系统进化树在外耳道真菌感染鉴定和区分中的应用

沙勇芳[1] 刘 旭[1] 陈 敏[2] 刘建平[1△]

([1]复旦大学附属眼耳鼻喉科医院耳鼻喉科 上海 200031; [2]海军军医大学第二附属医院皮肤科 上海 200433)

【摘要】 目的 通过形态学、基因测序、系统进化树分析真菌性外耳道炎的菌群分布与遗传变异多样性,明确真菌感染物种分布,获取其进化、传播等相关信息,便于尽快开展针对性防治工作。**方法** 收集真菌性外耳道炎患者的外耳道分泌物,进行培养和形态学鉴定,分离菌株,采用核酸扩增技术对核糖体内部转录间隔区(internal transcribed spacer,ITS)、β-微管蛋白(β-tubulin, BenA)和钙调蛋白(calmodulin,CaM)3个基因片段分别扩增测序,采用序列比对工具BLAST进行比对鉴定。并构建系统发育进化树,进行曲霉菌株精确鉴定。**结果** 菌株(共96株)的菌种构成为曲霉菌属(80株,83.33%)和假丝酵母菌属(16株,16.67%)。主要致病菌株有6种,包括土曲霉(53株,55.21%)、近平滑念珠菌(16株,16.67%)、烟曲霉(10株,10.42%)、塔宾曲霉(7株,7.29%)、黑曲霉(6株,6.25%)、黄曲霉(4株,4.17%)。通过最大似然法与邻接法,基于*ITS*、*BenA*、*CaM*单基因与多基因构建8棵系统进化树,多基因比单基因进化树更能准确区分黑曲霉与塔宾曲霉,揭示菌株呈多样性分布。**结论** 相比于形态学与基因测序方法,构建系统进化树更为精确地鉴定了真菌菌株,并得到了正确的菌群分布结果,其中高比例菌株(土霉菌、烟曲霉等)与标准菌株之间的亲缘关系远近反映了外耳道真菌感染中优势菌株的遗传变异倾向性,为临床用药等研究提供了明确方向。

【关键词】 外耳道; 真菌鉴定; 测序分析; 系统进化树

【中图分类号】 R764.1+1 **【文献标志码】** A **doi**:10.3969/j.issn.1672-8467.2026.03.016

Application of phylogenetic tree analysis in identification and differentiation of fungal infection in external auditory canal

SHA Yong-fang[1], LIU Xu[1], CHEN Min[2], LIU Jian-ping[1△]

([1]*Department of Otorhinolaryngology, Eye and ENT Hospital, Fudan University, Shanghai* 200031, *China*;
[2]*Department of Dermatology, the Second Affiliated Hospital of Naval Medical University, Shanghai* 200433, *China*)

【Abstract】 Objective To determine the distribution of fungal otitis externa flora and genetic variation diversity by morphology, gene sequencing, and phylogenetic tree analysis, to clarify the distribution of fungal infection species, and to obtain relevant information on their evolution and transmission can be obtained, so as to facilitate the implementation of targeted prevention and control work as soon as possible. **Methods** The external ear canal secretions of patients with fungal otitis externa were collected for culture and morphological identification, and the strains were isolated. The three gene fragments of ribosomal internal transcribed spacer (ITS), β-tubulin (BenA) and calmodulin (CaM) were amplified and sequenced by nucleic acid amplification technology, and then Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) was used for comparison and identification. A phylogenetic evolutionary tree was constructed to accurately identify the Aspergillus strains. **Results** The strains (96 strains in total) were composed of

△Corresponding author E-mail: liujianping_2023@sina.com

网络首发时间:2026-03-09 15:44:41 网络首发地址:https://link.cnki.net/urlid/31.1885.R.20260309.0956.006

