

· 临床论著 ·

基因芯片法检测脑脊液病原菌的临床应用

刘志忠 张艳 石广志

【摘要】 目的 分析细菌芯片检测开颅手术后疑似感染者脑脊液标本中临床常见致病菌的可行性。**方法** 留取疑似感染者脑脊液标本,使用细菌DNA专用试剂盒提取总DNA,多重PCR扩增待测菌16S rRNA和23S rRNA特异序列片段,PCR产物与芯片杂交,检测病原菌。该检测结果与常规培养结果进行比较。**结果** 200例疑似感染者脑脊液标本中检出9种(属)病原菌,与常规细菌学检查法检测结果的符合率达到97.0%(194/200)。**结论** 寡核苷酸芯片法检测疑似感染者脑脊液中病原菌具有简便、快速、准确和高通量等优点,适合于临床样本检测及流行病学现场调查。

【关键词】 基因芯片;病原菌;脑脊液

Detection of bacterial pathogens in cerebrospinal fluid from patients with suspected meningitis by oligonucleotide microarray LIU Zhi-zhong, ZHANG Yan, SHI Guang-zhi. Intensive Care Unit, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China.

Corresponding author: SHI Guang-zhi, Email: shigzh@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To explore the feasibility of screening bacterial pathogens in cerebrospinal fluid (CSF) from patients with suspected meningitis by oligonucleotide microarray. **Methods** Total of 200 specimens of CSF were collected in this study. The bacteria DNA in CSF were extracted. Multiple polymerase chain reaction (PCR) was applied to amplify the segments of 16S rRNA and 23S rRNA genes of the target bacteria, then the PCR product was identified by oligonucleotide microarray. At the same time, all CSF specimens were detected by routine bacteriological examinations. **Results** Among the 200 CSF specimens, nine bacterial pathogens were detected by oligonucleotide microarray. The coincidence rate of gene chip detection and routine bacteriological examinations was 97.0% (194/200). **Conclusions** The established assay in this study based on oligonucleotide microarray has many advantages such as convenient, rapid, accurate, stable and high flux, which is suitable for clinical specimen detection and epidemiological field investigation.

【Key words】 Oligonucleotide microarray; Pathogenic bacteria; Cerebrospinal fluid

中枢神经系统感染是临床医师尤其是神经内外科医师面临的重要挑战,其导致患者病死率和致残率居高不下^[1]。导致中枢神经系统感染治疗困难的原因众多,除了易感人群的增加(老年、创伤、肿瘤患者等),滥用抗菌药物和细菌严重耐药外,还与早期诊断困难、确诊周期长有关。颅内感染时脑脊液病原体的检查是早期诊断和治疗的关键^[2]。目前,临床上细菌鉴定仍主要采用基于表型检测的生化反应,仅有极少数细菌感染采用基因水平的分子生物

学鉴定技术^[3]。基因芯片检测技术具有快速、准确以及高通量等优点,已被广泛应用于基因突变、多态性分析、微生物鉴定和疾病基因诊断等领域。

本研究拟探讨基因芯片检测开颅手术后疑似感染者脑脊液标本中临床常见病原菌的可行性,为临床快速筛查和诊断脑脊液中病原菌提供一种新的技术手段。

资料与方法

一、疑似感染者脑脊液样本的收集

留取2012年3月至2012年5月进行脑脊液培养检查患者的脑脊液标本(与用于培养的标本同时取样),每例1~2 ml,10 000 r/min离心10 min后

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2013.02.008

基金项目:首都医科大学附属北京天坛医院学科振兴基金(No. ZX2011-02)

作者单位:100050 北京,首都医科大学附属北京天坛医院检验科(刘志忠、张艳),ICU(石广志)

通讯作者:石广志,Email: shigzh@yahoo.com.cn

于-20℃冻存。培养阳性的35例脑脊液标本全部进行芯片检测,从培养阴性的标本中随机选取165例用于芯片检测,共200例标本入组。

二、用于细菌检测的基因芯片

所用基因芯片购自潮州凯普生物化学有限公司,所有检测菌种(属)根据文献^[4]报道的开颅手术后脑脊液感染的临床常见致病菌确定。

1. 芯片检测:在GenBank查得选定细菌16S rRNA和23S rRNA的基因序列,应用DNA STAR程序对检索到的基因序列进行碱基序列列阵比较,确定细菌的高度保守区和各细菌相对变化区。然后再采用Primer 5.0软件在保守区寻找通用引物,在特异引物序列之间选取针对每一种靶病原菌的候选探针,长度约20 bp。经BLAST特异性分析,与其他细菌和病毒等无相似性。筛选出的引物和探针由上海英俊生物技术有限公司合成,引物的5'-端标记生物素。寡核苷酸芯片点样模式表见图1。

