

• 检验技术与方法 •

通用 PCR 法在痰标本真菌检测中的临床应用*

曹国君¹, 赵 芳¹, 刘 璐², 华 丽², 季育华², 赵 缙^{1△}

(1. 上海市闵行区中心医院检验科 201199; 2. 上海交通大学医学院附属瑞金医院检验科 200025)

摘 要:目的 用 PCR 法进行痰标本真菌检测, 并与痰培养结果作比较, 以期临床真菌感染的早期诊断和治疗提供有效手段。方法 160 例免疫力低下患者留取痰标本 194 份 $\times 2$ (均为一式双份), 其中一份直接用于 PCR 扩增, 另一份在 37℃ 培养 1~7 d, 如见真菌或可疑菌落, 则用无菌棉拭子挑取菌落, 再次进行 PCR 扩增并测序, 测序结果与已知真菌序列进行比对, 以鉴定种属。然后用配对卡方检验对 3 种方法(直接 PCR、培养、培养后 PCR)的检测结果进行统计学分析。结果 194 份痰标本接种于科玛嘉平板后培养 7 d, 其中 146 份见真菌生长, 48 份未见真菌生长; 痰培养后挑取真菌或可疑菌落进行 PCR 分析, 结果阳性 170 份, 阴性 24 份; 痰标本直接 PCR 分析, 阳性 178 份, 阴性 16 份。PCR 扩增产物经测序、比对发现, 除 2 份为曲霉菌, 其余均为白色念珠菌。痰培养法真菌检出率显著低于痰直接 PCR 法($P=0.000$)和痰培养后 PCR 法($P=0.000$); 痰培养后, PCR 法与痰直接 PCR 法真菌检出率差异无统计学意义($P=0.115$)。结论 痰直接 PCR 和痰培养后 PCR 在真菌检测中均具有高度敏感性, 但是前者操作更加简便、快速, 适合临床实验室常规使用。

关键词:真菌; 聚合酶链反应; 痰培养

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.13.042

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)13-1635-02

近年来, 随着器官移植受者、获得性免疫缺陷综合征患者、接受免疫抑制治疗的患者、以及长期接受侵袭性治疗的患者等易感人群不断增多, 侵袭性真菌感染的形势越来越严峻^[1-2]。对于免疫低下患者, 侵袭性真菌病(IFD)一旦发病, 死亡率极高, 因此, 早期诊断和早期治疗具有重要的临床意义^[3]。不过, 当前实验室还缺乏特异、有效的真菌检测方法^[4-6]。本研究利用前期建立的真菌通用 PCR 检测法^[7], 对 160 例患者的痰标本进行了分析, 结果发现其比普通培养具有更高的敏感性, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2010 年 8~11 月在海瑞金集团闵行医院住院的 160 例免疫力低下患者(长期服用免疫抑制剂患者、ICU 患者、长期接受插管等创伤性治疗患者)为研究对象, 收集到痰标本共 194 份 $\times 2$ (均为一式双份)。

1.2 仪器与试剂 溶壁酶 lyticase (Sigma), 核糖核酸酶 A (Sigma), 蛋白酶 K (Biotech), 酵母基因组 DNA 抽提试剂盒(上海生工), ExTaqTM (宝生物, DRR001AM), DNA Marker 1 (天根生化科技有限公司, MD101-02); 大和基因扩增仪(杭州大和, 型号: TC-96/T/H), PCR 荧光定量测定仪 (ABI 7500), Tanon-4100 数码凝胶图像分析系统。

1.3 痰标本的处理 取 194 份痰标本直接抽提基因组 DNA。同时将配对的 194 份痰标本接种至科玛嘉平板(CHRO Magar), 在 37℃ 恒温培养箱内培养 1~7 d, 每天观察, 如出现真菌或可疑菌落生长, 则用无菌棉拭子挑取代表性菌落, 转移至 1.5 mL 离心管内保存(含无菌生理盐水)。

1.4 基因分析 按照以前建立的方法提取痰标本基因组 DNA, 并进行 PCR 扩增^[4]。扩增产物经电泳鉴定, 如出现靶条带, 则进行测序分析, 测序结果在 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 数据库中进行比对; 如果未出现靶条带, 则为阴性。每份标本同时进行内对照扩增, 以排除假阴性结果。内对照扩增序列为人 GAPDH, 所用引物由上海复星医学科技发展有限公司提供: 上游引物 5'-CCA GGT GGT CTC CTC

TGA CTT-3'; 下游引物 5'-GTT GCT GTA GCC AAA TTC GTT GT-3'。每次实验均设置阴性对照(蒸馏水)和阳性对照(酵母菌 DNA), 并严格防止污染。

