

• 临床检验研究论著 •

穿刺引流液中病原性真菌的 ITS 测序研究

黄君华¹, 张书婉², 张 宁³

(1. 西安医学院医学技术系, 陕西西安 710021; 2. 西安市儿童医院检验科, 陕西西安 710003;
3. 西安交通大学医学院第一附属医院检验科, 陕西西安 710061)

摘 要:**目的** 探讨内部转录间隔区(ITS)测序用于快速检测穿刺引流液中病原性真菌的价值。**方法** 采用临床常见的 14 种细菌和 4 种真菌及人类基因组 DNA 验证真菌通用引物(ITS1/ITS4 和 ITS3/ITS4)的特异性和敏感性;采集 90 例临床疑似真菌感染患者的穿刺引流液标本 10 mL, 其中 8 mL 用于常规真菌培养, 剩余 2 mL 用于提取真菌 DNA 并分别用 ITS1/ITS4 和 ITS3/ITS4 作为引物进行扩增, 将阳性扩增产物测序并与 BLAST 比对, 将测序法与培养法的阳性率结果进行统计学比较。**结果** 14 种细菌及人类基因组扩增产物均为阴性, 4 种真菌扩增产物为阳性。ITS3/ITS4 和 ITS1/ITS4 的最低检测限分别为 10² CFU/mL 和 10³ CFU/mL。90 例标本培养阳性率为 4.44%(4/90), 测序法阳性率为 12.22%(11/90), 二者差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 引物 ITS1/ITS4 和 ITS3/ITS4 的特异性良好, 后者较前者扩增敏感性更高;测序真菌 ITS 区可作为临床快速检测穿刺引流液中病原性真菌感染的方法。

关键词: 穿刺引流液; 病原性真菌; 内部转录间隔区; 测序; 快速检测
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.12.025 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2014)12-1580-03

Detection of the pathogenic fungi from the puncture fluid by sequencing the ITS region

Huang Junhua¹, Zhang Shuwan², Zhang Ning³

(1. Department of Medical Technology, Xi'an Medical University, Xi'an, Shaanxi 710021, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Xi'an Children's Hospital, Xi'an, Shaanxi 710003, China; 3. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital, School of Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710061, China)

Abstract:**Objective** To explore the value of sequencing internal transcribed spacer(ITS) in identification of pathogenic fungi species from the puncture fluid. **Methods** The specificities and sensitivities of primers(ITS1/ITS4 and ITS3/ITS4) were validated by using 14 kinds of bacteria, 4 kinds of fungi and human DNA. 90 cases of clinical patients with suspected fungal infections were enrolled. 10 mL puncture drainage fluid was collected from each patient, and 8 mL in which was cultured and the rest 2 mL was used for DNA extraction and PCR detection with ITS1/ITS4 and ITS3/ITS4 as primers. The positive PCR products were compared with BLAST, and the results were analyzed statistically. **Results** PCR products of bacteria and human DNA were negative, which of fungi were positive. The lowest detectable limits of ITS1/ITS4 and ITS3/ITS4 were 10³ CFU/mL and 10² CFU/mL, respectively. Of the 90 cases of puncture drainage fluid samples, the cultivation positive rate was 4.44%(4/90), PCR positive rate was 12.22%(11/90), and the difference was statistically significant($P<0.05$). **Conclusion** ITS1/ITS4 and ITS3/ITS4 are well in specificity, but sensitivity of ITS3/ITS4 is higher than ITS1/ITS4. ITS region sequencing will become a quick method of detecting fungal infection in the puncture fluid.

Key words: puncture fluid; pathogenic fungi; internal transcribed spacer; sequencing; rapid detection

