

荧光定量聚合酶链反应检测常见致病真菌方法的建立

韩学贞(河南省郸城县第二人民医院 477150)

【摘要】 目的 建立快速的检测临床致病真菌的荧光定量聚合酶链反应(PCR)方法。**方法** 使用真菌的通用引物 ITS86 和 ITS4,检测临床常见的致病性真菌,并观察检测方法的敏感性和特异性。**结果** 建立的荧光定量 PCR 可以准确地检测念珠菌属、曲霉菌属和新型隐球菌等常见的致病真菌,白色念珠菌的敏感性为 0.87 fg,光滑念珠菌的敏感性为 4.2 fg,与细菌和人类基因组 DNA 以及病毒 DNA 均无交叉反应,根据融解曲线的 T_m 值可以进行菌种的初步鉴定。**结论** 荧光定量 PCR 方法检测真菌的敏感性和特异性好,可以应用于临床进行快速检测。

【关键词】 荧光定量聚合酶链反应; 真菌; 念珠菌属; 曲霉菌属; 新型隐球菌

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.24.035 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2012)24-3112-01

Establishment of real-time PCR for detection of common pathogenic fungi HAN Xue-zhen(*The Laboratory Medicine of the Second People's Hospital of Dancheng, Henan 477150, China*)

【Abstract】 Objective To develop real-time PCR for rapid detection for clinical pathogenic fungi. **Methods** Clinical common pathogenic fungi were detected by universal primer ITS86 and ITS4, the sensitivity and specificity were assessed. **Results** *Candida*, *Aspergillus* and *Cryptococcus neoformans* could be detected accurately by real-time PCR. The sensitivity of *Candida albicans* was 0.87 fg, the sensitivity of *Candida glabrata* was 4.2 fg, it did not cross-react with bacteria, HBV DNA and human genome DNA. The strains could be identified according to T_m value of melting curve. **Conclusion** Real-time PCR method with high sensitivity and specificity can be applied in clinical test.

【Key words】 real-time PCR; fungi; candida; aspergillus species; cryptococcus neoformans

随着抗真菌药物以及免疫抑制剂的大量应用,临床机会性致病菌和耐药菌株越来越多,如念珠菌属和曲霉菌属感染,发病率 and 病死率也在逐年上升,常见的感染标本包括血液、痰液、分泌物等^[1]。传统的检测常见真菌的方法主要是培养法、显微镜检查和抗原检测等,但是这些方法耗时长、敏感性和特异性差,而且容易出现假阳性或假阴性结果^[2]。为了早期诊断和治疗真菌感染,需要快速敏感的检测方法,本文采用荧光定量聚合酶链反应(PCR)染料结合法检测致病性真菌,根据融解曲线的融解温度可以进行菌种的初步鉴别。

1 材料与方法

1.1 实验菌株 实验所用菌株包括白色念珠菌、热带念珠菌、光滑念珠菌、近平滑念珠菌、黑曲霉、烟曲霉和新型隐球菌,均是临床分离菌株,阴性对照菌为金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、乙型肝炎病毒 DNA 和人基因组 DNA(来自医院检验科)。

1.2 试剂与仪器 SYBR Premix(Takara)、酵母基因组 DNA 提取试剂盒(东盛生物)、细菌基因组 DNA 提取试剂盒、溶壁酶(sigma),Stratagene MX3005P 荧光定量 PCR 仪、ND-1000 分光光度计等。

1.3 方法

1.3.1 各菌株基因组 DNA 提取 挑取临床培养板上各菌株的单个菌落,加入沙保弱液体培养基中 37℃ 振荡培养 24 h,取 1 mL 菌悬液 10 000 r/min 离心 2 min,加入溶壁酶和缓冲液在 37℃ 温育 30 min,按照试剂盒说明提取基因组 DNA。

1.3.2 通用引物合成 根据文献[3]报道以及进行 BLAST 比对,选择真菌的通用引物 ITS86 和 ITS4^[4]进行扩增反应,序列为 ITS86: 5'-GTGAATCATCGAATCTTTGAAC-3', ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3',引物由上海 Invitrogen 公司合成。

1.3.3 荧光定量 PCR 在 Stratagene MX3005P 仪器上进行荧光定量 PCR,反应体系 20 μ L: SYBR Premix Ex Taq 10 μ L,上下游引物 ITS86、ITS4(10 μ M)各 0.4 μ L,ROX 内参染料 0.4 μ L,无菌去离子水 7.8 μ L,模板为 1 μ L,反应条件为 95

