

RT-LAMP 与 RT-PCR 法快速检测脑脊液结核分枝杆菌的效果比较*

吴丹丹^{1,2}, 亢继文², 孙殿兴^{2△}

(1. 承德医学院, 河北承德 067000; 2. 解放军白求恩国际和平医院肝病传染科, 河北石家庄 050082)

摘要:目的 探讨逆转录(RT)-环介导等温扩增(RT-LAMP)法、RT-聚合酶链反应(PCR)法检测脑脊液结核分枝杆菌(MTB)的效果,为其快速诊断及临床药效评估提供依据。**方法** 选取 2015 年 12 月至 2017 年 4 月解放军白求恩国际和平医院就诊的 85 例患者脑脊液标本进行研究,并将其分为 TBM 组(46 例)、疑似 TBM 组(25 例)和对照组(16 例),根据结核分枝杆菌 16S rRNA 区段,设计特异性引物,建立 RT-LAMP 和 RT-PCR 检测技术体系,对两种方法的检测结果进行分析。**结果** TBM 组阳性检出率分别为 97.8% 和 75.0%,疑似 TBM 组阳性检出率分别为 76.0% 和 40.0%,对照组阳性检出率分别是 0.0% 和 12.0%,各组 RT-LAMP 法阳性检出率高于 RT-PCR 法,差异有统计学意义($P < 0.01$);对照组中,采用 RT-PCR 法检测时发现非特异性扩增,采用 RT-LAMP 法检测时未见非特异性扩增,RT-LAMP 法检测特异性强于 RT-PCR 法;RT-PCR 法检测灵敏度为 100 CFU/mL,高于 RT-LAMP 法的 1 CFU/mL。**结论** RT-LAMP 法检测 MTB 时具有简便、灵敏快速、可检测活菌特点,与 PCR 法比较,特异性强、操作简便、检测成本低、耗时短,有望成为基层、野战医疗单位及发展中国家等的常规检查工具。

关键词:结核性脑膜炎; 结核分枝杆菌; 逆转录-环介导等温扩增; 聚合酶链反应; 16S rRNA

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.03.019 中图分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2018)03-0322-05 文献标识码:A

Comparison of rapid detection effects of Mycobacterium tuberculosis in cerebrospinal fluid by RT-LAMP and RT-PCR*

WU Dandan^{1,2}, KANG Jiwen², SUN Dianxing^{2△}

(1. Chengde Medical University, Chengde, Hebei 067000, China; 2. Liver Disease and Infectious Diseases Department, Bethune International Peace Hospital of PLA, Shijiazhuang, Hebei 050082, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) method and RT-PCR method for detecting Mycobacterium tuberculosis (MTB) in cerebrospinal fluid (CSF) to provide a basis for its rapid diagnosis and clinical pharmacodynamic evaluation. **Methods** Eighty-five cases of CSF sample in the Bethune International Peace Hospital of PLA from December 2015 to April 2017 were selected for conducting the study and divided into the tuberculous meningitis (TBM) group (46 cases), suspected TBM group (25 cases) and control group (16 cases). The 16S rRNA region of MTB was used to design the specific primers. Then RT-LAMP and RT-PCR detection technological systems were established. Then the detection results by using the these two methods was analyzed. **Results** The positive detection rates of the TBM group were 97.8% and 75.0% respectively, which of the suspected TBM group were 76.0% and 40.0% respectively, and which of the control group were 0.0% and 12.0% respectively, the positive detection rate of each group in the RT-LAMP method was higher than that in the RT-PCR method, the difference was statistically significant ($P < 0.01$); in the control group, adopting RT-PCR detection found non-specific amplification, while which was not found by adopting RT-LAMP method, indicating that the specificity of RT-LAMP method was stronger than that of RT-PCR; the sensitivity of RT-PCR was 100 CFU/mL, which was higher than 1 CFU/mL of RT-LAMP. **Conclusion** RT-LAMP has the advantages of simpleness,

* 基金项目:全军医药卫生科研基金项目(CBJ14C010)。

作者简介:吴丹丹,女,在读研究生,主要从事病原体分子生物学研究。△ 通信作者, E-mail: sundianxing@hotmail.com。

本文引用格式:吴丹丹,亢继文,孙殿兴. RT-LAMP 与 RT-PCR 法快速检测脑脊液结核分枝杆菌的效果比较[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(6): 322-326.

sensitivity, rapidness and detecting viable bacteria, compared with PCR, which has strong specificity, easy operating, low cost and short time-consuming, is expected to be a routine detection tool of basic level and field medical institutions and developing countries.

