

18S rDNA 的 PCR 扩增技术在棘阿米巴角膜炎临床诊断中的应用

朱学军, 刘晓燕, 苏晓霖, 徐国兴, 胡健章

作者单位: (350001) 中国福建省福州市, 福建医科大学附属第一医院眼科

作者简介: 朱学军, 女, 主任医师, 硕士研究生导师, 教授, 主要从事角膜病的研究。参与福建省卫生厅的“角膜病的预防与治疗”课题研究, “棘阿米巴角膜炎的发病机制与治疗”, 研究方向: 角膜病。

通讯作者: 刘晓燕, 女, 在读硕士研究生, baba_1983@163. com

收稿日期: 2008-12-08 修回日期: 2009-03-23

Application of 18S rDNA PCR technique in the laboratory diagnosis of Acanthamoeba keratitis in the clinical

Xue-Jun Zhu, Xiao-Yan Liu, Xiao-Ji Su, Guo-Xing Xu, Jian-Zhang Hu

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

Correspondence to: Xiao-Yan Liu. Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China, baba_1983@163. com

Received: 2008-12-08 Accepted: 2009-03-23

Abstract

• AIM: To discuss the feasibility for early diagnosis of Acanthamoeba keratitis using polymerase chain reaction amplification the gene 18S rDNA fragment.

• METHODS: We used 18S rDNA as template, the Acanthamoeba in clinical specimen is detected by Specific primer JDP1-JDP2 combining PCR technology.

• RESULTS: In 16 eyes of 16 cases which had been diagnosed Acanthamoeba in clinic 12 eyes proved Acanthamoeba keratitis using PCR, 5 cases found Acanthamoeba follicle by observing the epithelial specimen with 100g/L KOH under microscopy. With the Fisher exact propability to add up the two diagnostic method, and $P < 0.05$.

• CONCLUSION: Polymerase chain reaction is of great importance in the correction for early diagnosis of Acanthamoeba keratitis.

• KEYWORDS: ribosomal 18S; polymerase chain reaction; Acanthamoeba keratitis; diagnosis

Zhu XJ, Liu XY, Su XJ, et al. Application of 18S rDNA PCR technique in the laboratory diagnosis of Acanthamoeba keratitis in the clinical. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2009;9(4):715-718

摘要

目的: 探讨利用聚合酶链反应 (polymerase chain reaction,

PCR) 技术扩增棘阿米巴 18S rDNA 在角膜炎早期临床诊断应用中的可行性。

方法: 以 18S rDNA 为模板, 利用特异性引物 JDP1-JDP2 配合 PCR 技术来检测临床标本中的棘阿米巴原虫。

结果: 在临床拟诊为棘阿米巴角膜炎的 16 例 (16 眼) 中, 通过 PCR 检测法有 12 眼证实为棘阿米巴原虫感染, 同时 100g/L KOH 角膜刮片后镜检有 5 例发现了棘阿米巴包囊。两种诊断方法用 Fisher 确切概率法统计, $P < 0.05$ 。

结论: 18S rDNA PCR 技术对正确诊断早期棘阿米巴角膜炎有重要的临床应用价值。

关键词: 18S rDNA; PCR 技术; 棘阿米巴角膜炎; 诊断

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-5123. 2009. 04. 033

朱学军, 刘晓燕, 苏晓霖, 等. 18S rDNA 的 PCR 扩增技术在棘阿米巴角膜炎临床诊断中的应用. *国际眼科杂志* 2009;9(4):715-718

0 引言

棘阿米巴角膜炎 (Acanthamoeba keratitis, AK) 是棘阿米巴感染人体引起的一种顽固的进行性角膜炎、角膜溃疡疾病。该病病情险恶, 国内外学者特别强调早期诊断的重要性。其传统的诊断方法主要是角膜刮片, 培养。其阳性率与取材部位, 及观察者主观因素密切相关, 且棘阿米巴形态多变、培养需时较长 (15d 左右)。国内外专家逐渐倾向于探求临床上使用可靠、敏感的研究系统。许多研究已经证实聚合链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术在研究棘阿米巴是非常有用的^[1-3]。1~10 个滋养体都能够被检测出来^[4,5]。18S rDNA DF3 段以其特异性可提供棘阿米巴的分类^[6], 本实验以利用其特异性做实验性的临床应用。

