

## 利用环介导等温扩增技术检测新型隐球菌

李东冬 王凯飞 陈荣 沈定霞

**【摘要】目的** 建立一种快速检测新型隐球菌的方法。**方法** 根据新型隐球菌的 18 S rRNA 基因序列设计内外引物各一对,在不同温度下对新型隐球菌进行环介导等温扩增,以探明环介导等温扩增法检测新型隐球菌最适宜的温度。对新型隐球菌、其他几种常见引起脑膜炎的病原菌以及部分种类的念珠菌进行扩增,以研究环介导等温扩增技术检测隐球菌的特异性。将新鲜培养的新型隐球菌稀释后加入非隐球菌感染患者的脑脊液中,模拟脑膜炎感染后的脑脊液环境,以研究环介导等温扩增技术检测新型隐球菌的敏感性。**结果** 环介导等温扩增法检测新型隐球菌在 60 °C ~ 65 °C 条件下均能实现良好扩增。环介导等温扩增法对其他病原菌的检测结果均为阴性,仅新型隐球菌的检测结果为阳性,特异性达到 100%。用环介导等温扩增法从脑脊液中检测新型隐球菌的最低检出限为 10<sup>2</sup> CFU/ml。用环介导等温扩增技术检测新型隐球菌性脑膜炎,能节省培养及传统鉴定的时间,从 DNA 的提取至反应结束在 2 ~ 3 h 内即可完成,大大减少了诊断所需时间。**结论** 环介导等温扩增是一种灵敏度高,特异性强,耗时短,且操作简便的检测新型隐球菌感染的方法。

**【关键词】** 环介导等温扩增; 新型隐球菌; 脑膜炎

**Loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of *Cryptococcus neoformans*** LI Dongdong, WANG Kaifei, CHEN Rong, SHEN Dingxia. Department of Microbiology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: SHEN Dingxia, Email: shendx301@sina.com

**【Abstract】Objective** To establish a method of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid detecting *Cryptococcus neoformans* (*C. neoformans*). **Methods** Two pairs of primers were designed according to 18 S rRNA gene sequence of *C. neoformans*. Performing LAMP at different temperatures in order to ascertain the optimum temperature of LAMP method for detection of *C. neoformans*, other common pathogens of meningitis and some species of candida were all amplified through LAMP, to investigate the specificity of detecting *C. neoformans* by LAMP assay. Fresh cultured of *C. neoformans* was diluted into different concentrations with non-cryptococcal infection cerebrospinal fluid, to build *C. neoformans* meningitis cerebrospinal fluid simulation environments. Sensitivity was evaluated through detecting *C. neoformans* of different concentrations in cerebrospinal fluid. **Result** LAMP assay could achieve good amplification between 60 °C and 65 °C. In Specificity test, only *C. neoformans* showed amplification, no specific reactions were found in other meningitis pathogens nor candidas, LAMP showed a specificity of 100%. The minimum detection limit of LAMP for *C. neoformans* from cerebrospinal fluid is 10<sup>2</sup> CFU/ml. Detecting *C. neoformans* with LAMP assay could save time for culture and conventional identification. From DNA extraction to the end of the reaction could be completed within 2-3 hours, greatly reducing the time needed for diagnosis. **Conclusion** LAMP could be a very simple, rapid method for detecting *C. neoformans* with high specificity and sensitivity.

**【Key words】** Loop-mediated isothermal amplification; *Cryptococcus neoformans*; Meningitis

新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*) 是一种侵袭力很强的病原菌,新型隐球菌脑膜炎是一种严重的中枢神经系统感染性疾病,病死率高。诊断新型隐球菌性脑膜炎的传统方法是通过墨汁染色镜检,或通过对培养后的菌落进行鉴定。环介导等温

