

· 技术与方法 ·

多重PCR结合毛细管电泳检测儿童呼吸道病原体方法的建立及应用

马菁菁¹, 陶桂香², 陈倩^{1*}

¹南京医科大学附属儿童医院儿科研究所, 江苏 南京 210029; ²南京医科大学儿科学院, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的: 建立肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*, MP)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, S.au)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, KP)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, P.Ae)、阴沟杆菌(*Enterobacter cloacae*, Ecl)、白色假丝酵母菌(*Candida albicans*, Cal)、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*, Aba) 7种儿童呼吸道病原体多重PCR结合毛细管电泳法检测体系。方法: 随机收集南京市儿童医院2020年11—12月266例儿童呼吸道病原体样本, 针对MP、S.au、KP、P.Ae、Ecl、Cal、Aba保守序列设计特异性引物, 设计并优化多重PCR结合毛细管电泳检测体系; 将该检测结果与细菌培养以及荧光定量PCR比对, 评估该方法的检测性能(灵敏度、特异度)。结果: 所设计引物可以特异性扩增出呼吸道病原体; 多重PCR结合毛细管电泳检测体系检出敏感性高; 与其他呼吸道感染病原体未出现交叉反应, 无明显非特异峰, 特异性较好。结论: 成功建立一种能够快速筛查7种常见儿童呼吸道病原体的多重PCR结合毛细管电泳的检测方法。

[关键字] 儿童; 呼吸道病原体; 多重PCR; 毛细管电泳

[中图分类号] R446.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2022)01-133-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20220126

急性呼吸道感染(acute respiratory infections, ARI)是儿科最常见的呼吸系统疾病, ARI的发病率占儿童呼吸系统疾病首位^[1-3], 据统计, 5岁以下儿童每年发生的600万例死亡中有100万例是由ARI引起的^[4-5], 给儿童的生长发育和身体健康带来了较大危害。许多病毒和细菌都能引起ARI, 并且由于患者可能携带不止一种病原体, 不同病毒之间以及病毒和细菌之间的临床体征相互重叠, 往往使得仅基于临床表现的病因诊断变得困难, 无法确定致病原因, 导致抗生素治疗无效, 造成抗生素滥用以及医源性交叉感染^[6-7], 因此需要对呼吸道病原体进行快速检测, 从而帮助诊断和准确用药。

目前国内外对呼吸道病原体检测的方法较多, 主要包括传统的分离培养方法、免疫学检测方法以及新兴的分子生物学检测方法^[8-10]。病毒的分离培养及鉴定周期较长; 免疫学方法在窗口期通常不能反映现症感染; 单病原体的PCR方法检测通量较低。随着病原体分子诊断技术的不断提高, 多重核

酸扩增检测, 已经被逐渐运用在临床检验过程中, 它是一种速度快、灵敏性高、特异性强的检测方法, 可以显著减少检测操作时间和成本, 并且能够快速得到结果^[11]。此外, 多重核酸扩增检测能够提供多目标产物的共扩增, 从而能够对呼吸道疾病混合感染的预后和复发提供重要信息。但是, 目前通常使用的多重PCR检测试剂盒检测病原体的种类有限: Zhang等^[12]的研究只能检测大肠杆菌的各种亚型, 不能检测多种病原体; 刘晓萌等^[13]对肺炎常见病原菌的多重PCR检测, 仅能检测肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、肺炎克雷伯菌3种病原体。这一现状导致在快速鉴别病原体方面存在较大困难, 不能及时指导临床治疗。

本研究以儿童常见呼吸道病原体: 肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*, MP)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, S.au)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, KP)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, P.Ae)、阴沟杆菌(*Enterobacter cloacae*, Ecl)、白色假丝酵母菌(*Candida albicans*, Cal)、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*, Aba)作为诊断目标, 建立多重PCR结合毛细管电泳法检测体系, 以提高儿童呼吸道感染诊断的效率。

[基金项目] 南京市医学科技发展课题(YKK17161); 南京医科大学科技发展基金(NMUB2019201)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: js_chenqian@sina.com

