

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.16.042

实时荧光重组酶聚合酶扩增快速检测临床常见曲霉菌方法的建立*

龙炫辉 杨永强 魏 涛 邓宁波 桑 晔 唐文志 曾朱君[△]

(广东省中医院珠海医院检验科 广东 珠海 519015)

摘要 目的:针对曲霉菌属转录间隔区 ITS1 设计引物、探针,利用实时荧光重组酶聚合酶扩增(Real-time RPA)技术建立一种快速、准确、经济的临床常见曲霉菌检测鉴定方法。**方法:**利用建立的实时荧光重组酶聚合酶扩增体系对标准菌株及临床标本提取的 DNA 进行扩增,验证该方法的性能。**结果:**本研究针对曲霉菌属转录间隔区 ITS1 设计引物、探针利用 RPA 试剂盒(荧光型)建立了 Real-time RPA 扩增体系,在 15 分钟内即可检测出临床常见的四种曲霉菌;特异性试验结果显示反应体系只对烟曲霉、黄曲霉、土曲霉、黑曲霉四种曲霉呈现出明显的扩增曲线,而其它细菌和真菌均无扩增曲线。灵敏性试验显示最低检出限为 10^{-3} ng/ μ L。临床验证试验的 12 份曲霉菌均有较高的扩增效应。**结论:**本研究建立的 Real-time RPA 方法能快速、特异、灵敏地检出烟曲霉、黄曲霉、土曲霉、黑曲霉等临床常见曲霉菌,为曲霉菌的快速、现场检测提供了一种新的思路。

关键词:实时荧光重组酶聚合酶扩增;曲霉菌;快速检测

中图分类号:R446.6;R379.6 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2020)16-3189-04

Establishment of A Real-time Fluorescent Recombinase Polymerase Amplification Method for Rapid Detection of Common Clinical Aspergillus*

LONG Xuan-hui, YANG Yong-qiang, WEI Tao, DENG Ning-bo, SANG Ye, TANG Wen-zhi, ZENG Zhu-jun[△]

(Department of Clinical Laboratory, Zhuhai Hospital, Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhuhai, Guangdong, 519015, China)

ABSTRACT Objective: To design primers and probes for Aspergillus transcript spacer ITS1, and to use Real-time fluorescent recombinase polymerase amplification (Real-time RPA) technology to establish a rapid, accurate, and economical method for detection and identification of common clinical Aspergillus. **Methods:** The established Real-time fluorescent recombinase polymerase amplification system was used to amplify the DNA extracted from standard strains and clinical specimens to verify the performance of the method. **Results:** In this study, we designed primers and probes for the Aspergillus transcript spacer ITS1 using RPA kit (fluorescent type) to establish a Real-time RPA amplification system, and detected four clinically common Aspergillus species within 15 minutes; The specific test results show that the reaction system only has specific amplification for Aspergillus fumigatus, Aspergillus flavus, Aspergillus terreus and Aspergillus niger, while there was no amplification for other bacteria and fungi; The sensitivity test showed that the detection limit was 10^{-3} ng/ μ L. 12 samples of Aspergillus in clinical validation test had high amplification effect. **Conclusion:** The Real-time RPA method established in this study can detect Aspergillus fumigatus, Aspergillus flavus, Aspergillus terreus, Aspergillus niger and other common clinical aspergillus quickly, specifically and sensitively. It provides a new idea for rapid and field detection of Aspergillus.

Key words: Real-time RPA; Aspergillus; Rapid detection

Chinese Library Classification(CLC): R446.6; R379.6 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)16-3189-04

前言

曲霉菌是普遍存在于自然界的真菌,一般不致病,但在特定的条件下可引起人类感染,常见诱发侵袭性肺曲霉病(IPA),是严重的机会性感染疾病,尤其是血液系统恶性肿瘤、器官移植、艾滋病等接受免疫抑制治疗、免疫力低下患者的致命性感染因素^[1-3];虽然抗真菌药物不断更新换代但侵袭性曲霉病患者死亡率还是居高不下^[4]。目前侵袭性曲霉病的临床诊断主