Aspergillus（80 strains，83.33%）and Candida（16 strains，16.67%）. There were 6 main pathogenic strains，including *Aspergillus terreus*（53 strains，55.21%），*Candida parapsilosis*（16 strains，16.67%），*Aspergillus fumigatus*（10 strains，10.42%），*Aspergillus tubingensis*（7 strains，7.29%），*Aspergillus niger*（6 strains，6.25%），and *Aspergillus flavus*（4 strains，4.17%）. Based on ITS，BenA，and CaM single genes and multigenes，8 phylogenetic trees were constructed based on ITS，BenA，and CaM single genes and multigenes by maximum likelihood and neighbor-joining methods. Multigene evolutionary trees could more accurately distinguish *Aspergillus niger* from *Aspergillus tubingensis* than single gene evolutionary trees，revealing the diversity distribution of strains. **Conclusion** Compared to morphological and gene sequencing methods，constructing phylogenetic trees more accurately identified fungal strains and obtained correct results on the distribution of the fungal community. The closeness of the phylogenetic relationship between high-proportion strains（such as *Aspergillus terreus* and *Aspergillus fumigatus*）and the standard strain reflected the genetic variation tendency of dominant strains in external auditory canal fungal infections，providing a clear direction for clinical drug research.

【Key words】 external auditory canal； fungal identification； sequence analysis； phylogenetic tree

真菌性外耳道炎是一种易迁延、易复发的常见耳鼻喉疾病，真菌感染途径多样，致病菌群具有复杂多样性、区域性、季节性等特点，临床诊断较为棘手。研究外耳道真菌菌群是深入理解该病的基础[1]。

传统真菌鉴定主要依赖显微镜检查与分离培养[2]，而当前基于DNA分析的分子生物学技术已成为菌株鉴定和菌群结构分析的主流方法[3-5]。随着测序数据的不断积累，近年来流行使用基因组数据推断物种进化关系。系统进化树是基因组时代一种可视化且具有系统性的手段，又称为系统发生树、演化树，作为树状图结构，它可以表现不同物种之间、或者相同物种不同族群的个体之间进化关系，在多领域得到广泛应用[6-8]。物种体内生物分子的相似程度越高，亲缘关系就越为接近。所以进化树带有物种宏观进化与短期遗传变异过程的关键信息，揭示了物种多样性机制，对病原微生物的防治具有深入的指导意义[9-10]。因此，及时进行菌株鉴定，进而开展毒力和耐药性分析，可以尽快确定最佳治疗时间与制定相应感染控制措施。

如今国内外关于真菌性外耳道炎的研究较多，但多局限于形态学鉴定与基因测序鉴定，而关注真菌分离株物种多样性的研究较少[3]，并且众多外耳道真菌感染研究中，鲜有探究真菌菌群分布与菌种进化树遗传差异。本研究拟借助多位点基因测序、系统进化树构建等手段[5]，对真菌菌株的物种水平精确鉴定与遗传特征研究，补充建立菌株数据库，进一步可对上海地区乃至全国临床真菌性外耳道炎诊疗提供参考依据。

资料和方法

研究对象 收集2021年10月至2022年12月于复旦大学附属眼耳鼻喉科医院就诊的真菌性外耳炎患者。纳入标准：(1)有真菌性外耳道炎症状，例如耳痒、耳鸣、耳塞、耳内流脓、听力下降等；(2)耳内镜下，外耳道检测到菌斑或稠厚分泌物，伴有痂皮、碎屑等，或伴有外耳道充血等症状；(3)外耳道分泌物检测到真菌。排除标准：(1)数据有遗失，或数据无效；(2)不是典型真菌性外耳道炎感染症状；(3)除浅表局部真菌感染（真菌性外耳道炎、皮肤炎症、甲真菌病等）外，患有其他急性或慢性感染性疾病。

所有患者对此研究知情并同意进行问卷调查记录，包括患者生活习惯、基本情况、临床症状、体征，另采集患者的外耳道分泌物。本项研究获得复旦大学附属眼耳鼻喉科医院伦理委员会批准（批准号：2021077）。

样品采集 按照《全国临床检验操作规程（第四版）》的要求进行病原菌收集，外耳道分泌物及碎片样品通过无菌镊子或棉签进行收集，在肉眼或耳内镜下采集标本。单侧选取真菌菌斑或稠厚分泌物明显的部位进行采集，双侧采集菌斑明显或分泌物较多的耳道。使用干燥无菌采样拭子以标准方