Key words: tuberculous meningitis; *Mycobacterium tuberculosis*; reverse transcription-loop mediated isothermal amplification; polymerase chain reaction; 16S rRNA

结核性脑膜炎(TBM)是由结核分枝杆菌(MTB)引起的最严重的肺外结核病。TBM 病情发展迅速,具有高病死率、高致残率及高误诊率,预后与早期诊断和及时治疗密切相关。目前对 TBM 诊断主要依靠症状和脑脊液细胞、生化、常规等检查,其中病原学检测是诊断的“金标准”,2009 年国际结核病研究小组在南非确定 TBM 诊断金标准为:脑脊液抗酸染色阳性、脑脊液 MTB 培养阳性、聚合酶链反应(PCR)法检测到 MTB^[1]。由于脑脊液标本中 MTB 载菌量低,涂片法需抗酸杆菌标本浓度达每毫升 5 000~10 000 条菌以上才能检出^[2],其检测灵敏度低,另检测特异性差,当抗酸杆菌检测为阳性时,不能区分 MTB 与非结核分枝杆菌(NTM),亦不能区分死菌与活菌;培养法虽然精确可靠,但培养周期约为 4 周,极易错失最佳治疗时期,尽管 BACTEC MGIT 全自动快速培养系统能将培养时间缩短至 2 周左右,但费用较高,容易污染^[3-4],并且 MTB 与 NTM 均可以生长,其中 NTM 感染近年来呈明显上升趋势^[5-6],因此区分 MTB 与 NTM 越来越重要;PCR 法具有较好的灵敏度、特异度,但需要昂贵的仪器设备及较高的技术要求,限制了在发展中国家及基层医疗单位中的应用^[7]。2000 年环介导等温扩增(LAMP)法^[8]应运而生,其仅需 1 h,1 台水浴锅就可完成扩增,具有快速、简单的特点,最有希望成为资源紧缺的发展中国家及基层医疗单位的常规检测方法^[9-10]。LAMP 引物设计区段多选择 DNA 基因 IS1081、IS6110、gyrB 等位点^[11-12],IS6110 区段在分枝杆菌基因组上为 6~24 拷贝,成为选用最多的区段^[12],但以 DNA 为靶序列对死菌或活菌都呈现阳性结果,无法在临床上评估抗结核治疗效果,容易出现假阳性,而结核分枝杆菌 16S rRNA,因参与生命活动,半衰期短,仅存在于代谢增殖的活菌中,拷贝数约为 10³ 拷贝,约为 IS6110 拷贝 100 倍^[12],因此选择选择 16S rRNA 区段设计引物,进行逆转录(RT)-LAMP 法,不仅能提高灵敏性,还有助于判断活菌的存在。本研究选用 16S rRNA 区段对 MTB 进行 RT-LAMP、RT-PCR 扩增,并以 RT-PCR 为金标准,评价 RT-LAMP 法的检测效果。

1 资料和方法

1.1 标本来源 选取 2015 年 12 月至 2017 年 4 月解放军白求恩国际和平医院就诊的 85 例患者脑脊液标

本进行研究,年龄 1~80 岁,男女比例约 2:1,并将其分为 3 组,其中以脑脊液显微镜法或培养法或 PCR 法等确诊的 TBM 组 46 例,临床症状、脑脊液化验符合但未找到 MTB 的疑似 TBM 组 25 例,排除 TBM 并确诊为病毒性脑膜炎、细菌性脑膜炎等的对照组 16 例。

1.2 仪器与试剂 RNA 提取试剂盒(RNeasy Mini Kit)购自德国 Qiagen 公司, FastKing One Step RT-PCR 试剂盒购自北京 Tiangen 公司。

1.3 标本处理 按常规腰穿留取脑脊液 1 mL,加入 2 mL RNA 酶抑制剂,置于-80 °C 冰箱冷冻保存,用于统一提取 MTB RNA,提取时根据试剂盒提示加入 DNase I 进行处理。

