

• 检验技术与方法 •

应用实时荧光 PCR 检测各种环境标本中的嗜肺军团菌^{*}

李 达¹, 张晶波¹, 王永全¹, 彭晓旻², 卢立新¹

(1. 北京市西城区疾病预防控制中心, 北京 100120; 2. 北京市疾病预防控制中心, 北京 100013)

摘要:目的 评价实时荧光 PCR 在检测各种环境标本中嗜肺军团菌的应用效果。方法 选择针对 *mip* 基因的引物和探针, 优化实时荧光 PCR 的反应条件, 并对嗜肺军团菌和其他非嗜肺军团菌进行检测, 验证方法的敏感性、特异性和重复性。将实时荧光 PCR 检测各种环境标本中嗜肺军团菌的效果与传统培养法进行比较。结果 实时荧光 PCR 法最低检测限达 6 CFU/mL。该方法特异性好, 嗜肺军团菌呈现阳性结果, 而非嗜肺军团菌均为阴性结果。重复性好, Ct 值变异系数较小。从菌株核酸的提取至检测完成仅需 2 h 左右。实时荧光 PCR 法和传统培养法的检测嗜肺军团菌的阳性率差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 实时荧光 PCR 检测敏感性优于传统培养法。结论 实时荧光 PCR 具有较好的敏感性、特异性和快速的特点, 适于各种环境标本中嗜肺军团菌污染状况调查及应急事件的快速检测。

关键词: 嗜肺军团菌; 聚合酶链反应; 环境标本

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.12.037

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)12-1609-03

Detection of *Legionella pneumophila* in various environmental samples by real-time PCR^{*}

Li Da¹, Zhang Jingbo¹, Wang Yongquan¹, Peng Xiaoming², Lu Lixin¹

(1. Center for Diseases Prevention and Control of Xicheng District, Beijing 100120, China;

2. Beijing Center for Diseases Prevention and Control, Beijing 100013, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the effect of the detection of *Legionella pneumophila* in various environmental samples by real-time PCR. **Methods** A pair of primer and probe were selected to identify the *mip* gene of *Legionella pneumophila*, and the PCR reaction conditions were optimized. By using this method, *Legionella pneumophila* and non-*Legionella pneumophila* were detected. The sensitivity, specificity and reproducibility of the assay were tested and verified. The detection of *Legionella pneumophila* in various environmental samples by real-time PCR was compared with the detection by traditional culture. **Results** The lowest detectable limit of real-time PCR was 6 CFU/mL. This assay had high specificity for detecting *Legionella pneumophila* but not to non-*Legionella pneumophila*. The reproducibility of this assay was high, the coefficient of variation of Ct values was low. The whole process from extraction of genomic DNA of strains to assessment of the results could be done in about 2 h. There was statistically significant between the positive rate which was detected by real-time PCR and detected by traditional culture ($P < 0.05$), real-time PCR was more sensitive than traditional culture for the detection of *Legionella pneumophila*. **Conclusion** The real-time PCR provides a sensitive, specific and rapid method for detection of *Legionella pneumophila*. It is helpful for the rapid detection of environment source of *Legionella pneumophila* pollution and emergency.

Key words: *Legionella pneumophila*; polymerase chain reaction; environmental sample

军团菌在自然界广泛存在并可导致高病死率^[1], 已成为世界性的公共卫生问题, 引起普遍关注。现已分离到军团菌属共有 52 种, 72 个血清型, 其中与人类关系最为密切的是嗜肺军团菌^[2]。而嗜肺军团菌传统的实验室诊断主要依靠细菌培养、生化反应和血清学鉴定, 所耗时间比较长, 易受其他微生物和杂质的干扰, 难以适应疫情处理快速诊断的要求。目前关于嗜肺军团菌 PCR 检测方法的报道中主要的目标基因包括主要的目标基因包括 16S rRNA、5S rRNA 及 *mip* 基因。其中 *mip* 基因的表达产物是迄今所公认的嗜肺军团菌的主要毒力因子之一, 为嗜肺军团菌所特有^[3]。本研究选用文献报道的针对 *mip* 基因的实时荧光 PCR 检测方法, 通过预实验优化反应条件后, 对各种环境标本中嗜肺军团菌进行检测, 检测结果与传统细菌培养方法进行比较, 通过大量的实验数据来对实时荧光 PCR 方法直接检测环境标本中嗜肺军团菌的效果进行评价。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 嗜肺军团菌 LP1 ATCC33125, 其他非嗜肺军团