式收集外耳道分泌物,在耳道内旋转拭子至少5圈,直到拭子饱和;或用无菌镊子夹取较大耵聍或阻塞物,放置在无菌管内。无菌管密封,置于冰箱4 ℃保存。

实验流程简介 由浅入深通过形态学鉴定、基因测序鉴定、系统进化树构建3个层级依次展开实验,详见图1。

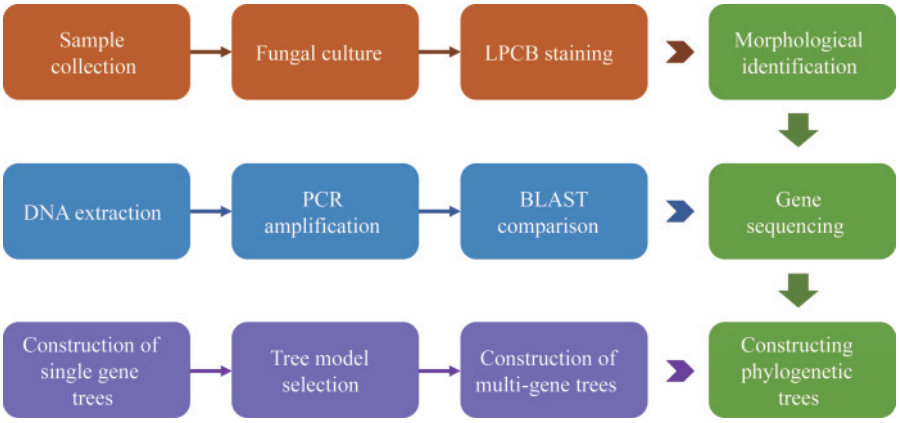

图1 实验流程示意图

Fig 1 Experimental flowchart

形态学鉴定方法 外耳道拭子在无菌操作台接入沙氏葡萄糖琼脂(sabouraud's dextrose agar,SDA)平板培养基,在28 ℃真菌培养箱培养7天。

观察在真菌培养皿中的颜色、生长形态、质地以鉴定种属,此时可区分酵母菌和霉菌。酵母菌落较小,呈白色球状;霉菌菌落较大,呈絮状。

使用乳酸酚棉蓝(lactophenol cotton blue,LPCB)真菌染色,菌丝与分生孢子呈亮蓝色,结合培养皿菌种形态可初步鉴定曲霉菌,记录鉴定结果。土曲霉菌落呈肉桂色绒毛状,孢梗直柱状,顶囊半球形;烟曲霉菌落呈深绿色或烟绿色,丝绒样表面,孢梗短柱状,顶囊烧瓶状;黑曲霉菌落最终呈黑色,羊毛状或绒毛状质地,孢梗呈放射状,顶囊球形或近球形;黄曲霉菌落呈黄绿色或棕绿色,羊毛状或棉毛状质地,孢梗初期放射状,后变为疏松状,顶囊球形或近球形。

基因测序鉴定方法 采用基因组DNA提取试剂盒进行DNA提取,首先进行DNA浓度测定,其中260 nm和280 nm下吸光度比值($D_{260/280}$)应在1.8~1.9。接着进行核糖体内部转录间隔区(internal transcribed spacer,ITS)、β-微管蛋白(β-tubulin,BenA)和钙调蛋白(calmodulin,CaM)的PCR扩增。PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳试验,与DNA条带位置比对,确定DNA片段的长度范围,检测PCR产物。

把PCR产物送检纯化后,借助全自动测序仪,开展双向测序,可以获得双向碱基序列的结果和关于目的基因的序列图形文件,用DNAstar(Seqman7.1.0)软件进行序列拼接。运用序列比对工具BLAST(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)开展BLAST比对分析拼接序列。最后提交序列获取序列编号,ITS在网页(https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/subs/genbank/)提交,BenA和CaM在BankIt(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/index.cgi)在线提交部分基因序列后,等待邮件(gb-admin@ncbi.nlm.nih.gov)发送序列编号。

