

DOI:10.11784/tdxbz202404003

白念珠菌唑类耐药分子检测体系的建立

王梦凡^{1,2}, 王旭¹, 刘春龙^{1,3}, 齐崑¹

(1. 天津大学化工学院, 天津 300350; 2. 天津大学生命科学学院, 天津 300072;
3. 丹娜(天津)生物科技股份有限公司, 天津 300457)

摘要: 随着免疫抑制剂与侵入性手术的应用, 侵袭性真菌病的发病率逐渐上升, 而由此出现的抗真菌药物大量使用也导致了真菌耐药性的增强。其中, 白念珠菌(*Candida albicans*)对唑类药物耐药性日益明显, 这对开发早期临床耐药性诊断方法提出了更大的需求。相关研究显示, 白念珠菌的耐药性涉及到多种机制, 其中 *erg11* 基因上的热点区突变是其产生唑类耐药性的主要机制之一。本研究旨在基于多色探针熔解曲线分析技术(MMCA)建立一种针对白念珠菌唑类耐药的分子检测方法, 从而对 3 个热点突变区内的 4 种主要的突变类型进行基因分型。研究纳入了 11 株耐药和 22 株敏感的白念珠菌, 通过对其进行药敏检测、耐药相关基因突变类型鉴定, 建立真菌耐药表型与耐药基因型之间的联系。药敏结果显示, 11 株耐药株和 22 株敏感株的最低抑菌浓度(MIC)值分别为 16~64 $\mu\text{g/mL}$ 和 0.5~1.0 $\mu\text{g/mL}$ 。耐药基因型鉴定结果显示有 *erg11HS1* 热点区突变的菌株 9 株, *erg11HS3* 热点区突变的菌株 2 株, 未能鉴定到 *erg11HS2* 热点区突变的菌株, 相关突变型与耐药性之间的联系符合预期结果。在此基础上, 通过设计数对特异性引物和荧光探针, 并筛选最佳反应程序, 建立了一种鉴定有关突变型与野生型的 MMCA 检测体系。对该检测体系的效果进行了评估和验证: 所有 4 种突变型和野生型均被准确分型, 两者的溶解温度差异均大于 3.5 $^{\circ}\text{C}$, 检出限最低可达 1.9×10^2 拷贝数/mL, 扩增效率均大于 90%。在 33 例白念珠菌的样本中, 以一代测序为标准, 该体系检测的一致率为 93.94%(31/33), 不同物种间无特异性交叉。本研究为白念珠菌病的早期唑类药物耐药性诊断提供了新方法。

关键词: 白念珠菌; 耐药性; 探针熔解曲线分析; 突变型

中图分类号: TQ426.97

文献标志码: A

文章编号: 0493-2137(2025)04-0414-09

Establishment of a Molecular Detection System for Azole Resistance in *Candida albicans*

Wang Mengfan^{1,2}, Wang Xu¹, Liu Chunlong^{1,3}, Qi Wei¹

(1. School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300350, China;

2. School of Life Sciences, Tianjin University, Tianjin 300072, China;

3. Dynamiker Biotechnology (Tianjin) Co., Ltd., Tianjin 300457, China)

Abstract: With the increasing use of immunosuppressive agents and invasive surgeries, the incidence of invasive fungal diseases is gradually increasing, leading to an increased prevalence of antifungal drug resistance due to extensive use of these drugs. *Candida albicans*, in particular, has shown a gradual increase in resistance to azole antifungal drugs, which highlights the need for early detection of drug resistance. Studies have indicated that resistance mechanisms in *C. albicans* involve multiple factors, with hotspot mutations in *erg11* being one of the main contributors to azole resistance. This study aimed to establish a molecular detection system using multicolor melting curve analysis(MMCA) for azole resistance in *C. albicans* via genotyping four major mutation types within three hotspot regions. A total of 11 strains of drug-resistant and 22 strains of drug-sensitive *C. albicans* were included. The correla-

收稿日期: 2024-04-08; 修回日期: 2024-05-20.

作者简介: 王梦凡(1983—), 女, 博士, 教授.

通信作者: 王梦凡, mwang@tju.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(22178260); 天津市科学技术局重大专项资助项目(20ZXGBSY00040).

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 22178260), the Major Project of Tianjin Science and Technology Bureau (No. 20ZXGBSY00040).

tion between fungal drug resistance phenotypes and genotypes was established by performing antimicrobial susceptibility testing and identifying mutations in drug resistance-related genes. Drug susceptibility testing revealed that the minimum inhibitory concentration (MIC) values for the 11 resistant and 22 sensitive strains were in the ranges of 16—64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 0.5—1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. Genotypic resistance analysis identified nine strains with mutations in the *erg11*/HS1 hotspot region, two strains with mutations in the *erg11*/HS3 hotspot region, and no strains with mutations in the *erg11*/HS2 hotspot region. Based on this, a MMCA detection system was established to identify mutations and wild types by designing pairs of specific primers and fluorescent probes, and screening for the optimal reaction conditions. The performance of the MMCA detection system was evaluated and validated. All four mutation types and the wild type were accurately genotyped, and the difference in melting temperature between them was more than 3.5 $^{\circ}\text{C}$. The detection limit was as low as 1.9×10^2 copies/mL, and the amplification efficiency was consistently more than 90%. In a sample of 33 *C. albicans* isolates, the system exhibited a consistency rate of 93.94% (31/33) compared the first-generation sequencing and did not show cross-reactivity among different species. The findings from this study provide insights for the early diagnosis of azole resistance in *C. albicans* infections.

