

类健康造成危害^[5-6]。

本文调查中朝边境鸭绿江江水15个水域45份水标本共检出细菌45种218株,真菌13株,其中革兰阴性杆菌89.91%(88/218)、革兰阳性菌10.09%(22/218)。由表2可见,江水中细菌主要以革兰阴性杆菌为主,在阴性杆菌中肠杆菌科细菌44.89%(88/196)、非发酵菌26.53%(52/196)、弧菌科细菌25.51%(50/196)。肠杆菌科细菌优势菌主要为大肠埃希菌22.59%(19/88)、弗劳地枸橼酸杆菌15.91%(14/88)、河生肠杆菌生物1群14.77%(13/88);非发酵菌优势菌主要为不动杆菌属细菌25.00%(13/52)、腐败希瓦菌23.08%(12/52)、Ⅱb黄杆菌15.38%(8/52);弧菌科细菌的优势菌主要为气单胞菌属84.00%(42/50),类志贺毗邻单胞菌10.00%(5/50),弧菌属细菌6.00%(3/50)。本文弧菌科细菌主要为气单胞菌属占84.00%(42/50),其中亲水气单胞菌占气单胞菌属的60%(30/50),弧菌属只占6.00%(3/50),弧菌属细菌分离率低,可能与江水和海水Na⁺和Cl⁻含量有关。本文采集的江水Na⁺含量为5 mmol/L,Cl⁻含量为4 mmol/L,而有文献报道海水Na⁺含量为320 mmol/L,Cl⁻含量为383 mmol/L^[4]。另外,采集标本时检测江水的pH值为5~6,这个环境不利于部分弧菌属细菌的生长。由此可见江水中的弧菌科细菌主要为气单胞菌属为主,而海水中的弧菌科细菌主要为弧菌属为主。

本文调查未检出沙门、志贺、霍乱弧菌,但这些细菌是夏秋季节主要肠道致病菌,加强对这些菌的监测是一项长期而重要的任务。

由表3可以看出肠杆菌细菌对21种抗菌药物敏感试验结果,其中对亚胺培南、美洛培南、哌拉西林/他唑巴坦、头孢哌酮/舒巴坦、阿米卡星敏感率为100%,三代头孢、氟喹诺酮类、氨曲南、庆大霉素敏感率为85~98%,氨基西林、头孢唑啉、阿

• 临床微生物学与检验论著(全军检验大会优秀论文) •

莫西林/克拉维酸、氨基西林/舒巴坦、复方新诺明敏感率为50%~70%。非发酵菌对14种抗菌药物的敏感性均为95%~100%。弧菌科细菌对16种抗菌药物的敏感率除替卡西林/棒酸、哌拉西林/复方新诺明(60%、78%、84%)外,其他抗菌药物均为95~100%。肠杆菌科细菌未检出ESBLs菌株,可以证明采集标本的水域未被耐药菌污染,这与上述水域为军营驻地、主要为山野林区、居民稀少、环境污染程度低相关。但目前由于抗菌药物在医疗、农业、畜牧水产业的大量应用,容易导致人畜共患病原菌的产生和蔓延^[7],有些耐药菌可通过多种途径进入江水,引起耐药菌的产生,因此开展对环境江水的细菌耐药性监测至关重要。

参考文献

- [1] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].3版.南京:东南大学出版社,2006:474-576.
- [2] 周庭银.临床微生物学诊断与图解[M].2版.上海:上海科学技术出版社,2007:184-193.
- [3] 唐志清,吴德怀,马立人.唐山口岸地区海水致病性弧菌的调查与耐药检查[J].中国国境卫生检疫杂志,1999,25(5):257-260.
- [4] 韩善桥,虞积耀,姜涛,等.福建晋江细菌种类及分布调查[J].实用预防医学,2010,17(9):1790-1792.
- [5] 韩善桥,虞积耀,姜涛,等.东南沿海海域海水细菌的分布[J].解放军预防医学杂志,2008,26(1):18-21.
- [6] 周云昌,付利君,吴玲,等.海军某部营区环境致病性弧菌流行病学调查[J].西南国防医学,2005,15(5):5742-5751.
- [7] 金少鸿,马跃.国内细菌耐药性监测研究的回顾与展望[J].中国抗生素杂志,2005,30(5):257-259.