1.5 统计学处理 数据处理采用 SPSS16.0 软件, 统计方法为卡方检验, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 PCR 扩增结果 194 份痰标本接种于科玛嘉平板后培养 1~7 d, 结果为 146 份见真菌生长(阳性), 48 份未见真菌生长(阴性); 痰培养后挑取真菌或可疑菌落进行 PCR 分析, 结果阳性 170 份, 阴性 24 份; 痰标本直接 PCR 分析, 阳性 178 份, 阴性 16 份。PCR 扩增产物送上海英俊公司测序, 经序列比对发现 2 份为曲霉菌感染, 其他均为白色念珠菌感染。用内对照扩增 GAPDH 进行验证, 仅发现 1 份真菌培养阴性标本存在扩增抑制现象或提取过程中基因组 DNA 丢失。

2.2 3 种方法的比较 194 份标本中, 痰培养法真菌阳性率为 75.3%(146/194), 痰直接 PCR 法真菌阳性率为 91.8%(178/194), 痰培养后 PCR 法真菌阳性率为 87.6%(170/194)。痰培养法真菌检出率显著低于痰直接 PCR 法($P=0.000$, $\kappa=0.215$)和痰培养后 PCR 法($P=0.000$, $\kappa=0.468$); 痰培养后, PCR 法与痰直接 PCR 法真菌检出率差异无统计学意义($P=0.115$, $\kappa=0.445$)。

3 讨 论

真菌根据其致病性分为致病性真菌: 组织胞浆菌, 球孢子菌, 类球孢子菌, 皮炎芽生菌, 着色真菌, 孢子丝菌等; 条件致病菌: 念珠菌, 隐球菌, 曲霉菌, 毛霉属, 放线菌, 奴卡菌。侵袭性真菌感染多为条件致病菌, 其中以白色念珠菌和曲霉菌感染最为常见, 约占真菌感染的 70%~80%^[8]。本研究对 194 份痰标本进行真菌 PCR 扩增, 共检测到真菌 178 份, 其中仅 2 份为曲霉菌, 其余全部为白色念珠菌。真菌感染的诊断主要依赖于临床症状、影像学检查和病原学检查, 但由于其临床症状和影像学表现无特异性, 故病原学检查具有非常重要的价值^[8]。病原学检查主要包括真菌直接镜检、培养和组织病理学检查^[9],

* 基金项目: 上海市闵行区科委自然科学基金资助项目(2011MHZ22、2007MH038)。△ 通讯作者, E-mail: zhaozhen72@126.com。

其中镜检是 IFD 实验室检查中最简单、直接与实用的诊断方法。无菌部位标本镜检阳性,可诊断为真菌感染,但检出率较低,阴性结果不能排除诊断。痰等带菌标本只有镜检发现大量菌丝或假菌丝才有诊断意义。培养是 IFD 实验室检查的经典方法,若来源于无菌部位的标本有真菌生长,即可确定为真菌侵袭性感染。但对痰、脓液、粪便等标本真菌培养阳性则应谨慎判断,不能简单地视为 IFD 或者污染,必须密切结合临床做出诊断^[8]。

不过,痰培养虽然操作方便,但易受抗菌剂使用、菌群失调等相关因素的影响,所用时间也较长(1~2 周)。为实现真菌感染的早发现、早治疗,本研究用前期建立的 PCR 法对 194 份痰标本进行扩增,并与痰培养和培养后 PCR 做比较,结果发现直接 PCR 法具有更高的敏感性,检测更为快速(约 4 h)、方便,而且通过对 PCR 产物测序可以实现真菌种属的鉴定。由于不同真菌的耐药有所差异,所以种属鉴定有助于临床实现 IFD 的个性化治疗,促进患者的预后,并有利于节约卫生资源。为了避免假阳性,作者对标本的采集、运送、分析全过程进行了控制,防止外界真菌的污染。同时在检测过程中,设置了内对照,扩增人 GAPDH 基因,以提示标本采集处理不当或存在扩增抑制现象,避免假阴性发生,确保检测结果的准确性和可靠性。不过,本方法仅进行真菌定性检测,无法鉴别真菌定植与侵袭性感染。在多数情况下,条件致病真菌仅在合适的部位定植而不引起感染,但当机体的抵抗力下降、菌群失调或天然屏障结构破坏,定植真菌会引起侵袭性感染,并导致严重的临床后果。可见,定植真菌的检测对危重患者也能起到一定的预警作用^[5]。

总之,虽然 PCR 检测无法鉴别真菌定植与感染,至今还未被批准用于侵袭性真菌病的临床诊断,但由于该方法具有高度的灵敏性和特异性^[10-11],建议将 PCR 法与其他检测方法联合应用,同时结合患者临床症状及影像学特征,以提高 IFD 的确诊率,减少经验性用药或非必要的预防性用药^[12]。

参考文献

[1] Morgan J, Wannemuehler KA, Marr KA, et al. Incidence of invasive aspergillosis following hematopoietic stem cell and solid organ

transplantation; interim results of a prospective multicenter surveillance program[J]. Med Mycol, 2005, 43(Suppl 1): 49-58.