Keywords: *Candida albicans*; drug resistance; probe melting curve analysis; mutation type

侵袭性真菌病 (invasive fungal disease, IFD) 系指真菌侵入人体, 在组织、器官或血液中生长、繁殖, 并导致组织损伤与炎症反应的感染性疾病。随着医学高速发展, 新的免疫抑制剂或化疗药物的应用、侵入性手术、血管内医疗器械的使用等造成了患者的免疫力缺陷, 导致了患 IFD 风险的增加^[1]。其中念珠菌是最常见致病菌之一。

念珠菌又称假丝酵母菌, 是一种条件致病真菌, 多感染于免疫低下患者^[2]。迄今为止, 被发现的致病念珠菌亚种多达 17 种之多, 其中白念珠菌最为常见, 占 65% ~ 70%^[3]。唑类药物是治疗念珠菌感染的最常用药物, 其作用靶标是羊毛甾醇 14- α 去甲基化酶 (CYP51), 由 *erg11* 基因编码。但近年来, 由于抗真菌药物的选择性压力, 耐唑类药物真菌的种类和数量迅速增加, 为临床真菌病诊疗带来极大挑战。近期, 随着对白念珠菌耐药机制研究的深入, 已经证实了真菌耐药性的产生与抗真菌药物作用靶点相关基因的突变有关^[4-6]。如白念珠菌 *erg11* 基因上的热点区突变, 导致菌体对唑类药物产生抗性^[7]。而且不同的突变型表现出了不同的耐药表型^[8-11]。所以如何快速准确地鉴定突变类型对于疾病治疗的有效性来说至关重要。

目前临床上普遍使用的耐药真菌检测方法是标准真菌药敏试验法。然而, 这种方法需要长时间的体外培养, 操作步骤繁琐, 在培养过程中易造成菌株污染^[12]。另外, 质谱技术和 NGS (next generation sequencing) 技术也可应用于耐药突变基因的检测, 但都处于技术起步阶段, 而且价格昂贵, 对操作人员的专业性要求比较高。实时荧光 PCR (qPCR) 方法在 PCR 体系中加入附带了荧光基团的各种探针, 在扩

增反应的过程中荧光信号会随着扩增产物的量的变化而变化, 从而对反应体系进行实时监控, 此方法敏感性和特异性高, 检测时间短 (≤ 3 h), 闭管操作降低了污染的可能, 可以实现自动化, 相对成本较低。

随着分子诊断技术的发展, 越来越多的研究侧重于开发新的分子检测体系来解决多重基因检测的问题^[13-17]。近期, 基于多色探针熔解曲线分析 (multi-color melting curve analysis, MMCA) 技术发展迅速, 其在 PCR 完成后, 通过实时监测温度变化过程中探针荧光强度变化的情况, 得到荧光强度随温度变化的关系 (即探针熔解曲线), 从而可以获得探针与靶序列杂交的溶解温度 (T_m)。当荧光探针与不同的靶序列杂交时, 由于碱基匹配程度不同, 形成双链 DNA 的稳定性不同, 其 T_m 值不同, 因此根据 T_m 值的差异可以实现不同 DNA 靶点的鉴定与区分。将 MMCA 技术与 qPCR 方法融合, 既能发挥实时 qPCR 方法的优势, 又能对突变靶点进行有效的区分和鉴定, 操作简便。Liao 等^[13]结合荧光基团和溶解温度作为 2D 标记, 成功对 48 个人类单核苷酸多态性进行基因分型。此种方法能够大幅增加实时 PCR 平台中可检测的靶标数量, 从而有效提高检测效率^[18]。

TaqMan 探针是一种常见的水解探针, 两端分别标记荧光基团和淬灭基团, 在反应过程中探针被外切酶降解后发出荧光。已有相关研究表明, TaqMan 探针不仅可用于实时监测聚合酶链式反应, 还可用于不对称聚合酶链式反应条件下的熔解曲线分析^[19]。目前, 基于 TaqMan 探针的多重熔解曲线分析已应用于突变基因检测和基因分型^[20-25]。例如, Wang 等^[20]使用 MMCA 方法同时检测 12 个流行的非综合征性听力损失突变; Xia 等^[21]利用多色熔解曲线分析对中国

人群中的 G6PD 突变进行了准确分型. 由此可见, 相比于目前广泛应用的药敏检测方法, MMCA 技术具有简便、易操作、易判读等优点, 有望替代传统的临床药敏测试, 为耐药真菌分子检测与鉴定提供新方法.

研究发现, 白念珠菌 *erg11* 基因被分为 3 个热点突变区(氨基酸 105 ~ 165, 266 ~ 287, 405 ~ 488)^[9]. 基于此, 本研究中选择了 1 种野生型(ATCC 90028, 以下称 WT)和 3 个热点突变区内的 4 种突变型(以下称 MT)作为检测靶点, 突变型包括 Y132F(A395T)、K143R(A428G)、S279F(C836T)、G450E(G1349A), 其中括号外表示氨基酸突变, 括号内表示对应的碱基突变. 本文首先通过药敏实验与基因测序初步验证了白念珠菌基因突变与其对氟康唑(FZ)和伏立康唑(VOR)耐药性的相关性. 然后基于 MMCA 方法建立了一种新的分子检测体系, 包含 4 个不同波长的荧光检测通道: FAM 通道用于检测 Y132F, ROX 通道用于检测 K143R, HEX 通道用于检测 S279F, CY5 通道用于检测 G450E. 对该检测体系进行了优化与性能评估, 最终将检测结果与测序结果进行比较, 为白念珠菌唑类药物耐药性的快速检测提供新方法.

1 材料与方法

1.1 材料

野生型标准菌株 ATCC 90028、药物敏感性试验质控菌株 ATCC 22019 和用于效果验证的临床分离菌株均为本实验室保存. 使用德国 QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit 试剂盒进行核酸提取. 含有设计的特定突变序列的质粒和所有引物/探针由上海生工生物科技有限公司合成. 96 孔细胞培养板(F 底)、25 mm × 0.22 μm 针式滤器(带 PES 滤膜)、60 mm 细胞培养皿、3-吗啉丙磺酸(MOPS)、葡萄糖, 购自天津鼎国生物技术有限公司. 2 × Pfu PCR 预混试剂(KP201), 购自天根生化科技有限公司. RPMI1640 培养基(干粉), 购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司. 氟康唑(FZ)(≥ 98.0%)、伏立康唑(VOR)(≥ 98.0%), 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司.

