

• 论 著 •

烟曲霉荧光探针实时 PCR 法的临床应用价值研究*

邢志芳¹, 曹国君^{2△}, 赵 镇³, 赵红英⁴, 潘惠芬³, 夏建红³

(1. 复旦大学附属闵行医院输血科, 上海 201199; 2. 复旦大学附属华山医院检验医学科, 上海 200040;
3. 复旦大学附属闵行医院检验科, 上海 201199; 4. 潍坊医学院, 山东潍坊 261053)

摘 要:目的 建立一种针对烟曲霉的探针实时聚合酶链反应(PCR)法并初步探讨其临床应用价值。方法 以烟曲霉基因组内特有序列为靶位, 设计引物、探针, 建立 PCR 反应体系, 初步应用于临床痰标本和血浆标本的检测验证其检测性能。结果 所建针对烟曲霉的实时 PCR 法具有良好的灵敏度和特异度, 将其应用于临床痰标本和血浆标本的检测效果较好。结论 所建立的荧光探针实时 PCR 法初步应用于临床痰标本和血浆标本检测, 效果良好, 其实际临床应用价值仍需进行大样本验证。

关键词: 烟曲霉菌; 探针实时聚合酶链反应法; 临床应用

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2016. 24. 003

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)24-3391-02

Preliminary exploration on clinical application value of aspergillus fumigatus fluorescence probe real-time PCR method*

XING Zhi-fang¹, CAO Guo-jun^{2△}, ZHAO Zhen³, ZHAO Hongying⁴, PAN Hui-fen³, XIA Jianhong³

(1. Department of Blood Transfusion, Affiliated Minhang Hospital, Fudan University, Shanghai 201199, China; 2. Department of Laboratory Medicine, Affiliated Huashan Hospital,

Fudan University, Shanghai 200040, China; 3. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Minhang Hospital, Fudan University, Shanghai 201199, China; 4. Weifang Medical College, Weifang, Shandong 261053, China)

Abstract: **Objective** To establish a probe real-time polymerase chain reaction(PCR) method for aspergillus fumigatus and to preliminarily explore its clinical application value. **Methods** The special genome sequence of aspergillus fumigatus served as the target for designing corresponding primers and probe and establishing the PCR reaction system. This method was preliminarily applied in the detection of clinical sputum and plasma samples for verifying its detection performance. **Results** The established real time PCR method for aspergillus fumigatus had good sensitivity and specificity. The method showed good effect in detecting the clinical sputum and plasma samples. **Conclusion** The established fluorescence probe real-time PCR method for aspergillus fumigatus has good effect in preliminary application of clinical sputum and plasma sample detection. But its practical clinical value still needs to be verified by a larger sample.

Key words: aspergillus fumigatus; probe real-time PCR method; clinical use

近年来,侵袭性真菌病(IFD)的致死率仍居高不下,IFD 的早发现、早治疗仍是当前改善患者预后的最佳途径。但由于 IFD 缺乏特异性的临床症状和体征,传统的实验室方法在灵敏度和特异度等方面存在缺陷,导致 IFD 的临床诊断率和实验室诊断率偏低^[1]。近年来,随着分子生物学的高速发展,使人们将 IFD 的早检测、早发现寄希望于分子生物学手段,虽然此方法尚不成熟,但具有重要的潜在应用价值^[2-3]。本课题组在前期工作中建立了 SYBR 染料法实时聚合酶链反应(PCR)检测体系,但由于此方法的原理是利用荧光染料结合到 DNA 上发光而实现定量,当反应体系内发生非特异性扩增时难以辨别,即与探针法实时 PCR 检测体系相比,此方法在特异性方面存在缺陷,制约了将来其在临床的推广应用。为此,本课题组在前期工作的基础上设计探针,优化反应条件,建立了探针法实时 PCR 检测体系,并将其应用于临床标本的检测,取得了良好的效果,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取前期实验中的 160 例免疫低下患者的 194 例痰标本作为研究对象^[4],同时选取瑞金医院 40 例已明确临床 IFD 诊断的骨髓移植患者的 112 例血浆标本进行验证。

1.2 材料、仪器与试剂 同前期实验^[5]。

1.3 真菌基因组 DNA 提取 具体方法同前期实验^[6]。

1.3.1 烟曲霉实时 PCR 检测方法(探针法)的建立 在前期实验所建立的 SYBBR 染料法实时 PCR 检测体系的基础之上^[5],原引物和反应体系不变,设计合成新探针,具体序列为 5' FAM-GCA AGG CGA TTT ATC TCA CCA CT-3' TARMA, PCR 扩增条件为:50 ℃, 2 min; 94 ℃预变性 3 min; 94 ℃变性 10 s, 55 ℃退火延伸 45 s, 共 40 个循环。构建含靶片段的 PMD19-T 质粒重组体,制备梯度浓度的标本,验证该方法的检测灵敏度,同时验证其特异性,具体操作同前。

