

聚合酶链反应快速诊断棘阿米巴角膜炎的研究

施 健¹, 陆 宏²

作者单位:(226001)中国江苏省南通市,南通大学附属医院¹酶学研究室;²眼科

作者简介:施健,毕业于南通大学医学院,学士,副主任技师。

通讯作者:陆宏,毕业于天津医科大学,博士,副主任医师。
adanlu2000@yahoo.com.cn

收稿日期:2010-05-13 修回日期:2010-11-23

Research of rapid diagnosis of acanthamoeba keratitis with polymerase chain reaction

Jian Shi¹, Hong Lu²

¹Laboratory of Enzymology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China; ²Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Hong Lu, Department of Ophthalmology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. adanlu2000@yahoo.com.cn

Received:2010-05-13 Accepted:2010-11-23

Abstract

• **AIM:** To probe into a method of rapid diagnosis of acanthamoeba keratitis with polymerase chain reaction (PCR).

• **METHODS:** PCR was performed to detect the DNA segment of acanthamoeba from standard strain and applied to 24 scraping samples from patients' cornea. The results were compared with protozoan culture and 100g/L KOH wet mount.

• **RESULTS:** We successfully detected acanthamoeba from standard strain and samples from patients' cornea 5 hours after PCR, but not from bacteria, fungi, herpes simplex virus I (HSV-I) and human corneal cells. The positive rate of samples from patients was 46%, which was higher than protozoan culture or 100g/L KOH wet mount ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** PCR is fairly valuable to get rapid and definite diagnosis of acanthamoeba keratitis.

• **KEYWORDS:** acanthamoeba keratitis; rapid diagnosis; polymerase chain reaction

Shi J, Lu H. Research of rapid diagnosis of acanthamoeba keratitis with polymerase chain reaction. *Guji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(1):19-21

摘要

目的:探讨聚合酶链反应(PCR)技术快速诊断棘阿米巴角膜炎的价值。

方法:建立棘阿米巴标准虫株的PCR检测方法,并应用于临床检测24例角膜刮片标本,结果与原虫培养及100g/L氢氧化钾湿封片镜检做比较。

结果:PCR 5h可检测出标本中微量棘阿米巴原虫,对照细菌、真菌、I型单纯疱疹病毒、正常人角膜均为阴性。临床标本PCR敏感性为46%,明显高于原虫培养与100g/L氢氧化钾湿封片镜检($P < 0.05$)。

结论:PCR速度快、敏感性和特异性高,有助于棘阿米巴角膜炎的快速明确诊断。

关键词:棘阿米巴角膜炎;快速诊断;聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2011.01.007

施健,陆宏.聚合酶链反应快速诊断棘阿米巴角膜炎的研究.国际眼科杂志2011;11(1):19-21

0 引言

棘阿米巴原虫是致病性自由生活阿米巴原虫的一种,在全世界范围内的土壤和水中广泛分布。棘阿米巴原虫作为机会感染性病原体,可引起人两种疾病,一种是原发性脑炎^[1],另一种是角膜炎^[2]。棘阿米巴角膜炎是一种严重的致盲性角膜疾病,临床特点是环形角膜基质炎和眼球剧烈疼痛,药物和手术治疗效果不理想^[2,3],若不及时治疗可导致角膜穿孔,致盲率极高。但其确切的发病机制目前仍不清楚,目前的观点认为角膜轻度擦伤合并感染以及机体抵抗力降低是其主要诱因^[4],首例棘阿米巴角膜炎报道于1974年,以后随着角膜接触镜的广泛应用、临床检查方法的完善及对本病认识的加深,本病感染人数在世界各国逐渐增多。早期诊断、早期治疗可改善其预后。但在病变早期常被误诊为细菌性角膜炎、单纯疱疹性角膜炎和霉菌性角膜炎而延误治疗。因此,我们建立了聚合酶链反应(PCR)快速诊断棘阿米巴角膜炎病原体方法,并应用于临床,现报告如下。

