

聚合酶链反应在感染性葡萄膜炎诊断中的应用

陈尧,高玲

作者单位:(410011)中国湖南省长沙市,中南大学湘雅二医院眼科

作者简介:陈尧,中南大学湘雅二医院眼科在读硕士研究生,研究方向:眼底病。

通讯作者:高玲,1990年毕业于湖南医科大学,1997年获博士学位,1997/1999年在华西医科大学博士后流动站工作,主任医师,教授,博士研究生导师,研究方向:眼底病。gaoling66@hotmail.com

收稿日期:2012-08-30 修回日期:2012-10-22

Application of polymerase chain reaction in diagnosis of infectious uveitis

Yao Chen, Ling Gao

Department of Ophthalmology, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China

Correspondence to: Ling Gao. Department of Ophthalmology, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China. gaoling66@hotmail.com

Received:2012-08-30 Accepted:2012-10-22

Abstract

• As a powerful molecular biological tool, polymerase chain reaction (PCR) can detect pathogens in intraocular fluids at the early stage of infectious uveitis cases. It takes tiny amount of samples, short examination duration with high detective sensitivity and specificity. PCR detection of pathogens is superior to routine diagnostic approaches such as serological antibody detection and pathogen culture. It provides a potential method in early diagnosis of infectious uveitis and evaluation of therapeutic efficacy.

• **KEYWORDS:** infectious uveitis; intraocular fluid; polymerase chain reaction

Citation: Chen Y, Gao L. Application of polymerase chain reaction in diagnosis of infectious uveitis. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2012;12(11):2113-2115

摘要

聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 是一种有力的分子生物学工具,检测所需标本量少,耗时短,灵敏度高,对于某些不典型的感染性葡萄膜炎,PCR能够在感染早期从极少量眼内液中检测出病原体的复制数量,提高诊断的效率。与传统的血清学抗体检测、病原微生物培养相比,PCR在辅助诊断方面表现出更大的优势。

关键词: 感染性葡萄膜炎;眼内液;聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2012.11.19

引用: 陈尧,高玲. 聚合酶链反应在感染性葡萄膜炎诊断中的应用. 国际眼科杂志 2012;12(11):2113-2115

0 引言

在发达国家,感染性葡萄膜炎在葡萄膜炎所占比例为11%~21%^[1],在发展中国家则为30%~50%^[1]。感染性葡萄膜炎可由病毒、细菌、真菌、螺旋体、寄生虫等病原体感染引起,尽管根据典型临床表现可以诊断少数典型病例,但对于大多数不典型病例(尤其在疾病早期),很难将其与非感染性葡萄膜炎区分开来^[2]。急性进展的疾病(如急性视网膜坏死、细菌性眼内炎),正确的诊断和治疗刻不容缓。慢性进展的感染性疾病,如弓形虫脉络膜视网膜炎以及真菌性眼内炎,在没有使用相应抗生素的情况下一味使用强的松会使病情加剧^[2]。因此,合适的实验室病原学检查很有必要。目前临床常见的葡萄膜炎病原体检查主要有血清抗原抗体检测、眼内液涂片镜检、细菌真菌培养^[2],但它们各自都存在局限性。血液中的病原体检测并不一定能真实地反映眼局部病灶的状况,抗原抗体的产生具有明显的时效性和滞后性并且受到机体免疫状态的制约,有时大量IgG的产生会影响到IgM的检测,导致结果假阴性。眼内液涂片的灵敏度不高,约为22.05%~44%^[3-5]。细菌真菌培养耗时长,一般需要3~7d,对于某些要求苛刻的病原体可能还会更长,其灵敏度也不高,约为26%~58.2%^[3-5];某些特殊病原体在一般的培养基上不能生长,如厌氧菌、L型细菌等,加大了发现这些病原体的难度。这些都限制了感染性葡萄膜炎的早期诊断以及对于疾病进展的动态观察。近年来,不断改进的聚合酶链式反应(PCR)技术在感染性葡萄膜炎的辅助诊断方面得到了越来越广泛的应用,具有很高的敏感性和特异性,对于早期诊断很有价值。本文就PCR对感染性葡萄膜炎患者眼内液病原体的检测进行综述。