1 材料和方法

1.1 材料

引物由金斯瑞生物科技有限公司合成,磁珠法病毒总核酸提取试剂盒(西安天隆科技有限公司),毛细管电泳仪(Bioptic,江苏光鼎生物公司)。

1.2 方法

1.2.1 对象

随机收集南京市儿童医院 2020 年 11—12 月 266 例儿童呼吸道病原体临床检测剩余样本。

1.2.2 痰液处理及核酸提取

本研究创造性使用了一种高效核酸释放剂,使得细菌的细胞壁以及病毒的核衣壳充分破裂,核酸更加充分地释放出来。同时释放的核酸尤其是一些病毒的核酸是 RNA, RNA 非常不稳定,通过加入 RNA 酶抑制剂和 RNA 保护剂等,最大程度防止 RNA 的降解;又针对细菌核酸提取,在裂解液中加 chelex-100 提高核酸纯度。通过以上方式的优化,在痰液样本被充分液化的基础上,样本中的细菌或病毒被充分纯化,同时将后续核酸的提取时间从传统的柱膜法或磁珠法的 30~60 min 缩短到仅需约 8 min,核酸释放量也是传统方法的两倍左右。

1.2.3 引物设计、PCR 扩增体系及条件建立

我们利用相同的嵌合引物来设计特异引物,首先确定基本的 PCR 反应体系,进行单重 PCR,筛选出最佳基因特异性引物浓度。按照上述引物浓度以及 PCR 促进剂浓度[四甲基氯化铵(TMAC)、甜菜碱、BSA、四甲基亚砷(TMSO)、海藻糖等],进行了多

重扩增体系的摸索,最终建立起一个 7 重扩增体系,分别包括肺炎支原体、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、阴沟杆菌、白色假丝酵母菌、鲍曼不动杆菌。其引物设计如表 1 所示。扩增体系为 50 μ L: ddH₂O 34.5 μ L, 10 \times Taq buffer 5 μ L, dNTP Mix 1 μ L, Primer Pool 4.0 μ L, 模板 5 μ L, Taq 酶 0.5 μ L。单重 PCR 扩增条件方案: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s、55~60 $^{\circ}$ C 40 s、72 $^{\circ}$ C 30 s(10 个循环); 95 $^{\circ}$ C 15 s、55~60 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 30 s(20 个循环); 72 $^{\circ}$ C 5 min。多重 PCR 扩增条件方案: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s、58 $^{\circ}$ C 40 s、72 $^{\circ}$ C 30 s(10 个循环); 95 $^{\circ}$ C 15 s、60 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 30 s(20 个循环); 72 $^{\circ}$ C 5 min。

1.2.4 毛细管电泳检测

取 1 μ L 扩增后核酸样本,使用毛细管电泳仪对 PCR 扩增产物进行检测。

1.2.5 临床样本检测

采用上述建立方法检测 266 例临床检测剩余样本。

2 结 果

2.1 7 种呼吸道病原体单重 PCR 产物毛细管电泳检测分析

对 7 种呼吸道病原体: MP、S.au、KP、P.Ae、Ecl、Cal、Aba 分别进行单重 PCR 扩增,产物经毛细管电泳后均检测到相应片段,无明显的感染杂峰出现,引物设计合理(图 1)。

