文章编号:1000-5404(2006)14-1506-03

论著

巢式PCR扩增诊断播散性毛孢子菌病的动物实验研究

杨蓉娅,赵 逊,郝 飞 (第三军医大学西南医院皮肤科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨应用PCR技术诊断播散性毛孢子菌病的可行性。**方法** 建立动物模型后,于接种3、7、14 d分别采集小鼠眶静脉血和肝脏组织标本,进行真菌培养和巢式PCR扩增。**结果** 小鼠静脉接种3、7、14 d后血清培养的阳性率分别为0、20%、0,而巢式PCR的阳性率分别为80%、90%、88.9%;在上述时相点,肝脏组织真菌培养阳性率分别为50%、40%、22.2%,而巢式PCR的阳性率分别为90%、90%、88.9%。血清和肝脏组织真菌培养阳性率与巢式PCR阳性率差异均具有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 巢式PCR扩增*T. asahii*特异性DNA片段,可作为播散性毛孢子菌病的一种特异、灵敏、快捷的早期诊断手段。

关键词:播散性毛孢子菌病;诊断

中图法分类号:R446.5;R519.8 **文献标识码**:A

A nested PCR assay to diagnose disseminated trichosporonosis in murine model

YANG Rong-ya, ZHAO Xun, HAO Fei (Department of Dermatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the feasibility of the nested PCR technique to detect the *Trichosporon asahii* DNA in the blood and liver samples from the murine model of disseminated trichosporonosis. **Methods** On day 3, 7, 14 after intravenous inoculation of *Trichosporon asahii* suspension, blood and liver samples of 30 BALB/c mice were collected. Another ten normal mice serve as control. DNA was amplified by nested PCR, with a pair of primer. Fungal culture was done as control. **Results** On day 3, 7, 14 after inoculation, the positive rate of the serum fungal cultivation were 0, 20%, 0; the positive rate of the serum after nested PCR assay was 80%, 90%, 88.9%; the positive rate of liver fungal cultivation were 50%, 40%, 22.2%; the positive rate of liver after nested PCR assay was 90%, 90%, 88.9%. There were statistical differences between the positive rate by nested PCR assay and fungal cultivation to check the serum and liver samples on day 3, 7, 14 after inoculation. The survival mice to the 14th day were too less to make statistical analysis. **Conclusion** The results suggest that *T. asahii* DNA assay by nested PCR is more specific, more sensitive, and faster than fungal cultivation. The nested PCR assay could be a potential assay for the diagnosis of disseminated trichosporonosis.

Key words: disseminated trichosporonosis; diagnosis

播散性毛孢子菌病是一种广泛累及皮肤、肝、脾、肺、肾等器官的深部真菌病,主要致病菌是阿萨希毛孢子菌(*Trichosporon asahii*, *T. asahii*),由于其病死率可高达80%,所以对该病的早期诊断和治疗则显得非常重要。近年来,播散性毛孢子菌病的发病率逐年上升[1],仅日本1家医院就报道了27例。相比之下,国内报道病例则很少,2000年国内报道了首例播散性毛孢子菌病,并构建了动物模型[2-4],其后在另一家医院也发现了肺部*T. asahii*感染。国内皮质类固醇激素和细胞毒性化疗药物的临床应用远较国外普遍,存在着播散性毛孢子菌病的漏诊、误诊的可能性。该病的诊断在很大程度上要依靠病原菌的分离和鉴定,但*T. asahii*鉴定困难,可影响临床诊断。为了能给临床提供一种特异、灵敏、快捷的诊断手段,我们探讨了应用巢式PCR(Nested PCR)技术早期诊断播散性毛孢子菌病的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 BALB/c小鼠40只,雄性,体质量20~28 g(购自中国中医研究院动物实验中心),分为4组,每

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30570099)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30570099)

作者简介:杨蓉娅(1958-),女,山西省兴县人,博士研究生,主任医师,主要从事毛孢子菌病等深部真菌病方面的研究,发表论文30篇。电话:(010)66721229,E-mail: yangrya@sina.com

通讯作者:郝 飞,电话:(023)68754416

收稿日期:2006-04-10;修回日期:2006-05-29

组 10 只，其中 1 组为对照组，不进行免疫抑制和菌液接种，其余为实验组，分为 3 d 组，7 d 组和 14 d 组，并分别于 3、7、14 d 进行眶静脉采血、处死、解剖。