菌菌株包括: 变形杆菌 ATCC33420、金黄色葡萄球菌 ATCC259238、大肠杆菌 ATCC25922、白色念珠菌 ATCC10231、沙门氏菌 ATCC14208。

1.1.2 主要试剂 GVPC、BCYE 培养基和嗜肺军团菌诊断血清均购自英国 Oxoid 生物公司, 全自动核酸提取试剂盒 (Mag-MaxTM-96 Viral Isolation Kit) 和核酸检测试剂盒 (AgPath-IDTM One-step RT-PCR kit) 均购自 ABI 公司。引物和探针均由北京六和通公司合成: 上游引物 5'-GCT TGC AAT GTC AAC AGC-3'; 下游引物 5'-CCT TTA GCC ATT GCT TCC-3'; 探针 5'(FAM)-CTG CAA CCG ATG CCA CAT CAT TA-(TAMRA)3'。

1.1.3 主要仪器 生物安全柜(型号 Therm Forma), 高效过滤器(型号 GM-0.33 II), ABI 公司的全自动核酸提取仪和荧光定量 PCR 仪。

1.2 方法

1.2.1 传统培养检测方法 将水样摇匀后静置 15 min, 取 200 mL 水样(冷却塔底泥标本用 50 mL 无菌水溶解并离心)

* 基金项目: 北京市西城区科技计划项目(2011JH20)。 作者简介: 李达, 男, 微生物检验技术中级, 主要从事呼吸道病原检测研究。

经 0.45 μm 孔径的滤膜过滤后,剪碎滤膜与 10 mL 灭菌蒸馏水混合并振荡 5 min,取 1 mL 振荡后的液体加同体积酸处理液(pH2.0 HCl-KCl 缓冲液)作用 10 min 后,取 0.1 mL 接种军团菌选择性培养基(GVPC),37 ℃ 培养 48~72 h 后每日观察结果,并挑取可疑菌落转分离培养基(BCYE)分纯和普通血平板培养鉴别。对在血平板上未生长而 BCYE 上生长的可疑菌落做乳胶凝集试验,乳胶凝集试验阳性的菌株再做进一步生化实验分型。

1.2.2 实时荧光 PCR 检测方法 (1)模板处理:采用热裂解法和自动核酸提取试剂盒制备 DNA 模板。热裂解法:取培养方法中的滤膜洗脱液,经 4 500 r/min 离心 10 min,弃上清液,吸取上清液加入灭菌 Eppendorf 管中,12 000 r/min 离心 5 min;吸掉上清液,加入 100 μL ddH₂O 清洗,12 000 r/min 离心 5 min。吸掉上清液,加入 20 mL ddH₂O 彻底混匀。100 ℃ 裂解 15 min,立即放入 -20 ℃ 冰箱,冷冻 15 min;取出 12 000 r/min 离心 5 min。取上清液进行扩增。自动核酸提取法按照试剂盒操作说明书进行。预实验比较两种核酸提取方法,选择效率较高的进行各种水体标本批量检测。(2)实时荧光 PCR 扩增反应体系和反应条件:总反应体系为 25 μL,包括酶 5 μL,2×buffer 12.5 μL,上、下游引物各 0.5 μL,探针 0.5 μL,模板 DNA 5 μL,ddH₂O 5 μL。反应条件为 95 ℃ 10 min,1 个循环;95 ℃ 15 s,55 ℃ 45 s,40 个循环。(3)引物与探针最佳浓度优化:以相同 DNA 浓度的 LP1 菌为 PCR 反应模板,引物浓度(20 μmol/L)和探针浓度(10 μmol/L)不变,将引物量和探针量排出 5 个组合[引物加入量(μL)-探针加入量(μL)]:0.15-0.30、0.25-0.40、0.35-0.50、0.45-0.60、0.50-0.50。对 5 个稀释度的 LP1 型军团菌标准菌液进行检测,通过比较 Ct 值和荧光强度增加值(ΔRn)来优选引物和探针的最佳浓度。(4)实时荧光 PCR 方法验证:敏感性验证,取菌量为 3×10⁸ CFU/mL 的 LP1 型军团菌标准菌株,用双蒸水进行 10 倍稀释,从 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸ 稀释液中吸取 100 μL 到 BCYE 培养基上,用 L 棒及时涂布均匀,每个稀释度做 3 个平皿,于含 5% CO₂ 的培养箱,37 ℃ 培养 3~5 d 后进行计数。同时再取每个稀释度的菌液各 1 mL,制成 100 μL 的模板,用于 PCR 敏感性试验。特异性验证,对上述嗜肺军团菌 LP1 型标准菌株 2 个不同稀释度和 5 株非嗜肺军团菌株提取 DNA,进行实时荧光 PCR 检测,验证方法特异性。重复性验证,取上述 3 个嗜肺军团菌 LP1 型菌株不同稀释度检测结果,计算 Ct 值变异系数验证检测体系的稳定性。(5)实时荧光 PCR 结果判定:荧光定量 PCR 检测以 Ct<37 并且扩增曲线呈