近几年院内真菌感染率呈明显的上升趋势,尤其在免疫功能不全患者(如血液系统恶性肿瘤患者、ICU 患者)中,真菌感染的发病率和病死率不断增加^[1-3]。然而临床对真菌感染依然缺乏快速、准确的诊断方法^[4]。目前主要采用的真菌培养法耗时、费力,不能满足临床早期诊断的需求。测序法能直接从体液标本中快速而准确地将病原真菌鉴定到种,具有良好的应用前景,而且对流行病学研究意义重大。真菌核糖体 DNA 含有 2 个内部转录间隔区(ITS),分别为 ITS1 和 ITS2,其中 ITS1 位于 18S rDNA 和 5.8S rDNA 之间,ITS2 位于 5.8S rDNA 与 28S rDNA 之间,二者均表现为种间多态性(即长度和碱基序列因菌种的不同而不同)。从进化角度来说,编码真菌 18S、5.8S、28S rRNA 的基因进化很慢,在真菌中相对保守,这为真菌通用引物的设计提供了理论依据。而在编码区之间的 ITS 进化却很快,在不同菌种之间表现为多态性。这种多态性在真菌通用引物扩增产物上可表现为扩增产物片段大小的多样性^[5-6]。应用 ITS 对真菌进行鉴定已成为一种公认的快速分子

鉴定方法^[6-7]。本研究应用 2 对真菌通用引物扩增 ITS,进一步测序扩增产物,比较 2 对引物的敏感性和特异性,最终将真菌培养和扩增测序 2 种结果进行分析比较。

1 资料与方法

1.1 一般资料 实验菌株:大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌、产酸克雷伯菌、阴沟肠杆菌、洋葱伯克霍尔德菌、奇异变形杆菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、溶血葡萄球菌、人葡萄球菌、尿肠球菌、粪肠球菌,共 14 种细菌;白色念珠菌、热带念珠菌、克柔念珠菌、光滑念珠菌,共 4 种真菌。所有实验菌株均按要求分离纯化,并经西安交通大学医学院第一附属医院检验科微生物实验室 VITEK Compact 全自动细菌鉴定药敏分析仪鉴定。标本来源:从西安交通大学医学院第一附属医院中心 ICU、RCU、肝胆外科、胸外科、肾内科、肿瘤外科等多个科室收集 90 例临床疑似真菌感染患者的穿刺引流液标本,另采集健康人全血标本 2 mL,提取人类基因组 DNA。

1.2 方法

1.2.1 标本的采集 在严格无菌操作下,用一次性无菌注射器穿刺患部,抽取引流液 10 mL,将 2 mL 注入 EDTA-K₂ 抗凝管,剩余 8 mL 注入血培养瓶中进行培养。静脉穿刺采集健康人外周血 2 mL,注入 EDTA-K₂ 抗凝管。抗凝标本放入 4 ℃ 冰箱中暂存。

1.2.2 标本预处理 将抗凝管中的引流液标本颠倒混匀,取 1 mL 放入 2 mL 灭菌 EP 管中,加入 1 mL 10 mmol/L Tris-HCl(pH8.0)充分颠倒混匀,14 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,沉淀物于-40 ℃ 冷冻保存,以备提取 DNA 之用。

1.2.3 标本中真菌基因组 DNA 的提取 用 100 μ L 10 mmol/L Tris-HCl(pH8.0)缓冲液重悬经预处理的标本,加入 20 μ L 溶壁酶(10 U/ μ L),用加样器吸打混匀,37 ℃ 水浴 30 min 后应用 QIAamp Blood DNA Mini Kit(QIAGEN, Cat. No. 51106)提取,操作步骤按照试剂盒说明书。

1.2.4 检测真菌通用引物 PCR 的特异性 实验所用真菌通用引物参照 Lott 等^[8] 设计 ITS1(F):3'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-5';ITS3(F):3'-GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC-5';ITS4(R):3'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-5'。25 μ L PCR 反应体系包括:10 \times Buffer 2.5 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 2.0 μ L, dNTP (2.5 mmol/L) 2.0 μ L, 上游引物(5 μ mol/L)0.5 μ L, 下游引物(5 μ mol/L) 0.5 μ L, Taq 酶(5 U/ μ L)0.15 μ L, 模板 DNA 2 μ L, 灭菌超纯水 15.35 μ L。PCR 反应条件:预变性 94 ℃ 5 min;变性 94 ℃ 30 s,退火 55 ℃ 30 s,延伸 72 ℃ 40 s,共 35 个循环;最后延伸 72 ℃ 7 min。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,电泳电压为 6 V/cm,电泳时间为 1 h,采用溴化乙锭(EB)染色 20 min,在凝胶成像分析系统拍照保存。

