

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.09.010

## PCR 检测技术在真菌性角膜炎快速诊断中的应用\*

王 俊<sup>1</sup>, 王 宇<sup>1,2</sup>, 彭柿杰<sup>1</sup>, 冯 涛<sup>1</sup>, 唐卫东<sup>1</sup>

1. 攀枝花学院附属医院检验科, 四川攀枝花 617000; 2. 攀枝花学院医学院, 四川攀枝花 617000

**摘要:**目的 探讨聚合酶链反应(PCR)检测技术在真菌性角膜炎快速诊断中的应用。方法 留取攀枝花学院附属医院 502 例疑似感染性角膜炎患者角膜分泌物分别进行革兰染色镜检、真菌培养和 PCR 检测, 比较 3 种方法的检出率。结果 革兰染色镜检、真菌培养、PCR 检出率分别为 5.6%(28 例)、4.8%(24 例)、5.9%(30 例), 三者比较, 差异无统计学意义( $\chi^2=0.722, P=0.697$ )。结论 PCR 检测、革兰染色镜检和真菌培养 3 种方法对真菌性角膜炎的检出率无明显差异, PCR 检测具有能更快速地诊断真菌性角膜炎的特点。

关键词: 聚合酶链反应; 真菌性角膜炎; 分泌物

中图分类号: R446.9; R772.3

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2020)09-1183-03

## Application of PCR detection in rapid diagnosis of fungal keratitis\*

WANG Jun<sup>1</sup>, WANG Yu<sup>1,2</sup>, PENG Shijie<sup>1</sup>, FENG Tao<sup>1</sup>, TANG Weidong<sup>1</sup>

1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Panzhihua University, Panzhihua, Sichuan 617000, China; 2. Medical College, Panzhihua University, Panzhihua, Sichuan 617000, China

**Abstract:** Objective To explore the application of PCR detection in rapid diagnosis of fungal keratitis. **Methods** A total of 502 specimens of corneal secretions were taken from Affiliated Hospital of Panzhihua University by fungal smear, fungal culture and PCR detection. Then the results of the three methods were compared. **Results** In the 502 cases, 28 positive cases were observed by fungal smear (5.6%), 24 positive cases were observed by fungal culture (4.8%), 30 positive cases were observed by PCR detection (5.9%), there was no significant statistical difference in three methods ( $\chi^2=0.722, P=0.697$ ). **Conclusion** There was no significant difference on the diagnosis of fungal keratitis among PCR detection, fungal smear and fungal culture. PCR detection is more rapidly for the diagnosis of fungal keratitis.

Key words: PCR; fungal keratitis; secretions

真菌性角膜炎是由各种真菌引起的角膜病变, 早期诊断困难, 严重者可致盲<sup>[1]</sup>。快速诊断真菌性角膜炎有助于临床的诊治, 以及患者眼球和视力的恢复。本研究通过比较革兰染色镜检、真菌培养和聚合酶链反应(PCR)3 种检测方法在诊断真菌性角膜炎中的优缺点, 探讨 PCR 检测技术在真菌性角膜炎的快速诊断中的应用价值, 现报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集攀枝花学院附属医院 2016 年 1 月至 2018 年 12 月收治的 502 例疑似感染性角膜炎的患者为研究对象, 其中男 320 例, 女 182 例; 年龄 1~87 岁, 平均(53.36±18.56)岁。

**1.2 仪器与试剂** 革兰染液和乳酸酚棉兰染液均购自珠海贝索生物技术有限公司; 沙保罗平板购自郑州安图生物有限公司; 实时荧光定量 PCR 仪、电泳仪和凝胶电泳成像系统购自美国伯乐生命科学产品有限公司; 核酸提取试剂盒购自广东凯普生物科技股份有限公司; PCR 引物的合成和测序均由苏州金唯智公司

完成。

**1.3 方法** 眼科医生根据患者临床症状和病史, 进一步做裂隙灯和激光共焦显微镜检查, 对出现角膜溃疡患者刮取角膜分泌物分别做革兰染色镜检、真菌培养和 PCR 检测。

**1.3.1 革兰染色镜检** 由眼科医生无菌操作刮取患者角膜病变部位组织, 制成涂片, 自然干燥后火焰固定, 然后进行革兰染色, 最后采用油镜进行镜检。

**1.3.2 真菌培养** 取涂片的同时, 将角膜分泌物分别接种于两块沙保罗平板, 分别放置于 28℃ 和 35℃ 培养箱中培养 7 d, 每天观察, 长出可疑菌落进一步做乳酸酚棉兰染色鉴定。

**1.3.3 PCR 检测** (1) PCR 引物设计, 参考文献[2], 选择内转录间隔区 1 (ITS1) 和内转录间隔区 4 (ITS4) 为真菌通用型引物, 分别为 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG-3' 和 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'。因为菌种的差异, ITS1 和 ITS4 可扩增出 500~600 bp 不等的片段。(2) 真菌 DNA

