

论著·基础研究

卡氏肺孢子菌肺炎大鼠中的 LAMP 检测方法及其 1,3-β-D 葡聚糖变化的研究^{*}

帕提古丽·那吾尔,刘媛媛,乌兰·同巴依尔,牛晓琳,朱 辉[△]

(新疆医科大学第一附属医院消毒配送中心次供应室一部,新疆乌鲁木齐 830054)

摘要:目的 探讨环介导恒温扩增法(LAMP)检测在卡氏肺孢子菌肺炎大鼠中的可行性及 1,3-β-D 葡聚糖水平的变化。方法 40 只 Wister 大鼠随机分为对照组和肺炎感染组,每组各 20 只。采用地塞米松磷酸钠构建卡氏肺孢子菌肺炎大鼠模型。模型构建成功后,观察两组大鼠的发病情况、体质量、肺重及肺重体积比。设计卡氏肺孢子菌的特异度引物,对两组大鼠进行 LAMP 检测。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测外周血和肺灌洗液 1,3-β-D 葡聚糖水平。结果 与对照组比较,肺炎感染组大鼠死亡 4 只,体质量明显降低,肺重及肺重体积比明显上升,差异有统计学意义($P<0.05$);LAMP 方法能检测卡氏肺孢子菌,对照组为阴性;与对照组比较,肺炎感染组外周血和肺灌洗液 1,3-β-D 葡聚糖水平升高,且肺灌洗液 1,3-β-D 葡聚糖水平高于外周血,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 本研究成功构建卡氏肺孢子菌肺炎大鼠模型并建立卡氏肺孢子菌简便快捷的 LAMP 检测方法,1,3-β-D 葡聚糖水平与卡氏肺孢子菌有一定的相关性。

关键词:卡氏肺孢子菌;LAMP;大鼠;1,3-β-D 葡聚糖

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.03.006

中图法分类号:R446.1

文章编号:1673-4130(2019)03-0277-04

文献标识码:A

Detection of LAMP and changes of 1,3-β-D-glucan in *Pneumocystis carinii* pneumonia rats^{*}

PATIGULI · Nawuer, LIU Yuanyuan, WULAN · Tongbayier, NIU Xiaolin, ZHU Hui[△]

(Disinfecting Supply Division, Xinjiang Medical University First Affiliated Hospital, Urumqi, Xinjiang 830054, China)

Abstract: Objective To investigate the feasibility of LAMP detection in *Pneumocystis carinii* pneumonia rats and the changes of 1,3-β-D-glucan. **Methods** 40 Wister rats were randomly divided into control group and lung infection group, 20 rats in each group. Specific primers were designed for *pneumoniae carinii* and LAMP technique was carried out to identify whether the rats were infected or not. The levels of 1,3-β-D-glucan in peripheral blood and lung lavage fluid were detected by ELISA. **Results** Compared with the control group, there were 4 dead rats in the lung infection group, the body weight decreased significantly, and the lung weight and the percentage of the lung volume increased significantly ($P<0.05$). LAMP method can detect *Pneumocystis carinii*, the control group was negative. Compared with the control group, the level of 1,3-β-D-glucan in peripheral blood and lung lavage fluid in the lung infection group increased. And the 1,3-β-D-glucan level in lung lavage fluid was higher than that in peripheral blood ($P<0.05$). **Conclusion** In this study, we successfully constructed a rat model of *Pneumocystis carinii* pneumonia and established a simple and rapid method for LAMP detection of *Pneumocystis carinii*. 1,3-β-D-glucan and *Pneumocystis carinii* have some relevance.

Key words: *Pneumocystis carinii*; LAMP; rat; 1,3-β-D-glucan

肺孢子菌肺炎(PCP)是获得性免疫缺陷综合征(AIDS)患者最常见的机会性感染疾病,也是该类患者致死的重要原因^[1]。PCP是由卡氏肺孢子菌(PC)感染引发的一种疾病。目前临床上诊断PCP的主要方法是病原学检测、免疫学诊断和分子学诊断^[2]。病

原学检测是最常用的方法,被称为“金标准”,此方法特异度高,但是较繁琐、检出率低。免疫学诊断具有特异度好,检出率高的优点,但是成本较高^[3]。分子学诊断方法主要是聚合酶链式反应(PCR),特异度好,但是需要专门的试剂和贵重仪器。环介导恒温扩

^{*} 基金项目:医学联合基金(2015211C083)。

作者简介:帕提古丽·那吾尔,女,护理师,主要从事消毒灭菌方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail: zhuhui1973@163.com。

本文引用格式:帕提古丽·那吾尔,刘媛媛,乌兰·同巴依尔,等.卡氏肺孢子菌肺炎大鼠中的 LAMP 检测方法及其 1,3-β-D 葡聚糖变化的研究[J].国际检验医学杂志,2019,40(3):277-280.

