

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.202524257

· 论著 ·

多重 PCR 技术在检测外耳道真菌菌种中的应用研究

张仪^{1,2}, 彭丹^{1,2}, 孙毅^{2,3}, 毛承刚^{1,2}, 沈敏^{1,2}, 姜义道¹

(长江大学附属荆州医院 荆州市中心医院 1. 耳鼻咽喉头颈外科; 2. 湖北省病原真菌感染诊疗临床医学研究中心; 3. 皮肤科, 湖北 荆州 434020)

摘要: **目的** 研究外耳道真菌病的真菌菌种分布, 探讨多重 PCR 技术检测和鉴定外耳道真菌病常见真菌菌种的方法。 **方法** 取 2022 年 3 月—2023 年 6 月就诊于荆州市中心医院耳鼻咽喉科门诊的 137 例外耳道真菌病患者外耳道标本, 采用改良的马丁固体培养基对同一标本的一部分进行了常规培养, 培养后提取 DNA, PCR 扩增及测序鉴定真菌菌种。同时, 该标本另一部分直接经 DNA 提取后, 行两次多重 PCR, 分别使用通用真菌引物和特异性真菌引物, 根据琼脂糖凝胶电泳得到的条带的长短可鉴定真菌菌种。 **结果** 通过传统方法和多重 PCR 技术行真菌菌种鉴定, 本地区 137 例外耳道真菌病患者曲霉菌共 128 株 (93.4%), 其中土曲霉 73 株、黄曲霉 24 株、黑曲霉 18 株和烟曲霉 13 株; 念珠菌共 9 株 (6.6%), 均为白念珠菌。传统方法需 4~7 d, 而多重 PCR 技术 6~8 h 即可鉴定真菌菌种, 对比两组方法结果, 符合率为 100%。 **结论** 本地区外耳道真菌病患者最常见的真菌菌种是曲霉菌和念珠菌。除了常见菌种, 多重 PCR 技术还可以鉴定高耐药和高致死率的耳念珠菌、近平滑念珠菌等罕见菌种。与传统方法相比, 多重 PCR 技术检测和鉴定外耳道真菌病具有快速、准确等优点, 值得临床推广。

关键词: 外耳道真菌病; 菌种鉴定; 多重 PCR 技术; 快速诊断

中图分类号: R764.1⁺1

Application of multiplex polymerase chain reaction in the detection of fungal species of otomycosis

ZHANG Yi^{1,2}, PENG Dan^{1,2}, SUN Yi^{2,3}, MAO Chenggang^{1,2}, SHEN Min^{1,2}, JIANG Yidao¹

(1. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery; 2. Clinical Medical Research Center for Diagnosis and Treatment of Pathogenic Fungal Infections in Hubei Province; 3. Department of Dermatology, Jingzhou Hospital Affiliated to Yangtze University, Jingzhou Central Hospital, Jingzhou 434020, China)

Abstract: **Objective** To study the distribution of fungal species in otomycosis, and to explore the method of multiplex polymerase chain reaction (PCR) to detect and identify common fungal species in otomycosis. **Methods** Specimens were collected from external ear canal of 137 patients with otomycosis who visited the department of otolaryngology, Jingzhou central hospital from March 2022 to June 2023. Part of the specimen was routinely cultured with modified Martin solid medium. After culture, DNA was extracted, and the fungal species were identified by PCR amplification and sequencing. At the same time, the other part of the same specimen was directly extracted by DNA, and multiple PCR were performed twice, using the universal and specific fungal primers respectively. The fungal species could be identified according to the length of bands obtained by agarose gel electrophoresis. **Results** A total of 128 *Aspergillus* strains (93.4%) were identified by traditional methods and multiplex PCR in 137 otomycosis specimens, including 73 strains of *Aspergillus terreus*, 24 strains of *Aspergillus flavus*, 18 strains of *Aspergillus niger*, and 13 strains of *Aspergillus fumigatus*. There were 9 strains (6.6%) of *Candida albicans*. The traditional method took 4 to 7 days, while the multiplex PCR technique could identify the fungal species in 6 to 8 hours. The results of the two methods were compared, and the coincidence rate was 100%. **Conclusions** The most common fungal species in patients with otomycosis in this region are *Aspergillus* and *Candida*. In addition to common species, multiplex PCR can also be used to identify rare species such as