2.2 7 种呼吸道病原体多重 PCR 扩增结合毛细管电泳检测分析

对 7 种呼吸道病原体逐步进行多重 PCR 扩增,

表 1 本文所使用引物

引物名称	引物序列(5'→3')	退火温度($^{\circ}$ C)
肺炎支原体	AGGTGACACTATAGAATAAGACCCCTCCAATCCTTATCG	61
	GTACGACTCACTATAGGGAGGTTGCATCCTTCACCTTCAA	63
肺炎克雷伯菌	AGGTGACACTATAGAATAGAGAGCGACTCCAGCCAGAA	62
	GTACGACTCACTATAGGGACGCCGAAATCATAGCTTAACG	63
铜绿假单胞菌	AGGTGACACTATAGAATAGTTGTTTCATCGTGTTCCTT	59
	GTACGACTCACTATAGGGACGCACCAATACTTACGGCATT	63
金黄色葡萄球菌	AGGTGACACTATAGAATACACCTGAAACAAAGCATCCTAA	58
	GTACGACTCACTATAGGGAATACGCTAAGCCACGTCCAT	63
白色假丝酵母菌	AGGTGACACTATAGAATAGACCGTTCATTTGCTCAAYTATAT	58
	GTACGACTCACTATAGGGATTGACCACCCATAAGAATACCA	62
鲍曼不动杆菌	AGGTGACACTATAGAATAGAGTCACTTATTTGCGACCACC	60
	GTACGACTCACTATAGGGAGCGGAAAGCTCATCTTGTTTCAT	63
阴沟杆菌	AGGTGACACTATAGAATAGTTACCCCCTGATGAAAAGC	61
	GTACGACTCACTATAGGGAATCGCCACCTAATACGCCG	64

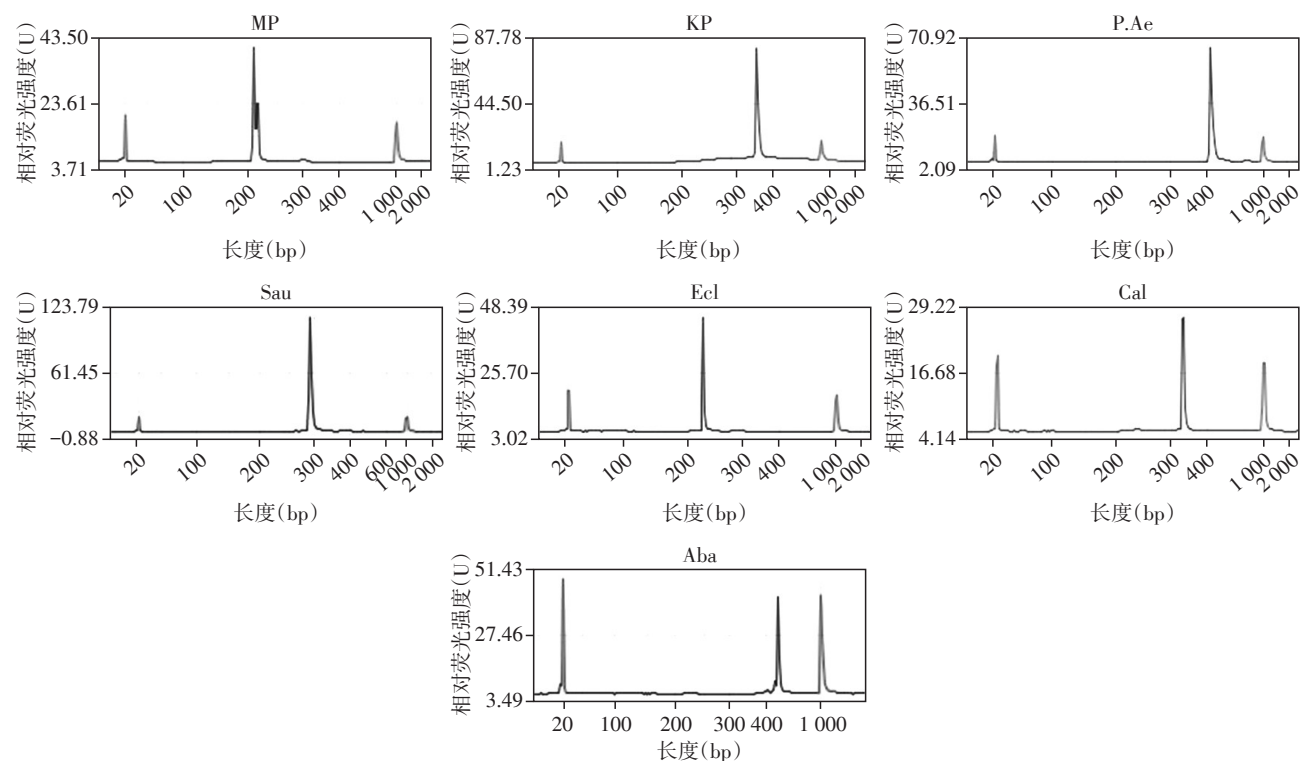


图1 7种呼吸道病原体单重PCR结合毛细管电泳检测结果

调整扩增程序以及引物浓度,至无非特异性扩增条带,最终建立一个7种呼吸道病原体多重PCR扩增结合毛细管电泳的检测系统,该系统扩增产物进行毛细管电泳,均检测到对应片段,无明显杂峰出现(图2)。

