

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.12.023

环介导等温扩增技术便捷检测淋病奈瑟菌 *porA* 基因向 波¹, 向 辉², 易 平¹, 刘龙亚³, 印道春⁴, 田 芳¹, 符自清^{1△}

吉首大学第一附属医院/湘西州人民医院:1. 检验科;2. 肿瘤科;

3. 泌尿外一科;4. 皮肤科, 湖南吉首 416000

摘 要:目的 设计一种特异度和灵敏度高的环介导等温扩增(LAMP)系统,用于淋病奈瑟菌便捷检测。**方法** 选取淋病奈瑟菌 *porA* 基因特定序列,设计一套适合 LAMP 技术的引物。用 LAMP 技术和 PCR 同时检测 2018 年 1 月至 2019 年 1 月该院 32 例淋病性宫颈炎和 88 例非淋病性宫颈炎患者的宫颈拭子标本淋病奈瑟菌阳性检出率。所得数据配对设计,采用 McNemar 检验比较两种技术阳性检出率的差异,再分别用 Fisher 检验比较灵敏度和特异度差异。**结果** LAMP 技术的阳性检出率高于 PCR 技术,差异有统计学意义($P < 0.05$);LAMP 技术灵敏度(96.88%)高于 PCR(78.13%),差异有统计学意义($P < 0.05$);二者特异度均为 100.00%。**结论** LAMP 技术可在水浴条件下,于 50 min 内通过目测试剂颜色变化准确检出淋病奈瑟菌,有效提升女性淋病患者阳性诊断率,降低漏诊率。

关键词: 环介导等温扩增技术; 淋病奈瑟菌; 基因; 灵敏度与特异度

中图法分类号:R446.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2020)12-1712-03

Rapid and simple identification of the *porA* gene of *Neisseria gonorrhoeae*
by using a loop-mediated isothermal amplification assay

XIANG Bo¹, XIANG Hui², YI Ping¹, LIU Longya³, YIN Daochun⁴, TIAN Fang¹, FU Ziqing^{1△}

1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Oncology; 3. Department of Urology;

4. Department of Dermatology, the First Affiliated Hospital of Jishou University/

Xiangxi People's Hospital, Jishou, Hunan 416000, China

Abstract: **Objective** A highly specific and sensitive loop-mediated isothermal amplification(LAMP) system was designed for the convenient detection of *Neisseria gonorrhoeae*. **Methods** A specific sequence of *porA* gene of *Neisseria gonorrhoeae* was selected and a set of primers suitable for LAMP technology was designed. The positive detection rate of *Neisseria gonorrhoeae* in cervical swab samples of 32 patients with gonorrhea cervicitis and 88 patients with non-gonococcal cervicitis in the hospital from January 2018 to January 2019 was detected by both LAMP and PCR technology. The difference between the positive detection rates of the two techniques was compared by McNemar test, and the differences of sensitivity and specificity were compared by Fisher test. **Results** The positive detection rate of LAMP technology was higher than that of PCR, and the difference was statistically significant($P < 0.05$); the sensitivity of LAMP technology(96.88%) was higher than PCR (78.13%), and the difference was statistically significant($P < 0.05$); both specificities of LAMP technology and PCR were 100.00%. **Conclusion** The LAMP technology can accurately detect *Neisseria gonorrhoeae* by color change of the visual test agent within 50 minutes under water bath conditions. LAMP technology can improve the positive diagnosis rate of female gonorrhea patients and reduce the rate of missed diagnosis.