扩增技术 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP), 为自 2000 年以来发展起来的一种新型快速扩增靶基因的技术<sup>[1]</sup>, 通过两对不同引物及具有链置换活性的 DNA 聚合酶实现对靶基因的扩增,能在恒温下进行,且具有高效、特异的优点。本研究利用 LAMP 方法研究脑脊液中不同浓度新型隐球菌的检测模型,为临床早期诊断新型隐球菌性脑膜炎提供新的诊断方法,报道如下。

## 资料与方法

### 一、引起脑膜炎的常见病原菌和常见致病的酵母类真菌

新型隐球菌菌株来自于临床患者标本,经 Vitek-MS 和 Vitek-2 明确鉴定为新型隐球菌。引起脑膜炎的其他病原菌肺炎链球菌、无乳链球菌、结核分枝杆菌分离自临床标本,脑膜炎奈瑟菌为卫生部检验中心的质控菌株。金黄色葡萄球菌为 ATCC29213, 流感嗜血杆菌为 ATCC49247。白念珠菌(ATCC90028)、近平滑念珠菌(ATCC22019)、酿酒酵母菌(ATCC4021338)采用美国菌种保存中心的标准菌株。光滑念珠菌、阿萨希毛孢子菌分离自临床患者标本,经 Vitek-2 和 Vitek-MS 明确鉴定。

### 二、试剂和仪器

真菌 DNA 提取试剂盒购自北京美莱博公司, LAMP 扩增反应的 Bst 聚合酶以及 LAMP 实时扩增浊度测定仪 LA-320 由日本荣研公司提供。荧光染料 SYBER Green I 购自大连宝生物公司。

### 三、引物

根据新型隐球菌的 18 S rRNA 基因序列,利用 LAMP 引物设计软件 Primer Explorer V4 设计引物。引物序列:外引物 F3: 5'-CGAAATGCGATAAGTA-ATGTGAA-3', B3: 5' -CACATTTAAGGCGCCG-3', 内引物 FIP: 5'-CCTTC-GGAATACCAAAGGGCCA-GAATTCAGTGAATCATCGAATC-3', BIP: 5' -ATGCCTGTTTGTGAGAGTTCATGAAA-CAAACACCCAAATCCAAGTC-3'。

### 四、DNA 的提取

肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、脑膜炎奈瑟菌、无乳链球菌、金黄色葡萄球菌和结核分枝杆菌均用煮沸法提取 DNA。新型隐球菌、光滑念珠菌、酿酒酵母菌、阿萨希毛孢子菌、近平滑念珠菌和白色念珠菌均按真菌的 DNA 提取试剂盒操作提取 DNA。

### 五、LAMP 扩增温度的优化

反应体系共 20  $\mu$ l, 包括内引物 FIB 和 BIP 各 1.6  $\mu$ mol/L, 外引物 F3 和 B3 各 0.2  $\mu$ mol/L, Tris-HCl (pH 8.8) 20 mmol/L, KCl 10 mmol/L, MgSO<sub>4</sub> 8 mmol/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 mmol/L, Tween 20 0.1%, Betaine 0.8 mol/L, dNTP 各 1.4 mmol/L, Bst 酶 1  $\mu$ l, 新型隐球菌模板 2  $\mu$ l (约 3 ng)。将以上组分充分混匀后,分别在 60  $^{\circ}$ C、63  $^{\circ}$ C、65  $^{\circ}$ C 和 67  $^{\circ}$ C 4 个恒温条件下反应,反应时间均为 60 min。

### 六、结果判读与数据的处理

LA-320 实时扩增仪能利用反应管中浊度的变化来判定结果是否为阳性,当反应的样本 60 min 内在 650 nm 的吸光度 (*A*) 达到 0.1 的则判定为阳性。此外,在反应产物中加入 SYBER Green I 2  $\mu$ l, 阳

性反应显示为荧光绿色,阴性反应为橙色,通过颜色的变化同样能判断反应结果。

## 结果

### 一、扩增温度的优化

在 60  $^{\circ}$ C 和 65  $^{\circ}$ C 这一温度范围之内,样本均实现了 60 min 内的最大扩增,60  $^{\circ}$ C 与 63  $^{\circ}$ C 时的扩增曲线比较无差异,均在反应开始后的 25 min 达到了最大扩增速率,65  $^{\circ}$ C 时在则在反应的 40 min 达到了最大扩增速率。67  $^{\circ}$ C 在 60 min 内无扩增曲线。提示选择 63  $^{\circ}$ C 作为优化的温度。

