文章编号:1000-5404(2013)15-1583-04

论著

核酸序列依赖扩增联合分子信标对曲霉菌感染的检测效果

王立朋[1],何云燕[2],夏 云[1],王慧娟[1] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院检验科[1];400013 重庆,重庆市中山医院检验科[2])

[摘要] **目的** 建立快速、灵敏、特异的定量检测曲霉菌感染的诊断方法。**方法** 以烟曲霉菌、黄曲霉菌及黑曲霉菌的孢子配制菌液,提取RNA后,采用核酸序列依赖扩增(nucleic acid sequence-based amplification,NASBA)联合分子信标(molecular beacon,MB)技术进行荧光检测,并对该方法进行灵敏度和特异性分析。**结果** 扩增过程中累计荧光量达到设定的荧光阈值所需循环数与标本中霉菌孢子量的对数存在线性相关关系($y=-10.7x+81.6$,$r=0.988$)。将含有梯度数量霉菌孢子的标本提取总RNA后进行检测,可建立相应标准曲线。该方法的灵敏度可达到1个孢子;对照菌株(金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌、热带念珠菌、新型隐球菌)与曲霉菌提取总RNA经扩增后的产物进行电泳分析,发现仅曲霉菌出现特异性条带。**结论** NASBA结合分子信标检测曲霉菌具有灵敏度高、特异性强的特点,具有潜在利用价值,有望成为曲霉菌感染的临床诊断方法。

[关键词] 核酸序列依赖扩增;分子信标;曲霉菌;诊断
[中图法分类号] R379.6; R446.5; R446.9 [文献标志码] A

Aspergillosis detection by nucleic acid sequence-based amplification and molecular beacon

Wang Lipeng[1], He Yunyan[2], Xia Yun[1], Wang Huijuan[1] ([1]Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Clinical Laboratory, Chongqing Zhongshan Hospital, Chongqing, 400013, China)

[**Abstract**] Objective To establish a quick, sensitive, specific and quantitative method for detecting aspergillus for clinical diagnosis of aspergillosis. Methods *Aspergillus fumigates*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* were cultured, and the spores were harvested. The total RNA was extracted from the spores. Ten-fold serially titrated *Aspergillus conidia* (101 to 106 spores) were detected by nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) and molecular beacon (MB) platform to establish a standard curve. The sensitivity and specificity of the method were evaluated. Results The reaction time (minute) of the fluorescence signal rising above the fixed threshold was linearly correlated with the logarithm of the spore amount ($y=-10.7x+81.6$, $r=0.988$). The detection limit of this method was 1 spore. The RNA extracted from aspergillus and the comparisons (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Cryptococcus neoformans*) were amplified by NASBA, and were analyzed by electrophoresis. NASBA did not cross-react with the non-target bacteria or fungi. Conclusion The method of NASBA combined with MB has high sensitivity and specificity, and can be potentially used for medical diagnosis of aspergillosis.

[**Key words**] nucleic acid sequence-based amplification; molecular beacon; *aspergillus*; diagnosis

Supported by the Project of National Clinical Key-discipline Construction [2010(305)] and the Project of Scientific Research of Chongqing Public Health Bureau(2008-2-312). Corresponding author: Xia Yun, E-mail: xiayun12cn@aliyun.com.cn

系统性真菌感染是造成免疫力低下患者死亡的主要原因之一。引起感染的病原菌绝大多数属于念珠菌属(*Candida spp*)和曲霉菌属(*Aspergillus spp*)。尽管在真菌感染的预防和治疗方面已取得了明显的进步,但侵袭性曲霉病(*Invasive Aspergillusis*)仍然是接受移植

[基金项目] 国家临床重点专科建设项目(2011-2013);重庆市卫生局科研课题(2008-2-312)
[通信作者] 夏 云,E-mail:xiayun12cn@aliyun.com.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130425.0902.001.html(2013-04-25)

术及化疗等治疗的患者的主要死亡原因。由于该病病死率很高[1],早期诊断是采取适当、成功的抗真菌治疗的关键,并能够显著改善预后[2]。目前分子生物学方法是曲霉菌感染诊断中最有应用前景的方法。核酸序列依赖性扩增技术(nucleic acid sequence-based amplification,NASBA)较普通PCR技术更为敏感且不易受DNA污染的影响。联合分子信标技术可以实现定量检测,目前国内尚少见以此原理为检测方法的报道;国外虽有报道,但多是基于昂贵的专利试剂盒进行,国内难以推广应用[3]。本研究采用NASBA联合分子信标技术,以曲霉菌18S rRNA保守序列区作为靶序列,建立累积荧光量达到设定阈值所需循环数与孢子数的对数线性模拟曲线,用于临床曲霉菌感染的诊断。

