Sputum
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	1	Sputum
<i>Pichia guilliermondii</i>	5	Sputum
<i>Pichia norvegensis</i>	2	Sputum
<i>Pichia anomala</i>	2	Nail
<i>Pichia fabianii</i>	1	Urine
<i>Pichia ohmeri</i>	1	Alveolate fluid
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1	Sputum
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1	Sputum
<i>Saccharomycopsis crataegensis</i>	1	Sputum
<i>Trichosporon asahii</i>	2	Lung tissue
<i>Trichosporon jirovecii</i>	1	Sputum

3 讨论

本研究中,我们将 SSCP 引入到酵母菌 26S rDNA D1/D2 区序列分析中,研究证明 D1/D2-SSCP 图谱分析为临床大量菌株标本的初步鉴定提供了一种快速、简单、低成本和高分辨率的方法。该方法不仅可以区分 D1/D2 区片段长度的不同,还可以分辨相同片段长度下碱基差异所造成的单链构象的改变。因此,SSCP 能够从 3 个层次对 D1/D2 区序列进行多态性分析(a)片段长度(b)单链构象(c)个别碱基的点突变。不同酵母菌种间 26S rDNA D1/D2 区通常有片段大小的不同,即使个别菌种间片段长度相同(如近平滑念珠菌和热带念珠菌),种间碱基

序列的差异也大于 1%,即至少会有 5 个碱基的差异,这样的差异通过 SSCP 可以容易的检测到。如 5 种临床常见酵母菌不同种的菌株间 D1/D2 区 SSCP 图谱有明显的差异,可以容易的将不同种的菌株区分开。同时同种不同临床分离菌株间 D1/D2 区没有差异或差异很小,SSCP 图谱完全相同或非常相似,也容易将同一菌种的菌株归类在一起。个别菌种菌株间的 D1/D2 可能会有多态性,如白色念珠菌 D1/D2 区有 1~2 碱基的多态性,这样的碱基差异通过 SSCP 也可以检测到。

SSCP 方法分辨力高、成本低、简单、容易操作。但该方法也是基于图像分析的一种方法,不同批次丙烯酰胺凝胶间不容易比较,不同实验室数据难以共享是其最大的缺点。在本研究中,我们对实验流程 PCR 扩增、PCR 产物变性、电泳和检测分析等操作中的每个参数都进行标准化,同时每块凝胶板上都加入标准菌株的 D1/D2 样品作为参照标准,实现了不同批次实验结果的比较。以 5 种临床常见酵母菌的 26S rDNA D1/D2 作为标准,可以清楚地鉴定 90% 的菌株。SSCP 图谱还可以帮助了解菌株间的亲缘关系,亲缘关系越近的菌株其 SSCP 图谱也越相似。另外 10% 的菌株虽然不能明确其属于哪一个种,根据其 SSCP 图谱与已知菌种图谱的差异大小,也可以初步了解其亲缘关系。

通过对临床 Chromagar 方法鉴定为白色念珠菌的菌株进行 SSCP 图谱分析,说明现行临床酵母菌鉴定方法的准确性还有待提高。临床鉴定为白色念珠菌的菌株有近 30% 的菌株不是白色念珠菌,虽然我们 Chromagar 方法验证了部分错误鉴定是临床技术人员的主观判断造成的,但这也说明基于颜色反应的 Chromagar 菌种鉴定方法,由于方法本身的局限性和颜色判断容易受判断者的主观影响,容易引起临床鉴定的错误。同时 Chromagar 显色培养、API 20C AUX 试剂盒等其他生理生化鉴定方法都依赖于菌株培养,受制于菌株生长速度和培养的难易程度。D1/D2-SSCP 分析方法不依赖于菌株培养,在临床样品中只要有微量的 DNA 就可以被检测到。因此在快速诊断和灵敏度方面明显优于传统的生理生化鉴定方法。

