

• 临床探讨 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.18.028

环介导等温扩增法与重组酶聚合酶扩增法用于孕妇 B 族链球菌定植筛查的价值

马小波^{1,2}, 梁朝霞¹, 吴勇¹, 何玉萍¹, 刘鸿飞², 董艳³

1. 江苏省南京市高淳中医院检验科, 江苏南京 211300; 2. 徐州医科大学附属沭阳医院检验科, 江苏沭阳 223600; 3. 徐州医科大学附属沭阳医院妇产科, 江苏沭阳 223600

摘要:目的 探讨环介导等温扩增法(LAMP)与重组酶聚合酶扩增法(RPA)应用于孕妇 B 族链球菌(GBS)定植的筛查价值。方法 选取 2018 年 5 月至 2019 年 7 月在徐州医科大学附属沭阳医院采集的 68 例孕 35~37 周孕妇阴道及直肠拭子作为主要检测标本, 培养 GBS 菌株后提取菌株基因组 DNA, 应用 LAMP 及 RPA 反应引物进行基因扩增, 确定 LAMP 及 RPA 的灵敏度、特异性差异及时效性指标。结果 LAMP 的基因扩增时间为 45 min, 产生结果需 69 min, LAMP 测定需要恒温仪温度为 63 ℃; RPA 的基因扩增时间为 15 min, 经凝胶成像产生结果共需要 130 min, 经免疫金试纸条检测产生结果仅需 20~30 min, 仪器需要使用恒温仪 38 ℃、电泳仪和凝胶成像仪或免疫金试纸条。对本标本检测发现, LAMP 共检出 6 例阳性、62 例阴性, 与 16s rRNA 测序结果完全一致; 而 RPA 电泳法共检出 7 例阳性(假阳性 1 例), 61 例阴性; RPA 免疫金试纸条检测与 LAMP 测定结果一致。结论 LAMP 及 RPA 对设备依赖程度较低, RPA 基因扩增速度快, LAMP 总耗时相对较短, 且具有可视性, RPA 扩增后采用免疫金试纸条诊断的灵敏度及特异性与 LAMP 一致, 两组均具有简单、高效的特点, 适用于中小型医院孕妇 GBS 定植筛查。

关键词: B 组链球菌; 环介导等温扩增法; 重组酶聚合酶扩增法; 孕妇**中图分类号:** R714.251**文献标志码:** A**文章编号:** 1672-9455(2022)18-2559-04

B 族链球菌(GBS)定植是发生早发型新生儿败血症的主要原因^[1]。GBS 定植具有起病隐匿、症状不典型的特点^[2]。多方共识指出:孕 35~37 周进行直肠及阴道 GBS 定植筛查有助于减少产妇分娩风险及新生儿感染风险^[3-5]。GBS 定植的筛查临床上多以培养法作为判断 GBS 定植的金标准, 但培养法多需要 48 h 以上, 其耗时长、灵敏度差^[6]。聚合酶链反应(PCR)或荧光 PCR 虽然能够减少鉴定时间, 已经逐渐取代培养法成为新型筛查方式, 但其对仪器及设备的成本需求相对较高, 不适合中小型医院应用^[7]。环介导等温扩增法(LAMP)的反应时间仅需几十分钟, 反应结束可通过肉眼直接观察, 简单、高效^[8]。重组酶聚合酶扩增法(RPA)能在 15 min 内进行 DNA 扩增, 但缺乏有效的直接观察方式^[9]。两种方法均属于恒温环境下来进行 DNA 扩增的有效方式, 简单、方便。为进一步明确 LAMP 及 RPA 用于孕妇 GBS 定植筛查的价值故进行本研究, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2018 年 5 月至 2019 年 7 月在徐州医科大学附属沭阳医院(以下简称该院)采集的 68 例孕 35~37 周孕妇阴道及直肠拭子作为主要检测标本。纳入的孕妇在 4 周内未进行抗菌药物治疗。取孕妇肛周分泌物及阴道下三分之一处分泌物等分为 3 份, 标记后进行孕妇 GBS 定植筛查。