1 对象和方法

1.1 对象 选取2006-10/2008-12在我院门诊或病房怀疑棘阿米巴角膜炎的患者24例24眼。男16例,女8例;年龄18~67(平均43.4)岁;左眼10例,右眼14例;配戴角膜接触镜者15例,非角膜接触镜配戴者9例;眼部轻微外伤史3例。所有患眼行角膜刮片,标本进行PCR检测,同时行100g/L氢氧化钾湿封片镜检、棘阿米巴原虫培养。虫株和试剂:棘阿米巴原虫标准株由北京同仁眼科研究所惠赠,保存于20g/L无营养琼脂培养基中。以铜绿假单胞菌、白色念珠菌、I型单纯疱疹病毒为对照菌株,由南通大学附属医院检验科提供;正常人角膜(取自正常人眼球供体)为阴性对照,由南通大学附属医院眼科提供。棘阿米巴原虫的通用引物为1:5'-GTT TGA GGC AAT AAC AGG T-3'和引物2:5'-GAA TTC CTC GTT GAA GAT-3',选自棘阿米巴原虫的保守序列区间,扩增产物长度为229bp^[5],引物由上海生工生物工程有限公司合成。蛋白酶K, dNTP, MgCl₂, 10×PCR buffer, 10×明胶(1g/kg), TaqDNA

聚合酶,DNA marker DL2000,溴化乙锭,琼脂糖均购自上海华美生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 棘阿米巴原虫培养及观察 切取小块原虫保存培养基置于另一培养基表面,滴加一滴活的或死的大肠杆菌肉汤,放入35℃~37℃温箱内培养,同时做不加标本的阴性对照。对于临床标本,将其角膜刮片材料进行相同的棘阿米巴原虫培养。培养后1~2d刮取培养皿中生长旺盛、滋养体较多的培养物放入加有蒸馏水的平皿中,即刻在倒置显微镜下观察,也可用吸管取液体滴在载玻片上,用普通光学显微镜观察^[6]。

1.2.2 100g/L 氢氧化钾湿封片检查 取角膜刮片材料、棘阿米巴原虫的培养物涂于载玻片上,加1滴100g/L氢氧化钾溶液,置普通显微镜下检查^[7]。

1.2.3 PCR 检测棘阿米巴原虫 分别从琼脂培养基上刮取培养物置于0.5mL微型离心管(Eppendorf管)中,加入少量双蒸水稀释,取100μL加入0.1mol/L氢氧化钠10μL,100℃煮沸3~5min。采用连续的酚-氯仿-异戊醇抽提DNA,异丙醇沉淀,750mL/L乙醇洗涤,离心干燥后加入50μL无菌双蒸水做为模板DNA,用Gene Amp 9600型PCR扩增仪进行PCR扩增。反应体系总体积为30μL,包括10×PCR buffer 3μL,2.5mmol/L dNTPs 2.4μL,25mmol/L MgCl₂ 3μL,30mmol/L引物1,2各0.2μL,10×明胶 3μL,模板DNA 5μL,无菌去离子水13.6μL,5U/μL Taq DNA聚合酶2U。PCR反应条件为:95℃预变性10min,94℃45s,52℃45s,72℃60s共35个循环,最后72℃延伸5min。对照细菌、真菌、I型单纯疱疹病毒、正常人角膜刮片组织采用相同方法处理和扩增。用752紫外分光光度计测定DNA质量浓度(双链DNA OD₂₆₀=1时,DNA含量为50μg/L),根据测定值将DNA进行10倍系列质量浓度稀释,得到10ng(10⁻⁸g)~10fg(10⁻¹⁴g)的7个连续质量浓度,然后分别进行PCR扩增检验反应的敏感性。所有扩增产物经30g/L琼脂糖凝胶(含溴化乙锭0.5mg/L)电泳,在紫外线灯下观察、记录结果,并在SX-100型凝胶自动成像系统上成像。

统计学分析:结果使用SPSS 13.0软件进行配对χ²检验,P<0.05为有统计学意义。

2 结果

2.1 标准棘阿米巴虫株检测结果 标准棘阿米巴虫株经PCR反应可扩增出229bp条带,对照真菌菌株、对照细菌菌株、正常人角膜扩增结果均为阴性,耗时大约5h。PCR敏感性研究显示最终可检出DNA的量为100fg(10~13g)。标准棘阿米巴虫株培养物倒置显微镜下观察及100g/L氢氧化钾湿封片检查,显微镜下均可检出具有棘状伪足、胞质内含数个大小不等的空泡状滋养体和/或双层囊壁结构的包裹。

