

多重半套式聚合酶链反应在检测脑脊液病原菌中的应用

闫志勇 王斌 毕春霞

【摘要】 目的 建立多重半套式聚合酶链反应(PCR)快速检测脑脊液标本中常见的病原菌。方法 通过对病原菌 16S rRNA 基因保守区和变异区的序列分析,设计通用引物及革兰阴性菌、革兰阳性菌的特异性引物,分别作为外、内侧引物,对脑脊液标本中不同细菌的 DNA 进行多重半套式 PCR 扩增,同时与常规细菌培养法作比较,并检测了该方法的敏感性。结果 外侧扩增后革兰阳性菌、革兰阴性菌经扩增后均有长约 1 032 bp 的片段产生;内侧扩增两种细菌除 1 032 bp 的产物外,革兰阳性菌另有一 336 bp 的特异性产物,革兰阴性菌另有一 127 bp 的特异性产物。该方法最低可检测出 8 cfu/ml 的大肠埃希菌 62 份脑脊液标本扩增结果与培养法相比,敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值分别为 93.8%、5.7%、88.2%、97.8%。结论 多重半套式 PCR 方法能特异、敏感、快速地检测出脑脊液感染的常见病原菌。

【关键词】 聚合酶链反应;脑脊液;细菌;16S rRNA 基因

Application of multiplex semi-nested polymerase chain reaction in detection of pathogens in cerebrospinal fluid YAN Zhi-yong*, WANG Bin, BI Chun-xia. *Department of Medical Microbiology, Qingdao University Medical College, Qingdao 266021 China

【Abstract】 Objective To establish a new method of multiplex semi-nested polymerase chain reaction(PCR) to detect pathogens in cerebrospinal fluid(CSF). **Methods** According to the analysis of the conservative and variable regions in bacterial 16S rRNA genes, we designed universal primers for all bacteria and specific primers for most gram-positive and gram-negative bacteria. All primers were added into the same reaction systems successively of a two-step PCR assay to amplify the different bacterial DNA in CSF, and the results were compared with common culture method with sensitivity and the specificity both detected at the same time. **Results** Both gram-positive and gram-negative bacteria amplified DNA fragment about 1 032 bp after first-step amplification with universal primers. In the second step, specific fragments of 336 bp and 127 bp were amplified in gram-positive and gram-negative bacteria respectively besides fragments of 1 032 bp; The detection limit for *E. coli* was 8 cfu/ml. The comparison of 62 CSF samples detected by both multiplex semi-PCR and conventional culture method revealed sensitivity, specificity, positive and negative values of 93.8%, 95.7%, 88.2%, and 97.8% respectively for PCR. **Conclusion** The result suggested that the multiplex semi-nested PCR we established was sensitive, specific and rapid method for clinical laboratory to detect pathogens in CSF.

【Key words】 Polymerase chain reaction; Cerebrospinal fluid; Bacteria; 16S rRNA gene

脑脊液标本病原菌感染的快速准确诊断一直是困扰临床实验室的一大难点。目前,国内外多采用传统的培养法,该法虽然较准确,但存在耗时、敏感性低等不易克服的缺点。聚合酶链反应(PCR)技术自问世以来已被广泛应用于病原菌感染的早期、快速检测,但是一般 PCR 只能针对特定的细菌 DNA 进行扩增,而临床实际操作中不可能用 PCR 逐一检

测每种可能的病原菌,因此,使该技术的应用受到了限制。对于本应无菌的组织 and 体液标本(如血液、脑脊液、膀胱中的尿液),只要确定有细菌存在即可断定为感染。根据这一特点,结合细菌 16S 核糖体(ribosomal RNA, rRNA)基因兼有保守性和变异性的特征^[1],我们成功地设计出所有细菌的通用引物(universal primer, UP),以及常见革兰阴性菌、革兰阳性菌的特异性引物,建立了多重半套式聚合酶链扩增(multiplex semi-nested PCR)的方法,对不同病原菌进行检测,并将该方法在临床脑脊液标本的检