1.2.5 制备梯度菌悬液 为了检测真菌通用引物 PCR 的敏感度,本研究用 1 麦氏单位(约 3×10^8 CFU/mL)的白色念珠菌菌液 100 μ L 加入 200 μ L 纯水,得到约 10^8 CFU/mL 的菌液,然后进行 1:10 倍比稀释,取 10^7 、 10^8 、 10^9 3 个稀释度的菌液涂布沙保罗平板,每个稀释度 3 个平板,每个平板涂 100 μ L,37 ℃ 培养 48 h 后计数菌落,选用 3 个平板的平均菌落数作为参考菌数。提取真菌 DNA、PCR 反应体系及条件同上。

1.2.6 真菌通用引物 PCR 产物的测序 应用 QIAquick PCR Purification Kit 纯化 PCR 产物。20 μ L 测序 PCR 反应体系包括:灭菌去离子水 13.5 μ L, 5 \times BigDye Seq Buffer 3.5 μ L, 2.5 \times BigDye 1 μ L, 测序引物 ITS4(3.2 pmol/ μ L)1 μ L, 纯化的 PCR 产物 1 μ L。反应条件:预变性 96 ℃ 1 min;变性 96 ℃ 10 s,退火 50 ℃ 5 s,延伸 60 ℃ 4 min,共 25 个循环。测序产物按 Edge Bio 试剂盒纯化,然后在 PCR 仪上变性,条件为:95 ℃ 4 min,4 ℃ 4 min。用 ABI 3500xl 基因分析仪进行测序。

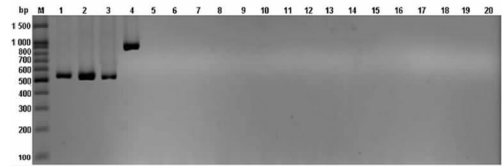
1.2.7 测序结果的比对 登陆 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>,将测序结果与 NCBI 核酸数据库进行 BLAST 比对。

1.3 统计学处理 应用 SPSS17.0 进行数据分析,采用配对四格表资料的 χ^2 检验对培养法和测序法的阳性率进行比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

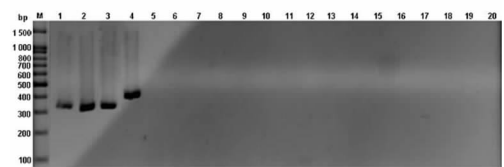
2.1 真菌通用引物 PCR 特异性 4 种真菌的 DNA 经引物 ITS1/ITS4 和 ITS3/ITS4 扩增后均产生单一条带,经与 DNA 标记物(100 bp DNA Ladder)比对,产物大小和预期相符,而 14 种细菌及人类基因组 DNA 经 PCR 后无任何条带,见图 1~2。

2.2 真菌通用引物 PCR 敏感性 引物 ITS1/ITS4 最低检测限为 10^3 CFU/mL,ITS3/ITS4 最低检测限为 10^2 CFU/mL,见图 3~4。



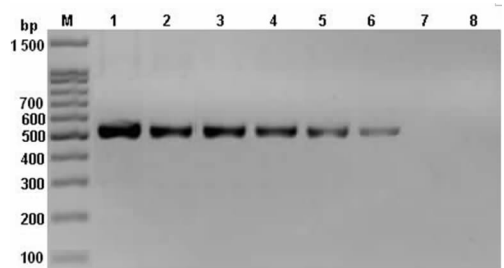
M:DNA 标记物;1:白色念珠菌;2:热带念珠菌;3:克柔念珠菌;4:光滑念珠菌;5:鲍曼不动杆菌;6:产酸克雷伯菌;7:阴沟肠杆菌;8:洋葱伯克霍尔德菌;9:肺炎克雷伯菌;10:奇异变形杆菌;11:金黄色葡萄球菌;12:表皮葡萄球菌;13:溶血葡萄球菌;14:人葡萄球菌;15:尿肠球菌;16:粪肠球菌;17:大肠埃希菌;18:铜绿假单胞菌;19:人类基因组 DNA;20:PCR 阴性对照。