要依靠实验室病原学检测包括真菌培养和显微镜镜检,而真菌培养时间一般需要 3-7 天,有些真菌甚至需要培养 14 天才生长^[5]。这些方法检出率低、敏感性差、耗时长无法实现快速诊断,严重耽误临床治疗^[6]。近年来临床广泛利用血清学检测包括 1,3- β -D- 葡聚糖试验(G 试验)、半乳甘露聚糖试验(GM 试验),能为早期诊断提供帮助,但其干扰因素多、假阳性率高,不同厂家试剂参考值也不同,临床应用价值存有争议^[7]。快速检出曲霉菌有利于侵袭性曲霉病的早期诊断,对降低相关的发病率和死

* 基金项目:广东省医学科学技术研究基金项目(A2018522)

作者简介:龙炫辉(1986-),男,硕士,主管技师,研究方向:临床微生物学真菌鉴定,E-mail: longlongh@126.com

[△] 通讯作者:曾朱君(1982-),女,本科,主管技师,研究方向:医院感染管理与临床微生物检验,E-mail: 24195892@qq.com

(收稿日期:2020-03-17 接受日期:2020-04-11)

亡率非常重要^[8]。研究表明及时有效的抗真菌治疗可以降低50%死亡风险^[9,10]。重组酶聚合酶扩增(RPA)是一种恒温扩增技术,该技术具有操作简单,设备要求低,反应快速,高灵敏性和特异性等优势,自问世以来被广泛用于病原体检测^[11,12]。目前鲜有使用实时荧光重组酶聚合酶扩增(Real-time RPA)曲霉菌的报道,本研究探讨 Real-time RPA 技术同时检测烟曲霉、黄曲霉、土曲霉、黑曲霉等临床常见曲霉菌的效果,为临床实现侵袭性曲霉病的快速诊断提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

标准菌株烟曲霉(ATCC96918)、黄曲霉(ATCC28539)、土曲霉(ATCC1012)、黑曲霉(ATCC16404)由珠海贝索生物有限公司惠赠,白色念珠菌(ATCC10231)、克柔念珠菌(ATCC6258)、金黄色葡萄球菌(ATCC25923)、大肠埃希菌(ATCC25922)购于广东省临床检验中心;另有12例临床分离的曲霉菌来源于广东省中医院珠海医院检验科微生物室。

1.2 主要试剂和仪器

杭州众测生物科技有限公司的RPA核酸扩增试剂(荧光型),真菌基因组DNA提取试剂盒(北京索莱宝科技有限公司),细菌DNA提取试剂盒(中山大学达安基因股份有限公司),沙保弱培养基(江门凯琳贸易有限公司),1416R型高速冷冻离心机(珠海黑马医学仪器有限公司),美国Bio-Rad公司的CFX96实时荧光定量PCR扩增仪。

1.3 DNA提取

曲霉菌、细菌DNA制备方法按照试剂说明书进行。

1.4 引物、探针设计

在GeneBank数据库中查找曲霉属烟曲霉(ATCC96918)、黄曲霉(ATCC28539)、黑曲霉(ATCC16404)、土曲霉(ATCC1012)、根霉属(AM933547)、白色念珠菌(ATCC10231)、毛霉属(AJ878783)的5.8S rRNA、18S rRNA、28S rRNA及ITS基因序列,通过多序列比对发现各菌属在ITS-I差别较大,而曲霉菌在该区间比较保守,因此选择在ITS-I区间利用Premier 5软件设计引物和探针,经过一系列的引物筛选,最终选定上游引物F:5'-GAACCTGCGGAAGGATCAT-

TACCGAGTGAG-3'下游引物R:5'-CTTTCAGAACACGTCATGTTGGGGTCTTCGG-3',探针:5'-GGCCCTCTGGGTCCAACCTCCACCCGTGTCTAT[FAM-dT][dspacer]T[BHQ-1-dT]CCTTGTTGCTTCG-[C3-spacer]-3',产物大小180bp左右。引物及探针均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.5 RPA反应体系优化

反应体系体积共50 μL:缓冲液A 40.95 μL,上游引物(10 μM) 2.0 μL,下游引物(10 μM) 2.0 μL,探针(10 μM) 0.6 μL,样本DNA 2.0 μL,缓冲液B 2.5 μL,振荡摇匀后低速离心10秒。将检测管放入CFX96实时荧光定量PCR扩增仪;扩增条件设置:预热温度38℃,4秒,循环数1;扩增温度38℃,30秒,循环数40后采集荧光。

