

• 临床检验研究论著 •

## TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测肺炎链球菌\*

颜善活, 孙雷<sup>△</sup>, 符可鹏, 龙驹, 叶海明, 劳可干, 樊祖茜, 黄永霞  
(钦州市妇幼保健院, 广西钦州 535000)

**摘要:**目的 利用实时荧光定量聚合酶链反应(实时 PCR)方法进行肺炎链球菌的检测和流行病学调查。方法 用实时 PCR 技术扩增并检测 400 例临床标本的肺炎链球菌的自溶素(lyt)基因,并将其与传统的培养法进行对比。结果 400 例临床标本中,实时 PCR 检测肺炎链球菌为阳性的有 78 例(阳性率为 18%),传统培养法结果为阳性的有 29 例(阳性率为 7.25%)。结论 实时 PCR 是一种灵敏、特异、快速的检测肺炎链球菌方法,其可用于肺炎链球菌的诊断和流行病学调查。

**关键词:**链球菌,肺炎; 聚合酶链反应; 核酸探针

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.02.005

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)02-0140-02

Rapid detection of *Streptococcus pneumoniae* using TaqMan real-time PCR<sup>\*</sup>

Yan Shanhua, Sun Lei<sup>△</sup>, Fu Kepeng, Long Ju, Ye Haiming, Lao Kegan, Fan Zuqian, Huang Yongxia  
(Maternal and Child Health Hospital of Qinzhou, Qinzhou, Guangxi 535000, China)

**Abstract: Objective** To establish real-time PCR method for the identification of *S. pneumoniae* in clinical and epidemiological studies. **Methods** 400 clinical specimens were selected. The *lyt* gene sequence was amplified and detected by real-time PCR and the results was compared with conventional methods. **Results** In 400 clinical specimens, 78 cases of *S. pneumoniae*-positive (positive rate was 19%) were detected by real-time PCR, while by culture method were 29 cases (positive rate was 7.25%). **Conclusion** Real-time PCR is a rapid, sensitive and specific assay for the identification of *S. pneumoniae*. It can be used for the identification and epidemiological investigation.

**Key words:** streptococcus pneumoniae; polymerase chain reaction; nucleic acid probes

肺炎链球菌(SP)感染引发的相关疾病是全球儿童健康的一大威胁。轻微的感染引起中耳炎、鼻窦炎,严重的则会引起肺炎、败血症、脑膜炎,甚至危及生命<sup>[1]</sup>。

目前,临床对于肺炎链球菌的诊断主要是靠采集患者样本进行病原体培养。由于肺炎链球菌的生长较为缓慢且需丰富的营养成分,所以在培养时经常被其他生长旺盛的杂菌所覆盖,从而影响肺炎链球菌的检测率。另外,由于抗菌药物的广泛使用让肺炎链球菌的检出率更低<sup>[2]</sup>。实时荧光定量聚合酶链反应(实时 PCR)用于肺炎链球菌的诊断相对于传统培养方法具有无需进行细菌培养、不受药物影响以及能够快速诊断(3~5 h 内即可完成诊断)等特点,因此,利用实时 PCR 进行肺炎链球菌的诊断将会越来越普遍。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 标本来源于 2010 年 4 月至 2012 年 6 月,钦州市妇幼保健院临床送检的痰标本。

**1.2 试剂与仪器** 经参考有关文献和检索 Genbank,分别以肺炎链球菌的自溶素(lyt)基因为目的序列合成引物及探针。lytA 基因<sup>[3]</sup>引物序列为:正向 5'-ACG CAA TC TAG CAG ATG AAG C-3',反向 5'-TGT TTG GTT GGT TAT TCG TGC-3';lytA 基因探针为:探针 FAM-5'-TTT GCC GAA AAC GCT TGA TAC AGG G-3'-TAMRA,引物及探针均由金斯瑞生物科技有限公司合成。荧光定量 PCR 仪为达安基因公司 DA7600 产品,紫外分光光度计、高速离心机、电泳仪等购自美国 Labnet 公司,电泳凝胶成像分析系统购自美国 Bio Rad 公司,荧光定量 PCR 系列试剂购自天根生化科技(北京)有限

公司。

**1.3 肺炎链球菌的培养及鉴定** 将临床痰液标本和标准菌株(ATCC49619)分别在哥伦比亚血琼脂培养基中进行接种,并将接种好的培养基置于 37 ℃的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 18~24 h。然后采用革兰染色镜检、奥普托欣和胆汁溶菌试验对细菌进行鉴定。