### 二、特异性试验

将优化过的反应条件应用于新型隐球菌及光滑念珠菌、酿酒酵母菌、阿萨希毛孢子菌、近平滑念珠菌、白色念珠菌、肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、无乳链球菌、脑膜炎奈瑟菌、金黄色葡萄球菌和结核分枝杆菌等作为特异性试验对照组的病原菌。仅新型隐球菌及阳性对照出现了明显的扩增曲线,其余反应结果均为阴性,扩增曲线见图 1 所示。

### 三、LAMP 法对脑脊液中的新型隐球菌检测的敏感性试验

将在沙氏平板上生长 48 h 的新型隐球菌的纯菌落,利用常规细菌学检查为阴性(离心后涂片革兰染色、墨汁染色和抗酸染色均为阴性)的脑脊液充分混悬,用牛鲍计数池进行计数,将新型隐球菌分别稀释至约 10 CFU/ml、10<sup>2</sup> CFU/ml、10<sup>3</sup> CFU/ml 和 10<sup>4</sup> CFU/ml 的浓度,以模拟新型隐球菌性脑膜炎的脑脊液环境。采用试剂盒从混有不同浓度新型隐球菌的脑脊液中提取得到 DNA,以优化后的 LAMP 扩增方法进行扩增。以未加入新型隐球菌的脑脊液作为阴性对照。浓度为 10<sup>2</sup> CFU/ml、10<sup>3</sup> CFU/ml 和 10<sup>4</sup> CFU/ml 的反应均显示出扩增曲线,而 10 CFU/ml 未出现扩增。向反应结束后的反应管中加入 SYBER Green I 的结果如图 2 所示,与实时扩增的结果一致。

## 讨论

新型隐球菌广泛分布于自然界,是条件致病菌,但为引起颅内感染重要的病原菌之一,同时也可以引起血流感染和肺部感染等其他深部感染,尤其容易侵袭免疫力低下的患者群,新型隐球菌性脑膜炎已成为艾滋病患者的首发表现之一,艾滋病患者合并新型隐球菌的病死率已高于合并结核的病死率<sup>[2-4]</sup>。器官移植术后的患者合并新型隐球菌的感染也较为常见<sup>[5]</sup>。新型隐球菌容易在患者体内形成播散性感染,致死率很高,因此,早期确诊非常重要。



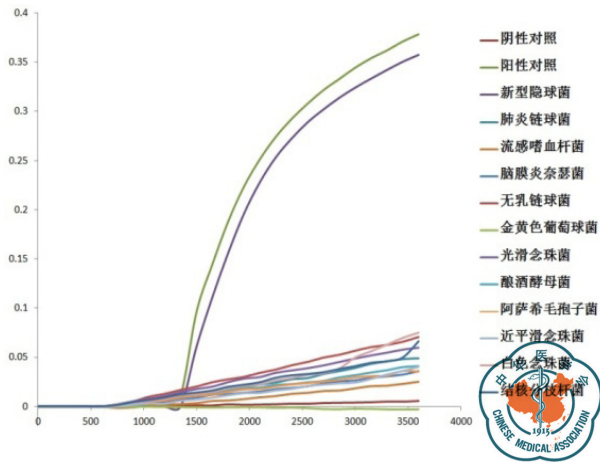
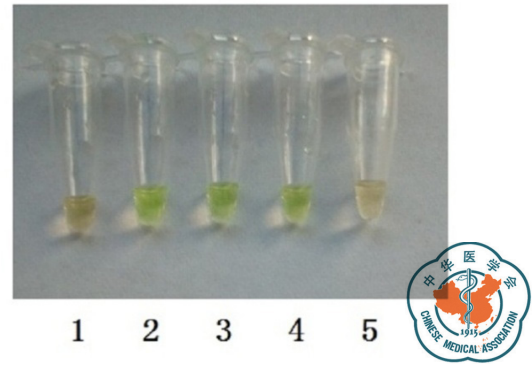


