

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.06.001

实时定量 PCR 检测流感嗜血杆菌感染实验室诊断方法的建立^{*}

蔚 然¹, 王良玉¹, 高 琦², 胡文娟¹, 窦海伟¹, 向 莉², 辛德莉¹, 郭东星^{1△}

(1. 首都医科大学附属北京友谊医院/北京热带医学研究所, 北京 100050; 2. 首都医科大学附属北京儿童医院, 北京 100050)

摘 要:目的 建立 SYBR-Green 染料法实时定量聚合酶链反应(PCR)检测流感嗜血杆菌(Hi)感染的实验室诊断方法。方法 设计合成针对 Hi fucK 基因的引物;扩增 Hi fucK 基因,构建质粒,10 倍梯度稀释后,以 $10 \sim 10^8$ copy/反应作为标准品绘制标准曲线,并检验新建实验室诊断方法的敏感度;采用实验室保存的肺炎支原体标准株、人型支原体标准株、阴沟肠杆菌标准株、金黄色葡萄球菌标准株、肺炎克雷伯菌标准株和大肠埃希菌标准株的 DNA 标本,检验新建实验室诊断方法的特异度;将新建立的实验室诊断方法,应用于临床标本的检验。结果 新建实验室诊断方法敏感度较高,其可检测到拷贝数为 10 copy 的 Hi DNA;具有较高特异度,可成功区别于几种病原体 DNA;将该方法应用于 226 份临床咽拭子标本的检测,检出 Hi 感染 92 份,阳性率为 40.70%。结论 该研究建立的实时定量 PCR 检测 Hi 感染的方法,具有较高的敏感度和特异度,操作简单,用时较短,可用于临床 Hi 感染的实验室诊断。

关键词:流感嗜血杆菌; 儿童; 呼吸道感染; 实时定量聚合酶链反应

中图法分类号:R446.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)06-0737-04

Laboratory diagnostic method establishment of real-time quantitative PCR for detecting Haemophilus influenza infection^{*}

WEI Ran¹, WANG Liangyu¹, GAO Qi², HU Wenjuan¹, DOU Haiwei¹,
XIANG Li², XIN Deli¹, GUO Dongxing^{1△}

(1. Affiliated Beijing Friendship Hospital of Capital Medical University/Beijing Tropical Medicine Research Institute, Beijing 100050, China; 2. Affiliated Beijing Children Hospital of Capital Medical University, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective To establish a laboratory diagnostic method of SYBR Green dye method of real-time quantitative PCR for detecting Haemophilus influenza(Hi) infection. **Methods** The primers aiming at L-fuculokinase(fucK) gene were designed and synthesized. The Hi fucK gene was amplified, the plasmid was constructed, after 10 fold gradient dilution, the standard curve was drawn with $10 - 10^8$ copy of reaction as the standard substance, the sensitivity of newly established laboratory diagnostic method was tested; the DNA samples of Mycoplasma pneumoniae standard strain, Mycoplasma hominis standard strain, Enterobacter cloacae standard strain, Staphylococcus aureus standard strain, Klebsiella pneumoniae standard strain and Escherichia coli standard strain preserved in the laboratory were adopted for detecting the specificity of newly established laboratory diagnostic method; then the newly established laboratory diagnostic method was used in the detection of clinical samples. **Results** This newly established laboratory diagnostic method had higher sensitivity, its detectable copy number was 10 copy Hi DNA; this method had higher specificity and could successfully distinguish several pathogenic DNA; in the application of this method for 226 clinical throat swab samples, 92 cases of Hi infection were detected out with the positive rate of 40.70%. **Conclusion** The real-time quantitative PCR for detecting Hi infection established by this study has higher sensitivity and higher specificity, is easy to operate, uses short time and can be used in the laboratory diagnosis of clinical Hi infection.