1.4 引物设计 从 NCBI 网站下载 MTB 与常见 NTM 的 16S rRNA 全序列,用 Clustal 工具进行序列对比,确定特异引物区,并通过 Blast 验证其特异性。MTB 引物参考序列(Genbank 号:NR_102810.1),引物序列见表 1,表中 F3 和 B3 为 RT-LAMP 外引物, FIP 和 BIP 为 RT-LAMP 内引物,其中内引物由两段相邻的正义和反义序列组成。FIP 由 F1c(F1 的互补区段)和 F2 组成, BIP 由 B1c(B1 的互补区段)和 B2 组成, F 和 R 为 RT-PCR 上下游引物。

1.5 RT-LAMP 及 RT-PCR 反应体系 25 μL RT-LAMP 体系:1.6 μmol/L 内引物(FIP 和 BIP)、0.2 μmol/L 外引物(F3 和 B3)、0.8 μmol/L 环引物(LB)、0.8 mol/L 甜菜碱、8 mmol/L 硫酸镁、1.4 mmol/L 三磷酸脱氧核糖核苷、8 U Bst DNA 聚合酶、20 U 重组核糖核酸酶抑制剂、100 U M-MLV 反转录酶、2.5 μL 10×缓冲液、1 μL 模板 RNA,最后加入 1 μL 钙黄绿素和氯化锰混合液(浓度分别 0.5 mmol/L 和 6 mmol/L),用去离子水补足 25 μL,同时用未加入模板的体系作为阴性对照,将反应管置于 60 °C 恒温水浴箱内反应 50 min,然后 90 °C 2 min 终止反应。扩增完成后,见到体系变绿色视为阳性,保持淡橙色视为阴性,并取扩增产物 5 μL,在凝胶中电泳约 25 min 以验证结果,阳性可见梯形特异性条带。50 μL RT-PCR 反应体系:2×FastKing One Step RT-PCR 25 μL、25×RT-PCR 酶混合物 2 μL、上游引物 F 1.25 μL、下游引物 R 1.25 μL、RNA 模板 1 μL、无核糖核酸酶的 ddH₂O 补充体积至 50 μL,在 42 °C 30 min 进

行逆转录,95 °C 保持 3 min 预变性,然后是 94 °C 30 s、55 °C 30 s、72 °C 30 s、40 个热循环步骤,最后 72 °C 延伸 5 min,通过 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

表 1 RT-LAMP 和 RT-PCR 引物及基因位点

名称	序列(5'→3')	长度(bp)	基因位点
F3	TCC TGG CTC AGG ACG AAC	18	20~37
B3	CGC TTT CCA CCA CAA GAC AT	20	192~211
FIP(F1c+F2)	TCG CCA CTC GAG TAT CTC CGA A-GC GGC GTG CTT AAC ACA T	40	82~103 和 42~59
BIP(B1c+B2)	AGT AAC ACG TGG GTG ATC TGC C-AT CCC GTG GTC CTA TCC G	40	111~132 和 172~189
LB	CCT GGG AAA CTG GGT CTA ATA C	22	150~171
F	TGC ATG TCT TGT GGT GGA AAG	21	89~109
R	TGC AAT ATT CCC CAC TGC TG	20	251~270

表 2 RT-LAMP 法和 RT-PCR 法检出情况

组别	n	RT-LAMP 法			RT-PCR 法		
		阳性(n)	阴性(n)	阳性率(%)	阳性(n)	阴性(n)	阳性率(%)
TBM 组	45	44	1	97.8	34	11	75.0
疑似 TBM 组	25	19	6	76.0	10	15	40.0
对照组	16	0	16	0.0	2	14	12.0

1.6 灵敏度和特异性检测 以 H37Rv 细菌纯培养物经平板计数,原始菌液浓度为 1×10^6 CFU /mL,取 10 倍倍比稀释菌液提取 RNA 后分别进行 RT-LAMP 法和 RT-PCR 法的灵敏度检测。用中枢系统感染的其他病原体为模板验证其引物特异性,RT-LAMP 产物采用限制性内切酶 Xho I 进行酶切鉴定,30 μ L 酶切体系如下:RT-LAMP 产物 3 μ L、Q. CUT. 10 \times buffer 3 μ L、Xho I 1 μ L,去离子水补足 23 μ L,37 °C 反应 1 h。酶切产物用 2.0% 琼脂糖凝胶进行电泳。

