

• 临床检验研究论著 •

基于 ITS2 序列诊断临床深部真菌感染的初步研究

凌步致, 吴奎海, 马均宝, 何艳嫦, 崔东岚, 吴智刚

(广东省佛山市第一人民医院检验科, 广东佛山 528000)

摘要:目的 建立以 ITS2 为靶序列的 PCR 方法诊断临床深部真菌感染, 并进行初步研究。方法 用通用引物扩增纯菌落和临床标本的 ITS2 区域, 对 PCR 产物测序, 测序结果在 GenBank 中进行 Blastn 等分析, 以此来鉴定真菌属种。结果 10 种常见致病性真菌纯菌落和 10 例临床标本的 DNA 测序结果均与表型鉴定符合。结论 以 ITS2 为靶序列的 PCR 可成为临床快速诊断深部真菌感染的重要方法之一。

关键词: 内部转录间隔区; 转录间隔区 2; 深部真菌感染

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.11.008

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)11-1365-02

Identification of invasive fungal infections by sequence analysis of the internal transcribed spacer region 2

Ling Buzhi, Wu Kuihai, Ma Junbao, He Yanchang, Cui Donglan, Wu Zhigang

(Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Foshan, Foshan, Guangdong 52800, China)

Abstract: Objective To investigate the feasibility of using sequencing of the ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) for identification of invasive fungal infections. Methods Amplification and sequencing of internal transcribed spacer 2 (ITS2) region of fungi DNA from fungal isolates and clinical specimens. Searches of current nucleotide databases in GenBank were carried out with the BLAST algorithm. Results 10 common fungal isolates were accurately detected and 83% (10/12) invasive fungal infections cases were identified. Conclusion PCR targeting internal transcribed spacer 2 permits rapid and reliable identification of fungal species from clinical specimens.

Key words: internal transcribed spacer; ITS2; invasive fungal infection

随着免疫力低下及严重免疫系统缺陷患者的增多, 尤其是器官移植、血液病患者、恶性肿瘤患者的增多, 免疫抑制剂、抗肿瘤药物、广谱抗菌药物的广泛应用, 临床深部真菌感染病例增多且病情复杂, 对该类疾病的早期诊断对抗真菌治疗效果相当关键。随着分子生物学的飞速发展、生物信息学的兴起以及测序技术的逐步提高, 分子生物学早期诊断深部真菌感染更加便利。本文主要以真菌的内部转录间隔区 2 (internal transcribed spacer 2, ITS2) 为靶序列^[1-2], 建立普通 PCR 扩增方法并结合测序, 以此来快速诊断深部真菌感染。

1 材料与与方法

1.1 真菌菌株 临床常见致病性真菌菌株由南方医科大学南方医院微生物室惠赠, 包括白色念珠菌、热带念珠菌、近平滑念珠菌、克柔念珠菌、光滑念珠菌、烟曲霉菌、黄曲霉菌、黑曲霉菌、土曲霉菌、新生隐球菌、马尔尼菲青霉菌。

1.2 临床标本 2011 年 1~12 月收集临床真菌感染患者血清标本和血培养标本(确证证据为血培养真菌阳性并经表型鉴定), 健康体检和菌血症患者外周血标本作为阴性对照。

1.3 仪器与试剂 德国 Eppendorf 公司的 PCR 扩增仪器, Bio-Rad 公司的凝胶成像仪。TaqDNA 聚合酶、dNTPs、蛋白酶 K 均为 TaKaRa 公司产品。Tris 饱和酚、氯仿、异戊醇、10% 十二烷基磺酸钠(SDS)、溶菌酶、核酸试剂盒提取试剂盒均为北京鼎国生物技术有限公司产品。Lyticase 酶为 Sigma 公司产品。

1.4 纯菌落 DNA 提取 真菌菌株的 DNA 提取采用 TaKaRa 公司试剂盒(Lysis Buffer for Microorganism to Direct PCR)提取。具体步骤如下: (1) 50 μ L Lysis Buffer for Microorganism to Direct PCR 于灭菌的 EP 管中。(2) 用灭菌枪头挑取单菌落, 置于 EP 管中搅动几下后取出。(3) 80 $^{\circ}$ C 热变性 15 min 后, 低速离心, 取 1~5 μ L 裂解后的上清液作为 PCR 反应的