1.2 仪器与试剂 PCR 仪(含染料, 上海星汉生物科技有限公司, 型号: 2×Taq MasterMix)、高速离心机

(常州市亿能试验仪器厂, 型号: TG16G)、电泳仪(南京普阳科学仪器研究所, 型号: LG4C0818)、凝胶成像仪(赛默飞世尔科技公司, 型号: E-Gel Imager 凝胶成像仪-紧凑型凝胶成像系统)、恒温水浴锅(苏州珀西瓦尔试验设备有限公司, 型号: TZL-5002)、核酸染料(上海抚生实业有限公司, 型号: SYBR Green II)。LAMP 试剂盒(苏州天隆生物科技有限公司, 国械注准 20193400369)、RPA 反应试剂盒(广州市宝创生物技术有限公司, 国械注准 20213400530)、TwistAmp[®] LF 免疫金试纸条(广州市微米生物科技有限公司, 国械注准 20193400250)。

GBS 标准菌株选择购自上海素尔生物科技有限公司的无乳链球菌 ATCC13813 菌株作为阳性菌株; 将该院培养的化脓性链球菌、肺炎链球菌、星座链球菌、金黄色葡萄球菌、F 组链球菌各 1 株作为阴性菌株。

1.3 方法

1.3.1 标本的处理 将采集的孕妇阴道及直肠拭子置于 1 mL 无菌蒸馏水中, 10 000 r/min 高速振荡 60 s, 10 000×g 离心 300 s, 弃去上清液; 再加入 0.1 mL 无菌蒸馏水中沉淀后, 再次离心, 弃上清液; 再加入 0.1 mL 无菌蒸馏水重悬沉淀后依据沸水浴法提取 DNA, 一份行 LAMP 检测, 一份行 RPA 检测, 另一份行 16s rRNA 测序, 应用 GenBank 数据比对确定细菌 DNA。

1.3.2 DNA 提取方法 应用移菌环自血平板上刮

取培养完成的菌株, 置入 0.1 mL 的无菌蒸馏水中, 在沸水中水浴 10 min, 10 000×g 离心 2 min(分离线粒体), 取上清液备用, 作为模板 DNA(ATCC13813 菌株为阳性模板, 其他菌株为阴性模板)。

1.3.3 LAMP 将 LAMP 试剂盒中的反应液、显色液 FDR 和 2 μL 的模板 DNA 置入 0.5 μL 的 PCR 管中, 混合均匀, 再置入 63 °C 的恒温水浴锅中反应 0.5~1.0 h 后取出, 置入判定结果。

1.3.4 RPA 严格按照 RPA 试剂盒说明书进行操作, RPA 反应体系(47.5 μL): 10 μmol/L 的上下游引物各 2.4 μL, DNA 模板 2 μL、重组缓冲液 29.5 μL, 超纯水 11.2 μL 制成混合液。将混合液移入预装好冻干粉的反应管中, 混合均匀后加入 2.5 μL MgAc, 使最终反应体积达到 25 μL, 置入 PCR 扩增仪, 运行 20 min。运行 4 min 时, 取出 PCR 管, 轻弹并混匀, 再放回 38 °C 的恒温仪中继续孵育。运行结束后将扩增产物取出 12.5 μL 置入新的 EP 管中, 后续经 DNA 纯化及琼脂糖凝胶电泳, 并将余下的孵育产物进行 TwistAmp® LF 免疫金试纸条检测。

1.3.5 判定方法 LAMP 结果判定: 以反应液变为绿色作为阳性结果, 反应液无变色为阴性结果。RPA 结果判定: 以出现反应条带为阳性结果, 无反应条带为阴性结果。本研究以 ATCC13813 菌株检验结果为阳性对照组, 其他标本为阴性对照组, 并以 16s rRNA

