

念珠菌血症小鼠模型的建立及血清标志物初探

崔嘉玥¹ 麻雅婷² 杨晨³ 陈汐濛¹ 王驰³ 杨继勇³ 王成彬¹

¹温州医科大学检验医学院、生命科学学院,温州 325035; ²南开大学医学院,天津 300192; ³解放军总医院第一医学中心医学检验中心,北京 100853

通信作者:王成彬, Email:wangcb301@126.com

【摘要】 目的 建立念珠菌血症小鼠模型,寻找辅助诊断念珠菌血症的差异多肽峰。方法 SPF级ICR雄性小鼠170只,体质量27~30g,根据随机数字表法将小鼠完全随机分为白色念珠菌感染组($n=80$)、近平滑念珠菌感染组($n=80$)和对照组($n=10$),通过尾静脉注射的方法建立念珠菌血症小鼠模型。利用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱检测模型小鼠血清多肽谱,选择差异较为明显的多肽峰建立诊断模型。结果 比较白色念珠菌感染组和对照组共得到65个差异多肽峰,组合质荷比(m/z)为1 100.4、1 581.0、3 808.0这3个差异多肽峰建立诊断模型,敏感度为95.24%(40/42),特异度为90.63%(29/32),准确率为93.24%(69/74),ROC曲线下面积为0.972(95%CI:0.941~1.000);比较近平滑念珠菌感染组和对照组共得到73个差异多肽峰,组合质荷比(m/z)为1 433.2、1 148.5、4 093.5、4 522.2、8 140.9、8 234.6这6个差异多肽峰建立诊断模型,敏感度为95%(38/40),特异度为81.25%(26/32),准确率为88.89%(64/72),ROC曲线下面积为0.953(95%CI:0.903~1.000)。比较白色念珠菌感染组和近平滑念珠菌感染组,共得到78个差异多肽峰,组合质荷比(m/z)为2 736.9、8 091.5、8 153.7这3个差异多肽峰建立诊断模型,区分白色念珠菌感染和近平滑念珠菌感染的准确率为98.78%(81/82)。结论 通过念珠菌血症小鼠模型筛选的差异多肽峰有利于寻找辅助念珠菌血症诊断的血清标志物,为临床早期诊断及合理用药提供了依据。

【关键词】 念珠菌血症; 基质辅助激光解析电离; 多肽指纹图谱; 诊断模型; 血清标志物
DOI:10.3760/cma.j.cn112137-20191128-02589

Establishment of mouse model and preliminary screening of serum biomarkers for Candidemia

Cui Jiayue¹, Ma Yating², Yang Chen³, Chen Ximeng¹, Wang Chi³, Yang Jiyong³, Wang Chengbin¹

¹School of Laboratory and Life Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China; ²School of Medicine, Nankai University, Tianjin 300192, China; ³Center of Laboratory Medicine, the First Medicine Center of PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: Wang Chengbin, Email:wangcb301@126.com

【Abstract】 Objective To establish mouse models of Candidemia, and investigates statistically significant polypeptide peaks to provide auxiliary diagnosis of this disease. **Methods** A total of 170 specific pathogen free adult male ICR mice with body mass of 27–30 g were completely randomly divided into *Candida albicans* infection group ($n=80$), *Candida parapsilosis* infection group ($n=80$) and the normal control group ($n=10$), and the two kinds of Candidemia mouse models were established via tail vein injection. The serum samples were analyzed by Matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry and relevant software, and the polypeptide peaks with significant differences were screened to establish diagnostic models. **Results** A total of 65 differential polypeptide peaks were obtained compared with the *Candida albicans* infection group and the normal control group. Combined with m/z 1 100.4, 1 581.0, 3 808.0 as differential polypeptide peaks to established the diagnostic model, the sensitivity was 95.24%(40/42), the specificity was 90.63%(29/32), the accuracy rate was 93.24%(69/74), and the AUC value of the ROC curve was 0.972(95%CI: 0.941–1.000). A total of 73 differential polypeptide peaks were obtained compared with *Candida parapsilosis* infection group and the normal control group. Combined with m/z 1 433.2, 1 148.5, 4 093.5, 4 522.2, 8 140.9, 8 234.6 as differential polypeptide peaks to established the diagnostic model, the sensitivity was 95%(38/40), the specificity was 81.25%(26/32), the accuracy rate was