系统进化树构建 借助Genbank数据库与BioEdit软件,把相关标准曲霉菌株的ITS、BenA、CaM序列保存,与上述获取的三位点部分序列开展比对分析裁剪。之后,在MEGA7.0.14软件中分别构建三位点序列的单基因系统进化树,并结合3种序列构建多位点序列分型(multilocus sequence typing,MLST)和标准菌株序列的系统进化树。经过软件计算挑选最佳建树模型,4种系统进化树均采用邻接法(neighbor-joining,NJ)和最大似然法(maximum likelihood estimate,ML)进行构建,并对系统进化树进行可信度检验(bootsrap-1000次)。

NJ法基于距离矩阵,其核心特点是通过迭代合并最小距离对逐步构建进化树。ML法是通过计算不同进化树拓扑结构对观测序列数据的解释能力,

选择使序列出现概率（似然值）最大的树作为最优结果。

结　　果

形态学鉴定结果　共提取99个外耳道分泌物进行真菌培养，其中丝状真菌（83株，83.84%）所占比例最高，第二位是酵母菌（16株，16.16%）。

由于3株曲霉菌分离株未能成功分离和保藏，对剩余96株进行形态学鉴定。鉴定显示曲霉菌属为80株，包括黄曲霉（*Aspergillus flavus*）4株（4.17%），烟曲霉（*Aspergillus fumigatus*）10株（10.42%），黑曲霉（*Aspergillus niger*）13株（13.54%），土曲霉（*Aspergillus terreus*）37株（38.54%），未鉴别曲霉菌16株（16.67%）；酵母菌属（*Yeast*）16株（16.67%）。由此可见，镜检对于菌群的检出能力相当有限。

基因测序鉴定结果　对外耳道分泌物培养的真菌分离株进行ITS、BenA、CaM基因测序检测，菌株*ITS*、*BenA*、*CaM*基因的电泳产物在系统紫外灯下均可见一条清晰的条带，无杂带，且3种目的基因的序列长度与预期序列长度相符，说明已成功扩增。

三位点基因的测序结果用Chromas软件打开，所有目的基因可见峰形规则，峰值稳定且信号较强，表明测序结果有效可信。由于念珠菌使用*CAM*和*BenA*基因的引物行PCR扩增后琼脂糖凝胶电泳无条带，所以只有ITS测序比对结果，比对后均为近平滑念珠菌。曲霉菌共80株，ITS、BenA、CaM鉴定检测出土曲霉、烟曲霉、塔宾曲霉（*Aspergillus tubingensis*）、黄曲霉、黑曲霉。按照BLAST比对规则，未鉴别曲霉菌在ITS对比中占52.5%（42/80），在BenA比对中占6.25%（5/80），而在CaM比对中菌种完全鉴定。

测序结果综合分析，发现真菌性外耳道炎患者样品中土曲霉（53株）比例最高，达到55.21%，近平滑念珠菌（16株）次之，为16.67%，而烟曲霉（10株）为10.42%，塔宾曲霉（7株）为7.29%，黑曲霉（6株）为6.25%，黄曲霉（4株）为4.17%。但是，仅测序无法探明菌种之间遗传变异的特性，对于分析真菌性外耳道炎病原菌较为片面。

系统进化树构建结果　从80株曲霉菌株中，排除ITS/BenA/CaM单基因未鉴定曲霉菌株（ITS：42株；BenA：5株），剩余33株曲霉菌株。从ITS/BenA/CaM三基因位点序列比对同源性均为100%的菌株中选取一株做代表性菌株，从33株选取了具有代表性的21株绘制系统进化树。通过ML法和NJ法对曲霉菌构建4种系统进化树（附图1～6，图2～3），包括曲霉菌ITS、曲霉菌BenA、曲霉菌CaM基因序列与多基因序列（ITS/BenA/CaM三基因位点）。结果表明ML和NJ法构建的系统发育树的拓扑结构基本相同，间接说明构建的系统进化树是稳定准确的。但是ITS、BenA、CaM基因位点分别构建的系统进化树和多基因位点序列的系统进化树有一定区别。深入分析发现CMSYF6072、CMSYF6018在ITS、BenA和CaM单基因系统进化树中皆为黑曲霉；但是多位点进化树分析将其归为塔宾曲霉。塔宾曲霉与黑曲霉同属黑色曲霉组[11-12]，源自3种基因构建的多基因进化树，参考基因位点多可准确区分两种菌株，得到正确的菌群分布结果，体现出多基因系统进化树的优势。其中高比例菌株（土霉菌、烟曲霉等）与标准菌株之间的亲缘关系远近反映了外耳道真菌感染中优势菌株的遗传变异倾向性。