模板。

1.5 临床标本 DNA 提取 提取参照张梦宇等^[3]的方法。(1) 选用血清标本, 4 000 r/min 离心 8 min, 上层血清移入新的 1.5 mL EP 管中, 新管 13 000 r/min 离心 8 min, 弃上清。(2) 加入 100 mmol/L Tris 缓冲液 100 μ L (含 lyticase 酶), 振荡混匀, 37 $^{\circ}$ C 水浴 1 h。(3) 加入蛋白酶 K, 37 $^{\circ}$ C 水浴 4 h。(4) 用核酸试剂盒, 按照说明书步骤提取 DNA。

1.6 PCR 反应体系 选取扩增真菌 ITS2 序列的通用引物^[3], ITS86-F: 5'-gtg aat cat cga atc ttt gaa c-3', ITS4-R: 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3', 目的片段 194~494 bp。PCR 反应总体积 50 μ L, 10 \times buffer 5 μ L, dNTP 终浓度为 200 μ mol/L, 上下游引物终浓度分别为 0.2 μ mol/L, DNA 模板 5 μ L, TaqDNA 聚合酶 1.25 U, 加入灭菌去离子水至 50 μ L。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 57 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 PCR 产物 5 μ L, 加 1 μ L 6 \times 缓冲液上样, 1.5% 琼脂糖电泳, 使用 5 μ L DL1000 相对分子质量标准。

1.7 PCR 产物测序及序列分析 对 PCR 产物纯化后送华大基因科技公司测序, 测序引物使用 PCR 扩增引物。在 GenBank 中(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)应用 blas 对获得的基因片段进行同源性检索, 真菌 ITS2 序列分析参考文献的标准, 序列同一性(identity) 大于或等于 97% 定义到属的水平, \geq 99% 定义到种的水平^[4]。

2 结果

2.1 真菌菌株 ITS2 序列扩增及分析 ITS2 序列通用引物扩增 10 种真菌的 PCR 产物, 电泳显示均出现单个阳性条带, 范围在 200~500 bp 左右。阴性对照鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、结核分枝杆菌、大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、人类血细胞基因组均扩增阴性。选取 10 种类型真菌的

PCR 扩增产物进行测序,序列分析结果均与表型鉴定的属种符合。

2.2 临床标本 ITS2 序列扩增及分析 12 例确诊深部真菌感染的患者,血培养菌阳性并经表型鉴定。白色念珠菌感染 8 例,烟曲霉菌感染 2 例,马尔尼菲青霉菌感染 2 例。12 例患者的外周血标本 DNA 10 例 PCR 扩增阳性(2 例白色念珠菌 PCR 扩增阴性),2 例健康体检者和 2 例败血症患者(1 例金黄色葡萄球菌感染和 1 例大肠埃希菌感染)PCR 扩增阴性。PCR 扩增阳性产物测序结果分析与表型鉴定符合,部分测序结果见图 1、2。