88.89%(64/72), and the AUC value of the ROC curve was 0.953(95%CI:0.903–1.000). A total of 78 differential polypeptide peaks were obtained compared with *Candida albicans* infection group and *Candida parapsilosis* infection group. Combined with m/z 2 736.9, 8 091.5, 8 153.7 as differential polypeptide peaks to established the diagnostic model, the accuracy of distinguishing *C. albicans* infection from *C. parapsilosis* infection was 98.78%(81/82). **Conclusions** Successfully screened the differential polypeptides and established the related diagnostic models. Which is helpful to find serum biomarkers for the auxiliary diagnosis of Candidemia, and provides a basis for the early diagnosis and the rational use of drugs.

【Key words】 Candidemia; Matrix-assisted laser desorption-ionization; Peptide fingerprinting; Diagnostic model; Serum biomarkers

DOI:10.3760/cma.j.cn112137-20191128-02589

近年来,由于免疫抑制剂和广谱抗生素的广泛应用,静脉置管和创伤性诊疗技术的广泛开展,念珠菌血症的发病率持续增加^[1-2]。2018年中国医院侵袭性真菌耐药监测网(CHIF-NET)报告^[3]显示,2009年8月1日至2014年7月31日,来自中国27个省65家三级综合医院的8 829例念珠菌分离株中,共鉴定出32种念珠菌属,其中白色念珠菌检出率最高,占44.9%;其次为近平滑念珠菌,占20.0%。这两者也被认为是最常见的导致念珠菌血症的菌种^[2]。念珠菌血症病死率高^[4],且预后与有无及时合理的抗菌药物治疗有关^[5-7],因此,念珠菌血症的早期诊断至关重要,但临床上缺乏对念珠菌血症的快速有效诊断^[8]。另一方面,念珠菌血症患者血液标本收集困难,难以开展相关研究,而Hohl^[9]研究表明,小鼠是最常用的模拟临床真菌感染的动物模型,因此,本实验应用较为成熟的基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)^[10],选择白色念珠菌和近平滑念珠菌标准菌株建立念珠菌血症小鼠模型,寻找有差异的多肽峰,构建相应的诊断模型,为念珠菌血症的早期诊断提供新思路。

材料与与方法

1. 菌株及实验动物:白色念珠菌标准菌株(ATCC90028)、近平滑念珠菌标准菌株(ATCC22019)由解放军总医院第一医学中心医学检验中心微生物组惠赠。实验动物为SPF级ICR雄性小鼠200只,体质量27~30 g,购自维通利华(北京)实验动物科技有限公司。本研究通过解放军总医院伦理委员会批准(伦审第S2018-207-02号)。

2. 仪器与试剂:沙堡氏真菌培养基由微生物室提供,沙氏液体培养基、磷酸盐缓冲液(PBS)、离心管等购自北京索莱宝生物科技有限公司。小鼠血常规采用Sysmex 800i血细胞分析仪测定,台式冷

冻离心机购自美国Thermo公司,恒温摇床购自苏州培英实验设备有限公司,生化培养箱购自上海博迅实业有限公司医疗设备厂。MALDI-TOF MS质谱仪、蛋白多肽提取试剂盒及配套软件均购自北京毅新博创生物科技有限公司。生物安全柜AC2-6S1来自新加坡ESCO公司。

3. 菌种复苏与活化:在生物安全柜内将白色念珠菌、近平滑念珠菌标准菌株分别三区划线接种在沙堡氏培养基上,置于30℃恒温培养箱中传代培养48 h,观察生长情况;取单个菌落置于沙氏液体培养基中,30℃,恒温增菌16~24 h。

4. 菌液的配置:将上述菌液5 000 rpm离心10 min,弃上清,用无菌PBS重悬,重复操作3次。利用牛鲍氏计数板确定菌液浓度。

5. 半数致死量(LD₅₀)的测定:取30只SPF级ICR雄性小鼠,根据随机数字表法分为5组,每组6只。将计数后的菌液倍比稀释为5个浓度梯度,分别经尾静脉注射小鼠,注射剂量为0.1 ml/10 g。连续观察7 d,每天记录小鼠精神状态、行为活动、饮食和死亡等情况。按Karber法计算LD₅₀。