Key words: Haemophilus influenzae; children; respiratory tract infections; real time quantitative PCR

流感嗜血杆菌(Hi)为革兰阴性菌,是人类呼吸道岁以下急性呼吸道感染患儿 2000—2002 年呼吸道 Hi 携带率为 26.1%,随着疫苗的应用 Hi 携带率有所下

^{*} 基金项目:首都市民健康培育项目(Z161100000116088、Z131100006813044)。

作者简介:蔚然,女,在读硕士,主要从事儿内科学研究。△ 通信作者, E-mail: dongxing_guo@163.com。

降,但 2010—2012 年仍高达 16.3%^[1]。Hi 是儿童时期细菌性脑膜炎、肺炎和菌血症的重要病原菌之一,还可导致儿童中耳炎、上颌窦炎、急性会厌炎、化脓性关节炎和眼内炎等^[2],给儿童健康造成很大威胁。由于 Hi 毒力较强,病情变化快,其导致的小儿肺炎属于较严重的一种类型,病死率没有得到有效控制,各地的诊治方法也无标准,常有漏诊、误诊情况^[3]。Hi 的早期、快速、准确检测,对疾病的早期治疗、疾病的转归及预后起到非常重要的作用。现有诊断方法,如分离培养、血清学诊断等不能满足临床需要,需不断探索早期、快速诊断 Hi 感染的新方法。近年来,分子生物学诊断正逐渐成为研究的热点。本研究拟建立一种 SYBR-Green 染料法实时定量聚合酶链反应(PCR)检测 Hi 感染的方法,以期实现 Hi 的临床早期、快速、准确诊断。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 采集 2014 年 9—12 月就诊于北京儿童医院的患儿咽拭子标本 226 份。本研究通过伦理审查,患儿家属均知情同意。菌株:肺炎支原体标准株 M129 菌株(ATCC 29342)、人型支原体标准株(ATCC 15488)、阴沟肠杆菌标准株(ATCC 700323)、金黄色葡萄球菌标准株(ATCC 25922)、肺炎克雷伯菌标准株(ATCC 1705)和大肠埃希菌标准株(ATCC 25922),含有 Hi fucK 基因质粒的大肠埃希菌冻存于本研究室。

1.2 仪器与试剂 ABI 公司 Prism[®] 7500 型荧光定量 PCR 仪;高纯度质粒小提试剂盒(康为世纪生物科技有限公司,货号 CW0500S,生产批号 20121);通用型柱式基因组提取试剂盒(康为世纪生物科技有限公司,货号 CW2298S,生产批号 40137);PCR 荧光染料为 ULtra SYBR Mixture(康为世纪生物科技有限公司,货号 CW2601M,生产批号 10209)。

1.3 方法

1.3.1 构建标准品 复苏冻存于-80℃冰箱的含有 Hi fucK 基因的大肠埃希菌,构建质粒,采用康为世纪高纯度质粒小提试剂盒提取质粒,实验操作参考产品说明书。对提取的质粒进行定量分析,10 倍稀释构建水平为 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10 copy/ μ L 的质粒作为标准品,保存于-80℃备用。

1.3.2 设计并合成引物 针对 Hi 的 fucK 基因设计引物 Hi-F/Hi-R,引物序列 Hi-F: ATGGCGGGAA-CATCAATGA; Hi-R: ACGCATAGGAGGGAAAT-GGTT。引物由美国 Invitrogen 公司合成,经 HPLC 方式纯化。

1.3.3 绘制标准曲线 以标准品为模板进行染料法荧光定量 PCR,绘制标准曲线。荧光定量 PCR 反应体系:2×Taqman 缓冲液 10 μ L,引物 Hi-F/Hi-R 各 0.3 μ L, DNA 模板 2.0 μ L, ddH₂O 8.0 μ L,总体积 20.0 μ L。反应条件:50℃ 2 min;95℃ 10 min;95℃ 15 s,60℃ 1 min,40 个循环;95℃ 15 s,60℃ 1 min,95℃ 15 s。采用 ABI 公司 7500 型荧光定量 PCR 仪