\* 基金项目: 四川省卫生和计划生育委员会科研课题(17PJ428)。

作者简介: 王俊, 女, 副主任技师, 主要从事临床微生物检验研究。

的提取,将清洗液 1.0 mL 加入标本中,振荡;将振荡均匀的液体转至 1.5 mL 离心管,以 13 000 r/min 转速离心 5 min,弃去上清液;再次加入 1.0 mL 清洗液,振荡重悬,以 13 000 r/min 转速离心 5 min,弃去上清液;将核酸提取液 100  $\mu$ L 加入沉淀,重悬,将提取固形物 1 管加入后,高速涡旋振荡 5 min 后,瞬时离心;然后置 95  $^{\circ}$ C 干浴 2 min,马上冰浴 5 min,立刻以 13 000 r/min 离心 5 min,上清液即为 PCR 反应的模板(保存温度-20  $^{\circ}$ C)。(3) PCR 反应,用上述提取的真菌 DNA 为模板,用真菌通用引物扩增相应的片段。反应体系:25  $\mu$ L Mix 溶液、1.5  $\mu$ L 上/下游引物、1  $\mu$ L 模板 DNA,双蒸馏水加至 50  $\mu$ L。反应条件:94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94  $^{\circ}$ C 变性 1 min,55  $^{\circ}$ C 退火 1 min,72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 个循环;72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取扩增产物 5  $\mu$ L 做 1% 琼脂糖凝胶电泳,观察是否有特异性扩增条带。(4) PCR 扩增产物分析,电泳后,如果有目标带出现,则纯化 PCR 产物,外送测序。电泳出现阳性结果,则登录 Gen-Bank,使用 Blast 对测序结果进行同源性比对,进而鉴定菌株。如果是同一属,序列同源性大于 97%;如果是同一种则大于 99%;如果是阴性结果则不会出现特异性扩增条带。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据处理及统计分析。计数资料以例数或百分率表示,多组间比较采用  $\chi^2$  检验,多组间的两组比较采用 Fisher 确切概率法比较。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 革兰染色镜检结果** 502 份角膜分泌物革兰染色镜检检出阳性 28 例,检出率为 5.6%。

**2.2 真菌培养结果** 502 份角膜分泌物真菌培养检出阳性 24 例,检出率为 4.8%,检出真菌种属见表 1。

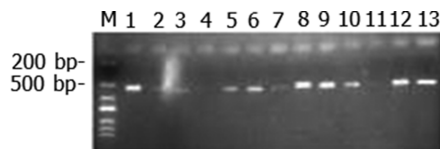
表 1 PCR 检测和真菌培养结果[n(%)]

检测方法	n	镰刀菌属	曲霉菌属	青霉菌属	赛多孢菌	其他丝状真菌
PCR 检测	30	21(70.0)	3(10.0)	2(6.7)	3(10.0)	1(3.3)
真菌培养	24	16(66.7)	3(12.5)	2(8.3)	2(8.3)	1(4.2)
$\chi^2$		0.069	0.000	0.000	0.000	0.000
P		0.793	1.000	1.000	1.000	1.000

**2.3 PCR 检测结果** 用 ITS1 和 ITS4 对 502 例疑似患者的角膜分泌物标本直接进行 PCR 检测,扩增结果见图 1。扩增出的目的片段约 500 bp。共检出阳性 30 例,检出率 5.9%,检出真菌种属见表 1。PCR 检测结果为阳性的 30 例患者中,23 例为农民(76.7%),7 例为非农民(23.3%);15 例为男性(50.0%),15 例为女性(50.0%)。PCR 检测结果为阳性的 30 例患者中,革兰染色镜检 28 例阳性,真菌培养 24 例阳性。

**2.4 3 种方法检测结果的比较** 502 份角膜分泌物中,PCR 检测的检出率最高,为 5.9%(30/502);革兰

染色镜检检出率次之,为 5.6%(28/502);真菌培养检出率最低,为 4.8%(24/502)。但三者比较,差异无统计学意义( $\chi^2 = 0.722, P = 0.697$ )。



