

· 论 著 · DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2023. 16. 003

重组酶聚合酶扩增技术用于脑脊液中肺炎链球菌检测的价值*

侯玉婷¹, 俞梦楚², 王妍柏¹, 张 庆^{3△}

宁夏医科大学总医院:1. 神经内科脑脊液检测室;2. 医学科学研究院;3. 神经内科, 宁夏银川 750004

摘 要:目的 探讨重组酶聚合酶扩增(RPA)技术用于脑脊液(CSF)中肺炎链球菌检测的价值。方法 利用 RPA 技术检测 CSF 中肺炎链球菌。根据肺炎链球菌 LepA 基因设计 RPA 反应引物,收集临床确诊和疑似的 52 例细菌性脑膜炎患者为研究对象,采集 CSF 标本并提取 DNA,采用 RPA 技术对临床 CSF 进行 LepA 基因扩增检测。结果 52 例患者的 CSF 标本经微生物培养有 19 例(36.5%)为阳性,阳性标本中有 7 例检出肺炎链球菌,这 7 例患者 CSF 标本的 RPA 检测结果均为阳性。微生物培养为阴性的 33 例(63.5%)患者中有 7 例患者 CSF 标本的 RPA 检测结果为阳性。共 14 例患者 CSF 标本的 RPA 检测结果为阳性,从中选取 10 例患者 CSF 标本的 RPA 扩增产物经纯化后,与肺炎链球菌 LepA 基因目的片段进行核酸序列比对,其比对结果一致。结论 RPA 技术可用于肺炎链球菌性脑膜炎病原菌的快速检测。

关键词:细菌性脑膜炎; 肺炎链球菌; 重组酶聚合酶扩增技术; 脑脊液

中图法分类号:R446.6

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2023)16-2316-04

A study on detection of Streptococcus pneumoniae in cerebrospinal fluid by recombinase polymerase amplification assay*

HOU Yuting¹, YU Mengchu², WANG Yanbai¹, ZHANG Qing^{3△}

1. Department of Cerebrospinal Fluid Laboratory of Neurology; 2. Institute of Medical Sciences;

3. Department of Neurology, the General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China

Abstract: Objective To investigate the value of recombinase polymerase amplification (RPA) assay in detecting of Streptococcus pneumoniae in cerebrospinal fluid (CSF). **Methods** RPA was used to detect Streptococcus pneumoniae in CSF. According to the LepA gene of Streptococcus pneumoniae, RPA reaction primers were designed, 52 cases of clinically confirmed and suspected bacterial meningitis were collected as research objects, CSF samples were collected and DNA was extracted, and LepA gene amplification of clinical CSF was detected by RPA technology. **Results** Among the 52 patients, 19 (36.5%) of the CSF samples were positive by microbial culture, and 7 of the positive samples were positive for Streptococcus pneumoniae. The RPA test results of the CSF samples of these 7 patients were positive. The CSF samples of 33 patients (63.5%) were negative by microbial culture, of which 7 patients were positive for RPA. The results of RPA amplification from CSF samples of 14 patients were positive. After purification of RPA amplification products from CSF samples of 10 patients, nucleic acid sequences were compared with the target fragment of LepA gene of Streptococcus pneumoniae, and the results were consistent. **Conclusion** RPA assay can be used for the rapid detection of pneumococcal meningitis.

Key words: bacterial meningitis; Streptococcus pneumoniae; recombinase polymerase amplification assay; cerebrospinal fluid

细菌性脑膜炎是由细菌直接侵入中枢神经系统(CNS)引起的严重感染性疾病,其发病率和病死率居高不下^[1-2]。脑脊液(CSF)微生物培养是临床诊断细菌性脑膜炎的常规方法之一,同时也是诊断的金标准,但由于细菌培养时间长,不能满足临床的早期诊断和指导临床合理用药需求。因此,快速、准确地检测 CSF 中的致病菌是神经科医生关注的重点,也是医