**1.4 DNA 的提取及实时荧光定量 PCR** 取接种剩余的痰标本 1 mL 或挑取纯培养的菌株悬浮于 1 mL 无菌生理盐水中,用 14 000×g 离心 5 min 后弃上清液;向沉淀中加入 100~150 μL 的裂解液后,于 100 ℃水浴 10 min;将水浴后标本 10 000×g 离心 10 min,其上清液即可作为 PCR 扩增的 DNA 模板。以上述方法提取的肺炎链球菌 DNA 为模板,分别进行实时 PCR,20 μL 的反应体系中包含:模板 2 μL,引物 1 μL,去离子水 9.5 μL,实时 PCR 混合物 12.5 μL。PCR 扩增的温度条件为:94 ℃预变性与酶激活 10 min; 然后进行 42 个循环扩增与检测,94 ℃变性 20 s,60 ℃延伸 1 min,并在每次延伸的最后检测试验结果。每次检测均以标准菌株为阳性对照,ddH<sub>2</sub>O 为阴性对照;所有检测的样品都设有 2 孔以进行平行检测与验证。

**1.5 统计学处理** 分别对实时 PCR 方法和细菌培养法检测的 400 例临床标本的阳性标本例数进行统计,并分析细菌培养阳性与实时 PCR 阳性结果的差异。

## 2 结果

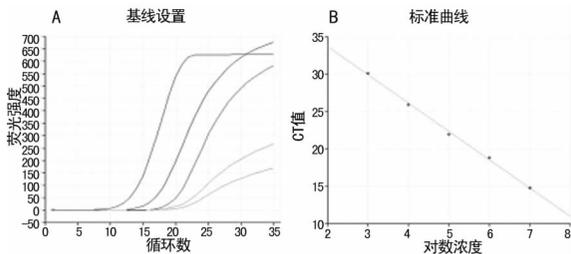
**2.1 肺炎链球菌的培养及鉴定** 胆汁溶菌试验的原理主要是基于胆盐能够活化肺炎链球菌的自溶酶而使肺炎链球菌溶解,

\* 基金项目:2010 年钦州市科学研究与技术开发计划项目(20100913)。 作者简介:颜善活,男,副主任技师,主要从事微生物检验研究。

<sup>△</sup> 通讯作者,E-mail:sunshijie12345@163.com。

但是不能溶解草绿色链球菌。将 1 接种环 2% 的去氧胆酸钠溶液加于待鉴定菌的血平板菌落上,并将其置 35 °C 孵育 15~30 min 后进行观察,如果菌落溶解消失则判断为阳性标本。奥普托欣试验主要用于区分肺炎链球菌与草绿色链球菌,取单个待鉴定菌落并将其均匀涂于血平板上,用含量为 5 μg 的奥普托欣纸片贴于接种区的中央,35 °C 培养过夜后观察,抑菌圈大于 18 mm 的则判断为肺炎链球菌阳性。通过胆汁溶菌试验和奥普托欣试验鉴定出阳性标本 29 例。

**2.2 肺炎链球菌的标准曲线** 实时 PCR 标准曲线的绘制:选取阳性的肺炎链球菌标本进行梯度为 1 ng、100 pg、10 pg、1 pg、100 fg DNA 的检测,对 *lyt* 基因的实时 PCR 检测结果显示,1 ng~100 fg 浓度的肺炎链球菌 DNA 均具有明显的扩增信号,其检测的最低 DNA 浓度可低至 100 fg,见图 1。



A:不同浓度梯度的肺炎链球菌 DNA 的检测;B:*lyt* 的标准曲线。

图 1 *lyt* 的标准曲线

**2.3 临床标本检测结果** 400 例临床标本中,实时 PCR 法检出的肺炎链球菌阳性标本为 78 例(阳性率为 18%),而通过传统培养法检出的阳性标本为 29 例(阳性率为 7.25%),两种方法比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

**3 讨论**

下呼吸道感染是一种非常常见的感染疾病,仅 30%~80% 的患者能够确定是何种病原体感染的,目前主要是依靠传统的细菌培养法进行诊断。部分诊断结果的获得需要较长的时间,以至于结果对疾病的治疗已无多大影响。同时,由于抗菌药物的滥用以及培养实验条件的限制,在我国,细菌学检查阳性率一直偏低。因此,建立一种能够快速而不受抗菌药物治疗影响的肺炎链球菌检测方法就显得非常迫切。笔者建立了实时 PCR 法快速定量检测肺炎链球菌的方法<sup>[4]</sup>,并成功进行了肺炎链球菌的检测和流行病学的调查。