Key words: loop-mediated isothermal amplification; *Neisseria gonorrhoeae*; gene; sensitivity and specificity

淋病是由淋病奈瑟菌(NG)引起的性传播性疾病。NG 是国家法定监控的细菌之一,尽管淋病发病率高,但全国 NG 检出率低^[1-3]。目前,临床医生诊断淋病的重要依据是泌尿生殖系统的流脓症状,以及涂片发现革兰阴性双球菌。该方法诊断男性淋病患者具有一定准确性,但不适用于诊断淋病性宫颈炎和淋病性盆腔炎的女性患者。尽管各大医院普遍开展了 NG 分子生物学检测技术,然而国内女性淋病患者的

阳性检出率一直处于较低水平^[3-4]。这是由于女性患者感染症状不明显,以及临床医师和检验技师的一系列错误认识 and 不当操作共同导致。因此,临床迫切需要研发一种更高效的检测系统,用于提高女性淋病患者阳性检出率。环介导等温扩增(LAMP)技术是 2000 年开发出来的一种比传统分子生物学检测技术更简便快捷,且特异度更高的新型分子生物学检测技术^[5-7]。LAMP 技术采用 Bst-DNA 聚合酶,针对模板

DNA 的 6 个靶区巧妙设计 1 对内部复合引物和 1 对外围引物,通过 60 ℃ 恒温水浴 30~60 min,可获得超过 10 亿拷贝的扩增产物^[8-10]。本课题组设计了一套新的针对 NG 菌株 porA 基因保守序列的 LAMP 检测系统,并分析其与国内主流淋球菌 PCR 检测技术的差异。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2018 年 1 月至 2019 年 1 月本院 32 例淋病性宫颈炎和 88 例非淋病性宫颈炎患者的宫颈脓性分泌物拭子。排除院前使用抗菌药物治疗病例,所有患者获得 NG 细菌培养证据。本研究获得本院伦理委员会批准。

1.2 LAMP 反应体系设计 从 Genebank 获取 NG porA 基因碱基序列。在线设计 1 对内部复合引物 FIP、BIP(FIP 是 F2 与 F1c 的复合引物,BIP 是 B2 与 B1c 复合引物)和 1 对外围引物 F3、B3(<https://primerexplorer.jp/>)。DNA 模板 2.0 μL,Bst DNA 聚合酶 1.0 μL,引物 Mix 2.5 μL,反应 Mix 12.0 μL,双蒸水 2.5 μL,反应体系 20.0 μL,保持 60 ℃ 水浴

50 min,85 ℃ 维持 2 min。每管加入 1.0 μL 显色剂 SYTO-9,绿色判为阳性。

1.3 仪器与试剂 LAMP 反应引物由生工生物(上海)股份有限公司合成,采用凯杰公司试剂提取上述标本 DNA 后,使用 60 ℃ 水浴箱进行 LAMP 检测。PCR 仪器为美国 ABI7500 PCR 仪。

1.4 统计学处理 将 120 例 LAMP 数据与 120 例 PCR 数据进行配对设计,比较两种方法阳性检出率差异,采用 McNemar 检验计算确切概率。将 32 例淋病数据和 88 例非淋病性宫颈炎患者数据分层。淋病组数据配对后,比较灵敏度差异;非淋病组数据配对后,比较特异度差异,采用 Fisher 确切概率法。应用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 引物及相关参数 各引物 5'端自由能(5'dG)和 3'端自由能(3'dG)均小于-4.00,T_m 均为 60 ℃ 左右。见表 1。

表 1 LAMP 系列引物的相关参数

引物	长度	T _m (℃)	5'dG	3'dG	碱基序列
F3	19	60.60	-4.81	-6.10	AGTAGCAGGCGTATAGGCG
B3	18	60.20	-5.58	-6.42	GCGAATCCGTTTGCGCAT
F2	20	59.60	-5.80	-5.02	TGCTGTTTTGACTCGGAACA
F1c	21	56.10	-4.69	-6.14	CGATTCCACCGGATTTTCGG
B2	20	60.30	-5.40	-5.35	GCCATTGATCCTTGGGACAG
B1c	21	56.20	-4.62	-5.84	GGAAACTGGCATACCGTCGTG
FIP	41	—	—	—	CGATTCCACCGGATTTTCGG-TGCTGTTTTGACTCGGAACA
BIP	41	—	—	—	GGAAACTGGCATACCGTCGTG-GCCATTGATCCTTGGGACAG