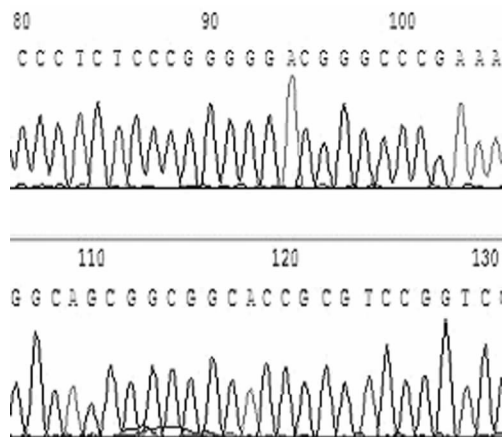


图 1 烟曲霉菌 ITS2 区域的部分测序图

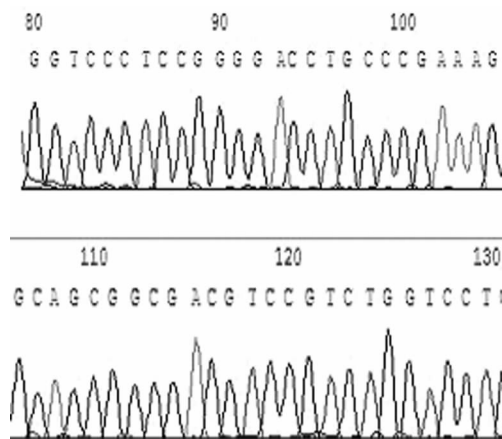


图 2 马尔尼菲青霉菌 ITS 区域的部分测序图

3 讨论

目前诊断深部真菌感染的主要有显微镜检查、培养检查、血清学试验、分子生物学方法。传统显微镜检查受检验人员的技术熟练程度和标本的采集方法、部位和时机等诸多主观因素的影响,有时不能够得到客观的阳性结果。培养其所需时间长,报告结果的时间长达数周,也给临床医生的工作带来极大不便,常常延误了患者的最佳治疗时机。血清方法学诊断主要包括 1,3-β-D-葡聚糖和曲霉半乳甘露聚糖(GM)检测,不同区别真菌的属种^[5-6],而且容易产生假阳性^[7-8]。PCR 方法具有较高的灵敏度和特异性,能鉴定真菌到种的水平,能指导临床合理使用药物。ITS2 区域位于 5.8S 和 28S 之间,常用于真菌的系统进化分析,是分子生物学鉴定临床致病性真菌的理想靶序列^[9-11]。

在本研究中,ITS2 检测临床常见致病性真菌和细菌的纯菌落,显示了良好的鉴别能力。但在检测临床标本时有 2 例白

色念珠菌感染 PCR 扩增是阴性,一方面可能与患者血浆中的真菌负荷量、接受过抗真菌药物治疗有关,另一方面也可能与 DNA 提取效果相关。由于空气中存在真菌孢子,而且 PCR 容易产生携带污染^[12],所以在日常检测中做好无菌操作,紫外线消毒试剂,可以用两次不同批次 PCR 检测同时阳性作为诊断标准,从而提高检测的特异性。由于真菌的细胞壁比较坚硬,由几丁质、葡聚糖、甘露聚糖等组成,DNA 提取效果直接影响到 PCR 扩增效率。对于两种或两种属种真菌感染,本方法的测序结果比将无法鉴别具体属种,但这种情况在临床上很少见。在本研究中,仅涉及临床血液标本,其他深部真菌送检标本如脑脊液、肺泡灌洗液、支气管分泌物、胸腹水标本均没有纳入,对这些标本所含真菌 DNA 提取方法还需要进一步的优化。

由于本试验初步研究,采用回顾性分析,纳入标本相对较少,在今后的临床评价中,应采用前瞻性研究和双盲试验,按照临床深部感染的诊断标准确定金标准。总之,ITS2 具有种类较大的属种变异性且种类变异性较低,加上测序技术的快速、成本逐步降低,以 ITS2 为靶序列的 PCR 方法可成为临床快速诊断深部真菌感染的重要方法之一。

参考文献

- [1] Leaw SN, Chang HC, Sun HF, et al. Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(3): 693-699.
- [2] Landlinger C, Preuner S, Willinger B, et al. Species-specific identification of a wide range of clinically relevant fungal pathogens by use of Luminex Xmap technology[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(4): 1063-1073.
- [3] 张梦宇, 郑磊, 何岳林, 等. 实时荧光定量 PCR 检测血中曲霉菌基因的实验研究[J]. 临床检验杂志, 2007, 25(4): 283-285.
- [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 Microbiol, 1999, 37(6): 1846-1851.
- [5] 素飞, 朱文秀, 褚云卓, 等. 1,3-β-D-葡聚糖在诊断深部真菌感染中的意义[J]. 微生物学杂志, 2012, 32(5): 88-91.
- [6] 余进, 李若瑜. 侵袭性曲霉病的诊断进展[J]. 中华医学检验杂志, 2008, 31(2): 133-136.
- [7] 史利宁, 邵海枫, 李芳秋. 侵袭性真菌感染的血清学诊断[J]. 临床检验杂志, 2010, 28(2): 94-96.
- [8] 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.
- [9] 燕勇, 李卫平, 高雯洁. rDNA-ITS 序列分析在真菌鉴定中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(10): 1958-1961.
- [10] Barnes RA. Early diagnosis of fungal infection in immunocompromised patients[J]. J Antimicrob Chemother, 2008, 61 Suppl 1: i3-i6.
- [11] Zeng X, Kong F, Halliday C, et al. Reverse line blot hybridization assay for identification of medically important fungi from culture and clinical specimens[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(9): 2872-2880.
- [12] 杨朝国, 周忠华, 杨敏. 聚合酶链反应检测真菌感染的临床评价[J]. 临床检验杂志, 2003, 21(2): 104-105.

(收稿日期: 2013-01-11)