1.1.2　菌株及主要试剂　　*T. asahii* AS 2.2174，由北京军区总医院提供。真菌培养：采用沙氏斜面培养基。试剂：Tris 碱（Roche 公司）；EDTA（Amresco 公司）；SDS（Sigma 公司）；PCR Buffer（10mmol/l Tris-HCl、50 mmol/l KCl、0.1% TritonX-100）、$MgCl_2$、*Taq* 酶（Promega 公司）；dNTP（Toyobo 公司）；β-actin（英骏生物公司）；玻璃奶 DNA 回收试剂盒（Promega 公司）。

1.1.3　引物　　根据 Sugita[5] 巢式 PCR 所应用的 2 对引物：第 1 步引物正义链为 TAAF：5′-GGATCATTAGTGATTGCCTTTATA-3′，反义链 ITS4R：5′-TCCTCCGCTTATTGATATG-3′；第 2 步引物正义链为 TAAF：5′-GGATCATTAGTGATTGCCTTTATA-3′，反义链 S2-2：5′-GGACCCAGTGAAACTTATTACAC-3′（英骏生物公司）。扩增 *T. asahii* 的 ITS。采用 β-actin（英骏生物公司）作对照，引物正义链为 5′-GTCAGAAGGACTCCTATGTG-3′，反义链 5′-GCTCGTTGCCAATAGTGATG-3′。

1.2　方法

1.2.1　建立动物模型　　菌液制备：*T. asahii* AS 2.2174 在沙氏培养基上 37 ℃培养 2 周，以无菌生理盐水冲洗培养基斜面，搜集菌落，将菌液经 8 层无菌纱布过滤，血球记数板记数，调整孢子悬液浓度为 3.2×10^7 cfu /ml。免疫抑制：对实验组 30 只小鼠于菌液接种 3 d 前进行免疫抑制，每只小鼠腹腔注射环磷酰胺 200 mg/kg。对存活小鼠接种第 7 天重复上述注射。菌液接种：对实验组 30 只小鼠选尾静脉注射菌液 0.3 ml。

1.2.2　标本采集　　于接种 3、7、14 d 时取眶静脉血 1 ml；分别于接种后 3、7、14 d 处死各组存活的小鼠并解剖，取肝组织约 1/3 匀浆；对照组小鼠于第 14 天处死，取眶静脉血 1 ml，取肝组织约 1/3 匀浆。

1.2.3　真菌培养　　将上述各组小鼠血清及肝组织标本匀浆，分别接种于沙氏斜面培养基中进行真菌培养。温度 37 ℃，2 周后，如无菌落生长则判定为阴性结果。

1.2.4　DNA 提取　　分别取上述各组小鼠肝脏匀浆少许及血清 100 μl，加入 100 μl 裂解液，用移液管反复吸打；100 ℃水浴 15 min；加入 100 μl 醋酸钾，冰块中放置 1 h；离心后上清液 24∶1氯仿-异戊醇 200 μl 抽提 2 次；水相加入 200 μl 预冷异丙醇，－20 ℃放置 15 min；离心后沉淀用 75% 乙醇洗涤 1 次后风干；加入 50 μl 蒸馏水 －20 ℃保存。

1.2.5　PCR 扩增　　总反应体积为 50 μl，包括 PCR 缓冲液（10 mmol/L Tris-HCl、50 mmol/l KCl、0.1% TritonX-100）5 μl、200 μmol/L dNTP 4 μl、$MgCl_2$ 3 μl、第 1 对上下游引物各 3 pmol、*Taq* 酶 2.5 U、DNA 模板 20 μl，蒸馏水补齐。94 ℃预变性 3 min，94 ℃ 30 s，57 ℃ 1 min，72 ℃ 1 min，30 个循环，72 ℃延伸 10 min；取 1 μl 第 1 次 PCR 扩增产物作模板，加入第 2 对引物经 94 ℃预变性 3 min，94 ℃ 30 s，65℃ 1 min，72 ℃ 40 s，30 循环，72 ℃延伸 10 min。分别取 2 次 PCR 扩增产物 10 μl 在 2% 琼脂糖凝胶电泳。