(收稿日期:2012-08-09)

快速检测粪便中艰难梭菌的方法研究*

刘 畅,蒋栋能,蒲晓允[△]

(第三军医大学新桥医院检验科,重庆 400037)

摘要:目的 建立可用于粪便中艰难梭菌快速检测的环介导恒温扩增(LAMP)方法。方法 针对艰难梭菌毒素A基因,设计引物。采用LAMP对艰难梭菌和其他腹泻干扰菌及不同浓度艰难梭菌的扩增检测,对其特异性和灵敏度进行评价。同时采用LAMP和荧光定量PCR对100例疑似艰难梭菌感染的临床腹泻患者粪便进行检测,对两种方法进行比较。结果 LAMP对艰难梭菌及6种腹泻干扰菌的检测,只针对艰难梭菌有扩增,显示了较好的特异性。LAMP最低检测限为10 CFU/mL,灵敏度较高。对100例临床粪便标本LAMP检测结果与荧光定量PCR比较差异无统计学意义($P>0.05$, $\chi^2=0.1429$)。结论 本研究建立的粪便中艰难梭菌的LAMP快速检测方法特异性好、灵敏度较高、操作简便,适用于艰难梭菌的临床快速检测及现场检测。

关键词:环介导恒温扩增; 梭菌,难辨; 快速检测

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.20.023

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)20-2488-04

Study on rapid detection of clostridium difficile in fecal^{*}

Liu Chang, Jiang Dongneng, Pu Xiaoyun[△]

(Department of Clinical Laboratory, Xinqiao Hospital, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To establish a rapid detection of Clostridium difficile(C. difficile) in fecal samples by loop mediated isothermal amplification(LAMP) method in fecal. **Methods** The LAMP primers were designed by targeting toxin A gene. To evaluation the specificity and sensitivity of LAMP method by detection of other interference bacteria and different concentrations of C. difficile. Comparative analysis with fluorescence quantitative PCR assay of LAMP method by detection 100 unformed stool samples

* 基金项目:重庆市重点攻关课题(2011GGB058)。 △ 通讯作者,E-mail:puxiaoyong@yahoo.com。

from patients suspected of *C. difficile* associated disease. **Results** The DNA of *C. difficile* was positive and other bacteria were not detected. The test suggested a high specificity of LAMP assay for detection of *C. difficile*. The detection limit of the LAMP method was 10 CFU/mL. There was no difference between fluorescence quantitative PCR assay and LAMP method. **Conclusion** The rapid LAMP detection method with high specificity and high sensitivity could be suitable for the rapid detection of clinical *C. difficile* infection.

Key words: loop-mediated isothermal amplification; *Clostridium difficile*; point of care test

艰难梭菌为革兰阳性厌氧芽孢杆菌,广泛分布于水、土壤等自然环境及动物和人的粪便中。艰难梭菌是一种条件致病菌,当人体肠道正常微环境遭到破坏时,艰难梭菌可迅速繁殖并产生毒素,引起艰难梭菌相关性腹泻、伪膜性肠炎等疾病^[1]。艰难梭菌感染临床症状可为轻至中度的腹泻,甚至可发展为危及生命的伪膜性肠炎。随着临床广谱抗菌药物的应用,艰难梭菌相关性腹泻患病率达到 25%~30%,伪膜性肠炎发病率也不断增高。随着全球范围内艰难梭菌感染的暴发流行增多,艰难梭菌感染快速而特异的实验室检测对于疾病的控制和疾病的临床诊断及治疗显得迫切而重要^[2]。目前,粪便中艰难梭菌实验室检测包括作为 CDAD 检测“金标准”的艰难梭菌毒素检测及细胞培养毒素中和试验^[3-4],但因培养条件及技术要求高、耗时长,难以用于临床常规检测。目前国内外广泛应用的免疫酶学试验,针对艰难梭菌毒素 A 或 B 的检测可在 2 h 内快速测定完成,但该方法存在交叉反应、假阳性率高,特异性差等缺点^[5]。利用普通 PCR 可检测艰难梭菌,但因实验条件要求高而且操作复杂、速度慢(2~3 h),不适合基层医院及现场快速检测的应用。随着分子诊断技术的不断进步,Notomi 等^[6]于 2000 年报道了一种新的环介导恒温扩增技术(LAMP)。该技术针对靶基因的 6 个区域设计 2 对特异引物,通过恒温(63~67 °C)扩增反应,利用高活性链置换 DNA 聚合酶(BstDNA 聚合酶),使得链置换 DNA 合成在不停地自我循环,产生大量茎环状扩增产物,从而实现对目的基因的快速检测。该方法检测时间短(30~60 min),无需特殊仪器,操作简便,配合相应显色试剂还能实现肉眼判别结果。LAMP 方法目前已经成功应用于多种病原微生物的检测^[7-8],成为常用的临床快速检验方法之一。本研究基于 LAMP 技术建立了一种针对艰难梭菌毒素 A 基因的 LAMP 检测方法,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株 标准菌株均购于上海天呈医疗有限公司,包括 6 种腹泻常见干扰菌:大肠埃希菌(ATCC35218)、伤寒杆菌(ATCC14028)、志贺菌(ATCC 13313)、空肠弯曲菌(ATCC 33291)、单核里斯特菌(ATCC19115)、肺炎克雷伯菌(ATCC700603)。

