

· 实验室研究 ·

多重聚合酶链反应检测流感嗜血杆菌

田国忠 邵祝军 张砺 李晓静 朱兵清 杨亚静 徐丽 高源 王晓蕾

【摘要】 目的 建立检测流感嗜血杆菌的多重聚合酶链反应(M-PCR)方法。**方法** 合成扩增流感嗜血杆菌编码 P6 外膜蛋白基因的引物(Hi), 鉴定流感嗜血杆菌种特异性;合成扩增流感嗜血杆菌编码荚膜基因的引物(Hi-cap), 鉴定菌株是否具有荚膜;设计并合成 6 对扩增流感嗜血杆菌不同血清型(荚膜型)编码基因的引物(Hia~Hif), 鉴定菌株的血清型, 以其他呼吸道常见病原体菌株做对照, 应用M-PCR方法对 200 株临床分离的疑似流感嗜血杆菌菌株进行鉴定和血清分型。结果 M-PCR 方法检测流感嗜血杆菌具有高度的敏感性和特异性。对照菌株应用种(Hi)、荚膜(Hi-cap)和荚膜型(Hia~Hif)特异引物没有扩增出 DNA 片段。M-PCR 方法检测 DNA 的最低检测量为 0.935 pg。对临床分离的 200 株疑似流感嗜血杆菌鉴定, 189 株为流感嗜血杆菌, 与 API[®]NH 鉴定结果一致。其中 1 株具有荚膜, 为 f 血清型, 与玻片凝集法鉴定结果一致。**结论** M-PCR 方法检测流感嗜血杆菌具有较高的敏感性和特异性, 可用于流感嗜血杆菌感染病例标本的快速检测和病例诊断。

【关键词】 流感嗜血杆菌; 多重聚合酶链反应; 检测

Detection of *Haemophilus influenzae* by multiplex polymerase chain reaction method TIAN Guo-zhong*, SHAO Zhu-jun, ZHANG Li, LI Xiao-jing, ZHU Bing-qing, YANG Ya-jing, XU Li, GAO Yuan, WANG Xiao-lei. *National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Corresponding author: SHAO Zhu-jun, Email: shaozhujun@icdc.cn

【Abstract】 Objective To develop a rapid method for detecting *Haemophilus influenzae* by multiplex polymerase chain reaction (M-PCR). **Methods** Primers (Hi) were designed for amplification of p6 gene coding P6 protein of *Haemophilus influenzae*, which was used to identify *Haemophilus influenzae* species. Primers (Hi-cap) were designed for amplification of *bezA* gene which coding capsular polysaccharide (cap) synthesis was used for detecting whether *Haemophilus influenzae* isolates possess *bezA* gene relating to cap synthesis. Twelve primers (Hia-Hif) were designed for amplification of cap synthesis gene to identify the cap-type of *Haemophilus influenzae*. Other relative enteric pathogenic bacteria were amplified by M-PCR to serve as controls. 200 strains isolated from patients were identified. Results from M-PCR were compared to two methods including V and X factors grow requirement test and standard slide agglutination serotyping (SAST). **Results** The results indicated that the M-PCR assay was high specificity and sensitivity and might be valuable for differential diagnosis of *Haemophilus influenzae*. The sensitivity of detection was 0.935 pg. 189 strains out of the 200 belonged to *Haemophilus influenzae* isolates, and one isolate was cap-type f. An agreement results were seen among the V and X factors grow requirement test, SAST and M-PCR methods. **Conclusion** M-PCR method showed satisfactory sensitivity, specificity and stability for detecting and identifying *Haemophilus influenzae*, and could be used in clinic diagnosis, surveillance and rapid diagnosis for plague of *Haemophilus influenzae*.

【Key words】 *Haemophilus influenzae*; Multiplex-polymerase chain reaction; Detection

流感嗜血杆菌(Hi)感染可引起脑膜炎、肺炎、中耳炎、咽炎等急性传染病。其检测和病例的诊断多依赖于细菌的培养和对流免疫电泳方法^[1]。由于该菌分离培养较为困难,临床上抗生素的广泛使用也

导致了低的检出率。流感嗜血杆菌的血清抗体检测根据急性期和恢复期血清抗体效价的 4 倍升高进行判断,对于及时发现和诊断感染病例具有滞后性。PCR 方法已经在许多感染性疾病的快速检测和诊断中应用,本研究拟建立以 PCR 技术为基础的多重 PCR 方法(M-PCR)检测流感嗜血杆菌种特异性,检测流感嗜血杆菌是否具有荚膜,进一步鉴定菌株的血清型,为临床病例的快速诊断、疾病预防控制提供

