

科玛嘉显色培养和 API20C AUX 鉴定酵母样真菌的临床价值

赵琳琳, 王江元, 艾清[△] (吉林大学第一医院二部检验科, 长春 130031)

【摘要】目的 探讨科玛嘉显色培养和 API20C AUX(简称 API20C)鉴定酵母样真菌的对比研究。**方法** 收集该院微生物室 2012~2013 年无菌体液标本分离出的酵母样真菌 121 株,对所有菌株进行科玛嘉显色培养鉴定和 API20C 鉴定。通过基因序列分析法将真菌准确鉴定到种。**结果** 显色培养基除 13 株无法鉴定、8 株鉴定错误外其余菌株均鉴定正确,正确率为 92.59%(100/108)。API20C 除 5 株鉴定错误、4 株无鉴定结果外其余菌株均鉴定正确,正确率为 92.56%(112/121);其中对显色培养能鉴定菌株的正确率为 95.37%(103/108),对显色培养无法鉴定菌株的正确率为 69.23%(9/13)。**结论** 科玛嘉显色培养和 API20C 方法对大多数临床分离菌株能够准确鉴定到种,API20C 对少见真菌和显色不典型菌种的鉴定有待进一步验证。

【关键词】 酵母菌; API20C AUX; 显色培养; 序列分析; DNA

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.11.044 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)11-1602-02

近年来,由于广谱抗菌药物的不规范使用、免疫抑制剂的广泛应用,真菌引起的感染逐年上升^[1-2]。有报道显示白色酵母样真菌的药物敏感性高于非白色酵母样真菌,不同菌种的酵母样真菌对抗真菌药物的敏感性和耐药性不同,所以真菌的准确鉴定对指导临床用药尤为重要^[3-5]。临床工作中常用的真菌鉴定方法有科玛嘉显色培养法、API20C AUX(简称 API20C)等生化反应鉴定卡,本研究以分子生物学方法为“金标准”,对科玛嘉显色培养和 API20C 鉴定酵母样真菌的能力进行评估^[6-7]。报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集该院微生物室 2012 年 1 月至 2013 年 12 月无菌体液和血液标本中分离出的酵母样真菌共 121 株(已剔除同一患者同一部位或不同部位标本反复检出的相同菌株),干滤纸片法-80℃保存。

1.2 质控菌株 选取 3 株标准菌株作为质控菌株:白色假丝酵母菌(ATCC90028)、光滑球拟假丝酵母菌(ATCC90030)、热带假丝酵母菌(ATCC1463),标准菌株均购自卫生部临床检验中心。

1.3 仪器与试剂 LD5-10B 低温离心机(美国赛默飞世尔科技),T-100 PCR 仪(美国 Bio-rad 公司),BC-J80S 隔水式恒温培养箱(上海博讯医疗设备厂)。PCR 扩增试剂盒(上海生工),科玛嘉显色培养基(法国梅里埃),API20C AUX 鉴定卡(法国梅里埃)。

1.4 真菌显色培养鉴定 所有菌株接种于沙氏培养基后 36℃培养 24 h,重复 1 次上述操作,使真菌充分复苏并分离出单个菌落。挑取沙氏培养基上的单个菌落接种于科玛嘉显色培养基,36℃培养 72 h 后判定结果(每 24 h 观察 1 次显色情况):绿色、翠绿色菌落为白色假丝酵母菌;蓝灰色、铁灰色菌落为热带假丝酵母菌;粉红色模糊有微毛菌落为克柔假丝酵母菌;紫红色光滑菌落为光滑球拟假丝酵母菌;显色不典型和白色菌落为无法鉴定的其他假丝酵母菌。

1.5 真菌 API20C 鉴定 配制所有菌株的菌悬液(2.0 Mac),取 100 μL 菌悬液至 API C Medium 培养基,混均后加入 API20C 真菌鉴定试剂条,29℃培养 48~72 h 后与阴性孔对照,阅读生化谱。生化谱输入 API20C 3.0 系统进行结果判读:鉴定百分率≥80%且 T≥0 为“可接受的鉴定”,鉴定百分率<80%为“无鉴定结果”。