1.2 真菌检测样品的制备

选取本实验室保存的 36 株念珠菌临床分离菌株并依次编号, 进行待测菌液制备, 过程如下: 取新鲜培养的 SDA 培养基上的念珠菌(培养 24 h)的菌落 2 ~ 3 个, 放入约 1.3 mL 质量分数为 0.85% 无菌生理盐水中, 取 200 μL 以 0.85% 无菌生理盐水稀释 5 倍,

用微量可见紫外分光光度计测定 OD₆₀₀, 调节菌悬液浊度为 0.5 麦氏浊度(OD₆₀₀ = 0.13), 涡旋振荡器上持续混匀 15 s, 随后用 RPMI 1640 培养基稀释 1000 倍(先稀释 10 倍, 再稀释 100 倍)待用.

1.3 微量肉汤稀释法测定最低抑菌浓度

通过标准微量肉汤稀释法进行真菌药敏检测. 根据临床实验室标准化协会(CLSI)发布的真菌药敏试验指南(CLSI M27, 2017 第 4 版; CLSI M60, 2020 第 2 版), 以质控菌(选择近平滑念珠菌 ATCC 22019)为对照, FZ 和 VOR 为目标药物, FZ 检测范围为 0.125 ~ 64 μg/mL, VOR 检测范围为 0.031 3 ~ 16 μg/mL(均为 2 倍梯度). 生长对照为不添加抗菌药物但添加菌悬液, 空白对照为不添加抗菌药物和菌悬液. 35 °C 孵育 24 h 后进行观察, 抑制待测菌肉眼可见生长的最低药物浓度, 即为该药物对待测菌的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC).

1.4 MMCA 模板制备

使用标准菌株 ATCC 90028 作为野生型模板, 使用上海生工生物科技有限公司合成的突变型质粒作为突变型模板. 质粒初始浓度为 1.9×10^{10} 拷贝数/mL, 按 10 倍梯度稀释, 从 1.9×10^8 拷贝数/mL 稀释到 1.9×10^1 拷贝数/mL. 每种浓度的质粒设 3 个平行样本, 使用超微量紫外分光光度计(DeNovix, 美国)检测定量后于 -20 °C 保存.

1.5 引物和探针设计

分别在 *erg11* 基因 3 个热点突变区上选择突变热点作为白念珠菌唑类耐药的检测靶点, 利用 Primer Premier 6.0、Beacon Designer 7.7 和 Tm Utility v1.5 等软件对每个靶点序列设计引物和荧光标记探针. 其中 *erg11*(HS1 Y132F)用 FAM 荧光标记, *erg11*(HS1 K143R)用 ROX 荧光标记, *erg11*(HS2 S279F)用 HEX 荧光标记, *erg11*(HS3 G450E)用 CY5 荧光标记. 设计出的引物和探针序列在 Genebank 中进行 Blast 分析, 排除与其他物种基因的同源性, 避免非特异性扩增, 并尽量减少二级结构的存在或避免过高的结合能($\Delta G < -18.83$ kJ/mol). 根据扩增效率、熔解曲线效果、 T_m 值差异筛选引物/探针组合.

本研究使用的引物和探针序列如表 1 所示.

1.6 MMCA 检测体系程序

为了产生大量的单链 DNA 扩增子与探针结合, 从而产生更强的荧光信号, 本研究使用了不对称聚合酶链式反应技术, 即通过上下游引物的物质的量的差异实现单链扩增子的大量复制. 经优化后, 在宏石全自动荧光定量 PCR 仪 SLAN-96P 上进行 PCR 扩增

表 1 多重 PCR 引物和探针信息汇总

Tab.1 Summary of multiplex PCR primers and probes

热点突变区域	名称	序列	修饰方式	终浓度/($\mu\text{mol/L}$)
HS1 (Y132 F、 K143R)	正向引物	GTTTCTGCTGAAGATGCTT		8.30
	反向引物	CATAGGAACATATCTTTTAAA		0.30
	Y132F 探针	TTGGACAATCATAAATAACCCCTTTAC	5' BHQ-1, 3' FAM	0.26
	K143R 探针	AATTTAGCAAATTTTTTTTGTCCATTAATCT	5' ROX, 3' BHQ-2	0.40
HS2 (S279F)	正向引物	GAACGTGGTGATATTGAT		0.15
	反向引物	TGTTGACCACCATAAGA		3.30
	S279F 探针	ATTTAATTGATTCCTTATTGATTCACTCAACT	5' HEX, 3' BHQ-2	0.30
HS3 (G450E)	正向引物	CTCCAGGTTATGCTCATA		0.15
	反向引物	GTTCCCAATACATCTATG		0.83
	G450E 探针	AGTTGATTATGGGTTGGGAAAGTTTC	5' CY5, 3' BHQ-2	0.15

和熔解曲线的分析. 每个反应体系由 20 μL 的 PCR 混合物和 5 μL 的 DNA 模板组成. PCR 混合物由 12.5 μL 的 FastStart Taq DNA Polymerase PCR Buffer (LightCycler@480 Probes Master, 罗氏上海有限公司)、1.25 μL 的 HS1 正向引物 (200 $\mu\text{mol/L}$)、1 μL 的 HS1 反向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$)、0.8 μL 的 Y132F 探针 (10 $\mu\text{mol/L}$)、1.2 μL 的 K143R 探针 (10 $\mu\text{mol/L}$)、0.5 μL 的 HS2 正向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$)、0.5 μL 的 HS2 反向引物 (200 $\mu\text{mol/L}$)、1 μL 的 S279F 探针 (10 $\mu\text{mol/L}$)、0.5 μL 的 HS3 正向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$)、0.125 μL 的 HS3 反向引物 (200 $\mu\text{mol/L}$)、0.5 μL 的 G450E 探针 (10 $\mu\text{mol/L}$) 和 0.125 μL 的 DEPC H_2O 组成. 上机前先将薄壁透明 PCR 八连排放入 MiniPlate 垂直微孔板离心机离心 30 s, 以去除管盖上的液滴和混合液中的气泡. 扩增熔解反应的条件为: 第 1 阶段为预变性阶段, 95 $^\circ\text{C}$ 下保持 10 min; 第 2 阶段为循环扩增阶段, 分两步进行, 第 1 步 95 $^\circ\text{C}$ 下 10 s, 第 2 步 53 $^\circ\text{C}$ 下 40 s, 第 2 阶段循环 45 次, 每次在 53 $^\circ\text{C}$ 时采集荧光信号; 第 3 阶段为熔解曲线阶段, 95 $^\circ\text{C}$ 下 60 s, 然后在 50 $^\circ\text{C}$ 下保持 120 s, 以 0.04 $^\circ\text{C/s}$ 的速率从 50 $^\circ\text{C}$ 升高到 80 $^\circ\text{C}$, 期间采集荧光信号; 最后第 4 阶段为冷却阶段, 37 $^\circ\text{C}$ 下冷却 10 s. 来自 FAM、HEX、ROX 和 CY5 通道的荧光在第 2 阶段 45 个扩增循环的退火步骤和熔解曲线分析期间被记录, 通过绘制荧光对温度的负导数 ($-dF/dT$) 得到熔解曲线以及 T_m 值. 当通过二阶导数分析检测到基线以上的荧光信号时, 结果被认为是阳性, 并以达到基线时的循环次数 (C_i) 量化表示. 每个实验都包含阴性对照.