1.6 特异性检测

将临床常见的烟曲霉、黄曲霉、土曲霉、黑曲霉四种曲霉标准菌株及白色念珠菌、克柔念珠菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌标准菌株及临床标本培养的桔青霉、卷枝毛霉、马尔尼菲蓝状菌、米根霉提取DNA进行Real-time RPA扩增。

1.7 灵敏性检测

将浓度为100 ng/L烟曲霉菌基因组DNA使用ddH₂O进行10倍梯度稀释,设计成8个稀释浓度:10² ng/μL、10¹ ng/μL、10⁰ ng/μL、10⁻¹ ng/μL、10⁻² ng/μL、10⁻³ ng/μL、10⁻⁴ ng/μL、10⁻⁵ ng/μL,分别以此浓度的DNA为模板,按照1.5所示的Real-time反应体系进行扩增。

2 结果

2.1 特异性试验

以烟曲霉、黄曲霉、土曲霉、黑曲霉、白色念珠菌、克柔念珠菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌标准菌株及临床标本菌桔青霉、卷枝毛霉、马尔尼菲蓝状菌、米根霉为DNA模板进行荧光Real-time RPA扩增,并用ddH₂O作阴性对照。结果显示烟曲霉、黄曲霉、土曲霉、黑曲霉四种曲霉呈现出明显的扩增曲线,而其它细菌和真菌均无扩增曲线。表明该方法具有较好的特异性。见图1。

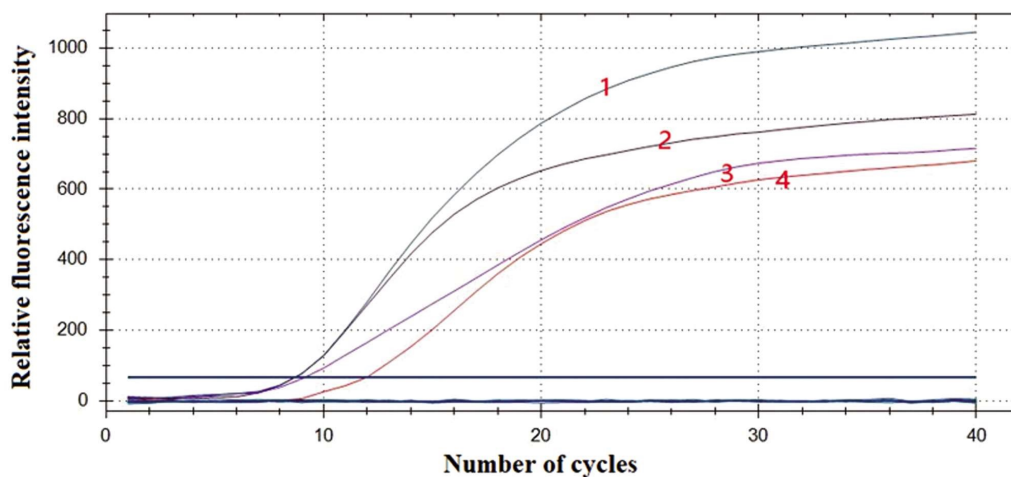


图1 Real-time RPA 扩增特异性结果

Fig.1 Real time RPA amplification specific results

Note: 1~4 was *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*.

2.2 灵敏性试验

将烟曲霉提取的 DNA 进行 10 倍稀释,配置成 8 个稀释浓度,每个稀释度荧光 Real-time RPA 扩增,结果表明浓度为

$10^2 \sim 10^3$ ng/ μ L 均可见明显的扩增曲线,而浓度为 10^4 ng/ μ L、 10^5 ng/ μ L 均无扩增曲线出现,因此本方法最低检出限为 10^3 ng/ μ L。见图 2。

