

探讨实时荧光定量 PCR 法检测血液新生隐球菌的临床意义

黄铭珊 金霆

作者单位:350101 福州市,福建卫生职业技术学院(黄铭珊)

350003 福州市,福州市第一医院检验科(金霆)

通讯作者:金霆, E-mail: fzf776@163.com

【摘要】 目的 探讨实时荧光定量 PCR(real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RT-FQ-PCR)法检测新生隐球菌感染的临床应用价值。**方法** 选择 2014 年 2 月-2014 年 7 月就诊的 47 例疑似新生隐球菌感染患者的血液标本,采用常规培养基培养方法以及 RT-FQ-PCR 法进行检测,计算检测新生隐球菌的阳性率,并进行统计学分析。采用 RT-FQ-PCR 法对新生隐球菌、光滑念珠菌、克柔念珠菌、烟曲霉、黑曲霉、大肠杆菌、肺炎球菌、金黄色葡萄球菌和链球菌这些常见真菌和细菌的 DNA 进行检测,评价 RT-FQ-PCR 法的特异性。采用 RT-FQ-PCR 和常规培养基培养法对稀释至 5 个/mL 的新生隐球菌菌液进行检测,评价 RT-FQ-PCR 法的灵敏度。**结果** 采用 RT-FQ-PCR 法,以新生隐球菌特异性引物为探针针对新生隐球菌和其他常见真菌及细菌进行检测,只有新生隐球菌出现荧光信号。RT-FQ-PCR 在 5 个/mL 浓度的新生隐球菌菌液中检测出新生隐球菌,而常规培养基培养法未检测出。在 47 例疑似新生隐球菌感染患者中,常规培养基培养方法检测出 11 例,阳性率为 23.40%,而 RT-FQ-PCR 法检测出 14 例,阳性率为 29.79%,二者经比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** RT-FQ-PCR 法与常规培养基培养法对新生隐球菌的检测具有很好的一致性。且 RT-FQ-PCR 法能够检测出较低浓度的新生隐球菌,较常规培养基培养法快速、灵敏度高、特异性强,可缩短报告时间,为临床早期诊断及治疗新生隐球菌感染提供可靠依据。

【关键词】 新生隐球菌;实时荧光定量 PCR 法;常规培养基培养法

doi: 10.3969/j.issn.1674-7151.2015.01.008

The clinical value of RT-FQ-PCR method for *Cryptococcus neoformans* detection in blood

HUANG Ming-shan¹, JIN Ting². ¹The Health Professional Technical College of Fujian, Fuzhou 350101, China

²Department of Clinical Laboratory, the First Hospital of Fuzhou, Fuzhou 350003, China

【Abstract】 Objective To investigate the clinical application value of real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (RT-FQ-PCR) method for *Cryptococcus neoformans* detection in blood. **Methods** The blood samples of 47 patients with probable *Cryptococcus neoformans* infection were selected from February 2014 to July 2014 in hospital. The blood samples were measured by routine culture method and detected DNA fragments by RT-FQ-PCR method. And the detection rates were evaluated by statistical method. *Cryptococcus neoformans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus* were detected by RT-FQ-PCR method to evaluate the specificity. The concentration of *Cryptococcus neoformans* solution was detected by RT-FQ-PCR method and routine culture method to evaluate the sensitivity. **Results** In RT-FQ-PCR method detection, only *Cryptococcus neoformans* had fluorescence signal. In 5/mL concentration of *Cryptococcus neoformans* solution, *Cryptococcus neoformans* was only detected by RT-FQ-PCR method. In 47 cases probable *Cryptococcus neoformans* infection patients, positive rate of routine culture method was 23.40% (11 cases), and positive rate of RT-FQ-PCR method was 29.79% (14 cases). The difference had no statistical significance ($P > 0.05$). **Conclusion** RT-FQ-PCR method and routine culture method have a higher concordance for *Cryptococcus neoformans* detection. RT-FQ-PCR method can detect low concentration of *Cryptococcus neoformans*. Compared with routine culture method, RT-FQ-PCR has shorter time, higher sensitivity and specificity, which can reduce report time and provide reliable basis for clinical early diagnosis and treatment of *Cryptococcus neoformans* infection.