的 SDS 软件分析实验结果并绘制标准曲线。

1.3.4 方法学验证 (1)敏感度:将构建的标准品稀释为 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10 copy/ μ L,采用和绘制标准曲线时相同的反应体系和反应条件,检测新建的实时荧光定量 PCR 的敏感度。(2)特异度:以本实验室保存的肺炎支原体、人型支原体、阴沟肠杆菌、金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌的 DNA 作为检测模板,验证新建的实时荧光定量 PCR 特异度。(3)检验临床标本:采集的 226 份儿科患儿的咽拭子标本,均采用通用型柱式基因组提取试剂盒提取 DNA,实验操作参考产品说明书。用新建的实时荧光定量 PCR 检测 Hi 的感染情况,反应体系和条件均参照构建标准曲线时采用的体系和条件。根据标本扩增的 Ct 值 ≤ 38 、Tm 值与标准品相符,且结合扩增曲线、溶解曲线,判定为阳性。

2 结果

2.1 标准曲线 10 倍梯度稀释用标准株提取的质粒, 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10 copy/ μ L 的质粒标准品,用 Hi-F/Hi-R 引物分别扩增标准品,以标准品水平为横坐标,对应的 Ct 值为纵坐标,采用 SDS 软件分析实验结果并绘制标准曲线。标准曲线方程: $Y = -3.335\ 976X + 35.492\ 149$ ($R^2 = 0.999$);模板量与 Ct 值具有良好的相关性,能够对模板定量。见图 1。

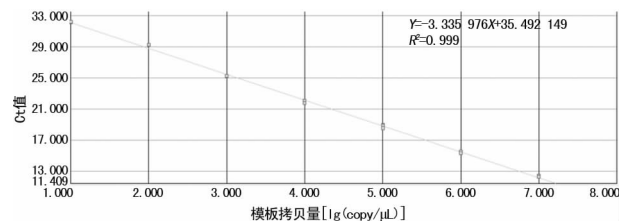
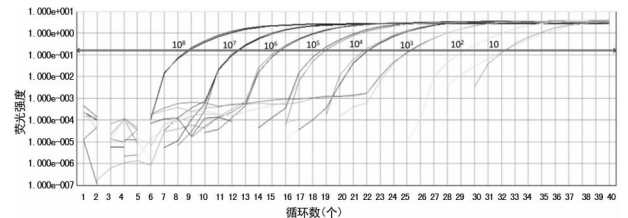


图 1 标准曲线

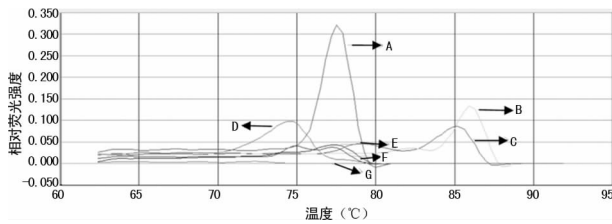
2.2 敏感度 10 倍梯度稀释用标准株提取的质粒, 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10 copy/ μ L 的质粒标准品,用 Hi-F/Hi-R 引物分别扩增标准品,检验新建荧光定量 PCR 的敏感度。新建实时荧光定量 PCR 可检测拷贝数为 10 copy 的基因模板。见图 2。



注: 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10 分别代表标准品模板拷贝量

图 2 标准品扩增曲线

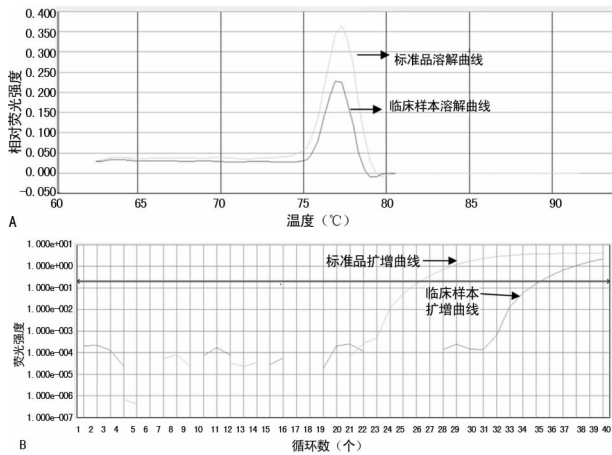
2.3 特异度 大肠埃希菌、阴沟肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、肺炎支原体、肺炎克雷伯菌和人型支原体标准株的 DNA 作为检测模板,验证新建实验室诊断方法的特异度。结果显示以上几种病原体 DNA 均为阴性,新建实验室诊断方法具有良好的特异度。见图 3。