图1 LAMP 扩增浊度仪实时扩增曲线图

新型隐球菌快速诊断方法主要有墨汁染色、隐球菌血清抗体检测,脑脊液乳胶凝集试验等,但其敏感性和特异性都无法满足临床的需求。新型隐球菌感染患者体液中的隐球菌的多聚糖荚膜抗原能用ELISA的方法检测,但此法与毛孢子菌属及某些阴性菌存在交叉反应<sup>[6]</sup>。脑脊液乳胶凝集试验的敏感性能达到93%到100%,但多种因素如类风湿因子、抗核抗体等均可导致乳胶凝集试验出现假阳性<sup>[7-8]</sup>。张志等<sup>[9]</sup>建立了基于荧光定量PCR反应的对新型隐球菌性脑膜炎的分子诊断方法,敏感性较墨汁染色法(54%~74%)大大提高,但由于仪器设备的限制,无法进行推广和应用。本研究所应用的LAMP实时扩增浊度测定仪LA-320是基于LAMP反应中核酸大量合成时产生的副产物——焦磷酸镁沉淀引起浊度的变化来判断反应结果,此外,在反应结束后向管中加入荧光染料能产生肉眼可辨的颜色变化,同样能判读反应结果,无需特殊仪器。

LAMP是Notomi在2000年开发的一种特殊的扩增反应,利用具有链置换特性的DNA聚合酶(Bst酶),在等温条件(65℃左右)下可高效、快速、高特异扩增靶序列。目前LAMP方法不仅在检测病原菌广泛应用,且能应用于癌前的分子诊断。韩慧等<sup>[10]</sup>对新型隐球菌荚膜相关蛋白基因(CAP10)设计的LAMP试验,同样能检测新型隐球菌,但需要对新型隐球菌的RNA进行逆转录,且需要提取质粒,对评价机体是否有活菌存在以及评价药物治疗效果具有一定价值,而本研究采用对18S rRNA基因设计的引物,操作步骤较为简便,能便捷快速地检测新型隐球菌,更好地为脑膜炎患者的病原学诊断提供依据。

本实验中选取了引起脑膜炎最常见的病原菌共11种,涵盖了以新生儿感染为主的无乳链球菌,以儿童感染为主的脑膜炎奈瑟菌、流感嗜血杆菌、肺



注:1~4的新型隐球菌浓度依次为10<sup>1</sup>CFU/ml、10<sup>2</sup>CFU/ml、10<sup>3</sup>CFU/ml和10<sup>4</sup>CFU/ml,5为阴性对照

图2 敏感性试验的SYBER Green I染色结果

炎链球菌<sup>[11]</sup>,以成人感染为金黄色葡萄球菌、结核分枝杆菌和临床常见的真菌,其中光滑念珠菌、酿酒酵母菌不形成菌丝,与新型隐球菌具有相似性。扩增曲线显示,LAMP法扩增特异性很强,仅对新型隐球菌产生了扩增,其他反应均为阴性。对模拟的新型隐球菌性脑膜炎的脑脊液进行敏感性的试验显示,当脑膜炎中的新型隐球菌达到10<sup>2</sup>/ml时,用LAMP方法即可直接检出。与荧光PCR的最低检测下限10<sup>2</sup>/ml相同,可见其敏感性非常高。

新型隐球菌感染的致死率高、预后差,且由于治疗新型隐球菌引起的感染所用的抗真菌药物有别于其他念珠菌感染,常用治疗药物两性霉素B和氟胞嘧啶等具有一定的毒副作用<sup>[12]</sup>,及早确诊对患者意义重大。传统鉴定新型隐球菌的时间,从进行脑脊液的培养开始,到生化反应结果的读取至少需要4d。荧光PCR等分子诊断大大缩短了确诊的时间。从本研究可以得出,LAMP法检测新型隐球菌性脑膜炎的敏感性和特异性都可以与传统PCR相提并论,且读取结果时间更短。但LAMP还具有恒温且反应适宜温度范围较宽的特点,该特点使得LAMP技术不依赖特殊的反应仪器,也不需要用电泳来观察阳性结果,从而降低了检测成本。