实时 PCR 自 1996 年诞生以来就显示出了该方法的优越性,不仅被广泛应用于分子生物学研究的各个领域,并且也应用于临床项目的诊断与检测。其荧光探针法检测的主要原理是将荧光共振能量传递(FRET)技术应用于常规 PCR 中。在探针的 5' 端标记一个荧光报告基因(R),3' 端标记一个淬灭基团(Q),当两者距离较近时,5' 端的荧光基团所发出的荧光可被淬灭基团吸收或抑制,从而无法检测出荧光信号;当两者距离较远时,两者之间的抑制作用消失,荧光监测系统就可检测到相应的荧光信号。利用以上荧光产生原理,可以在 PCR 过程中连续不断地检测反应体系中荧光信号的变化。实时 PCR 与常规 PCR 相比具有数据稳定、特异性强、不易污染和自动化程度高等技术优势与特点,使得该技术广泛应用于肿瘤基因和病毒感染等方面诊断或研究<sup>[5-6]</sup>。实时 PCR 方法在肺炎链球菌检测中的成功应用,将大大加快肺炎链球菌的诊断,为提供更快速、更准确的诊断结果奠定基础。

该实验利用实时 PCR 和传统的细菌培养法同时检测 400

例临床标本。实时 PCR 检测出 78 例肺炎链球菌阳性。培养法阳性标本为 29 例,培养阳性的标本在实时 PCR 检测中均为阳性,49 例实时 PCR 法检测为阳性而细菌培养为阴性标本。造成这种差异的原因可能有两点:(1)痰液标本中的肺炎链球菌的总量相对较少,在传统的培养过程中,肺炎链球菌的生长在与其他细菌竞争中被抑制,从而导致培养失败而产生阴性结果;(2)患者在采样前使用过某些抗菌药物,而导致培养出现阴性结果。近年来,应用实时 PCR 诊断细菌、病毒、真菌的报道逐渐增多,因其敏感性较高,所以也易存在被污染的可能,从而造成出现假阳性结果。肺炎链球菌作为口咽部的正常寄生菌群,在获得痰标本时,由于操作不当,极易造成正常肺炎链球菌的污染。因此,在严格控制取材环节的同时通过定量的方法来判断肺炎链球菌的感染情况。可以排除标本被污染的情况。

随着分子生物学技术的发展,目前,用于快速诊断肺炎链球菌的方法主要有 PCR 电泳法<sup>[7]</sup>、斑点杂交法<sup>[8]</sup>、盒式 PCR<sup>[9]</sup> 等方法。由于这几种方法只能进行肺炎链球菌的定性研究,不能区分出标本是污染还是感染,而且还需要针对 PCR 进行一系列的后续处理,大大增加了操作的繁琐性,人力花费大。因此,相对其他的检测肺炎链球菌的分子生物学方法,荧光定量 PCR 具有检测速度快、药物影响小、敏感性高、特异性强、经济实惠等特点,其更适合肺炎链球菌的早期诊断和分子流行病学调查。

**参考文献**

- [1] Burke AC, Jean EH. Community-acquired pneumonia: diagnostic vs prognostic significance of the platelet count[J]. Chest, 2011, 139(5):1255-1256.
- [2] Campbell SG, Marrie TJ, Anstey R, et al. The contribution of blood cultures to the clinical management of adult patients admitted to the hospital with community-acquired pneumonia: a prospective observational study [J]. Chest, 2003, 123(4):1142-1150.
- [3] McAvin JC, Reilly PA, Roudabush RM, et al. Sensitive and specific method for rapid identification of Streptococcus pneumoniae using real-time fluorescence PCR [J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(10):3446-3451.
- [4] 颜善活,孙雷,符可鹏,等.实时荧光定量 PCR 快速诊断肺炎链球菌[J]. 检验医学, 2013, 28(3):221-224.
- [5] Konishi H, Sugiyama M, Mizuno K, et al. Detailed characterization of a homozygously deleted region corresponding to a candidate tumor suppressor locus at distal 17p13. 3 in human lung cancer [J]. Oncogene, 2003, 22(12):1892-1905.
- [6] Gouarin S, Gault E, Vabret A, et al. Real-time PCR quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid samples from mothers with primary infection[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(5):1767-1772.
- [7] 黄文杰,刘志红,王全立,等.肺炎链球菌定性及定量诊断方法的建立[J]. Chin J Microbiol Immunol, 2000, 16(4):280-283.
- [8] 樊慧珍,黄文杰,梁昆.反向斑点杂交快速检测肺炎链球菌[J]. 新医学, 2004, 35(3):145-146.
- [9] 胡晓彦,桂炳东,王伶,等. BOX-PCR 技术在肺炎链球菌检测中应用[J]. 实验与检验医学, 2010, (3):209-211.