6. 小鼠模型的建立:取170只SPF级ICR雄性小鼠,根据随机数字表法将小鼠分为白色念珠菌感染组($n=80$)、近平滑念珠菌感染组($n=80$)和对照组($n=10$)。感染组以1/2 LD₅₀浓度,按0.1 ml/10 g注射小鼠尾静脉,对照组小鼠注射等量无菌PBS。感染组按相同方法又各分为8组,每组10只,分别在注射后的1、3、6、12、24、48、96、168 h处死小鼠,收集样本。

7. 样本采集与处理:感染组小鼠腹腔注射水合氯醛,待小鼠麻醉后进行眼球取血,采集血标本。其中20 μ l用于白细胞计数,100 μ l用毛细管吸取后涂于沙堡氏真菌培养基作病原菌鉴定;剩余部分在4℃冰箱中放置过夜后5 000 rpm离心20 min,所得血清分装冻存于-80℃冰箱待用。脊椎脱白法

处死小鼠,无菌条件下解剖取肝、肺、肾等内脏组织,观察其大小、色泽及有无肉眼可见病灶;内脏组织一部分放入 10% 甲醛中固定,后按照操作规范进行苏木精-伊红(HE)染色,一部分放入 -80°C 冰箱中冻存,以备后续实验所需。每天观察小鼠状态,记录小鼠体质量。

8. 血清多肽的提取:按照多肽提取试剂盒(SPE-C100)中检验方法进行操作。

9. MALDI-TOF MS 质谱分析:将 $1\ \mu\text{l}$ 多肽提取液涂在 ClinTOF-2 靶板上,待干燥后将 $1\ \mu\text{l}$ 基质覆于样品上,室温干燥后上机检测;使用 BioexplorerTM 软件进行数据分析,质谱数据均经归一化、基线校正和平滑处理,采用径向基函数(RBF)神经网络算法建立相应诊断模型。

10. 统计学分析:使用 SPSS 20.0 处理数据。正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 描述,两组间数据比较采用 *t* 检验;对诊断模型效能作受试者工作特征曲线(ROC)分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. LD_{50} 测定结果:计算得到白色念珠菌对小鼠的 LD_{50} 值为 2×10^6 CFU/ml。近平滑念珠菌各浓度感染小鼠均无死亡,但注射最高浓度菌液的小鼠有较明显症状,故建模时采用最高菌液浓度 2×10^8 CFU/ml。

2. 小鼠感染后一般情况和体质量变化:两组小鼠均出现不同程度的精神萎靡、闭眼、抱团、立毛、活动变缓、饮食减少等病理症状。白色念珠菌组小鼠在感染后 1 d 体质量出现下降,且随时间延长呈下降趋势;而近平滑念珠菌组在感染后 1 d 体质量降至最低,之后回升至正常水平(图 1)。

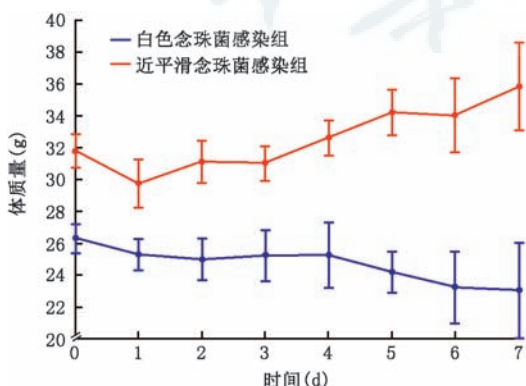


图 1 两组小鼠感染后体质量变化曲线图

3. 白细胞计数结果:两组小鼠白细胞计数均呈先下降后升高的趋势。其中,白色念珠菌组小鼠白

细胞计数先小幅度下降后又大幅度上升,且在实验过程中持续升高;而近平滑念珠菌组小鼠白细胞计数在注射后 6 h 降至最低,后逐渐回升,最终趋于正常水平(图 2)。

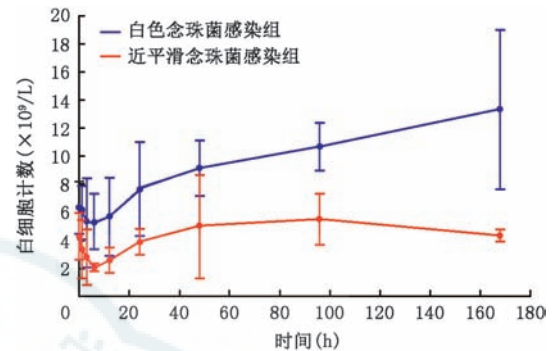


图 2 两组小鼠感染后白细胞计数变化曲线图

4. 病原菌鉴定结果:经 30°C 培养 48 h 后,沙堡氏真菌培养基上长出奶油色类酵母型菌落,经 VITEK-MS 质谱鉴定证明建模所用菌液分别为白色念珠菌和近平滑念珠菌。