1.3.2 烟曲霉实时 PCR 用于临床标本的检测 以所建立的烟曲霉实时 PCR 法检测 194 例来自临床的痰标本和 112 例血浆标本 DNA,并初步验证其临床应用价值,并将其结果与之前通用 PCR 法结果(扩增产物测序分析)进行比较,同时将烟曲霉探针法实时 PCR 法检测阳性的标本送生工生物工程(上海)有限公司测序验证;为排除由抑制物引起的假阴性情况,对所有的标本均进行人 GAPDH 基因检测。

2 结 果

2.1 烟曲霉实时 PCR 法的检测性能 PCR 扩增曲线良好,标准曲线的斜率为-3.293 921,截距为 46.210 117,相关系数为 0.994 966,提示相关性良好,可以满足实验的基本要求;线性检测范围的上限为 10⁸ copy/mL,下限为 10² copy/mL,提示检测灵敏度较高;以非烟曲霉基因组 DNA 进行扩增时,未见

* 基金项目:上海市卫生和计划生育委员会青年项目(20154Y0141);上海市闵行区科学技术委员会自然科学基金项目(2015MHZ003; 2016MHZ01);上海市闵行区卫生和计划生育委员会基金项目(2014MW13)。

作者简介:邢志芳,女,主管技师,主要从事临床检验诊断研究。 △ 通讯作者, E-mail: gjcao@foxmail.com。

非特异性扩增,表明该扩增体系的特异性较好。

2.2 烟曲霉实时 PCR 法的临床应用效果 在 194 例临床痰标本 DNA 中包含 176 例念珠菌阳性标本,2 例烟曲霉阳性标本,16 例阴性标本,经该烟曲霉探针法实时 PCR 法检测,2 例阳性标本均被检出,其他 192 例标本均未出现扩增,该结果与原实验通用 PCR 法结果一致,符合预期,且提示此实验中该方法的检测灵敏度和特异度均为 100%;骨髓移植患者的 112 例临床标本中,包含 2 例烟曲霉菌,用所建立的烟曲霉探针法实时 PCR 法进行检测时,均可以检出,而其他 110 例标本则未出现扩增,同样说明所建立的新方法具有良好的检测性能。将烟曲霉阳性标本的 PCR 产物送测序,测序分析结果与 PCR 结果一致。以上两类标本,均对其进行了人 GAPDH 基因检测,扩增曲线良好,均提示标本中无明显的扩增反应抑制剂存在。

3 讨 论

真菌多为条件致病菌,对免疫力正常的人群一般不会致病,然而当机体处于免疫妥协状态时,可能会导致 IFD 的发生^[7]。以往的临床研究大多仅重点关注移植患者的 IFD 情况,而非移植群体的情况相关报道少见^[8]。近年来,IFD 的发病率呈逐年上升趋势,且其致病菌种的流行病学也在不断变化^[9]。由于 IFD 无特异性的临床症状和体征,且容易被基础疾病或免疫抑制所掩盖,因此其确诊主要依靠实验室检查,传统实验室真菌检测方法因在灵敏度和特异度等方面存在缺陷,IFD 的实验室检查漏诊率高,不能满足当前临床需求,由于侵袭性真菌病发病凶险、确诊困难、病原体耐药、病情进展快、预后不佳、治疗不良反应较多及费用高等特点,其诊断和治疗一直是困扰临床工作的难点之一^[10-11]。早期诊断、及时治疗是改善预后的关键,意义重大^[12]。虽然近年来 IFD 诊断技术不断进步和新型抗真菌药物不断面世,但 IFD 发病率仍呈上升趋势。

传统检测方法如真菌培养鉴定、镜检、G 实验和 GM 实验等均不够理想,组织病理学检查虽为 IFD 诊断的金标准,但由于其存在一定的创伤性而不被大多数患者所接受。此外,组织病理学检查灵敏度较低且获取标本困难,对于有严重基础疾病者往往不易进行等缺陷,制约了其在临床的广泛应用。充分利用现代先进的检验手段,加强病原学监测,提高早期诊断率,近年来,随着分子检测水平的快速发展,国内外大量学者将 IFD 的早期诊断寄希望于 PCR 法,并进行了一系列研究,目前已取得了较大进展,但仍存在许多问题,如方法学未标准化,缺少统一的标准,周围环境中真菌无处不在,如何才能有效控制其对标本的污染等^[13]。关于 PCR 技术在 IFD 早期检测应用方面,有的学者认为该方法尚不成熟,尚需更多的研究加以完善;有的学者认为当前已经开发了足够的专有技术,当前可以考虑进行大规模临床实验。本课题组的研究表明多种检测方法联合应用,可以提高 IFD 的诊断率和阴性除外价值^[14],尤其是 PCR 法具有检测灵敏度高的特点,其阴性除外价值更加有价值。本课题组在前期工作的基础上建立了针对烟曲霉的实时 PCR 检测方法(探针法),本实验过程中阴性对照标本与待测标本按 1:10 的比例进行全程监控,有效监控因污染而导致假阳性结果的情况。与先前所建立的荧光染料法相比,探针法具有更高的特异度,有利于将来临床的推广应用。与通用 PCR 法相比,实时 PCR 法可以实现更加准确的定量,可为临床区分真菌的感染和定植提供依据,为疾病的早发现、早治疗初步奠定基础,且实时 PCR 法扩增完成后结果分析过程中无需开盖操作,大大降低了实验室 PCR 扩增产物污染事件的发生率,该方法具有较好的临床应用前景,其不足之处在于所建立的实时 PCR 法只能用于烟曲霉菌的检测,且如果烟曲霉相关基因位点发生

