

# PCR 技术在快速诊断艾滋病合并播散性马尔尼菲青霉菌病中的应用

陈万山 李凌华 胡凤玉 宋伟南 邝燕玲 蔡卫平 唐小平

**【摘要】 目的** 探讨 PCR 技术在快速诊断艾滋病(AIDS)合并播散性马尔尼菲青霉菌病(PSM)中的应用价值。**方法** 收集 21 例 AIDS 合并播散性 PSM 患者抗真菌治疗前的系列标本:未培养血液、阳性血液培养物和阳性骨髓培养物,以 12 例健康人血液为阴性对照。提取上述标本的基因组 DNA,采用真菌通用引物 ITS1 和 ITS4 对基因组 DNA 进行 PCR 扩增,扩增产物测序后与 GenBank 核酸序列数据库进行比对分析。**结果** 21 份阳性血液培养物、21 份阳性骨髓培养物及 2 份未培养血液标本均扩增出目的条带,而 12 份健康人血液标本未扩增出条带。阳性 PCR 产物测序结果与广东、日本、泰国、印度尼西亚的马尔尼菲青霉菌(PM) rDNA ITS 序列(登录号分别为 AB298970、AB298950、L37406、AJ853738)一致性高达 97%~100%,证实为 PM。PM 与新型隐球菌及烟曲霉 rDNA ITS 序列的遗传距离最远,与青霉菌属其他菌种绳状青霉菌和桔青霉菌 rDNA ITS 序列的遗传距离最近。**结论** PCR 可敏感、特异的检测出培养阳性标本中 PM,并能有效缩短 PM 检出时间,但直接采用患者血液进行 PCR 检测的阳性率较低,方法有待改进。

**【关键词】** 马尔尼菲青霉菌病;聚合酶链反应;获得性免疫缺陷综合征;rDNA ITS 序列

**Clinical application of PCR on rapid diagnosis of AIDS complicated with disseminated penicillosis marneffeii** CHEN Wan-shan, LI Ling-hua, HU Feng-yu, SONG Wei-nan, KUANG Yan-ling, CAI Wei-ping, TANG Xiao-ping. Clinical Laboratory, No. 8 People's Hospital of Guangzhou, Guangzhou 510060, China

Corresponding author: TANG Xiao-ping, Email: xiaopingtanggz@yahoo.com

**【Abstract】 Objective** To explore the application value of PCR technique on rapid diagnosis of disseminated penicillosis marneffeii in patients with AIDS. **Methods** Total of 21 AIDS cases complicated with penicillosis marneffeii were enrolled to collect a serial samples including uncultured blood samples, positive blood cultures and positive bone marrow cultures before receiving antifungal therapy. Twelve blood samples

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2011.02.001

基金项目:广州市卫生局课题(2009-YB-092);广东省卫生厅课题(A2010478);广东省自然科学基金(10151006002000000)

作者单位:510060 广州,广州市第八人民医院检验科

通讯作者:唐小平,Email:xiaopingtanggz@yahoo.com

from healthy individuals were processed as negative controls. The genome DNA were extracted from these specimens and amplified with fungal consensus primers ITS1 and ITS4. Subsequently, the PCR products were sequenced, then the sequences were aligned with those nucleotide sequences in GenBank. **Results** A 500-600 bp DNA product was detected in all 21 positive blood cultures and positive bone marrow cultures, and 2 uncultured blood samples, but not in 12 blood samples from healthy individuals. The sequences of these PCR products were highly concordant (97% -100%) with those *Penicillium marneffeii* (PM) isolates originated from Guangdong, Japanese, Thailand and Indonesia (accessions: AB298970, AB298950, L37406, AJ853738), which proved it to be PM. The genetic distances of rDNA ITS sequences between PM and *Neoformans cryptococcus* or *Aspergillus fumigatus* were the farthest, while were closest between PM and *Penicillium funiculosum* or *Penicillium citrinum* belonging to *Penicillium* species. **Conclusions** PM in positive culture samples could be sensitively and specifically detected by PCR, which can effectively shorten the time for PM identification. However, the positive rate of directly detecting PM in uncultured blood by PCR is very low, which needs further improvement.