讨　　论

真菌性外耳道炎是一种由致病性真菌引起的外耳道炎症性疾病，是耳鼻喉科的常见病。外耳道暴露于空气中，形成了一个包含细菌和真菌的复杂微环境。当致病性真菌入侵并大量繁殖时，会导致外耳道的急性或慢性炎症。因此，真菌性外耳道炎的发生与外耳道微生态系统的改变密切相关，而菌群多样性研究对于疾病的预防和防止病情扩散、复发具有重要意义[13]。

在鉴定方法上，真菌涂片法的阳性检出率低于培养法，但涂片初筛可以提高鉴定的准确性，更有利于诊断真菌性外耳道炎。然而，真菌培养阴性并不一定意味着外耳道中没有真菌存在，这可能与取样不准确或培养条件限制有关。因此，传统的形态学鉴定存在较大不确定性。基质辅助激光解吸飞行时间质谱仪（matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry，MALDI-TOF MS）技术与本文方法有相似之处，都需要以

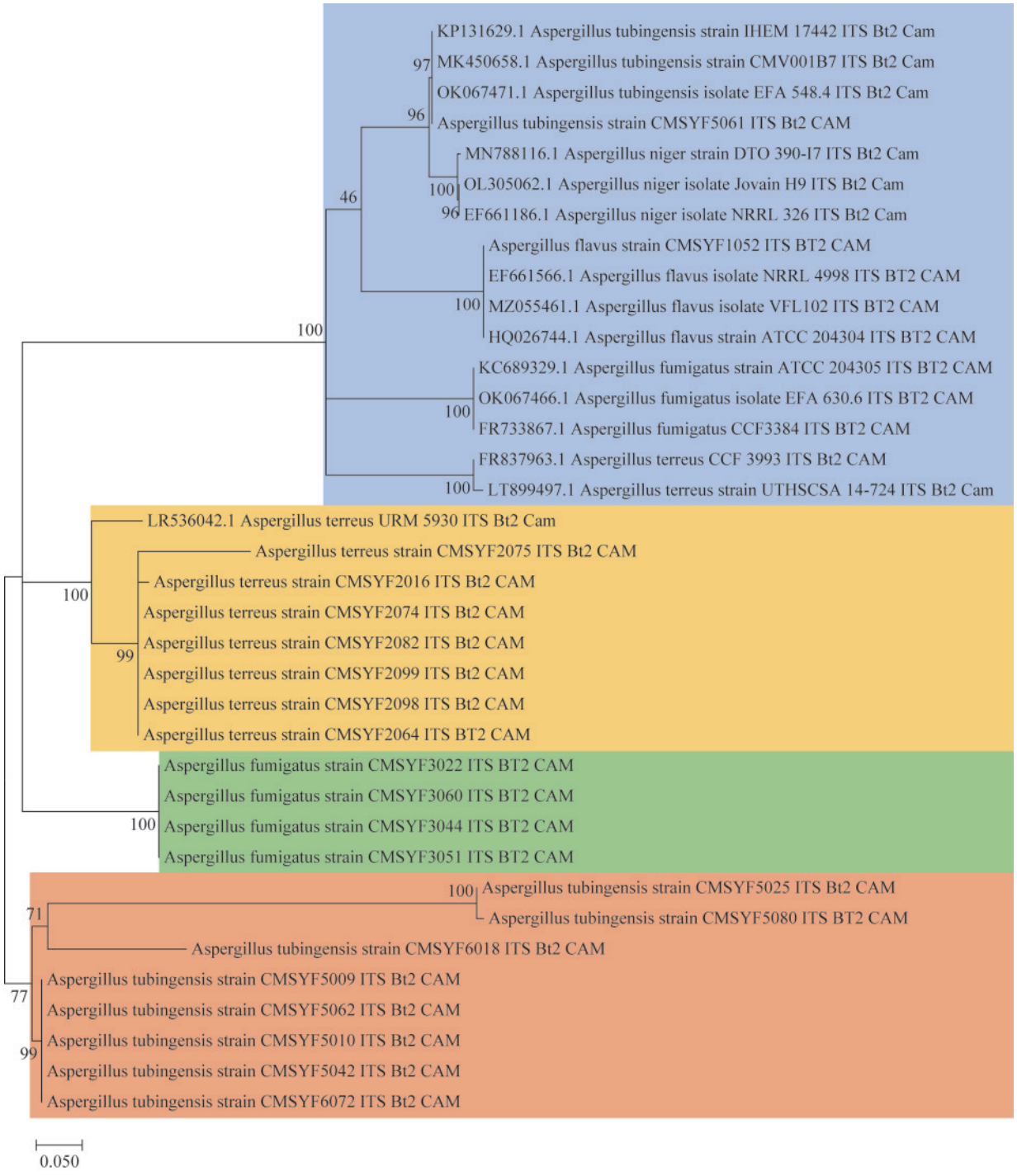

图2 曲霉菌多基因序列的系统进化树(最大似然法)

Fig 2 Phylogenetic tree of aspergillus multi-gene sequences (maximum likelihood method)

菌落的形式分离微生物来鉴别病原体,并且处理所需时间更短[14],但不足之处是无法体现菌株种间进化关系与遗传差异。通过基因测序技术进而构建系统进化树,着眼于菌株的DNA序列,菌种水平分辨能力更高,可以明确真菌菌株之间的进化关系与遗传差异。同菌株对各种抗真菌药敏感度不同,从而有助于治疗药物的选择,如土霉菌对两性霉素B有天然的耐药性[15]。

本研究中,培养鉴定结果显示13株曲霉菌被鉴定为黑曲霉菌,但通过测序鉴定,这些菌株被进一步细分为黑曲霉菌和塔宾曲霉菌。这表明本研究中形态学鉴定方法准确性较差,易受样品质量和操