学检验需要面临的问题。重组酶聚合酶扩增(RPA)是一种等温基因核酸扩增技术,因其快速、特异、可靠等特点成为新的病原微生物分子诊断方法^[3-5]。RPA 可在恒温条件下,20 min 内进行 DNA 检测,反应效率高。前期的研究发现,本院收治的肺炎链球菌性脑膜炎患者较多^[6],因此本研究以肺炎链球菌为目的菌株。LepA 蛋白是核糖体延伸因子,在原核生物中具

* 基金项目:宁夏自然科学基金项目(2020AAC03374);宁夏医科大学优势学科群建设项目(XY201714)。

作者简介:侯玉婷,女,主管技师,主要从事脑脊液细胞形态学和分子检测研究。△ 通信作者, E-mail: nxzhangqing@aliyun.com。

网络首发 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.R.20230727.1748.010.html>(2023-07-28)

有高度的序列保守性^[7]。本研究以 LepA 基因作为鉴定肺炎链球菌的分子诊断靶点,利用 RPA 技术检测 CSF 中肺炎链球菌,以 CSF 微生物培养的结果作为标准,探讨 RPA 技术的应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2020 年 5 月至 2021 年 5 月本院收治的确诊及疑似细菌性脑膜炎患者 52 例为研究对象,其中男 32 例,女 20 例;年龄 0.5~82.0 岁。

1.2 仪器与试剂 PCR 仪(Aanalytikjena 德国)、Bio-Rad 电泳仪(Bio-Rad 美国)、凝胶电泳仪(Azure 美国)、Cytospin-4 型细胞玻片离心仪(Thermo Scientific 美国)。瑞氏-姬姆萨染色液(珠海贝索生物技术有限公司)、TopRed 核酸染料(北京博奥拓达科技有限公司)、DNA 提取试剂盒(QIAamp DNA mini Kit 德国)、DNA 纯化回收试剂盒(天根生化科技有限公司)、RPA 反应试剂盒(TwistAmp™ Basic Kit 英国)。

1.3 方法

1.3.1 引物设计与合成 根据 GenBank 肺炎链球菌 LepA 基因(Genbank accession number NC_018594.1)的核酸序列及参考文献[8]设计 RPA 引物,正向引物:ACAGCTCCGTCTGTTATTTACAAAGTTAATTTGAC;反向引物:AGTCCCCACGCTTACGCTGAGCTAGCTCCATTACT。扩增片段长度均为 190 bp,引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.3.2 CSF 微生物培养 52 例患者均进行常规 CSF 微生物培养,按照临床检验操作规程对 CSF 标本进行微生物分离鉴定。

1.3.3 CSF 细胞学检查和 DNA 提取 进行腰椎穿刺取 CSF,采用血细胞计数板进行 CSF 中白细胞计数。吸取 0.5 mL CSF 置于标本室内,放置在细胞玻片离心仪内以 113×g 离心 5 min 制成 CSF 涂片。待涂片自然干燥后,滴加瑞氏-姬姆萨染色液,然后加入缓冲液并吹均匀,静置 5 min 后流水冲洗。干燥后采用 CSF 细胞图像诊断分析系统进行分类,计数 100 个细胞,计算单个核细胞(淋巴细胞、单核细胞)和多个核细胞(中性粒细胞)百分比^[9]。剩余的 CSF 在室温下 12 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液;按照试剂盒中说明书的操作方法提取 CSF 的 DNA,检测核酸浓度及纯度后置于-20℃保存备用。

1.3.4 CSF RPA 检测 将 CSF 标本的 DNA 按照 TwistAmp™ Basic Kit 试剂盒的说明书进行 RPA 检测。反应体系如下:10 μmol/L 的上、下游引物各 2.4 μL,重组缓冲液 29.5 μL,DNA 模板 1 μL,ddH₂O 12.2 μL,涡旋混匀后简短离心。将上述 47.5 μL 的混合液移入预装有冻干粉的反应管中并充分混匀,再加入 280 mmol/L 的醋酸镁溶液 2.5 μL,混匀后置于 40℃恒温仪中反应 4 min。将反应管从恒温仪中取出,上下翻转混匀 8~10 次,简短离心后再次置于 40℃恒温仪中反应 16 min。