基金项目:荆州市科技局科研项目(2023HC14)。

第一作者简介:张仪,女,在读硕士研究生,住院医师。

通信作者:毛承刚,Email:L10068@yangtzeu.edu.cn;孙毅,Email:jzzxyssy@163.com

Candida auris and *Candida parapsilosis* with high drug resistance and high mortality. Compared with traditional methods, multiplex PCR has the advantages of rapid and accurate detection and identification of otomycosis, which is worthy of clinical promotion.

Keywords: Otomycosis; Species identification; Multiplex polymerase chain reaction technique; Rapid diagnosis

外耳道真菌病是真菌病原体侵袭外耳道引起的外耳道亚急性或慢性真菌感染,可合并细菌感染。随着广谱抗生素及糖皮质激素等的广泛使用,近年来外耳道真菌病的发病率及复发率都有所上升,早期诊断是提高疗效的前提条件。外耳道真菌病的诊断通常依赖于患者的病史、耳内镜检查和临床特征等^[1]。

我们通常在治疗该病时是经验性用药。但从取样材料中培养、分离和鉴定真菌是诊断外耳道真菌病的金标准^[2-4]。然而,传统培养方法最短需 4 ~ 7d,这大大影响了临床治疗效率。本实验运用多重 PCR 技术可以检测外耳道真菌病致病菌种,相比传统培养方法,具有快速、准确等优点。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 样本的收集 本实验所用 137 例标本均由荆州市中心医院耳鼻咽喉科门诊两位有丰富经验的医师收集,使用电耳镜或耳内镜观测患者外耳道,观测到真菌感染样物质,如真菌菌丝,使用一次性无菌镊子小心夹取外耳道耵聍,放入无菌标本袋备用。图 1 为部分患者外耳道镜下图。

1.1.2 主要试剂及药品 琼脂粉,改良马丁培养基,琼脂糖,溴化乙锭(EB),Fungal DNA Kit 真菌 DNA 小量提取试剂盒,2 × Hieff[®] PCR Master Mix,GoldBand 100bpDNAladder,5 000bp DNA maker,缓冲裂解液。

1.1.3 主要仪器 电子天平(武汉珠恒电子有限公司 ZG-TP203),离心机(上海力辰邦西仪器科技有限公司 LC-LX-H185C),旋涡混合器(上海翊圣生物科技股份有限公司 ES-VM25),PCR 扩增仪(杭州晶格科学仪器有限公司 T960),琼脂糖凝胶电泳仪(上海伯乐生命医学产品有限公司 PowerPac TM Basic),凝胶成像分析系统(北京百晶生物科技有限公司 BG-gdsAUTO 320),雷磁酸度仪 pH 计(上海仪电科学仪器有限公司 PHS-25)。

1.1.4 引物 本研究引物序列均由上海生工生物有限公司合成(表 1)用于设计引物的候选基因靶点

的 DNA 序列从 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>)获取。引物设计遵循引物设计的基本原则^[5]。为了开发一种通用的真菌检测方法,我们选定了 *ITS* 基因作为主要的检测目标。同时,考虑到 *βtubulin* 基因在区分念珠菌和曲霉菌中的重要性,我们也针对此基因设计了特异性引物。在引物设计过程中,我们采用了先进的在线设计工具 primer3plus(www.primer3plus.com),以确保引物的精确性和效率。此外,为了便于追踪和评估,表 1 提供了详尽的列表,包括所有设计的引物序列、它们所对应的预期扩增片段大小以及其他关键信息。