1.2.6　DNA 序列分析　　用玻璃奶 DNA 回收试剂盒对凝胶中的 DNA 进行回收并经 ABI377 核苷酸测序仪检测。

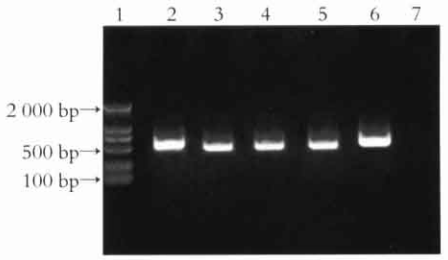
1.3　统计学分析

采用 Qstat 35 软件对实验结果进行 χ^2 检验。

2　结果

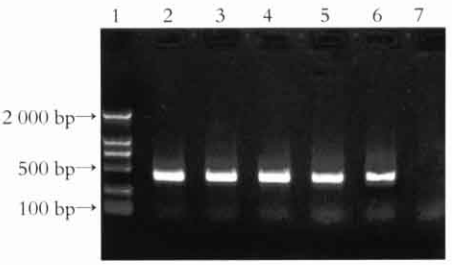
2.1　小鼠肝脏及血清巢式 PCR 扩增产物

小鼠肝脏及血清经巢式 PCR 第 1 对引物扩增后，得到长度为 529 bp 的 DNA 片段（图 1）。取 1 μl 第 1 次扩增产物作模板，应用第 2 对引物进行第 2 次 PCR 扩增，得到长度为 412 bp 的 DNA 片段（图 2）。回收巢式 PCR 扩增后得到的 DNA 片段，经 ABI377 核苷酸测序仪测序，Blast 分析，结果显示目标片段与 *T. asahii* 具有 99.99% 的同源性。



1：DNA 标准；2－4：小鼠肝脏组织；5，6：小鼠血清；7：阴性对照

图 1　巢式 PCR 第 1 对引物扩增



1：DNA 标准；2－4：小鼠肝脏组织；5，6：小鼠血清；7：阴性对照

图 2　巢式 PCR 第 2 对引物扩增

2.2　小鼠血清巢式 PCR 扩增及真菌培养阳性率比较

小鼠血清巢式 PCR 扩增阳性率 3 d 为 80%（8/10），7 d 为 90%（9/10），14 d 为 88.9%（8/9）。小鼠血清真菌培养阳性率 3 d 为 0（0/10），7 d 为 20%（2/10），14 d 为 0（0/9），各时间段阳性率比较均有显著性差异（$P<0.01$）。健康对照组小鼠血清巢式 PCR 扩增均为阴性。

2.3　小鼠肝脏组织巢式 PCR 扩增及真菌培养阳性率比较

小鼠肝脏组织巢式 PCR 扩增阳性率 3 d 为 90%（9/10），7 d为 90%（9/10），14 d 为 88.9%（8/9）；小鼠肝脏真菌培养阳性率3 d为 50%（5/10），7 d 为 40%（4/10），14 d 为 22.2%（2/9）。14 d 组仅存活 9 只，各时间段阳性率比较均有显著性差异（$P<0.05$）。健康对照组小鼠肝脏组织巢式 PCR 扩增均为阴性。

3　讨论

本实验结果表明，各时间段组间肝脏、血清巢式 PCR 检测与真菌培养比较均有统计学意义，巢式 PCR

检测阳性率高于真菌培养。

巢式 PCR 本质是 2 对引物重复扩增 *T. asahii* 的特异性 DNA 片段。本实验是通过扩增 *T. asahii* 的 ITS 区及 5.8S 区域，并利用第 1 次 PCR 扩增产物作模板进行巢式 PCR 扩增，使目标 DNA 片段再次指数扩增，产量大大增加，实验的灵敏性也相应增高。Nagai 等[6]报道巢式 PCR 能通过 5 fg（femtogram，飞克）的 *T. asahii* DNA 提取物检测出靶 DNA。真菌培养需要的标本量较大，尤其是血培养，至少需要 5 ~ 10 ml，而每只小鼠仅能采到 1 ml 血液，血清得到的更少。本实验 30 例标本中，只有 2 例真菌培养阳性，说明真菌培养与标本量有直接关系。巢式 PCR 的血清用量仅为 100 μl，肝脏标本用量也仅为几十毫克，对于微量标本的检测，巢式 PCR 的灵敏性明显优于真菌培养。

诊断用时方面，真菌培养耗时较长，该菌在沙氏培养基上，一般需经过至少 3 ~ 5 d 的时间才能长出菌落。即便真菌培养成功后，*T. asahii* 鉴定也比较烦琐，根据其镜下形态特征只能进行初步鉴定，准确的结果还需要生化实验和 DNA 序列分析。而利用巢式 PCR 扩增 *T. asahii* DNA 片段，确诊时间不超过 8 h。