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心传染病预防控制所(田国忠、邵祝军、朱兵清、徐丽、高源);成都市儿童医院(张砺、李晓静、杨亚静、王晓蕾)

通讯作者:邵祝军, Email: shaozhujun@icdc.cn

快速、准确的方法。

材料与方法

1. 实验菌株: 实验参考菌株均为美国疾病预防控制中心 (CDC) 惠赠, 包括 6 种血清型 (a~f) 和 1 株不可分型流感嗜血杆菌: m4741 (a 型)、m5216 (b 型)、m6542 (c 型)、m6548 (d 型)、m9418 (e 型)、m6297 (f 型)、m5209 (不可分型); 另外选用的对照菌株包括副流感嗜血杆菌、脑膜炎奈瑟菌不同血清群菌株 (A、B、C、W135、X、Y)、肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、嗜肺军团菌、肺炎克雷伯杆菌等菌株也均由美国 CDC 赠送。200 株临床分离菌株来自成都市儿童医院呼吸科肺炎病例, 90% 以上的病例为 5 岁以下儿童。所有实验菌株是通过菌落形态观察、革兰染色镜检、溶血试验、V 和 X 因子生长需求试验和 API[®] NH 生化鉴定系统等方法进行鉴定, 并采用流感嗜血杆菌诊断血清, 玻片凝集法对菌株进行血清型分型。菌株的 DNA 提取使用 QIAGEN 基因组提取试剂盒, 并进行 DNA 浓度测定, DNA 置 -20℃ 保存。

2. 试剂和仪器: API[®] NH 生化鉴定系统 (BioMerieux SA) 试剂, 流感嗜血杆菌诊断血清 (BD 公司), PCR 反应及电泳试剂包括 Taq DNA 聚合酶、dNTP (TaKaRa 公司)、琼脂糖 (Gene Tech 公司)、100 bp DNA Ladder Marker 和 Goldview[®] 核酸染料 (华美生物工程公司)。主要仪器有: Bio-RAD Gel Doc[™] XR 凝胶成像仪, Bio-RAD DNA EnginePCR 扩增仪, DYY-8B 型稳压稳流电泳仪, DNA 浓度测定仪 (Effendorf Biophotometer, RS-232C)。

3. 引物设计: 根据流感嗜血杆菌编码 P6 蛋白基因 (GenBank AY521618)、荚膜合成相关基因 (GenBank AF549212, Z33384-33394, Z37516) 等, 参考有关文献^[2-5], 应用 DNASTar 引物设计软件进行引物设计。流感嗜血杆菌种特异引物参照文献^[6]方法; 鉴定三种流感嗜血杆菌血清型 (b、d、e) 特异引物 (Hib、Hid、Hie) 参照文献^[2]方法; 鉴定三种流感嗜血杆菌血清型 (a、c、f) 特异引物 (Hia、Hic、Hif) 由本试验设计, 引物名称及序列见表 1, 引物合成由北京赛百盛生物技术有限公司完成。

4. PCR 扩增体系及条件: 25 μl PCR 反应体系中, 包括: 10× 缓冲液 (含 20 mmol/L Mg²⁺) 2.5 μl, 上、下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μl, 4 种 dNTP 混合物

2 μl (每种 dNTP 浓度均为 2.5 mmol), DNA 模板 1 μl, Taq DNA 聚合酶 (1 U/μl) 1 μl, 加灭菌双蒸水补足体积至 25 μl。PCR 反应条件: 94℃ 4 min; 94℃ 30 s, 不同引物的退火温度见表 1, 退火时间均为 30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 10 min。