2.2 临床标本检测结果 临床标本检测结果见表1。24例标本PCR检测棘阿米巴阳性11例(46%),原虫培养阳性6例(25%),100g/L氢氧化钾湿封片镜检阳性5例(21%)(表1)。PCR与原虫培养相比,χ²=4.53,PCR与100g/L氢氧化钾湿封片镜检相比,χ²=7.46,PCR阳性率明显高于原虫培养和100g/L氢氧化钾湿封片镜检(P<0.05)。部分标准虫株和临床标本的扩增结果见图1。

3 讨论

配戴角膜接触镜者是棘阿米巴角膜炎发病的高危人群。本研究24例受检者中配戴角膜接触镜者15例(63%)。

表1 临床标本PCR与原虫培养和100g/L氢氧化钾湿封片镜检结果比较

PCR	原虫培养		100g/L 氢氧化钾湿封片	
	+	-	+	-
+	5	6	5	6
-	1	12	0	13
合计	6	18	5	19



图1 棘阿米巴虫株PCR扩增结果 泳道M:DNA marker DL2000;1~2:标准棘阿米巴虫株;3:铜绿假单胞菌;4:白色念珠菌;5:I型单纯疱疹病毒;6:正常人角膜组织;7~9:阳性临床标本。

另外,轻微的角膜损伤也是诱发因素之一。棘阿米巴角膜炎早期缺乏特征性表现,表现为眼部异物感、烧灼感、畏光、流泪、疼痛甚至剧痛,眼睑、结膜充血、肿胀,角膜混浊、浸润、溃疡,前房或葡萄膜炎炎症反应。以上表现很难与细菌、真菌、单疱病毒性角膜炎鉴别^[8]。随病情进展,眼部疼痛及刺激症状多明显加重,出现特征性的环形角膜基质炎、角膜放射状神经炎。由于棘阿米巴角膜炎发病率较低,加上眼科医师认识的局限性,此时仍有许多病例被误诊。Roters等^[9]报道了无明显眼部疼痛的棘阿米巴角膜炎,使明确诊断难度加大。

目前已知至少有8种棘阿米巴原虫可引起人类角膜炎^[10],由于棘阿米巴原虫缺乏稳定的形态学特征,一些虫种间的形态差异细微,存在种别混乱的局面,因此很难进行精确的诊断和原虫鉴定。随着分子生物学的进展,基因诊断方法得到飞速发展。基因诊断是采用分子生物学方法在DNA水平或RNA水平对基因的结构和功能进行分析,从而对特定的疾病进行诊断。基因诊断应用于棘阿米巴检测研究后,使病原体的早期、快速、精确诊断成为可能。本研究采用棘阿米巴原虫的通用引物,对各种属的棘阿米巴原虫均具有良好的通用性,而对细菌、真菌、单纯疱疹病毒、正常角膜组织扩增结果都为阴性,同时显示了该引物良好的特异性。

本研究中24例怀疑棘阿米巴角膜炎的患者PCR诊断阳性率为46%,明显高于原虫培养和100g/L氢氧化钾湿封片镜检阳性率。我国仍是发展中国家,医疗卫生条件相对滞后,各种感染性角膜病变的发病率相对仍较高。同时考虑到PCR技术具有高度的敏感性和特异性,推测本研究PCR阴性的病例,其它类型特别是其它病原体造成的角膜炎或角膜溃疡可能性大。对于这部分病例,早期、快速病原体明确诊断对于能否及时、正确治疗及预后意义重大。如果将我们先前报道的快速诊断感染性角膜炎的方法^[11,12]与本研究相结合,同时选用特异性针对细菌、真菌、HSK的引物分别对角膜刮片标本进行PCR扩增,将有可能早期明确病原体诊断。