1.7 敏感性和特异性分析

通过与包括烟曲霉、黄曲霉、黑曲霉、土曲霉等常见曲霉属致病真菌和克柔念珠菌、近平滑念珠菌、光滑念珠菌、热带念珠菌等常见念珠菌在内的多种真菌进行交叉反应实验, 以判断 MMCA 方法的特异

性. 曲霉属和念珠菌属模板均由本实验室保存.

通过 36 例临床分离念珠菌菌株的药敏试验筛选出耐药菌株和敏感菌株, 然后分别采用 MMCA 方法和一代测序法 (华大基因) 对其进行基因分型. 以测序结果作为检测的金标准, 统计两种方法检测到的野生型样本和突变型样本的差异, 分析 MMCA 方法的敏感性和特异性. 其中, 测序所需引物序列如表 2 所示. 扩增的退火温度选择 55 $^\circ\text{C}$, 延伸时间选择 1 min, 其余条件与 2 \times Pfu PCR 预混试剂推荐参数相同.

表 2 基因型鉴定所需引物

Tab.2 Primers required for genotyping

热点突变区域	引物	上、下游引物信息
HS1	正向	GCAGCTTCATATGGTCAAC
	反向	CATAACATTGGCAACCCC
HS2	正向	CGTGATGCTGCTCAAAAAG
	反向	GCAGAAGTATGTTGACCAC
HS3	正向	GTTACTAACCCATTAAGAATCCC
	反向	GCTGGTTCAGTAGGTA AAC

1.8 检测限分析

将含有特定突变靶片段序列的质粒进行梯度稀释, 每次稀释 10 倍, 从 1.9×10^8 拷贝数/mL 稀释到 1.9×10^1 拷贝数/mL. 使用 MMCA 方法进行检测, 每个浓度的质粒做 3 次重复, 以 DEPC H_2O 作为阴性对照.

1.9 扩增效率分析

通过检测不同浓度的质粒的扩增情况来评估 MMCA 方法对不同突变型的扩增效率, 方法如下: 以梯度稀释的含有特定突变靶片段序列的质粒为模板, 分别对 4 个检测靶点进行 PCR 扩增, 得到不同质粒浓度下的 C_i 值, 以质粒浓度的对数和 C_i 值为关系进行线性回归分析, 得到线性回归直线 $C_i = -k \lg X_0 + b$, 则扩增效率 $E = 1 \times 10^{1/k} - 1$. 每个突变型重复 3 组实验, 以 DEPC H_2O 作为阴性对照.

2 结果讨论

2.1 微量肉汤稀释法检测药敏性

微量肉汤稀释法作为传统细菌药敏性检测手段被广泛应用. 本研究首先对实验室保存的 36 株念珠菌进行菌种鉴定和药敏试验, 药敏试验结果经统计和处理后见表 3. 根据临床实验室标准化协会(CLSI)发布的真菌药敏试验指南(CLSI M27, 2017 第 4 版, CLSI M60, 2020 第 2 版), 质控菌(ATCC 22019)的质控范围为 0.5 ~ 4.0 $\mu\text{g/mL}$ (FZ) 和 0.016 ~ 0.120 $\mu\text{g/mL}$ (VOR), 由表 3 中结果可知均在质控范围内.

对于白念珠菌, FZ 耐药的判读标准为 $\geq 8 \mu\text{g/mL}$, VOR 耐药的判读标准为 $\geq 1 \mu\text{g/mL}$. 22 株 (61.11%) 对两种药物均敏感, 其余 14 株 (38.89%) 对两种药物的敏感性出现了不同程度的降低, 10 株 (27.78%) 存在交叉耐药现象, 4 株 (11.11%) 单独对氟康唑耐药. FZ 的 MIC 值明显高于 VOR. 菌种鉴定结果表明在 14 株耐药念珠菌中, 耐药白念珠菌 11 株, 近平滑念珠菌 2 株, 热带念珠菌 1 株. 该药敏试验结果用于与 MMCA 检测结果进行对比分析, 以验证 MMCA 的检测效果.

表 3 耐药念珠菌药敏试验结果

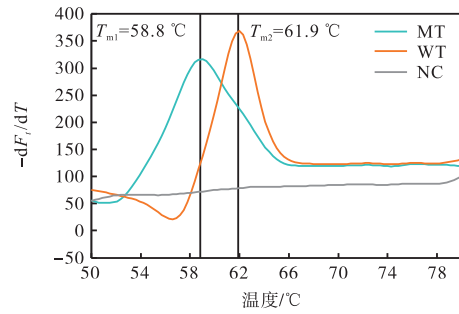
Tab.3 Drug susceptibility testing results of drug-resistant *Candida albicans*

菌株名	物种	MIC/($\mu\text{g/mL}$)					
		FZ			VOR		
ATCC 22019	近平滑	2	2	2	0.032	0.032	0.032
YB01	白念	64	64	64	1	1	1
YB03	白念	32	32	32	0.062 5	0.062 5	0.062 5
YB04	白念	64	64	64	1	1	1
YB05	白念	32	32	32	0.062 5	0.062 5	0.062 5
YB08	白念	64	64	64	4	4	4
YB09	白念	64	64	64	1	1	1
YB15	白念	64	64	64	8	8	8
YB18	白念	32	32	32	1	1	1
YB22	白念	64	64	64	1	1	1
YB23	白念	64	64	64	1	1	1
YB26	白念	64	64	64	8	8	8
YB31	近平滑	32	32	32	0.25	0.25	0.25
YB33	近平滑	16	16	16	0.125	0.125	0.125
YB35	热带	64	64	64	4	4	4