突变,烟曲霉菌将不能被检出。目前临床上确诊 IFD 的方法对专业技术要求高,且结果的判断带有主观性,耗时长,导致早期确诊困难;与传统的实验室检测方法相比,PCR 法具有更高的检测灵敏度,在 IFD 的早发现中具有明显的优势,PCR 法有助于早诊断、早治疗,明显改善疾病预后,且有效减少不必要的抗生素滥用。有研究认为,长期使用广谱抗生素,可导致中性粒细胞释放过氧化物减少,继而其破坏真菌菌丝细胞壁的有效性大大降低,更容易导致 IFD 的发生^[8]。此外,抗真菌药物品种相对较少、不良反应大且价格昂贵,经验性用药与精准医疗的潮流不符,且容易引起医患矛盾,因此探索出一种快速准确的 IFD 早期检测方法,为临床的诊断和治疗提供依据,具有重要的意义。分子生物学方法应用于 IFD 的检测,有助于提高 IFD 诊断水平,应用前景良好^[15],但仍需进行大规模、多中心的临床实验进行验证。

参考文献

- [1] Pluhacek T, Petrik M, Luptakova D, et al. Aspergillus infection monitored by multimodal imaging in a rat model [J]. *Proteomics*, 2016, 16(11/12): 1785-1792.
- [2] Pappas PG. Invasive candidiasis [J]. *Infect Dis Clin North Am*, 2006, 20(3): 485-506.
- [3] Mabbott S, Thompson D, Sirimuthu N, et al. From synthetic DNA to PCR product: detection of fungal infections using SERS [J]. *Faraday Discuss*, 2016, 231(4739): 699-704.
- [4] 曹国君, 赵芳, 刘璐, 等. 通用 PCR 法在痰标本真菌检测中的临床应用 [J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(13): 1635-1636.
- [5] 曹国君, 邢志芳, 华丽, 等. 烟曲霉实时 PCR 检测方法的建立 [J]. *国际检验医学杂志*, 2014, 35(6): 731-732.
- [6] 曹国君, 赵筑, 彭奕冰, 等. 真菌基因组 DNA 的提取和检测用通 PCR 方法的建立 [J]. *检验医学*, 2011, 26(11): 773-778.
- [7] Imbert S, Bresler P, Boissonnas A, et al. Calcineurin inhibitors impair neutrophil activity against *Aspergillus fumigatus* in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2016, 138(3): 860-868.
- [8] 马明铭, 李芳, 杨慧, 等. 侵袭性真菌病患者病原学特点和危险因素分析 [J]. *疑难病杂志*, 2015, 14(13): 239-242.
- [9] Pemán J, Quindós G. Current aspects of invasive diseases caused by *Candida* and other yeast fungi [J]. *Rev Iberoam Micol*, 2016, 33(3): 133-139.
- [10] 李燕明, 钟雪峰, 居阳, 等. 老年人侵袭性真菌病的临床病理分析 [J]. *中华老年医学杂志*, 2015, 34(3): 270-273.
- [11] 闫晓培, 孔辉, 胡松, 等. 侵袭性真菌病免疫治疗策略与研究进展 [J]. *中华传染病杂志*, 2015, 33(4): 250-252.
- [12] 崔宇慧, 唐建国, 吴春荣, 等. 肠道屏障在肠源性侵袭性真菌病中的作用 [J]. *中国急救医学*, 2014, 34(6): 544-549.
- [13] Powers-Fletcher MV, Hanson KE. Nonculture Diagnostics in Fungal Disease [J]. *Infect Dis Clin North Am*, 2016, 30(1): 37-49.
- [14] 孙于谦, 黄晓军. 对未确定侵袭性真菌病的思考 [J]. *中华内科杂志*, 2015, 54(10): 831-833.
- [15] 杨启文, 徐英春. 侵袭性真菌病的非培养实验室诊断方法 [J]. *中华检验医学杂志*, 2014, 37(10): 721-724.