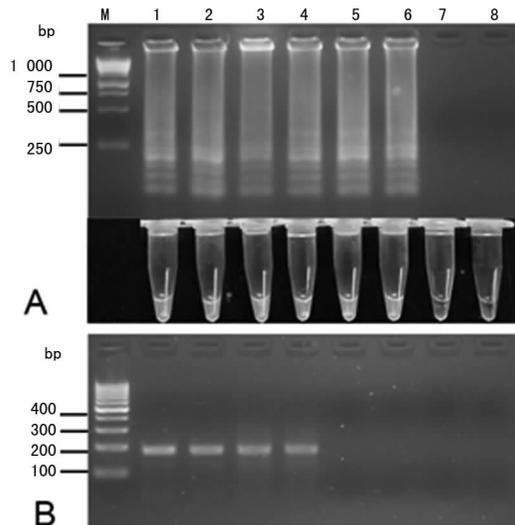
1.7 统计学处理 采用 SPSS21.0 软件进行统计学处理,计数资料以百分率或频数表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 RT-LAMP 法和 RT-PCR 法检出情况比较 TBM 组阳性检出率分别为 97.8% 和 75.0%,疑似 TBM 组阳性检出率分别为 76.0% 和 40.0%,对照组阳性检出率分别是 0.0% 和 12.0%,各组 RT-LAMP 法阳性检出率高于 RT-PCR 法,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 1、2。

2.2 RT-LAMP 法和 RT-PCR 法检测灵敏度比较 RT-LAMP 法检测灵敏度为 1 CFU /mL;RT-PCR 法检测灵敏度为 100 CFU /mL,为 RT-PCR 法的 100

倍,见图 1。



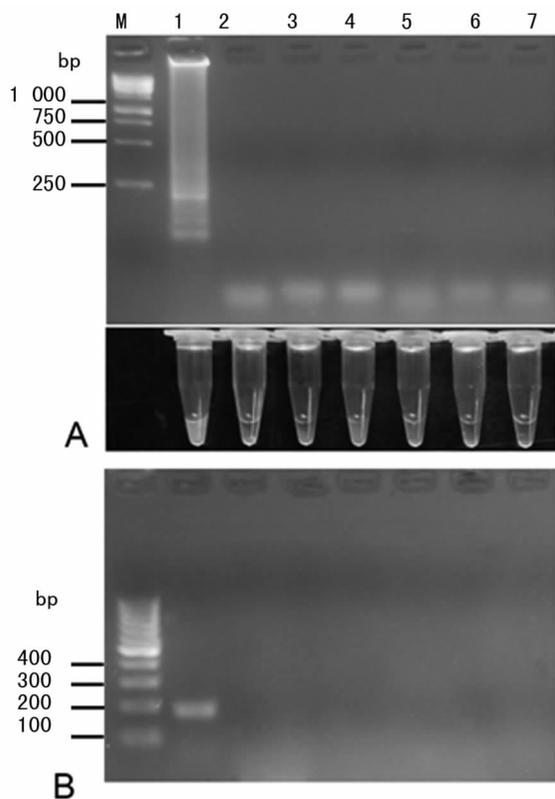
注:A 为 RT-LAMP 凝胶电泳及钙黄绿素染色图;M 为 DNA 标记物;B 为 RT-PCR 凝胶电泳图;泳道 1~7 分别为 1.0×10^5 、 1.0×10^4 、 1.0×10^3 、 1.0×10^2 、 1.0×10^1 、 1.0×10^0 、 1.0×10^{-1} CFU/mL,8 为阴性对照

图 1 RT-LAMP 法和 RT-PCR 法检测灵敏度比较

2.3 RT-LAMP 法和 RT-PCR 法检测特异性比较 RT-LAMP 法与 RT-PCR 法均能特异性地扩增出 MTB,而脑脊液常见细菌、真菌、病毒感染未扩增出特异性条带。RT-LAMP 与 RT-PCR 引物均有较强的特异性,见图 2。

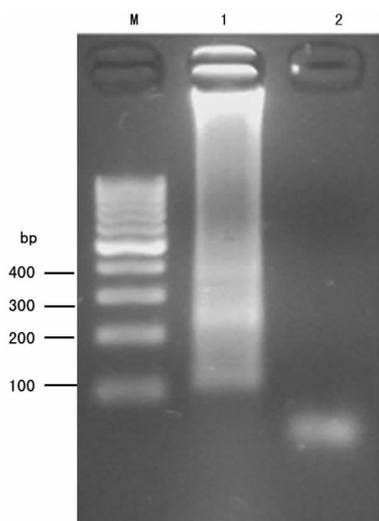
表 3 RT-LAMP 法和 RT-PCR 法检测结果比较 (n)