5. 小鼠脏器组织学观察:白色念珠菌组小鼠感染后 12、24、48 h 的脏器 HE 染色结果如图 3 所示。肝脏肝窦结构模糊,内皮细胞增大;肺脏肺泡扩张,肺间隔充血;肾脏肾小管管腔扩大,肾小球结构不清晰,且肝、肺、肾均有炎细胞浸润。

6. 血清多肽谱的检测结果:通过 BioexplorerTM 软件分析,白色念珠菌感染组和正常对照组在相对分子质量 1 000~10 000 范围内共检测到 65 个有显著差异的多肽峰($P < 0.01$);近平滑念珠菌感染组和正常对照组共检测到 73 个有显著差异的多肽峰($P < 0.01$);白色念珠菌感染组和近平滑念珠菌感染组共检测到 78 个有显著差异的多肽峰($P < 0.01$)。如图 4 所示。其中,质荷比(m/z)为 2 709.3、8 095.3、8 158.4、8 168.0 这 4 个差异多肽峰在两组感染小鼠中共同出现。

7. 诊断模型的构建及验证:选择差异较明显的 m/z 为 1 100.4、1 581.0、3 808.0 这 3 个多肽峰建立白色念珠菌诊断模型,敏感度为 95.24%(40/42),特异度为 90.63%(29/32),诊断准确率为 93.24%(69/74)。选择差异较明显的 m/z 为 1 433.2、1 148.5、4 093.5、4 522.2、8 140.9、8 234.6 这 6 个多肽峰建立近平滑念珠菌诊断模型,敏感度为 95%(38/40),特异度为 81.25%(26/32),诊断准确率为 88.89%(64/72)。ROC 曲线分析显示,两种菌株诊断模型的曲线下面积分别为 0.972(95%CI:0.941~1.000)、0.953

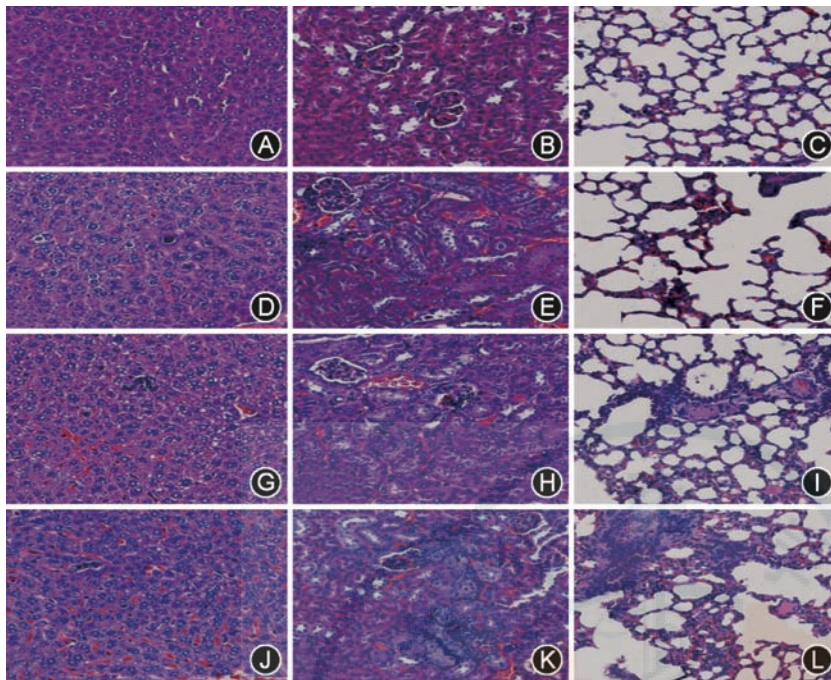
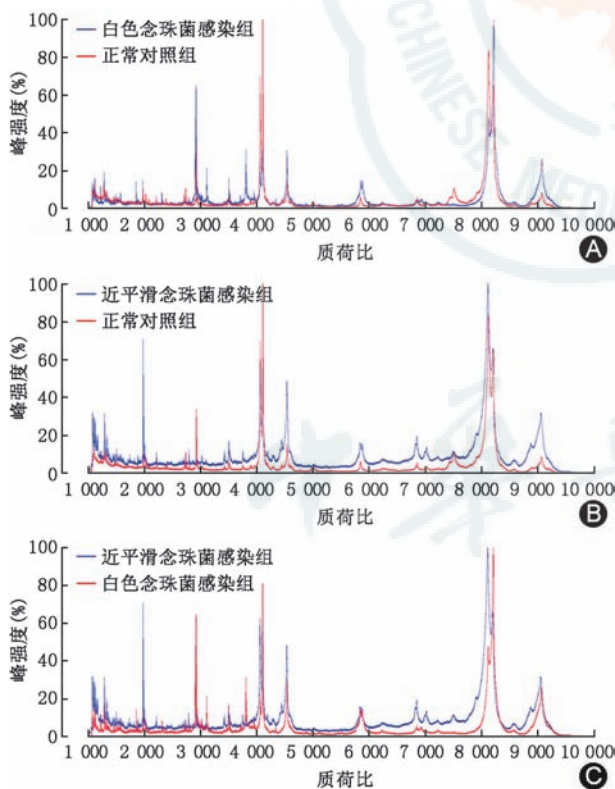