1.3.5 RPA 产物的结果判断 按照 DNA 纯化回收

试剂盒的说明书将 RPA 反应产物进行纯化,测定核酸浓度及纯度后,通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

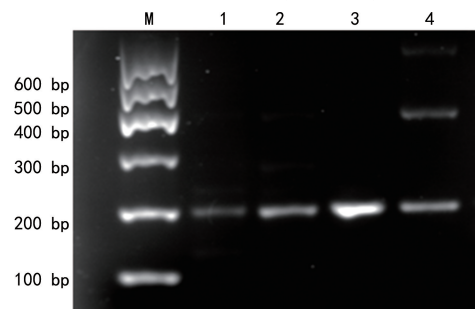
1.3.6 RPA 产物的验证 根据琼脂糖凝胶电泳检测的结果,选取部分阳性扩增产物送往上海生工生物工程有限公司进行测序,通过生物软件 VectorNTI 分析临床标本 RPA 产物的核酸序列与目标核酸序列的一致程度,验证扩增产物是否为目的条带。

1.4 统计学处理 采用 Excel 2007 软件进行数据分析。

2 结果

2.1 CSF 微生物培养结果 CSF 经微生物培养有 19 例(36.5%)为阳性。其中肺炎链球菌为 7 例;鲍曼不动杆菌 5 例;肺炎克雷伯菌 2 例;脑膜炎奈瑟菌、流感嗜血杆菌、单核细胞增生李斯特菌、缓症链球菌和黏质沙雷菌分别为 1 例。CSF 微生物培养阴性者为 33 例(63.5%)。

2.2 CSF RPA 检测的结果 52 例研究对象中,RPA 阳性为 14 例(26.9%),阴性为 38 例(73.1%)。CSF 标本的 RPA 产物电泳图见图 1,阳性标本能扩增出清晰的 RPA 条带,且条带大小符合预期长度(190 bp)。