测序结果为金标准。

1.3.6 评估方法

1.3.6.1 灵敏度评估 取无菌双蒸馏水对待测模板 DNA 做 10 倍梯度递减稀释, 并以模板 DNA 检验情况最低浓度判断。同时对比不同检测方法的阳性结果准确率。

1.3.6.2 特异性评估 以阴性菌株为模板, 应用 LAMP、RPA 检测, 并进行评估, 以确定 LAMP、RPA 对 GBS 的诊断特异性。

1.3.6.3 时效性评估 采集自开始检验至检验结果产生的时间差进行比较, 确定两种检验方法的时效性差异。

1.3.7 观察指标 观察 LAMP 及 RPA 的最佳引物、反应条件、反应时间及检测的灵敏度、特异性。

2 结果

2.1 LAMP 和 RPA 的最佳引物和反应条件对比 本实验自 5 组 LAMP 引物中选择一组反应迅速、特异性高的引物作为最佳引物, 该引物最佳反应条件: 63 °C, 反应 45~60 min。反应 45 min 时, LAMP 检测管颜色自橙色逐渐转为绿色标本为阳性, 延长时至 60 min 无颜色变化, 阴性标本为橙色。RPA 的引物以 F3、B3 为主, 其最佳反应温度为 38 °C, 恒温 15 min。见表 1。

表 1 最佳引物序列

引物	序列(5'-3')	片段大小(bp)
F3	AGA AGC CTT AAC AGA TGT GA	20
B3	CAG GAT AAG TTA AAA CCT TTT GTT CA	23
FIP	ATT CGC ATT TTA GAT CCA TTT GCT TGC CTT TAC ATC GTT GA	38
BIP	CAG CTT AGT TAT CCC AAA TCC CAT AGA AGC AAT CAC AAT CAT	42

注: F3 为上游外引物; B3 为下游外引物; FIP 为上游内引物; BIP 为下游内引物。

2.2 两种方法的灵敏度及特异性对比 经 LAMP 及 RPA 检测, 45 min 时, ATCC13813 菌株 DNA 模板水平在 0.01~10.00 ng/μL 时, 两种检测方法均能

够有效筛查阳性标本, 检验极限均为 0.01 ng/μL。经 LAMP 及 RPA 检测确定, 而对于阴性菌株可以明确排除。两者的特异性一致。见表 2。

表 2 LAMP 及 RPA 特异性比较

方法	ATCC13813	化脓性链球菌	肺炎链球菌	星座链球菌	金黄色葡萄球菌	F 组链球菌
LAM	+	-	-	-	-	-
RPA 电泳	+	-	-	-	-	-
RPA 免疫金试纸条	+	-	-	-	-	-

注: + 表示阳性; - 表示阴性。

2.3 两种方法的时效性及准确性对比 68 例标本中共 6 例阳性、62 例阴性, GBS 定植率为 8.82%。LAMP 共耗时 69 min, LAMP 测定仅需要恒温仪即可判读; RPA 测定 68 例标本, 共耗时 130 min, 需要使用恒温仪、电泳仪和凝胶成像仪或免疫金试纸条才

能产生准确结果。两种检测方法临床准确性比较, LAMP 共检出 6 例阳性、62 例阴性, 与 16s rRNA 测序结果完全一致; 而 RPA 电泳法共检出 7 例阳性(假阳性 1 例), 61 例阴性; RPA 免疫金试纸条检测与 LAMP 测定结果一致, 仅需 20~30 min 即可完成。

3 讨 论

GBS 定植筛查已经成为发达国家对孕 35~37 周筛查的主要指标之一。研究显示,孕晚期妇女 GBS 定植率为 15.58%,以 30~40 岁孕产妇多见^[10]。这一结果与本研究纳入标本的 GBS 定植率 8.82%(6/68)大致相当^[11]。我国民众对 GBS 的了解少,故 GBS 定植筛查的普及率相对较低;而且受到筛查时间、筛查技术难度及费用昂贵的限制,多数孕期妇女对 GBS 认识不足,难以建立有效的 GBS 定植筛查机制^[12]。随着 GBS DNA 诊断技术的发展,PCR 技术逐渐成熟,但是在中小型医院由于经费等原因仍难以普及^[13]。