2.3 临床样本检测结果

对266例儿童呼吸道病原体痰液样本,进行7重PCR扩增并结合毛细管电泳分析,结果显示37例阳性,其中:8例肺炎支原体阳性(阳性率为3.0%),2例白色假丝酵母阳性(阳性率为0.8%),10例金黄色葡萄球菌阳性(阳性率为3.8%),8例肺炎克雷伯菌阳性(阳性率为3.0%),2例铜绿假单胞菌阳性(阳性率为0.8%),1例阴沟杆菌复合群阳性(阳性率为

0.4%),3例鲍曼不动杆菌阳性(阳性率为1.1%)。该检测结果同痰培养以及实时荧光定量PCR(因肺炎支原体较难培养,故与实时荧光定量PCR结果作对比)比较,敏感性提高,多检测3例(表2)。

2.4 多重PCR与单重PCR结合毛细管电泳检测的比较

在266例儿童呼吸道病原体痰液标本中,随机选择100例,分别进行7种病原体的单重PCR扩增并结合毛细管电泳和多重PCR结合毛细管电泳检测分析,结果一致(表3)。

3 讨论

引起儿童ARI的病原体种类较多,涉及多种病毒和细菌,且临床症状表现相似,因此临床医生很难根据临床症状做出准确的病因诊断,如何快速准确地检测出患者所感染的呼吸道病原体一直是临床诊断面临的难点^[14]。本研究建立了7种呼吸道病原体PCR扩增结合毛细管电泳分析的技术。

这种检测方法可以一次性检测并区分多种呼吸道感染病原体。本研究选取各种呼吸道感染病原体的保守序列进行PCR分析,在设计引物的同时注意不同病原体产物长度的差异化,以便于毛细管电泳的直观判断分析。阳性参考品经毛细管电

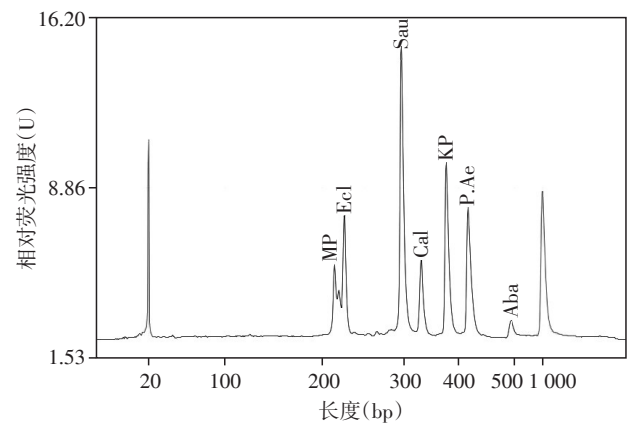


图2 7种呼吸道病原体多重PCR结合毛细管电泳检测结果

表2 两种检测方法阳性对比 (n)			
检测方法	阳性	阴性	合计
多重PCR结合毛细管电泳	37	229	266
痰培养及实时荧光定量PCR	34	232	266

表3 多重PCR结合毛细管电泳与单重PCR结合毛细管电泳检测方法对比 (n)

病原体	多重PCR结合毛细管电泳阳性个数	单重PCR结合毛细管电泳阳性个数
肺炎支原体	5	5
白色假丝酵母	0	0
金黄色葡萄球菌	4	4
肺炎克雷伯菌	3	3
阴沟杆菌复合群	0	0
铜绿假单胞菌	1	1
鲍曼不动杆菌	1	1