RT-LAMP 法	RT-PCR 法		χ^2	P
	+	-		
+	44	17	10.32	<0.01
-	2	23		



注: A 为 RT-LAMP 凝胶电泳及钙黄绿素染色图; M 为 DNA 标记物; B 为 RT-PCR 凝胶电泳图; 泳道 1~7 分别为 MTB 性脑脊液、奈瑟菌性脑脊液、肺炎球菌性脑脊液、新型隐球菌性脑脊液、柯萨奇病毒性脑脊液、EB 病毒性脑脊液和阴性对照

图 2 RT-LAMP 法与 RT-PCR 法检测特异性比较



注: M 为 100 bp DNA 标记物, 泳道 1 为酶切前, 泳道 2 为酶切后

图 3 RT-LAMP 酶切实验

2.4 酶切实验结果 为确定 RT-LAMP 产物为

MTB 特异性产物, 对阳性产物进行特异性酶切鉴定。经计算, RT-LAMP 产物为 192 kb, 经 Xho I 酶切成大小约为 80 kb 的片段, 酶切后出现与预期大小相符的条带, 见图 3。

3 讨 论

TBM 是由 MTB 引起的脑膜和脊膜的非化脓性炎症性疾病, 因血脑屏障作用, 其在脑脊液中的含量很少, 难以被一般检测方法检测到, 而 TBM 临床表现又缺乏特异性, 因此 TBM 早期诊断困难, 但若不及时诊断及治疗会造成严重的神经系统损伤甚至死亡。据 WHO 报道, 2015 年全球估算有 1 040 万结核病发病患者, 而中国、印度和印尼占全球发病人数的前三, 因此迫切需要快速、简便、灵敏、可靠的病原微生物学检验方法, LAMP 正好满足上述要求, 它不像 PCR 法一样需要专门设备, 如热循环仪、电泳仪等, 只需要水浴锅或小热量提供的简单的恒温装置即可, 在 1 h 内就能完成扩增, 结果肉眼可见, 更适用于医疗资源不足的发展中国家。2016 年 8 月 11 日, 世界卫生组织于在日内瓦发布了一份最新的推荐书, 推荐发展中国家的基础医疗单位使用新的结核病检测方法 TB-LAMP, 这种方法可以替代涂片法。但传统 LAMP 法多采用 TB-DNA 为靶基因进行扩增, 因 DNA 为双链结构, 不易被降解, 易造成污染, 且反应对死菌、活菌都呈现阳性结果, 故不能鉴别是潜伏性结核还是活动性结核, 亦不能评估临床抗结核疗效。JOON 等^[13]的试验以 IS6110 为靶序列进行扩增, 其灵敏度和特异度分别为 94.4% 和 97.2%, 但是因死菌也呈阳性结果, 该试验不能评估病情程度, 还需要进一步做培养鉴定。如果针对活菌中存在的 16S rRNA 进行扩增, 那就可以集 TB-LAMP 法与培养法优点于一身。本研究以 rRNA 为靶基因进行扩增, 结果显示, RT-LAMP 法检测灵敏度为 1 CFU/mL, 是 RT-PCR 的 100 倍; RT-LAMP 法对于可疑 MTB 的检出率为 76%, 高于 RT-PCR 法的 40%, 差异有统计学意义 (P<0.05)。这表明 16S rRNA 因拷贝量大具有较高的灵敏度, 在临床上对高度怀疑为 TBM 患者的诊断具有一定价值。

本研究结果显示, TBM 组采用 RT-LAMP 法检测时, 检出 1 例阴性, 后鉴定为 NTM 性脑膜炎; 对照组采用 RT-PCR 法检出 2 例阳性, 考虑为非特异性扩增引起。这表明 RT-LAMP 的内引物为 8 个不同的靶基因区, 显示了更强的特异性。近年来, 各国家学者对 LAMP 的研究不断深入, 如: 茎引物或环引物的加入更是提高了它的灵敏度, 并缩短了反应所需时间^[14]; 有学者在茎引物与环引物之间加入群引物, 使反应时间缩短到 15 min, 并且进一步提高了灵敏