S 型为阳性判定原则。其中 Ct<35 且扩增曲线良好可直接判定为阳性,Ct 为 35~37 之间需要重复实验,2 次实验均能得到良好 S 型扩增曲线方可判定为阳性。

1.3 统计学处理 数据采用 Epidata3.02 软件建立数据库,使用 SPSS13.0 进行数据统计处理。率的差异比较用 χ² 检验,P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 热裂解法和自动核酸提取试剂盒制备 DNA 模板效果比较 分别用热裂解法和自动核酸提取试剂盒提取 LP1 型军团菌标准菌株 3 个稀释度的 DNA 进行实时荧光 PCR 反应。结果如图 1 所示(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”),用热裂解煮沸法提取 DNA 的 Ct 值分别为 19.58、22.41 和 28.04,用试剂盒提取 DNA 的 Ct 值分别为 22.59、26.75 和 30.31,前者结果优于后者。考虑热裂解法方法简便、成本低的因素,在本研究后续的批量实验中,模板 DNA 的提取均采用了热裂解法。

2.2 引物与探针最佳浓度优化 将 5 个引物量和探针量的组合对 5 个稀释度的 LP1 型军团菌标准菌液进行检测,通过比较 Ct 值和荧光强度增加值(ΔRn)优选出引物和探针的最佳组合为引物、探针各加入 0.5 μL。

2.3 方法敏感性评价 利用活菌进行评价:LP1 型菌株不同稀释度平皿培养结果显示,其中接种菌液稀释度为 10⁻¹、10⁻² 的平皿不可计数,10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 稀释度的平皿中,菌落数分别为 2 588、590、53、6 CFU/mL,10⁻⁷、10⁻⁸ 稀释度的平皿中未检出菌落。不同稀释度提取模板经荧光定量 PCR 检测,检测结果如图 2 所示(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”),10⁻⁷、10⁻⁸ 稀释度检测结果为阴性,10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 稀释度均呈现较好的 S 型曲线,10⁻⁶ 稀释度 Ct 值为 35.78,从而可知实时荧光 PCR 的最低检测限为 6 CFU/mL。

2.4 方法特异性评价 实时荧光 PCR 检测 2 株嗜肺军团菌、5 株非嗜肺军团菌检测,结果见图 3 所示(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”),本反应体系对嗜肺军团菌有良好的特异性,而其他 5 株非嗜肺军团菌均为阴性结果。

2.5 方法重复性评价 取 10 倍系列稀释的 LP1 型军团菌标准菌株 3 个不同稀释度(10⁻²、10⁻³、10⁻⁴),提取 DNA 进行实时荧光 PCR 检测,每个浓度做 3 个重复试验。检测结果如图 4 所示(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”),计算各浓度 Ct 值的变异系数,分别为 0.489%、0.246%、0.343%,证实该方法具有较好的重复性。