测中进行了实际应用,现将结果报告如下。

材料与方法

1. 标本和对照菌株:大肠埃希菌(ATCC 11775)和金黄色葡萄球菌(ATCC 33589)标准菌株由中国药品生物制品检定所提供,肺炎克雷伯菌、脑膜炎奈瑟菌、铜绿假单胞菌、化脓性链球菌、腐生葡萄球菌、结核分支杆菌等为本室保存株。62份脑脊液标本采自1999年7月至2002年3月青岛市立医院、青岛大学医学院第一、第二附属医院疑为细菌性脑脊膜炎患者,每份标本2~4 ml,平均分为2份,分别用于细菌学常规检测和多重半套式PCR扩增。

2. 试剂及处理:DNA提取试剂盒购自美国Promega公司,Taq DNA聚合酶、dNTP等购自加拿大MBI公司,其他试剂由本微生物室自行配置。除Taq酶外,其他试剂均经过高压灭菌或用0.20 μm滤器抽滤处理。

3. 引物设计与合成:在美国生物技术信息中心(NCBI)基因库中查得56种(属)常见细菌的16S rRNA基因序列(其中革兰阴性菌31种,革兰阳性菌25种),用DNA star软件进行分析比较,在保守区各寻找一段保守序列作为外侧的通用引物UP₁和UP₂,根据变异区部分序列分别设计革兰阳性菌引物PG⁺和革兰阴性菌引物PG⁻(表1),由上海生物工程技术公司合成,稀释成10 μmol/L的应用液。各引物中,通用引物UP₁和UP₂除在第一步反应中共同扩增出1 032 bp的产物外,在第二步反应中,UP₁还作为PG⁺的上游引物,扩增出336 bp的特异性产物;UP₂作为PG⁻的下游引物,扩增出127 bp的特异性产物(图1)。

表1 多重半套式PCR引物序列

引物	序列(5'→3')	在16S rRNA基因中的位置*	长度(bp)	扩增产物的长度** (bp)
UP ₁	TACGTGCCAGCAGC CGCGTAATA	509~523	24	1 032
UP ₂	AGTAAGGAGGTGAT CCAACCGCA	1 541~1 522	23	
PG ⁺	GGAACCGTCTAAC ACTTAGCACT	845~822	24	336
PG ⁻	TGGGAGTGGGCTGT ACAAGAAGTA	1 414~1 437	24	127

* 引物在16S rRNA基因中的位置以大肠埃希菌为参照^[21];

** 由于不同16S rRNA基因变异区的长度存在差异,使各菌PCR扩增产物的大小并不完全一致,但一般差异较小,在琼脂糖凝胶电泳中位置变化不明显。本文为描述方便均以大肠埃希菌为参照

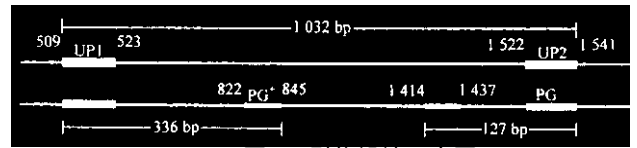


图1 引物设计示意图

4. 增菌和DNA的提取:将脑脊液标本接种于3 ml LB液体培养基中,37℃摇床增菌培养2 h,14 000 g离心5 min,弃去上清液,加入1 ml PBS缓冲液洗涤沉淀物,用基因组DNA提取试剂盒(美国Promega公司)提取DNA,最后溶于100 μl DNA水合剂作为扩增模板。大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌标准菌株,以及肺炎克雷伯菌、脑膜炎奈瑟菌、铜绿假单胞菌、化脓性链球菌、腐生葡萄球菌、结核分支杆菌等本室保存株,接种于5 ml LB培养基中,于37℃摇床振荡过夜,然后提取DNA。