1 PCR技术概述

PCR是体外酶促合成特异DNA或RNA片段的一种方法,由高温变性、低温退火及适温延伸等三步反应组成一个周期,循环进行,使DNA或RNA片段在数小时内得以迅速扩增百万倍^[6]。PCR的形式多种多样,以顺应各种不同的检测需要:定量PCR可检测标本中特定序列的拷贝数,评估病原体的侵袭数量;RT-PCR即先将RNA用逆转录酶转化为相应cDNA再进行扩增,检测靶基因的表;巢式PCR中包含了两对引物,第二对引物扩增片段位于第一对PCR产物内部,提高反应的特异性;多重PCR在对多对引物引导同时进行多种病原微生物的检测,经济省时^[7]。

2 感染性葡萄膜炎眼内液的取材与保存

在无菌条件下取0.02~0.1mL前房液或0.2~1mL未稀释的玻璃体液送检,用无DNA的小管分装,放置于-80℃冰箱或直接用于PCR检测^[8]。标本的反复冻融可

导致 DNA 的突变或丢失、RNA 的降解^[8]。此外,不同取材时间对感染性葡萄膜炎病原体的检出率有影响,尽管在病毒性葡萄膜炎发作后 24h ~ 10wk 采用 PCR 可检测出病毒 DNA,但在发病 1wk 内阳性检出率最高^[9];而弓形虫性葡萄膜炎在发作后 1wk ~ 4mo 可检测出弓形虫 DNA,但检测高峰为发病后 3wk^[9]。从取材部位看,与前房液相比,收集玻璃体液所致创伤相对较大,相对较难,因此如果二者的灵敏度和特异度没有统计学显著差异时^[10,11],常常倾向于行前房液的 PCR 检测。

3 眼内液病原体的 PCR 检测在感染性葡萄膜炎中的应用

3.1 PCR 与病毒感染 病毒感染可引起多种眼部炎症,如角膜炎、虹膜睫状体炎、小梁炎、巩膜炎以及坏死性视网膜膜炎。在有免疫活性的人群中,病毒性葡萄膜炎最常见的病原体为单纯疱疹病毒、水痘-带状疱疹病毒;而巨细胞病毒则是免疫抑制的人群中最常见的感染类型^[12]。在普通人群中,疱疹类病毒血清 IgG 阳性率高达 86% ~ 100%^[13],因此在血清学抗体阳性而无病毒感染证据的患者中,PCR 法可能在眼内液中检出病毒,导致假阳性结果。事实上,Pendergast 等^[13]对 75 例具有免疫活性且无病毒感染临床证据的患者,采用 PCR 结合凝胶电泳法定性检测前房液或玻璃体液中的疱疹病毒 DNA (HSV, VZV, CMV 和 EBV),没有 1 例检测出病毒 DNA,眼内液 PCR 检测结果与临床表现相吻合,由此推测,当病毒潜伏于眼内且尚未大量复制,未造成眼内炎时,尚未破坏的血-眼屏障可能阻挡血液或其他组织的病毒进入眼内液,因此即使血清 IgG 阳性眼内也可能检测不到病毒或仅检测到低拷贝的病毒。

鉴于 PCR 扩增的优势,更多的学者开始探讨 PCR 方法在病毒性脉络膜炎辅助诊断中的临床应用。Harper 等^[14]对 133 例临床诊断为坏死性疱疹病毒性视网膜炎、巨细胞病毒性视网膜炎以及 EB 病毒性视网膜炎的患者进行眼内液 PCR 病毒检测,前房液或玻璃体液 PCR 对相应病毒的阳性检出率分别为 88%, 82% 和 100%,灵敏度 80.9%,特异度 97.4%。Westeneng 等^[15]比较分析 56 例病毒性葡萄膜炎疑似患者的眼内液,发现 PCR 法的病毒阳性率(94%)远远高于抗体阳性率(18%),且特异性可达到 98%,显示 PCR 法较占优势,但该研究未动态定量观察治疗前后病毒 DNA 复制的数量变化。Sugita 等^[16]对 111 例不明原因的、活动性葡萄膜炎患者的前房液或玻璃体液,进行人类疱疹类病毒的多重 PCR 以及定量 PCR 检测,其中 65% 患者检测出病毒拷贝,在这部分人中又有 65% 患者病毒拷贝数超过 5×10^3 copies/mL。眼内液的高拷贝病毒量揭示其在眼内的大量复制,强烈提示病毒直接侵袭在这部分眼内炎症的发病机制中占据主导地位。而部分病毒高拷贝的患者已局部使用过一段时间糖皮质激素,可能造成了眼局部的免疫抑制而导致人类疱疹病毒的复制,故临床早期使用抗病毒药物很重要,多重 PCR 与定量 PCR 的联合应用对于快捷地筛查患者以及判断患者病毒感染的状态很有帮助。

