

反转录 PCR 在真菌性角膜溃疡快速诊断中的价值

赵林,张繁友

作者单位:(116031)中国辽宁省大连市第三人民医院眼科
作者简介:赵林,硕士,副主任医师,研究方向:角膜病、角膜移植。
通讯作者:赵林. littlecolumn@ qq. com
收稿日期:2011-06-13 修回日期:2011-09-02

Value of applied reverse transcription-polymerase chain reaction in detecting fungal corneal ulcer

Lin Zhao, Fan-You Zhang

Department of Ophthalmology, The Third People's Hospital of Dalian, Dalian 116031, Liaoning Province, China

Correspondence to: Lin Zhao. Department of Ophthalmology, The Third People's Hospital of Dalian, Dalian 116031, Liaoning Province, China. littlecolumn@ qq. com

Received: 2011-06-13 Accepted: 2011-09-02

Abstract

• AIM: To establish a method for rapid detection of clinical suspect fungal corneal ulcer by reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR).

• METHODS: A pair of oligonucleotide sequences, which was based on the conserved region of 18srRNA shared by medically important conditioned fungi, was used as the general primers to amplify the DNAs from clinical suspect fungal corneal ulcer in a RT-PCR assay, and the result was compared with culture.

• RESULTS: A 400bp specific DNA product was successfully amplified. The positive rate of fungi culture among 26 clinical specimens was 61.9%, while that of RT-PCR amplification was 73.8%. In addition, the accuracy of PCR method in this study was 83.8%, the sensitivity was 100.0%, and the specialty was 33.3%.

• CONCLUSION: PCR with the general primers is suitable for rapid detection of fungal corneal ulcer because of quickness and high positive rate.

• KEYWORDS: polymerase chain reaction; fungal corneal ulcer; diagnosis

Zhao L, Zhang FY. Value of applied reverse transcription-polymerase chain reaction in detecting fungal corneal ulcer. *Guji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(10):1758-1759

摘要

目的:探讨聚合酶链反应(RT-PCR)快速检测在真菌性角膜溃疡诊断中的价值。

方法:以条件致病性真菌 18srRNA 基因保守区的一对寡

核苷酸序列为通用引物,对临床拟诊为真菌性角膜溃疡的 42 例标本进行 RT-PCR 检测,并与培养方法进行对比。

结果:在 400bp 处出现 DNA 扩增者为阳性。26 份临床标本的真菌培养阳性,阳性率为 61.9%,而经 RT-PCR 扩增阳性率为 73.8%,PCR 扩增准确性为 83.8%,敏感性为 100.0%,特异性为 33.3%。

结论:真菌通用引物进行 PCR 反应检测真菌性角膜溃疡速度快、阳性率高,有助于真菌性角膜溃疡的快速诊断。

关键词:聚合酶链反应;真菌性角膜溃疡;诊断

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2011.10.023

赵林,张繁友.反转录 PCR 在真菌性角膜溃疡快速诊断中的价值.国际眼科杂志 2011;11(10):1758-1759

0 引言

真菌性角膜溃疡是一种严重的感染性角膜疾病,常有植物性外伤病史,致盲率高。真菌性角膜溃疡于 1878 年首先由 Leber 报导。以往由于发病率不高,文献上较少提及,近年来随着广谱抗生素、糖皮质激素和免疫抑制剂的广泛应用,真菌性角膜溃疡的发病率呈上升趋势^[1,2],在我国某些地区已上升为角膜感染的首位^[3]。许多病例特别是不典型病例早期明确诊断较为困难,进而延误了治疗,造成角膜穿孔、眼球摘除,因此寻找快速、准确的实验室诊断方法对临床早期诊断具有重要意义。以往用真菌培养方法鉴定真菌因费时而不能满足临床诊断、治疗的需要。所以,我们采用条件致病性真菌 18srRNA 保守区的寡核苷酸序列为通用引物,以聚合酶链反应(RT-PCR)技术对 42 例临床上拟诊为真菌感染病例的标本进行检测,并与培养方法进行对比,报告如下。

1 对象和方法

1.1 对象 选择 2008-12/2010-11 来我院就诊的被临床拟诊为真菌性角膜溃疡患者 42 例 42 眼,男 30 例,女 12 例;年龄 23~72(平均 45)岁;病程 10d~6mo;左眼 22 只,右眼 20 只。