【Key words】 *Cryptococcus neoformans*; Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction method; Routine culture method

广谱抗生素、免疫抑制剂的大量应用,获得性免疫缺陷综合症(acquired immune deficiency syndrome, AIDS)等导致免疫受损疾病患者的增加,器官移植、化疗放疗等技术的普及,使得免疫受损人群逐渐增多,让越来越多人的生命受到深部真菌感染的威胁。新生隐球菌是深部真菌感染中隐球菌属的主要菌种之一,患者主要表现为中枢神经系统被侵犯。新生隐球菌系环境腐生菌,广泛生存于土壤和鸽粪中。正常人常处于新生隐球菌污染的环境中,但发病者极少,感染多发生于免疫功能低下者。新生隐球菌是免疫功能受损的 AIDS 患者最常见的感染真菌,也是导致患者死亡的重要原因^[1]。新生隐球菌按血清学分为 A、B、C、D 和 AD 5 个型别,根据不同型别分为格特变种(血清型 B、C)、grubii 变种(血清型 A)和新生变种(血清型 D)3 个变种,此外,还发现了新生变种和 grubii 变种的杂合体(血清型 AD)^[2-4]。由于新生隐球菌感染的临床表现缺乏特异性,造成其早期诊断很困难,使其感染的诊断和治疗被延误。因此,建立一种简单、快速、有效判断新生隐球菌感染的新方法,对于临床新生隐球菌感染的诊断和治疗具有重要的意义^[5,6]。本文采用实时荧光定量 PCR(real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RT-FQ-PCR)方法和常规培养基培养方法,对 47 例疑似新生隐球菌感染患者的血液进行检测,对比其一致性和灵敏度,探讨 RT-FQ-PCR 法在检测血液新生隐球菌感染中的临床意义。

1 资料与方法

1.1 临床资料 收集 2014 年 2 月-2014 年 7 月福州市第一医院 47 例疑似新生隐球菌感染患者的血液标本。其中男性 31 例,平均年龄(25.4±10.6)岁,女性 16 例,平均年龄(28.7±8.7)岁。根据《隐球菌感染诊治专家共识》^[7]的诊断标准,其中 14 例患者为新生隐球菌感染。

1.2 方法

1.2.1 仪器与试剂 RT-FQ-PCR 采用 7500RT-FQ-PCR 仪(美国 ABI),电热恒温培养箱(DNP-9162,上海精宏),分光光度计(K5500,北京凯奥科技发展有限公司)。新生隐球菌培养采用沙氏琼脂培养基(HB0235-10,青岛海博生物技术有限公司)。

1.2.2 RT-FQ-PCR 模板的 DNA 提取 取 4 ml 血液标本,以离心半径 15 cm,5000 r/min 离心 1 min。去掉上清液,保留沉淀物,后续步骤参照 Meyer 等^[8]的 DNA 提取方法进行 DNA 的提取。使用 K5500 微量分光光度计对提取后的核酸进行检测,其

OD₂₆₀/OD₂₈₀=1.897(高纯度 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.80~2.20)。

1.2.3 RT-FQ-PCR 的引物探针设计 在这 5 种新生隐球菌中,其内转录间隔区(internal transcribed spacer region, ITS)的序列具有种间特异性和种内保守性,可以作为鉴定新生隐球菌的目的序列。通过比对,在新生隐球菌的 ITS 序列中取一段高度保守的序列作为检测的目的序列,再利用 Primer Express 3.0 软件设计出特异性引物和探针。上游引物为 NF: 5'-TTACCTGTTGGACTTGGATTG-3',下游引物为 NR: 5'-CATAGGCCCAGCGAACTTATT-3',探针为 NP: 5'-ACCTGTCAGCCCGGC-3'。其中荧光探针在 5' 和 3' 端分别标记“荧光发射基团”-FAM(6-羧基荧光素,荧光发射峰值在 518 nm 处)和“荧光淬灭基团”-TAMRA(6-羧基四甲基若丹明,荧光发射峰值在 582 nm 处)。