℃ 30 s, 95℃ 5 s, 60℃ 20 s 共 40 个循环,反应结束仪器自动进行融解曲线。

1.3.4 敏感性 & 特异性分析 使用核酸测定仪定量白色念珠菌和光滑念珠菌的基因组 DNA,并用无菌去离子水进行 10 倍的梯度稀释,白色念珠菌稀释为 87 pg/ μ L~0.87 fg/ μ L 共 6 种梯度,光滑念珠菌的浓度依次为 420 pg/ μ L~4.2 fg/ μ L 共 6 种梯度,使用上述建立的方法和反应体系分别检测两种菌的各梯度,观察检测敏感性。同时选取乙型肝炎病毒 DNA、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和人基因组 DNA 作为阴性对照,用无菌去离子水作为空白对照。

2 结果

2.1 PCR 扩增结果 使用上述建立的荧光定量 PCR 反应体系检测临床常见的致病性真菌,所选取的临床分离菌株均有明显的扩增曲线,说明所用引物可以正确的扩增出念珠菌属、曲霉菌属、新型隐球菌,而且扩增曲线呈标准的 S 型。

2.2 荧光定量 PCR 的敏感性 & 特异性 选取白色念珠菌和光滑念珠菌作为代表菌株,分别做 10 倍的梯度稀释,稀释成 6 种浓度梯度,每次反应加入 1 μ L 的模板,根据扩增曲线和 CT 值可以观察到本方法检测白色念珠菌的敏感性为 0.87 fg, CT 值为 39.8,光滑念珠菌的敏感性为 4.2 fg, CT 值为 38.6。ITS86 和 ITS4 这对引物并不能扩增细菌、病毒和人基因组 DNA,反应结果无扩增曲线,空白对照也无扩增曲线,说明特异性很好。

2.3 融解曲线和融解温度分析 上述荧光定量 PCR 反应体系融解曲线均为单一峰值,其中白色念珠菌和新型隐球菌的 T_m 值为 86.2℃,热带念珠菌为 83.7℃,光滑念珠菌为 85.2℃,近平滑念珠菌为 84.7℃,烟曲霉为 92.7℃,黑曲霉为 91.7℃,可以根据 T_m 值大小初步鉴定致病性真菌。

3 讨论

近年来,由于抗真菌药物和免疫抑制剂的广泛应用,深部真菌感染的发生率和病死率呈上升趋势。由于早期感染的临床症状不典型和诊断方法的缺陷,临床医生(下转第 3114 页)

常显著地高于健康对照组($P < 0.01$),经中西医结合治疗 2 周后则与健康对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),其升高的机制,初步认为是:(1)由于 COPD 是一种慢性病,常伴有免疫调节的紊乱,T、B 细胞比例失衡,造成 NO 水平升高。(2)患者常伴有血管张力提高和支气管管挛而引起缺氧和心功能障碍。(3)患 COPD 时机体在炎症介质刺激下激活了 NOS 从而产生较多的 NO。(4)由于患者受细菌或病毒的侵犯,其内毒素及多种细胞因子诱导器官及血管壁内的诱导型 NOS 合酶基因表达及蛋白质合成,继而催化合成并产生了过多的 NO 之故。NOS 在一些感染性疾病、休克等情况下活性增加,合成大量的 NO,参与对各种器官的损伤。本文检测结果表明,COPD 患者在治疗前血清 NOS 水平非常显著地高于健康对照组($P < 0.01$),经治疗 2 周后则与健康对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),其升高的机制可能是由于炎症等刺激引起的应激反应之故。

IL-10 是一种与免疫反应有密切关系的细胞因子,具有重要的抗炎作用,抑制巨噬细胞的活化,防止过度活化的巨噬细胞对宿主组织产生损伤,降低免疫活性 T 淋巴细胞的增殖^[5]。本文检测结果表明,COPD 患者在治疗前血清 IL-10 水平非常显著地高于健康对照组($P < 0.01$),经治疗 2 周后与健康对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。这一结果证实:血清 IL-10 可能抑制上述炎性细胞因子对 COPD 患者的炎性反应,参与了疾病的发生与发展。

IL-18 是具有多种免疫调节功能的细胞因子,能够促进 Th1 细胞增殖和 Th1 型免疫应答^[6]。本文检测结果表明,COPD 患者在治疗前 IL-18 水平非常显著地高于健康对照组($P < 0.01$),治疗 2 周后与健康对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),这一现象可以证明 IL-18 参与了 COPD 患者的免疫抑制损伤过程。

GM-CSF 是在炎症反应过程中由损伤内皮细胞释放的一种多肽类激素样造血生长因子^[7]。本文检测的结果表明,

COPD 患者在治疗前血清 GM-CSF 水平非常显著地高于健康对照组($P < 0.01$),经治疗 2 周后与健康对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),其升高的机理可能是患者体内淋巴细胞处于活化状态而使表达增多之故。