3.2 PCR 与刚地弓形虫感染 刚地弓形虫主要引起脉络膜视网膜炎,常常合并严重的玻璃体混浊,难以进行临床诊断,需要借助弓形虫抗原抗体的检测。但部分患者血清学检查为阳性,而眼部表现却不典型^[17];部分患者有眼部表现而血清学检查却为阴性^[18],由此引入 GWC (Goldmann-Witmer coefficient) 法进行客观评价。GWC

即:(眼内液弓形虫 IgG/眼内液总 IgG)/(血清弓形虫 IgG/血清总 IgG)^[19],因同时对眼内液和血清中的弓形虫 IgG 与总 IgG 的比值进行比较,直接体现了眼部局部病灶的感染情况,排除了其他部位感染对诊断的干扰,很大程度地避免假阳性和假阴性。采用 PCR 法对疑似患者的前房液行弓形虫检测,阳性率仅为 36%,而 GWC 法的阳性率 92%^[20]。但抗体检测存在局限性,在免疫抑制的患者抗体检测可能存在假阴性^[21],且未能检测不典型种属的弓形虫感染^[22],而这正是 PCR 法检测的优势所在,PCR 联合 GWC 可使前房液病原体检出阳性率由 36% (单用 PCR 检测)或 92% (单用 GWC 检测)提升到 97% (PCR 联合 GWC 检测)^[23],成为不可或缺的选择。因弓形虫常引起后段葡萄膜炎,玻璃体液可能是检测眼内弓形虫感染的更好样本^[24],PCR 法检测还存在改进的空间:(1)就单一检查而言,玻璃体液的 PCR 检测优于前房液检测^[25];(2)玻璃体液的 PCR 检查联合血清学的 GWC 可能为提高灵敏度的最佳之选。(3)运用多重 PCR 结合定量 PCR 检测,眼内液(11 例前房液与 2 例玻璃体液)的阳性检出率提高到 84.6% (11 例/13 例),77% (10 例/13 例)呈高拷贝数^[26]。由此可见,PCR 对眼内弓形虫感染的诊断还是大有裨益的。

3.3 PCR 与细菌和真菌感染 外伤、内眼手术、全身感染性疾病等内源性因素均可以引起细菌感染性眼内炎。常规的细菌培养存在耗时长、敏感度低、特殊菌属还需选择不同的培养基的缺点。眼内液细菌培养阳性的患者,PCR 结果均呈阳性;但 PCR 检测的阳性率可达到 90%,且经过临床诊治验证,大大高于传统培养检测阳性率^[27]。细菌核糖体 RNA 基因(即 16S rDNA)为细菌的通用基因^[28],针对其设计的引物可以检测出所有革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌^[29],包括许多传统方法难以检测的细菌如结核杆菌和其他一切不常见的细菌^[30],阳性率可达到 95%,远远高于传统的涂片检测(47%)和细菌培养(53%)^[27]。尤其是对于内眼手术后眼内反应严重的患者,早期不易判断病因:究竟是感染占主导的亚急性细菌性眼内炎?还是免疫应答占主导的自身免疫性葡萄膜炎?采用 PCR 法定量检测眼内液的病原体数量,可以较好地回答这个问题。

与细菌感染类似,PCR 检测在真菌性眼内炎的辅助诊断中占据优势,体现在:(1)眼内液中 PCR 检测真菌的敏感性高,对于疑似真菌性眼内炎的患者,PCR 阳性的病例中有半数真菌培养为阴性;(2)真菌培养耗时也长,血清学抗原抗体检查灵敏度不高^[31],因此 PCR 检测眼内液真菌成了更好的选择。针对念珠菌和曲霉菌的 18SrDNA 设计相应引物和探针,可检测出常见的念珠菌、镰刀菌和曲霉菌,但不能检测其他类型的真菌 DNA^[32]。针对真菌 28SrDNA 设计的引物和探针可以检测到更多类别的真菌,包括念珠菌、曲霉菌、毛癣菌、隐球菌、毛霉菌和青霉菌等^[33],拓展了 PCR 对真菌性眼内炎的检测范围。