注:M 为 DNA 标记物;4、11 为阴性结果;1~3、5~10、12、13 为阳性结果。

图 1 PCR 扩增结果

**3 讨 论**

PCR 检测出的菌株中,镰刀菌属最多,为 70.0%,曲霉菌属次之,为 10.0%,与某些国内报道的镰刀菌属占 63.2%,曲霉菌属占 14.1% 等数据接近<sup>[3-6]</sup>。30 例 PCR 检测结果阳性的病例中:23 例为农民,占检出人群的 76.7%;男女患者各 15 例,各占 50.0%,与胡卫萍等<sup>[7]</sup>报道的男性患者占 67% 和女性患者占 33% 略有不同。我国大于 60% 的真菌性角膜炎的发生与角膜植物外伤史密切相关<sup>[8]</sup>。自然环境中广泛存在镰刀菌属和曲霉菌属等植物致病性真菌<sup>[9]</sup>,农民由于频繁地从事农业生产活动,角膜容易被植物叶子及枝条等划伤,引起真菌性角膜炎可能性更大<sup>[10]</sup>。

近年来,真菌性角膜炎感染发生率增加了数倍,呈明显上升趋势<sup>[11]</sup>,由此导致角膜穿孔的风险也比细菌性角膜炎高出 5~6 倍<sup>[12]</sup>,同时也增加了患者手术风险<sup>[13-15]</sup>,及早诊断和治疗显得尤为关键。但是目前,真菌性角膜炎的早期诊断面临重重窘境:首先,真菌性角膜炎早期临床表现不具有典型特征,容易与细菌或阿米巴等微生物引起的角膜炎混淆,导致出现误诊。其次,传统的实验室检查,如革兰染色镜检和真菌培养难以做到既快速又准确。革兰染色镜检简单、快速<sup>[16-17]</sup>,可多部位多次取材,提高检出率,缺点是不能将所见真菌准确鉴定到种属,临床医生只能经验性治疗,容易延误病情。真菌培养物染色后,采用显微镜观察菌丝和孢子仍然是诊断真菌性角膜炎的金标准<sup>[18-19]</sup>,有助于医生合理治疗,但需耗费 2~7 d,甚至更长的时间,同时标本受污染的风险较高。

PCR 检测技术以准确、快速、特异、敏感和标本用量少等优点受到临床一线工作者的青睐,研究者们也尝试用分子生物的手段对真菌性角膜炎进行快速诊断。本研究中,革兰染色镜检、真菌培养和 PCR 检测的检出率差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),PCR 检测和真菌培养检测的真菌种属比较,差异也无统计学意义( $P > 0.05$ ),表明 PCR 检测的检出率及对真菌种属的鉴定能力可与另外两种方法媲美,且 PCR 检测的优势更加突出:数小时内直接将标本中少量真菌初步鉴定到属或种,大大缩短了检测周转时间(TAT),能尽快给临床医生提供准确诊断的依据和有效治疗的方

向,既让患者及时得到最佳的治疗,也为患者节省了医疗费用,同时减少了真菌耐药性的发生。但是,对非致病性 DNA 的扩增可造成过度诊断<sup>[20]</sup>,不应将 PCR 检测作为常规诊断真菌性角膜炎的唯一方法,可联合其他方法提高诊断的准确性。本研究中,PCR 检测的检出率偏低,可能与医生的取材、患者在入院之前就自行使用各种滴眼液和积累的分析数据量不够大等有密切的关系,具体原因有待进一步探讨。

综上所述,PCR 检测、革兰染色镜检和真菌培养 3 种方法对真菌性角膜炎的检出率无明显差异,但 PCR 检测的时效性有明显优势,在快速诊断方面具有广阔前景。

参考文献

[1] 陈辉.聚维酮碘外用联合抗真菌药物治疗真菌性角膜炎患者的效果观察[J].中国生化药物杂志,2017,37(4):223-225.

[2] 鲁辛辛,耿佳靖,李云川,等.ITS 序列鉴定真菌性鼻窦炎病原的方法评价[J].中华检验医学杂志,2010,33(2):126-131.

[3] 鹿秀海,高彦,张莉,等.真菌性角膜炎 334 例的病原学分析[J].中华眼科杂志,2013,49(1):12-15.

[4] 陈晓莲,刘红山,何宏,等.中国热带地区真菌性角膜溃疡致病菌种类及药物敏感性分析[J].中华实验眼科杂志,2017,35(2):156-160.

[5] 张阳,王智群,孙旭光,等.2007 至 2016 年我国北方地区真菌性角膜炎病原学及药物敏感性分析[J].中华眼科杂志,2018,54(6):432-436.