1.2 实验方法

1.2.1 传统方法鉴定菌种 在无菌操作台中将采集的同一外耳道真菌样本分为两部分,一部分用于传统方法培养,另一部分标本保存于 -20 °C 备用。用棉签均匀接种于改良马丁固体培养基,于 35 °C 温箱中培养 72 h,每 24 小时观察菌落生长情况,我们可以通过菌落形态进行初步的菌属分类。使用真菌 DNA 小量提取试剂盒(Fungal DNA Kit)提取 DNA,DNA 溶液保存于 -20 °C 冰箱。在初步实验阶段,我们采用了通用引物 *ITS1* (5' -TCCGTAGGTGAACCT-GCGG-3') 和 *ITS4* (5' -TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 对真菌样本的 *ITS* 区域进行了 PCR 扩增。扩增成功的样本随后被送往生工生物工程有限公司武汉分公司进行专业的序列测定服务。得到的序列数据随后被上传至 NCBI 的 GenBank 数据库,并利用 BLAST 工具(通过链接 <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi> 访问)进行序列比对分析,以准确鉴定所检测真菌的物种。

1.2.2 多重 PCR 技术 DNA 提取 ①采用传统的苯酚-氯仿抽提法提取标本 DNA,-20 °C 保存^[6]。②产物检测:利用 Nano drop one 超微量分光光度计检测每个标本浓度和在 260、280 nm 处的 OD 值,计算 A260/A280 值。经检测,我们提取的产物 OD260/OD280 在 1.7 ~ 1.9,说明抽提的 DNA 样品纯度达到合格要求。

1.2.3 多重 PCR 技术检测真菌菌种 为了诊断真菌感染并识别其是否为常见的致病菌,我们采用了两步多重 PCR 策略。在初步的 PCR 检测中,我们

使用通用真菌引物,并以无菌蒸馏水作为阴性对照,以确保实验结果的可靠性。如果初步 PCR 检测结果为阳性(出现 811 bp 的条带),我们随后进行第二轮 PCR 检测,使用特异性引物以进一步鉴定真菌种类。我们设置了两组 PCR 反应体系,分别针对曲霉菌属和念珠菌属进行检测。对于曲霉菌属,阳性条带的出现及其大小可以区分为土曲霉(575 bp)、黄曲霉(295 bp)、黑曲霉(320 bp)、烟曲霉(1 120 bp)或可能混合感染。念珠菌属的检测同样根据条带大小进行分类,包括白念珠菌(487 bp)、近平滑念珠菌(389 bp)、耳念珠菌(286 bp)。如果同一外耳道标本在两组检测中均显示阳性条带,这表明存在念珠菌属和曲霉菌属的混合感染。如果初步 PCR 检测未发现阳性条带,则排除了真菌感染的可能性。如果在初次 PCR 检测中发现阳性条带,但第二轮 PCR 检测中未观察到条带,则提示感染可能由不常见的

真菌种类引起。为减少实验误差,每组 PCR 反应均设置了 3 个重复样本。多重 PCR 反应体系为 25 μ L。曲霉菌组及念珠菌组包括待测 DNA 溶液 3 μ L, MasterMix 15 μ L, 每种曲霉菌或念珠菌引物 0.8 μ L, 用去离子水补足剩下体积,置于小型离心机混匀,确保无样本溶液挂壁。混合物置于 PCR 扩增仪中进行 PCR 扩增。各组 PCR 反应参数见表 2。

1.2.4 琼脂糖凝胶电泳法 轻柔从配槽中将完全凝固的凝胶放入已加适量 1 \times TAE 缓冲液的电泳槽内,保证 1 \times TAE 缓冲液浸没琼脂糖凝胶表面并高出 4 ~ 5 mm,琼脂糖凝胶加样孔中无气泡;使用移液枪将 5 μ L GoldBand 100 bp DNA ladder 或 5 000 bp DNA maker 加入第一个加样孔中用做标记,其余孔顺次加入 PCR 产物样本,加样过程防止加样量超过加样孔容量;盖上电泳仪电泳槽盖板,打开电泳仪,