1.2 粪便标本 收集本院 2010 年 5 月至 2012 年 1 月长期使用抗菌药物且疑似艰难梭菌感染患者的腹泻粪便标本 100 例。所有粪便标本均于-80 °C 冷冻保存。

1.3 仪器与试剂 细菌 DNA 提取试剂盒购于天根生化科技有限公司。DNA-LAMP 扩增试剂盒购于日本荣研公司。琼脂糖购于西班牙 BIOWEST 公司。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。Gel Logic 212 型凝胶成像仪购于美国 Kodak 公司。

1.4 方法

1.4.1 引物设计 艰难梭菌毒素 A 基因序列检索自美国生

物科技信息中心(NCBI),GenBank 登录号 FN545816;通过日本荣研化学公司网络在线 LAMP 设计软件 Primerexplorer 4.0,设计出 6 条特异性引物。

1.4.2 细菌 DNA 提取 菌株基因组 DNA 提取采用天根公司的 DNA 纯化试剂盒,粪便基因组提取采用 QIGEN 公司的 QI-Aamp DNA stool Mini Kit 试剂盒,按照操作说明进行。

1.4.3 LAMP 扩增方法 LAMP 扩增反应体系为:2 μL 细菌 DNA,12.5 μL 反应液,1.0 μL BstDNA 聚合酶,4 μL 引物(含 80 μmol/L FIP,80 μmol/L BIP,10 μmol/L F3,10 μmol/L B3 4 种引物),5.5 μL 双蒸水。将反应体系混匀后,在 LAC320 比浊仪(日本荣研公司产品)上 65 °C 恒温扩增 60 min。根据反应管中反应液浊度及颜色变化判断结果,出现绿色判定为阳性,橙色为阴性。阳性产物采用 2% 琼脂糖凝胶电泳,观察电泳条带。

1.4.4 LAMP 方法灵敏度试验 将艰难梭菌(ATCC43255)用生理盐水 10 倍倍比稀释菌液为 1~1×10⁶ CFU/mL 7 个梯度,再分别取各稀释菌液 1 mL 于管中,相同方法提取细菌 DNA 及进行 LAMP 扩增,检测艰难梭菌 LAMP 的灵敏度。

1.4.5 LAMP 方法特异性试验 对 6 种腹泻干扰菌进行培养,挑取生长良好的单个菌落,用生理盐水溶解,取各稀释度样本 1 mL,做倾注培养,37 °C 过夜,确定菌液浓度,然后稀释菌液至 1×10⁵ CFU/mL。按照细菌 DNA 提取试剂盒操作步骤提取 DNA,然后进行 LAMP 扩增,检测艰难梭菌 LAMP 的特异性。

1.4.6 LAMP 检测与荧光定量 PCR 的比较 将收集的 100 例临床腹泻粪便标本按照 DNA 提取试剂盒操作步骤提取细菌 DNA,分别进行 LAMP 扩增和荧光定量 PCR 检测。

1.5 统计学处理 采用 SPSS11.0 统计软件包进行分析。计数资料用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 引物设计 以艰难梭菌毒素 A 编码基因序列(GenBank: FN545816)为靶基因,设计 LAMP 引物,引物序列见表 1。