注: A 为 Hi 标准品; B 为阴沟肠杆菌标准株; C 为大肠埃希菌标准株; D 为肺炎支原体标准品; E 为金黄色葡萄球菌标准品; F 为人型支原体标准品; G 为肺炎克雷伯菌标准株

图 3 Hi 的标准品与其他菌株标准株的溶解曲线

2.4 临床标本检测 用新建实时荧光定量 PCR 检测临床标本提取的 DNA, 结果显示, 226 份咽拭子标本 Ct 值 ≤ 38 , Tm 值与标准品相符合; 结合扩增曲线、溶解曲线, 判定为阳性, 阳性检出率为 40.70%。PCR 阳性产物测序(由生工生物工程股份有限公司完成)并与美国国立生物技术信息中心(NCBI)已发布的 Hi 菌株的基因序列比对, 阳性率为 92.3%。见图 4。



注: A 为溶解曲线; B 为扩增曲线

图 4 临床标本、Hi 标准品的溶解曲线与扩增曲线

3 讨论

有研究报道, 综合 192 个国家的流行病学调查显示, 肺炎仍是导致儿童死亡的首要病因, 其中由 Hi 引起的死亡占 16.0%, 我国由 Hi 感染引起的死亡占 21.2%, 高于世界平均水平^[4-5]。可能由于 Hi 感染的临床表现及胸部 X 线征象缺乏特异性, 诊断 Hi 感染往往需要结合实验室诊断方法^[6]。对 Hi 感染的早期、快速、准确诊断对指导临床合理规范用药至关重要。

传统的分离培养被认为是诊断 Hi 感染的金标准, 但培养所需时间较长(36~72 h), 难以实现快速鉴定^[7], 对临床早期诊断的意义不大。该方法受培养条件、标本保存与运输、实验室培养条件等诸多因素影响。有报道称, 经改良培养基后, Hi 分离率有所提高, 也仅为 59.9%^[8-9]。血清学诊断方法主要通过检测血清中的特异性抗原、抗体滴度的变化等判断病原体感染, 有研究报道其敏感度高于分离培养^[10]。但血清抗体产生需 4~5 d, 不能进行快速检测, 且容易产生假阴性。因此, 血清学诊断方法常用于回顾性诊断, 不建议作为确诊依据^[11-12]。

分子生物学诊断技术自 1990 年首次用于 Hi 的鉴定后, 因其快速、敏感、特异、简单等优点, 受到国内外学者的广泛关注。目前已报道的分子生物学诊断 Hi 感染的方法有传统 PCR、巢式 PCR、多重 PCR、高分辨率溶解曲线等^[13]。NAKHJAVANI 等^[14]将 PCR 用于 Hi 的检测, 并与常规培养法和血清学方法比较, PCR 使检出率明显提高。理论上认为实时定量 PCR 较传统 PCR 更敏感, 并可实时监测, 实验过程中即可判断结果。实时定量 PCR 较巢式 PCR, 可以减少核酸污染问题, 操作更简便。实时定量 PCR 相较于多重 PCR, 用时更短, 实验条件更易优化, 敏感度更高。有研究显示, 以实时定量 PCR 为参考标准, 多重 PCR 的敏感度、特异度分别仅为 30.0%、75.0%^[15]。