表 1 引物、PCR 反应条件和预期扩增产物大小

鉴定流感嗜血杆菌	引物名称	引物序列 (5'-3')	退火温度 (°C)	产物片段 (bp)
种特异性	Hi-F	ACTTTTGGCGGTACTCTGT	50	273
	Hi-R	TGTGCCATAATACCAGCAT		
荚膜特异性	Hi-cap-F	CGTTTGTATGATGTTGATCCAGAC	50	343
	Hi-cap-R	TGTUCATGCTTCAAAATGATG		
a 型	Hia-F	TACTCATGCGACATTT	50	250
	Hia-R	AATATGACCTGATCTCTGT		
b 型	Hib-F	GCGAAAGTGAACCTCTATCTCTC	55	480
	Hib-R	GCTTACGCTTCTATCTCGGTGAA		
c 型	Hic-F	CTGTGTAGATGATGGTTCA	50	250
	Hic-R	AGAGGCAAGCTATTAGTGA		
d 型	Hid-F	TGATGACCGATACAACCTGT	50	150
	Hid-R	TCCACTCTTCAAACCATCT		
e 型	Hie-F	GGTAAOCAATGTAGTGGTAG	50	1350
	Hie-R	GCTTTACTGTATAAGTCTAG		
f 型	Hif-F	ACTATCAAGTCCAATC	42	450
	Hif-R	CAATTATGGAAGAAAG		

5. 引物特异性检测: 将流感嗜血杆菌种特异引物 (Hi)、流感嗜血杆菌荚膜特异引物 (Hi-cap) 以及 6 种流感嗜血杆菌血清型 (a~f) 特异引物 (Hia~Hif) 分别扩增所有实验菌株。

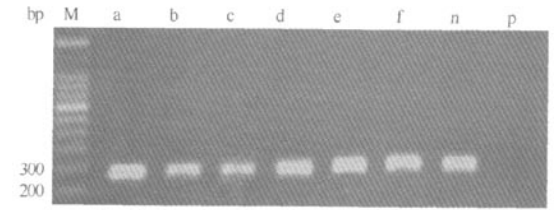
6. 灵敏性检测: 对流感嗜血杆菌参考菌株进行灵敏性试验。将提取的菌株 DNA 进行浓度测定, 然后进行一系列倍数稀释, 应用流感嗜血杆菌种特异引物、流感嗜血杆菌荚膜特异引物以及 6 种血清型 (a~f) 特异引物分别扩增所稀释的一系列浓度 DNA。

7. 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物: 取 3 μl PCR 扩增产物在 1% 的琼脂糖凝胶 (含 7 μl/100 ml GoldView 染料) 电泳 (0.5× TBE, 6 V/cm, 60 min), 100 bp DNA Ladder Marker 作分子质量标准。凝胶成像分析仪下观察并照相。

结 果

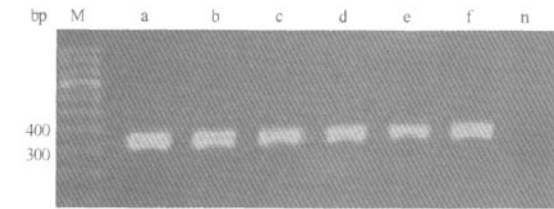
1. M-PCR 方法检测的特异性: 用种特异性引物 (Hi)、荚膜特异性引物 (Hi-cap) 和 6 个血清型特异引物 (Hia~Hif) 分别对流感嗜血杆菌 6 个血清型

(a~f) 菌株、不可分型菌株和对照菌株 DNA 进行 PCR 扩增。结果显示, 流感嗜血杆菌种特异引物均能扩增出 273 bp 的 DNA 片段(图 1), 11 株对照菌株(副流感嗜血杆菌、脑膜炎奈瑟菌等)均未扩增出特异性 DNA 片段。流感嗜血杆菌荚膜特异引物扩增 6 个血清型(a~f) 菌株, 均能扩增出 343 bp 的 DNA 片段(图 2), 而不可分型流感嗜血杆菌菌株, 以及副流感嗜血杆菌等对照菌株均未扩增出特异性 DNA 片段。流感嗜血杆菌 6 种血清型(a~f) 特异引物扩增所有的实验菌株, 只有相应血清型的流感嗜血杆菌菌株扩增出 DNA 片段(图 3), 无交叉现象。6 种血清型(a~f) 菌株 PCR 扩增的 DNA 片段大小见表 1。



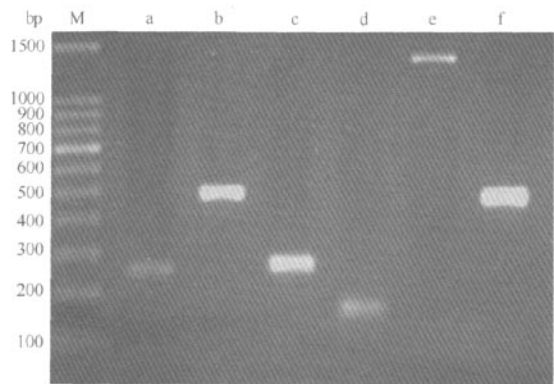
注: M: 100 bp Marker; a~f: 6 种荚膜型流感嗜血杆菌; n: 不可分型流感嗜血杆菌; p: 副流感嗜血杆菌