表 1 多重 PCR 技术对外耳道真菌致病菌进行菌属鉴定使用的引物

步骤	引物名称	引物序列(5'-3')	基因类型	长度(bp)	检测菌属
泛引物	真菌 F	GGCGCGCAAATTACCCAATCC	ITS	811	真菌
	真菌 R	TCTGTCAATCCTTATTTTGTCTGGA	ITS		
	黄曲霉 F	TTGATGTCTAGCAGGACCATG	<i>βstubulin</i>		
	黄曲霉 R	TTCCGTTACTGTACTGCTCTCGTC	<i>βstubulin</i>		
	土曲霉 F	TTCCGTTACTGTACTGCTCTCGTC	<i>βstubulin</i>		
	土曲霉 R	ATCCTGGGACAGATTCTCCACC	<i>βstubulin</i>		
逐步引物	烟曲霉 F	GTCCCTTTAGGAGACGGCTC	<i>βstubulin</i>	1 120	曲霉菌
	烟曲霉 R	AGTCAGTATCCGCGTGTGTTTTTC	<i>βstubulin</i>		
	黑曲霉 F	CAATTGGAGATCGCCACGG	<i>βstubulin</i>		
	黑曲霉 R	CTTTGGCGATGGCTTCCTTC	<i>βstubulin</i>		
	白念珠菌 F	CCGTTTATTCCTTCCTTACACC	<i>βstubulin</i>		
	白念珠菌 R	GATCCAATTGGCAGGTGTTAACC	<i>βstubulin</i>		
	近平滑念珠菌 F	CAAGAATTTACCTCTGACTACTG	<i>βstubulin</i>		
	近平滑念珠菌 R	CAAGAATTTACCTCTGACTACTGAA	<i>βstubulin</i>		
	耳念珠菌 F	CGTAAGCAAGTTCAAACTTTTAGC	<i>βstubulin</i>		
	耳念珠菌 R	TACGGGACAGCTTGACAGC	<i>βstubulin</i>		
传统方法	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG		286	念珠菌
	ITS4	TCCTCCCTTATTGATATGC			

表 2 多重 PCR 技术各项反应参数

类别	MasterMix (μ L)	DNA 模板 (μ L)	每种引物终浓度(μ L)	双蒸水 (μ L)	PCR 过程	温度 ($^{\circ}$ C)	时间 (s)	循环 (个)
曲霉菌鉴定	15	3	0.8	0.6	预变性	95	300	1
					变性	95	15	
					退火	55	30	30
					延伸	72	30	
					最后延伸	72	300	1
					预变性	95	300	1
念珠菌鉴定	15	3	0.8	2.2	变性	95	15	30
					退火	60	30	
					延伸	72	30	
					最后延伸	72	300	1

设置电压为 100 V 后启动,25 ~ 50 min 后将凝胶取出,放在凝胶成像分析系统中进行观察并摄影。GoldBand 100 bp DNAladder 条带大小依次为 100、200、300、400、500、600、700、800、900、1 000、1 500 bp;5 000 bp DNA maker 条带大小依次为 100、250、500、750、1 000、2 000、3 000、5 000 bp。

1.2.5 耳念珠菌引物验证 在临床样本中未能成功分离出耳念珠菌的情况下,我们从美国疾病控制与预防中心和美国食品药品监督管理局的抗生素抗性菌株库中随机选取了 4 株耳念珠菌。经过 DNA 提取,我们对这些菌株进行了多重 PCR 分析。

2 结果

2.1 标本检测

我们收集的 137 例标本经传统方法鉴定菌种,图 2 为外耳道标本在马丁培养基上培养后的形态。我们检测出曲霉菌共 128 株,其中土曲霉 73 株、黄曲霉 24 株、黑曲霉 18 株和烟曲霉 13 株。念珠菌共 9 株,均为白念珠菌。图 3 为 137 例外耳道真菌病分离菌种分布图。

2.2 多重 PCR 检测

产物经过多重 PCR 反应后可见各扩增后的 DNA 产物进行琼脂糖凝胶电泳的条带均清晰,黄曲霉菌电泳条带约 295 bp,土曲霉电泳条带约 575 bp,烟曲霉电泳条带约 1 120 bp,白念珠菌电泳条带约 487 bp,黑曲霉菌电泳条带约 320 bp。图 4 为琼脂糖凝胶电泳结果。多重 PCR 方法所测结果与传统检测方法测序结果比对一致,符合率为 100%。