1.2.4 RT-FQ-PCR 条件 在 50 μl 体系中:10×PCR Buffer 5.0 μl、MgCl₂(20 mmol/L)10.0 μl,上下游引物(10 pmol/L)各 2.0 μl、Hot-Taq 酶(5 U/L) 0.5 μl、探针(10 pmol/μL)0.4 μl、dNTPs(20 μmol/L)0.6 μl、模板 DNA 5 μl,加 ddH₂O 至 50 μl。在 ABI 7500 型荧光 PCR 仪上扩增,条件为:95 ℃ 15 min, 94 ℃ 15 s, 60 ℃ 60 s, 40 个循环。

1.2.5 常规培养基培养方法 将增菌后的血液标本接种于沙氏琼脂培养基,置于 37 ℃ 培养 2-5 d,出现乳白色黏液性菌落生长。该菌落呈现圆形的酵母样细胞,其外周有一层较厚的胶质样荚膜,荚膜宽 3~5 μm,初为乳白色,后转变成橘黄色;尿素酶试验阳性(隐球菌产生的尿素酶分解尿素,使培养基变为红色)^[9]。

1.2.6 RT-FQ-PCR 扩增反应检测新生隐球菌的特异性 选择来自福州市第一医院的新生隐球菌(D2a-c)、光滑念珠菌(Y10)、克柔念珠菌(C6a)、烟曲霉(A1)、黑曲霉(A3)这些临床上常见的真菌 DNA 和大肠杆菌(DH5α)、肺炎球菌(Tn1545)、金黄色葡萄球菌(EMRSA15)、链球菌(Ingbritt FR)这些临床上常见的细菌 DNA,用设计的新生隐球菌特异性引物探针对其进行荧光定量检测,观察结果。

1.2.7 两种方法灵敏度比较 取新生隐球菌菌数浓度为 10⁴ 个/mL 的菌液,稀释至 5 个/mL,分别用 RT-FQ-PCR 法和常规培养基培养法来检测,计算两者的灵敏度。

1.2.8 两种方法对 47 例疑似新生隐球菌感染患者的检测效率评价 同时使用 RT-FQ-PCR 方法和常

规培养基培养方法对 47 例疑似新生隐球菌感染患者的血液进行检测,用绝对阳性(确诊为新生隐球菌感染)作为衡量两种方法检测的效率,并进行统计学分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行统计学分析,计数资料的比较采用卡方检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-FQ-PCR 法检测新生隐球菌的特异性 采用 RT-FQ-PCR 法检测新生隐球菌、光滑念珠菌、克柔念珠菌、烟曲霉、黑曲霉、大肠杆菌、肺炎球菌、金黄色葡萄球菌和链球菌这些常见真菌和细菌的 DNA,结果显示,以新生隐球菌特异性引物为探针,RT-FQ-PCR 法只能特异性检测新生隐球菌,而对其他真菌和细菌没有荧光信号,见图 1、图 2。

2.2 灵敏度比较 将新生隐球菌菌数浓度稀释为 5 个/mL 时,采用常规培养基培养方法培养 5 d 后重复检测 10 次,均未检测到新生隐球菌;而采用 RT-FQ-PCR 法重复检测 10 次,均检测到新生隐球菌。

2.3 RT-FQ-PCR 法和常规培养基培养法检测新型

隐球菌的结果比较 采用 RT-FQ-PCR 法对 47 例疑似新生隐球菌感染患者的血液标本进行检测,共检测出 14 例新生隐球菌感染,检测阳性率为 29.79%;而采用常规培养基培养方法检测出 11 例新生隐球菌感染,检测阳性率为 23.40%。两种检测方法经比较,差异无统计学意义($\chi^2 = 0.24, P > 0.05$),见表 1。

表 1 RT-FQ-PCR 法和常规培养基培养法
检测新生隐球菌的结果比较[n(%)]

检测方法	例数	新生隐球菌阳性	新生隐球菌阴性
RT-FQ-PCR 法	47	14(29.79)	33(70.21)
常规培养基培养法	47	11(23.40)	36(76.60)

3 讨论

新生隐球菌是一种引起隐球菌病的深部感染真菌,主要侵犯中枢神经系统^[10]。新生隐球菌广泛存在于自然环境中,可以从水果、蔬菜、土壤中分离出来,也可以从各种鸟类排泄物中分离出,而人类感染的最主要来源是从鸽粪中分离出的新生隐球菌^[11]。随着 AIDS、糖尿病患者的增加以及人们大量使用抗生