图 1 引物 ITS1/ITS4 通用性检测结果



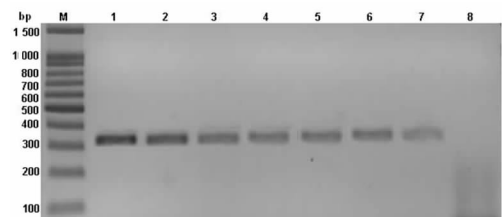
M:DNA 标记物;1:白色念珠菌;2:热带念珠菌;3:克柔念珠菌;4:光滑念珠菌;5:鲍曼不动杆菌;6:产酸克雷伯菌;7:阴沟肠杆菌;8:洋葱伯克霍尔德菌;9:肺炎克雷伯菌;10:奇异变形杆菌;11:金黄色葡萄球菌;12:表皮葡萄球菌;13:溶血葡萄球菌;14:人葡萄球菌;15:尿肠球菌;16:粪肠球菌;17:大肠埃希菌;18:铜绿假单胞菌;19:人类基因组 DNA;20:PCR 阴性对照。

图 2 引物 ITS3/ITS4 通用性检测结果



M:DNA 标记物;1: 10^8 CFU/mL;2: 10^7 CFU/mL;3: 10^6 CFU/mL;4: 10^5 CFU/mL;5: 10^4 CFU/mL;6: 10^3 CFU/mL;7: 10^2 CFU/mL;8:10 CFU/mL。

图 3 引物 ITS1/ITS4 敏感度结果



M:DNA 标记物;1: 10^8 CFU/mL;2: 10^7 CFU/mL;3: 10^6 CFU/mL;4: 10^5 CFU/mL;5: 10^4 CFU/mL;6: 10^3 CFU/mL;7: 10^2 CFU/mL;8:10 CFU/mL。

图 4 引物 ITS3/ITS4 敏感性结果

2.3 真菌通用引物 PCR 检测临床标本 见图 5~6。

2.4 测序结果 11 株 PCR 阳性临床标本经测序均得到较好的序列,与 NCBI 核酸数据库进行 BLAST 比对后均可将病原性真菌鉴定到种的水平。

2.5 测序法与培养法检测阳性率比较 90 例穿刺引流液中, 培养法检出 4 例阳性标本(3 例白色念珠菌和 1 例光滑念珠菌), 这 4 例标本经测序法检测也均为阳性; 86 例培养法检测的阴性标本中有 7 例标本为测序法检测阳性(5 例白色念珠菌、1 例光滑念珠菌、1 例热带念珠菌)。测序法阳性率是 12.22%(11/90), 培养法阳性率是 4.44%(4/90), 测序法阳性率是培养法的 2.75 倍, 二者差异有统计学意义($\chi^2=5.14$, $P<0.05$)。见表 1。

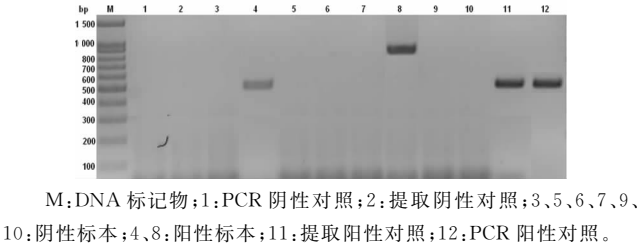


图 5 通用引物 ITS1/ITS4 检测部分标本电泳结果图

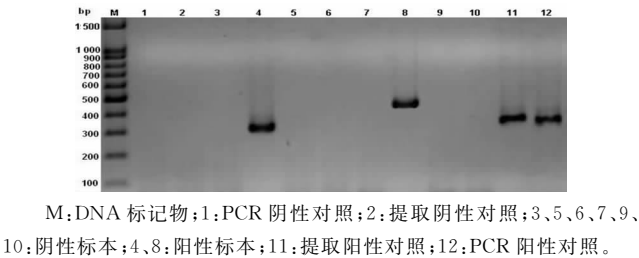


图 6 通用引物 ITS3/ITS4 检测部分标本电泳结果图

测序法	培养法		合计
	阳性	阴性	
阳性	4	7	11
阴性	0	79	79
合计	4	86	90

3 讨 论

真菌感染的发病率逐年增加, 尤其对于急性播散性念珠菌感染, 早期快速地检测和鉴定对选择抗真菌药物非常重要^[4], 而传统培养方法的敏感性低且耗时长, 这给检测手段提出了新的要求, 因此寻找一种快速的检测和鉴定真菌感染的方法势在必行。测序法以其高敏感性和特异性, 而成为一种极具前景的真菌感染检测方法^[9-10]。

