

• 临床检验研究论著 •

LAMP 结合示差脉冲伏安法快速检测肺炎克雷伯菌的方法建立及临床应用*

刘孝波, 蒋栋能, 项贵明, 蒲晓允[△]

(第三军医大学第二附属医院检验科, 重庆 400037)

摘要:目的 利用环介导恒温扩增(LAMP)技术结合示差脉冲伏安(DPV)法,建立快速检测肺炎克雷伯菌的方法,并将其应用于小儿腹泻病原菌分析。方法 通过基因比对与引物设计,建立针对肺炎克雷伯菌的 LAMP 检测方法。采用 LAMP 技术对肺炎克雷伯菌和其他 8 种干扰菌以及对不同浓度肺炎克雷伯菌进行扩增,结合 DPV 法评价其特异性及灵敏度。将 200 份腹泻患儿的粪便标本同时采用 LAMP 方法与培养法进行检验,对比 2 种方法检测肺炎克雷伯菌的阳性率。统计近 2 年该院门诊及住院小儿腹泻病例,初步分析其常见腹泻致病菌种类及比例。结果 设计出针对肺炎克雷伯菌的 LAMP 检测方法,该法只针对肺炎克雷伯菌有扩增,对其他干扰菌不扩增,显示出良好的特异性,LAMP 法最低检测限为 10 CFU/mL,显示出较高的灵敏度。200 份腹泻患儿粪便标本,采用 LAMP 法与培养鉴定法检测的肺炎克雷伯菌阳性率差异无统计学意义($P>0.05$)。近 2 年内该院小儿腹泻粪便标本中共检出致病菌 709 株,主要病原菌分别为志贺菌(34.23%)、大肠杆菌(15.40%)、铜绿假单胞菌(12.96%)、弗劳地枸橼酸杆菌(7.82%)、沙门菌(6.36%)、白色念珠菌(6.11%)、肺炎克雷伯菌(4.40%)、产气荚膜梭菌(3.67%)、变形杆菌(3.42%)、其他菌(5.63%)。结论 设计出了针对肺炎克雷伯菌的 LAMP 检测方法,该法具有良好的特异性和较高的灵敏度,能够用于肺炎克雷伯菌的快速检验。

关键词:环介导恒温扩增; 示差脉冲伏安法; 肺炎克雷伯菌; 快速检验; 细菌性肠炎

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.12.008

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)12-1539-03

Rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* based on loop-mediated isothermal amplification with differential pulse voltammetry*

Liu Xiaobo, Jiang Dongneng, Xiang Guiming, Pu Xiaoyun[△]

(Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of the Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To construct method based on loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and differential pulse voltammetry (DPV) for the rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* in children with diarrhea. **Methods** By gene alignment and primer design, LAMP method for the detection of *Klebsiella pneumoniae* was constructed. *Klebsiella pneumoniae*, other 8 kinds of interference bacteria and different concentration of *Klebsiella pneumoniae* were amplified by using LAMP technology. Specificity and sensitivity were evaluated by using DPV method. LAMP and culture identification were performed to analyze 200 stool samples of children with diarrhea, and the positive rates of the two methods were compared. Infantile diarrhea cases of outpatient and inpatient in recent two years were analyzed to identify common diarrhea bacteria species and their proportions. **Results** LAMP method for detection of *Klebsiella pneumoniae* was successfully constructed, which was specific and sensitive. Positive rates of culture identification and LAMP for the detection of 200 stool samples were without significant difference. A total of 709 strains of pathogenic bacteria were detected in stool samples of children with diarrhea treated in this hospital in recent two years, including *Shigella* (34.23%), *Escherichia coli* (15.40%), *Pseudomonas aeruginosa* (12.96%), *Citrobacter freundii* (7.82%), *Salmonella* (6.36%), *Candida albicans* (6.11%), *Klebsiella pneumoniae* (4.40%), *Clostridium perfringens* (3.67%), *Bacillus proteus* (3.42%) and other strains (5.63%). **Conclusion** LAMP detection method of *Klebsiella pneumoniae* was successfully constructed, which was with fine specificity and sensitivity, and could be used for rapid detection of *Klebsiella pneumoniae*.