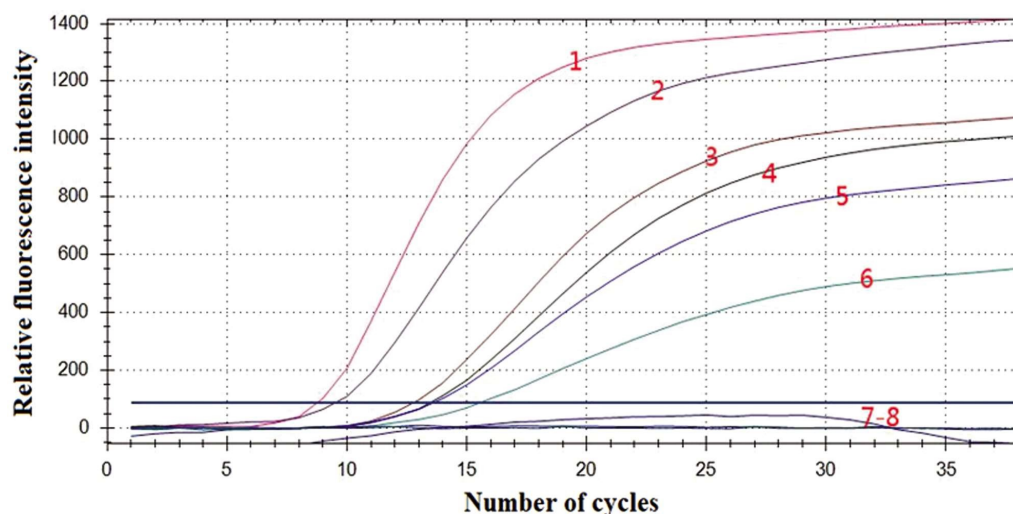


图 2 Real-time RPA 扩增敏感性结果

Fig.2 Real time RPA amplification sensitivity results

Note: 1~8 was 10^2 ng/ μ L, 10^1 ng/ μ L, 10^0 ng/ μ L, 10^{-1} ng/ μ L, 10^{-2} ng/ μ L, 10^{-3} ng/ μ L, 10^{-4} ng/ μ L, 10^{-5} ng/ μ L.

2.3 临床验证

将从本实验室痰标本分离培养出的 12 份曲霉菌 (3 份黄曲霉、5 份烟曲霉、2 份黑曲霉、2 份土曲霉)提取 DNA,利用本

研究建立的 Real-time RPA 扩增体系进行检测。结果显示 12 份标本均有明显的扩增曲线,说明该方法有良好的临床诊断价值。见图 3。

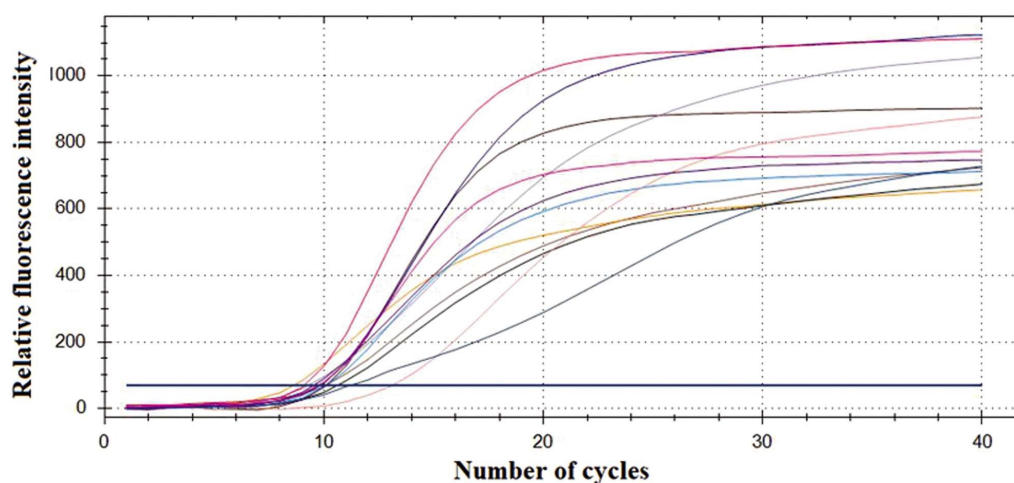


图 3 临床验证结果

Fig.3 Clinical validation results

3 讨论

侵袭性曲霉病是免疫缺陷型疾病,血液系统恶性肿瘤,实体器官移植或造血干细胞移植等接受免疫抑制剂或大剂量激素治疗的患者最常见并发症^[13-15]。由于临床表现通常是非特异性的,很容易被原发性基础疾病掩盖,因此早期诊断很困难,容易导致诊断延迟,误诊和治疗延迟^[12,16]。RPA 是最近开发的等温扩增技术,在恒温环境利用重组酶与寡核苷酸引物形成核蛋白复合物,在辅助因子的作用下扫描识别并结合靶序列寡核苷酸中的同源序列,以此为模板在 DNA 聚合酶辅助下进行延伸扩增,如此反复实现指数扩增^[17-19]。RPA 技术操作简便,影响因素