度^[15];多重 LAMP 的应用不仅提高了效率还节约了成本。2013 年,LIU 等^[16]应用微流控芯片同时检测 10 个 MTB 样品,集 DNA 提取、反应、鉴定产物为一体,整个过程只需要 50 min,检测极限为 10 个菌,灵敏度、特异度分别为 96%、100%。如果提取 RNA 进行反应,会有更高的灵敏性,但 LAMP 容易发生气溶胶污染,易出现假阳性,不过可以通过规范的操作和处理来避免,如将加样区和电泳区进行隔离,经常清洗操作台,使用带滤嘴的枪头,样品反应前在 EP 管内加微量石蜡油隔离空气或者加入尿嘧啶糖基化酶(UNG、UDG)降解扩增产物防污染等。

综上所述,RT-LAMP 法检测 MTB 时具有简便、灵敏快速、可检测活菌特点,与 PCR 法比较,特异性强、操作简便、检测成本低、耗时短,有望成为基层、野战医疗单位及发展中国家等的常规检查工具。

参考文献

- [1] MARAIS S, THWAITES G, SCHOEMAN J F, et al. Tuberculous meningitis: a uniform case definition for use in clinical research[J]. *Lancet Infect Dis*, 2010, 10(11): 803-812.
- [2] MODI M, SHARMA K, SHARMA M, et al. Multitargeted loop-mediated isothermal amplification for rapid diagnosis of tuberculous meningitis[J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2016, 20(5): 625-630.
- [3] BRUM C B, RAMOS D F, ABILLEIRA F S, et al. The BACTEC MGIT(tm) 320 system as a laboratory tool to diagnose tuberculosis in a Brazilian hospital with a high prevalence of HIV infection[J]. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2016, 49(1): 112-114.
- [4] MOKADDAS E, AHMAD S, ELDEEN H S, et al. Discordance between xpert MTB/RIF assay and bactec MGIT 960 culture system for detection of rifampin-resistant mycobacterium tuberculosis isolates in a country with a low tuberculosis (TB) incidence[J]. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(4): 1351-1354.
- [5] YU X, LIU P, LIU G, et al. The prevalence of non-tuberculous mycobacterial infections in mainland China: Systematic review and meta-analysis[J]. *J Infect Dis*, 2016, 73(6): 558-567.
- [6] YUSTE J R, BERTO J, DEL POZO J L, et al. Prolonged use of tedizolid in a pulmonary non-tuberculous mycobacterial infection after linezolid-induced toxicity[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2017, 72(2): 625-628.
- [7] KOUZAKI Y, MAEDA T, SASAKI H, et al. A simple and rapid identification method for mycobacterium bovis BCG with loop-mediated isothermal amplification [J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0133759.
- [8] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. *Nucleic Acids Res Suppl*, 2000, 28(12): E63.
- [9] SHARMA K, SHARMA M, BATRA N, et al. Diagnostic potential of multi-targeted LAMP (loop-mediated isothermal amplification) for osteoarticular tuberculosis [J]. *J Orthop Res*, 2017, 35(2): 361-365.
- [10] YIN X M, WU L J, ZHENG L, et al. Quantification of colony-forming units for M. tuberculosis complex using gyrB-based real-time PCR assay[J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2016, 20(7): 967-972.
- [11] YANG B, WANG X, LI H, et al. Comparison of loop-mediated isothermal amplification and real-time PCR for the diagnosis of tuberculous pleurisy[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2011, 53(5): 525-531.
- [12] CHOI Y, HONG S R, JEON B Y, et al. Conventional and real-time PCR targeting 16S ribosomal RNA for the detection of Mycobacterium tuberculosis complex[J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2015, 19(9): 1102-1108.
- [13] JOON D, NIMESH M, VARMA-BASIL M, et al. Evaluation of improved IS6110 LAMP assay for diagnosis of pulmonary and extra pulmonary tuberculosis[J]. *J Microbiol Methods*, 2017, 139(5): 87-91.
- [14] GANDELMAN O, JACKSON R, KIDDLE G, et al. Loop-mediated amplification accelerated by stem primers[J]. *Int J Mol Sci*, 2011, 12(12): 9108-9124.
- [15] MARTINEAU R L, MURRAY S A, CI S, et al. Improved performance of loop-mediated isothermal amplification assays via swarm priming[J]. *Anal Chem*, 2017, 89(1): 625-632.
- [16] LIU D, LIANG G, ZHANG Q, et al. Detection of mycobacterium tuberculosis using a capillary-array microsystem with integrated DNA extraction, loop-mediated isothermal amplification, and fluorescence detection[J]. *Anal Chem*, 2013, 85(9): 4698.

(收稿日期:2017-06-07 修回日期:2017-09-07)