表 1 两种方法检测各种环境标本中嗜肺军团菌结果比较

标本类型	样本数(n)	传统培养		实时荧光 PCR		χ ²	P
		阳性数(n)	阳性率(%)	阳性数(n)	阳性率(%)		
河湖水	30	2	6.7	6	20.0	2.308	0.129
喷泉水	30	4	13.3	7	23.3	0.677	0.411
淋浴热水	83	47	56.6	60	72.3	4.444	0.035
冷却塔水	113	38	33.6	81	71.7	32.818	<0.01
冷却塔底泥	48	16	33.3	30	62.5	8.181	0.004
合计	304	107	35.2	184	60.5	—	—

—:无数据。

2.6 两种方法检测各种环境标本中嗜肺军团菌结果比较 从各种标本类型的阳性率来看,两种方法检测阳性率差距比较明

显,实时荧光 PCR 检测阳性率是传统培养的 1.28~2.99 倍,见表 1。对 5 种环境标本两种检测方法的阳性率分别做 χ^2 检验,结果显示,河湖水和喷泉水这两种类型标本两种检测方法的阳性率差异没有统计学意义($P>0.05$),而淋浴热水、冷却塔水和冷却塔底泥这三种类型标本两种检测方法的阳性率差异有统计学意义($P<0.05$),实时荧光 PCR 检测阳性率高于传统培养。两种方法检测总阳性率差异有统计学意义($\chi^2=83.698, P<0.01$),实时荧光 PCR 检测总阳性率高于传统培养。

3 讨 论

嗜肺军团菌主要存在于水和土壤中,污染的水和土壤以气溶胶的形式被人体吸入可能是军团菌感染的主要途径,军团菌也可在医院、宾馆等单位的供水系统、温泉水、空调的冷却塔等检出,并可能是引起暴发流行的原因^[4]。李达等^[5]报道包括河湖水、喷泉水、淋浴热水和冷却塔水在内的多种水体检出嗜肺军团菌,阳性率在 6.7%~60.2%,而且淋浴热水和冷却塔水阳性率分别高达 60.2%和 35.8%,随着经济发展,热水系统和中央空调等人工水环境越来越普及,军团菌污染对人群健康的潜在威胁越来越严重。

目前,嗜肺军团菌的检测主要靠分离培养等传统方法,培养军团菌要求特殊培养基,培养难度大、时间长^[6],对实验人员的技术要求比较高且费事,标本中其他微生物能抑制其生长,样本预处理过程中会导致部分细菌死亡,另外有些活的细菌出现“活的非可培养状态”,因此传统培养法虽然特异性好,但阳性率低,仅为 50%~60%^[7]。近年来,实时荧光 PCR 已广泛应用于生物、医药等各个领域,有文献报道 Taqman 实时荧光 PCR 检测嗜肺军团菌以达到快速检测的目的^[8]。本研究以针对嗜肺军团菌 *mip* 基因的引物和探针,选用 ABI 公司的 Ag-Path 一步法 PCR 试剂盒,通过预实验优化模板提取方法、引物与探针最佳浓度组合等反应条件。热裂解煮沸法提取 DNA 的效率优于试剂盒提取 DNA 的效率,可能的原因是,本研究所用的全自动核酸提取试剂盒以磁珠吸附的原理可以用于提取 RNA 和 DNA,此提取方法的优势是特异性高,操作简便,提取时间短(15 min),但相比于其他方法,此方法因裂解时间短,提取效率不是很高,本课题组的经验也证实其提取效率低于 QIAGEN 提取试剂盒和热裂解煮沸法。因此,在大批量检测嗜肺军团菌浓度高的标本时(例如临床痰标本等),可以考虑使用该试剂盒提取 DNA,当检测嗜肺军团菌浓度低的各种环境标本时,为了降低假阴性,提高检出率,还是建议优先使用热裂解煮沸法。实验结果显示,本方法检测敏感性高,利用 LP1 型标准菌株不同稀释度进行检测验证最低检测限达 6 CFU/mL;对 2 株嗜肺军团菌和 5 株非嗜肺军团菌检测结果显示,本方法有较好的特异性;稳定性好,3 个不同稀释度 LP1 型军团菌标准菌株重复 3 次实验, Ct 值变异系数较小;实行完全闭管式操作,减少了扩增产物的交叉污染^[9];操作简单,无需凝胶电泳,结果判别直观明了,使用 ABI7500 整个过程(加样在内)仅需 2 h,较传统培养法而言大大减少了检测时间。