采用通用引物可以明确细菌真菌感染,但仍需进一步采用特定的探针和引物引导的 PCR 扩增,才能明确是哪一种菌种感染。而细菌真菌种类繁多,即使是多重 PCR,所能检测的数量仍旧有限。因此在 PCR 的基础上采用 DNA 微阵列芯片技术,一次性快速检测多达 76 种不同细菌真菌的基因^[34],既便于发现多重感染,又能准确辨别感染病原体的种类,为临床诊断和治疗展示了美好前景。

4 PCR 在感染性葡萄膜炎诊断中存在的问题

尽管 PCR 检测在众多病原体检测中表现出很高的灵敏度和特异性,要求的标本数量极少,能够快速做出诊断,但它也有自身的局限性。(1)由于部分疾病没有诊断的金指标,很难判断 PCR 结果是否为假阴性,故尽管 PCR 结果为阴性,但仍需结合病史、临床表现以及其他辅助检查,必要时还要综合患者对治疗的反应做出推断,以防漏诊。(2)PCR 检测价格较一般检查昂贵,而眼内液的检查又是有创伤性的,难以将其列入常规检查。为了避免过度检查,对于什么样的患者做眼内液 PCR 检测利大于弊,各篇文献中的标准不一。(3)经 PCR 法检测出高拷贝的病原体数量,显示病原体可能处于复制阶段;但是低拷贝的病原体数量代表着什么呢?它与病毒感染有没有关系?以及诱导机体产生的特异性免疫反应是否致病?对于这种患者是否有抗病原体或免疫治疗的必要。(4)PCR 检测病原体的数量与治疗之间存在怎样的关系,治疗后的患者病原体是否会相应减少或消失?这些暂未见到相应的文献报道。

5 小结

总体而言,PCR 能够检测出眼内液中微量的 DNA 和 RNA,简单、快捷、灵敏度和特异度高,是诊断感染性葡萄膜炎的有利工具。

参考文献

- 1 London NJ, Rathinam SR, Cunningham ET Jr. The epidemiology of uveitis in developing countries. *Int Ophthalmol Clin* 2010; 50(2): 1-17
- 2 Davis JL. Diagnostic dilemmas in retinitis and endophthalmitis. *Eye (Lond)* 2012; 26(2): 194-201
- 3 管怀进,陆宏. 两步聚合酶链式反应法快速诊断感染性角膜炎和眼内炎病原体的研究. *中华眼科杂志* 2004;12: 819-823
- 4 吴薇,鲁辛辛,黄艳飞. 细菌性眼内炎的病原分子诊断研究. *中华医学杂志* 2008;20: 1429-1432
- 5 肖启国,梁丹,刘祖国,等. 127 例外源性化脓性眼内炎病原体及药敏试验结果分析. *中国实用眼科杂志* 2003;4:299-302
- 6 王廷华. Pierre Dubus. PCR 理论与技术. 北京: 科学出版社 2009: 1-3
- 7 Nandi K. Polymerase chain reaction in intraocular inflammation. *Open Ophthalmol J* 2008;(2): 141-145
- 8 Errera MH, Pablo G, Laurence B, et al. Real-time polymerase chain reaction and intraocular antibody production for the diagnosis of viral versus toxoplasmic infectious posterior uveitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2011;249(12):1837-1846
- 9 De Groot-Mijnes JD, Aniki R, Anton M, et al. Polymerase chain reaction and Goldmann-Witmer coefficient analysis are complimentary for the diagnosis of infectious uveitis. *Am J Ophthalmol* 2006;141(2):313-318
- 10 Kongyai N, Sirirungi W, Pathanapitoon K, et al. Viral causes of unexplained anterior uveitis in Thailand. *Eye* 2012; (26): 529-534
- 11 Santos FF, Commodaro A, Souza AV, et al. Real-time PCR in infectious uveitis as an alternative diagnosis. *Arq Bras Oftalmol* 2011;74(4):258-261
- 12 Carmichael A. Cytomegalovirus and the eye. *Eye (Lond)* 2012;26(2):237-240
- 13 Pendergast SD, Werner J, Drevon A, et al. Absence of herpesvirus DNA by polymerase chain reaction in ocular fluids obtained from immunocompetent patients. *Retina* 2000; 20(4): 389-393
- 14 Harper TW, Miller D, Schiffman JC, et al. Polymerase chain reaction analysis of aqueous and vitreous specimens in the diagnosis of posterior segment infectious uveitis. *Am J Ophthalmol* 2009;147(1):140-147
- 15 Westenberg AC, Rothova A, de Boer JH, et al. Infectious uveitis in immunocompromised patients and the diagnostic value of polymerase