1 材料与方法

1.1 曲霉菌的培养

将烟曲霉菌株(CMCCA1a)、黄曲霉菌株(临床分离)及黑曲霉菌株(临床分离)接种于哥伦比亚血琼脂平板,置于35 ℃恒温培养箱中进行培养,每天观察标准菌株的生长状况,24 ~ 48 h后收获曲霉孢子备用。

1.2 标准菌液的配制及总RNA的提取

取无菌Ep管,加入无菌蒸馏水及1%的二甲基亚砜(体积比),用无菌的取菌环将曲霉菌从血平板上取下并迅速溶于管中制成孢子菌液。菌液置于-80 ℃冰箱中保存备用。孢子菌液浓度测定采用牛鲍计数板显微镜计数法。牛鲍计数板做消毒处理后使用。计数后配制含有梯度孢子数的菌液(10^1 ~ 10^6)。曲霉菌总RNA提取采用的试剂盒为Fungal/Bacterial RNA MicroPrep™(ZYMO RESEARCH),提取的操作步骤按照试剂盒说明书进行。

1.3 NASBA引物及分子信标探针序列设计

曲霉菌扩增的靶序列位于18S rRNA保守序列区[4],该区域的rRNA序列具有属特异性。经生物信息学及文献查询,设计引物序列及分子信标序列[5],上游引物:5′-AATTCTAATACGACTCACTATAGGGGAGCAAAGGCCTGCTTTGAACA-3′,下游引物:5′-GCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATA-3′,探针:5′-GGTCCGCCTCACCGCGAGTACTG-3′,扩增产物长度为241 bp。下划线部分为T_7 RNA聚合酶启动序列,T_7 RNA聚合酶能够识别该序列并自动启动转录过程。分子信标5′端标记羧基荧光素(FAM),3′端标记二氮烯基苯甲酸(DABCYL)[6]。

1.4 NASBA联合分子信标反应体系建立

核酸序列依赖扩增反应体系主要包括3个部分,即反应缓冲液、扩增模板及扩增酶混合物。以20 μL反应体系为例,应包括反应缓冲液10 μL[40 mmol/L pH 8.5的Tris-HCl,70 mmol/L KCl,5 mmol/L二硫苏糖醇(DTT公司),12 mmol/L $MgCl_2$,0.375 mol/L山梨醇,12 U RNA酶抑制剂(Promega公司),1 μmol/L dNTP(TaKaRa公司),2 μmol/L NTP(TaKaRa公司),0.4 μmol/L引物及10%二甲基亚砜(DMSO公司)],缓冲液各成分轻轻涡旋混匀后离心,然后向缓冲液体系中加入霉菌模板RNA 5 μL。缓冲液和模板的混合物轻轻涡旋混匀后离心,反应管置于61 ℃、5 min,41 ℃、5 min,预温后向反应管中加入酶混合物[包括40 U T_7 RNA聚合酶(TaKaRa公司),8 U AMV逆转录酶(AMV-RT,Promega公司),0.1 U RNA酶H(RNase H),2 μg牛血清白蛋白(BSA公司),0.4 μmol/L分子信标],补充无RNA酶水至反应总体积为20 μL[7-8]。涡旋混匀后短暂离心,将反应管置于ABI 7 500检测系统中进行检测。扩增反应在41 ℃的恒温条件下进行,设定累积荧光信号每分钟检测1次。

1.5 标准曲线绘制

用1.4描述方法以不同浓度梯度的孢子菌液中的总RNA为模板进行反应,反应完成后收集荧光信号并采用Microsoft Excel进行线性相关性的统计学分析,并计算出相关系数。

1.6 特异性分析

选定临床上常见的感染病原菌标准株为对照组,包括革兰阳性球菌的金黄色葡萄球菌(ATCC29213)、革兰阴性杆菌的大肠埃希菌(ATCC25922)、非发酵菌的铜绿假单胞菌(ATCC27853)以及白色念珠菌(ATCC64548)、热带念珠菌(ATCC60556)、新型隐球菌(ATCC62069)。取对照组菌株进行总RNA提取后,分别取5 μL RNA作为模板进行NASBA反应,反应体系其他成分及含量与其他曲霉菌标准株的扩增体系相同,用电泳的方法对扩增后产物进行分析。