[2] 廖万青. 侵袭性真菌感染的实验室诊断[J]. 检验医学, 2010, 7(25): 503-506.

[3] Maertens J, Meersseman W, Van Bleyenbergh P. New therapies for fungal pneumonia[J]. Curr Opin Infect Dis, 2009, 22(2): 183-190.

[4] Andrew MB, Christopher JL, Sarah JM, et al. Molecular identification of pathogenic fungi[J]. J Antimicrob Chemother, 2008, 61(Suppl 1): i7-i12.

[5] Lau A, Chen S, Sleiman S, Sorrell T, et al. Current status and future perspectives on molecular and serological methods in diagnostic mycology[J]. Future Microbiol, 2009, 4(9): 1185-1222.

[6] Khot PD, Ko DL, Fredricks DN. Sequencing and analysis of fungal rRNA operons development of broad-range fungal PCR assay[J]. , 2009, 75(6): 1159-1165.

[7] 曹国君, 赵筑, 彭奕冰, 等. 真菌基因组 DNA 的提取和通用 PCR 检测方法的建立[J]. 检验医学, 2011, 26(11): 773-778.

[8] 廖万清, 陈敏. 侵袭性真菌病的诊断: 现状与展望[J]. 菌物学报, 2011, 30(1): 5-11.

[9] 武建国. 关注侵袭性真菌感染的实验诊断[J]. 临床检验医学, 2010, 28(2): 87-89.

[10] Khot PD, Fredricks DN. PCR-based diagnosis of human fungal infections[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2009, 7(10): 1201-1221.

[11] Khot PD, Ko DL, Hackman RC, et al. Development and optimization of quantitative PCR for the diagnosis of invasive aspergillosis with bronchoalveolar lavage fluid[J]. BMC Infect Dis, 2008, 29(8): 73.

[12] Suarez F, Lortholary O, Buland S, et al. Detection of circulating Aspergillus fumigatus DNA by real-time PCR assay of large serum volumes improves early diagnosis of invasive aspergillosis in high-risk adult patients under hematologic surveillance[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(11): 3772-3777.

(收稿日期: 2012-02-01)

• 检验技术与方法 •

UF-500i 全自动尿沉渣分析仪在细菌计数中应用的探讨

万 芳, 杜利军, 陈 恒, 钟翠雯
(同江医院检验科, 广东佛山 528300)

摘 要:目的 评价 Sysmex UF-500i 全自动尿沉渣分析仪细菌计数的性能。方法 将大肠埃希菌用生理盐水倍比稀释成理论细菌浓度分别为 9 000、5 400、2 700、1 350、675、337. 5、168. 75 CFU/μL, 用培养法验证配制菌液的实际浓度。同样的方法配制大肠埃希菌与表皮葡萄球菌及大肠埃希菌、表皮葡萄球菌(1: 1)混合菌液, 用 UF-500i 全自动尿沉渣分析仪进行细菌计数。比较理论浓度与 UF-500i 全自动尿沉渣分析仪细菌计数结果的差异。结果 Sysmex UF-500i 全自动尿沉渣分析仪测定大肠埃希菌、表皮葡萄球菌及大肠埃希菌与表皮葡萄球菌混合菌液细菌计数结果远低于理论浓度。结论 Sysmex UF-500i 全自动尿沉渣分析仪用于细菌计数时, 由于细菌的聚集性, 对于泌尿系感染常见细菌, 所测定的细菌个数远低于实际细菌数。

关键词:全自动尿沉渣分析仪; 细胞培养技术; 细菌计数
DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 13. 043 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2012)13-1636-02

以流式细胞术为基本原理的自动分析仪来对尿液进行细菌计数, 具有简单、快速、不需离心、重复性好和准确性高等优点, 成为辅助诊断尿路感染的较好的过筛方法。Sysmex 新推

出的 UF-500/1000i 尿沉渣分析仪系列, 增配了细菌专用通道, 对于细菌的分辨有更强的准确性与特异性。为了解 UF-500i 尿沉渣分析仪细菌计数的特点, 作以下相关研究。