**【Key words】** Penicillosis marneffeii; Polymerase chain reaction (PCR); Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS); rDNA ITS sequence

播散性马尔尼菲青霉菌病 (penicillosis marneffeii, PSM) 是东南亚国家和我国南方地区艾滋病 (acquired immunodeficiency syndrome, AIDS) 患者常见的深部真菌病, 可侵犯肺脏、肝脏及脾脏等多个脏器, 病情严重且发展迅速, 病死率较高<sup>[1,2]</sup>。但若能早期诊断并及时应用抗真菌药物治疗, 通常可获得较好的疗效。该病起病隐匿, 临床表现复杂且无明显特征, 容易与淋巴瘤、结核、鸟分枝杆菌感染等疾病相混淆, 造成误诊或漏诊<sup>[3]</sup>。确诊依靠分离培养出马尔尼菲青霉菌 (*Penicillium marneffeii*, PM), 但需时间较长<sup>[4]</sup>。聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术是近年来在临床检验方面比较成熟的分子生物学检测技术, 其敏感性远远高于真菌培养, 不仅能提高检测的阳性率, 而且可以大大缩短诊断时间<sup>[5]</sup>。本研究应用 PCR 技术, 对 21 例艾滋病合并播散性 PSM 患者未培养的血液、细菌培养仪报告阳性的血液或骨髓培养物进行检测, 以探讨快速鉴定 PM 的方法, 为临床研发早期诊断播散性 PSM 的方法提供依据。

## 材料和方法

### 一、材料

1. 临床标本采集和保存: 标本取自 2008 年 1 月至 2009 年 12 月于本院感染科住院, 怀疑合并播散性 PSM 的 AIDS 患者。所有病例均为广东本地居民, 发病前未到过其他 PM 流行地区, 临床分期均属 AIDS (C3) 期。入院当天 (未给予任何抗真菌治疗前) 即无菌抽取患者静脉全血 5 ml 和骨髓 3 ml, 置于 Versa TREK™

细菌培养仪进行培养,抽取 2 ~ 3 ml 细菌培养阳性的血液或骨髓培养物,置于 -80℃ 冰箱保存;同时抽取 3 ml 静脉全血,不做任何处理,置于 -80℃ 冰箱保存。同时留取 12 例健康人外周血 3 ml,培养 5 d 后,抽取 2 ~ 3 ml 血液培养物,置于 -80℃ 冰箱保存。

2. 主要仪器与试剂: Versa TREK™ 细菌培养仪购自美国 TREK 公司; Amp 5700 PCR 扩增仪购自美国 ABI 公司; C340S 25℃ 隔水式电热恒温培养箱和 37℃ 隔水式电热恒温培养箱购自日本 Yamato 公司; 核酸蛋白检测仪购自德国 Eppendorf 公司; 电泳仪购自北京六一仪器厂; Tanon-3500 凝胶成像仪购自上海金鹏分析仪器有限公司; 真菌 DNA 提取试剂盒 DNeasy Plant Mini Kit 购自德国 QIAGEN 公司; 5 U/μl *rTaq* 酶、2.5 mmol/L dNTPs (dATP、dCTP、dTTP、dGTP)、10 mmol/L buffer、DNA 片段凝胶纯化试剂盒及 DNA Marker 均为日本 TaKaRa 公司产品; 引物合成和 PCR 产物测序由上海英骏生物技术有限公司完成。

## 二、方法

1. 标本培养与菌种鉴定: 将培养阳性的血液和骨髓接种于 37℃ 肉汤培养液中增菌, 72 h 见絮状沉淀生长后, 转种于沙氏琼脂培养皿, 分别置于 25℃ 和 37℃ 孵育, 观察两种温度下菌落形态、产色素情况, 并取部分菌落置于显微镜下观察孢子和菌丝的形态, 以鉴定致病真菌属种。

2. 基因组 DNA 提取: 选取培养阳性并经形态学鉴定为 PM 的血液或骨髓培养物及相应的血液标本为研究对象, 健康人血液标本作为阴性对照。各取 600 μl 标本, 加入液氮充分研磨成粉末, 使用 DNeasy Plant Mini Kit 提取 DNA。提取纯化的 DNA 经 1% 琼脂糖凝胶 (Gelred 染色) 电泳 (100 V, 30 min), 在紫外灯下观察基因组 DNA 提取的质量。将提取的 DNA 样品适当稀释, 检测样品在 260 nm、280 nm 波长下的 A 值。将 DNA 提取液稀释至 100 μg/ml, 作为 PCR 反应模板, 保存于 -20℃ 冰箱。