增法(LAMP)指在等温环境下,30~60 min 内进行核酸扩增,扩增过程中出现焦磷酸镁沉淀,肉眼可判断结果^[4]。LAMP 法灵敏度高,最低检测限为 10 个拷贝。张楠等^[5]发现 LAMP 方法特异度高,灵敏度高 于 PCR 方法,反应时间较短,临床使用时不需要特殊仪器,操作较简单。1,3-β-D 葡聚糖(BDG)是真菌细胞壁的主要成分之一。研究发现 BDG 与深部真菌感染关系密切^[6]。本研究通过构建卡式 PCP 大鼠模型,建立 LAMP 法检测模型大鼠体内 PC,同时测定 BDG,旨在探讨 LAMP 检测方法在卡式 PCP 大鼠中的可行性及 BDG 水平的变化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 Wister 大鼠,SPF 级,雌性,200~220 g 左右,购自上海斯莱克动物中心。生产许可证为 SCXK(沪)2017-0005,实验动物许可证为 SYXK2015-009。

1.1.2 主要试剂 地塞米松磷酸钠注射液(金耀,天津金耀药业有限公司,国药准字 H2020514);四环素片(华南,广东华南药业集团有限公司,国药准字 H44020690);无内毒素质粒小提中量试剂盒[天根,货号 DP118,天根生化科技(北京)有限公司];PMD18-T Vector 试剂盒[宝生物,货号 6011,宝生物工程(大连)有限公司];Bst DNA 聚合酶(KALANG,货号 KL-D7887,上海康朗生物科技有限公司);琼脂糖(Spain,货号 A8201,北京索莱宝生物科技有限公司);大鼠 1,3-β-D 葡聚糖 ELISA 试剂盒购自基尔顿生物科技(上海)有限公司;SYBR Green I 核酸染料购自上海美季生物技术有限公司;引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。

1.1.3 主要仪器 DNA 电泳仪购自孚光精仪(中国)有限公司;DKT200-2 恒温金属浴购自广州华韵生

物科技有限公司;台式高速离心机购自北京泰泽瑞达科技有限公司;KEFS-1 高速组织匀浆机购自上海艾黎化学科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 PCP 模型构建 40 只 Wister 大鼠分成肺炎感染组和对照组,每组各 20 只。对肺炎感染组大鼠进行腹腔注射地塞米松磷酸钠注射液 3.5 mg/只,2 次/周,期间为防止细菌感染,给予肺感染大鼠含四环素的饮水(1 g/L),对照组大鼠腹腔注射同等剂量无菌生理盐水,连续注射 8 周,8 周后停止注射。期间随时观察两组大鼠的活动、饮水和饮食情况,记录大鼠存活数,每 2 周称量体质量。停止地塞米松磷酸钠注射液后,取肺炎感染组大鼠右肺中叶制成肺印片进行 GMS 染色,油镜下观察并发现肺组织中存在典型的肺孢子菌包囊,则认为 PCP 模型构建成功。

1.2.2 实验样本的采集 构建模型前,每组各取 6 只大鼠称重,使用乙醚进行麻醉后心脏取血 1 mL,离心后取血清备用。解剖各组大鼠,取肝脏、肠系膜淋巴结及完整的肺组织并称重,计算肺重/体质量比。参照相关文献^[7]的方法,对大鼠进行支气管肺泡灌洗,采用离心管收集灌洗液,离心收集上清备用。到第 8 周时两组各处死 10 只大鼠,麻醉后心脏取 1 mL 血,离心后取血清备用。解剖大鼠取肝脏、肠系膜淋巴结及完整的肺并称重,计算肺重/体质量比。收集灌洗液,方法同上。

1.2.3 引物设计 从 GeneBank 获得卡式肺孢子菌核内核糖体小亚基 16s rRNA 的基因序列(X12708),使用 DNA man 软件与人肺孢子菌(AB266392)、念珠菌属(E15168)、酵母菌属(Z75578)和小鼠肺孢子菌(AY532651)等的 16s rRNA 进行比对,选择一段保守性好的基因片段。利用 Primer5 软件设计 16s rRNA 特异度 LAMP 引物。见表 1。