2.3 验证引物的特异性

对设计的引物在 NCBI 进行引物比对分析显示,引物与非靶生物没有错配性扩增。通过逐步多重快速 PCR 检测出的菌种和测序检测出的菌种保持一致。在本研究 3 次重复特异性验证实验中,一对引物只会对靶生物扩增出原设计长度的产物。该测定使用目标 DNA 和灭菌蒸馏水分别作为阳性和阴性对照,都得到了阳性和阴性的结果。初步实验结果显示,在第一轮 PCR 反应中,所有 4 株菌株均呈现出阳性条带。第二轮 PCR 反应也成功获得了预期长度的阳性条带(图 4 中 C11 ~ 14)。

2.4 多重 PCR 技术的灵敏性

实验过程中某标本土曲霉 DNA 提取出的量较少,但经过多重 PCR 扩增后仍能检测出(见图 4 中 C10)。在分离的 137 例外耳道真菌病患者的耳分

泌物标本中,每例标本初次 PCR 反应均得到了对应长度(811 bp)的条带。

3 讨论

3.1 多重 PCR 技术的应用及意义

外耳道真菌病通常是一种良性和浅表感染,在早期阶段通常无症状,不被认为危及生命。外耳道真菌病常见症状为外耳道不适、胀痛或瘙痒、阻塞感、听觉障碍等,容易误诊、漏诊、误治,临床症状以耳闷、耳痒多见,严重可造成耳鸣、鼓膜穿孔等^[7]。然而,在某些情况下,由于外耳道为真菌生长提供了理想的环境,感染可能会复发,这极大影响了患者的生活质量^[8]。现今临床治疗外耳道真菌病主要使用抗真菌药物,临床工作者通常依靠经验指导患者用药,若患者未得到及时有效治疗,病情有可能发展为鼓膜穿孔、坏死性外耳道炎甚至颅内感染^[9]。目前,传统培养方法鉴别外耳道真菌菌种需 4 ~ 7 d,本文使用的多重 PCR 技术可快速、准确鉴定常见及少见真菌菌种。

文献报道 PCR 技术已被广泛应用于多个领域,包括食品安全检测、病原体检测、药物开发等。特别是在临床检验领域,PCR 技术发挥着至关重要的作用^[10]。多重 PCR 技术与常规 PCR 技术的原理相同,但区别在于它使用两对或两对以上的引物,这些引物分别结合在模板 DNA 的不同部位,从而同时扩增多个核酸片段。多重 PCR 技术可以用于多种病原微生物的同时检测或鉴定,例如肝炎病毒、肠道致病性细菌、性病等,也可以用于遗传病和癌基因的分型鉴定^[11]。尽管多重 PCR 技术在多个领域已经显示出其应用潜力,但目前临床疾病诊断领域的研究仍待深入。

本研究深入探讨了多重 PCR 技术在诊断外耳道真菌病这一特定疾病中的应用实例,从而突显了该技术在提高临床诊断精确度方面发挥的核心作用。多重 PCR 为临床医生提供了一种快速、准确的诊断手段,有助于疾病的及时诊断和治疗。本研究将多重 PCR 技术成功地与临床实践相融合,这一突破不仅拓宽了 PCR 技术的应用范围,而且为临床诊断提供了更为精准和高效的工具。这是本文一大创新。