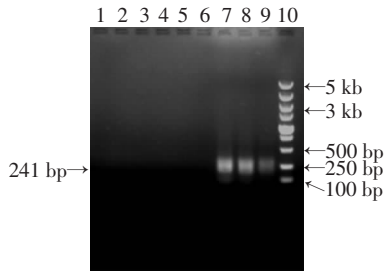
1.7 灵敏度分析

对含有梯度(10^0 ~ 10^6)霉菌孢子的菌液进行总RNA提取,并以此为模板进行NASBA联合分子信标分析,检测能达到阳性荧光阈值的最高稀释倍数,推断NASBA的灵敏度。以梯度霉菌孢子的菌液总RNA为模板进行NASBA,电泳分析能出现条带所对应的霉菌孢子,推断NASBA的灵敏度。

2 结果

2.1 特异性分析

对照组标准株用同曲霉菌样的方法处理,进行NASBA后电泳对扩增产物进行分析,得出仅有当模板RNA来自曲霉属时,核酸序列依赖扩增反应后产物才会出现明亮的电泳条带(图1)。



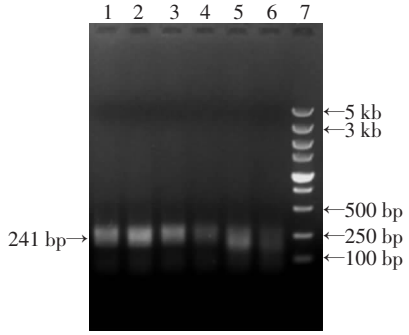
1:金黄色葡萄球菌;2:铜绿假单胞菌;3:白色念珠菌;4:大肠埃希菌;5:热带念珠菌;6:新型隐球菌;7:烟曲霉菌;8:黄曲霉菌;9:黑曲霉菌;10:标准

图1 不同菌种核酸序列依赖性扩增后产物电泳分析

2.2 灵敏度分析

对曲霉菌孢子菌液梯度稀释后提取总RNA并作为模板,

发现孢子数为1的总RNA模板进行NASBA联合分子信标分析依然可以达到荧光阳性阈值。利用电泳分析NASBA产物进一步得到NASBA的灵敏度(图2)。电泳分析也进一步证明NASBA的灵敏度可以达到1个孢子甚至更高。



1~3:分别为10^3、10^2、10^1个孢子提取总RNA后NASBA后的产物条带;4~6:为10个孢子提取总RNA分别稀释10、100、1 000倍后NASBA后的产物条带;7:标准

图2 电泳分析含有梯度霉菌孢子的核酸序列依赖性扩增产物

2.3 累计荧光量达到设定阈值(40)所需循环数y与霉菌孢子量的对数x的关系

NASBA联合分子信标检测体系中,分子信标与扩增产物结合发出的累计荧光量达到设定荧光阈值(研究设定为40,阈值应根据各个实验室的实际情况设定)所需循环数与霉菌孢子量的对数之间存在线性相关关系($y = -10.7x + 81.6$,相关系数$r = 0.988$),见图3。

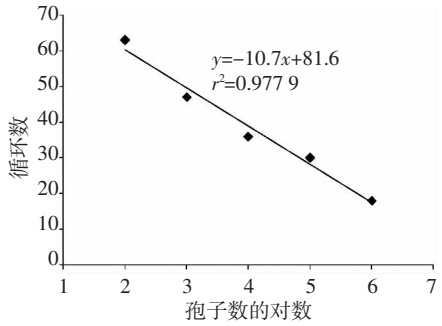


图3 累积荧光量达到设定阈值所需循环数与孢子数的对数线性模拟曲线 (烟曲霉菌)

3 讨论

侵袭性曲霉菌感染已经成为免疫力低下患者发病率和病死率的一个重要原因。目前临床所应用的传统诊断方法,如病原微生物培养及组织病理学检查虽然可以作为确诊的手段,但是灵敏度较低,临床绝大部分侵袭性曲霉菌感染病例培养结果为阴性。近年临床免疫学检验技术作为一种非侵入性的手段在侵袭性曲霉菌感染诊断中得到广泛应用。抗原检测的靶分子是半乳甘露聚糖(GM试验)和(1,3)-β-D-葡聚糖(G试验),但结果差异很大,敏感性为30%~100%,特异性为87%~98%,与该方法标本采集时机、频率、阳性结果判断标准等因素有关[2]。由于侵袭性曲霉菌感染者多伴有免疫缺陷,免疫功能受到削弱,机体可能并不能有效地免疫应答产生抗体,抗体的检测对侵袭性曲霉菌感染的诊断意义不大。此外,免疫学检测手段往往受到多重假阳性及假阴性因素的干扰,降低了其应用价值。