泳检测,条带长度与设计长度基本一致,未出现明显非特异性检测峰;利用此方法检测了2020年11—12月随机收集的266例儿童呼吸道病原体痰液样本,各病原体的检出率高于痰培养及实时荧光定量PCR,且检测时间远远短于细菌培养,能够满足临床实验室诊断的需求。除此之外,本研究在266例上述标本中,随机选取100例标本,进行7种病原体单重PCR结合毛细管电泳检测,该结果与多重PCR结果完全一致,进一步佐证了多重PCR结合毛细管电泳检测技术的可靠性。

多重PCR结合毛细管电泳检测,在发挥毛细管电泳检测技术优势的前提下,最大程度降低检测成本,提高检测效率^[15],未来该技术值得在临床大范围推广和应用。

[参考文献]

[1] NING G, WANG X, WU D, et al. The etiology of community-acquired pneumonia among children under 5 years of age in mainland China, 2001-2015: a systematic review [J]. Hum Vaccin Immunother, 2017, 13 (11) : 2742-2750

[2] 谢维波, 谢俊波, 鄞晓峰, 等. 儿童社区获得性肺炎支原体肺炎实验室检查特征分析[J]. 现代医药卫生, 2021, 37(1):26-29

[3] 陈小琴, 冯东举, 姚 堃. 340例儿童急性呼吸道感染常见病毒病原的检测[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2010, 30(12):1756-1759

[4] 李鑫淼, 刘世月, 吴凯峰. 儿童社区获得性肺炎病死率

预测评分[J]. 中外医疗, 2019, 38(34):196-198

[5] WANG X, LI Y, O'BRIEN K L, et al. Global burden of respiratory infections associated with seasonal influenza in children under 5 years in 2018: a systematic review and modelling study [J]. Lancet Global health, 2020, 8 (4) : e497-e510

[6] LI X, CHEN B, ZHANG S, et al. Rapid detection of respiratory pathogens for community-acquired pneumonia by capillary electrophoresis-based multiplex PCR [J]. SLAS Technol, 2019, 24(1) : 105-116

[7] BHUYAN G S, HOSSAIN M A, SARKER S K, et al. Bacterial and viral pathogen spectra of acute respiratory infections in under-5 children in hospital settings in Dhaka city [J]. PLoS One, 2017, 12(3) : e0174488

[8] 郑凯文, 黄晓园, 陈渡波, 等. 基于多重PCR和第二代高通量测序技术快速检测下呼吸道感染病原微生物方法的建立和应用[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(17) : 2066-2070

[9] ESPOSITO S, MENCACCI A, CENCI E, et al. Multiplex platforms for the identification of respiratory pathogens: are they useful in pediatric clinical practice? [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2019, 9:196

[10] 廖 佩, 陈 慧, 郭燕琪, 等. 基于封闭式卡盒的现场病原体检测系统的设计与实现[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2017, 37(2):139-148

[11] 贾雪洋, 任红宇, 聂旭冬, 等. 下呼吸道感染病原体检测方法研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2019, 35(3) : 263-270

[12] ZHANG J, XU Y, LING X, et al. Identification of diarrheagenic *Escherichia coli* by a new multiplex PCR assay and capillary electrophoresis [J]. Mol Cell Probe, 2020, 49: 101477

[13] 刘晓萌, 周 立, 王振虹, 等. 支气管异物并下呼吸道感染患儿病原菌多重PCR检测结果分析[J]. 精准医学杂志, 2020, 35(3):250-252

[14] 高 巍, 柴 丽, 方 昆. 某医院急性下呼吸道感染患儿病原菌分布特征分析[J]. 实用医技杂志, 2021, 28 (9):1105-1107

[15] LI Y, XU P, WAN Z, et al. Single-tube detection of nine bacterial antibiotic-resistance genes by a 2-dimensional multiplex qPCR assay based on fluorescence and melting temperature [J]. Mol Biol Rep, 2020, 47(10):7341-7348

[收稿日期] 2021-07-23
(本文编辑:陈汐敏)