PCR和原虫培养相比,优势明显,最具有实用价值的

就是阳性率高和快速。PCR 阳性率高得益于其高度的敏感性,我们通过对 10 倍系列质量浓度稀释的 DNA 进行检测,得出最小检出量为 100fg DNA,相当于几个到十几个棘阿米巴原虫。同时,PCR 对标本要求很低,只要有微量的被检病原体存在,就能得到阳性结果,所需的标本量与培养相比根本不在同一个数量级,而原虫培养对标本在质和量两方面要求都较高。在检测速度方面,培养一般需要 1~3d,PCR 5h 就可得出结果,快速的特点非培养可比。PCR 早期明确诊断后进行有针对性的治疗将对疾病的预后产生积极影响,有助于减轻患者痛苦,节省医疗资源。本研究显示,PCR 用于快速明确诊断棘阿米巴角膜炎具有较好的临床应用前景。

参考文献

- 1 Qvarnstrom Y, da Silva AJ, Schuster FL, et al. Molecular confirmation of Sappinia pedata as a causative agent of amoebic encephalitis. *J Infect Dis* 2009;199:(8)1139-1142
- 2 Lindsay RG, Watters G, Johnson R, et al. Acanthamoeba keratitis and contact lens wear. *Clin Exp Optom* 2007;90(5):351-360
- 3 Schaumberg DA, Snow KK, Dana MR. The epidemic of Acanthamoeba keratitis: where do we stand? *Cornea* 1998;17(1):3-10
- 4 van Klink F, Taylor WM, Alizadeh H, et al. The role of macrophages

- in Acanthamoeba keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37(7):1271-1281
- 5 Mathers WD, Nelson SE, Lane JL, et al. Confirmation of confocal microscopy diagnosis of Acanthamoeba keratitis using polymerase chain reaction analysis. *Arch Ophthalmol* 2000;118(2):178-183
- 6 Silvany RE, Dougherty JM, McCulley JP, et al. The effect of currently available contact lens disinfection systems on Acanthamoeba castellanii and Acanthamoeba polyphaga. *Ophthalmology* 1990;97(3):286-290
- 7 邓新国,李家臣,祝磊. 棘阿米巴角膜炎的实验诊断. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志* 2000;18(5):301-304
- 8 D'Aversa G, Stern GA, Driebe WT Jr. Diagnosis and successful medical treatment of Acanthamoeba keratitis. *Arch Ophthalmol* 1995;113(9):1120-1123
- 9 Roters S, Aisenbrey S, Severin M, et al. Painless acanthamoeba keratitis. *Klin Monbl Augenheilkd* 2001;218(8):570-573
- 10 Rumelt S, Cohen I, Rehany U. Spontaneous corneal graft ulcerative perforation due to mixed Acanthamoeba and herpes simplex keratitis: a clinicopathologic study. *Cornea* 2000;19(2):240-242
- 11 陆宏,管怀进. 多重聚合酶链反应快速诊断 HSK 和真菌性角膜炎的研究. *国际眼科杂志* 2004;4(4):657-660
- 12 陆宏,管怀进. 聚合酶链反应快速诊断真菌性角膜炎. *眼科新进展* 2004;24(4):257-259

国际眼科杂志英文版聘请英文审稿人

国际眼科杂志英文版(International Journal of Ophthalmology—English edition)于 2008 年创刊,2009 年申请 SCI,2010 年 9 月被 SCIE 正式收录,成为我国唯一被国际最权威检索系统 SCIE 收录的眼科专业学术期刊。现因编审工作需要,聘请数名兼职英文审稿人。条件如下:(1)具有优良的眼科专业知识及英语水平;(2)具有博士学位;(3)在国外研修一年以上;(4)以第一作者在国际著名眼科学术期刊发表英文论著 2 篇以上;(5)具有奉献精神和认真负责的工作作风,并热心支持本刊工作;(6)以上条件可根据个人综合素质灵活考虑。

有意者请与本刊联系,寄来简历及相关资料,经研究录用者本刊将通知本人并在本刊公布,赠送参与审稿当期杂志,可根据需要颁发聘书。

联系地址:(710054)西安市友谊东路 269 号

《国际眼科杂志》编辑部

电话:029-82210956 85569828

联系人:韩建方 高晶

Email: IJO.2000@163.com; IJO2000@126.com