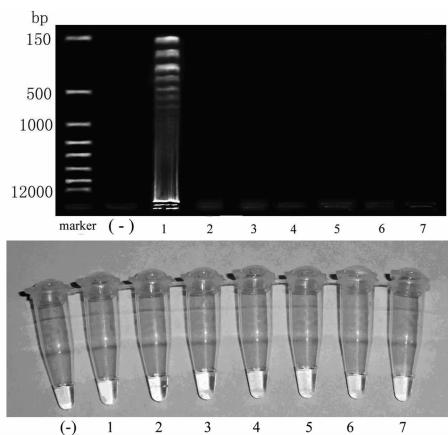
2.2 特异性试验 艰难梭菌标准菌株经 LAMP 特异性扩增出毒素 A 基因。其余 6 种腹泻干扰菌均未有阳性扩增。结果见表 2 及图 1。

2.3 敏感度试验 艰难梭菌敏感度试验结果显示,随着菌液浓度降低,LAMP 扩增曲线起峰时间延后,电泳条带亮度变弱,至菌液稀释至 1 CFU/mL 无扩增产物,结果见图 2。

2.4 LAMP 技术和荧光定量 PCR 技术的比较 临床 100 例长期使用抗菌药物的腹泻患者粪便标本分别通过 LAMP 和荧光定量 PCR 检测,结果显示,LAMP(+):艰难梭菌(96 例)、其他细菌(4 例);LAMP(-):艰难梭菌(3 例)、其他细菌(97 例)。两种方法比较差异无统计学意义($P > 0.05$, $\chi^2 = 0.142$ 9)。

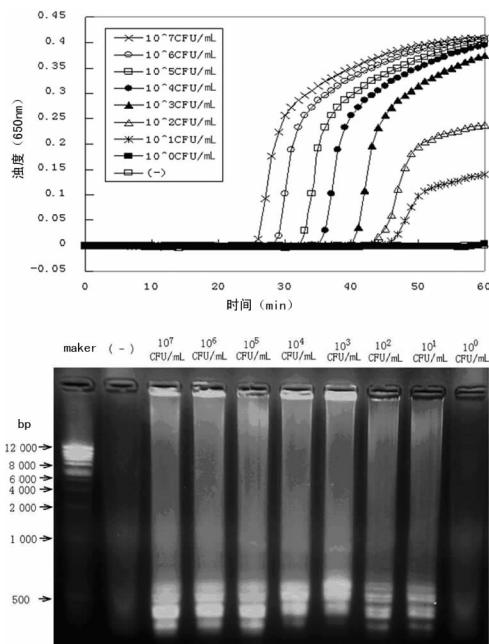
表1 艰难梭菌A毒素(tcdA)基因序列及LAMP引物序列

基因序列及引物设计位点	GenBank: FN545816
716751	AGTAATCATGGGATAGATATCAGGGCTAATA <u>AGTTTGT</u> TTACAGAACAGAGTTATTAAAT F3
716811	ATTATAGTCAGGAGTTAA <u>ATCGT</u> GGGAATTAGCTGCAGCATCTGACATAGTAAGA F2
716871	TTATTAGCC <u>TTAA</u> AAATTTGGCGGAGTATATT <u>AGATGTTG</u> ATATGCTCCAGGTATT F1
716931	CACTCTGATT <u>TTAA</u> ACAATAC <u>CTAGAC</u> CTATTGGACTAGACC <u>GTTGG</u> AA B2
716991	<u>ATGATAAA</u> ATTAGAGGC 引物(5'-3'): F3 : AGTTTGT <u>TTACAGAACAGAGTT</u> B3 : ATCATT <u>CCAAACGGT</u> CTA FIP: CCGCAA <u>AAATTTTAGGGCTAATATT</u> ATAGTCAGGAGTT <u>GTAAATCG</u> BIP: AGATGTTGATATGCT <u>CCAGGTATT</u> CCAATAGAGCTAGGTCTAGG