1.6 分子生物学鉴定 采用直接煮沸法提取真菌 DNA,选取真菌通用引物 ITS1、ITS4 进行 PCR 扩增^[6-7]。PCR 体系为 50 μL;PCR Master 25 μL,模板 DNA 2 μL,上、下游引物各 2 μL,无菌双蒸水至 50 μL。PCR 扩增条件:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,56℃退火 30 s,72℃延伸 60 s,35 个循环;最后 72℃延伸 8 min。DNA 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后送上海生工测序,测序结果提交 GenBank 数据库进行序列分析,从而将所有菌株准确鉴定到种。

2 结果

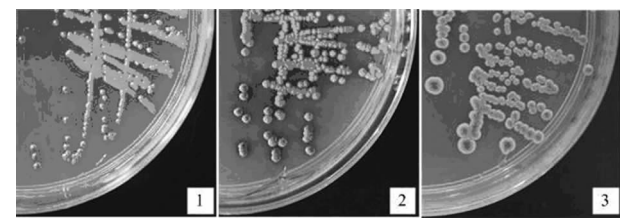
2.1 质量控制 3 株标准菌株白色假丝酵母菌(ATCC 90028)、光滑球拟假丝酵母菌(ATCC 90030)、热带假丝酵母菌(ATCC 1463)通过科玛嘉显色培养、API20C、基因序列分析法均能准确鉴定至种。见图 1。

2.2 显色培养鉴定结果 显色培养基仅能鉴定 4 种常见的酵母样真菌,有 13 株无法鉴定,鉴定率为 89.26%(108/121),与国内有关文献报道一致^[8]。其中 108 株菌株的鉴定结果中有 8 株与基因序列分析结果不符,正确率为 92.59%(100/108)。

2.3 API20C 鉴定结果 13 株显色无法鉴定菌株经 API20C 鉴定,除 1 株近平滑假丝酵母菌和 2 株葡萄牙假丝酵母菌鉴定错误、1 株白色假丝酵母菌无鉴定结果外,其余菌株均鉴定正确,正确率为 69.23%(9/13)。108 株显色鉴定至种菌株经 API20C 鉴定,除 1 株白色假丝酵母菌和 1 株热带假丝酵母菌鉴定错误、1 株季也蒙假丝酵母菌和 2 株热带假丝酵母菌无鉴定结果外,其余菌株均鉴定正确,正确率为 95.37%(103/108)。API20C 的总正确率为 92.56%(112/121),接近国内相

[△] 通讯作者, E-mail: 851661865@qq.com。

关文献报道^[9]。见表 1。



注:1 表示白色假丝酵母菌(ATCC 90028);2 表示热带假丝酵母菌(ATCC 1463);3 表示光滑球拟假丝酵母菌(ATCC 90030)。

图 1 标准菌株显色结果

表 1 121 株真菌基因序列分析与表型鉴定结果比较

基因序列分析	显色培养鉴定	API20C 鉴定
白色假丝酵母菌(58)	白色假丝酵母菌	白色假丝酵母菌
白色假丝酵母菌(1)	无法鉴定	无法鉴定
白色假丝酵母菌(1)	白色假丝酵母菌	新型隐球菌
光滑球拟假丝酵母菌(40)	光滑球拟假丝酵母菌	光滑球拟假丝酵母菌
光滑球拟假丝酵母菌(2)	无法鉴定	光滑球拟假丝酵母菌
热带假丝酵母菌(2)	光滑球拟假丝酵母菌	无法鉴定
热带假丝酵母菌(1)	热带假丝酵母菌	无名假丝酵母菌
近平滑假丝酵母菌(6)	无法鉴定	近平滑假丝酵母菌
近平滑假丝酵母菌(1)	无法鉴定	无名假丝酵母菌
近平滑假丝酵母菌(1)	光滑球拟假丝酵母菌	近平滑假丝酵母菌
葡萄牙假丝酵母菌(1)	光滑球拟假丝酵母菌	葡萄牙假丝酵母菌
葡萄牙假丝酵母菌(1)	热带假丝酵母菌	葡萄牙假丝酵母菌
葡萄牙假丝酵母菌(1)	无法鉴定	浅白隐球菌
葡萄牙假丝酵母菌(1)	无法鉴定	新型隐球菌
季也蒙假丝酵母菌(1)	光滑球拟假丝酵母菌	无法鉴定
季也蒙假丝酵母菌(1)	无法鉴定	季也蒙假丝酵母菌
阿萨希丝孢酵母(1)	白色假丝酵母菌	阿萨希丝孢酵母
奥默毕赤酵母(1)	热带假丝酵母菌	奥默毕赤酵母