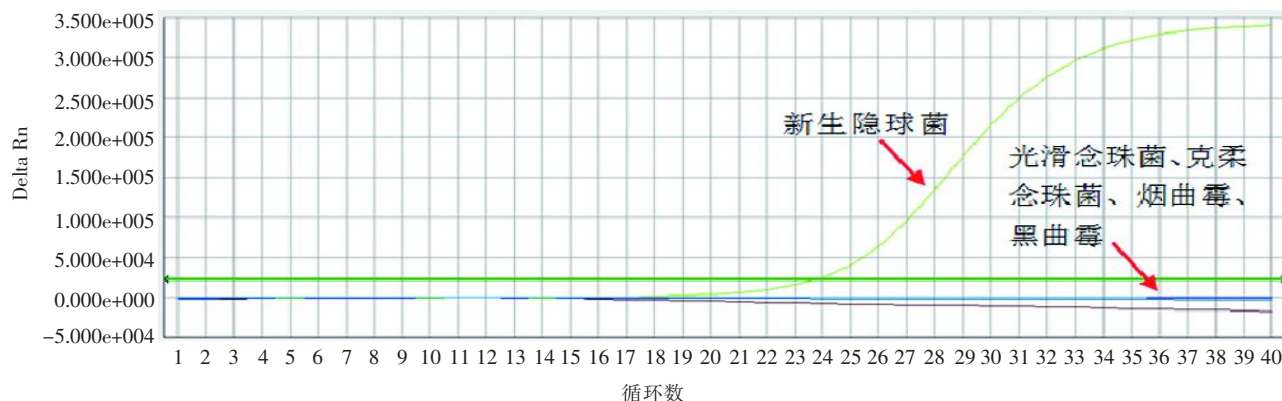


图 1 RT-FQ-PCR 法检测新生隐球菌和其他真菌 DNA 基因扩增曲线图

注:箭头所示为各菌种的荧光曲线

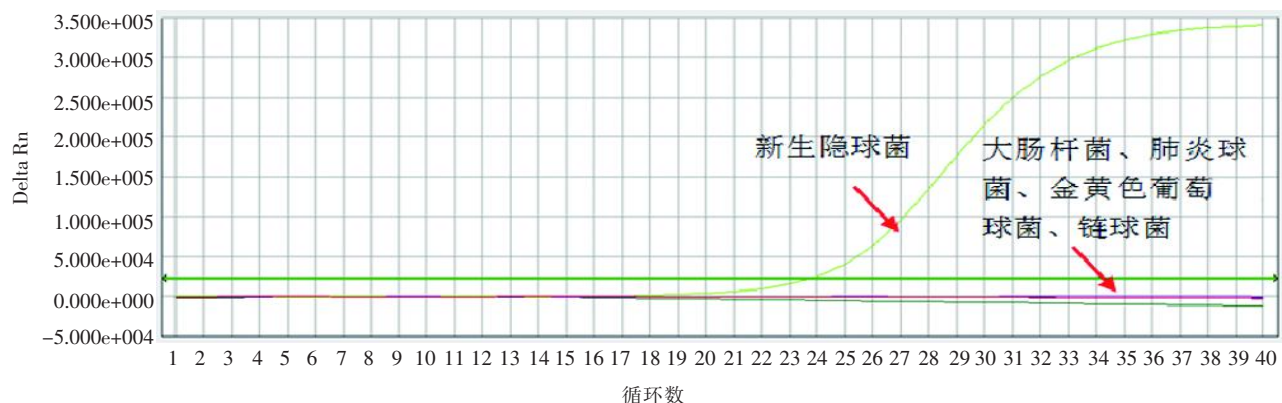


图 2 RT-FQ-PCR 法检测新生隐球菌和细菌 DNA 基因扩增曲线图

注:箭头所示为各菌种的荧光曲线

素、移植手术后使用抗排斥药物、化疗药物等原因,使得免疫受损人群越来越多,导致新生隐球菌感染的患病率有明显的升高趋势。然而新生隐球菌感染的临床表现不具有特征性,易误诊为其他疾病而延误治疗。因此,急需找到一种灵敏度高、特异性强的方法来检测新生隐球菌,以便于临床早期诊断、早期治疗。