Key words: loop-mediated isothermal amplification; differential pulse voltammetry; *Klebsiella pneumoniae*; rapid detection; bacterial enteritis

克雷伯菌属是条件致病菌,临床感染中以肺炎克雷伯菌多见,可引起肺炎、肠炎、尿路感染、脑膜炎、全身败血症等疾病。在我国肺炎克雷伯菌是引起院内感染的第二大致病菌^[1]。研究发现,近年来肺炎克雷伯菌感染病例有增多趋势,肺炎克雷伯菌已成为小儿肠炎的重要致病菌之一^[2]。婴幼儿腹泻一年

四季均可发病,以夏、秋季为发病高峰,临床表现不典型,可表现为急性腹泻,也可迁延不愈成为慢性腹泻^[3]。抗菌药物在新生儿科应用相当广泛,但目前抗菌药物滥用的情况越来越严重,致使肠道菌群紊乱,导致抗菌药物相关性腹泻增多,滥用抗菌药物已经成为新生儿肠炎的重要病因^[4]。目前,肺炎克雷伯

* 基金项目:重庆市科技攻关重点项目(CSTC2011AB5035)。 作者简介:刘孝波,男,检验技师,主要从事临床微生物检验研究。 [△] 通讯作者, E-mail: puxiaoyong@yahoo.com。

菌的检测方法主要有培养法、免疫学方法^[5]和 PCR 及有关方法等^[6],但培养法耗时长,免疫学方法灵敏度不够高,PCR 及有关方法对实验条件要求高,而且操作复杂,不适合在基层医疗单位进行快速检测。近年来发展的环介导等温扩增(LAMP)法具有简单、快速、特异性强、灵敏度高的特点,结合示差脉冲伏安(DPV)法可对病原菌进行床旁快速检测。DPV 法结合 LAMP 法可在恒温系统中实现电极微型化检测,为临床简便、快捷、批量化检测致病腹泻菌提供了新的途径。本研究设计了一种快速检测肺炎克雷伯菌的 LAMP 方法,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 标本来源:2012 年 10 月至 2013 年 9 月本院门诊及住院腹泻患儿 1 277 例,其中男性 658 例,年龄 0~6 岁,平均 1.4 岁,女性 619 例,年龄 0~6 岁,平均 1.2 岁,采集患儿粪便标本。标准菌株均购自上海天呈医流有限公司,包括:肺炎克雷伯菌(ATCC700603)、福氏志贺菌(ATCC12022)、大肠杆菌(ATCC25922)、铜绿假单胞菌(ATCC27853)、弗劳地枸橼酸杆菌(ATCC43864)、伤寒沙门菌(ATCC14028)、白色念珠菌(ATCC12031)、产气荚膜梭菌(ATCC13124)、奇异变形杆菌(ATCC12453)。

1.2 仪器与试剂 VITEK-2 全自动细菌培养鉴定仪、ANI 细菌鉴定卡均由法国生物梅里埃公司提供;CHI650D 电化学工作站由上海辰华仪器有限公司提供;DNA-LAMP 扩增试剂由日本荣研化学提供;细菌 DNA 提取试剂盒由天根生化科技(北京)有限公司提供;哥伦比亚血液琼脂血平板由重庆庞通公司提供;亚甲基蓝购自美国 Sigma 公司。

1.3 方法

1.3.1 LAMP 引物设计 基因序列检索自美国国家生物技术信息中心(NCBI),引物设计软件采用日本荣研化学公司网络在线 LAMP 设计软件 Primerexplorer4.0。通过基因比对,筛选出肺炎克雷伯菌相对特异的区段,再在选出的区段中设计 LAMP 引物,设计出的引物交由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.3.2 细菌 DNA 提取 取待测菌液 0.5 mL 置于 EP 管中,按照细菌 DNA 提取试剂盒操作步骤提取 DNA。