图3 小鼠脏器组织学改变(HE染色 ×10) A~C图:健康小鼠肝、肾、肺正常形态;D~F图:感染白色念珠菌 12 h后小鼠肝、肾、肺形态;G~I图:感染 24 h后小鼠肝、肾、肺脏形态;J~L图:感染 48 h后小鼠肝、肾、肺形态



注:A图:白色念珠菌感染组与正常对照组小鼠血清多肽指纹图谱;B图:近平滑念珠菌感染组与正常对照组小鼠血清多肽指纹图谱;C图:白色念珠菌感染组与近平滑念珠菌感染组小鼠血清多肽指纹图谱

图4 不同组别小鼠血清多肽指纹图谱的比较

(95%CI:0.903~1.000)。选择差异较明显的 m/z 为 2 736.9、8 091.5、8 153.7 这 3 个多肽峰建立白色念珠菌-近平滑念珠菌诊断模型,诊断准确率为 98.78%(81/82)。

讨 论

念珠菌血症是一种严重威胁生命健康的疾病^[4]。虽然在许多地区白色念珠菌仍为临床最常见的病原菌,但不能否认非白念珠菌种类日益增加,且可能会导致超过 50% 的念珠菌血症的事实,而近平滑念珠菌在非白念珠菌中占首要位置^[2,11-13]。目前,诊断念珠菌血症的金标准仍然是血培养^[14],但该方法通常需要 3~5 d 才能有结果,耗时长,且对样本要求高,一般需在使用抗菌药物治疗前从身体不同部位同时采集 2~3 份样本进行血培养^[9],不能满足临床早诊断早治疗的需求。此外,一些分子学方法,如 PCR 检测、基因测序等在一定程度上提高了检测敏感性,但需要复杂的手工操作,较难应用于常规的临床实践^[15]。MALDI-TOF MS 是一种广泛应用于细菌和真菌菌体蛋白鉴定的检测手段^[16],具有高灵敏度、高通量的优势,从而大大缩短了检测周期^[17],但将该技术应用于寻找血清标志物的研究较少。

本研究收集了 8 个不同时间段感染小鼠的血清,通过弱阳离子交换磁珠结合 MALDI-TOF MS 的方法分析了白色念珠菌感染小鼠和近平滑念珠菌感染小鼠的血清样本,直观地反映了各多肽含量随时间的变化趋势;应用有显著差异的多肽峰建立了诊断模型,优于临床上常规检测的一些炎症标志物,如 C 反应蛋白、降钙素原、白细胞介素 6 等^[18-20]。对白色念珠菌感染组和近平滑念珠菌感染组多肽谱进行分析,发现有 4 个差异多肽峰在两种感染中共同出现,提示两者存在相似的致病机制。念珠菌属的致病因素包括生物膜的形成及水解酶的产生^[21-23],前者可显著降低抗真菌敏感性,后者与黏附、渗透、宿主入侵密切相关^[24-25]。值得注意的是, m/z 为 8 095.3 的多肽峰在近平滑念珠菌感染血清中含量最高,而在白色念珠菌感染和正常对照血清中含量降低,推断该多肽峰表达的蛋白可能具有鉴