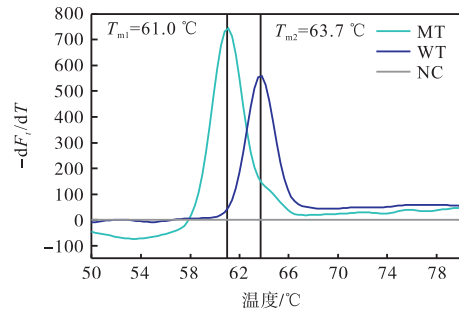
2.2 基于 MMCA 的标准突变类型检测结果

为了建立一种在同一反应管内同时区分白念珠菌 4 种突变型和野生型的 MMCA 方法, 本文设计了 4 组包含 4 种荧光基团的探针和对应的引物. 检测的核心机制为: 探针序列的设计是基于野生型的, 所以当相关区域存在突变时, 探针与待测物之间的碱基无

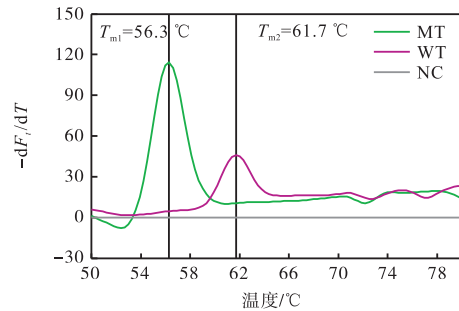
法完全配对, 结合程度相比于野生型就会有所下降, 表现在熔解曲线中就是突变型的 T_m 值低于野生型. 基于上述原理可以得到特定突变型的 T_m 值如下所述: 探针的实际 T_m 值在 56.0 ~ 65.0 $^{\circ}\text{C}$ 之间; 对应的 T_m 值在 FAM 通道中 Y132F 和野生型分别为 58.0 ~ 59.0 $^{\circ}\text{C}$ 和 61.5 ~ 62.5 $^{\circ}\text{C}$ (图 1(a)), 在 ROX 通



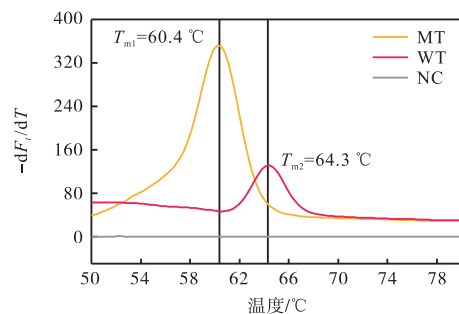
(a) Y132F 和野生型的熔解曲线



(b) K143R 和野生型的熔解曲线



(c) S279F 和野生型的熔解曲线



(d) G450E 和野生型的熔解曲线

NC 表示阴性对照; $-dF_v/dT$ 表示荧光值相对于温度的负导数

图 1 应用 MMCA 方法鉴定白念珠菌 *erg11* 突变类型
Fig.1 Identification of *erg11* mutation types in *Candida albicans* using the MMCA method

道中 K143R 和野生型分别为 60.5 ~ 61.5 °C 和 63.5 ~ 64.5 °C (图 1(b)), 在 HEX 通道中 S279F 和野生型分别为 56.0 ~ 57.0 °C 和 61.0 ~ 62.0 °C (图 1(c)), 在 CY5 通道中 G450E 和野生型分别为 60.5 ~ 61.5 °C 和 64.0 ~ 65.0 °C (图 1(d)). 由于不同荧光通道间的信号存在竞争性抑制, 所以 HEX 和 CY5 通道的信号明显弱于其他两个通道, 为了尽量避免这种抑制效果, 选取了波长差距较大的检测通道.

与仅涉及单一标记的多重 PCR 相比, 采用荧光通道和 T_m 值作为双重标记的策略有效提高了可检测的靶标数量^[26-27]. 此外, MMCA 体系中的成本消耗主要来源于荧光探针的合成费用, 而相比于双重杂交探针 (FRET) 和分子信标探针 (molecular beacon, MB), 本研究所使用的 TaqMan 水解探针易于合成. 另外 MMCA 方法有一个特殊要求是不对称扩增, 这项要求很容易满足, 并不需要额外的步骤或成本^[15].

2.3 基于 MMCA 的检测效果分析

一代测序是一种被广泛应用的测序方法, 采用双脱氧链末端终止法, 通过使用链终止剂, 即类似于正常 dNTP 的 2', 3'-双脱氧核苷三磷酸 (ddNTP), 将延伸的 DNA 链特异性终止, 从而得到序列信息. 本研究通过一代测序对上述 36 株念珠菌进行了基因型鉴定, 其中药敏试验筛选的 14 株唑类耐药念珠菌测序结果见表 4, 包含 3 例非白念珠菌, 不计入分析范围. 选择 *erg11* 基因上的 HS1、HS2、HS3 3 个热点突变区, 鉴定到 *erg11* HS1 热点区突变的菌株 10 株, 其

表 4 耐药念珠菌耐药基因型鉴定结果

Tab.4 Drug-resistant genotype identification results of *Candida albicans*

菌株名	物种	突变信息		
		<i>erg11</i> HS1	<i>erg11</i> HS2	<i>erg11</i> HS3
YB01	白念	Y132F (A395T)	—	G464S (G1390A)
YB03	白念	S137S (C411T), K143R (A428G)	—	—
YB04	白念	—	—	G450E (G1349A)
YB05	白念	K143R (A428G)	—	A434A (T1302C)
YB08	白念	S137S (C411T), Y132F (A395T)	—	V437I (G1309A)
YB09	白念	Y132F (A395T)	—	A434A (T1302C)
YB15	白念	K143R (A428G)	—	G450E (G1349A)
YB18	白念	Y132H (T394C)	—	A434A (T1302C)
YB22	白念	Y132F (A395T)	—	A434A (T1302C)
YB23	白念	Y132F (A395T)	—	G464S (G1390A), A434A (T1302C)
YB26	白念	Y132F (A395T)	—	G450E (G1349A), G464S (G1390A)
YB31	近平滑	—	—	—
YB33	近平滑	—	—	—
YB35	热带	—	—	—

中 1 例为 Y132H (突变型中还包含同义突变或对耐药性无明显影响的突变); *erg11* HS3 热点区突变的菌株 10 株, 其中 2 例探针覆盖区域之外的突变 (分别为 A434A (T1302C)、G464S (G1390A)); 未能鉴定到 *erg11* HS2 热点区突变的菌株.