图1 M-PCR 方法检测流感嗜血杆菌种特异性



注: 同图 1

图2 M-PCR 方法检测流感嗜血杆菌荚膜特异性

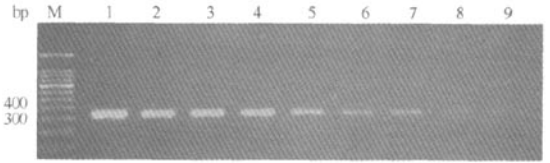


注: 同图 1

图3 M-PCR 方法检测流感嗜血杆菌血清型特异性

2. M-PCR 方法检测流感嗜血杆菌的灵敏性: 流

感嗜血杆菌种特异引物 PCR 检测 DNA 最低检测量为 2.5 pg, 荚膜特异引物检测 DNA 最低检测量为 0.935 pg, 电泳图谱见图 4。6 种血清型特异引物 PCR 检测 DNA 最低检测量为 1.87 pg。



M: 100 bp Marker; 1~9: PCR 扩增时 DNA 模板的量 15 ng、1.5 ng、0.15 ng、0.015 ng、7.5 pg、3.75 pg、1.87 pg、0.935 pg、0.467 pg

图4 M-PCR 方法检测流感嗜血杆菌灵敏性 (荚膜引物 PCR 扩增)

3. 临床分离菌株的检测结果: 对 200 株临床分离菌株应用流感嗜血杆菌种、荚膜和 6 个血清型(a~f) 特异引物进行 PCR 方法鉴定, 189 株为流感嗜血杆菌, 与 V、X 因子生长需求试验鉴定结果和 API[®]NH 鉴定结果一致, 其中 188 株为不可分型菌株, 1 株具有荚膜, PCR 鉴定为 f 型。189 株流感嗜血杆菌 PCR 血清型鉴定与血清玻片凝集法鉴定结果一致。

讨 论

在欧美国家, 自 1987 年起陆续将 Hib 偶联疫苗纳入儿童免疫规划中, 并且建立了以实验室为基础的侵袭性流感嗜血杆菌脑膜炎主动监测。这些国家 Hib 偶联疫苗应用后 Hib 引起脑膜炎的发病率下降了 80% 以上^[7,8]。通过实验室主动监测掌握了引起脑膜炎的流感嗜血杆菌血清型分布规律^[9,10]。Hib 偶联疫苗自 1998 年引进我国, 目前还没有纳入儿童免疫规划中, 监测工作也处于起步阶段。因此, 从主动监测方面迫切需要完善实验室检测方法。

目前国际上检测与鉴定流感嗜血杆菌的方法主要有, 菌落的形态观察、革兰染色镜检、V 和 X 因子生长需求试验、溶血试验、PCR 方法检测鉴定以及 API[®]NH 鉴定系统。玻片凝集法和 b 型乳胶凝集法对菌株进行血清型分型。而对分离培养阴性标本(血液、脑脊液和下呼吸道抽出液等) 的检测主要依据革兰染色镜检和 PCR 检测法。API[®]NH 鉴定系统被广泛应用, 但只能鉴定 API[®]NH 鉴定系统内所规定的菌种, 无法鉴定分离培养无菌生长的临床标本。对血清型分类而言, 玻片凝集法快速、简便, 但

用于检测的抗血清(a~f)存在着较高的假阳性和交叉凝集现象^[9,10]。PCR 方法不仅能够检测菌株,而且也可以检测脑脊液、血液等体液培养阴性的标本;不但能够鉴定流感嗜血杆菌种,鉴定流感嗜血杆菌菌株是否具有荚膜以及菌株的血清分型,而且还能解决由于 b 型菌株荚膜丢失导致玻片凝集法无法鉴定的问题^[2]。随着 Hib 偶联疫苗的应用,由 Hib 菌株感染的病例数下降,而其他血清型和不可分型菌株感染的病例数增多^[7,8],临床上抗生素的广泛使用也增加了实验室诊断上的难度,因此迫切需要一种敏感而特异的实验室诊断方法。PCR 方法具有较高的灵敏性和特异性^[2,9,10],而被广泛的应用于检测与鉴定流感嗜血杆菌。