1.3.3 LAMP 扩增方法 LAMP 扩增反应体系:2 μ L 细菌 DNA,12.5 μ L 反应液,1.0 μ L Bst DNA 聚合酶,4 μ L 引物(含 80 μ mol/L FIP,80 μ mol/L BIP,10 μ mol/L F3,10 μ mol/L B3 等 4 种引物),5.5 μ L 双蒸水,混匀,在 ALB64 恒温金属浴中 65 $^{\circ}$ C 恒温扩增 60 min。

1.3.4 LAMP 特异性试验 试验针对其他 8 种腹泻菌进行培养,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 $^{\circ}$ C 过夜,确定菌液浓度,然后稀释菌液至 1×10^5 CFU/mL。按照细菌 DNA 提取试剂盒操作步骤提取 DNA,进行 LAMP 扩增。扩增液中加入浓度为 250 μ mol/L 亚甲基蓝溶液 50 μ L。

1.3.5 LAMP 灵敏度试验 将肺炎克雷伯菌(ATCC700603)用生理盐水 10 倍倍比稀释菌液为 $10\sim 10^5$ CFU/mL 5 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、LAMP 扩增。扩增液中加入浓度为 500 μ mol/L 亚甲基蓝溶液 50 μ L。

1.3.6 DPV 法检测扩增产物 在 CHI650D 电化学工作站中

选择“Differential Pulse Voltammetry”(DPV),设定“init E”为-0.4 V,“High E”为 0.4 V,“Low E”为-0.4 V,“Final E”为 0.4 V,“Initial E”为 0.02 V,“Quiet time”为 2 s,实时监测反应液的电流曲线。将电压、电流数据导出到 Excel 表中,再通过 OriginPro7.5 软件对记录数据进行分析。

1.3.7 LAMP 法与传统培养法对比试验 将粪便标本接种于哥伦比亚血液琼脂平板上,37 $^{\circ}$ C 培养 24 h。然后挑取单个菌落,一半用于细菌 DNA 提取、LAMP 扩增,条件同前。另一半接种于 ANI 鉴定卡,通过 VITEK-2 全自动细菌培养仪进行鉴定。以传统培养法为参考方法,将 LAMP 法检测结果与培养法检测结果对比,对 LAMP 法进行评价。

1.4 统计 本院近 2 年小儿腹泻病原菌种类及比例 在本院实验室信息系统(LIS)中查询 2012 年 10 月至 2013 年 9 月本院小儿腹泻粪便标本中致病菌阳性结果,统计致病菌种类及例数,为实现同时快速检测多种腹泻致病菌提供实验依据。

2 结果

2.1 LAMP 引物设计 通过基因比对与筛选,最终选择肺炎克雷伯菌 *resA* 基因(GenBank: NC021502.1)为靶基因,设计 LAMP 引物。经美国 NCBI 网站 BLAST 检索,针对该段基因设计的引物具有良好的特异性。引物序列分别为:F3 5'-CGA TTT GTG CAG CTA TAC CG-3',B3 5'-CAT CAA GGT CTT TTG GGG TTA TCG-3';FIP 5'-GCA CGA AAC AGT CTT CAT TCA GGG TCA ACA GTG CTG CGG ATC-3',BIP 5'-GCA CGA AAC AGT CTT CAT TCA GGG TCA ACA GTG CTG CGG ATC-3'。

2.2 LAMP 特异性试验 LAMP 特异性试验结果,见图 1(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。本 LAMP 检测方法能够对肺炎克雷伯菌进行特异性扩增,对其他肠道中常见的干扰菌均无扩增,说明本 LAMP 检测方法有较好的特异性。

2.3 LAMP 灵敏度试验 LAMP 灵敏度试验结果,见图 2(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。本 LAMP 检测方法的最低检测限为 10 CFU/mL,显示出良好的灵敏度。