对所有 36 株念珠菌的一代测序、药敏试验、MMCA 检测结果进行比对分析, 以一代测序作为金标准, 比对结果见表 5 (3 例非白念珠菌不参与分析). 从药敏试验与测序结果的对应关系来看, 本研究选取

表 5 一代测序、药敏试验、MMCA 方法结果比对

Tab.5 Comparative analysis of first-generation sequencing, antimicrobial susceptibility testing, and the MMCA method

菌株名	一代测序	药敏试验	MMCA 检测
YB01	Y132F, G464S	+	+
YB02	—	-	-
YB03	S137S, K143R	+	+
YB04	G450E	+	+
YB05	K143R, A434A	+	+
YB06	—	-	-
YB07	—	-	-
YB08	S137S, Y132F, V437I	+	+
YB09	Y132F, A434A	+	+
YB10	—	-	-
YB11	A434A	-	-
YB12	—	-	-
YB13	—	-	-
YB14	—	-	-
YB15	K143R, G450E	+	+
YB16	—	-	-
YB17	—	-	-
YB18	Y132H, A434A	+	+ (-)
YB19	—	-	-
YB20	—	-	-
YB21	—	-	-
YB22	Y132F, A434A	+	+
YB23	Y132F, A434A, G464S	+	+
YB24	—	-	-
YB25	G464S	-	-
YB26	Y132F, G450E, G464S	+	+
YB27	—	-	-
YB28	—	-	-
YB29	—	-	-
YB30	—	-	-
YB31	近平滑	+	-
YB32	—	-	-
YB33	近平滑	+	-
YB34	—	-	-
YB35	热带	+	-
YB36	—	-	-

注: 一代测序中的“—”表示无突变; 药敏试验中的“+”表示耐药菌株, “-”表示非耐药菌株; MMCA 检测中的“+”表示阳性, “-”表示阴性, “+(-)”表示阳性但不符合前文所述 4 种标准结果.

的 4 个靶点之中,存在 Y132F、K143R、G450E 突变的菌株均表现出耐药性,此类耐药机制为 *erg11* 基因的突变导致其编码的 14 α -去甲基化酶过度表达,唑类药物不能有效抑制靶酶活性,从而使真菌产生耐药性,这与文献[7]的报道结果也相符合. 药敏试验和 MMCA 的阳性均一致,分析 MMCA 方法的敏感性和一致率指标. 敏感性 = (MMCA 与一代测序一致的突变菌株数)/一代测序突变型菌株数 = 11/(11 + 2) \times 100% = 84.6%. 一致率 = (MMCA 与一代测序一致的所有菌株数)/所有菌株数 = (11 + 20)/33 \times 100% = 93.94%.

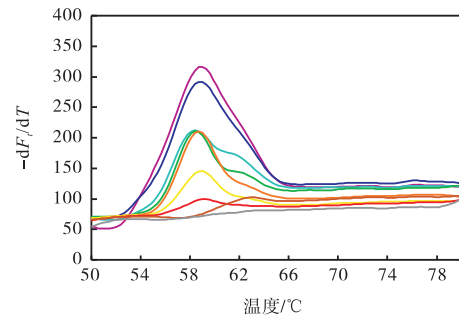
结果表明该体系的检测性能良好,灵敏度较高. 与一代测序结果相比,其中有 2 例测序显示发生突变,但 MMCA 中没有被检测到,原因是荧光探针的设计是基于相关基因的保守区域的序列, T_m 值的范围也与探针所在区域碱基的匹配程度有关,这两例的突变类型不在该体系 4 种探针的覆盖区域内,所以检测结果与野生型并无差异. 这也提醒研究者如果相关基因出现新的突变类型,可能会导致设计的探针与靶标的匹配程度发生变化,从而使 T_m 值的范围偏离预期. 所以应该关注相关基因的突变情况,根据实际更新已建立的检测标准.

如上文所述,通过与其他种类的常见念珠菌和常见曲霉属真菌的交叉 PCR 实验来评估此体系的特异性. MMCA 方法可以有效地检测和区分白念珠菌的 4 种突变型和野生型,没有观察到与其他种类念珠菌和曲霉的交叉反应. 结果表明,此体系对于这 4 种突变型和野生型的检测具有良好的特异性.

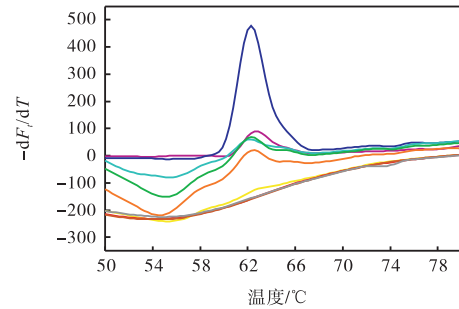
2.4 MMCA 方法的最低检测限和扩增效率

在各种以 PCR 为基础的检测手段中,最低检测限和扩增效率都是重要的评价指标,一般认为检出限 ≤ 500 拷贝数/mL、扩增效率在 90% ~ 110% 即为高灵敏度的体系. 通过 MMCA 的重复试验,得到 Y132F、K143R、S279F、G450E 的最低检出限 (LOD) 分别为 1.9×10^2 、 1.9×10^3 、 1.9×10^3 、 1.9×10^2 拷贝数/mL (图 2), 可见此检出限已可以满足绝大多数检测需求. 但此种方法仍然存在一定的局限性, 如下所示.