1 材料和方法

1.1 材料 琼脂粉, NaCl, MgSO₄ · 7H₂O, CaCl₂ · 2H₂O, Na₂HPO₄, K₂HPO₄, 100g/L KOH, 裂解液 DTT; UNIQ-10 细菌基因组 DNA 抽提试剂盒 (上海生工生物科技有限公司); PCR 反应一体化 (上海鼎新生物科技有限公司); JDP1-JDP2 引物 (上海生工生物科技有限公司); JDP1: 5'-GGCCCAGATCGTTTACCCTGAA-3'; JDP2: 5'-TCTCACAA GCTGCTAGGGGAGTCA-3'; Marker100 ~ 1 000bp 实验对照株: 来源于北京市眼科研究所; 埃希大肠杆菌、葡萄球菌、茄病菌: 来源福建医科大学附属第一医院微生物室; 正常人角膜基质细胞: 来源于福建医科大学附属第一医院眼科角膜移植供体。本研究临床标本来自 2007-07/2008-10 福建医科大学附属第一医院眼科拟诊棘阿米巴角膜炎的 16 例 (16 眼) 患者。临床表现主要是患眼剧烈疼痛, 角膜有假树枝状或者环形基质灰白色浸润灶, 无或少许分泌物, 病程均在 1wk ~ 1mo 以上, 或临床使用各种抗细菌及真菌药物均无效, 需排除棘阿米巴角膜炎。在采集标本时, 16 眼均先予患眼点 10g/L 丁卡因表面充分麻醉后, 用手术刀片



图1 角膜刮取物 NNA 培养基培养 15d 后 A:棘阿米巴胞囊(类圆形)×400;B:滋养体(不规则形状,其间偏位亮点是细胞核)×200



图2 角膜刮片 100g/L KOH 湿封片镜检(亚甲蓝染色×400) A:病例 A2 棘阿米巴胞囊;B,C:均为折光性很强的双壁胞囊,外囊壁呈皱缩状,内囊壁呈波浪状

在浸润环或溃疡灶与正常角膜交界处刮取上皮至基质层,第1次取样置于加了1mL 无菌蒸馏水的 EP 管中,送检做 PCR 检测,第2次取样用于 100g/L KOH 封片做镜检。3次取材置于加了活大肠杆菌的 NNA 琼脂培养基培养。以培养作为金标准。

1.2 方法

1.2.1 配置 NNA 培养基 琼脂粉 15g, NaCl 120mg, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 4mg, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 4mg, Na_2HPO_4 142mg, K_2HPO_4 136mg, H_2O 1 000mL, 120℃ 高压 20min。

1.2.2 棘阿米巴 DNA 组提取 离心含有样本的 EP 管 1 300r/min, 离心 3min, 弃掉蒸馏水, 在其中加入 0.5 μ L 裂解液, 混匀。再利用 UNIQ-10 细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取样本 DNA 基因组。

1.2.3 PCR 反应 循环体系: 25 μ L, 不足的用水填补, hot start 体系 12.5 μ L, JDP1 0.5 μ L, JDP2 0.5 μ L, 模板 10 μ L。PCR 循环参数: 94℃ 预变性 3min, 94℃ 变性 60s, 52℃ 退火 60s, 72℃ 延伸 2.5min, 共 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10min。

1.2.4 PCR 扩增产物检测 取 5 μ L 棘阿米巴的 18S rDNA 基因扩增产物以 1:5 体积比的 6 \times 电泳上样缓冲液混合, 加入到含 5g/L 的溴乙锭的 15g/L 琼脂凝胶上样孔。加入 Marker、葡萄球菌、茄病菌、正常人角膜、实验对照虫株 PCR 产物, 直流电 100V 电泳 35min, 紫外灯下观察结果并拍照。

1.2.5 角膜刮片镜检 用角膜刮片刀取样后, 直接涂抹于滴 1 滴 100g/L KOH 的载玻片上, 涂抹均匀, 盖玻片封片。光学显微镜镜检。

2 结果

2.1 NNA 培养结果 14 例角膜炎患者培养阳性, 培养 3d

左右, 倒置显微镜可以看见接种部位阿米巴胞囊转为滋养体, 高倍镜下可以观察到其内有颗粒状内质在流动, 泛粉色的核, 透明的棘, 变化不定的外质。7d 可看见滋养体离开接种部位向周边移动, 接种点附近胞囊形成, 包裹大部分呈类圆球形, 双层囊壁, 外层透明, 内层呈星状或多角形。15d 左右可见远离接种点有滋养体活动, 及胞囊(图1)。

2.2 角膜刮片 100g/L KOH 封片镜检 角膜刮片, 滋养体在 KOH 刺激下变成胞囊, 而其他细胞被破坏。1 次刮片 4 例检查结果阳性, 行 2 次刮片观察到 5 例阳性(图2)。