2.4 LAMP 检测与传统培养法的比较 以培养法为金标准,将本研究建立的 LAMP 法与培养法进行比较,结果见表 1。200 份小儿腹泻粪便标本,传统培养法阳性率为 3.5%,LAMP 法阳性率为 4.0%,二者差异无统计学意义($P>0.05$),LAMP 法与培养法相比,阳性符合率为 100.00%、阴性符合率为 99.48%、总体符合率为 99.50%,可以作为基层医院肺炎克雷伯菌的快速检测方法。

表 1 LAMP 法与培养法检测肺炎克雷伯菌结果比较(n)

LAMP 法	培养法		合计
	阳性	阴性	
阳性	7	1	8
阴性	0	192	192
合计	7	193	200

2.5 本院近 2 年腹泻致病菌的种类及比例 了解腹泻菌种类及所占比例,可实现多种目标病原菌同时用 LAMP 法快速检测,并为疾病的诊断、治疗和抗菌药物的合理应用提供依据。2012 年 10 月至 2013 年 9 月本院送检小儿腹泻粪便标本共

1 277 份,共检出致病菌 409 株,检出率为 32.03%,见表 2。

表 2 本院近 2 年腹泻致病菌的种类及比例		
致病菌种类	株数(n)	比例(%)
福氏志贺菌	140	34.23
大肠杆菌	63	15.40
铜绿假单胞菌	53	12.96
弗劳地枸橼酸杆菌	32	7.82
伤寒沙门菌	26	6.36
白色念珠菌	25	6.11
肺炎克雷伯菌	18	4.40
产气荚膜梭菌	15	3.67
奇异变形杆菌	14	3.42
其他	8	5.63

3 讨 论

肺炎克雷伯菌为革兰阴性杆菌,有荚膜,无鞭毛,无芽孢。近年来,该菌属细菌因能产生超广谱 β-内酰胺酶(ESBLs),导致其对常用的 β-内酰胺类抗菌药物耐药,成为引起医院感染的重要病原菌。有报道指出,急性感染性腹泻患者中,肺炎克雷伯菌感染比例可达 3.75%^[7]。抗菌药物在新生儿科应用相当广泛,耐药性问题也越来越严重。此外,正常肠道菌由于在抗菌药物影响下发生结构改变,也可引起腹泻。目前,肺炎克雷伯菌的检测方法主要有培养法、免疫学方法和 PCR 及有关方法等,但培养法耗时长,免疫学方法灵敏度不够高,PCR 及有关方法对实验条件要求高,而且操作复杂,使基层医疗单位快速检测肺炎克雷伯菌难以实现。

近年来,LAMP 技术被越来越广泛地运用于分子诊断技术领域。LAMP 技术是在传统的 PCR 基础上创建的一种理想的手段,其特点是:设备简单,特异性强,灵敏度高,操作简便,反应迅速。LAMP 法扩增产物可以通过肉眼观察、检测浊度或电阻、电泳等方法进行检测^[8]。目前,LAMP 检测技术在微生物检测研究中得到了广泛的应用,如对沙门氏菌^[9]、志贺氏菌属^[10]、大肠杆菌 O157:H7^[11]、结核分枝杆菌^[12]等,都实现了快速检测。本研究创新性地使用了 DPV 法检测 LAMP 法扩增产物,此法的优点在于扩增产物在恒温系统中就能完成检测,若进一步将电极微型化制作成新型便携式检测芯片,可实现床旁快速检验,并可对不同病原菌进行批量测定。通过对 LAMP 引物的进一步设计,还可以对目标 DNA 进行定量测定^[13-14],从而准确辅助临床诊疗。

本研究所述方法依据 LAMP 技术的基本原理,采用肺炎克雷伯菌 *resA* 基因作为靶基因,设计 LAMP 引物,基因序列来源于 NCBI 基因数据库,对其进行了基因比对,找到相对保守的区段,再应用日本荣研公司 Primerexplorer4.0 在线设计软件,在保守区段上设计 LAMP 引物,在 NCBI 网站上进行 BLAST 检索,验证了设计引物与肺炎克雷伯菌的特异性较高,与其他菌的特异性则较低,在此基础上建立了肺炎克雷伯菌的 LAMP 检测方法。通过试验发现,LAMP 检测方法只针对肺炎克雷伯菌扩增,显示出良好的特异性,最低检测限可达 10 CFU/mL,显示出较高的灵敏度。通过与传统培养法比较,该 LAMP 法与培养鉴定法对肺炎克雷伯菌的阳性检出率差异无统计学意义($P>0.05$),可以作为基层医院肺炎克雷伯菌的快速检测方法。腹泻是小儿科常见病、多发病,其致病菌种类繁多,主要有福氏志贺菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌、弗劳地枸橼