3. PM rDNA ITS 序列的检测: 采用真菌通用上游引物 ITS1 (5' -TCCGTAGGT-GAACCTGCGG-3') 和下游引物 ITS4 (5' -TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 扩增基因组的 rDNA ITS。50 μl 反应体系包括 10 mmol/L buffer 5 μl, DNA 1 μl (100 μg/ml), 2.5 mmol/L dNTPs 4 μl, 10 μmol/L 引物 2 μl, 5 U/μl *rTaq* 酶 0.5 μl 及 35.5 μl ddH<sub>2</sub>O。PCR 扩增反应条件: 95℃ 预变性 5 min; 35 个循环: 95℃ 变性 1 min, 55℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min; 最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳 (100 V, 30 min), 在紫外灯下观察其完整性和长度, 预期长度为 515 bp。PCR 产物经凝胶回收纯化后再进行单相测序。

4. 序列分析: 将测序结果先转化成 Fasta 格式并存成文本格式, 在 GenBank 核酸序列数据库 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) 中进行同源序列搜索。随后, 使用分子进化分析软件 MEGA4 (molecular evolutionary genetics analysis) 将所得序列与 GenBank 公布的其他真菌 rDNA ITS 序列进行比对分析, 构建 N-J 分子进化树。

## 结 果

### 一、PCR 扩增结果

共留取 21 例 AIDS 合并播散性 PSM 患者的系列标本:未培养血液、培养阳性的血液培养物和阳性骨髓培养物,提取基因组 DNA 后使用真菌通用引物 ITS1 和 ITS4 扩增 rDNA ITS 序列。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳验证,提示 21 份阳性血液培养物和 21 份阳性骨髓培养物及 2 份未培养血液标本均能扩增出目的条带。图 1 可见扩增产物均在 500 ~ 600 bp 位置,与预期结果一致。12 份健康人血液均未能扩增出目的条带。根据贝叶斯公式,计算得出 PCR 检测阳性血液培养物和阳性骨髓培养物的灵敏度和特异性均为 100%,PCR 检测未培养血液的灵敏度为 9.52%,特异性为 100%。

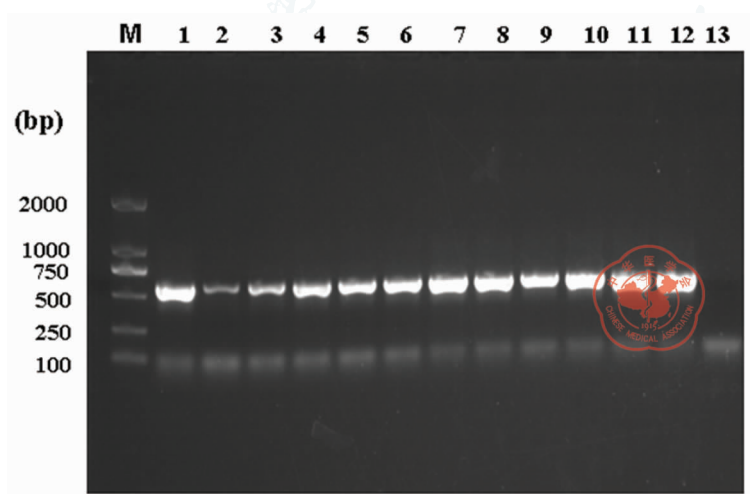


图 1 样本 rDNA ITS PCR 产物电泳结果

注:M 为 DL 2000 Marker,泳道 1、2 为未培养血液,泳道 3 ~ 7 为阳性血液培养物,泳道 8 ~ 12 为阳性骨髓培养物,泳道 13 为阴性对照

### 二、rDNA ITS 序列测定和比对结果

所有阳性 PCR 扩增产物均经凝胶回收纯化后进行单相测序。所得序列长度均在 515 bp 左右,与 GenBank 上已公布的来源于广东、日本、泰国、印度尼西亚的 PM rDNA ITS 序列(登录号分别为 AB298970、AB298950、L37406、AJ853738)一致性高达 97% ~ 100%,包括 18S rRNA、ITS1、5.8S rRNA、ITS2 及 28S rRNA 在内的 ITS 全序列,证实为 PM rDNA ITS 特异性序列。