少,设备要求低易于实施,与 PCR 方法不同,无需加热变性,只要一台恒温设备维持 $25 \sim 42^\circ\text{C}$ 环境下就可以进行扩增,并且反应时间短,5~30 分钟就可以完成扩增^[20-22]。基于以上优势,RPA 技术被广泛用于细菌、真菌、病毒、寄生虫、支原体、耐药基因、食品安全等方面的检测^[23-27]。

本试验扩增产物使用 Bio-Rad 公司的 CFX96 实时荧光定量 PCR 扩增仪进行荧光强度检测,无条件的实验室也可以使用便携式实时荧光 RPA 监测器检测荧光强度,基于该方法操作简便、对仪器要求较低,非常适合用于床旁检测及条件差的基层诊断实验室机构^[28,29]。RPA 技术的关键步骤是引物、探针的设计,它直接影响扩增效果,不能使用 PCR 引物、探针设计原则,

可根据 TwistDx 公司提供的引物、探针筛选指南^[30], 最终引物和探针的确定需要进行优化筛选, 本研究前期做了大量预试验最终筛选出本研究的最佳引物和探针, 以此建立的反应体系整个扩增只需 15 分钟, 与其它曲霉菌的检测方法相比更加简便, 检测周期大幅减短, 节约成本。以上试验结果显示本研究建立的 Real-time 方法对烟曲霉、黄曲霉、土曲霉、黑曲霉四种曲霉呈现出明显的扩增曲线, 而其它细菌和真菌均无扩增曲线, 且其最低检出限为 10^{-3} ng/ μ L, 表明 Real-time 方法具有较好的特异性和灵敏性, 能满足临床诊断需求。本研究在临床验证试验的 12 份曲霉菌均有较高的扩增效应, 说明该方法有较好的应用效果。

综上所述, 研究针对曲霉菌属转录间隔区 ITS I 设计引物, 利用 RPA 技术初步建立了实时荧光重组酶聚合酶扩增快速检测临床常见曲霉菌的方法, 该方法在 38℃ 条件下 15 分钟内即可完成对目标 DNA 进行扩增, 并且有较高的特异性及灵敏度, 操作简单, 无需特殊的仪器设备, 非常适合基层医疗单位对曲霉菌的检测, 为曲霉菌的快速、现场检测提供了一种新的思路。

参考文献(References)