别作用。本研究通过多肽指纹图谱分析,发现 4 个差异多肽峰在两种感染中共同出现,提示两者存在相似的致病机制。念珠菌属的致病因素包括生物膜的形成及水解酶的产生^[21-23],前者可显著降低抗真菌敏感性,后者与黏附、渗透、宿主入侵密切相关^[24-25]。值得注意的是, m/z 为 8 095.3 的多肽峰在近平滑念珠菌感染血清中含量最高,而在白色念珠菌感染和正常对照血清中含量降低,推断该多肽峰表达的蛋白可能具有鉴

别诊断意义,在后续实验中也将通过液相色谱-质谱联用(LC-MS/MS)等二级质谱的方法对该多肽所对应的蛋白质进行验证。同时,本研究建立的白色念珠菌-近平滑念珠菌模型,区分白色念珠菌感染和近平滑念珠菌感染的准确率达98%以上,对治疗用药有良好的提示作用。

临床上,由于患者疾病的复杂性、临床资料的不完整性以及真菌血培养的低检出率往往导致临床样本难以收集,实验结果难以保证;而小鼠已被证明在模拟与真菌相关的临床综合征方面具有不可估量的价值^[9]。基于以上两点,本实验选择小鼠作为研究对象,以1/2 LD₅₀经由尾静脉注射,建立了念珠菌血症模型,既能使小鼠存活,又保证了感染症状的出现。实验过程中发现,白色念珠菌组小鼠体质量一直呈下降趋势;而近平滑念珠菌组小鼠体质量出现明显下降后又逐渐恢复至正常水平,符合正常小鼠体质量增长规律,这也表明白色念珠菌致病性较近平滑念珠菌强,小鼠感染前者后在7 d内不能自行恢复,但可依靠自身免疫对后者进行清除^[26]。感染后1 d内,两组小鼠白细胞计数均先有小幅下降,后又大幅升高,这种变化趋势与Yang和Mao^[27]的研究结果一致。病原菌鉴定与内脏HE染色结果均证明模型建立成功,保证了后续实验结果的可靠性。当然,由于小鼠外周血白细胞波动范围较大,且例数有限,不能完全模拟患者实际情况,故在解决临床问题时不能盲目照搬。