1:艰难梭菌;2:大肠埃希氏菌;3:伤寒杆菌;4:志贺氏菌;5:空肠弯曲菌;6:单核李斯特菌;7:肺炎克雷伯菌;marker:DNA分子标记物;(-)阴性对照;上图:凝胶电泳图;下图:反应管显示结果。

图1 艰难梭菌特异性试验



marker:DNA分子标记物;(-)阴性对照;上图:反应曲线;下图:凝胶电泳图。

图2 艰难梭菌灵敏度试验

表2 不同腹泻菌株LAMP扩增结果

菌株	LAMP
艰难梭菌(ATCC43255)	+
大肠埃希菌(ATCC35218)	-
伤寒杆菌(ATCC14028)	-
志贺氏菌(ATCC13313)	-
空肠弯曲菌(ATCC33291)	-
单核李斯特菌(ATCC19115)	-
肺炎克雷伯菌(ATCC700603)	-

3 讨论

艰难梭菌是引起抗菌药物相关及医源性腹泻的重要致病菌,医院范围内的感染暴发很难在短期内得到有效的控制。因此,艰难梭菌的实验室快速诊断极其重要。目前,用于粪便标本致病性艰难梭菌检测的方法中,粪便标本培养和细胞毒素测定是国际公认的“金标准”,但技术要求高,操作繁琐耗时,不适合快速诊断。目前实验室广泛采用酶免方法检测艰难梭菌。该方法操作简便,但因灵敏度不高难以实现临床检测的标准化。随着核酸分子检测技术的发展,目前已有大量PCR技术应用于艰难梭菌检测的报道^[9]。但该方法需要复杂的仪器,不适用于基层医院推广及应用。

目前,LAMP技术作为一种新发展的核酸扩增技术,以其特异性强、灵敏度高、操作简便快速等优点,已在细菌、病毒、食品、环境微生物检测等领域得到广泛应用。本试验建立了针对艰难梭菌毒素A基因的LAMP检测方法,用于快速检测粪便中的艰难梭菌。试验结果表明,对艰难梭菌及6种腹泻干抗茵进行LAMP检测,仅含艰难梭菌毒素A基因的艰难梭菌产物变为绿色,电泳出现梯状条带,而其他6种腹泻菌LAMP检测均为阴性,显示出良好的特异性。本法的最低检测限为10 CFU/mL左右,说明艰难梭菌LAMP检测方法灵敏度较高。通过进一步对100例临床腹泻患者粪便标本LAMP及荧光定量PCR方法的比较,结果表明两种方法比较差异无统计学意义($P>0.05$, $\chi^2=0.1429$)。

LAMP能直接对粪便中的艰难梭菌进行检测,与传统培养方法比较,缩短了检验周期。同时,该方法在恒温条件下进

行扩增反应,1 h 内完成反应,耗时短,操作简便,可实现反应及检测一步完成,适合现场快速检测及基层医院、小型实验室推广应用。

参考文献

- [1] Chen N, Shih SL. Images in clinical medicine. Pseudomembranous colitis [J]. N Engl J Med, 2011, 364(5): e8.
- [2] Wilkins TD, Leyerly DM. Clostridium difficile testing: after 20 years, still challenging [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(2): 531-534.
- [3] Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, et al. Clinical practice guidelines for Clostridium difficile infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA) [J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2010, 31(5): 431-455.
- [4] Crobach MJ, Dekkers OM, Wilcox MH, et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): data review and recommendations for diagnosing Clostridium difficile-infection (CDI) [J]. Clin Microbiol Infect, 2009, 15(12): 1053-1066.
- [5] Eastwood K, Else P, Charlett A, et al. Comparison of nine com-

mercially available Clostridium difficile toxin detection assays, a real-time PCR assay for C. difficile tcdB, and a glutamate dehydrogenase detection assay to cytotoxin testing and cytotoxicogenic culture methods [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(10): 3211-3217.

- [6] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): E63.
- [7] Muleya W, Namangala B, Mweene A, et al. Molecular epidemiology and a loop-mediated isothermal amplification method for diagnosis of infection with rabies virus in Zambia [J]. Virus Res, 2012, 163(1): 160-168.
- [8] Zhang J, Zhang GH, Yang L, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of Mycobacterium bovis [J]. Vet J, 2011, 187(3): 393-396.
- [9] Shakir FA, Thompson D, Marlar R, et al. A Novel Use of Rectal Swab to Test for Clostridium difficile Infection by Real-Time PCR [J]. Am J Gastroenterol, 2012, 107(9): 1444-1445.

