

论著 · 临床研究

环介导等温扩增快速可视化检测 B 族链球菌的应用研究*

王 行¹,汪 骅²,张 立¹

(1. 上海市普陀区人民医院检验科,上海 200060;2. 上海交通大学医学院附属仁济医院检验科,上海 200120)

摘 要:**目的** 建立环介导等温扩增(LAMP)快速检测 B 族链球菌(GBS)的方法并探讨此方法在临床诊断中的应用价值。**方法** 培养 GBS,提取病原体 DNA,设计 GBS 16S-23S rRNA 基因间隔区 LAMP 引物,优化并建立 LAMP 检测 GBS 的方法。分析 LAMP 法检测 GBS DNA 灵敏度,并与聚合酶链反应(PCR)法进行对比。分析 LAMP 法检测 GBS DNA 的特异度。**结果** LAMP 法可在 1 h 内实现 GBS DNA 的可视化检测,检测限为 20 fg,灵敏度高于 PCR 法(200 fg)。LAMP 法检测 50 例经 PCR 法确诊的 GBS 感染的临床样本,结果均为阳性,凝固酶阴性葡萄球菌、大肠埃希菌、淋病奈瑟菌、白色念珠菌的检测结果均为阴性。**结论** LAMP 检测 GBS 快速、简便、灵敏度高且特异度强,检测不需任何设备,借助荧光笔肉眼直接判读,有望成为社区及基层医院广泛开展的新方法。

关键词:环介导等温扩增; 可视化检测; B 族链球菌
DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2018. 19. 008 **中图法分类号:**R440
文章编号:1673-4130(2018)19-2366-04 **文献标识码:**A

A loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid visualization detection of group B streptococcus*

WANG Xing¹,WANG Hua²,ZHANG Li¹

(1. *Department of Clinical Laboratory, Putuo District People's Hospital, Shanghai 200060, China;*
2. *Department of Clinical Laboratory, Renji Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200120, China*)

Abstract: Objective To establish a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the rapid visualization detection of group B streptococcus and application prospect of this method was discussed. **Methods** Culture of B-group streptococcus and extraction of pathogen DNA. With the 16S-23S rRNA intergenic spacers as targets, four sets of LAMP primers were designed for identification group B streptococcus. Group B streptococcus DNA was used to determine the sensitivity and specificity of this method compared to PCR method. **Results** GBS DNA amplification was detected within 1h. The detection limit of LAMP method was 20 fg DNA template per reaction. The sensitivity of LAMP was 10 times compared with conventional PCR. The LMAP assays were then validated by analysis with samples from 50 GBS patients who had previously been analyzed via PCR. The results from the LMAP assay were in perfect agreement with PCR method. **Conclusion** LAMP assay can be used as a sensitive, rapid, and simple detection tool for the visualization detection of group B streptococcus. The methods do not require any additional user interaction is ideal for use of portable microfluidic platforms doctor's offices in the field or at the bed-side.

Key words: loop-mediated isothermal amplification; visualization detection; group B streptococcus

自 1938 年 FRY^[1]首次证实 B 族链球菌(GBS)为人类的致病菌以来,经过几十年的研究,发现 GBS 可引起新生儿败血症、肺炎、脑膜炎,甚至死亡。感染后存活的新生儿,还有可能有严重的神经系统后遗症,包括脑积水、智力障碍、小头畸形、耳聋等^[2]。同时,GBS 还可引起孕妇感染,引起早产、胎儿发育不良(低

体质量儿)、胎膜早破及晚期流产^[3-5]。目前 GBS 被认为是围产期严重感染性疾病的主要病原菌。GBS 从直肠或者阴道黏膜部位可上行进入子宫引起胎儿的宫内感染;在分娩的过程中,新生儿经过母体 GBS 污染的产道,而获得感染。细菌可入侵新生儿血液引起肺炎、败血症、脑膜炎等严重侵袭性感染。具有发

* 基金项目:上海市普陀区人民医院院级课题(2015Rm101)。
作者简介:王行,女,主管技师,主要从事分子生物学方面研究。
本文引用格式:王行,汪骅,张立. 环介导等温扩增快速可视化检测 B 族链球菌的应用研究[J]. 国际检验医学杂志,2018,39(19):2366-2368.