生物素	内部质控点		
革兰染色 阳性菌	金黄色 葡萄球菌	凝固酶阴性 葡萄球菌	肠球菌
革兰染色 阴性菌	鲍曼不动杆菌	铜绿假单胞菌	大肠埃希菌
肺炎克雷伯菌/ 肠杆菌属	肺炎克雷伯菌	产气肠杆菌	阴沟肠杆菌

图1 芯片检测菌种(属)图示

2. 芯片能够检测致临床脑脊液感染常见的10个种(属)病原菌:包括金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、肠球菌(*Enterococcus*) [包括粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)和屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)]、凝固酶阴性葡萄球菌(*Coagulase negative staphylococcus*)、大肠埃希菌(*Escherichia coli*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)、产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)和肺炎克雷伯菌/肠杆菌属(*Klebsiella pneumoniae/Enterobacter*)。

3. 质控系统:阴性对照,无菌生理盐水;阳性对照,生理盐水配制的金黄色葡萄球菌

(ATCC25923)菌液5 ml,浓度为 $10^3 \sim 10^4$;内部质控点(internal control, IC),人 β -actin基因;生物素点(Bio),标记生物素的一段基因序列,预先加入杂交液,杂交时与芯片膜上相应探针结合。

经197株临床分离培养细菌所制备的菌液验证,芯片检测特异性为97.05%,革兰阴性菌灵敏度为 $10^2 \sim 10^3$ CFU/ml,革兰阳性菌灵敏度为 10^3 CFU/ml。

三、细菌基因组DNA的提取

采用天根生化科技(北京)有限公司的细菌基因组DNA提取试剂盒提取细菌DNA,操作严格参照说明书进行。

四、PCR扩增

1. PCR扩增体系:PCR扩增体系为25 μ l,详见表1。

2. 扩增条件:95℃预变性9 min; 95℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s,共35个循环; 72℃延伸5 min。

五、导流杂交与结果判读

将反应膜条装入杂交仪中预热10 min,加入500 μ l杂交液,将PCR产物于95℃变性5 min,立即置于冰上2 min,然后加入到芯片上,在凯普医用核酸分子快速杂交仪于42℃进行快速杂交15 min,采用洗液进行洗膜3次,加入封阻剂作用5 min,再加入酶标液作用5 min,然后加入NBT/BCIP显色5 min。在色原控制位置出现蓝色斑点,阴性对照无斑点则示为试验有效,根据其他蓝色斑点出现的相应位置判读结果。

表1 本试验PCR扩增体系

试剂	浓度	用量(μ l)
10 \times Buffer		2.5
MgCl ₂	25 mmol/L	3.5
dNTP	25 mmol/L	0.4
Taq酶	5 U/ μ l	0.4
16SF	10 μ mol/L	0.5
16SR	10 μ mol/L	0.5
23SF-1	10 μ mol/L	0.5
23SF-2	10 μ mol/L	0.5
23R	10 μ mol/L	0.5
去离子水		15.7