对临床 260 株酵母菌菌相分布的研究显示:白色念珠菌仍是我国真菌感染最主要的病原菌,其他非白色念珠菌的比例也有明显的提高,已达到 42%,这与国内其他研究者的结果相同^[18]。同时约 10% 的菌株为非常见的临床酵母菌,分布在 16 个种

中。其中 *Pichia anomala* 和 *Trichosporon asahii* 分别来自肺泡液和气管组织,组织病理确认其就是患者肺部感染的病原菌;另外我们还发现一株来自患者痰标本的菌株,其 D1/D2 区序列(DQ234791)与皱褶念珠菌模式菌株(CBS 613)的相应序列同源性最高,在聚类分析中,该菌株也与皱褶念珠菌聚类在一个分支上,但与皱褶念珠菌模式菌株的相应序列有 4.7% 的差异(21 个替换和 2 个插入/缺失),经过多序列分析及生理生化鉴定,确定其为新种,并将其命名为拟皱褶念珠菌(*Candida pseudorugosa*)^[16]。药敏测试还显示该新种对多种临床常用抗真菌药物具有很强的耐药性^[16]。临床菌株中新种和非常见种菌株的出现给我们的临床诊断、预防和治疗带来了新的挑战。D1/D2-SSCP 方法能够实现对非常见种菌株的快速筛选,为及时、有效的临床治疗和预防提供了新的手段。

总之,26S rDNA D1/D2-SSCP 图谱分析为临床大量菌株标本的初步鉴定提供了一种快速、简单、低成本和高分辨率的方法。目前由于不同实验室之间操作流程还没有实现统一标准化,以及非常见种菌株的鉴定还依赖于序列测定,该方法距离其在临床实验室的推广使用还有一定的差距。如果能够实现不同临床实验室临床标本处理、PCR 扩增、电泳等鉴定流程标准化,建立一个临床致病酵母菌 SSCP 图谱的数据库,每个临床标本的 SSCP 图谱都可以在该数据库中找到对应的菌种名称,那么临床实验室大规模样品的菌株鉴定将会变得简单快捷。这也是我们目前和今后努力的目标和方向。

致谢 感谢北京朝阳医院检验科的栗芳大夫、北京协和医院检验科细菌室徐英春主任、北京大学第三医院皮肤科李东明副主任医师和解放军总医院第二附属医院检验科雷红副主任医师,为本研究提供的临床菌株和相关临床背景资料。

参考文献

- [1] Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill nonimmunosuppressed patients. *Lancet Infectious Diseases*, 2003, 3 : 685 - 702.
- [2] Pfaller MA, Diekema DJ, Jones R N, et al. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and in vitro susceptibility to fluconazole, ravuconazole, and voriconazole of isolates collected from 1997 through 1999 in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39 : 3254 - 3259.
- [3] Sugita T, Takashima M, Poonwan N, et al. *Candida pseudohaemulonii* sp. nov., an amphotericin B and azole-resistant yeast species, isolated from the blood of a patient from Thailand. *Microbiology and Immunology*, 2006, 50 : 469 - 473.
- [4] Rex JH, Pfaller MA, Galgiani JN, et al. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole, and candida infections. *Clinical Infectious Disease*, 1997, 24 : 235 - 247.
- [5] Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, et al. Activities of fluconazole and voriconazole against 1,586 recent clinical isolates of *Candida* species determined by broth microdilution, disk diffusion, and Etest methods: report from the APREMIS Global Antifungal Susceptibility Program, 2001. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41 : 1440 - 1446.
- [6] Odds C, Bernaerts R. Chromagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 1994, 32 : 1923 - 1929.
- [7] Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1998, 73 : 331 - 371.
- [8] Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, 35 : 1216 - 1223.
- [9] Fell JW, Boekhout T, Fonseca A, et al. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by larger subunit rDNA D1/D2/domain sequence analysis. *International Journal of Bacteriology*, 2000, 50 : 1351 - 1371.
- [10] Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, et al. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1989, 86 : 2766 - 2770.
- [11] Orita M, Susuki Y, Sekiya T, et al. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, 1989, 5 : 874 - 879.
- [12] Kong P, Hong C, Richardson PA, et al. Single-strand-conformation polymorphism of ribosomal DNA for rapid species differentiation in genus *Phytophthora*. *Fungal Genetics and Biology*, 2003, 39 : 238 - 249.