COUGHLAN 等^[16]研究证实, fucK 基因是目前发现的 Hi 特异度、敏感度最高, 应用最广的基因。本研究针对 Hi 的 fucK 基因设计引物, 保障引物设计的合理性、可行性。相对于探针法, 染料法不需要设计特异性探针, 成本更低, 更简单。荧光定量 PCR 相对于常规分离培养和血清学诊断更加快速、简易。本方法可检测 Hi 基因拷贝数为 10 copy 的样品, 相较于商品试剂盒^[17], 其具有较高的敏感度, 且成本较低。采用几种不同常见细菌 DNA 标本, 验证其特异度, 本实验中几种病原不存在交叉反应, 具有良好的特异度。但所选用的特异性实验菌种较为有限, 在后续研究中, 还应选择更多的菌种进行实验, 对其特异度进一步的验证。完善和优化实验条件后, 226 份临床标本检出 Hi 阳性 92 份, 阳性率为 40.70%。其 PCR 阳性产物测序与 NCBI 已发布的 HI 菌株的基因序列比对, 准确率为 92.3%。

综上所述, 本研究中建立的实时定量 PCR 检测 Hi 的实验室诊断方法具有早期、快速、简便、灵敏的优势, 是 Hi 感染临床诊断、流行病学调查、混合感染判定的可行手段, 具有较高的推广应用价值。

参考文献

- [1] 王爱华. 流感嗜血杆菌感染与耐药[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2016, 31(4): 256-258.
- [2] 胡俊, 王晓蕾, 许峰, 等. 流感嗜血杆菌阳性住院患儿回顾性流行病学调查[J]. 中国当代儿科杂志, 2015, 17(6): 596-601.
- [3] 孟亚辉. 42 例确诊小儿社区获得性流感嗜血杆菌肺炎病临床分析[J]. 中国农村卫生, 2015, 8(12): 16-17.
- [4] RUDAN I, O'BRIEN K L, NAIR H, et al. Epidemiology and etiology of childhood pneumonia in 2010: estimates of incidence, severe morbidity, mortality, underlying risk factors and causative pathogens for 192 countries[J]. J Glob Health, 2013, 3(1): 010401.
- [5] FANG W, RAN L, YING S, et al. A pilot study of quantitative loop-mediated isothermal amplification-guided target therapies for hospital-acquired pneumonia[J]. Chin Med J, 2016, 129(2): 181-186.

(下转第 743 页)

[3] WANG H,SRIBASTAV S S, YE F, et al. Comparison of percutaneous vertebroplasty and balloon kyphoplasty for the treatment of single level vertebral compression fractures:a meta-analysis of the literature[J]. Pain Physician, 2015,18(3):209-222.

[4] ZHAO D H, CHEN K, ZHU J, et al. Postoperative functional evaluation of percutaneous vertebroplasty compared with percutaneous kyphoplasty for vertebral compression fractures[J]. Am J Ther, 2016,23(6):e1381-e1390.

[5] 邢润麟,张顺聪,梁德,等. 椎体成形术与椎体后凸成形术治疗骨质疏松性椎体压缩骨折术后伤椎再塌陷的对比研究[J]. 脊柱外科杂志, 2015,13(4):207-210.

[6] ZHOU J L, LIU S Q, MING J H, et al. Comparison of therapeutic effect between percutaneous vertebroplasty and kyphoplasty on vertebral compression fracture[J]. Chin J Traumatol, 2008,11(8):60007-60009.

[7] TAKURA T, YOSHIMATSU M, SUGIMORI H A, et al. Cost-Effectiveness analysis of percutaneous vertebroplasty for osteoporotic compression fractures [J]. Clin Spine Surg, 2017,30(3):E205-E210.

[8] BALKARLI H, KILIC M, BALKARLI A, et al. An evaluation of the functional and radiological results of percutaneous vertebroplasty versus conservative treatment for acute symptomatic osteoporotic spinal fractures[J]. Injury-Int J Care Injured, 2016,47(4):865-871.

[9] 李志钢,宋建东,李停,等. 局麻下单侧经皮椎体后凸成形术治疗骨质疏松性胸腰椎凹陷性骨折[J]. 生物骨科材料与临床研究, 2013,10(2):1672-5972.

[10] 唐一村,林本丹,林慰光,等. X 线片和 CT 影像对胸腰椎后方韧带复合体损伤的诊断意义[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2016,26(9):801-806.