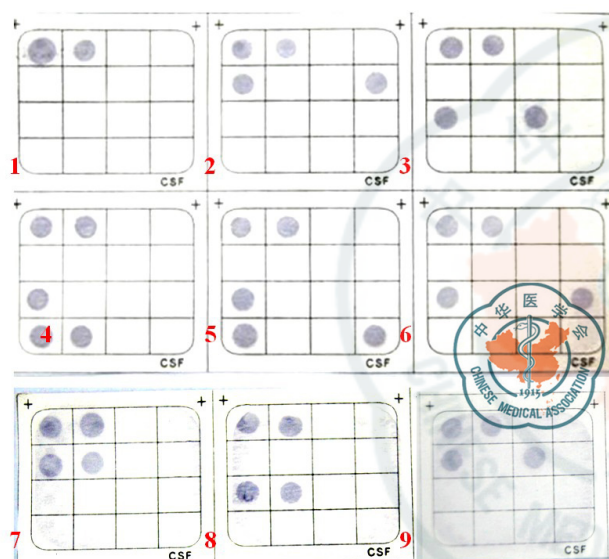
结 果

一、200例脑脊液标本的检测结果

200份患者脑脊液标本中,35份细菌培养阳性样本经芯片检测结果均为阳性(其中33份检测两种方法一致:13株凝固酶阴性葡萄球菌,2株金黄色

葡萄球菌, 4株肠球菌, 3株鲍曼不动杆菌, 2株肺炎克雷伯菌, 2株铜绿假单胞菌, 3株大肠埃希菌, 1株阴沟肠杆菌; 另有3例是芯片设计检测菌以外的菌株(其中奇异变形杆菌1株, 流感嗜血杆菌2株), 相应革兰染色阳性菌或革兰染色阴性菌通用探针检测均为阳性; 培养阳性的产气肠杆菌、大肠埃希菌各1株(芯片方法未检出)。

细菌分离培养阴性的样本中, 有4例芯片检测结果为阳性(其中1例为鲍曼不动杆菌, 1例为肺炎克雷伯菌, 2例为凝固酶阴性葡萄球菌), 见图2。



注: 1: 阴性对照; 2: 肠球菌; 3: 铜绿假单胞菌; 4: 肺炎克雷伯菌; 5: 阴沟肠杆菌; 6: 大肠埃希菌; 7: 金黄色葡萄球菌; 8: 鲍曼不动杆菌; 9: 凝固酶阴性葡萄球菌

图2 芯片检测菌株结果

200例标本行芯片检测法与常规培养方法结果比较, 两种方法细菌检测结果的符合率为97.0% (194/200)。

二、芯片检测的重复性

选取金黄色葡萄球菌阳性标本对芯片检测重复性进行评价。从金黄色葡萄球菌阳性的脑脊液标本中提取细菌DNA, 进行PCR扩增和基因芯片杂交, 实验重复6次。使用同一批次芯片的实验3次, 使用不同批次的芯片实验3次。6次结果均为革兰阳性通用探针及相应金黄色葡萄球菌特异性探针区出现蓝紫色斑点。提示该方法的重复性良好。

讨 论

目前在临床工作中, 脑脊液病原菌诊断的“金标准”为细菌培养, 但细菌培养的阳性率低, 且培

养周期长, 一般需24~48 h。临床医生大多依据临床表现、脑脊液常规、生物化学及血常规等综合指标, 推测细菌或其他病原体感染的可能性。本研究根据基因芯片原理, 应用导流杂交技术, 对9种脑脊液常见致病菌的检测进行了初步探讨, 覆盖临床中枢神经系统感染80%以上的病原菌。

基因芯片能够检测多种病原菌。目前, 已可鉴定血、尿、便中有限数量的细菌^[5-7]。在颅内感染病原菌检测方面, Ren等^[8]采用基因芯片法检测50名临床怀疑为细菌性脑膜炎患者的脑脊液, 并同时对这些患者的血液及脑脊液进行培养。芯片检测方法可快速、准确诊断细菌性脑膜炎, 临床应用这种技术可能降低治疗延迟带来的风险。Bøving等^[9]采用多重PCR与液态芯片相结合的方法检测丹麦脑膜炎患者脑脊液中9种常见的细菌和病毒, 此方法快速而灵敏, 可用于脑膜炎患者的初筛。本研究采用基于导流杂交的基因芯片技术, 检测200例患者的脑脊液标本, 与传统细菌培养方法比较, 两种方法细菌学检测结果的符合率为97.0%, 进一步证实了分子诊断技术筛查脑脊液病原菌的可行性。本研究特色之一是应用了导流杂交技术, 基于该技术的HPV21型别检测芯片目前已经在临床广泛应用, 且得到了业界的肯定^[10]。该技术是在负压作用下, 多重PCR产物快速通过杂交膜, 既缩短了杂交时间(5 min), 又提高了杂交的特异性和灵敏度, 且整个检测过程约耗时3.5 h。本试验中所应用芯片还包括Bio(生物素)点, 其能够监控杂交显色过程是否正常; IC点(内对照), 通过人 β -actin基因的检测, 监控DNA提取和PCR过程, 能够有效避免假阴性, 以上措施均大大提高了芯片的检测性能, 增加了检测结果的可信度。