注:括号内为菌株数。

3 讨 论

本研究以分子生物学方法鉴定结果为金标准,对科玛嘉显色培养和 API20C 的鉴定能力进行评估。从菌种库中选取的少见菌种的菌株比例常较临床分离菌株高,这与临床实际情况不符。本研究菌株收集 2012 年 1 月至 2013 年 12 月临床无菌体液和血液标本中分离出的不同患者的全部酵母样真菌,在菌种构成上与临床符合,因此得出的结果更能反映显色培养和 API20C 在临床应用中的价值。

显色培养基鉴定结果显示,8 株菌株显色培养错误鉴定,显色培养可鉴定菌种内的 2 株常见菌株无法鉴定,可能原因:(1)个人颜色辨别能力不同。如蓝灰色、蓝紫色、紫红色辨别的差异。(2)常见菌株在科玛嘉显色培养基上显色不典型。如本组显白色的白色假丝酵母菌和显橘红色的光滑球拟假丝酵母菌,这 2 株菌株在显色培养基可鉴定至菌种,但显色培养基均

无法鉴定。(3)少见菌株显出与常见菌株相似的颜色。如 1 株葡萄假丝酵母菌和 1 株季也蒙假丝酵母菌均显示紫红色,易错误鉴定为光滑球拟假丝酵母菌;1 株阿萨希丝孢酵母显出绿色,易错误鉴定为白色假丝酵母菌。API20C 鉴定结果表明,有 9 株菌株鉴定错误或无鉴定结果,其中包括 6 株常见菌株(2 株白色假丝酵母菌、3 株热带假丝酵母菌和 1 株近平滑假丝酵母菌),原因可能为:(1)广谱抗菌药物、免疫抑制剂的应用使菌株的生化反应不再典型。(2)菌株的生长状态不同,生化反应结果不同。科玛嘉显色培养基鉴定正确率为 92.59%,API20C 鉴定酵母样真菌的总正确率为 92.56%,说明科玛嘉显色培养基和 API20C 能够将大多数临床分离菌株准确鉴定到种。但是临床工作中对显色培养可以鉴定的菌株不再进行 API20C 的鉴定,所以应该更加注重 API20C 对显色无法鉴定菌株的鉴定能力的评估。本研究中显色无法鉴定的 13 株菌株经 API20C 鉴定,3 株鉴定错误,1 株无鉴定结果,鉴定正确率仅为 69.23%(9/13),低于 API20C 的总鉴定正确率。但本研究中显色无法鉴定菌株标本量少,所以 API20C 对临床分离的显色无法鉴定的少见真菌和显色不典型菌株的鉴定能力有待进一步验证。

参考文献

[1] 钟明媚,张琳,张金,等.重症监护病房患者侵袭性真菌感染现状分析[J].安徽医药,2014,23(7):1258-1261.

[2] 韦仕高,韦忠理.院内真菌感染现状分析[J].中国医学创新,2010,7(14):38-39.

[3] 杨虹,董晶,吴波,等.近两年该院浅部真菌分布和深部酵母样真菌药敏情况分析研究[J].中国实验诊断学,2014,12(6):916-918.

[4] 马红霞,周运恒,范列英,等.725 株痰标本分离的酵母样真菌培养结果与药敏试验分析[J].中华医院感染学杂志,2010,20(22):3618-3620.

[5] 蔡卫洪.520 株酵母样真菌菌种分布及药敏结果分析[J].检验医学,2010,25(9):745-746.

[6] 窦江涛,肖盟,范欣,等.BD PhoenixTM 酵母菌鉴定板对临床分离酵母菌鉴定能力的评估[J].中国真菌学杂志,2013,8(5):281-284.

[7] 陈中举,孙自镛,李丽,等.应用 rDNA ITS 区测序评估 API20C AUX 及 CHROMagar 对酵母菌的鉴定[J].现代检验医学杂志,2013,28(5):68-71.

[8] 耿佳靖,袁梁,鲁辛辛.18S rRNA 基因序列分析在临床常见酵母样真菌鉴定中的应用[J].中华检验医学杂志,2009,32(6):644-648.

[9] 范欣,王贺,吴玥,徐英春,等.以分子生物学鉴定结果为“金标准”评估 Rapid ID Yeast Plus 及 API20C AUX 对酵母样真菌的鉴定效能[J].中国真菌学杂志,2013,8(5):274-280.