注:M 为 DNA 分子质量标准;1~4 为 CSF 标本(患者编号为 1、3、4 和 6 号)。

图 1 CSF 标本 RPA 阳性扩增产物电泳图

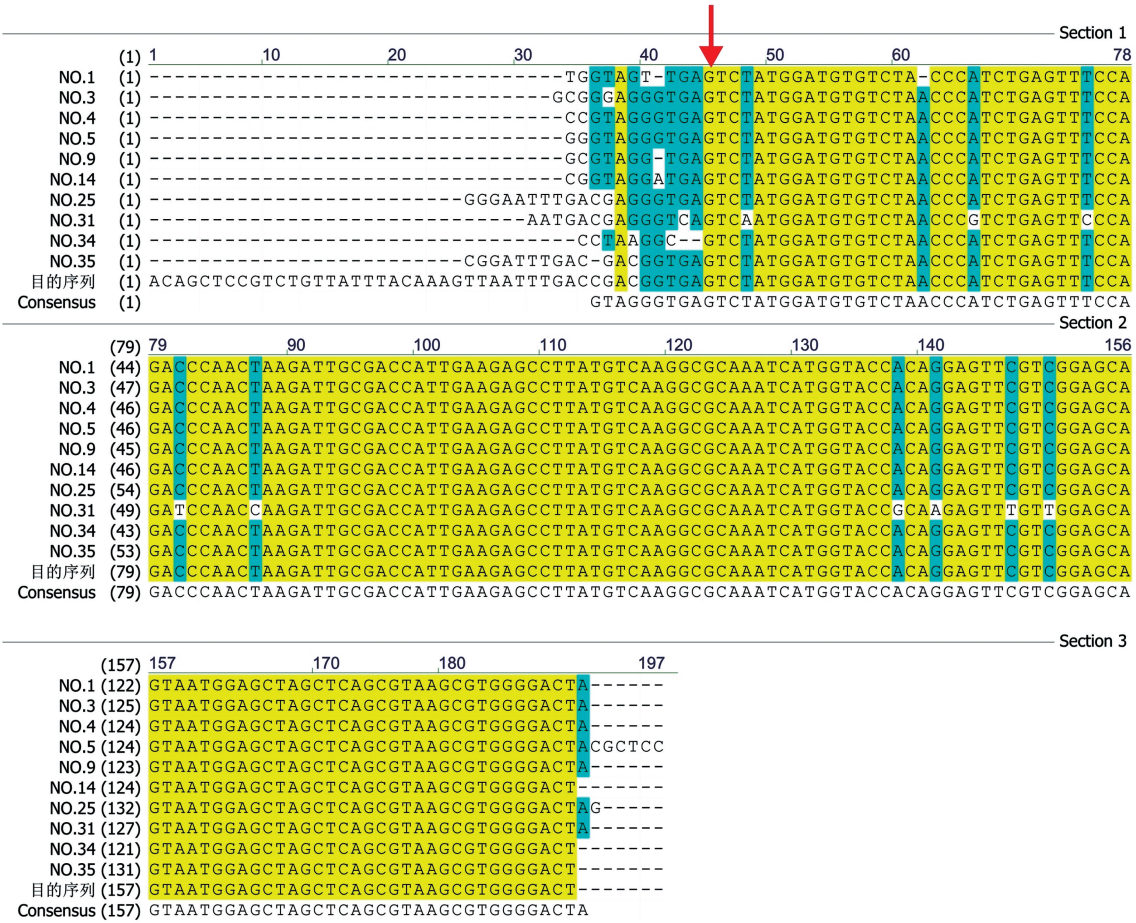
2.3 RPA 与微生物培养结果比较 微生物培养为阳性的 19 例(36.5%)患者中,有 7 例检出肺炎链球菌,这 7 例的 RPA 检测结果均为阳性。微生物培养为阴性的 33 例(63.5%)患者中,也有 7 例的 RPA 检测结果为阳性。这 7 例患者药物治疗史和 CSF 细胞学检查结果见表 1。有 12 例患者 CSF 标本的培养结果为非肺炎链球菌,其 RPA 反应均为阴性。

2.4 RPA 产物的测序结果 CSF 微生物培养和 RPA 检测结果均为肺炎链球菌的 7 例患者,随机选取 3 例(标本编号 3、9、14)RPA 产物进行测序。CSF 微生物培养为阴性,RPA 反应为阳性的 7 例患者的产物全部进行测序。共 10 份 RPA 的核酸产物与 LepA 基因的 190 bp 目标序列进行序列比对,结果见图 2。图中黄色代表相同的序列;蓝色代表相似的序列。测序时由于荧光染料的干扰,测序结果在引物 3' 端后面的 10~30 个碱基不一定能准确判读。在第 45 个碱基位置(箭头所示)以后 RPA 产物的核酸序列与目标序列一致,RPA 扩增成功并获得目的基因片段。

表 1 培养为阴性、RPA 检测为阳性患者的药物治疗史和细胞学检查结果

编号	性别	年龄 (岁)	腰椎穿刺前是否 接受药物治疗	药物名称	细胞学检查结果			
					白细胞计数 ($\times 10^6$ /L)	淋巴细胞 百分比(%)	单核细胞 百分比(%)	中性粒细胞 百分比(%)
1	男	50	是	—	4 050	6	15	79
4	女	1	是	头孢哌酮/他唑巴坦	630	17	15	68
5	男	28	是	青霉素、头孢曲松、更昔洛韦	5 600	3	15	82
25	男	40	—	—	6 120	16	7	77
31	男	82	—	—	9 600	3	5	92
34	男	47	—	—	5 280	7	11	82
35	女	30	是	—	390	3	24	73