本研究采用分子生物学领域的NASBA联合分子信标检测曲霉菌。NASBA属于等温扩增技术,敏感度高,不易受到DNA的污染[9]。目前有报道将NASBA技术应用于HIV、HCV及禽流感病毒的检测[10-11]。分子信标可特异性地识别模板RNA序列,发出荧光强度与RNA含量成正比,借此可以实现检测物的定量。研究过程应用NASBA技术检测曲霉菌的关键是RNA的提取。由于曲霉菌细胞壁较厚,常规方法难以裂解,给RNA的提取带来困难。本研究采用了液氮研磨结合Trizol法以及多种商品化试剂盒等尝试,发现Fungal/Bacterial RNA MicroPrep™效果较为理想。

我们对NASBA反应体系进行了特异性评估,发现NASBA不易受临床常见的金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌及白色念珠菌、新型隐球菌的干扰,仅有当模板RNA来自曲霉属真菌时,NASBA产物电泳才会出现明亮的条带,说明NASBA具有较理想的特异性。在联合分子信标应用时,分子信标本身的核酸序列也会对产物进行特异识别,即使一些干扰核酸通过扩增体系进行了扩增,但由于不具备与分子探针互补的序列,所以不会发出荧光信号。进一步提高了特异性,从而避免标本中混有多种病原菌所导致的检测结果假阳性。文献报道NASBA反应的灵敏度高于基于PCR技术的检测系统,本研究将含有梯度霉菌孢子的菌液进行RNA提取,经NASBA扩增后电泳分析,发现霉菌孢子数为1的菌液依然能够扩增后出现条带。这对于无菌部位侵袭性曲霉菌感染的快速诊断具有十分重要的意义。但由于设计的引物具有属特异性,扩增阳性并不能确定是哪一类曲霉菌的感染。

分子信标技术是一种荧光定量技术,我们利用梯度霉菌孢子的总RNA为模板,分别利用NASBA联合分子信标进行检测,发现扩增过程中产生的累积荧光信号达到设定阈值所需循环数与标本中霉菌孢子数的对数呈现良好的线性相关关系($y = -10.7x + 81.6$,$r = 0.988$),线性范围达$10^2 \sim 10^6$,完全能覆盖临床标本的曲霉菌含量,因此本方法可以实现对于未知孢子浓度标本的定量检测。

参考文献:

[1] Sanz-Alonso M A, Ramos I J, Lleti M S, *et al*. Epidemiology of invasive fungal infections due to Aspergillus spp. and Zygomycetes[J].

Clin Microbiol Infect, 2006, 12(Suppl 7): 2-6.
[2] Chandrasekar P. Diagnostic challenges and recent advances in the early management of invasive fungal infections[J]. Eur J Haematol, 2010, 84(4): 281-190.
[3] Deiman B, Schrover C, Moore C, *et al*. Rapid and highly sensitive qualitative real-time assay for detection of respiratory syncytial virus A and B using NASBA and molecular beacon technology[J]. J Virol Methods, 2007, 146(1/2): 29-35.
[4] Perlin D S, Zhao Y. Molecular diagnostic platforms for detecting Aspergillus[J]. Med Mycol, 2009, 47(Suppl 1): S223-S232.
[5] Yoo J H, Choi S M, Lee D G. Comparison of the Real-time Nucleic Acid Sequence-based Amplification (RTi-NASBA) with Conventional NASBA, and Galactomannan Assay for the Diagnosis of Invasive Aspergillosis[J]. J Korean Med Sci, 2007, 22(4): 672-676.
[6] Rodriguez-Lazaro D, D'Agostino M, Pla M, *et al*. Construction strategy for an internal amplification control for real-time diagnostic assays using nucleic Acid sequence-based amplification: development and clinical application[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(12): 5832-5836.
[7] Jean J, Blais B, Darveau A, *et al*. Simultaneous detection and identification of hepatitis A virus and rotavirus by multiplex nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) and microtiter plate hybridization system[J]. J Virol Methods, 2002, 105(1): 123-132.
[8] Zhao Y, Park S, Warn P, *et al*. Detection of Aspergillus fumigatus in a Rat Model of Invasive Pulmonary Aspergillosis by Real-Time Nucleic Acid Sequence-Based Amplification[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(4): 1378-1383.
[9] Monis P T, Giglio S. Nucleic acid amplification-based techniques for pathogen detection and identification[J]. Infect Genet Evol, 2006, 6(1): 2-12.
[10] Ge Y, Cui L, Qi X, *et al*. Detection of novel swine origin influenza A virus (H1N1) by Real-time nucleic acid sequence-based amplification[J]. J Virol Methods, 2010, 163(2): 495-497.
[11] Mohammadi-Yeganeh S, Paryan M, Mirab-Samiee S, *et al*. Molecular beacon probes-base multiplex NASBA Real-time for detection of HIV-1 and HCV[J]. Iran J Microbiol, 2012, 4(2): 47-54.