LAMP方法检测新型隐球菌简单、快速、敏感性和特异性都很强,能排除其他常见病原菌对诊断的干扰,为早期诊断新型隐球菌性脑膜炎及其他新型隐球菌感染提供一种实用而可靠的方法。

格特隐球菌(*Cryptococcus gattii*, *C. gattii*)曾被认为是新型隐球菌的变种,但近年已经被确定是隐球菌属的一个种<sup>[13]</sup>。其菌落形态、生化反应等与新型隐球菌相似,难以用实验室常规方法将二者区分开。本实验采用新型隐球菌的基因序列设计的引物,未进行格特隐球菌的检测,能否同时检测到脑脊液中的格特隐球菌,尚需进一步的研究来证明。

## 参 考 文 献

- 1 Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*,2000,28(12):E63.
- 2 Del Poeta M, Casadevall A. Ten Challenges on *Cryptococcus* and *Cryptococcosis*. *Mycopathologia*,2012,173(5-6):303-310.
- 3 叶玉兰. 以新型隐球菌脑膜炎为首表现的艾滋病13例临床分析. *中国社区医师(医学专业)*,2011,13(3):105-106.
- 4 张米, 杨绍敏, 李正伦. 艾滋病合并新型隐球菌肺炎和新型隐球菌脑膜炎2例. *中华实验和临床感染病杂志:电子版*,2008,2(1):112-114.
- 5 杨雅骊, 都琳, 温海, 等. 肾移植术后隐球菌性脑膜炎的临床分析. *中国真菌学杂志*,2013,8(2):78-82.
- 6 Huston SM, Mody CH. Cryptococcosis: an emerging respiratory mycosis. *Clin Chest Med*,2009,30(2):253-264.
- 7 常杏芝, 李若瑜, 王欲琦, 等. 脑脊液乳胶凝集试验在儿童新型隐球菌性脑膜炎诊断和治疗中的应用. *中国当代儿科杂志*,2011,13(2):115-118.
- 8 Lin TY, Yeh KM, Lin JC, et al. Cryptococcal disease in patients with or without human immunodeficiency virus: clinical presentation and monitoring of serum cryptococcal antigen titers. *J Microbiol Immunol Infect*,2009,42(3):220-226.
- 9 张志, 黄宗青, 沈琪, 等. 新型隐球菌性脑膜炎分子诊断方法的建立. *中华检验医学杂志*,2007,30(10):1185-1187.
- 10 韩慧, 胡子有, 吴炳义. 荧光定量PCR和环介导等温扩增方法检测隐球菌CAPI0基因的比较研究. *南方医科大学学报*,2012,32(6):817-820.
- 11 蒋鸿超, 奎莉越, 黄海林, 等. 116例细菌性脑膜炎儿童脑脊液病原菌分布及耐药性分析. *中国当代儿科杂志*,2013,15(4):264-267.
- 12 连江山, 李小芬, 刘薇, 等. 两性霉素B 脂质体、氟胞嘧啶和伊曲康唑联合治疗隐球菌性脑膜炎的临床回顾性研究. *中国微生物学杂志*,2012,24(9):819-824.
- 13 Center of Disease Control and Prevention. Emergence of *Cryptococcus gattii*-Pacific Northwest, 2004-2010. *Am J Transplant*,2011,11(9):1989-1992.

(收稿日期: 2013-08-26)

(本文编辑: 孙荣华)

李东冬, 王凯飞, 陈荣, 等. 利用环介导等温扩增技术检测新型隐球菌[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2014, 8(1): 80-83.



中 华 医 学 会