3.2 多重 PCR 技术的优势

在本实验中,检出结果显示本地区外耳道真菌病最常见的致病菌菌种是曲霉菌和念珠菌,这与以

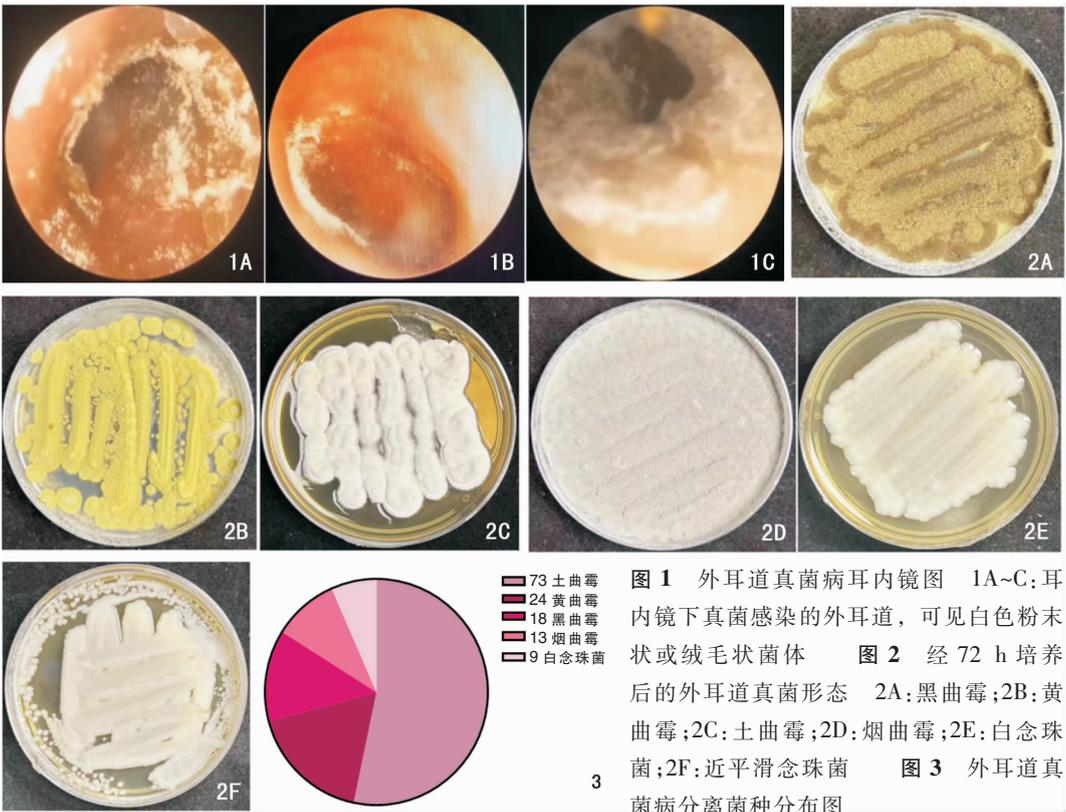


图1 外耳道真菌病耳内镜图 1A~C:耳内镜下真菌感染的外耳道,可见白色粉末状或绒毛状菌体 图2 经72 h培养后的外耳道真菌形态 2A:黑曲霉;2B:黄曲霉;2C:土曲霉;2D:烟曲霉;2E:白念珠菌;2F:近平滑念珠菌 图3 外耳道真菌病分离菌种分布图