病率、病死率、致残率都高的特点^[6-9],严重危害妊娠妇女及新生儿的健康。

检测 GBS 有助于临床对上述疾病的诊断和治疗。目前传统的培养法是诊断 GBS 感染的“金标准”,然而此法耗时长,48 h 以上 GBS 培养难度高,灵敏度低。免疫学检测方法操作简单,但需培养后进行,时间长,灵敏度低。微生物自动分析鉴定系统具有全面、自动化的特点,但检测时间长,成本高,设备昂贵。荧光 PCR 法检测 GBS 具有灵敏度高,特异度好的特点,已成为临床快速诊断的重要手段。但 PCR 技术需依赖特定设备和仪器,需要专门的人员进行操作,无法在基层的实验室广泛开展。因此,目前亟须建立操作简单、快速、灵敏度高、特异性强且适用于基层单位广泛开展的 GBS 检测方法。环介导等温扩增(LAMP)是一种不同于常规聚合酶链反应(PCR)的体外核酸基因扩增新技术。LAMP 主要利用两对或三对特异性引物和具有链置换活性的 Bst DNA 聚合酶,在恒温条件下的连续快速扩增。此技术可以在 1 h 内扩增出 10⁹~10¹⁰ 倍靶序列拷贝,具有更高的灵敏度、特异性和扩增效率^[10]。目前 LAMP 已应用于肿瘤基因检测^[11-12]、结核分枝杆菌^[13]及病毒^[14]的快速检测。本研究拟建立环介导等温扩增快速检测 GBS 的方法并探讨此法在临床应用中的价值。

1 材料与方法

1.1 材料 Loopamp® DNA 扩增试剂盒和 LAMP 法荧光检测试剂盒购于日本荣研公司。临床分离 1 株 GBS 和凝固酶阴性葡萄球菌、大肠埃希菌、淋病奈瑟菌、白色念珠菌各 1 株。

1.2 方法

1.2.1 GBS 培养 临床分离菌株 GBS 在 THB GBS 选择性培养基上培养。

1.2.2 引物设计 采用 Primer Explorer Version 5 软件,根据 GBS 16S-23S rRNA 基因间隔区基因设计 LAMP 引物(GenBank:DQ204552.1),委托上海生工生物工程有限公司合成。引物序列如表 1 所示。

表 1 GBS 16S-23S rRNA 基因间隔区 LAMP 引物 DNA 序列

引物	序列(5'~3')	片段大小(bp)
F3	AGT TTT GAG AGG TCT TGT G	19
B3	GTT TCT TTA AAC TAG AAA ACT CA	23
FIP	TAT GGA GCC TAG CGG GAT CGC TTA GCT CAG CTG GGA GA	38
BIP	ATA TCA AAT TCC ACG ATC TCG TTT TCG GTT TAT TTT CTT GTT	42

1.2.3 DNA 提取 将生殖道拭子样本转移到 1.5 mL 离心管(1 mL 保存液),30 000 r/min 离心 15 min,弃上清,根据 AllPrep® DNA Mini Kit 试剂盒(美国天根公司)说明书进行 DNA 提取。

1.2.4 LAMP 反应 使用去离子双蒸水溶解引物至如下工作浓度:F3(5 μmol/L),B3(5 μmol/L),FIP(40 μmol/L),BIP(40 μmol/L)。反应体系 25 μL:2×反应缓冲液(RM),12.5 μL;F3、B3、FIP、BIP 各 1 μL;Bst DNA 聚合酶 1 μL;钙黄绿素(FD)1 μL,去离子水 4.5 μL,DNA 2 μL。使用浊度基因检测仪 LA-500 进行实时检测(63 ℃,1 h)。在紫外荧光笔的照射下,根据反应试管是否有可视化绿色荧光判断阳性结果。

1.2.5 LAMP 产物琼脂糖凝胶电泳 取 5 μL LAMP 产物与 2 μL Loading Buffer 混合,加入电泳胶加样孔。依次加完所有 LAMP 产物后,接着新的加样孔内加入标志物,盖上电泳槽的上盖,电压调至恒压 110 V。30 min 后即可上凝胶电泳成像仪,观察电泳结果。

1.2.6 PCR 反应 GBS 16S-23S rRNA DNA 检测的引物序列为:前引物 F2:5'-CTT AGC TCA GCT GGG AGA-3';后引物 B2:5'-CGT TTT CGG TTT ATT TTC TTG TT-3'。

使用 PRISM 9700 基因扩增仪,降落 PCR(touchdown PCR)进行条件优化:94 ℃预变性 2 min;10 次循环:94 ℃ 15 s,94~62 ℃ 30 s(每 1 次循环降低 1 ℃)。进一步 PCR 反应,30 次循环:92 ℃ 15 s,62 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s。