1.2 方法

1.2.1 培养方法 所有患者均经 10g/L 奥布卡因眼角膜局部表面麻醉,在无菌操作下刮取角膜溃疡边缘和/或溃疡底部的菌丝苔被 2 份,1 份做培养,在无菌操作下接种于沙氏琼脂培养基斜面,置于 25℃~28℃,湿度 40%~50%的温箱中孵育培养 7~10d,有真菌生长者根据菌落特征、颜色以及乳酸酚棉蓝染色镜检菌丝、孢子特征进行菌属鉴定;另 1 份做 PCR 检测。

1.2.2 PCR 方法 (1)DNA 的制备:刮取的另一份病灶组织放入已加入 500μL PBS 的 1.5mL 离心管内,然后加入 100U 溶壁酶(lyticase),37℃温育 1h,6000g 离心 1min,弃上清,然后按照 Biospin 真菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书操作,提取的 DNA 反转录 RNA 做 PCR^[4]。(2)PCR 检测:真菌通用引物采用 A1(5'-ATTCTCGTTGAAGAGCA-3')和

A2 (5'-ACTCAACACGGGAAACT-3'), PCR 总体积为 25 μ L, 其中 2 \times Taq PCR master mix(由大连宝生物生化科技有限公司提供) 12.5 μ L, 真菌上、下游引物各 1 μ L, DNA 模板 6 μ L, 体积不足部分用无菌双蒸馏水补足。PCR 反应结束后, 样品在 12g/L 琼脂糖凝胶上电泳, EB 染色。紫外灯下观察, 凝胶成像系统下照相记录结果, 在整个实验过程中均设立阳性、阴性对照, 并严格按照操作规程进行操作^[5]。临床标本经 PCR 扩增后, 琼脂糖凝胶电泳在 400bp 处出现 DNA 扩增带者为阳性。

统计学分析: 采用 SPSS 11.0 统计软件进行统计分析, 计数资料以率表示, 采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

患者 42 例的临床标本经 RT-PCR 扩增真菌阳性 31 例, 阳性率为 73.8%; 真菌培养阳性率为 61.9% (26/42), 临床标本真菌培养与 RT-PCR 真菌扩增阳性结果比较, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。以真菌培养为“金标准”, RT-PCR 扩增准确性 83.8%, 敏感性 100.0%, 特异性 33.3%, 真菌培养与 RT-PCR 扩增结果比较 ($\chi^2 = 8.2, P < 0.05$)。

3 讨论

真菌性角膜溃疡是角膜病中致盲性眼病之一, 目前实验室诊断方法: 角膜刮片直接镜检阳性率低, 培养法虽是“金标准”, 但耗时长^[6], 共焦显微镜检查是一种快速、有效、无创性的活体检查手段, 能从四维水平进行扫描成像, 动态观察角膜组织中的菌丝^[7]。然而, 该法仅对浅层菌丝的检测效果较好, 当感染波及角膜全层时, 对深层的菌丝和组织难以检查出清晰的图像, 且对菌种的鉴别尚不成熟, 设备的昂贵限制了它的进一步普及^[8]。PCR 技术可体外大量扩增已知序列的 DNA 片段, 使得极微量的 DNA 可在紫外线下被直接观察到, 具有操作简单, 敏感性高和准确性可靠等优点, 因此近年来真菌性角膜溃疡的 PCR 检测越来越多。我们利用真菌 18srRNA 高度保守区而设计通用引物 A1 (5'-ATTCCTCGTTGAAGAGCA-3') 和 A2 (5'-ACTCAACACGGGAAACT-3') 对多种菌种进行 PCR 扩增实验, 结果该引物对真菌组标本均能扩增, 但不能扩增出其他菌种, 证明此真菌通用引物具有高度特异性^[8]; 对临床上拟诊为真菌性角膜溃疡的 42 例标本进行 RT-PCR 检测, 并与培养方法对比, RT-PCR 检测结果 31 例阳性, 扩增阳性率为 73.8%, 而真菌培养 26 例阳性, 阳性率为 61.9%, RT-PCR 扩增与真菌培养方法比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), PCR 扩增阳性率明显高于培养法。在检测时间上, 真菌培养可以鉴别菌种, 为临床药物治疗提供依据, 但是真菌培养耗时长, 一般需要 1wk 左右才能确定是否为真菌感染, 而 RT-PCR 技术可直接对患者角膜溃疡标本提取 DNA, PCR 扩增, 5h 即可出具检验报告, 其显著优点是敏感、快速。PCR 检查在诊断真菌性角膜炎方面效果明显, 并且在某些方面优于传统的真菌培养。美国康涅狄格州以及印度研究人员称, 这些优点包括快速分析以及分析来自遥远地方标本的能力。