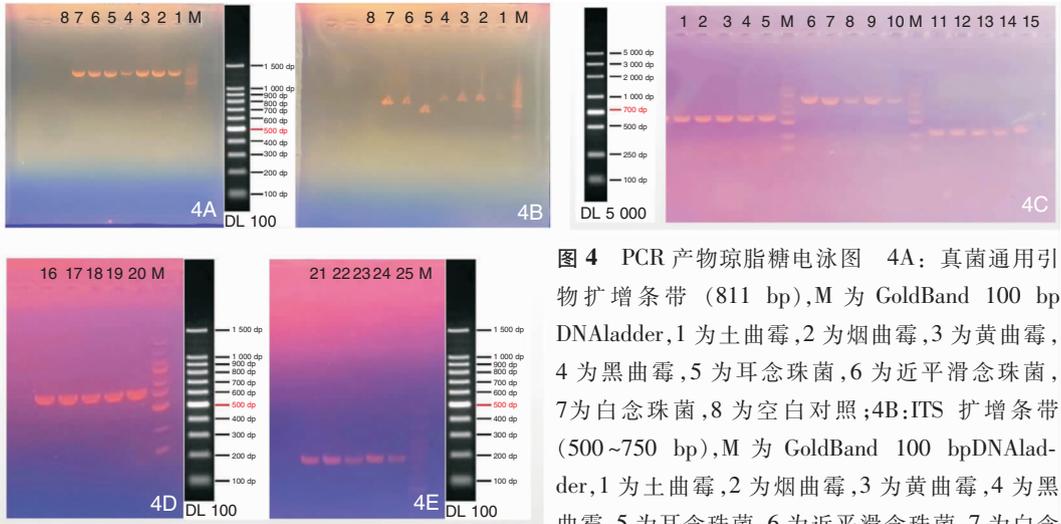


图4 PCR产物琼脂糖电泳图 4A:真菌通用引物扩增条带(811 bp),M为GoldBand 100 bp DNAladder,1为土曲霉,2为烟曲霉,3为黄曲霉,4为黑曲霉,5为耳念珠菌,6为近平滑念珠菌,7为白念珠菌,8为空白对照;4B:ITS扩增条带(500~750 bp),M为GoldBand 100 bp DNAladder,1为土曲霉,2为烟曲霉,3为黄曲霉,4为黑曲霉,5为耳念珠菌,6为近平滑念珠菌,7为白念珠菌,8为空白对照;4C:M为5 000 bp DNA maker,1~5为烟曲霉(1 120 bp),6~10为土曲霉(575 bp),11~14为耳念珠菌(286 bp),15为白念珠菌(487 bp);4D:M为GoldBand 100 bp DNAladder,16~20为黑曲霉(320 bp);4E:M为GoldBand 100 bp DNAladder,21~25为黄曲霉(295 bp)

珠菌,8为空白对照;4C:M为5 000 bp DNA maker,1~5为烟曲霉(1 120 bp),6~10为土曲霉(575 bp),11~14为耳念珠菌(286 bp),15为白念珠菌(487 bp);4D:M为GoldBand 100 bp DNAladder,16~20为黑曲霉(320 bp);4E:M为GoldBand 100 bp DNAladder,21~25为黄曲霉(295 bp)

往文献结果一致^[8]。多重PCR技术可以鉴定常见菌种,还可以鉴定高耐药和高致死率的耳念珠菌、近平滑念珠菌等罕见菌种。137例标本中未检测出非常见菌种,如红色毛癣菌、毛霉菌、镰刀菌等,这可能与标本总数不是很大有关。当提取DNA量较少时,仍能出现阳性条带,说明PCR技术可以检测到非常少量的真菌DNA,所以其灵敏度远高于传统方法。

多重PCR是一种高效的技术,它允许在一个反应体系中同时扩增多个目标DNA片段。这项技术不仅可以提高实验的通量,而且在某些情况下,由于减少了重复实验和使用较少的样品和试剂,可以显著降低成本。另外,PCR引物常针对真菌特有的基因序列,如ITS区域,从而根据特异引物序列进行多重PCR反应,该技术能够在单一反应中准确无误地扩

增多个目标 DNA 序列,而不会扩增非目标序列,因此具有很高的特异性。在本次多重 PCR 反应中,2 次 PCR 扩增时间约 5 h,琼脂糖凝胶电泳法约 20 min,故检测通常在 6~8 h 内完成,可以快速鉴定真菌菌种,从而及时指导临床治疗。

3.3 局限性及解决措施

多重 PCR 技术能够同时检测多个目标,但是需要注意避免假阳性或假阴性结果,确保实验结果的准确性和重复性。为了提高多重 PCR 技术检测外耳道真菌感染的准确性和可靠性,可以采取一些措施。例如通过优化引物设计和反应条件,提高多重 PCR 的特异性和灵敏度,减少非特异性扩增和假阳性结果^[12]。另外,有望发展能够同时检测更多靶标的多重 PCR 技术,以适应复杂样本的分析需求。将多重 PCR 与其他分子生物学技术(如数字 PCR、微流控技术等)结合,以提高检测的准确性和应用范围,在保持技术性能的同时,进一步降低多重 PCR 的成本,使其更加经济实用,特别是在资源有限的地区^[13]。在临床推广应用该技术前,可以加强对科研人员 and 临床医生的教育培训,提高他们对多重 PCR 技术的认识和应用能力^[14]。