### 三、分子进化树构建

使用分子进化分析软件 MEGA4,分析所得的 PM rDNA ITS 序列与 GenBank 中公布的绳状青霉菌、产黄青霉菌、桔青霉菌、荚膜组织胞浆菌、新型隐球菌、念珠菌属及烟曲霉菌等真菌的 rDNA ITS 序列的分子进化关系,根据遗传距离构建分

子进化树。图2 分子进化树显示:本研究中各株 PM rDNA ITS 序列之间的遗传距离极近,为 0.01 ~ 1.94,可归为同一类;PM 与其他菌属的新型隐球菌及烟曲霉菌 rDNA ITS 序列之间的遗传距离最远,与青霉菌属其他菌种绳状青霉菌和桔青霉菌 rDNA ITS 序列的种间遗传距离最近,但仍存在多个碱基的差别。

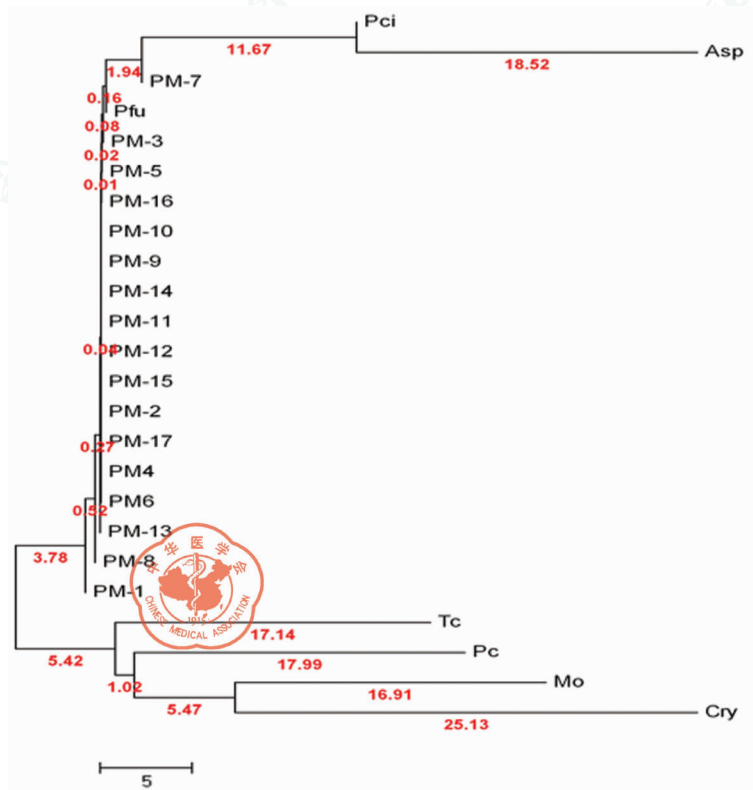


图2 PM 与其他真菌的 NJ 分子进化树

注: Pc:产黄青霉菌, Tc:荚膜组织胞浆菌, Pci:桔青霉菌, Mo:念珠菌属, Asp:烟曲霉菌, Pfu:绳状青霉菌, Cry:隐球菌, PM:马尔尼菲青霉菌, 标尺为遗传距离

### 讨 论

马尔尼菲青霉菌 (PM) 是一种温度双相性真菌, 主要感染免疫缺陷人群, 尤其在艾滋病患者, 易引起播散性 PSM<sup>[6]</sup>。该病主要流行于泰国、越南、印度尼西亚等东南亚国家及我国南方地区, 包括广东、广西、云南、台湾、香港等地。近年来, PSM 发病率显著增加, 并突破地域界限向非疫区扩散, 北美、欧洲、非洲等地也相继出现散发病例<sup>[7-9]</sup>。该病起病隐匿, 病情发展迅速, 需要尽早做出诊断, 给予两性霉素 B、伊曲康唑等进行抗真菌治疗, 以挽救患者生命。然而, 目前确诊的金标准——PM 的分离培养和鉴定一般需要 6 ~ 10 d<sup>[10]</sup>。即使培养为阳性, 还要经过菌液转种培养, 再根据菌落的温度双相性、分泌色素及显微镜下菌丝和孢子的形态来进行鉴定, 需 4 ~ 5 d。因此, 临床上迫切需要建立一种快速、灵敏、特异的 PM 检测方法。