[6] 龚桦,谭奕炜,龚向明,等.中国华南地区真菌性角膜炎致病菌谱变化[J].中华实验眼科杂志,2017,35(2):161-164.

[7] 胡卫萍,林琳,周宏伟,等.浙北地区 197 例真菌性角膜感染特征分析[J].中华医院感染学杂志,2018,28(9):1327-1329.

[8] 刘棒,高菊.食药真菌药理作用及草菇潜在的致癌性探讨[J].中国卫生工程学,2015,25(5):385-387.

[9] 贺丹,万雪,高嵩,等.真菌性角膜炎的病原学分析及鉴定

[J].中华微生物学和免疫学杂志,2014,34(1):19-22.

[10] 陈基黎.182 例真菌感染性角膜炎临床特征及致病菌分布特征分析[J].北华大学学报(自然科学版),2017,18(5):656-658.

[11] BADIEE P,ALBORZI A,NEJABAT M. Detection of Aspergillus keratitis in ocular infections by culture and molecular method[J]. Int Ophthalmol,2011,31(4):291-296.

[12] KEAY L J,GOWER E W,IOVIENO A, et al. Clinical and microbiological characteristics of Fungal Keratitis in the United States,2001-2007:a multicenter study[J]. Ophthalmology,2011,118(5):920-926.

[13] 邓先明,王丽娅,孙声桃,等.真菌性角膜炎致病菌属与疾病预后的关系[J].中国实用眼科杂志,2014,32(7):824-828.

[14] 程钧,翟华蕾,王君怡,等.角膜后部真菌感染的临床特点和治疗策略[J].中华眼科杂志,2017,53(10):758-765.

[15] 祁媛媛,张立军,董贺,等.前节 OCT 辅助准分子激光治疗性角膜切削术治疗真菌性角膜溃疡[J].眼科新进展,2017,37(3):263-266.

[16] KAMEL W H,KATAIA E M. Comparison of the efficacy of smear clear with and without a canal brush in smear layer and debris removal from instrumented root canal using waveone versus protaper;a scanning electron microscopic study[J]. J Endod,2014,40(3):446-450.

[17] 张晓燕,许洁.真菌性角膜炎的早期诊断与治疗方法[J].中国实用医药,2015,10(7):191-192.

[18] 刘素媛,张岸平,单秀水,等.唐山地区真菌性角膜炎的病原学分析及诊断[J].中国实用眼科杂志,2013,31(7):884-886.

[19] 王友沛,顾云峰,徐一.温州地区真菌性角膜炎流行病学特征分析[J].中国卫生检验杂志,2015,25(19):3364-3368.

[20] SUGITA S,KAMO I K,OGAWA M, et al. Detection of Candida and Aspergillus species DNA using broad-range real-time PCR for fungal endophthalmitis [J]. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol,2012,250(3):391-398.

(收稿日期:2019-09-09 修回日期:2019-12-09)

(上接第 1182 页)

[9] OH H J,PARK H Y,KIM K H, et al. Progastrin-releasing peptide as a diagnostic and therapeutic biomarker of small cell lung cancer[J]. J Thorac Dis,2016,8(9):2530-2537.

[10] 卢兴兵,石佳,李勤,等.血清肿瘤标志物在诊断转移性肺癌中的临床价值[J].检验医学与临床,2018,15(2):179-182.

[11] KAMATA K,UCHIDA M,TAKEUCHI Y, et al. Increased serum concentrations of pro-releasing peptide in patients with renal dysfunction[J]. Nephrol Dial Transplant,1996,11(7):1267-1270.

[12] DONG A R,ZHANG J L,CHEN X B, et al. Diagnostic value of ProGRP for small cell lung cancer in different stages[J]. J Thorac Dis,2019,11(4):1182-1189.

[13] QU T,ZHANG J,XU N, et al. Diagnostic value analysis of combined detection of Trx,CYFRA21-1 and SCCA in lung cancer[J]. Oncol Lett,2019,17(5):4293-4298.

[14] CHEN F,WANG X Y,HAN X H, et al. Diagnostic value of Cyfra21-1, SCC and CEA for differentiation of early-stage NSCLC from benign lung disease[J]. Int J Clin Exp Med,2015,8(7):11295-11300.

[15] QIAO Y F,CHEN C,YUE J, et al. Tumor marker index based on preoperative SCC and CYFRA 21-1 is a significant prognostic factor for patients with resectable esophageal squamous cell carcinoma[J]. Cancer Biomark,2019,25(3):243-250.

(收稿日期:2019-09-29 修回日期:2020-01-20)