LAMP 及 RPA 能够减少早期筛查成本,降低筛查时间损耗,灵敏度高、特异性好,与 PCR 技术相比,经济价值及诊断效能更佳。与传统 PCR 技术相比,LAMP 及 RPA 更加快速、方便,且对设备需求度低^[14]。LAMP 采用 6 个不同区域靶基因制订 4 条特殊引物,经过起始及循环扩增形成最终的花椰菜样茎-环状结构 DNA 混合物^[15]。在 LAMP 反应过程中,焦磷酸镁沉淀作为主要副产物存在,使得肉眼能够有效分辨荧光染料,具有可视性,但 LAMP 的引物设计较为复杂,在一定程度上限制了其临床应用程度^[16]。

RPA 与 LAMP 相比,反应温度更接近人体体温,在 37~42 °C 进行,单链核酸重组酶 UvsX 与引物相结合,利用 Bsu DNA 聚合酶实现链置换,在这个置换过程中,引入单链 DNA 结合蛋白 Gp32 核酸蛋白形成复合体,在多种因子共同作用下,基因链的延伸与配对过程才能实现^[17]。但由于反应情况无法进行视觉诊断,多应用凝胶电泳成像技术进行定性检测,但低浓度模板可能出现非特定信号污染,其诊断时效性及准确性较低^[18]。但结合免疫金试纸条技术能够减少低浓度模板的信号污染,避免假阳性标本产生,且基因扩增完成后即可进行检测,显像仅需 5 min,有效地弥补了 RPA 在 GBS 定植筛查过程中的缺陷^[19]。

本研究结果发现,LAMP 的基因扩增对设备需求更低,适合基层医院应用;而 RPA 扩增后应用免疫金试纸条进行定性检测,耗时更短,且结果与 LAMP 一致,虽然增加一定的检验成本,但节约检测时间,适合中型以上医院选用^[20]。LAMP 和 RPA(免疫金试纸条判读)的灵敏度及特异性一致。

综上所述,LAMP 及 RPA 对设备依赖程度较低,RPA 基因扩增速度快,LAMP 总耗时相对较短,且具有可视性,RPA 扩增后采用免疫金试纸条方式诊断灵敏度及特异性与 LAMP 一致,两种方法均具有简单、高效的特点,适用于孕妇 GBS 定植筛查。

参考文献

[1] STAFFORD I A, HUMMEL K, DUNN J J, et al. Retrospective analysis of infection and antimicrobial resistance

patterns of *Mycoplasma genitalium* among pregnant women in the southwestern USA[J]. *BMJ Open*, 2021, 11(6):50475.

[2] 张淑珍,金卓杏,陈晓方,等.晚期妊娠孕妇 B 族链球菌感染状况及妊娠结局分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2017, 27(12):2801-2804.

[3] 张莹,孙晖,王英,等.抗感染干预对孕妇生殖道 B 族链球菌感染胎膜早破的影响[J]. *中华医院感染学杂志*, 2017, 27(1):179-181.

[4] 高坎坎,曾兰兰,邓秋连,等.欧美国国家围生期 B 族链球菌感染预防指南筛查策略与方法的解读[J]. *中华检验医学杂志*, 2018, 41(11):817.

[5] KFOURI R Á, PIGNATARI A C, KUSANO E J, et al. Capsular genotype distribution of group B *Streptococcus* colonization among at-risk pregnant women in Sao Paulo, Brazil[J]. *Braz J Infect Dis*, 2021, 25(3):101586.

[6] 易辉,王云霞,郑丽君,等.妊娠早期及晚期孕妇生殖道 B 族溶血性链球菌监测的对比分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2017, 27(16):3768-3770.