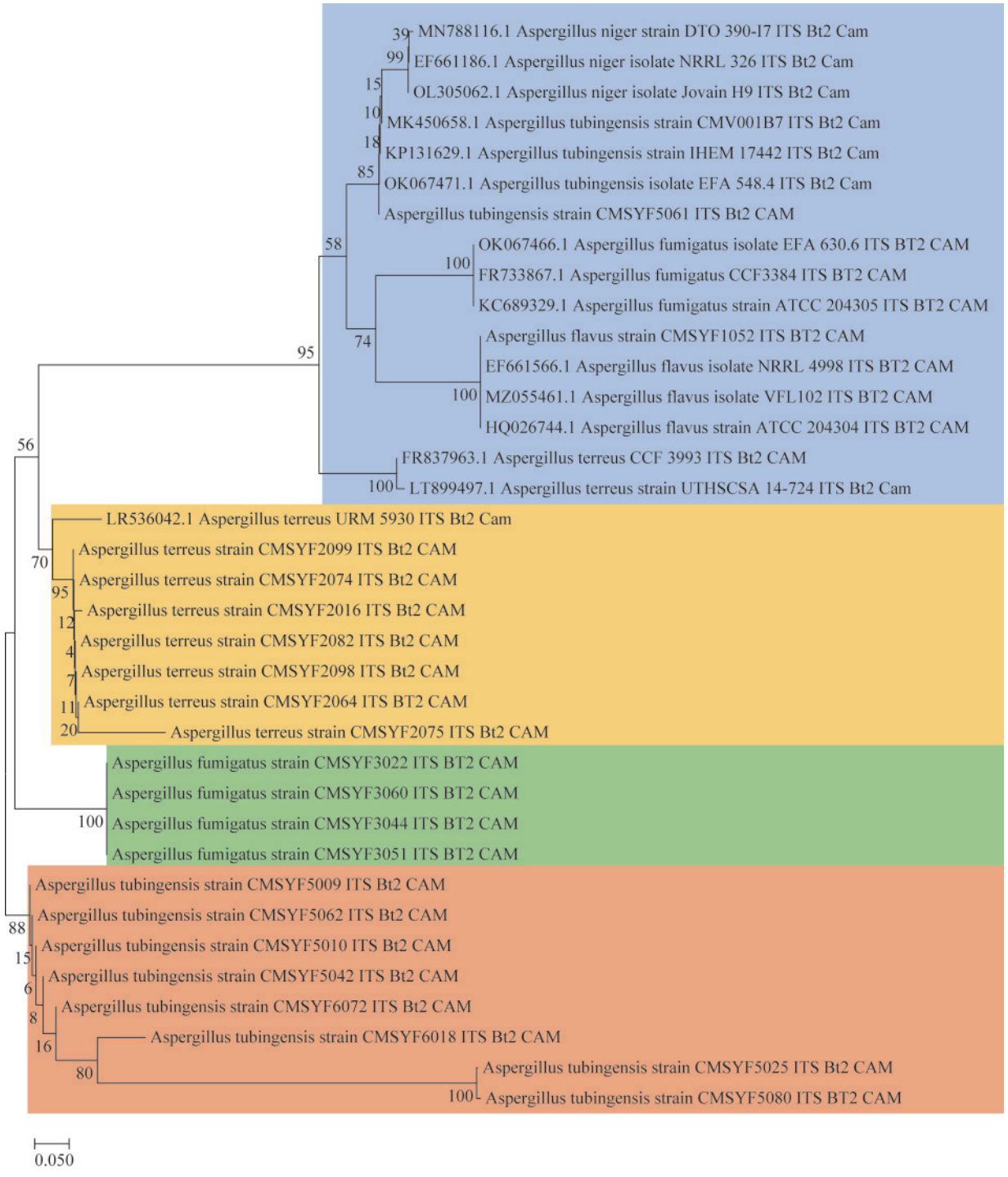

图3 曲霉菌多基因序列的系统进化树（邻接法）

Fig 3 Phylogenetic tree of aspergillus multi-gene sequences (neighbor-joining method)

作水平的影响。相比之下，PCR扩增后的基因测序技术（ITS/BenA/CaM）更为流行[16]，且显著提高了菌种鉴定的精准度。

在真菌性外耳道炎患者中，多数研究认为黑曲霉菌是最主要的病原真菌[17-18]，但本研究发现土曲霉菌也较为常见。这种差异可能与培养鉴定法的局限性有关，因为黑曲霉菌和塔宾曲霉菌在形态学上难以区分，也可能与地域性特点有关。因此，开展大范围乃至全国性的菌群研究具有重要意义。此外，研究发现鼓膜穿孔患者的病原真菌大多为丝状真菌，这提示真菌物种分类有助于探究其致病性与鼓膜穿孔的关系。

在基因测序的比对过程中,我们发现不同基因位点的比对效果存在差异。例如,CMSYF5061在ITS比对中与多种曲霉菌的序列相似度≥98%,难以鉴定到种水平;但在CaM序列比对中,此类情况几乎不存在。因此,综合多个位点的比对结果或构建系统进化树可以更准确地鉴定物种。总体而言,CaM序列比对效果优于ITS和BenA序列。

随着技术的发展,基因测序成本降低,临床真菌学也取得了显著进展。越来越多的病原性真菌被发现,其分类复杂且耐药谱多样。传统的形态学鉴定已无法满足临床需求,而基因测序结合序列分析技术更加准确。虽然通过进化树方法可以精确鉴别真菌种类,但用于临床诊断的人力成本与检测成本较高,患者经济负担较大。进一步降低进化树鉴定成本,普及到更多的患者,是未来研究拓展的方向之一。