1.2.7 LAMP 灵敏度分析 GBS 基因组 DNA 稀释到 20 ng/μL,NanoDrop 1000 微量紫外可见分光光度计(美国 Thermo Scientific 公司),配置 2×10⁶ fg,2×10⁴ fg,2×10² fg,2×10 fg,和 2 fg 的 GBS DNA 为标准品。分别采用 LAMP 和 PCR 法检测上述标准品,以评估 LAMP 法的灵敏度。

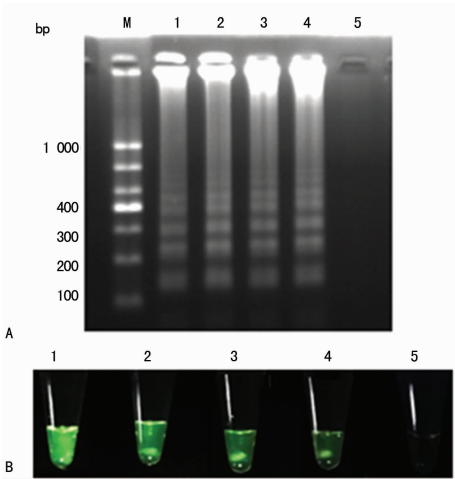
1.2.8 特异度分析 采用 AllPrep®DNA Mini Kit 试剂盒提取淋病奈瑟菌,凝固酶阴性葡萄球菌,白色念珠菌及大肠埃希菌,50 例经临床确诊为 GBS(PCR 法检测)的女性尿道分泌物拭子 DNA。每份 DNA 样本稀释到 10 ng/μL,取 2 μL 进行 LAMP 反应。

2 结果

2.1 LAMP 检测 Mg 的灵敏度分析 以系列稀释的 GBS DNA 标准品为检测模板进行 LAMP 反应,LAMP 反应产物琼脂糖凝胶电泳结果及相应的可视化检测结果见图 1。1~5 分别为 2×10⁶ fg,2×10⁴ fg,2×10² fg,20 fg,和 2 fg GBS DNA LAMP 反应结果。采用 PCR 法检测 GBS DNA 标准品,检出限为 200 fg,见图 2。

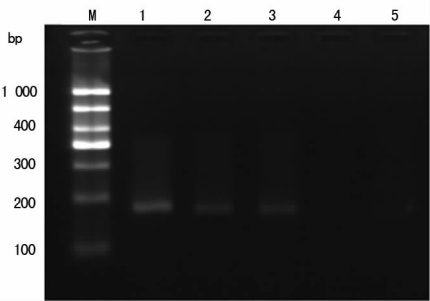
2.2 LAMP 检测 GBS 的特异性分析 LAMP 法检测 50 例 GBS 感染的的女性尿道分泌物拭子样本结果均为阳性,淋病奈瑟菌,凝固酶阴性葡萄球菌,白色念珠菌及大肠埃希菌 DNA 的 LAMP 反应均为阴性。图 3A 为 GBS,淋病奈瑟菌,凝固酶阴性葡萄球菌,白

色念珠菌及大肠埃希菌 DNA 的 LAMP 反的 LAMP 反应结果,图 3B 分别为上述病原体 DNA LAMP 产物的琼脂糖凝胶电泳结果。



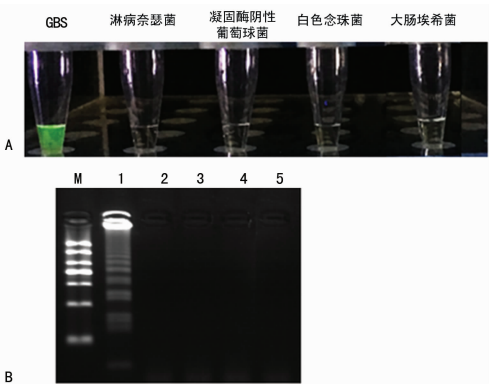
注:GBS DNA 1~5 样本浓度分别为 2×10^6 fg、 2×10^4 fg、 2×10^2 fg、20 fg、2 fg;M 为 1 000 bp 标志物

图 1 琼脂糖凝胶电泳分析 GBS DNA LAMP 产物



注:GBS DNA 1~5 样本浓度分别为 2×10^6 fg、 2×10^4 fg、 2×10^2 fg、20 fg、2 fg;M 为 1 000 bp 标志物

图 2 琼脂糖凝胶电泳分析生殖支原体 DNA PCR 产物



注:A 为 DNA LAMP 检测结果;B 1~5 分别为琼脂糖凝胶电泳检测 GBS、淋病奈瑟菌、凝固酶阴性葡萄球菌、白色念珠菌及大肠埃希菌 DNA LAMP 产物