[7] 张晓彤,韩淑毅,王晓,等.等温扩增法用于孕妇 B 族链球菌感染筛查的研究[J]. *中国病原生物学杂志*, 2018, 13(2):112-115.

[8] 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):36-38.

[9] 刘洁,凌勇,邱芳华,等.2011—2017 年孕妇生殖道无乳链球菌检出及其耐药性变化[J]. *中国感染控制杂志*, 2018, 17(12):1046-1049.

[10] 唐笑,甘甜,周梅花,等.湖南地区 9 205 例孕妇 B 族链球菌感染状况分析[J]. *检验医学*, 2020, 35(1):37-38.

[11] 高坎坎,关小珊,邓秋连,等. B 族链球菌四种筛查方法的比较[J]. *中华检验医学杂志*, 2020, 43(2):182-185.

[12] 张晓彤,韩淑毅,王晓,等.等温扩增法用于孕妇 B 族链球菌感染筛查的研究[J]. *中国病原生物学杂志*, 2018, 13(2):112-115.

[13] 金晓君,龚雅利,杨莉,等.重组酶聚合酶扩增在铜绿假单胞菌检测中的应用[J]. *中华烧伤杂志*, 2018, 34(4):233.

[14] GE Y, PAN F, BAI R, et al. Prevalence of group B streptococcus colonization in pregnant women in Jiangsu, East China[J]. *BMC Infect Dis*, 2021, 21(1):492.

[15] ALFOUZAN W, GADDAR N, DHAR R, et al. A study of group B streptococcus in pregnant women in Lebanon: prevalence, risk factors, vaginal flora and antimicrobial susceptibility[J]. *Infez Med*, 2021, 29(1):85-93.

[16] 漆小霞,王光咏,唐小花,等.胎膜早破孕妇 B 族链球菌感染分型及胎膜组织中 Nrf2/NF-κB 表达[J]. *中华医院感染学杂志*, 2020, 30(23):3659-3663.

[17] 符叶,沈婕,管翠,等.三种培养法在妊娠晚期孕妇 B 族链球菌感染筛查中的应用[J]. *中华医院感染学杂志*, 2021, 31(5):753-757.

[18] 刘敏,吴昕,李晶晶,等.孕妇生殖道感染对胎膜早破和妊娠不良结局的影响[J]. *中华医院感染学杂志*, 2021, 31(10):1586-1590.

[19] 梁玉林,刘秀,丁梦璇,等.环介导等温扩增技术在典型食

源性致病菌检测中的应用进展[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(18):229-234.

[20] 曾白华, 尹维, 吕禄平, 等. 围生期 B 族链球菌感染临床意义及检测方法研究进展[J]. 医学综述, 2017, 23(9):1839-

(收稿日期:2021-08-24 修回日期:2022-06-23)