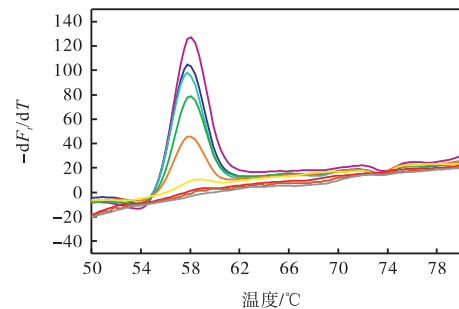
(1) MMCA 方法是一种终点检测方法,实际应用中只能实现定性检测,并不能作为定量检测的依据,这也是常规 PCR 的缺陷之一. 然而,如图 2 所示,在一定条件范围内,熔解曲线整体信号的相对大小随着模板浓度的增加而增加,但并没有呈现出简单的线性关系或者一定的函数关系. 当模板浓度超过一定范围时,熔解曲线的信号并没有像预计的一样随着模板



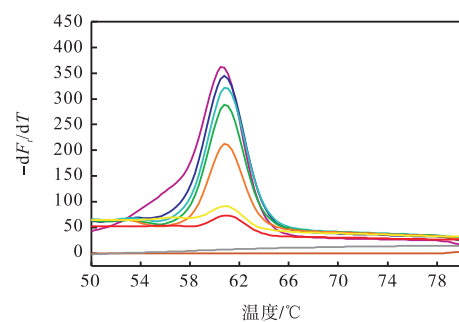
(a) Y132F



(b) K143R



(c) S279F



(d) G450E

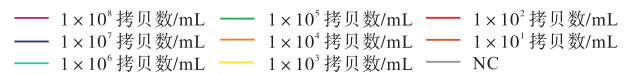


图 2 使用系列稀释模板验证多重 PCR 的敏感性 (NC 为阴性对照)

Fig.2 Validation of the sensitivity of multiplex PCR using a series of dilution templates (with NC as the negative control)

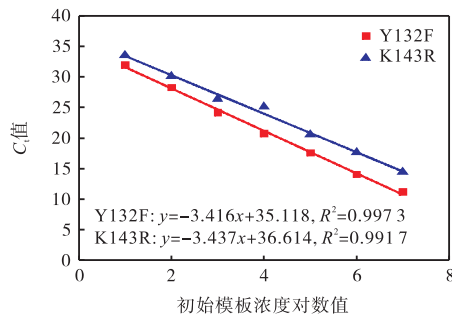
浓度的增加而增加,反而有所降低 (图 2 (b)), 可能的原因是,在反应进行到平台期后,互补的 DNA 双链迅速相互退火并退出反应,而多余的单链 DNA 可以继续与引物反应,进而转换成双链形式,即不对称

PCR 中的单链 DNA 浓度在反应进行到平台期后可能会降低,这样就导致了熔解曲线整体信号的异常降低^[28].

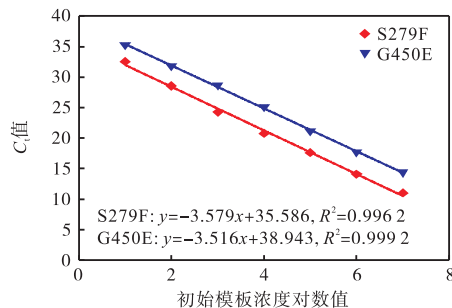
(2)与常规的 qPCR 相比,该方法增加了额外的熔解曲线分析步骤,这也就导致了单次反应分析时间的增加.此外,MMCA 方法的另一个限制是当反应体系中包含过多的荧光探针时,可能会出现交叉干扰从而导致检测灵敏度降低的情况.在实际应用中需要进行体系优化.

(3)此方法的重点之一在于引物和探针的设计是否合理,而探针设计的复杂性来源于二级结构的存在以及荧光信号之间的交叉干扰,尤其是在进行多重检测时,由于探针数量较多,这些因素对探针的设计和筛选工作带来了不少困扰.

此外,对于低浓度的样本,探针的质量直接影响到其是否能被有效检测.基于这种局限性,未来可以通过尝试不同的探针类型(如分子信标探针)来尽可能提高 MMCA 方法的精确度.



(a) Y132F 和 K143R



(b) S279F 和 G450E

图3 不同浓度突变型的扩增情况

Fig.3 Amplification profiles of mutation types at different concentrations

本研究将梯度稀释后的质粒作为模板检测其 C_t 值,然后以质粒浓度的对数和 C_t 值为关系进行线性回归分析.以 Y132F 为例,得到线性回归曲线解析式为 $y = -3.416x + 35.118$, $R^2 = 0.9973$,置信水平 95%,则得到扩增效率 $E = 1 \times 10^{1/3.416} - 1 = 0.9622$.同理可得到此体系对于 4 种突变型靶点的扩增效率分别为

96.22%、95.41%、90.29%、92.49% (图 3),可见扩增效率也符合预期.

3 结 语

近年来,侵袭性真菌病对人类健康的威胁日益严重,而耐药性白念珠菌的日益增加进一步加重了这种风险,其中单核苷酸多态性(SNP)是导致耐药表型变化的很重要的原因.所以对突变类型进行高效准确的检测和鉴别成为了重要前提.本研究通过药敏试验建立了耐药表型和耐药基因型之间的关联;然后利用不对称 PCR 原理与熔解曲线相结合的方法,通过不同突变型表现出的不同 T_m 值实现对 WT 和 MT 的区分;最后以一代测序结果作为金标准,对 MMCA 检测方法的效果进行验证分析.实现了在同一反应管内准确鉴定白念珠菌的野生型和 4 种突变型.该方法为白念珠菌感染的早期诊断和指导用药提供了新方法,有望通过增加检测通道和荧光探针的方式进一步拓展分子检测的靶标范围,提升效率.