表 1 LAMP 引物及碱基序列

LAMP	引物	序列
F3		5'-ATC AGA TAC CGT CGT AGT CTT A-3'
B3		5'-GCT CTC AAT CTG TCA ATC CTT A-3'
FIP		5'-TTC AGC CTT GCG ACC ATA CTC CTC GCT CGG CAT CTT ATG-3'
BIP		5'-AAG GGC ACC ACC AGG AGT TAT GTC TGG ACC TGG TGA G-3'
LoopF		5'-GGA ACC CGA AGA CTT TGA TTT C-3'
LoopB		5'-TGC GGC TTA ATT TGA CTC AAC-3'

1.2.4 质粒构建 使用引物 F3、B3 进行 PCR 扩增,PCR 产物与 PMD18-T 载体连接后转化至感受态细胞中,提取重组质粒 PMD18-T-16s rRNA。

1.2.5 LAMP 反应体系 本实验采用 25 μL 反应体系,包括 10×buffer 2.5 μL,dNTPs 2 μL,MgCl₂ 3.2 μL,LoopF 和 LoopB 引物各 0.16 μL,FIP 和 BIP 引

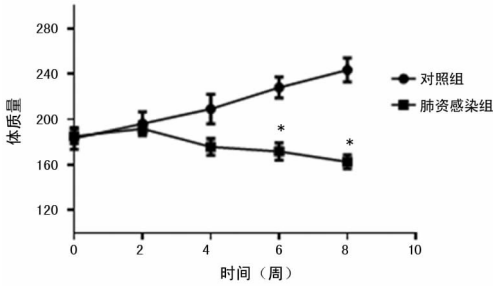
物各 0.32 μL,F3 和 B3 引物各 0.04 μL,BST DNA 聚合酶 0.8 μL,将反应混合物混匀后,再分别加入模板(质粒模板或者组织 DNA)2 μL,SYBR GREEN I 0.5 μL,加双蒸水至 25 μL,混匀后点离,放置于 63 ℃ 恒温水浴 1 h。取 5 μL 进行 2%琼脂糖凝胶电泳,观察电泳和颜色变化结果。

1.2.6 酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测血清和肺灌洗液中 BDG 严格按照 1,3-β-D 葡聚糖 ELISA 试剂盒说明书步骤进行检测。

1.3 统计学处理 选用 SPSS19.0 软件对本研究数据进行统计学分析,研究中体质量、肺重及肺重/体质量比和 BDG 等指标水平经验证均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间各指标水平比较均采用独立 t 检验分析,组内采用配对 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组大鼠的一般情况比较 构建大鼠过程中发现肺炎感染组大鼠出现饮食饮水减少、反应变迟钝、斑块状脱毛、眼球颜色变暗、眼睛和鼻子炎性分泌物增多等现象。注射地塞米松 8 周后,肺炎感染组大鼠死亡 4 只,死亡率为 28.57%。与对照组比较,肺炎感染组大鼠体质量从第 6 周开始明显下降,持续到第 8 周,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。



注:与对照组比较,* $P < 0.05$

图 1 两组大鼠的体质量比较

2.2 两组大鼠肺重及肺重/体质量比比较 注射地塞米松前两组大鼠肺重和肺重/体质量比差异无统计学意义($P > 0.05$)。与注射地塞米松前比较,注射地塞米松 8 周后肺炎感染组肺重和肺重/体质量比明显上升,且观察组注射地塞米松 8 周后肺重和肺重/体质量比高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),具体结果见表 2。

表 2 两组大鼠肺重及肺重/体质量比比较($\bar{x} \pm s$)

组别	肺重(g)		肺重/体质量比($\times 10^{-2}$)	
	注射地塞米松前(n=6)	注射地塞米松 8 周后(n=10)	注射地塞米松前(n=6)	注射地塞米松 8 周后(n=10)
肺炎感染组	1.81±0.16	2.89±0.31*#	0.81±0.11	1.98±0.22*#
对照组	1.78±0.18	1.64±0.15	0.84±0.09	0.61±0.06

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与同组注射地塞米松前比较,# $P < 0.05$

表 3 两组大鼠各组织卡式肺孢子菌 LAMP 检测结果[n/n(%)]

组别	注射地塞米松前	注射地塞米松 8 周后		
		肺	肝	肠系膜淋巴结
肺炎感染组	0/6	10/10(100)*	1/10(10)#	1/10(10)#
对照组	0/6	0/10	0/10	0/10