- chain reaction and Goldmann-Witmer coefficient in aqueous analysis. *Am J Ophthalmol* 2007;144(5):781-785
- 16 Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, et al. Use of multiplex PCR and real-time PCR to detect human herpes virus genome in ocular fluids of patients with uveitis. *Br J Ophthalmol* 2008; 92(7): 928-932
 - 17 Okhravi N, Jones CD, Carroll N, et al. Use of PCR to diagnose Toxoplasma gondii chorioretinitis in eyes with severe vitritis. *Clin Experiment Ophthalmol* 2005;33(2): 184-187
 - 18 Bidgoli S, Koch P, Caspers L. Toxoplasmic chorioretinitis: positive PCR on vitreous with negative serology for Toxoplasma gondii. *J Fr Ophthalmol* 2011;34(6): 384-385
 - 19 Talabani H, Mergey T, Year H, et al. Factors of occurrence of ocular toxoplasmosis. A review. *Parasite* 2010;17(3):177-182
 - 20 Errera MH, Pablo G, Laurence B, et al. Real-time polymerase chain reaction and intraocular antibody production for the diagnosis of viral versus toxoplasmic infectious posterior uveitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2011;249(12): 1837-1846
 - 21 De Boer JH, Verhagen C, Rothova A, et al. Serologic and polymerase chain reaction analysis of intraocular fluids in the diagnosis of infectious uveitis. *Am J Ophthalmol* 1996;121(6): 650-658
 - 22 Bottos J, Miller RH, Belfort RN, et al. Bilateral retinochoroiditis caused by an atypical strain of Toxoplasma gondii. *Br J Ophthalmol* 2009;93(11):1546-1550
 - 23 Fekkar A, Bodaghi B, Touafek F, et al. Comparison of immunoblotting, calculation of the Goldmann-Witmer coefficient, and real-time PCR using aqueous humor samples for diagnosis of ocular toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 2008;46(6): 1965-1967
 - 24 Matos K, Muccioli C, Belfort Jr, et al. Correlation between clinical diagnosis and PCR analysis of serum, aqueous, and vitreous samples in patients with inflammatory eye disease. *Arq Bras Oftalmol* 2007;70(1): 109-114
 - 25 Rothova A, De Boer JH, Ten Dam-van Loon NH, et al. Usefulness of aqueous humor analysis for the diagnosis of posterior uveitis. *Ophthalmology* 2008;115(2):306-311
 - 26 Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, et al. Diagnosis of ocular toxoplasmosis by two polymerase chain reaction (PCR) examinations: qualitative multiplex and quantitative real-time. *Jpn J Ophthalmol* 2011; 55(5):495-501
 - 27 Okhravi N, Adamson P, Carroll N, et al. PCR-based evidence of bacterial involvement in eyes with suspected intraocular infection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(11): 3474-3479
 - 28 Okhravi N, Adamson P, Lightman S. Use of PCR in endophthalmitis. *Ocul Immunol Inflamm* 2000;8(3): 189-200
 - 29 Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, et al. Diagnosis of bacterial endophthalmitis by broad-range quantitative PCR. *Br J Ophthalmol* 2011;95(3): 345-349
 - 30 Daroy ML, Lopez JS, Torres BC, et al. Identification of unknown ocular pathogens in clinically suspected eye infections using ribosomal RNA gene sequence analysis. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17(5): 776-779
 - 31 Hummel M, Buchheidt D. Molecular and serological diagnosis of invasive aspergillosis: new answers to old questions? *Mycoses* 2007;50(1): 18-23
 - 32 Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, et al. Detection of Candida and Aspergillus species DNA using broad-range real-time PCR for fungal endophthalmitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2012;250(3): 391-398
 - 33 Awa M, Sugita S, Watanabe K, et al. Novel diagnosis of fungal endophthalmitis by broad-range real-time PCR detection of fungal 28S ribosomal DNA. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2012;10:1255-1260
 - 34 Akai T, Kohzaki K, Watanabe A, et al. Use of DNA microarray analysis in diagnosis of bacterial and fungal endophthalmitis. *Clin Ophthalmol* 2012;6:321-326