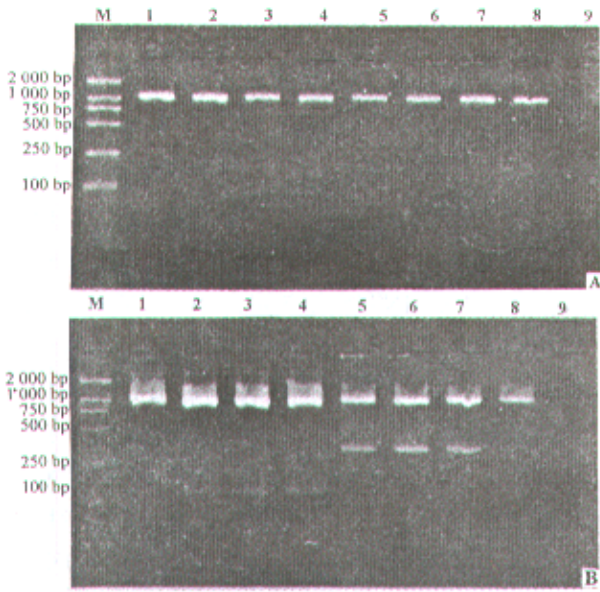
5. 多重半套式PCR扩增:先用通用引物UP₁和UP₂在进行PCR检测,PCR混合液(25 μl反应体系)组成:模板1 μl, Taq DNA聚合酶0.5 U, 2 mmol/L 4× dNTP 2.5 μl, 10× PCR buffer [100 mmol/L KCl, 100 mmol/L (NH₄)₂SO₄, 100 mmol/L Tris-HCl, pH 9.0, 1% Triton X-100] 2.5 μl, 引物UP₁和UP₂各1 μl。扩增条件为94℃ 6 min后,94℃ 1 min,54℃ 1 min,72℃ 2 min,30个循环后72℃延伸10 min。取扩增产物1.2%琼脂糖凝胶电泳并于紫外透射仪下观察,如有约1 032 bp大小的DNA片段,则证实该标本有细菌感染。取该扩增产物1 μl进行多重半套式PCR内套扩增以进一步鉴定细菌。反应体系中含引物UP₁、UP₂、PG⁺各1 μl,引物PG⁻ 2 μl,复性温度为52℃,其余同外侧扩增。

6. 通用引物PCR扩增敏感性测定:将大肠埃希菌标准株接种于LB培养基中,37℃摇床振荡培养至对数生长期,用无菌生理盐水做一系列1:10稀释,每一稀释度吸取1 ml加入无菌培养皿中,倾注适量预先保温到56℃的营养琼脂,37℃过夜后计数;将每一稀释度分别取1 ml提取DNA后,用通用引物进行外侧PCR扩增。

7. 脑脊液标本的常规细菌学检测:将62份脑脊液标本接种于专用增菌培养基后置于全自动细菌培养仪(BACTEC9120,美国B-D公司)培养,待仪器提示有细菌生长时,转种血液琼脂平板和巧克力色培养基,37℃分离培养18~24 h,涂片革兰染色,根据染色结果用自动细菌鉴定分析仪(WalkAway-40,美国DaDe公司)进行鉴定。

结 果

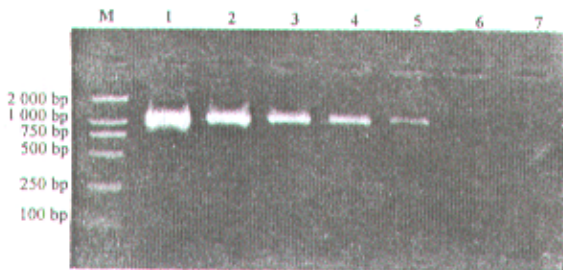
1. 多重半套式 PCR 的扩增结果 :对金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌标准菌株 ,以及本室保存的部分细菌菌株进行多重半套式 PCR 扩增的部分结果见图 2。经第一步扩增 ,所有细菌均有 1 032 bp 的产物 ,第二步扩增后 ,除有 1 032 bp 的 DNA 片段产生和结核分支杆菌外 ,革兰阳性菌另有一 336 bp 的特异性产物 ,革兰阴性菌有一 127 bp 的特异性产物形成。



A :外侧扩增结果 ;B :内侧扩增结果 ;M :DL 2 000 Marker ;1 :大肠埃希菌 ;2 :肺炎克雷伯菌 ;3 :脑膜炎奈瑟菌 ;4 :铜绿假单胞菌 ;5 :金黄色葡萄球菌 ;6 :化脓性链球菌 ;7 :腐生葡萄球菌 ;8 :结核分支杆菌 ;9 :水对照