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与肺组织比较,# $P < 0.05$

2.3 两组大鼠各组织卡式肺孢子菌 LAMP 检测结果 注射地塞米松前,对两组大鼠($n = 6$)肺组织、肝组织和肠系膜淋巴结进行 LAMP 检测,荧光为棕黄色,判定 PC 感染为阴性。注射地塞米松 8 周后,对照组大鼠 3 种组织 LAMP 荧光为棕黄色,判定 PC 感染为阴性;肺炎感染组大鼠均有组织 DNA LAMP 荧光

为绿色,判定 PC 感染为阳性,其中肝组织和肠系膜淋巴结 PC 检出率低于肺组织,差异有统计学意义($P < 0.05$),与对照组比较,肺炎感染组肺组织检出率升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),肝和肠系膜淋巴结检出率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具体结果见表 3。

2.4 两组大鼠外周血和肺灌洗液 BDG 水平比较 注射地塞米松前两组大鼠外周血和灌洗液的 BDG 水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。注射地塞米松 8 周后肺炎感染组外周血和肺灌洗液 BDG 水平表达均上升,均高于对照组,且肺灌洗液 BDG 水平高于外周血,差异有统计学意义($P < 0.05$),具体结果见表 4。

表 4 两组大鼠外周血和肺灌洗液 BDG 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	外周血 BDG(pg/mL)		肺灌洗液 BDG(pg/mL)	
	注射地塞米松前(n=6)	注射地塞米松 8 周后(n=10)	注射地塞米松前(n=6)	注射地塞米松 8 周后(n=10)
肺炎感染组	11.21±1.21	24.23±2.47*#	12.66±9.61	31.22±3.26*#△
对照组	11.52±1.15	12.54±1.33	13.17±8.46	13.61±9.06

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与注射地塞米松前比较,# $P < 0.05$;与外周血比较,△ $P < 0.05$

3 讨 论

肺炎主要是病原体所引发的疾病,如:真菌、细菌、支原体、衣原体和病毒等^[8]。PC 属于机会性致病

真菌的一种,可导致 PCP 的发生。近些年来随着艾滋病、肿瘤和自身免疫性疾病患者人数的增加,PCP 的致死率也逐年增加^[9]。研究报道,PCP 与慢性阻塞性

肺病(COPD)发生存在关系^[10]。目前临床上 PC 的检测方法主要为病原学检查,该方法具有良好的特异度,但是耗费时间较长^[11]。LAMP 是一种等温核酸扩增方法,敏感性高。研究发现,LAMP 灵敏度、特异度和检出率与巢氏 PCR 和实时定量荧光 PCR 无明显差异^[12]。因此将 LAMP 检测方法运用于 PCP 检测,对于该疾病的早期诊断和预后都具有重要的意义。

本研究采用腹腔注射地塞米松的方法构建 PCP 模型,建模过程中发现肺炎感染组大鼠出现饮食饮水减少、反应变迟钝、斑块状脱毛、眼球颜色变暗、眼睛和鼻子炎性分泌物增多等现象。注射地塞米松 8 周后,肺炎感染组大鼠死亡 4 只,死亡率为 28.57%。与对照组比较,肺炎感染组大鼠体质量从第 6 周开始明显下降,持续到第 8 周,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果提示了模型大鼠病情随建模时间延长而加重,也侧面验证了模型构建成功。孙艳等^[13]也发现卡氏 PCP 模型大鼠随着建模时间病情会加重,出现体质量减轻、反应迟钝等情况。目前国外已经开展 LAMP 检测肺孢子菌,但是国内还在构建 LAMP 检测方法阶段^[14]。本研究在 PCP 大鼠模型上运用 LAMP 技术检测到 PC 感染,检出率为 100%,而对照组各组织均未检测到 PC 感染。结果提示此方法具有高特异度,结果可靠,不存在假阳性。值得一提的是,PCP 组 10 只大鼠肺组织均检测到 PC 感染,各有 1 只肝脏组织和肠系黏膜组织也检测到 PC 感染,其原因可能是 PC 在 PCP 疾病后期发生了转移扩散,这需要后期大量实验验证。

BDG 检测主要用于系统性念珠菌病和肺曲霉病的检测,在 PC 的检测中应用较少^[15-16]。本研究结果显示,注射地塞米松前两组大鼠外周血和灌洗液的 BDG 水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。注射地塞米松 8 周后肺炎感染组外周血和肺灌洗液 BDG 水平表达均上升,均高于对照组,且肺灌洗液 BDG 水平高于外周血($P < 0.05$)。结果提示了 BGD 与 PCP 有一定相关性,可作为 PCP 的早期辅助诊断指标。吴欢欢等^[17]也发现 BGD 与 PCP 具有一定相关性,是可靠的 PCP 辅助诊断的指标。肺灌洗液中 BGD 高于血清 BGD,原因是肺部为 PC 的易感部位,且肺泡中含有大量吞噬细胞,吞噬病原菌后可释放更多 BDG^[18]。