2.3 PCR 结果 利用 JDP1-JDP2 引物扩增 18S rDNA 产物, 约 450bp 左右, 12 例阳性; 与来源于北京市眼科研究所实验对照株扩增出的片段大小基本一致。有 12 例阳性; 葡萄球菌, 正常人角膜基质细胞, 茄病菌均无阳性条带(图3)。

统计学分析: 利用 Fisher 确切概率法统计分析(表1)。利用 PCR, JDP1-JDP2 引物扩增 16 个病例, 其中 12 例被证实阳性, 片段大约在 460~470bp 大小, 本实验的另一篇文章将会详细报道棘阿米巴的基因分型。病例 16 获得的片段在 423~460bp 大小左右。两种诊断方法用 Fisher 确切概率法统计, $P < 0.05$; 有统计学意义。PCR 技术能更准确诊断 AK。进行 PCR 反应的 16 例标本均为新鲜样本, 其内大部分为胞囊, 偶尔可见滋养体。PCR 产物从 9 例培养阳性(65%), 1 例培养阴性病例中获得, 这样看来 PCR 技术与培养有 56% 的几率一致。如果把 PCR 阳性, 培养阴性的病例(病例 5)计入, PCR 技术更能提供临床诊断信息到 61%。另外 PCR 阴性的病例 8, 9b, 13, 但角膜刮片镜检中阳性; 联合 PCR 技术和刮片镜检方法可提高棘阿米巴性角膜炎诊断率 83.3%。



图3 PCR 扩增产物凝胶电泳成像分析 A:阳性病例与葡萄球菌(Sta),正常人角膜基质细胞(H),茄病菌(Bg)对照;B:实验对照株(ESC)的阳性条带;M:Marke

表1 棘阿米巴实验室检查结果阳性率比较 n(%)

组别	阳性(%)	阴性	合计
刮片镜检	5(28)	13	18
PCR	12(67)	6	18
合计	17(47)	19	36

表2 棘阿米巴实验室检查结果对比表

病例编号	培养结果	刮片镜检	PCR
A1	+	-	+
A2	+	+	+
A3a	-	-	+
A3b	+	-	-
A4	+	-	+
A5	-	-	+
A6	+	-	+
A7	+	-	+
A8	+	+	-
A9a	-	-	+
A9b	+	+	-
A10	+	-	+
A11	+	+	+
A12c	+	-	-
13	-	+	-
14	+	-	+
A15c	+	-	-
A16	+	-	+

注:a:同一病例第一次取材;b:同一病例同一眼第二次取材;c:就诊前抗棘阿米巴治疗过的病例

3 讨论

3.1 JDP1-JDP2 引物扩增种属诊断特异性 棘阿米巴属 18S rDNA 基因型描述的首要研究就是有效的配对引物的设计。首次利用 PCR 技术检测棘阿米巴属基因特异性诊断的是 Vodkin 等^[7]。这些作者使用 ACA-RNA1383-1655 引物,扩增 1 383 ~ 1 655bp 之间的片段,证明即使棘阿米巴虫株很少,许多的基因条带也能获得相应的 PCR 产物,新鲜的样本,被福尔马林浸泡过的样本也可以获得。之后 Lehmann 等^[3]证实这对引物也能用于诊断棘阿米巴角膜炎。一些作者随后发现了与 18S rDNA 有关的第 2 对引物 PIGP2379-2632,能扩增 1 835 ~ 2 079bp 之间的片段,在临

床研究中,能诊断棘阿米巴的存在。最新的相近的只有 16bp 大小的扩增引物已经应用于临床^[8]。18S rDNA 基因序列数据库已经被用于设计种属特异性诊断的引物,可以只扩增棘阿米巴属的 18S rDNA 基因型,不会扩增其他相近的阿米巴种属或者其他有机体包括人类的基因序列,这个目标从引物 JDP1-JDP2 中实现。Schroeder 等^[9]已经证明此引物在每一个阿米巴种属中均可获得扩增条带。目前为止,JDP1-JDP2 扩增引物因为其基因高选择性及可以从所有 18S rDNA 获得扩增条带而成为特异性诊断棘阿米巴的最好的选择。这使得它对棘阿米巴成分复杂的环境样本有独特的作用。本实验以葡萄球菌,正常人角膜基质细胞,茄病菌均无阳性条带从部分方面证明这个引物的种属特异性。一方面又排除其他角膜炎的可能。