图 3 LAMP 检测 GBS 的特异性分析

3 讨 论

LAMP 技术利用两对或三对特殊设计的引物和具有链置换活性的 Bst DNA 聚合酶,在恒温条件下快速实现基因扩增。此技术与传统的 PCR 相比较具有更高的灵敏度和扩增效率。本研究建立 LAMP 检

测 GBS 的方法,快速、方便且不需特殊检测设备,可检测到 20 fg 的 Mg DNA,检测灵敏度高于传统的 PCR 技术(200 fg),与以往研究报道一致^[13]。本研究建立的方法检测了 50 例经确诊的 GBS 感染的临床样本,结果均为 GBS DNA LAMP 反应阳性,对淋病奈瑟菌,凝固酶阴性葡萄球菌,白色念珠菌及大肠埃希菌的检测结果均为阴性,显示此方法具有高特异度。

目前国外对于孕妇是否进行抗菌药物预防一般采用两种评估策略:基于风险评定的策略和基于 GBS 筛检的策略。通过对比两种不同策略实施效果达成共识:采用对 GBS 进行常规筛检策略比通过风险评定策略更能有效的降低婴儿早期侵入性感染的发生率。目前亟须建立适用于基层单位广泛开展的 GBS 检测方法。本研究选择钙黄绿素作为荧光指示剂,反应前加入 LAMP 反应体系,一步反应后无需开盖,1 h 内可直接肉眼准确判断反应结果。

4 结 论

LAMP 方法快速、简便,灵敏度高,特异度强且结果检测不需任何设备,可肉眼直接判断,可望成为社区及基层医院广泛开展 GBS 检测的新方法。

参考文献

- [1] FRY R M. Fatal infections by hemolytic streptococcus group B[J]. Lancet,1938,20(1):199-201.
- [2] BIANCO A,LAROSA E,PILEGGI C,et al. Collaborative working group: appropriateness of Intrapartum antibiotic prophylaxis to prevent neonatal group B streptococcus disease [J]. PLoS One,2016,11(11):e0166179.
- [3] CHANG F W,LEE C I,FAN H C,et al. The impact of prenatal group B streptococcus screening as a national health policy in Taiwan [J]. Taiwan J Obstet Gynecol, 2017,56(5):648-651.
- [4] CHO C Y,TANG Y H,CHEN Y H,et al. Group B streptococcal infection in neonates and colonization in pregnant women: an epidemiological retrospective analysis [J]. J Microbiol Immunol Infect,2017,17(1):30185-30188.
- [5] SINHA A,RUSSELL L B,TOMCZYK S,et al. GBS vaccine cost-effectiveness analysis in sub-saharan africa working group:disease burden of group B streptococcus among infants in sub-saharan africa:a systematic literature review and meta-analysis [J]. Pediatr Infect Dis J,2016,35(9):933-942.
- [6] RAIGNOUX J,BENARD M,HUO YUNG KAI S,et al. Is rapid intrapartum vaginal screening test of group B streptococci (GBS) during partum useful in identifying infants developing early-onset GBS sepsis in postpartum period[J]. Arch Pediatr,2016,23(9):899-907.
- [7] SCHRAG S J,VERANI J R. Intrapartum antibiotic prophylaxis for the prevention of perinatal group B streptococcal disease:experience in the United States and implications for a potential group B streptococcal vaccine [J]. Vaccine,2013,31(4):20-26.

sTREM-1 水平之间均呈正相关,说明之间有着良好的相关性。

4 结 论

重症肺炎患者病原菌分布以革兰阴性菌为主,观察血清 PCT、CRP、RAGE、sTREM-1 水平能够利于疾病鉴别,评估其进展程度。

参考文献

[1] CLARKE L, SANCHEZ S, BLAS-MACHADO U, et al. Pathology in practice, severe, acute, lobar and diffuse necropsuppurative pneumonia[J]. J Am Vet Med Assoc, 2017, 251(5): 535-537.

[2] BAHCECI ERDEM S, NACAROGLU H T, ISGUDER R, et al. Pulmonary complications of chemical pneumonia: a case report[J]. Arch Argent Pediatr, 2017, 115(4): 245-248.

[3] 王新卫, 刘新年, 刘芳. 272 例老年重症肺炎患者感染病原菌分布及死亡危险因素分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2016, 11(9): 841-844.

[4] DJAKOVIC T, RIBEIRO D, BROSSARD C, et al. Eosinophilic pneumonia, how to differentiate, classification and diagnostic approach[J]. Rev Med Suisse, 2016, 12(539): 1958-1965.