随着分子生物学技术的快速发展,PCR 技术以其高度的敏感性和特异性被广泛应用于多种微生物的快速诊断<sup>[11,12]</sup>。近年来,人们开始尝试用 PCR 方法对 PM 进行诊断。真核生物基因组中编码核糖体的基因包括 28S rDNA、5S rDNA、18S rDNA 和 5.8S rDNA 4 种,其在染色体上头尾相连、串联排列,相互之间由间隔区分隔。其中 18S、5.8S 和 28S rDNA 基因组成 1 个转录单元,三者高度保守,适合于较高等级水平的生物群体间的系统分析。其间隔区为内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS),包括 ITS1 及 ITS2 两部分,由于进化相对迅速而具多态性<sup>[13]</sup>。PM 属于真核生物,其完整的 rDNA ITS 区序列包含两端 18S rDNA、28S rDNA 的部分序列和中间的 ITS1 区、5.8S rDNA、ITS2 区的完整序列,拥有相对丰富的信息。同时,由于 rDNA ITS 区既具有保守性,又在科、属、种水平上具有特异性序列,可对其进行 PCR 扩增、测序及序列分析,从而鉴定 PM<sup>[14,15]</sup>。Mekha 等<sup>[16]</sup>用真菌通用引物 ITS1 和 ITS4 成功扩增了泰国 58 株 PM 的 rDNA ITS,测序结果与 GenBank 上公布的 PM 的 rDNA ITS 序列进行比对,证实均为 PM,而且不同地区的 rDNA ITS 序列高度保守。尽管应用 PCR 检测 rDNA ITS 的方法简单,且特异性和敏感性均较高,但是由于必须通过分离培养 PM 后才能获得检测所需的菌株 DNA,所需时间仍较长(约 5 d),仍不能达到快速诊断要求。

本研究使用 PCR 技术,检测 21 例 AIDS 合并播散性 PSM 患者系列标本中的 PM rDNA ITS 序列。实验结果显示,21 份阳性血液培养物、21 份阳性骨髓培养物及 2 份未培养血液标本能扩增出目的条带,测序证实为 PM。使用全自动细菌培养仪,通常 1~2 d 即可监测到标本有菌生长。在此基础上提取阳性培养物的基因组 DNA,扩增其 rDNA ITS 序列并测序,一般仅需 1 d 时间。因此,使用 PCR 方法检测阳性培养物,只需 2~3 d 时间,相比传统的真菌分离、培养与鉴定方法(6~10 d),可以节约 3~8 d。因此,采用该方法诊断播散性 PSM,不仅具有良好的敏感性和特异性,还具有快速性,使临床早期诊治播散性 PSM 成为可能,值得进一步研究和推广。如果能使用 PCR 直接扩增出未培养血液里的 PM rDNA ITS,无疑更能节省时间。遗憾的是,21 份未培养血液中仅 2 份标本 PCR 获得成功,敏感性极低(9.5%)。分析其原因可能是未培养血液未经过真菌繁殖阶段,导致 PM 含量极低,且多数存在于白细胞内,能提取到的 PM 基因组 DNA 极其有限,严重影响 PCR 扩增效率。而一旦提取到足量 PM 基因组 DNA,PCR 扩增的特异性即可达到 100%。因此,下一步研究可以从多方面改进实验,如将液氮研磨破壁改为更好的细胞破壁方法——超声振碎仪破壁或使用巢式 PCR 方法<sup>[17]</sup>,从而提高扩增的敏感性和检测的阳性率。

本研究是回顾性分析,已得知所检测标本有 PM 感染。如果将该方法应用于临床实际工作,需考虑到由于所使用引物为真菌通用引物,扩增结果可能是荚膜组织胞浆菌、新型隐球菌、念珠菌、曲霉菌等其他真菌,因此引物的特异性对于菌种的鉴别非常重要。通过分析和比对 PM 与其他菌属的 rDNA ITS 序列,可以看出 PM 与烟曲霉菌、荚膜组织胞浆菌、新型隐球菌及念珠菌属之间的遗传距离较

远,其 rDNA ITS 序列相似性较低,这为在该区域设计特异引物和探针提供了有利证据。同时,PM 与青霉菌属其他菌种,如绳状青霉菌、桔青霉菌等种间的遗传距离较近,其 rDNA ITS 序列相似性较高,但仍存在多个碱基的差别,提示可以在该区域设计青霉菌属的特异性引物。