3.2 PCR 技术的敏感性 Vodkin 等^[7]能利用 PCR 从单个滋养体中扩增出相应的基因产物。我们将提取的 40μL DNA 样品分 4 管,全部参加 PCR 反应,保证平均 1 ~ 2 个滋养体可获得 ASA. S1 产物,这个敏感性已经在 16 个病例中被证实,包括部分刮片、培养为阴性的病例(表 2)。我们明确知道细胞克隆能从单个胞囊和滋养体中获得,同样我们已经知道单个滋养体足够 PCR 反应。但以我们目前的技术和知识水平尚未在成熟的棘阿米巴胞囊中获得基因扩增产物。A3a, A9a 培养和刮片阴性的病例中 PCR 结果阳性,而 A3b, A9b, A12, A15 均为治疗过的,培养阳性,PCR 结果阴性,推测经治疗后棘阿米巴可能因环境变化,形成成熟的胞囊,目前的实验结果表明 PCR 成功的关键是样本中含有滋养体和未成熟的胞囊,而培养阳性 PCR 阴性的样本中只含有成熟的胞囊。来就诊病例最短 1wk,角膜刮片镜检结果只有 5 例明确诊断为阳性。分析原因可能由于这时角膜上皮损害较小,刮片部位太浅,未刮到原虫有关^[10]。另外当混合真菌感染时,100g/L KOH 并不能破坏真菌的孢子,再加上对棘阿米巴形态认识不够,很容易漏诊。而 PCR 技术则可以完全排除主观因素,早期明确诊断。

3.3 PCR 技术其他优点 由于 PCR 的种属诊断特异性、JDP1-JDP2 引物扩增的敏感性高,所以只需极少量标本,就可获得阳性结果。Hot start 体系减少了多次加样的麻烦,对于多样本操作时减少了错误出现。加上目前采用电脑调控的 DNA 扩增仪,只需一次性把整个反应系统配置好,输入正确程序,便可自动进行变性、复性、延伸 3 个反

应阶段,产生正确的PCR产物。所以整个操作非常简便、迅速。为临床快速诊断提供了有效手段^[11]。

参考文献

- 1 Dgkouá I, Lom J, Schroeder-Diedrich JM, *et al.* Acanthamoeba strains isolated from organs of freshwater fishes. *J Parasitol* 1999;85(6): 1106-1113
- 2 Howe DK, Vodkin MH, Novak RJ, *et al.* Identification of two genetic markers that distinguish pathogenic and nonpathogenic strains of Acanthamoeba. *Parasitol Res* 1997;83(4):345-348
- 3 Lehmann OJ, Green SM, Morlet N, *et al.* Polymerase chain reaction analysis of corneal epithelial and tear samples in the diagnosis of Acanthamoeba keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39(7):1261-1265
- 4 Stothard DR, Schroeder-diedrich JM, Awward MH, *et al.* The evolutionary history of the genus acanthamoeba and the identification of eight new 18s rRNA gene sequence types. *J Eukaryot Microbiol* 1998;45(1):45-54
- 5 Bayers TJ, Hngo ER, Stewart VJ. Genes of acanthamoeba DNA, RNA and protein sequences;a review. *J Protozool* 1990;37(4):17-22
- 6 Booton GC, Kelly DJ, Chu YW, *et al.* 18S ribosomal DNA typing and

tracking of Acanthamoeba species isolates from corneal scrape specimens, contact lenses, lens cases, and home water supplies of Acanthamoeba keratitis patients in Hong Kong. *J Clin Microbiol* 2002;40(5): 1621-1625

- 7 Vodkin MH, Howe DK, Visvesvara GS, *et al.* Identification of Acanthamoeba at the generic and specific levels using the polymerase chain reaction. *J Protozool* 1992;39(3):378-385

- 8 Mathers WD, Nelson SE, Lane JL, *et al.* Confirmation of confocal microscopy diagnosis of Acanthamoeba keratitis using polymerase chain reaction analysis. *Arch Ophthalmol* 2000;118(2):178-183

- 9 Schroeder JM, Booton GC, Hay J, *et al.* Use of subgenetic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of Acanthamoebae from humans with keratitis and from sewage sludge. *J Clin Microbiol* 2001;39(5):1903-1911

- 10 邓新国,孙秉基,庞广仁. 棘阿米巴角膜炎的实验室诊断及实验研究. *河南医学研究* 2000;9(1):10-13

- 11 靳雷,井上美智子. 聚合酶链反应技术对棘阿米巴角膜炎诊断的临床应用. *临床眼科杂志* 2003;11(2): 124-125