注:—表示此项无数据。

2.2 LAMP 技术和 PCR 技术检测性能分析 120 例淋病性和非淋病性宫颈炎标本的 LAMP 和 PCR 技术检测结果配对数据,通过 McNemar 确切概率检验,两种方法阳性检出率分别为 25.83%、20.83%,差异有统计学意义($P<0.05$)。LAMP 和 PCR 的灵敏度分别为 96.88%、78.13%,差异有统计学意义($P<0.05$);二者特异度均为 100.00%。见表 2。

表 2 LAMP 技术和 PCR 技术检测性能分析

LAMP 技术	n	PCR 技术	
		阳性	阴性
淋病性和非淋病性宫颈炎	120		
阳性		25	6
阴性		0	89
淋病性宫颈炎	32		
阳性		25	6
阴性		0	1
非淋病性宫颈炎	88		
阳性		0	0
阴性		0	88

3 讨论

NG 具有较强的抗菌药物耐药潜力^[11-13]。20 世纪 80 年代,中国淋球菌耐药监测系统应运而生^[2-3]。从理论上分析,男性与女性患病率应接近 1:1。然而,近 30 余年来,女性淋病患者的阳性检出率一直远远低于男性^[3]。造成女性患者大量漏诊的因素较复杂,涉及以下 6 个方面:(1)女性患者常常是隐性感染,检出率低;(2)女性生殖道微生态复杂度高,降低了 PCR 灵敏度;(3)错误将阴道后穹窿分泌物等同于宫颈分泌物送检进行 NG PCR 检测;(4)抗菌药物导致细菌培养假阴性;(5)多数基层实验室无二氧化碳培养箱等硬件设备;(6)检验技师未掌握 NG 培养方法。

因此,亟需建立一种廉价、技术门槛低、灵敏度和特异度高的检测方法,以有效降低女性淋病患者漏诊率。本课题组前期研究发现,LAMP 技术是一种极其适用于 NG 检测的分子生物学新技术,具有 3 点明显优势^[14]:(1)检测温度恒定在 60 ℃ 左右,基因扩增结果可视化。不需要昂贵 PCR 仪器,试剂不涉及荧光探针,成本低。这适合大多数医院常规开展淋病筛

查。(2)LAMP 技术绕开了主流实时荧光定量 PCR 技术包含的温度梯度循环程序,避免了温度梯度循环的时间损耗,直接降低检测时间至 1 h 之内。(3)检测系统需要两套引物,检测的特异度较 PCR 高。但是 LAMP 技术较传统 PCR 技术更复杂,引物设计较难,这是限制其应用的主要因素之一。

本研究的新颖之处在于,本课题组自主设计了一套新的针对 NG 细菌 *porA* 基因保守序列的 LAMP 检测系统。LAMP 技术的核心在于设计前向内引物和后向内引物的筛选,以及 5' dG 和 3' dG 小于 -4.00,并避免引物间的二聚体。本套引物自由能最大值为 -4.62,最小值为 -6.42,利于引物 5' 端的特异性结合,利于 3' 端正确引发。本研究运用 Oligo6.0 分析并修正了个别碱基,控制了 4 个引物间二聚体的发生率。通过上述工作,从理论上保证了引物特异性。

为进一步验证本课题组设计的 LAMP 方法的检出率,收集了 NG 细菌培养阳性的 32 例淋病性宫颈炎和 88 例非淋病性宫颈炎患者的宫颈脓性分泌物拭子,同时进行 LAMP 检测和 PCR 检测,以比较两种检测技术的差异。NG PCR 检测及细菌培养过程耗时长,价格高,不适合门诊患者及时诊治,患者接受程度低。传统 PCR 技术在扩增效率为 100% 的前提下,扩增产物呈现 $2n$ 倍增长,27 个循环后,可以达到 1 亿个拷贝数。然而,LAMP 检测技术的循环扩增阶段比 PCR 循环复杂,产物远超 $2n$ 倍增长^[15]。故 LAMP 技术在方法学上拥有更高的灵敏度。本研究经检测 120 例细菌性宫颈炎患者宫颈分泌物标本,结果发现 LAMP 技术灵敏度比 NG PCR 技术高,为 96.88%,检测时间由 2 h 缩短至 50 min 以内。本课题所设计的 NG LAMP 系统只需要 60 °C 水浴 30~50 min 就可以依据显色剂 SYTO-9 的颜色变化判断阴阳性,是一种较理想的淋病分子生物学筛查技术。本课题的不足之处在于验证的样本量尚不够多,应在更大的人群中进一步验证该方法的检测效能。