3.4 展望

本实验研究了多重 PCR 技术在外耳道真菌病感染诊断中的应用,多重 PCR 优势在于高灵敏度、强特异性和检测速度快,除了鉴定真菌菌种,还可应用于鉴别诊断、治疗监测、预后评估以及流行病学研究等。多重 PCR 技术在不断发展,例如 Huang 等^[15]开发的高阶多重 PCR 检测技术,提高了检测的灵敏度和准确性。随着技术的进展,多重 PCR 技术有望在精准医疗和个性化治疗外耳真菌病中发挥重要的作用。

参考文献:

[1] Sangaré I, Amona FM, Ouedraogo RWL, et al. Ootomycosis in Africa: Epidemiology, diagnosis and treatment [J]. *J Mycol Med*, 2021, 31(2):101115.

[2] Alarid-Coronel J, Celis-Aguilar E, Escobar-Aispuro L, et al. Ootomycosis in immunocompetent patients: Clinical and mycological features. Our experience with 40 cases [J]. *Clin Otolaryngol*, 2018, 43(1): 373 - 377.

[3] Jing R, Yang WH, Xiao M, et al. Species identification and antifungal susceptibility testing of *Aspergillus* strains isolated from patients with otomycosis in northern China [J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2022, 55(2):282 - 290.

[4] Nemati S, Hassanzadeh R, Khajeh Jahromi S, et al. Ootomycosis in the north of Iran: common pathogens and resistance to antifungal agents [J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2014, 271(5):953 - 957.

[5] 陈兆亮,张英锋,李长江,等. 例析 PCR 引物的设计原则问题 [J]. *中学生理科应试*, 2022, (10):55 - 56.

[6] Figueroa-Bossi N, Balbontín R, Bossi L. Preparing plasmid DNA from bacteria [J]. *Cold Spring Harb Protoc*, 2022, 2022(10): Pdb. prot107852.

[7] 贾雯,李灿,庞盼,等. 外耳道真菌病的病原菌分布及疗效分析 [J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2022, 28(2):32 - 36.

[8] Bojanović M, Stalević M, Arsić-Arsenijević V, et al. Etiology, predisposing factors, clinical features and diagnostic procedure of otomycosis: A literature review [J]. *J Fungi (Basel)*, 2023, 9(6):662.

[9] 乡洁莹,许志萍,王蓉,等. 广州市 124 例外耳道真菌病的病原菌分布及临床特征 [J]. *中国真菌学杂志*, 2023, 18(3):211 - 215.

[10] 闫玉华. 伊曲康唑治疗难治性复发性真菌性外耳道炎的临床观察 [J]. *北方药学*, 2018, 15(4):34 - 35.

[11] 周小匀,周璇,郭玮. 数字 PCR 技术及其在临床检验中的研究进展 [J]. *检验医学与临床*, 2023, 20(18):2738 - 2743.

[12] 白菊红,康建平,张星灿,等. 多重 PCR 技术在病原微生物检测中的应用 [J]. *食品工业科技*, 2019, 40(7): 322 - 325, 331.

[13] 钟泽澄,王进,张师音. 多重 PCR 技术研究进展 [J]. *生物工程学报*, 2020, 36(2):171 - 179.

[14] 曹子健,邱艳红,王爽,等. 多重 PCR 技术在植物病原物检测中的应用 [J]. *中国农业科技导报*, 2023, 25(8):216 - 224.

[15] Huang Q, Chen D, Du C, et al. Highly multiplex PCR assays by coupling the 5'-flap endonuclease activity of Taq DNA polymerase and molecular beacon reporters [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, 119(9):e2110672119.

(收稿日期:2024-06-30)

本文引用格式:张仪,彭丹,孙毅,等. 多重 PCR 技术在检测外耳道真菌菌种中的应用研究 [J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2025, 31(1):52 - 57. DOI:10. 11798/j. issn. 1007 - 1520. 202524257

Cite this article as:ZHANG Yi, PENG Dan, SUN Yi, et al. Application of multiplex polymerase chain reaction in the detection of fungal species of otomycosis [J]. *Chin J Otorhinolaryngol Skull Base Surg*, 2025, 31(1): 52 - 57. DOI: 10. 11798/j. issn. 1007 - 1520. 202524257