在我国,应用 PCR 方法检测流感嗜血杆菌已有报道^[11-13],但只是参考国外文献对流感嗜血杆菌种、荚膜特性以及部分血清型进行检测与鉴定。本研究按照文献提供的实验方法进行菌株检测鉴定时^[2],发现血清型 a 引物(a1 和 a2)扩增 b 型 Hi 菌株时,有 600 bp 的 DNA 片段;采用血清型 c 引物(c1 和 c2)扩增 b、d 和 f 型 Hi 菌株及脑膜炎奈瑟菌时,除 b 型菌株外其他菌株也有弱的 250 bp DNA 片段;而使用血清型 f 引物(f1 和 f2)扩增 f 型 Hi 菌株时,除了有 450 bp 的电泳条带外还有两条非特异电泳条带。因此,我们应用 DNASTar 引物设计软件,结合已公布的流感嗜血杆菌的特征性基因,重新设计 a、c 和 f 血清型引物,优化了 PCR 反应条件,避免了实验的假阴性和假阳性,防止了非特异扩增,同时力争使 PCR 反应条件一致,在最短的时间内对菌株做出检测与鉴定,为临床病例的快速诊断、疾病预防控制工作中流感嗜血杆菌感染的评价提供快速、特异性的方法。该方法的结果与传统方法一致。

参 考 文 献

- [1] 沈舒庄,杨永弘,张桂荣,等. 细菌性脑膜炎 128 例病因学分析. 中华传染病杂志,1991,9(4):230-232.
- [2] Falla TJ, Crook DW, Brophy LN, et al. PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. J Clin Microbiol, 1994, 32(10): 2382-2386.
- [3] Satola SW, Schirmer PL, Farley MM. Genetic analysis of the capsule locus of *Haemophilus influenzae* serotype f. Infect Immun, 2003, 71(12):7202-7207.
- [4] Satola SW, Schirmer PL, Farley MM. Complete sequence of the cap locus of *Haemophilus influenzae* serotype b and nonencapsulated b capsule-negative variants. Infect Immun, 2003, 71(6):3639-3644.
- [5] Follens A, Veiga-da-Cunha M, Merckx R, et al. AcsI of *Haemophilus influenzae* type a capsulation locus region II encodes a bifunctional ribulose 5-phosphate reductase- CDP-ribitol pyrophosphorylase. J Bacteriol, 1999, 181(7):2001-2007.
- [6] van Ketel RJ, de Wever B, van Alphen L. Detection of *Haemophilus influenzae* in cerebrospinal fluids by polymerase chain reaction DNA amplification. J Med Microbiol, 1990, 33(4): 271-276.
- [7] Adams WG, Deaver KA, Cochi SL, et al. Decline of childhood *Haemophilus influenzae* type b (Hib) disease in the Hib vaccine era. JAMA, 1993, 269(2):221-226.
- [8] From the Centers for Disease Control and Prevention. Childhood vaccines — United States, 1995 — 1999. JAMA, 2001, 286(24): 3073-3074.
- [9] Luong DC, Ishiwada N, Takeda N, et al. Serotypes of *Haemophilus influenzae* strains isolated from pediatric patients with respiratory tract infections. Tohoku J Exp Med, 2004, 202(4):245-254.
- [10] LaClaire LL, Tondella ML, Beall DS, et al. Identification of *Haemophilus influenzae* serotypes by standard slide agglutination serotyping and PCR-based capsule typing. J Clin Microbiol, 2003, 41(1):393-396.
- [11] 袁艺,卢竞,郭章源,等. 聚合酶链反应检测流感嗜血杆菌. 中华微生物学和免疫学杂志,1997,17(1):25-27.
- [12] 陈志敏,汪天林,尚世强,等. 复合多聚合酶链反应技术在流感嗜血杆菌和 b 型流感嗜血杆菌联合检测中的意义. 浙江医学, 2001, 23(5):269-271.
- [13] 张莉滢,张双民,吕志跃,等. 广州地区患儿流感嗜血杆菌分离株荚膜基因分型的研究. 热带医学杂志,2007,7(8):722-725.

(收稿日期:2007-12-26)

(本文编辑:尹廉)