- [13] Kumar M , and Shukla PK. Use of PCR targeting of internal transcribed spacer regions and single-stranded conformation polymorphism analysis of sequence variation in different regions of rRNA genes in fungi for rapid diagnosis of mycotic keratitis. *Journal of Clinical Microbiology* , 2005 , 43 : 662 - 668 .
- [14] Makimura K , Murayama YS , Yamaguchi H. Detection of a wide range of medically important fungal species by polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Medical Microbiology* , 1994 , 40 : 358 - 364 .
- [15] Wallace AJ. SSCP/heteroduplex analysis. In PCR mutation detection protocols. Ed. By Theophilus BDM , Rapley R. 2000 , 151 - 163 .
- [16] Li J , Xu YCH , Bai FY. *Candida pseudorugosa* sp. nov. a novel yeast species from the sputum. *Journal of Clinical Microbiology* , 2006 , 44 : 4486 - 4490 .
- [17] Lachance MA , Daniel HM , Meyer W et al. The D1/D2 domain of the large-subunit rDNA of the yeast species *Clavispora lusitanae* is unusually polymorphic. *FEMS Yeast Research* , 2003 , 4 : 253 - 258 .
- [18] 廖万清 , 顾菊林. 深部真菌感染治疗的现状与对策. 中国感染与化疗杂志(*Chinese Journal of Infection and Chemotherapy*) 2007 , 7 (2) : 101 - 103 .

Rapid identification of clinical yeast species by single-strand conformation polymorphism analysis of 26S rDNA D1/D2 domain

Juan Li^{1 2} , Fengyan Bai^{2 *}

(¹ State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control , National Institute for Communicable Disease Control and Prevention , China CDC , Beijing 102206 , China)

(² Systematic Mycology and Lichenology Laboratory , Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100101 , China)

Abstract [Objective] To investigate the reliability of single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis of 26S rDNA D1/D2 domain for rapid identification of clinical yeast species and to examine the distribution of the yeast species in clinical strains from Beijing. **[Methods]** Type and authentic strains of five common pathogenic yeast species were used as references. Approximately 260 yeast strains with diversified clinical origins were collected from four hospitals located in Beijing. The 26S rDNA D1/D2 domain of each strain was amplified by PCR and subjected to SSCP or sequence analysis. **[Results]** SSCP analysis showed that the *Candida* strains with slight sequence differences in the D1/D2 domain could be effectively detected. The common pathogenic *Candida* species , including *C. albicans* , *C. parapsilosis* , *C. tropicalis* , *C. glabrata* and *C. krusei* , were clearly distinguished from each other by their SSCP patterns of PCR amplified D1/D2 domain products. Twenty species belonging to 10 genera were identified from the approximately 260 clinical yeast strains based on SSCP pattern comparison for the common species and D1/D2 sequence analysis for the uncommon species. The dominant species and their frequencies were : *C. albicans* (57.7%) , *C. parapsilosis* (10.0%) , *C. tropicalis* (9.2%) , *C. glabrata* (6.7%) and *C. krusei* (5.8%) . **[Conclusion]** The results indicated that PCR-SSCP analysis of D1/D2 is a powerful approach for rapid species identification of clinical yeast strains. The most common clinical yeast species was *C. albicans* in Beijing but the increasing trend of non-*albicans* *Candida* species was observed.

Keywords : pathogenic yeasts ; species differentiation ; SSCP ; 26S rDNA D1/D2

(本文责编 : 王晋芳)