注：—为不清楚。



注：图中黄色代表相同的序列；蓝色代表相似的序列；箭头为第 45 个碱基位置。

图 2 PRA 产物与目的序列的核酸比对结果

3 讨 论

细菌性脑膜炎的病情进展快,严重威胁人们的生命健康,需要早期诊断并及时给予有效的治疗。因此快速、准确的病原菌检测是临床确诊细菌性脑膜炎的关键。在微生物分子检测方法中,PCR 技术为病原菌的诊断提供了依据,已应用于 CNS 感染性疾病的诊断中^[10-11]。基因芯片技术在细菌性脑膜炎的诊断中也可见报道^[6,12-13]。但这两种方法都需要特定的仪器、设备和专业的人员,检测成本较高,在快速检测方面有不足之处。近年来,RPA 技术以其快速、灵敏度

高、特异性强的特点受到人们的关注,已应用于细菌、病毒和寄生虫等检测研究中^[14-17]。RPA 技术在恒温条件下(25~43 ℃),20 min 即可实现核酸指数扩增,这种常温扩增的优点使得该技术不需要精密的仪器,为床旁诊断提供了可能,满足了临床快速诊断的需求。

LepA 蛋白也被称为 EF4,是与蛋白质翻译密切相关的延伸因子,也是一个高度保守的蛋白,其编码基因 LepA 在原核生物中具有高度的序列保守性^[7]。有报道采用 LepA 基因对血液中肺炎链球菌进行了核酸扩增检测,研究发现肺炎链球菌的 8 株参考菌株

和 19 株临床分离株的检测结果均为阳性,其余 54 株非肺炎链球菌菌株的检测结果均为阴性,该研究表明 LepA 基因作为肺炎链球菌的检测靶点具有较好的特异度和灵敏度^[8]。

基于上述研究结果,本研究以 LepA 基因为分子诊断靶点,利用 RPA 技术检测临床 CSF 标本中的肺炎链球菌,以 CSF 微生物培养的结果作为标准,探讨 RPA 技术的应用价值。

研究表明 RPA 技术检测时间短,恒定 40 ℃、20 min 即可完成核酸的扩增,加上 CSF DNA 的提取和核酸产物凝胶电泳的时间,可以在 1 d 内得到检测结果。在本研究中,RPA 检出肺炎链球菌的阳性率为 26.9%(14/52),微生物培养技术检出肺炎链球菌的阳性率为 13.5%(7/52)。微生物培养结果为肺炎链球菌的 7 份 CSF 标本,其 RPA 检测结果为阳性,两种检测方法结果一致。另外有 7 份 CSF 标本,其微生物培养结果为阴性,但是 RPA 检测结果为阳性。这 7 例患者在本院就诊前,均有当地医院就诊史,根据患者的资料信息,笔者认为这 7 例患者是因为使用抗菌药物而降低了微生物培养的敏感性,患者 CSF 的中性粒细胞百分比为 60%以上且中性粒细胞吞噬细菌的能力强,所以微生物培养结果为阴性,但是 CSF 中存在肺炎链球菌的核酸物质,因此 RPA 结果为阳性。需要注意的是,本研究中的 RPA 引物是检测肺炎链球菌的特异性引物,所以微生物培养结果为非肺炎链球菌的标本 RPA 检测结果为阴性。

为进一步确认 RPA 产物序列的正确性,将 10 份 RPA 阳性产物纯化后与 LepA 基因目标序列进行核酸序列比对。从图 2 可知,31 号标本有 9 个位点的碱基与目的片段的碱基不一致,考虑 31 号标本中的肺炎链球菌在这 9 个位点发生了单个核苷酸的变异,其余 9 份 RPA 阳性产物的核酸序列与目标序列一致。该结果表明 RPA 成功扩增出目的基因片段。