(收稿日期:2012-08-09)

• 临床微生物学与检验论著(全军检验大会优秀论文) •

细菌自动鉴定仪 3 例布鲁氏菌误鉴定及文献复习^{*}

杨婧,任晓庆,褚美玲,马均,任微,王璐,孟冬娅[△]

(沈阳军区总医院检验科,辽宁沈阳 110840)

摘要:目的 探讨 VITEK2 Compact 微生物自动鉴定仪对布鲁氏菌误鉴定的原因及局限性。方法 2 例无明显诱因发热患者血培养分离菌株,1 例左胫骨病变患者骨髓培养分离株。采用 VITEK2 Compact 细菌鉴定系统、形态学、传统手工生化方法对分离株进行鉴定。采用 PCR 扩增 16S rRNA 基因并测序,对所测得的核酸序列进行同源性比对分析。结果 3 株缓慢生长的革兰阴性短小杆菌,使用 VITEK2 Compact 鉴定仪 GN 鉴定卡首次鉴定为支气管败血鲍特菌(1 例)及人苍白杆菌(2 例)。基于 16S rRNA 基因序列分析表明,菌株与马耳他布鲁菌或人苍白杆菌核酸匹配度高达 100%,完全排除支气管败血鲍特菌的可能,结合动力试验阴性,排除人苍白杆菌的可能。将保存的菌株用 VITEK2 Compact 鉴定仪 GN 鉴定卡复检,结果为马耳他布鲁氏菌。复习文献,发现使用一些商业的细菌鉴定系统产生布鲁氏菌被错误鉴定的案例时有发生。布鲁氏菌可被误鉴定为苯丙酮酸莫拉菌(以前为苯丙酮酸冷杆菌)或解脲寡源杆菌(API 20NE 系统,法国生物梅里埃, Marcy-l'Etoile, France, 人苍白杆菌(API 20NE 系统,快速 NF Plus 系统, Innovative Diagnostic Systems Inc., Atlanta, USA),流感嗜血杆菌生物 IV 型,莫拉菌属(MicroScan panels Siemens Healthcare Diagnostics Inc., West Sacramento, CA, USA),动物溃疡伯格菌(MicroScanWalk-Away system using MicroScan NegCombo Type 44 panel)。结论 16S rRNA 基因序分析是鉴定临床缓慢生长的革兰阴性杆菌的有效手段,微生物自动鉴定仪鉴定缓慢生长细菌(如布鲁氏菌)有明显局限性,对布鲁氏菌病等传染病的临床治疗及流行病学调查可产生误导。建议细菌鉴定系统生产厂家应该完善其数据库中专家系统,当细菌鉴定系统报告为人苍白杆菌、解脲寡源杆菌、苯丙酮酸莫拉菌、支气管败血鲍特菌、动物溃疡伯格菌、莫拉菌属或流感嗜血杆菌生物 IV 型等少见菌种时,应该在鉴定仪器专家系统中提示需与布鲁氏菌鉴别,有效预防布鲁氏菌引起的实验室获得性感染。有关上述非常见菌感染的文章中若仅有常规细菌鉴定而无分子生物学鉴定的案例,建议慎重报道。

关键词:布鲁杆菌属; 细菌自动鉴定仪器; 误鉴定

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.20.024

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)20-2491-04

3 misidentification cases of Brucella species by automated microbial identification system and literature review^{*}

Yang Jing, Ren Xiaoqing, Chu Meiling, Ma Jun, Ren Wei, Wang Lu, Meng Dongya[△]

(Department of Clinical Laboratory, General Hospital of Shenyang

Military Area Command, Shenyang, Liaoning 110840, China)

Abstract: Objective To investigate the reason and limitations of 3 misidentification cases of Brucella species by VTEK2 Compact microbial identification system. **Methods** Strains were isolated from blood culture of two patients suffering from fever without

* 基金项目:辽宁省科技攻关计划资助项目(2011225021)。 △ 通讯作者, E-mail:mengdongya@hotmail.com。