目前,检测新生隐球菌的方法有很多,常见的为传统的培养基培养法,其次为血清学方法和 PCR 指纹技术法。其中,常规培养基培养法是检测新生隐球菌的金标准,但该法灵敏度低,且检测时间长,不能作为早期检测新生隐球菌的理想方法。

本文采用 RT-FQ-PCR 法,以新生隐球菌特异性引物为探针,对新生隐球菌、光滑念珠菌、克柔念珠菌、烟曲霉、黑曲霉、大肠杆菌、肺炎球菌、金黄色葡萄球菌和链球菌这些常见的真菌和细菌进行检测,结果显示,只有新生隐球菌出现荧光信号,而其他菌种均未出现荧光信号。说明 RT-FQ-PCR 法对新生隐球菌的检测具有很高的特异性。

本文研究将新生隐球菌菌浓度为 10^4 个/mL 的菌液稀释至 5 个/mL,分别采用 RT-FQ-PCR 法和常规培养基培养法进行检测,结果显示,只有 RT-FQ-PCR 法检测出新生隐球菌,而常规培养基培养法未检测出。说明 RT-FQ-PCR 法可以检测低浓度的新生隐球菌菌液,具有较高的灵敏度,对于早期检测隐球菌感染具有一定的帮助。

本文研究分别采用 RT-FQ-PCR 法和常规培养基培养法对 47 例疑似新生隐球菌感染患者的血液标本进行检测,结果显示 RT-FQ-PCR 法检测的阳性率为 29.79%(14/47),常规培养基培养法检测的阳性率为 23.40%(11/47),经比较两种方法检测新生隐球菌的阳性率差异无统计学意义($P > 0.05$)。说明两方法检测结果具有很好的一致性。

相对于其他检测新生隐球菌的方法,本文研究建立的 RT-FQ-PCR 法,具有简便、快速、灵敏度高、特异性强等优点,减少了很多繁杂的操作,缩短了检测时间,是一种便捷、灵敏、准确有效的临床检验新生隐球菌的新方法。有助于临床及早确诊新生隐球

菌感染,为患者的治疗争取时间。

4 参考文献

- 1 Saag MS, Graybill RJ, Larsen RA, et al. Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis, 2000, 30: 710-718.
- 2 Espinel-Ingroff A, Chowdhary A, Gonzalez GM, et al. Multicenter Study of Isavuconazole MIC Distributions and Epidemiological Cutoff Values for the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* Species Complex Using the CLSI M27-A3 Broth Microdilution Method. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59: 666-668.
- 3 张园, 王静梅, 刘根强. 新生隐球菌病研究进展. 动物医学进展, 2007, 28: 63-67.
- 4 El Amraoui B, El Amraoui M, Cohen N, et al. Anti-Candida and anti-Cryptococcus antifungal produced by marine microorganisms. J Mycol Med, 2014, 24: e149-e153.
- 5 Kelley EJ, Driebe EM, Etienne K, et al. Real-time PCR assays for genotyping of *Cryptococcus gattii* in North America. BMC Microbiol, 2014, 14: 125.
- 6 Chan M, Lye D, Win MK, et al. Chow A3, Barkham T4. Clinical and microbiological characteristics of cryptococcosis in Singapore: predominance of *Cryptococcus neoformans* compared with *Cryptococcus gattii*. Int J Infect Dis, 2014, 26: 110-115.
- 7 《中国真菌学杂志》编辑委员会. 隐球菌感染诊治专家共识. 中国真菌学杂志, 2012, 5: 65-68, 86.
- 8 Meyer W, Marszewska K. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA—a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. Electrophoresis, 1999, 20: 1790-1799.
- 9 李莉, 王家春, 章强强, 等. 鸽粪中新生隐球菌的分离和鉴定. 临床皮肤科杂志, 2000, 29: 198-200.
- 10 Park SH, Kim M, Joo SI, et al. Molecular Epidemiology of Clinical *Cryptococcus neoformans* Isolates in Seoul, Korea. ShMycobiology, 2014, 42: 73-78.
- 11 Danesi P, Firacative C, Cogliati M, et al. Multilocus sequence typing (MLST) and M13 PCR fingerprinting revealed heterogeneity amongst *Cryptococcus* species obtained from Italian veterinary isolates. FEMS Yeast Res, 2014, 14: 897-909.

(收稿日期: 2014-11-20)

(本文编辑: 李霖)