预实验肯定了 Taqman 实时荧光 PCR 检测嗜肺军团菌的可行性和优点,但实际应用的角度来看,尚需通过大量的实验数据来评价实时荧光 PCR 方法直接检测环境标本中嗜肺军团菌的运用效果。本研究将实时荧光 PCR 对 5 种类型环境标本中嗜肺军团菌的检测结果显示与传统细菌培养方法进行比较,结果

显示:5 种环境标本中,所有传统细菌培养方法阳性的标本,经实时荧光 PCR 检测均为阳性,且实时荧光 PCR 检测阳性率是传统培养的 1.28~2.99 倍,两种方法检测总阳性率差异有统计学意义($P<0.05$),实时荧光 PCR 检测敏感性优于传统培养法。淋浴热水、冷却塔水和冷却塔底泥这三种类型标本两种检测方法的阳性率差异有统计学意义,实时荧光 PCR 检测阳性率高于传统培养。说明实时荧光 PCR 方法对淋浴热水、冷却塔水和冷却塔底泥这三种嗜肺军团菌污染状况严重的标本的检测效果良好,具有较好的实际应用意义。同时,实时荧光 PCR 特异性高的特点,也解决了环境标本中其他微生物能抑制嗜肺军团菌生长和“活的非可培养”的问题^[10];对死的细菌不能培养出来而实时荧光 PCR 则能检测出来,解决了环境标本及时上送和妥善保存中存在的问题。

综上所述,本课题组认为,应用实时荧光 PCR 法检测各种环境标本中的嗜肺军团菌具有高度敏感性和特异性,且快速、稳定,可用于空调冷却水等各种环境标本中嗜肺军团菌的快速检测,为军团菌病预防控制工作提供科学依据,尤其对应急样本的检测及在军团菌病暴发流行时准确、快速地确定传染源方面有较大的应用前景,不失为一种简易、快速、敏感、特异、定量检测嗜肺军团菌的有效方法。

参考文献

- [1] 武建国. 军团菌病[M]. 上海:东南大学出版社,1990:98.
- [2] Fields BS, Benson RF, Besser RE. Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation[J]. Clin Microbiol Rev, 2002, 15(3):506-526.
- [3] Heath CH, Grove DI, Looke DFM. Delay in appropriate therapy of Legionella pneumonia associated with increased mortality[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1996, 15(4):286-290.
- [4] Perola O, Kauppinen J, Kusnetsov J, et al. Persistent Legionella pneumophila colonization of a hospital water supply: efficacy of control methods and a molecular epidemiological analysis[J]. AP-MIS, 2005, 113(1):45-53.
- [5] 李达,王永全,张晶波,等. 各种水体嗜肺军团菌污染状况和分布规律研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(8):1839-1842.
- [6] Miller R D, Kenep K A. Risk assessments for Legionnaires' disease based on routine surveillance of cooling towers for legionellae [M]. Washington, DC: ASM, 1993:40-43.
- [7] Breiman RF, Butler JC. Legionnaires' disease: clinical, epidemiological, and public health perspectives[J]. Semin Respir Infect, 1998, 13(2):84-89.
- [8] 朱水荣,张政,卢亦愚,等. 嗜肺军团菌荧光定量 PCR 检测[J]. 中国公共卫生, 2008, 24(9):1111-1113.
- [9] Kuzio S, Sylvain K, Hanguehard A, et al. Rapid screening for HLA-B27 by a TaqMan-PCR assay using sequence-specific primers and a minor groove binder probe, a novel type of TaqMan trade mark probe[J]. J Immunol Methods, 2004, 287(1/2):179-186.
- [10] Yáñez MA, Carrasco-Serrano C, Barberá VM, et al. Quantitative detection of Legionella pneumophila in water samples by immunomagnetic purification and real-time PCR amplification of the dotA gene[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(7):3433-3441.

(收稿日期:2014-02-10)