[11] 柳超,刘建,王雷,等. 椎弓根螺钉短节段固定联合椎体成形术治疗单节段胸腰段骨质疏松性椎体爆裂骨折[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2013,23(4):347-351.

[12] WENG D H, JUN H T, CHUEN S T, et al. Subsequent vertebral fractures post cement augmentation of the thoracolumbar spine does it correlate with level-specific bone mineral density scores? [J]. Spine(Phila Pa 1976), 2015, 40(24):1903-1909.

[13] YOO C M, PARK K B, HWANG S H, et al. The analysis of patterns and risk factors of newly developed vertebral compression fractures after percutaneous vertebroplasty [J]. J Korean Neurosurg Soc, 2012,52(4):339-345.

[14] 张煜,张绍东. 椎体成形术后手术椎体再塌陷的危险因素[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2016,26(5):459-462.

[15] 许靖,黄胜,巫培康,等. 经皮椎体成形术后非手术椎体骨折的相关危险因素[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2014,24(1):63-67.

[16] SUGIE-OYA A, TAKAKURA A, TAKAO-KAWABATA R, et al. Comparison of treatment effects of teriparatide and the bisphosphonate rise dronate in an aged, osteopenic, ovariectomized rat model under various clinical conditions[J]. J Bone Miner Metab, 2016, 34(3):303-314.

(收稿日期:2017-08-30 修回日期:2017-12-16)

(上接第 739 页)

[6] 王宏. 流感嗜血杆菌肺炎的诊断[J]. 中外健康文摘, 2011,8(25):174-175.

[7] 陆伟桃,郭菁,邓晨晖,等. 探讨全自动快速微生物检测系统在鉴定流感嗜血杆菌的应用[J]. 检验医学与临床, 2016,13(7):944-945.

[8] 杨帅. b 型流感嗜血杆菌感染疾病流行病学及防治研究进展[J]. 中国病毒病杂志, 2009,11(6):465-468.

[9] 张建明,滕昆仑,卢勉飞,等. 不同动物血液对流感嗜血杆菌生长影响的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2016,26(17):2487-2489.

[10] 王明清,管娇琼,龙艺,等. b 型流感嗜血杆菌多糖间接竞争 ELISA 检测方法的建立[J]. 中国生物制品学杂志, 2015,28(6):623-627.

[11] 张莉滢,陈林,吴忠道. 流感嗜血杆菌 16S rRNA 和 p6 基因 PCR 检测结果比较[J]. 重庆医学, 2009,38(23):2960-2962.

[12] 周凯,李立群,徐飞,等. 小儿下呼吸道流感嗜血杆菌感染的血清分型及耐药分析[J]. 现代预防医学, 2016,43(4):643-645.

[13] PICKERING J, BINKS M J, BEISSBARTH J A, et al. A PCR-High-Resolution melt assay for rapid differentiation of nontypeable haemophilus influenzae and haemophilus haemolyticus[J]. J Clin Microbiol, 2014,52(2):663-667.

[14] NAKHJAVANI F A, HASHEMI F B, KALANI M T, et al. Detection of haemophilus influenzae type b in cerebrospinal fluid of suspected children with meningitis by pcr [J]. Med J Islamic Repub Iran, 2005,19(2):181-184.

[15] 丁振尧,李红微,郭美丽,等. 多重 PCR 检测浙江沿海地区儿童肺炎细菌性病原研究[J]. 中国微生态学杂志, 2014,26(1):46-50.

[16] COUGHLAN H, REDDINGTON K, TUI TE N, et al. Comparative genome analysis identifies novel nucleic acid diagnostic targets for use in the specific detection of Haemophilus influenzae[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2015,83(2):112-116.

[17] DE FILIPPIS I, DE ANDRADE C F, CALDEIRA N, et al. Comparison of PCR-based methods for the simultaneous detection of Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae, and Streptococcus pneumoniae in clinical samples[J]. Braz J Infect Dis, 2016,20(4):335-341.

(收稿日期:2017-08-18 修回日期:2017-12-15)