(**收稿**:2012-12-17;**修回**:2013-03-22)
(编辑 邓强庭)

经验交流

文章编号:1000-5404(2013)15-1586-01

彩超引导下经皮肾镜碎石取石术治疗上尿路结石285例临床分析

张 杰,李春茂,李大平,杨 烁,杨 天,夏茂楠,游云超 (635002 四川 达州,四川省达州市第二人民医院泌尿外科)

[**关键词**] 彩超引导;经皮肾镜碎石取石术;上尿路结石
[**中图法分类号**] R692.4 [**文献标志码**] B

经皮肾镜碎石取石术以其创伤小、恢复快、并发症小、安全可靠等优势已成为临床治疗上尿路结石的首选方式[1-2]。我科从2008年4月至2012年9月于彩超引导下建立经皮肾通道行超声负压联合气压弹道碎石取石术治疗上尿路结石285例,疗效满意,报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

本组患者285例,包括男性178例,女性107例,平均47(20~78)岁。单侧267例(单侧肾多发结石178例,单发结石52例,输尿管上段结石37例),双侧18例。完全铸型结石25例,部分铸型结石69例,有体外冲击波碎石史(ESWL)85例,有开放取石手术史28例,患肾重度积水63例,脓肾10例,急性肾衰5例。术前均行B超、静脉尿路造影、双肾CT扫描,中段尿培养及相关常规检查,无明显手术禁忌证。纳入病例均符合泌尿系结石诊断及治疗指南。

1.2 主要器械

德国Wolf公司8.0/9.8F输尿管硬镜及20F经皮肾镜,深圳迈锐医疗器械公司DC-3T彩超机,瑞士EMS公司生产的第4代超声气压弹道碎石清石系统,德国Urovision公司生产的肾穿刺扩张套件,金属叠套式扩张器、双"J"管、输尿管导管,F3.5超滑导丝,SONY摄像监视系统,国产液压灌注泵。

1.3 方法

患者腰硬联合麻醉后,截石位常规消毒铺巾后行患侧输尿管逆行插管,留置F5输尿管导管。患者改俯卧位,经输尿管导管逆行注水制造"人工肾积水",利用彩色多普勒避开大的肾血管,选定穿刺目标盏,经肾盏穹窿部进针,拔除针芯见有澄清液体流出后,置入穿刺导丝,使用肾微穿刺筋膜扩张器顺导丝方向依次扩张至F-16留置Peel-away鞘,用输尿管镜观察确定进入目标肾盏后,改用叠套式金属扩张器,扩大皮肾通道,置入F24金属肾镜镜鞘及肾镜。经内镜工作通道置入气压弹道或EMS第4代超声碎石清石系统,彻底清除结石后,用超滑导丝置入输尿管进入膀胱,置入F5-6号双"J"管及肾造瘘管1根。术后5~7 d复查腹部X线片,无明确残石者夹闭肾造瘘管24 h后拔除,4~6周后拔除双"J"管。

2 结果

285例患者中282例患者一次穿刺成功建立皮肾通道,3例患者因穿刺扩张后通道丢失,经彩超重新定位穿刺扩张。15例患者行双通道清石,1例患者行三通道清石。手术时间(101±25)min,出血量(108±58)mL。Ⅰ期清石230例,Ⅱ期清石23例,18例残留结石(直径0.5~1.0 cm)行体外冲击波碎石术(extracorporeal shock-wave lithoclasty, ESWL)治疗,14例残留结

(下转1590页)

[**通信作者**] 张 杰,E-mail:zjdz1976@163.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130428.0819.008.html(2013-04-28)