酸杆菌、伤寒沙门菌、白色念珠菌、肺炎克雷伯菌、产气荚膜梭菌、奇异变形杆菌等。肺炎克雷伯菌作为腹泻的重要病原菌之一,其耐药性问题越来越严重,已引起临床高度重视。因此,结合对小儿腹泻的临床统计分析,初步了解腹泻致病菌的种类及其临床分布比例,进一步研究还可实现 LAMP 法对多种目标病原菌的同时快速检测,可以预期 LAMP 结合 DPV 的检测技术有着光明的应用前景。

综上所述,本试验设计的肺炎克雷伯菌 LAMP 检测方法具有良好的特异性和较高的灵敏度,而且操作简便、快速,有望用于小儿腹泻病原菌的快速检验。通过对小儿腹泻的临床资料统计分析,初步了解腹泻致病菌的临床分布,可实现多种目标病原菌同时快速 LAMP 检测,为疾病的诊断、治疗和抗菌药物的合理应用提供依据。

参考文献

[1] 文细毛,任南,吴安华.全国医院感染监控网医院感染病原菌分布及变化趋势[J].中华医院感染学杂志,2011,21(2):350-355.

[2] Xu C. The mechanism of resistance of Klebsiella pneumoniae to antibiotics of β-lactamase[J]. Chin Trop Med, 2006, 6(9):1673-1675.

[3] Wu H. Epidemiological analysis of infants and young children diarrhea caused by Klebsiella[J]. Henan Med Res, 2004, 13(2):178-190.

[4] Yu J. Related factors for antibiotics-associated diarrhea in neonates[J]. Chin J Nosocomiol, 2012, 22(22):5047-5051.

[5] 李轻舟,张燕,戚薇,等.肺炎克雷伯菌荚膜糖蛋白 ELISA 检测方法的研究[J].生物化学与生物物理进展,2004,31(6):567-570.

[6] Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, et al. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes[J]. Microbiol Rev, 1993, 57(1):138-163.

[7] 杨乐,赵建.急性感染性腹泻病原菌的分布及其耐药性分析[J].中国实用医药,2013,8(2):137-138.

[8] 高芳,曹明富.环介导的核酸恒温扩增技术概述[J].生物学教学,2011,36(5):5-7.

[9] Ohtsuka K, Yanagawa K, Takatori K, et al. Detection of Salmonella enterica in naturally contaminated liquid eggs by loop-mediated isothermal amplification, and characterization of Salmonella isolates[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(11):6730-6735.

[10] Song T, Toma C, Nakasone N, et al. Sensitive and rapid detection of Shigella and enteroinvasive Escherichia coli by a loop-mediated isothermal amplification method[J]. FEMS Microbiol Lett, 2005, 243(1):259-263.

[11] Kawasaki S, Horikoshi N, Okada Y, et al. Multiplex PCR for simultaneous detection of Salmonella spp., Listeria monocytogenes, and Escherichia coli O157:H7 in meat samples[J]. J Food Prot, 2005, 68(3):551-556.

[12] 林世平,杨周周,谭卫国,等.环介导等温扩增法快速检测结核分枝杆菌的初步观察[J].中国防痨杂志,2010,32(8):466-469.

[13] 蔡哲钧,冯杰雄,朱圣禾.核酸环介导等温扩增技术[J].国际检验医学杂志,2006,27(12):1092-1093.

[14] Mori Y, Kitao M, Tomita N, et al. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA[J]. J Biochem Biophys Methods, 2004, 59(2):145-157.