总之,正确推广 LAMP 技术可大幅提升女性淋病患者的阳性检出率,降低漏诊率。

参考文献

- [1] QIN X,ZHAO Y,CHEN W,et al. Changing of antibiotic susceptibility and molecular characterization of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Guangdong, China: in a background of rapidly raising epidemic[J]. Int J Antimicrob Agents,2019,54(6):757-765.
- [2] YIN Y P,HAN Y,DAI X Q,et al. Susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to azithromycin and ceftriaxone in China: a retrospective study of national surveillance data from 2013 to 2016[J]. PLoS Med,2018,15(2):e1002499.

- [3] 张杰,李伟,朱邦勇,等. 2008—2013 年广西部分地区性病门诊患者淋球菌临床分离菌株的耐药监测[J]. 中国皮肤性病学杂志,2017,31(2):180-183.
- [4] WAN C,LI Y,LE W J,et al. Increasing resistance to azithromycin in *Neisseria gonorrhoeae* in eastern Chinese cities: resistance mechanisms and genetic diversity among isolates from Nanjing[J]. Antimicrob Agents Chemother,2018,62(5):e02499-e02417.
- [5] 张亚平,郑志高,简保磊,等. 新型环介导等温扩增技术开发与应用研究进展[J]. 分子诊断与治疗杂志,2018,10(2):138-144.
- [6] 刘亚东,冷雪,时坤,等. 环介导等温扩增技术检测方法的研究进展[J]. 中国人兽共患病学报,2018,34(5):76-81.
- [7] VERMA G,SHARMA S,RAIGOND B,et al. Development and application of fluorescent loop mediated isothermal amplification technique to detect *Phytophthora infestans* from potato tubers targeting ITS-1 region[J]. Biotech,2019,9(9):345.
- [8] 彭志,陈刚毅,刘雪飞,等. 等温核酸扩增技术在病原体检测中的应用[J]. 生物技术进展,2018,8(4):284-292.
- [9] LEE J Y,KIM J H,RHO J Y. Development of rapid and specific detection for the human aichivirus a using the loop-mediated isothermal amplification from water samples[J]. Indian J Microbiol,2019,59(3):375-378.
- [10] HULSE L S,MCDONALD S,JOHNSTON S D,et al. Rapid point-of-care diagnostics for the detection of *Chlamydia pecorum* in koalas (*Phascolarctos cinereus*) using loop-mediated isothermal amplification without nucleic acid purification[J]. Microbiologyopen,2019,8(12):e916.
- [11] HOOK E W,KIRKCALDY R D. A brief history of evolving diagnostics and therapy for gonorrhea: lessons learned[J]. Clin Infect Dis,2018,67(8):1294-1299.
- [12] WASHINGTON M A,JERSE A E,RAHMAN N,et al. First description of a cefixime and ciprofloxacin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* isolate with mutations in key antimicrobial susceptibility-determining genes from the country of Georgia[J]. New Microbes New Infect,2018,24:47-51.
- [13] PONCIN T,FOUERE S,BRAILLE A,et al. Multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* failing treatment with ceftriaxone and doxycycline in France[J]. Euro Surveill,2018,23(21):1-3.
- [14] 张丽娜,胡成进. 环介导等温扩增技术在病原微生物快速诊断中的应用[J]. 生物技术通讯,2015,26(6):886-890.
- [15] RAJESH R. Loop-mediated isothermal amplification: beyond microbial identification[J/OL]. Cogent Biol,2016,2(1) [2016-02-03]. <https://doi.org/10.1080/23312025.2015.1137110>.