图2 部分菌株的多重半套式 PCR 扩增结果

2. 通用引物 PCR 的敏感性 :将大肠埃希菌标准株做 1:10 系列稀释后 ,分别进行扩增 ,结果显示最低可检测出 8 cfu/ml 的大肠埃希菌(图 3)。



M :DL 2 000 Marker ;1~6 :大肠埃希菌菌液经 1:10 稀释提取 DNA 后的扩增结果 ,其浓度依次为 8 × 10⁴、8 × 10³、8 × 10²、8 × 10¹、8、8 × 10⁻¹ cfu/ml ;7 :阴性对照

图3 PCR 检测大肠埃希菌的敏感性

3. 脑脊液标本多重半套式 PCR 扩增和常规细

菌学检测结果的比较 62 份脑脊液标本经细菌学常规培养鉴定与多重半套式 PCR 扩增结果见表 2、3。根据表 2 计算出与培养法相比 ,本法的敏感性为 93.8% ,特异性为 95.7% ,阳性预测值为 88.2% ,阴性预测值为 97.8%。

表2 多重半套式 PCR 扩增与细菌学常规培养法检测脑脊液标本的结果比较

PCR 检测结果	常规细菌分离培养结果		标本总数
	+	-	
+	15	2	17
-	1	44	45
合计	16	46	62

注 :敏感性为 93.8% ,特异性为 95.7% ,阳性预测值为 88.2% ,阴性预测值为 97.8%

表3 62 份脑脊液标本细菌学常规培养鉴定和多重半套式 PCR 扩增鉴定结果

细菌名称	常规培养阳性份数	PCR 扩增阳性份数		
		UP	PG ⁺	PG ⁻
脑膜炎奈瑟菌	1	1		1
肺炎克雷伯菌	2	2		2
大肠埃希菌	1	1		1
都柏林沙门菌	1	1		1
荧光假单胞菌	1	1		1
铜绿假单胞菌	1	1		1
表皮葡萄球菌	3	3	3	
肺炎链球菌	1	1	1	
金黄色葡萄球菌	2	1	1	
腐生葡萄球菌	1	1	1	
草绿色链球菌	1	1	1	
产单核李斯特菌	1	1	1	
流感嗜血杆菌*	0	1		1
其他	0	1	1	
合 计	16	17	9	8

* 患者应用青霉素治疗后采集血样

表 3 所示 2 份脑脊液标本多重半套式 PCR 扩增检测阳性 ,而常规细菌分离培养阴性 ,其中 1 份标本为大量应用青霉素后采集 ,将该标本用含适量青霉素酶的增菌培养基增菌后重新分离培养证实为流感嗜血杆菌。1 份标本分离培养阳性(金黄色葡萄球菌) ,而 PCR 扩增阴性。

讨 论

脑脊液病原菌感染往往比较凶险 ,如不及时诊断和治疗将严重危及患者的生命。目前国内外对临床标本中病原菌的检验大多仍采用培养法 ,该方法尽管准确 ,但敏感性低 ,耗时长 ,易受细菌生理条件和抗生素的使用限制 ,且不能用于某些目前还不

能培养或新菌种的鉴定,故很难满足临床要求^[3,4],因此,对疑似严重感染的患者,临床医生往往来不及等待细菌培养结果,就盲目根据经验给患者使用大剂量广谱抗生素,故而很可能导致菌群失调和耐药细菌的产生。PCR虽早已应用于病原菌感染的检测,但一般PCR通常仅对特定病原体检测,而在病原体未明时,需用多种不同引物对多种病原微生物分别进行PCR扩增,往往费时费力,使PCR技术在临床病原体检测中的应用受到了限制。细菌等微生物的16S rRNA基因同时具有高度保守区和变异区,故既可作为细菌分类的标志,又可作为临床病原菌检测和鉴定的靶基因^[5]。此外,对于正常情况下无菌的组织 and 体液标本,如血液、脑脊液、膀胱中的尿液等,只要确定有病原菌DNA的存在即可断定为感染。故以细菌16S rRNA基因为靶分子已成为检测这些标本中病原菌感染的主要方案^[6-8]。我们设计的多重半套式PCR方法,集多重PCR、通用引物PCR和半套式PCR三种方法于一身,旨在先对可疑标本进行外侧的通用引物PCR,通过观察1032 bp片段的产生判断标本中是否有细菌的感染,作出初步诊断,然后再用一组特异性引物与通用引物一起进行多重半套式扩增,将细菌区分为革兰阳性菌和革兰阴性菌以指导临床用药。