参考文献:

- [1] 中国医师协会血液科医师分会,中国侵袭性真菌感染工作组.血液病/恶性肿瘤患者侵袭性真菌病的诊断标准与治疗原则(第六次修订版)[J].中华内科杂志,2020,59(10):754-763.
Chinese Association Hematologists, Chinese Invasive Fungal Infection Working Group. The Chinese guidelines for the diagnosis and treatment of invasive fungal disease in patients with hematological disorders and cancers (the 6th revision) [J]. Chinese Journal of Internal Medicine, 2020, 59(10): 754-763 (in Chinese).
- [2] 中国成人念珠菌病诊断与治疗专家共识组.中国成人念珠菌病诊断与治疗专家共识[J].中华内科杂志,2020,59(1):5-17.
Chinese Adult Candidiasis Diagnosis and Management Expert Consensus Group. Chinese consensus on the diagnosis and management of adult candidiasis [J]. Chinese Journal of Internal Medicine, 2020, 59(1): 5-17 (in Chinese).
- [3] Guo F M, Yang Y, Kang Y, et al. Invasive candidiasis in intensive care units in China: A multicentre prospective observational study [J]. Journal Antimicrobial Chemotherapy, 2013, 68(7): 1660-1668.
- [4] Liu J Y, Wei B, Wang Y, et al. The H741D mutation in Tac1p contributes to the upregulation of *CDR1* and *CDR2* expression in *Candida albicans* [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2020, 51(4): 1553-1561.
- [5] Li W J, Liu J Y, Shi C, et al. FLO8 deletion leads to azole resistance by upregulating *CDR1* and *CDR2* in *Candida albicans* [J]. Research in Microbiology,

- 2019, 170 (6/7): 272-279.
- [6] Wall G, Montelongo-Jauregui D, Bonifacio B V, et al. *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: Contributions to pathogenesis[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2019, 52: 1-6.
- [7] Ge S H, Wan Z, Li J, et al. Correlation between azole susceptibilities, genotypes, and *ERG11* mutations in *Candida albicans* isolates associated with vulvovaginal candidiasis in China[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(8): 3126-3131.
- [8] Löffler J, Kelly S L, Hebart H, et al. Molecular analysis of *cyp51* from fluconazole-resistant *Candida albicans* strains[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, 151(2): 263-268.
- [9] Marichal P, Koymans L, Willemsens S, et al. Contribution of mutations in the cytochrome P450 14 α -demethylase (*Erg11p*, *Cyp51p*) to azole resistance in *Candida albicans*[J]. *Microbiology (Reading)*, 1999, 145(10): 2701-2713.
- [10] Perea S, López-Ribot J L, Kirkpatrick W R, et al. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001, 45(10): 2676-2684.
- [11] Morio F, Loge C, Besse B, et al. Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* *Erg11* protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: New substitutions and a review of the literature[J]. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2010, 66(4): 373-384.
- [12] Otasevic S, Momcilovic S, Stojanovic N M, et al. Non-culture based assays for the detection of fungal pathogens[J]. *Journal de Mycologie Médicale*, 2018, 28(2): 236-248.
- [13] Liao Y, Wang X, Sha C, et al. Combination of fluorescence color and melting temperature as a two-dimensional label for homogeneous multiplex PCR detection[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(7): e76.
- [14] Ruhnke M. Antifungal stewardship in invasive *Candida* infections[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2014, 20(Suppl 6): 11-18.
- [15] Huang Q Y, Liu Z Z, Liao Y Q, et al. Multiplex fluorescence melting curve analysis for mutation detection with dual-labeled, self-quenched probes[J]. *PloS One*, 2011, 6(4): e19206.
- [16] Gao L, Liu Y H, Sun M N, et al. Rapid detection of α -thalassaemia alleles of $-\text{SEA}/$, $-\alpha^{3.7}/$ and $-\alpha^{4.2}/$ using a dual labelling, self-quenching hybridization probe/melting curve analysis[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2015, 29(6): 438-441.
- [17] Huang Q Y, Wang X D, Tang N, et al. Simultaneous genotyping of α -thalassaemia deletional and nondeletional mutations by real-time PCR-based multicolor melting curve analysis[J]. *Journal of Molecular Diagnostics*, 2017, 19(4): 567-574.
- [18] Hu S Y, Quan S M, Li Q G, et al. Application and evaluation of a probe melting analysis-based assay for detection of Isoniazid-resistant mutations in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Chinese Journal of Laboratory Medicine*, 2011, 34(10): 935-939.
- [19] Kong X M, Xu Y, Gao P, et al. Rapid detection of the irinotecan-related *UGT1A1*^{*28} polymorphism by asymmetric PCR melting curve analysis using one fluorescent probe[J]. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2022, 36(8): e24578.
- [20] Wang X D, Hong Y J, Cai P H, et al. Rapid and reliable detection of nonsyndromic hearing loss mutations by multicolor melting curve analysis[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 42894.
- [21] Xia Z M, Chen P, Tang N, et al. Rapid detection of G6PD mutations by multicolor melting curve analysis[J]. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2016, 119(1/2): 168-173.
- [22] Wang C T, You Z Q, Fu J J, et al. Application of metagenomic next-generation sequencing in the diagnosis of pulmonary invasive fungal disease[J]. *Frontiers Cellular Infection Microbiology*, 2022, 12: 949505.
- [23] Heckler I, Sabalza M, Bojmehrani A, et al. The need for fast and accurate detection of dermatomycosis[J]. *Medical Mycology*, 2023, 61(5): myad037.
- [24] Mielliet W R, Almeida S T, Trzcinski K, et al. *Streptococcus pneumoniae* carriage studies in adults: Importance, challenges, and key issues to consider when using quantitative PCR-based approaches[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1122276.
- [25] Narayanan A, Selvakumar P, Siddharthan R, et al. *ClalD*: A rapid method of clade-level identification of the multidrug resistant human fungal pathogen *Candida auris*[J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(2): e0063422.
- [26] Wen X Z, Chen Q, Yin H L, et al. Rapid identification of clinical common invasive fungi via a multi-channel real-time fluorescent polymerase chain reaction melting curve analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99(7): e19194.
- [27] Valero C, Cruz-Villar L D L, Zaragoza Ó, et al. New panfungal real-time PCR assay for diagnosis of invasive fungal infections[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2016, 54(12): 2910-2918.
- [28] Botezatu I V, Nechaeva I O, Stroganova A M, et al. Optimization of melting analysis with TaqMan probes for detection of KRAS, NRAS, and BRAF mutations[J]. *Analytical Biochemistry*, 2015, 491: 75-83.

(责任编辑: 田 军)