• 临床探讨 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.18.029

EB 病毒抗体联合 EBV-DNA 载量检测诊断儿童传染性单核细胞增多症的临床价值

钟志辉, 蒙国煌, 张岳汉, 龙则平

广东省高州市人民医院检验科, 广东高州 525200

摘要:目的 研究 EB 病毒(EBV)抗体联合 EBV-DNA 载量检测诊断儿童传染性单核细胞增多症(IM)的临床价值。方法 回顾性分析 2020 年 1 月至 2021 年 12 月该院收治的 75 例 IM 患儿作为病例组,另选取同期 70 例非 IM 儿童作为对照组。检测并比较两组 EBV 抗体水平以及 EBV-DNA 载量,分析 EBV 抗体以及 EBV-DNA 载量对 IM 的诊断效能。此外,对所有 IM 患儿实施常规治疗,将其根据治疗 1 周后的 EBV-DNA 载量差异分为 EBV-DNA 转阴组及未转阴组。通过单因素及多因素 Logistic 回归分析 IM 患儿治疗 1 周后 EBV-DNA 未转阴的影响因素。结果 病例组 EBV-CA-IgG、EBV-CA-IgM 以及 EBV-DNA 载量阳性率分别为 62.67%、85.33%、77.33%,均高于对照组的 15.71%、8.57%、7.14%,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。EBV 抗体以及 EBV-DNA 载量联合检测诊断 IM 的灵敏度、准确度分别为 96.00%、91.03%,均高于 EBV-NA-IgG、EBV-CA-IgG、EBV-CA-IgM 以及 EBV-DNA 载量单项检测的灵敏度、准确度($P < 0.05$)。EBV-DNA 未转阴组使用干扰素人数比例以及年龄、初始 Ct 值均低于 EBV-DNA 转阴组($P < 0.05$),而两组性别、白细胞计数及淋巴细胞计数比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。经多因素 Logistic 回归分析发现,未使用干扰素是 IM 患儿治疗 1 周后 EBV-DNA 未转阴的危险因素($P < 0.05$),而年龄、初始 Ct 值均是 IM 患儿治疗 1 周后 EBV-DNA 未转阴的保护因素($P < 0.05$)。结论 EBV 抗体联合 EBV-DNA 载量检测诊断儿童 IM 的临床价值较高,可提升 IM 诊断的灵敏度及准确度。此外,使用干扰素与否、年龄以及初始 Ct 值均与患儿治疗 1 周后 EBV-DNA 未转阴有关。

关键词:传染性单核细胞增多症; EB 病毒抗体; EBV-DNA 载量

中图分类号:R446.6

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2022)18-2562-04

传染性单核细胞增多症(IM)是儿科临床上发生率较高的一种急性传染病,根本病因是患儿机体内出现 EB 病毒(EBV)感染,继而导致单核-巨噬系统急性增生^[1]。IM 患儿临床表现特征以发热、肝脾大、皮疹以及咽峡炎为主,对患儿的正常生长发育以及生命健康安全具有不同程度的负面影响^[2]。有研究表明,EBV 感染在机体免疫功能不同的患儿中可能引发不同临床表现,从而使得其早期症状有所差异,进一步增加了疾病的临床诊断难度,最终导致误诊和漏诊情况的发生,致使患儿无法得到及时、有效的治疗,影响预后^[3]。由此可见,探寻一种能早期有效、准确诊断 IM 的手段具有极其重要的意义,可为临床治疗提供参考依据,继而改善预后。目前,临床上针对 IM 的诊断主要是依靠 EBV 抗体实现,包括 EBV-NA-IgG、EBV-CA-IgG、EBV-CA-IgM。然而,EBV 抗体检测存在反应较弱的不足,往往会导致 IM 的诊断难度增加^[4]。其中 EBV-DNA 载量是反映 IM 患儿体内 EBV 复制状况,其在儿童 IM 诊断中的应用价值已得到广泛关注。本文通过研究 EBV 抗体联合 EBV-DNA 载量检测诊断儿童 IM 的临床价值,旨在为 IM

的临床诊疗提供参考,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 回顾性分析 2020 年 1 月至 2021 年 12 月本院收治的 75 例 IM 患儿作为病例组,其中男 53 例、女 22 例,年龄 1~10 岁、平均(4.44±1.23)岁。另选取同期 70 例非 IM 儿童作为对照组,其中男 50 例、女 20 例,年龄 1~10 岁、平均(4.35±1.20)岁。两组性别、年龄差异均无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

1.1.1 IM 诊断标准 (1)均存在发热、淋巴结肿大以及肝脾大等临床症状;(2)外周血白细胞主要以淋巴细胞为分类依据,异型淋巴细胞 $> 10\%$ ^[5]。

1.1.2 纳入标准 (1)所有病例组患儿均与上述 IM 相关诊断标准相符;(2)年龄 ≤ 10 岁;(3)入院前未接受任何治疗;(4)临床病历资料完整。

1.1.3 排除标准 (1)伴有严重血液系统疾病;(2)合并器质性损伤;(3)生长缓慢且发育异常;(4)合并精神障碍等遗传性疾病;(5)研究期间因故退出或失访;(6)正参与其他研究。

1.2 方法