此外,传统培养分离分析和外耳道分泌物测序分析可深入分析鼓膜穿孔的病因及菌株耐药情况[18-20],从而指导临床实践。精确鉴定菌株有助于发现新菌株类型,结合系统进化树构建可推进真菌分类和遗传多样性分析,进一步助力疾病的诊断和治疗。同时,菌株分析结果还可与耳内镜照片结合,利用机器学习模型开发自动诊断程序,辅助远程诊疗[21-22]。

本研究存在一定不足之处:未进行MALDI-TOF MS等技术的交叉验证,数据结果准确率有待提高;样品收集周期超过1年,鉴定价值受到一定的影响。在今后的研究中将研究结果与实际诊断的临床数据结合充分,可以更为全面地探究进化树对于实际治疗的参考作用。

未来,随着测序技术的进一步发展,构建系统进化树的方法需要更新以处理大批量数据,从而更好地理解基因序列的进化过程。此外,综合基因组和宏基因组数据[23],建立模型监测耐药基因的分布和传播,并结合跨学科方法开发个性化治疗策略,将是未来研究的重要方向。

作者贡献声明 沙勇芳 数据收集,结果分析,论文撰写。刘旭 数据整理,论文修订。陈敏 研究设计,数据整理,论文修订。刘建平 研究设计,论文构思和修订。

利益冲突声明 所有作者均声明不存在利益冲突。

参 考 文 献

[1] 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.
[2] 周珍,倪海峰,汤建国,等.外耳道真菌病的真菌鉴定及筛选敏感性药物治疗[J].中国耳鼻咽喉头颈外科,2014,21(3):157-158.
[3] 刘昊斓,阮岩.真菌性外耳道炎患者耳道环境菌群结构及多样性[J].菌物学报,2020,39(12):2251-2260.
[4] 李颖,徐英春.评价ITS,BenA和CaM序列分析在曲霉菌种鉴定方面的应用[J].中国真菌学杂志,2017,12(2):74-77.
[5] EZEONUEGBU BA, ABDULLAHI MD, WHONG CMZ, *et al*. Characterization and phylogeny of fungi isolated from industrial wastewater using multiple genes [J].*Sci Rep*,2022,12(1):2094.
[6] ZOU Y,ZHANG Z,ZENG Y,*et al*.Common methods for phylogenetic tree construction and their implementation in R[J].2024,11(5):480.
[7] LETUNIC I, BORK P. Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool[J].*Nucleic Acids Res*,2024,52(W1):W78-W82.
[8] HUSON DH, BRYANT D. The SplitsTree App: interactive analysis and visualization using phylogenetic trees and networks[J].*Nat Methods*,2024,21(10):1773-1774.
[9] CICCARELLI FD,DOERKS T,VON MERING C,*et al*. Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life[J].*Science*,2006,311(5765):1283-1287.
[10] 王晶,刘峰.系统进化树构建在临床病原微生物分析中应用的研究进展[J].现代医学,2024,52(3):510-514.
[11] VESTH TC, NYBO JL, THEOBALD S, *et al*. Investigation of inter- and intraspecies variation through genome sequencing of Aspergillus section Nigri [J]. *Nat Genet*,2018,50(12):1688-1695.
[12] 梁丽存,刘文龙,刘晓青,等.化学试剂对塔宾曲霉同源重组效率的影响[J].生物技术进展,2024,14(4):586-593.
[13] CHEN M,XU Y,HONG N,*et al*.Epidemiology of fungal infections in China[J].*Frontiers Med*,2018,12(1):58-75.
[14] ROBERT MG, CORNET M, AURÉLIE H, *et al*. MALDI-TOF MS in a medical mycology laboratory: on stage and backstage[J].*Microorganisms*,2021,9(6):1283.
[15] VAHEDI-SHAHANDASHTI R,DIETL AM,BINDER U, *et al*. Aspergillus terreus and the interplay with amphotericin B: from resistance to tolerance? [J]. *Antimicrob Agents Chemother*,2022,66(4):e0227421.

(下转第445页)