- [1] Gautier M, Normand AC, Ranque S. Previously unknown species of *Aspergillus*[J]. Clin Microbiol Infect, 2016, 22(8): 662-669
- [2] Talbot JJ, Barrs VR. One-health pathogens in the *Aspergillus* viridinis complex[J]. Med Mycol, 2018, 56(1): 1-12
- [3] Qiao J, Sun Y, Gao L, et al. Lonafarnib synergizes with azoles against *Aspergillus* spp. and *Exophiala* spp [J]. Med Mycol, 2018, 56(4): 452-457
- [4] 王琴, 严梦楠, 宋一祎, 等. PCR 检测痰曲霉菌在慢性阻塞性肺疾病合并侵袭性肺曲霉病中的诊断价值[J]. 中国临床医学, 2019, 26(2): 238-241
- [5] 陈斌. 微生物检测对肺曲霉病临床诊治的意义分析[J]. 中国现代药物应用, 2019, 13(17): 55-57
- [6] 黄猛, 黎国喜, 陈天全. 支气管肺泡灌洗液 1,3- β -D 葡聚糖检测(G 试验)、半乳甘露聚糖检测(GM 试验)对早期诊断侵袭性肺部真菌感染的诊断价值[J]. 临床肺科杂志, 2019, 24(6): 992-995
- [7] 李逢将, 苑鑫, 柏长青, 等. 侵袭性真菌性肺炎快速检测方法研究进展[J]. 军事医学, 2019, 43(1): 77-80
- [8] Jenks JD, Salzer H, Hoenigl M. Improving the rates of *Aspergillus* detection: an update on current diagnostic strategies[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2019, 17(1): 39-50
- [9] Pitarch A, Nombela C, Gil C. Diagnosis of Invasive Candidiasis: From Gold Standard Methods to Promising Leading-edge Technologies[J]. Curr Top Med Chem, 2018, 18(16): 1375-1392
- [10] 夏云, 杜丽, 何云燕. 侵袭性曲霉病实验室诊断的现状和展望[J]. 中华检验医学杂志, 2018, 41(1): 9-12
- [11] Daher RK, Stewart G, Boissinot M, et al. Recombinase Polymerase Amplification for Diagnostic Applications [J]. Clin Chem, 2016, 62(7): 947-958
- [12] Wen X, Chen Q, Yin H, et al. Rapid identification of clinical common invasive fungi via a multi-channel real-time fluorescent polymerase chain reaction melting curve analysis [J]. Medicine (Baltimore), 2020, 99(7): e19194
- [13] Ramírez P, Gamacho-Montero J. Invasive aspergillosis in critically ill patients[J]. Rev Iberoam Micol, 2018, 35(4): 210-216
- [14] Cadena J, Thompson GR 3rd, Patterson TF. Invasive Aspergillosis: Current Strategies for Diagnosis and Management [J]. Infect Dis Clin North Am, 2016, 30(1): 125-142
- [15] Darling BA, Milder EA. Invasive Aspergillosis[J]. Pediatr Rev, 2018, 39(9): 476-478
- [16] 居阳, 钟雪锋, 方芳, 等. 侵袭性肺真菌感染的临床分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(8): 1762-1765
- [17] Wang J, Liu L, Wang J, et al. Recombinase Polymerase Amplification Assay-A Simple, Fast and Cost-Effective Alternative to Real Time PCR for Specific Detection of Feline Herpesvirus-1 [J]. PLoS One, 2017, 12(1): e0166903
- [18] Higgins M, Ravenhall M, Ward D, et al. PrimedRPA: primer design for recombinase polymerase amplification assays [J]. Bioinformatics, 2019, 35(4): 682-684
- [19] Li J, Macdonald J, von Stetten F. Review: a comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification[J]. Analyst, 2018, 144(1): 31-67
- [20] 岳苑, 张建中, 张茂俊. NASBA 和 RPA 两种等温扩增技术在病原菌检测中的应用研究[J]. 中华流行病学杂志, 2019, 40(8): 1018-1022
- [21] Del Río JS, Lobato IM, Mayboroda O, et al. Enhanced solid-phase recombinase polymerase amplification and electrochemical detection [J]. Anal Bioanal Chem, 2017, 409(12): 3261-3269
- [22] Lee J, Heo S, Bang D. Applying a Linear Amplification Strategy to Recombinase Polymerase Amplification for Uniform DNA Library Amplification[J]. ACS Omega, 2019, 4(22): 19953-19958
- [23] 刘立兵, 耿云云, 姜彦芬, 等. 沙门氏菌重组酶聚合酶检测方法的建立及应用[J]. 食品科学, 2019, 40(2): 298-303
- [24] 蒙雨丹, 刘爽, 赵军宁, 等. 实时荧光重组酶聚合酶扩增在白色念珠菌检测中的初步应用[J]. 中华烧伤杂志, 2019, 35(8): 587-594
- [25] 王猛, 刘晔华, 张坚磊, 等. 应用重组酶聚合酶扩增检测法快速分解豚支原体的探讨[J]. 重庆医学, 2020, 49(10): 1602-1606
- [26] 周树青, 杨栋, 金敏, 等. 重组酶聚合酶扩增技术(RPA)快速检测 GII 型诺如病毒[J]. 解放军预防医学杂志, 2020, 38(1): 76-78
- [27] Ma B, Li J, Chen K, et al. Multiplex Recombinase Polymerase Amplification Assay for the Simultaneous Detection of Three Foodborne Pathogens in Seafood[J]. Foods, 2020, 9(3): 278
- [28] 樊晓旭, 赵永刚, 李林, 等. 重组酶聚合酶扩增技术在疾病快速检测中的研究进展[J]. 中国动物检疫, 2016, 33(8): 72-77
- [29] 刘立兵, 王金凤, 张若曦, 等. 口蹄疫病毒实时荧光 RT-RPA 快速检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2019, 41(2): 168-173
- [30] Springer J, White PL, Kessel J, et al. A Comparison of *Aspergillus* and *Mucorales* PCR Testing of Different Bronchoalveolar Lavage Fluid Fractions from Patients with Suspected Invasive Pulmonary Fungal Disease[J]. J Clin Microbiol, 2018, 56(2): e01655-17