我们用计算机软件比较了56种细菌的16S rRNA的基因序列,在上、下游各选一段保守区序列,参考Radstrom^[7]的引物序列并加以改进,重新设计了一对能够扩增出所有真细菌的通用引物。革兰特异性引物则是通过对31种革兰阴性菌、25种革兰阳性菌16S rRNA基因可变区序列的分析完全自行设计,目前尚无类似报道。由于不同16S rRNA基因变异区的长度存在差异,使各菌PCR扩增产物的大小并不完全一致,但一般差异较小,在琼脂糖凝胶电泳中位置变化不明显。此外,对于结核分支杆菌等革兰染色比较特殊的细菌,该特异性引物并不能将其加以区分。因此,当通用引物扩增出现1032 bp的条带,而进一步扩增无革兰染色特异性产物产生时,可提示标本中有此类细菌的感染。对于其他多数脑脊液中常见的病原菌,该套引物具有较好的特异性。

对来自青岛市的62份标本的检测中发现,脑脊液感染病原菌中传统的脑膜炎奈瑟菌仅有1例,其他大多为一些体内平时存在的条件致病菌,如肺炎

克雷伯菌、大肠埃希菌、表皮葡萄球菌、草绿色链球菌等,且分布较分散,未发现优势流行株的存在。2份脑脊液标本多重半套式PCR扩增检测阳性,而常规细菌分离培养阴性,其中1份标本为大量应用青霉素后采集,将该标本用含适量青霉素酶的增菌培养基增菌后重新分离培养,证实为流感嗜血杆菌;另外1例原因不明,推测可能为污染,或目前尚不能分离培养的其他细菌的感染。

16S rRNA基因在细菌基因组中以多拷贝的形式存在,因此,PCR检测该基因有较好的敏感性。另外,我们在采集标本后先接种LB培养基37℃空气浴震荡增菌培养2 h,使该方法的敏感性进一步提高,最低可检测出8 cfu/ml的大肠埃希菌。用本文建立的方法检测了62例脑脊液标本,与常规分离培养法相比,其敏感性、特异性、阴性预测值、阳性预测值都较高。但培养法一般需要至少72 h才能完成鉴定,而该实验过程,外侧扩增不超过4 h,全部扩增不超过7 h,加上标本的预处理,整个实验过程在24 h,完全能满足临床快速诊断的要求。

参 考 文 献

- Huysman E, Wachter RD. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acid Res*, 1986, 14(suppl):73-118.
- Brosius J, Palmer ML, Kennedy PJ, et al. Complete nucleotide sequence of a 16S rRNA gene from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978, 75:4801-4805.
- Lenoard J, Lascolea JR, Dryyia D. Quantitation of bacteria in cerebrospinal fluid and blood of children and its diagnostic significance. *J Clin Microbiol*, 1984, 19:187-190.
- Teng K, Li M, Yu W, et al. Comparison of PCR with culture for detection of *Ureaplasma urealyticum* in clinical samples from patients with urogenited infections. *J Clin Microbiol*, 1994, 32:2232-2234.
- Olsen GJ, Larsen N, Woese CR. The ribosomal RNA database project. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19(suppl):2017-2021.
- Creisen K, Loeffelholz M, Purohit A, et al. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol*, 1994, 32:335-351.
- Radstrom P, Backman A, Qian NY, et al. Detection of bacterial DNA in cerebrospinal fluid by an assay for simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* and *Streptococci* using a seminested PCR strategy. *J Clin Microbiol*, 1994, 32:2738-2744.
- Jiang J, Cheng LP, Shi YL, et al. Use of PCR with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol*, 2000, 38:2076-2080.

(收稿日期 2002-06-20)

(本文编辑:尹廉)