[5] 陈小龙, 郝琴, 薛乐, 等. PA 及 WBC 对重症肺炎的诊断价值[J]. 检验医学与临床, 2017, 14(6): 865-867.

[6] 孙印, 韦海燕, 何士杰. 重症肺炎患者血清 suPAR、sTREM-1 水平变化及意义[J]. 山东医药, 2017, 57(22): 59-60.

[7] 叶任高, 陆再英. 内科学[M]. 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 1025-1030.

[8] 尚红, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2015.

[9] VASCHETTO R, CLEMENTE N, PAGNI A, et al. A double blind randomized experimental study on the use of IgM-enriched polyclonal immunoglobulins in an animal model of pneumonia developing shock[J]. Immunobiology, 2017, 222

(12): 1074-1080.

[10] 刘静华. 动态血清降钙素、CRP 与重症社区获得性肺炎发生、发展及预后的关系[J]. 中国实验诊断学, 2014, 18(2): 213-216.

[11] 曹军, 郭珊, 王丽华, 等. 重症肺炎患者病原菌分布与 C-反应蛋白和白细胞介素-6 及白细胞介素-10 的变化研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(11): 2434-2437.

[12] 郭霞, 喻昌利, 安庆丽, 等. 老年重症肺炎患者病原学分布及预后危险因素分析[J]. 广东医学, 2016, 37(6): 873-875.

[13] 黄鹏, 黄寨, 秦文波, 等. 老年重症肺炎患者的病原学分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2015, 25(15): 3411-3413.

[14] 倪高顺, 谢永红, 吴凤琴, 等. 重症肺炎患者 PCT、WBC、CRP 水平与预后的相关性分析[J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(32): 6334-6337.

[15] 陈琼, 凌文通, 韩慧, 等. 重症肺炎患者 BALF 和血清 IL-6、PCT 水平变化及其意义研究[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(21): 3053-3054.

[16] 陆光兵. 降钙素原对老年重症肺炎患者 30d 病死率的影响[J]. 检验医学与临床, 2015, 12(18): 2705-2707.

[17] 杨永昌, 贾志凌, 樊卫红, 等. 降钙素原、C 反应蛋白、前清蛋白及白细胞计数在重症肺炎诊断中的应用评价[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(4): 436-437.

[18] PERRONE T, QUAGLIA F. Lung US features of severe interstitial pneumonia: case report and review of the literature[J]. J Ultrasound, 2017, 20(3): 247-249.

[19] 范春红, 李时悦, 范惠群, 等. 重症肺炎患者血浆可溶性髓样细胞触发受体 1 与可溶性血红蛋白清道夫受体的水平变化[J]. 重庆医学, 2015, 44(34): 4780-4783.

[20] 陶飞, 吴翔, 胡桂芳, 等. 重症肺炎患者血管外肺水指数与血浆可溶性髓样细胞触发受体-1 的关系[J]. 疑难病杂志, 2016, 15(2): 143-146.

(收稿日期: 2017-12-10 修回日期: 2018-02-18)

(上接第 2368 页)

[8] VERANI J R, SPINA N L, LYNFIELD R, et al. Early-onset group B streptococcal disease in the United States: potential for further reduction [J]. Obstet Gynecol, 2014, 123(4): 828-837.

[9] JI W, ZHANG L, GUO Z, et al. Colonization prevalence and antibiotic susceptibility of group B Streptococcus in pregnant women over a 6-year period in Dongguan, China [J]. PLoS One, 2017, 12(8): e0183083.

[10] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): 63.

[11] WANG H, ZHANG X, XU X, et al. A portable microfluidic platform for rapid molecular diagnostic testing of patients with myeloproliferative neoplasms [J]. Sci Rep, 2017, 7(1):

8596.

[12] WANG H, LIU W, ZHANG X, et al. Toward point-of-care testing for JAK2 V617F mutation on a microchip [J]. J Chromatogr A, 2015(1410): 28-34.

[13] SEYRIG G, STEDTFELD R D, TOURLOUSSE D M, et al. Selection of fluorescent DNA dyes for real-time LAMP with portable and simple optics [J]. J Microbiol Methods, 2015(119): 223-227.

[14] VENKATESAN G, BHANUPRAKASH V, BALAMURUGAN V. Development and comparative evaluation of loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay for simple visual detection of or virus in sheep and goats [J]. Mol Cell Probes, 2015, 29(3): 193-195.

(收稿日期: 2017-12-04 修回日期: 2018-02-12)