在病原学诊断中, ITS 区被越来越广泛地应用于菌种鉴定^[11]。但是, 目前并没有一个真正意义上的真菌通用引物。因此, 本研究首先验证了所用引物的特异性, 结果表明这 2 对引物可以用于扩增临床上常见的病原真菌, 且不会将细菌及人类的 DNA 扩增出来。为了排除假阳性、最大限度地筛检病原菌, 并保证片段长度能够在种的水平对常见真菌进行鉴定, 本研究用了 2 对通用引物, 其中 ITS3/ITS4 的扩增产物包括: 5.8S rDNA 的 3'端、ITS2 区、28S rDNA 的 5'端; ITS1/ITS4 的扩增产物包括: 18S rDNA 的 3'端、ITS1 区、5.8S rDNA、ITS2 区、28S rDNA 的 5'端。研究结果表明, 引物 ITS3/ITS4 最低检测限为 10² CFU/mL, 引物 ITS1/ITS4 最低检测限为 10³

CFU/mL, 且对同一标本, 二者测序比对结果一致。

测序法具有较高的检测敏感性和特异性, 可以在少量的临床标本中检测到真菌, 并可以将检测时限缩短至 6~8 h, 而临床上传统的真菌培养表型鉴定方法一般需 2~3 d 的时间才能得到结果, 且有的真菌难以培养鉴定。另外, 表型鉴定方法数据库中的信息也是有限的, 而绝大多数真菌的基因已被测序完成, 数据库十分完善, 为真菌 PCR 测序鉴定提供了充分的保障。

真菌感染主要以念珠菌为主, 尤以白色念珠菌所占比例最大^[12]。本研究结果表明穿刺引流液感染真菌均为念珠菌, 主要以白色念珠菌为主, 占 72.7%(8/11)。

综上所述, 本研究通过应用 2 对真菌通用引物进行 PCR 测序来鉴定菌种, 摸索出了一套切实可行的方法, 较传统的培养方法快速, 且特异性和敏感性更高。后期工作可进一步收集其他标本类型并仅采用敏感度更高的 ITS3/ITS4 作为通用引物进行检测, 进一步验证该方法, 使之成为一套成熟的、临床实用性强的真菌检测手段。

参考文献

[1] Chan GF, Sinniah S, Idris TI, et al. Multiple rare opportunistic and pathogenic fungi in persistent foot skin infection[J]. Pak J Biol Sci, 2013, 16(5): 208-218.

[2] Guarro J. Taxonomy and biology of fungi causing human infection [J]. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2012, 30(1): 33-39.

[3] Ataides FS, Chaul MH, El Essal FE, et al. Antifungal susceptibility patterns of yeasts and filamentous fungi isolated from nail infection[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2012, 26(12): 1479-1485.

[4] Ellepola AN, Morrison CJ. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis[J]. J Microbiol, 2005, 43(5): 65-84.

[5] Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, et al. Polymorphic internal transcribed spacer region 1 DNA sequences identify medically important yeasts[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(11): 4042-4051.

[6] Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, et al. Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(6): 2302-2310.

[7] 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.

[8] Lott TJ, Kuykendall RJ, Reiss E. Nucleotide sequence analysis of the 5.8S rDNA and adjacent ITS2 region of *Candida albicans* and related species[J]. Yeast, 1993, 9(11): 1199-1206.

[9] Khlif M, Sellami H, Sellami A, et al. Detection and identification of *Candida* sp. by PCR in candidemia diagnosis[J]. J Med Mycol, 2007, 17(4): 256-260.

[10] Wellinghausen N, Siegel D, Winter J, et al. Rapid diagnosis of candidaemia by real-time PCR detection of *Candida* DNA in blood samples[J]. J Med Microbiol, 2009, 58(8): 1106-1111.

[11] Bastola DR, Otu HH, Doukas SE, et al. Utilization of the relative complexity measure to construct a phylogenetic tree for fungi[J]. Mycol Res, 2004, 108(2): 117-125.

[12] 李文波, 刘丽华, 张玉娟, 等. 2010~2012 年医院感染真菌的临床分布及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(18): 2409-2410.