综上,本实验应用MALDI-TOF MS寻找的差异多肽为临床寻找念珠菌血症的鉴别诊断血清标志物提供了思路。之后将确定诊断肽所对应的的蛋白质,分析与之相关的信号通路,进一步研究念珠菌血症的致病机制,同时开展临床研究进行验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Bassetti M, Merelli M, Righi E, et al. Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility, and outcome of candidemia across five sites in Italy and Spain[J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(12):4167-4172. DOI: 10.1128/jcm.01998-13.
- [2] Cordeiro RA, Sales JA, Castelo-Branco D, et al. Candida parapsilosis complex in veterinary practice: a historical overview, biology, virulence attributes and antifungal susceptibility traits[J]. *Vet Microbiol*, 2017, 212: 22-30. DOI: 10.1016/j.vetmic.2017.07.031.
- [3] Xiao M, Sun ZY, Kang M, et al. Five-year national surveillance of invasive Candidiasis: species distribution and azole susceptibility from the China hospital invasive fungal surveillance net (CHIF-NET) study[J]. *J Clin Microbiol*, 2018, 56(7):e00577-18. DOI: 10.1128/jcm.00577-18.
- [4] Barchiesi F, Orsetti E, Mazzanti S, et al. Candidemia in the elderly: what does it change? [J]. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0176576. DOI: 10.1371/journal.pone.0176576.
- [5] Kollef M, Micek S, Hampton N, et al. Septic shock attributed to Candida infection: importance of empiric therapy and source control[J]. *Clin Infect Dis*, 2012, 54(12): 1739-1746. DOI: 10.1093/cid/cis305.
- [6] Kung CT, Hsiao SY, Su CM, et al. Serum adhesion molecules as predictors of bacteremia in adult severe sepsis patients at the emergency department[J]. *Clin Chim Acta*, 2013, 421: 116-120. DOI: 10.1016/j.cca.2013.02.023.
- [7] Ludwig KR, Hummon AB. Mass spectrometry for the discovery of biomarkers of sepsis[J]. *Mol Biosyst*, 2017, 13(4): 648-664. DOI: 10.1039/c6mb00656f.
- [8] Hoenigl M, Zollner-Schwetz I, Sill H, et al. Epidemiology of invasive fungal infections and rationale for antifungal therapy in patients with haematological malignancies[J]. *Mycoses*, 2011, 54(5):454-459. DOI: 10.1111/j.1439-0507.2010.01881.x.
- [9] Hohl TM. Overview of vertebrate animal models of fungal infection[J]. *J Immunol Methods*, 2014, 410: 100-112. DOI: 10.1016/j.jim.2014.03.022.
- [10] Cassagne C, Normand AC, L'Ollivier C, et al. Performance of MALDI-TOF MS platforms for fungal identification[J]. *Mycoses*, 2016, 59(11):678-690. DOI: 10.1111/myc.12506.
- [11] Mikulska M, Del Bono V, Ratto S, et al. Occurrence, presentation and treatment of candidemia[J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2012, 8(8):755-765. DOI: 10.1586/eci.12.52.
- [12] Garzillo C, Bagattini M, Bogdanovic L, et al. Risk factors for Candida parapsilosis bloodstream infection in a neonatal intensive care unit: a case-control study[J]. *Ital J Pediatr*, 2017, 43(1):10. DOI: 10.1186/s13052-017-0332-5.
- [13] Pharkjaksu S, Chongtrakool P, Suwannakarn K, et al. Species distribution, virulence factors, and antifungal susceptibility among Candida parapsilosis complex isolates from clinical specimens at Siriraj hospital, Thailand, from 2011 to 2015[J]. *Med Mycol*, 2018, 56(4):426-433. DOI: 10.1093/mmy/myx058.
- [14] Navalkele BD, Revankar S, Chandrasekar P. Candida auris: a worrisome, globally emerging pathogen[J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2017, 15(9):819-827. DOI: 10.1080/14787210.2017.1364992.
- [15] Mellingshoff SC, Hoenigl M, Koehler P, et al. EQUAL Candida score: an ECMM score derived from current guidelines to measure QUALity of clinical Candidaemia management[J]. *Mycoses*, 2018, 61(5):326-330. DOI: 10.1111/myc.12746.
- [16] Patel R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases[J]. *Clin Chem*, 2015, 61(1): 100-111. DOI: 10.1373/clinchem.2014.221770.
- [17] Florio W, Morici P, Ghelardi E, et al. Recent advances in the microbiological diagnosis of bloodstream infections[J]. *Crit Rev Microbiol*, 2018, 44(3): 351-370. DOI: 10.1080/1040841x.2017.1407745.
- [18] Li X, Yuan X, Wang C. The clinical value of IL-3, IL-4, IL-12p70, IL17A, IFN-gamma, MIP-1beta, NLR, P-selectin, and TNF-alpha in differentiating bloodstream infections caused by gram-negative, gram-positive bacteria and fungi in hospitalized patients: an observational study[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98(38):e17315. DOI: 10.1097/md.00000000000017315.