近年来, 敏感、快速等特点使得 PCR 技术在诊断真菌性角膜炎中得到越来越广泛的应用。选择真菌基因中不同的目的片段而设计引物, 能特异性地检测真菌, 如 Alexandrakis 等^[9]将 PCR 用于检查镰刀菌引起的真菌

性角膜炎, 敏感性达 89%; Kumar 等^[10]成功将 PCR 结合单链构象多态性 (SSCP) 分析应用于临床中细菌性角膜炎的诊断。Gaudio 等^[11]将 PCR 与培养技术相比较, 其中 74% 的结果一致, 10% 的病例 PCR 为阳性, 培养阴性, 3% 的病例 PCR 为阴性, 培养阳性, 认为 PCR 对临床角膜真菌的诊断具有广阔的应用前景。

RT-PCR 是将 RNA 反转录和 PCR 结合起来建立的一种 PCR 技术。首先进行反转录 cRNA, 然后进行常规 PCR 反应。因为常规 PCR 敏感度不如 RT-PCR, 此法可以检测单个细胞中少于 10 个拷贝的特异的 RNA, 为了防止检测假阳性率高, 我们采取两次取样的方法。这样可以检测以往不能检测的样本里真菌含量少的情况, 尤其是多个医院治疗后用药繁杂病程长等形成的不典型病例有特殊价值, 可以及时确诊, 及时用药, 以达到保留有用视力, 防止失明的目的。

综上所述, 本实验对临床上 42 份拟诊为真菌性角膜溃疡的标本进行检测, 培养阳性的标本 PCR 检测也呈现阳性, 从而确认 RT-PCR 检测结果的正确性; RT-PCR 仅需要 5h, 而真菌培养鉴定需要 1wk, RT-PCR 所需时间明显少于真菌培养鉴定的时间, 有助于真菌性角膜溃疡的快速诊断; RT-PCR 扩增阳性率明显高于培养法; 本实验采用真菌通用引物进行 RT-PCR, 只能扩增出真菌, 不能确定是某个菌属, 采用 RT-PCR 技术确定菌属将是我们进一步研究方向。借鉴真菌检测技术的研究成果, 寻求更为快速、准确、简便、特异、敏感的技术用于临床角膜真菌的检测及鉴定其种属, 将使真菌性角膜炎得到良好的预防和控制。因此, 应用 RT-PCR 方法检测临床拟诊为真菌角膜溃疡患者快速、敏感、准确、简便、特异, 对患者的早期诊断和及时治疗具有重要意义。

参考文献

- 1 Cami J, Farre M. Drug addiction. *N Engl J Med* 2003; 349 (10): 975-985
- 2 曾静, 黄明汉, 王冬梅. 真菌性角膜溃疡 45 例临床分析. *国际眼科杂志* 2008; 8(4): 830-831
- 3 廖源. 伊曲康唑配合氟康唑滴眼液治疗真菌性角膜溃疡 25 例临床观察. *疑难病杂志* 2008; 7(2): 107
- 4 刘素玲, 冉玉平, 曾蔚, 等. 一种适合于 PCR 反应的酵母菌、无绿藻及丝状真菌 DNA 提取方法. *中国真菌学杂志* 2006; 1(6): 340-342
- 5 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程. 第 3 版. 南京: 东南大学出版社 2006; 934-938
- 6 Liesegang TJ. *The Cornea*. 2nd eds. Boston: Butter Worthheinemann 1998; 219-246
- 7 谢立信, 李绍伟, 史伟云, 等. 共焦显微镜在真菌性角膜炎临床诊断中的应用. *中华眼科杂志* 1999; 35: 7-9
- 8 路西林, 薛会敏, 赵朝贤, 等. PCR 检测在真菌性角膜溃疡中的诊断价值. *疑难病杂志* 2009; 8(2): 80-81
- 9 Alexandrakis G, Jalali S, Gloor P, et al. Diagnosis of Fusarium keratitis in an animal model using the polymerase chain reaction. *Br J Ophthalmol* 1998; 82(3): 306-311
- 10 Kumar M, Shukla PK. Use of PCR targeting of internal transcribed spacer regions and single-stranded conformation polymorphism analysis of sequence variation in different regions of rRNA genes in fungi for rapid diagnosis of mycotic keratitis. *J Clin Microbiol* 2005; 43(2): 662-668
- 11 Gaudio PA, Gopinathan U, Sangwan V, et al. Hughes TE. Polymerase chain reaction based detection of fungi in infected corneas. *Br J Ophthalmol* 2002; 86(7): 755-760