4 结 论

本研究成功建立 PCP 大鼠 PC 基因的 LAMP 检测方法,可将此方法与临床常用的 PCP 诊断方法结合并进行优化,对简捷高效的新型诊断技术开发具有一定的潜在价值。同时,本研究发现 BGD 与 PCP 有一定相关性,可作为 PCP 的早期辅助诊断指标。

参考文献

[1] 马孝煜,王敏,刘纯. 艾滋病合并肺孢子菌肺炎 23 例临床分析[J]. 中国感染控制杂志,2015,14(7):459-463.

- [2] OTTOSEN J, EVANS H. Pneumonia challenges in the definition, diagnosis, and management of disease[J]. Surg Clin North Am, 2014, 94(6):1305-1317.
- [3] DIBARDINO D M, WUNDERINK R G. Aspiration pneumonia: A review of modern trends[J]. J Crit Care, 2015, 30(1):40-48.
- [4] 崔淑娟,石伟先,彭晓旻,等. 人肺炎衣原体 LAMP 快速检测方法的建立[J]. 中国热带医学, 2015, 15(8):917-919.
- [5] 张楠,秦铮,马素丽,等. 肺孢子菌基因 LAMP 检测方法的建立[J]. 热带医学杂志, 2015, 15(8):1007-1009.
- [6] 伊洁,郑力胜,窦亚玲. 血浆 1,3- β -D 葡聚糖对卡氏肺孢子菌肺炎的诊断价值[J]. 检验医学与临床, 2015, 12(22):3337-3338.
- [7] 陈兆艳,梁冰,刘金凤,等. Wistar 大鼠肺孢子虫肺炎的实验研究[J]. 中华临床医师杂志:电子版, 2015, 9(14):2713-2717.
- [8] 葛神永,孙伟. 不同病原体感染小儿肺炎降钙素原 C-反应蛋白 白细胞计数变化情况[J]. 安徽医学, 2017, 44(7):904-906.
- [9] 谢正平,朱斌. 艾滋病合并肺孢子菌肺炎的 CT 表现分型与 CD4⁺ T 淋巴细胞的相关性[J]. 中国医学影像学杂志, 2017, 24(6):447-451.
- [10] FITZPATRICK M E, TEDROW J R, HILLENBRAND M E, et al. Pneumocystis jirovecii colonization is associated with enhanced Th1 inflammatory gene expression in lungs of humans with chronic obstructive pulmonary disease[J]. Microbiol Immunol, 2014, 58(3):202-211.
- [11] 宋贤,普琳梅,马翠莲,等. 复方磺胺甲噁唑联合卡泊芬净治疗卡氏肺孢子菌肺炎疗效和安全性的 Meta 分析[J]. 医药导报, 2017, 35(12):1415-1418.
- [12] 严春霞,闻人庆,陆伟宏,等. 可视化环介导等温扩增技术在肺炎支原体检测中的应用[J]. 临床检验杂志, 2016, 34(2):85-89.
- [13] 孙艳,伊丽孜拉·伊克拉木,高剑,等. 大鼠卡氏肺孢子菌肺炎模型建立及其病理生理学相关细胞因子的变化[J]. 西部医学, 2015, 27(9):1290-1294.
- [14] 曹科峰,沈继录,汪学龙. 环介导等温扩增技术检测铜绿假单胞菌的研究[J]. 安徽医科大学学报, 2017, 62(3):450-453.
- [15] 王兴,杨柳,贺曦,等. 脑脊液(1,3)- β -D-葡聚糖在颅内真菌感染诊治的价值[J]. 中国真菌学杂志, 2017, 39(2):86-88.
- [16] 杨莉莉,邓瑛,刘敏,等. 血浆(1-3)- β -D 葡聚糖对侵袭性真菌感染诊断的临床意义[J]. 检验医学与临床, 2016, 13(10):1364-1366.
- [17] 吴欢欢,李玉苹,陈成水,等. 卡氏肺孢子菌肺炎血清学指标的研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(8):1769-1771.
- [18] 赵衍会,付玉荣,伊正君. 支气管肺泡灌洗液真菌 1,3- β -D 葡聚糖对侵袭性肺部真菌感染诊断的临床价值[J]. 中国病原生物学杂志, 2015, 10(9):841-844.