- [19] Fu Y, Chen J, Cai B, et al. The use of PCT, CRP, IL-6 and SAA in critically ill patients for an early distinction between candidemia and Gram positive / negative bacteremia[J]. J Infect, 2012, 64(4):438-440. DOI: 10.1016/j.jinf.2011.12.019.
- [20] Stoma I, Karpov I, Uss A, et al. Combination of sepsis biomarkers may indicate an invasive fungal infection in haematological patients[J]. Biomarkers, 2019, 24(4):401-406. DOI: 10.1080/1354750x.2019.1600023.
- [21] Bhatt M, Sarangi G, Paty BP, et al. Biofilm as a virulence marker in Candida species in Nosocomial blood stream infection and its correlation with antifungal resistance[J]. Indian J Med Microbiol, 2015, 33 (Suppl): 112-114. DOI: 10.4103/0255-0857.150909.
- [22] Castillo GDV, Azcurra AI, Sotomayor CE. Candida lipases: a review on biochemical, molecular and pathogenic aspects[J]. Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba, 2019, 76(2):107-112. DOI: 10.31053/1853.0605.v76.n2.23822.
- [23] Paula-Mattiello S, Oliveira SD, Medina-Silva R. In vitro evaluation of hydrolytic enzyme activity and biofilm formation of Candida parapsilosis species complex from a nosocomial environment[J]. Rev Soc Bras Med Trop, 2017, 50(4):558-561. DOI: 10.1590/0037-8682-0032-2017.
- [24] Pulcrano G, Panellis D, De Domenico G, et al. Ambroxol influences voriconazole resistance of Candida parapsilosis biofilm[J]. FEMS Yeast Res, 2012, 12(4): 430-438. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2012.00792.x.
- [25] D'Eca Junior A, Silva AF, Rosa FC, et al. In vitro differential activity of phospholipases and acid proteinases of clinical isolates of Candida[J]. Rev Soc Bras Med Trop, 2011, 44(3): 334-338. DOI: 10.1590/s0037-86822011005000036.
- [26] MacCallum DM. Mouse model of invasive fungal infection[J]. Methods Mol Biol, 2013, 1031: 145-153. DOI: 10.1007/978-1-62703-481-4_17.
- [27] Yang YC, Mao J. Value of platelet count in the early diagnosis of nosocomial invasive fungal infections in premature infants [J]. Platelets, 2018, 29(1):65-70. DOI: 10.1080/09537104.2017.1293810.

(收稿日期:2019-11-28)

(本文编辑:张媛)

·读者·作者·编者·

本刊“急重症抢救”栏目征稿

对危、重、急症患者的抢救是临床医学中永恒的,也是最具挑战性的领域,特别是近年来各医学专科诊断、抢救水平的发展,为危、重、急症患者的综合救治水平的提高提供了巨大的潜在可能性。为了提高临床医生对急重症的诊断、各发展阶段主要矛盾和制约因素的分析及治疗的综合抢救水平,这一栏目将较详细地介绍对急重症抢救的成功经验及临床体会,以期使临床工作者得以借鉴,提高对急重症的抢救水平,其性质等同于“论著”。

1. 病例的选择:(1)治疗过程复杂的急重症病例;(2)涉及多学科、多领域的疑难病例;(3)在抢救过程中或诊断中有经验、教训可以借鉴的病例;(4)其他:对临床工作,尤其

是对基层医院的急诊抢救工作有提示或重要的指导意义的病例。以上病例最终获得明确诊断及成功的经验。

2. 写作格式及要求:(1)文题可以用主要的诊断或主要体征命名;(2)论文主要分“临床资料”和“分析与讨论”两部分,还可以有参考文献;(3)可以配有相应的图表资料,如:“生命指标监测图”;(4)“临床资料”部分要交代病例的一般情况(包括主诉、病史、体格检查、实验室检查)及抢救过程;(5)“分析与讨论”部分要求逻辑性强,条理清楚,能较好地体现正确的临床思维,对临床工作有实际借鉴及启迪作用;(6)字数一般在4 000字以内。

欢迎广大读者、作者向本栏目踊跃投稿并进行评议。

本刊“临床医学影像”栏目征稿

医学影像学检查是临床常用的诊断手段。影像学改变是病理改变的反应,但不同的病理改变往往有相似的影像学表现,这给诊断带来很大困难。为了促进临床影像诊断经验的交流和诊断、鉴别诊断水平的提高,中华医学杂志自2001年第1期开辟“临床医学影像”栏目,为特殊的、少见的、但具有临床启发意义的影像学表现提供一个展示园地,使局部的、个人的经验尽快地为广大临床医师借鉴,为临床医学影像诊断积累宝贵的第一手资料。本栏目是一个以图

片展示为主的栏目,要求提供高质量的影像图片,图片必须清晰、对比度好、病变特征显示明确。每篇文章可提供2~4幅不同影像技术的图片,如X线、CT、磁共振成像、超声、核素显像或病理图片等。文字部分则宜简练,描述患者的简要病史,主要影像学表现,经病理或临床科学手段确定的最后诊断结果,不进行讨论,不引用参考文献,字数在400字以内。欢迎踊跃投稿。