总之,作者认为,血清 NO、NOS、IL-10、IL-18 和 GM-CSF 可能以不同的方式参与了 COPD 的发病,其水平检测对了解病情、指导临床治疗具有重要的临床价值。

参考文献

- [1] 刘冀,刘伟,朱建忠,等.一氧化氮、一氧化氮合酶与肝性脑病关系的研究进展[J].现代中西医结合杂志,2011,20(19):2455-2457.
- [2] Eid AA, Lonsescu AA, Nixon LS. Inflammatory response and body Composition in chronic obstructive pulmonary diseases[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2004, 164(8): 1414-1418.
- [3] 中华医学会呼吸病分会.慢性阻塞性肺疾病诊治指南[J].中华结核和呼吸杂志,2002,25(8):453.
- [4] Griffiths, Stuehy DJ. Nitric oxide Synthesis properties and Catalytic mechanism[J]. Ann Rev physical, 1995, 57: 77-78.
- [5] 郭锦锦,孙万邦. IL-10 受体及其信号转导研究进展[J]. 临床医学工程, 2012, 19(1): 135-137.
- [6] 陈志芬,邓长生. IL-15、IL-18 的生物活性及其抗肿瘤机制的研究[J]. 医学新知杂志, 2011, 21(5): 372-373.
- [7] 田静,谢欣,周毅成,等.泛发性脓疱型银屑病患者皮损处 IL-8 及 GM-CSF 的检测[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2011, 27(12): 847-849.

(收稿日期:2012-10-11)

(上接第 3112 页)

往往进行经验性治疗。目前荧光定量 PCR 已经应用于真菌的早期诊断^[5-6],很多检测方法是根据真菌的保守序列设计的引物,如真菌的 18S rDNA、ITS 区段等,本研究选取的是常用的真菌通用引物 ITS86 和 ITS4,此对引物扩增的是 5.8S rDNA 和 28S rDNA 之间的 ITSⅡ 区的保守序列,具有较大的种属变异性,且种内变异性较低,可以识别更多的菌种^[7-8]。

荧光定量 PCR 操作简单,与普通 PCR 相比,无须进行琼脂糖凝胶电泳,通过扩增曲线就可观察结果。反应的敏感性和特异性高,最低检测限达到 fg 级别,与细菌、病毒和人类基因组 DNA 均无交叉反应。而且整个反应过程是在密闭的反应管中进行,极大地减少了反应产物的污染,整个过程仅需 2~3 h 即可完成。

本实验直接选用临床分离菌株提取基因组 DNA 进行扩增,能扩增出所选的所有菌株,说明这一方法可以直接应用于临床标本的检测。通过分析融解曲线发现,念珠菌属和曲霉属的 Tm 值差别比较大,在临床检测中可以进行菌属的鉴别,热带念珠菌和近平滑念珠菌与其他念珠菌可以粗略鉴别,有利于临床医生作出更详细的治疗措施。本研究所建立的荧光定量 PCR 可以快速的检测临床常见致病性真菌,为病原菌的早期诊断提供了帮助。

参考文献

- [1] 贺晨,孙鸿燕,邵丽筠,等.多重 PCR 结合基因芯片技术检测 11 种致病菌方法的建立[J].中国实验诊断学,

2011,15(4):45-46.

- [2] 赵林,张繁友.反转录 PCR 在真菌性角膜溃疡快速诊断中的价值[J].国际眼科杂志,2011,11(10):1758-1759.
- [3] 李丽丽,赵作涛,万喆,等.聚合酶链反应结合反向点杂交技术在检测及鉴定真菌性鼻窦炎常见致病曲霉菌中的应用[J].中华病理学杂志,2012,41(1):24-25.
- [4] Turenne CY, Sanche SE, Hoban DJ, et al. Rapid identification of Fungi by Using the ITS2 Genetic Region and an Automated Fluorescent Capillary Electrophoresis System[J]. J Clin Micro, 1999, 37(6): 1846-1851.
- [5] Soeta N, Terashima M, Gotoh M, et al. An improved rapid quantitative detection and identification method for a wide range of fungi[J]. J Med Micro, 2009, 58(8): 1037-1044.
- [6] Metwally L, Fairley DJ, Coyle PV, et al. Improving molecular detection of Candida DNA in whole blood: comparison of seven fungal DNA extraction protocols using real-time PCR[J]. J Med Micro, 2008, 57(3): 296-303.
- [7] 郭强,高志祥,张军东,等.实时荧光定量 PCR 快速鉴定五种常见念珠菌[J].中华皮肤科杂志,2010,43(3): 205-206.
- [8] 金敏,黄爱华,陈照立,等.常见致病真菌通用引物 PCR 检测技术研究[J].环境与健康杂志,2009,26(11):25-27.

(收稿日期:2012-11-14)