脑脊液细菌培养影响检出率的重要因素之一是受治疗药物的影响, 而PCR技术对于靶细菌的扩增, 可有效减少这方面的影响^[9, 11-13]。本研究中165例细菌培养阴性的标本有4例经芯片检测为阳性, 提示芯片技术可提高病原菌的检出率。35例细菌培养阳性的标本中, 有2例行芯片方法未检测到, 分析原因, 可能由于所留取标本为重度血性标本, 影响了细菌DNA的提取, 今后的研究中还应该探索更为有效的方法, 以避免血细胞对细菌DNA提取的影响。芯片检测重复性实验显示, 应用不同批次、同一批次芯片分别检测, 均得到相同可靠的结果, 提示芯片检测结果可靠稳定。

应用寡核苷酸芯片检测系统筛查疑似感染的脑

脊液样本, 全程仅需约4 h, 而细菌分离培养和生化鉴定法则常需3~4 d。寡核苷酸芯片系统检测临床样本具有简便、快速、准确、稳定以及高通量等优点, 适于临床样本检测及流行病学的现场调查^[14-15]。

参 考 文 献

- 1 靳桂明, 董玉梅, 余爱荣, 等. 开颅手术后颅内感染流行病学调查的荟萃分析. 中国临床神经外科杂志, 2007, 12(3): 149-151.
- 2 贾建平主编. 神经病学. 6版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 238-2400.
- 3 Tahashi T, Tamum M, Asami Y, et al. Novel wide-range quantitative nested real-time PCR assay for *Mycobacterium tuberculosis* DNA: clinical application for diagnosis of tuberculous meningitis. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(5): 1698-1707.
- 4 徐明, 史中华, 唐明忠, 等. 神经外科患者脑脊液细菌流行病学和耐药性10年监测. 北京医学, 29(10): 583-586.
- 5 Anthony RM, Brown TJ, French GL. Rapid diagnosis of bacteremia by universal amplification of 23S ribosomal DNA followed by hybridization to an oligonucleotide array. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(2): 781-788.
- 6 Wiesinger-Mayr H, Vierlinger K, Pichler R, et al. Identification of human pathogens isolated from blood using microarray hybridisation and signal pattern recognition. *BMC Microbiol*, 2007, 4(7): 78-82.
- 7 Cleven BE, Palka-Santini M, Gielen J. Identification and characterization of bacterial pathogens causing bloodstream infections by DNA microarray. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(7): 2389-2397.
- 8 Ben RJ, Kung S, Chang FY, et al. Rapid diagnosis of bacterial meningitis using a microarray. *Formos Med Assoc*, 2008, 107(6): 448-453.
- 9 Bøving MK, Pedersen LN, Møller JK. Eight-plex PCR and liquid-array detection of bacterial and viral pathogens in cerebrospinal fluid from patients with suspected meningitis. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(4): 908-913.
- 10 Liu SS, Leung RC, Chan KK, et al. Evaluation of a newly developed GenoArray human papillomavirus (HPV) genotyping assay and comparison with the Roche Linear Array HPV genotyping assay. *Clin Microbiol*, 2010, 48(3): 758-764.
- 11 Tissari P, Zumla A, Tarkka E. Accurate and rapid identification of bacterial species from positive blood cultures with a DNA-based microarray platform: an observational study. *Lancet*, 2010, 375(4): 224-230.
- 12 Grimwood KP, Anderson V, Anderson L, et al. Twelve year outcomes following bacterial meningitis: further evidence for persisting effects. *Arch Dis Child*, 2000, 83(6): 111-116.
- 13 Hoogman M, Beek D, Weisfelt M. Cognitive outcome in adults after bacterial meningitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2007, 78(3): 1092-1096.
- 14 Mancini N, Carletti S, Ghidoli N, et al. Molecular diagnosis of polymicrobial sepsis. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(4): 1274-1275.
- 15 Cenciariening-Borde C, Courtois S, La Scola B. Nucleic acids as viability markers for bacteria detection using molecular tools. *Future Microbiol*, 2009, 4(1): 45-64.

(收稿日期: 2012-10-15)

(本文编辑: 孙荣华)

刘志忠, 张艳, 石广志, 等. 基因芯片法检测脑脊液病原菌的临床应用[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2013, 7(2): 210-213.