诊断特异性方面，Takashi Sugita 利用上述 2 对引物进行巢式 PCR 扩增后，只有 *T. asahii var. asahii*、*T. asahii var. coremiiformis*、*T. asahii var. faecalis* 扩增出目标片段，其他 8 种毛孢子菌，以及念珠菌属均未扩增出目标片段。说明应用种特异性引物，巢式 PCR 只扩增 *T. asahii* DNA 特异性片段，该方法可以直接明确是否为 *T. asahii* 感染。

播散性毛孢子菌病的代谢产物测定，如几丁质酶、麦角甾醇等，也都是重要的辅助诊断方法，但由于缺乏 *T. asahii* 的特异性代谢产物，对诊断该病的价值远不如巢式 PCR。由于巢式 PCR 也存在假阳性和假阴性问题，因此本实验设立健康小鼠对照，在每次 PCR 扩增时，均分别采用 β-actin 和蒸馏水作为阳性和阴性对照，以避免饲养和操作因素对实验结果的影响。

总之，巢式 PCR 扩增 *T. asahi* 特异 DNA 片段，可作为 *T. asahii* 感染所致毛孢子菌病的一种特异、灵敏、快捷的早期诊断手段。

（致谢：感谢北京军区总医院皮肤科王文岭副主任医师给予本课题的指导与帮助）

参考文献：

[1] PINI G, FAGGI E, DONATO R, *et al*. Isolation of Trichosporon in a hematology ward[J]. Mycoses, 2005, 48(1): 45 - 49.

[2] 杨蓉娅，敖俊红，王文岭，等. 阿萨希丝孢酵母引起播散性毛孢子菌病国内首例报告[J]. 中华皮肤科杂志，2001，34(5)：329 - 332.

[3] 杨蓉娅，李大伟，赵建花，等. 国内首例播散性毛孢子菌病病原菌阿萨希丝孢酵母菌的 DNA 序列分析[J]. 中华医学杂志，2001，81(8)：472 - 475.

[4] 杨蓉娅，王文岭，敖俊红，等. 阿萨希毛孢子菌致小鼠播散性毛孢子菌病的实验和治疗研究[J]. 中华皮肤科杂志，2004，37(8)：481 - 483.

[5] SUGITA T, NAKAJIMA M, IKEDA R, *et al*. A nested PCR assay to detect DNA in sera for the diagnosis of deep-seated trichosporonosis [J]. Microbiol Immunol, 2001, 45(2): 143 - 148.

[6] NAGAI H, YAMAKAMI Y, HASHIMOTO A, *et al*. PCR detection of DNA specific for Trichosporon species in serum of patients with disseminated trichosporonosis[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(3): 694 - 699.

（编辑 汪勤俭）

（上接 1486 页）

菌活性（耐药率仅 16.9%），是治疗该类细菌感染的首选药物，但对嗜麦芽窄食单胞菌则表现为天然耐药。这与本菌能产生青霉素酶、头胞菌素酶及金属 β-内酰胺酶，破坏 β-内酰胺酶有关[4]。因此，当临床确定为该菌感染时，应禁用青霉素类、头胞类及碳青霉烯类抗生素。此外，本研究分离率较高的鲍曼不动杆菌在显示对泰能和阿米卡星较低耐药性的同时，也显示出对青霉素类、头胞类及 β-内酰胺酶类抗生素很高的耐药性。其耐药机制可能涉及：β-内酰胺酶的产生，青霉素结合蛋白的改变，菌体的结构和功能的变化以及外膜蛋白通透性的降低等原因，其中 β-内酰胺酶的产生为鲍曼不动杆菌最主要的耐药机制。由此可见，依据药敏检测的结果，优化选择敏感抗生素对患者治疗尤为重要。

关键词：非发酵菌；菌群分布
中图法分类号：R37 文献标识码：B

参考文献：

[1] 潘发慎，金益辉，郑 宇，等. 医院获得性嗜麦芽窄食单胞菌下呼吸道感染 65 例临床和药敏分析[J]. 中华传染病杂志，2001，19(3)：187 - 188.

[2] 安 群，高 岩. 非发酵菌耐药性分析及抗菌药物治疗对策[J]. 中华医院感染学杂志，2005，15(5)：571 - 573.

[3] 褚海青，何国钧，瞿介明. 下呼吸道标本分离的非发酵菌的耐药性监测[J]. 上海医学检验杂志，1999，14(2)：96 - 98.

[4] 林 明，李瑞慧，谢宝松，等. 37 株嗜麦芽窄食假单胞菌下呼吸道感染药敏分析[J]. 福建医药杂志，2003，25(1)：51 - 52.

（编辑 陈聪连）