传统的真菌形态学鉴定方法受主观经验与实验条件的影响,使得真菌鉴定工作较困难,且费时较长。应用 PCR 技术检测阳性血和(或)骨髓的 PM rDNA ITS 来鉴定 PM 相对更加客观、快速,并具有较高的灵敏度和特异性,为快速诊断 AIDS 合并播散性 PSM 带来了希望。

### 参 考 文 献

- 1 Baradkar V, Kumar S, Kulkarni SD. *Penicillium marneffeii*: the pathogen at our doorstep. Indian J Dermatol Venereol Leprol, 2009,75(6):619-620.
- 2 李凌华,唐小平,蔡卫平. 101例艾滋病合并马尔尼菲青霉菌病的临床研究. 中国艾滋病性病,2008,14(1):12-14.
- 3 Wong SY, Wong KF. *Penicillium marneffeii*— Infection in AIDS. Patholog Res Int,2011. Published online: <http://www.sage-hindawi.com/journals/pri/2011/764293/>.
- 4 Wong KF. Marrow penicilliosis: a readily missed diagnosis. Am J Clin Pathol,2010,134(2):214-218.
- 5 Sampietro DA, Marín P, Iglesias J, et al. A molecular based strategy for rapid diagnosis of toxigenic *Fusarium* species associated to cereal grains from Argentina. Fungal Biol,2010,114(1):74-81.
- 6 Ustianowski AP, Sieu TP, Day JN. *Penicillium marneffeii* infection in HIV. Curr Opin Infect Dis,2008,21(1):31-36.
- 7 Nguyen K, Taylor S, Wanger A, et al. A case of *Penicillium marneffeii* in a US hospital. J Am Acad Dermatol,2006,54(4):730-732.
- 8 Filiotou A, Velegraki A, Giannaris M, et al. First case of *Penicillium marneffeii* fungemia in Greece and strain susceptibility to five licensed systemic antifungal agents and posaconazole. Am J Med Sci,2006,332(1):43-45.
- 9 Yap FB, Thevarajah S, Asmah J. *Penicillium marneffeii* infection in an African man. Dermatol Online J,2010,16(7):2.
- 10 Pornprasert S, Praparattanapan J, Khamwan C, et al. Development of TaqMan real-time polymerase chain reaction for the detection and identification of *Penicillium marneffeii*. Mycoses,2009,52(6):487-492.
- 11 Reddy AK, Balne PK, Gaje K, et al. PCR for the diagnosis and species identification of microsporidia in patients with keratitis. Clin Microbiol Infect,2011,17(3):476-478.
- 12 Buitrago MJ, Bernal-Martínez L, Castelli MV, et al. Histoplasmosis and paracoccidioidomycosis in a non-endemic area: a review of cases and diagnosis. J Travel Med,2011,18(1):26-33.
- 13 Ahvenniemi P, Wolf M, Lehtonen MJ, et al. Evolutionary diversification indicated by compensatory base changes in ITS2 secondary structures in a complex fungal species, *Rhizoctonia solani*. J Mol Evol,2009,69(2):150-163.
- 14 Fernández-Bodega MA, Mauriz E, Gómez A, et al. Proteolytic activity, mycotoxins and andrastin A in *Penicillium roqueforti* strains isolated from Cabrales, Valdeón and Bejes-Tresviso local varieties of blue-veined cheeses. Int J Food Microbiol,2009,136(1):18-25.
- 15 Borman AM, Linton CJ, Miles SJ, et al. Molecular identification of pathogenic fungi. J Antimicrob Chemother,2008,61(Suppl 1):i7-i12.
- 16 Mekha N, Sugita T, Makimura K, et al. The intergenic spacer region of the ribosomal RNA gene of *Penicillium marneffeii* shows almost no DNA sequence diversity. Microbiol Immunol,2010,54(11):714-716.
- 17 Pongpom M, Sirisanthana T, Vanittanakom N. Application of nested PCR to detect *Penicillium marneffeii* in serum samples. Med Mycol,2009,47(5):549-553.

(收稿日期:2011-03-06)

(本文编辑:孙荣华)

陈万山,李凌华,胡凤玉,等. PCR 技术在快速诊断艾滋病合并播散性马尔尼菲青霉菌病中的应用 [J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版,2011,5(2):126-132.