RPA 技术可快速、准确地检测出 CSF 中的肺炎链球菌,有助于临床对肺炎链球菌性脑膜炎的早期诊断和治疗,也为细菌性脑膜炎其他病原菌的快速检测提供借鉴。CSF 病原菌的检测方法,如微生物培养技术、革兰涂片染色、免疫学及生化指标检测等方法都各有优势。RPA 技术应该与这些检测方法相互结合,相互补充,使得病原菌的检测不断向着简单快速、准确度高、床旁适用的方向发展。

参考文献

[1] VAN DE BEEK D,BROUWER M C,KOEDEL U,et al. Community-acquired bacterial meningitis[J]. Lancet, 2021, 398(10306):1171-1183.

[2] KIM K S. Investigating bacterial penetration of the blood-

brain barrier for the pathogenesis, prevention, and therapy of bacterial meningitis[J]. ACS Infect Dis, 2020, 6(1):34-42.

[3] LI J, MACDONALD J, VON STETTEN F. Review: a comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification[J]. Analyst, 2018, 144(1):31-67.

[4] 廖川,韦贵将. 重组酶聚合酶扩增技术的研究进展与应用[J]. 检验医学与临床, 2022, 19(22):3145-3149.

[5] 马巧妮,王萌,朱兴全. 重组酶介导扩增技术及其在病原微生物快速检测中的应用进展[J]. 中国生物工程杂志, 2021, 41(6):45-49.

[6] HOU Y, ZHANG X, HOU X, et al. Rapid pathogen identification using a novel microarray-based assay with purulent meningitis in cerebrospinal fluid[J]. Sci Rep, 2018, 8(1):15965.

[7] QIN Y, POLACEK N, VESPER O, et al. The highly conserved LepA is a ribosomal elongation factor that back-translocates the ribosome[J]. Cell, 2006, 127(4):721-733.

[8] CLANCY E, HIGGINS O, FORREST M S, et al. Development of a rapid recombinase polymerase amplification assay for the detection of Streptococcus pneumoniae in whole blood[J]. BMC Infect Dis, 2015, 15:481.

[9] 中华医学会神经病学分会感染性疾病与脑脊液细胞学学组. 脑脊液细胞学临床规范应用专家共识[J]. 中华神经科杂志, 2020, 53(11):875-881.

[10] 袁丽娜. 引发中枢神经系统感染性疾病常见病原体多重荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用[D]. 昆明:昆明理工大学, 2022.

[11] 吴婷娜,王旻晋,钟方财,等. 疑似中枢神经系统感染患者脑脊液病原体多重 PCR 检测结果的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(1):8-11.

[12] ZHAO C, WANG X, ZHANG C, et al. Development of a TaqMan Array card to target 21 purulent meningitis-related pathogens[J]. BMC Infect Dis, 2019, 19(1):289.

[13] BANNISTER S A, KIDD S P, KIRBY E, et al. Development and assessment of a diagnostic dna oligonucleotide microarray for detection and typing of meningitis-associated bacterial species[J]. High Throughput, 2018, 7(4):32.

[14] 闫雪,李明,张旭,等. 小鼠肝炎病毒逆转录-重组酶聚合酶扩增检测方法的建立、验证及应用[J]. 中国生物制品学杂志, 2022, 35(6):729-733.

[15] 陈家良,卢盼,王鲁彦,等. 基于重组酶聚合酶扩增技术快速检测霍乱弧菌中 SXT 元件[J]. 中国预防医学杂志, 2022, 23(9):705-708.

[16] 孙栋良,杨栋,金敏,等. 荧光重组酶聚合酶扩增技术快速检测甲型肝炎病毒[J]. 解放军预防医学杂志, 2020, 38(10):51-53.

[17] 王盛琳,邓王平,李银龙,等. 重组酶聚合酶扩增技术快速检测日本血吸虫核酸方法的建立[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2020, 38(3):293-298.