

• 综述 •

细菌检测方法研究进展*

王瑞莲 综述, 林裕龙[△] 审校

(南方医科大学珠江医院检验医学部, 广东广州 510282)

关键词: 细菌; 检测; 综述

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.16.033

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2014)16-2200-02

传统上, 细菌的检测方法先将标本进行培养, 分纯, 配制成一定浓度的细菌浓度, 再进行各种不同生化反应, 最后综合所获得的生化结果实现对细菌的鉴定。该方法影响因素多、操作繁杂、仪器设备要求高、检测周期长、对技术人员专业技能要求高, 甚至因个别细菌生长的特殊要求而无法得到鉴定结果。目前, 特异酶的使用、质谱技术的应用和生物传感器等新型技术的应用, 使得细菌的检测方法在鉴定技术、免疫技术以及分子生物学方面也取得了新的进步, 进而大幅缩短细菌鉴定周期, 实现了无需分纯即可鉴定细菌和实现了高通量检测细菌。

1 鉴定技术的新突破

1.1 特异酶的使用 在基础培养基中加入某些菌种特异性酶的底物, 在抑制不相关细菌生长, 促进目的细菌生长的同时, 通过菌落颜色的变化或者所产生特色的光信号等特殊的变化进而对目的细菌进行直接鉴定。如 Fedorko 等^[1] 利用 L-脯氨酸氨基肽酶(LPA 酶)的特性对难辨梭菌进行鉴定; Clark 等^[2] 综合利用 DL-丙氨酸-β-萘胺和 D-丙氨酸-对-硝基苯胺联合检测单核细胞增多李斯特菌丙氨酸氨基肽酶。目前, 市场上已有科玛嘉真菌显色培养基, 标本培养 24~48 h 就可通过菌落不同的颜色和形态对 4 种常见的念珠菌进行快速的鉴定, 另外还有科玛嘉的弧菌显色培养基和尿道显色培养基等, 其鉴定的准确性已得到临床的广泛认可。

1.2 质谱技术的应用 基质辅助激光解吸飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)通过微生物蛋白质表达谱中的特征谱峰鉴定, 然后与数据库所存在的质谱图进行比较, 进而对细菌的属、种、株, 甚至是不同亚型进行分类。MALDI-TOF MS 技术最大特点是对不需要纯菌落, 只需单个菌落就可以直接点样。对单菌落的分析是该技术的一大特点, 通常是将单菌落直接涂在样品靶上, 再用基质覆盖, 只需几分钟即可得到细菌的蛋白质图谱, 与常规的鉴定方法比较甚至可以提前 24 h 获得鉴定结果^[3]。在常见的人和动物病原菌检测鉴定方面, MALDI-TOF MS 技术已经在肺炎链球菌、单增李斯特菌、脆弱拟杆菌、沙门氏菌、阪崎肠杆菌及脑膜炎奈瑟球菌等病原菌的快速鉴定方面进行应用, 取得很好的结果^[4]。

2 免疫学技术的新发展

2.1 免疫磁性分离技术 免疫磁珠是磁性微球与免疫配体结合而成的一种免疫学技术。磁珠通过免疫配体与靶物质结合, 可在磁场中定向移动, 从而达到分离、富集、纯化靶物质的目的^[5]。免疫磁珠检测的病原微生物种类繁多, 临幊上免疫磁珠

最常应用于检测人粪便中 O157:H7, 用于明确腹泻病的病原体。已有商品化试剂(如挪威 Dynal 公司抗 O157:H7)。如诊断由肠出血性大肠埃希菌 O157:H7 引起的出血性结肠炎, 采用 O157:H7 单克隆抗体标记磁珠, 对已增菌 6 h 的粪便标本进行病原菌富集和分离。磁场分离的磁珠细菌混合物经缓冲液悬浮, 即为富集的 EHEC O157:H7, 菌悬液再划线接种于添加了头孢克肟和亚碲酸钾的山梨醇麦康凯选择性培养基, 长出的菌落进行生化鉴定。传统方法分离鉴定 O157:H7, 常需要挑选合适的方法进行选择性培养, 又需特异性抗血清等多种方法鉴定 E. coli 型别, 耗时又不经济。免疫磁珠既能保证分离的特异性, 又能提高方法的敏感度, 而且减少了原方法的操作步骤, 简便易行^[6-7]。

2.2 免疫传感器 免疫传感器是将基于抗原抗体特异性结合的原理与生物传感器相结合的一项检测技术, 不仅具有便捷、灵敏及可重复使用等特点, 甚至无需分离即可鉴定细菌并对细菌的浓度进行定量。常用于细菌检测的方法有酶免疫传感器、压电晶体免疫传感器和光学免疫传感器。Escamilla-Gómez 等^[8] 采用酶免疫传感器的方法检测金黄色葡萄球菌量, 检测范围和最低检出限分别为 $4.4 \times 10^5 \sim 1.8 \times 10^7$ CFU/mL 和 1.7×10^5 CFU/mL。Guo 等^[9] 利用压电晶体免疫传感器检测大肠杆菌, 检出限为 0~1 log CFU/mL。Ohk 等^[10] 采用光学免疫传感器同时检测李斯特菌、大肠杆菌 O157:H7 及沙门氏菌, 检出限为 1×10^3 CFU/mL。

3 分子生物学的新探索

3.1 PCR 扩增 rRNA 基因技术 rRNA 结构不仅具有保守性同时又具有高变性特征。保守性反映生物物种的亲缘关系而高变性揭示生物物种的特征核酸序列, 是进行属种鉴定的分子基础。rRNA 的这特点使得这一段核酸序列成为目前人们利用 PCR 技术检测不同细菌种间或种内差异最为理想的模板。目前, 临幊上运用 PCR 扩增 rRNA 基因扩增技术主要是 16S rRNA。王佃鹏等^[11] 利用 16S rRNA 基因的方法对细菌进行了快速鉴定, 为临幊诊断治疗及耐药菌的分子遗传分析提供科学依据。

3.2 环介导等温扩增技术(LAMP) LAMP 技术是利用靶序列的 6 个特异性区域进而设计 2 对引物, 再使用一种具有链置换活性的 DNA 聚合酶在相同温度条件保温 30~60 min, 就可扩增出 10^9 copies 靶序列, 同时伴有肉眼可见的白色焦磷酸镁沉淀产生。该方法具有高效性、高灵敏度、高特异性、操作简单

* 基金项目: 传染病监测技术平台之广东省传染病病原谱流行规律研究课(2012ZX10004-213)。 作者简介: 王瑞莲, 女, 主管技师, 主要从事临幊检验诊断学研究。 △ 通讯作者, E-mail: ly15775541@126.com。

和成本低廉等特点^[12]。目前 LAMP 已成功地用于检测霍乱弧菌^[13]、肺炎链球菌^[14]、炭疽芽孢杆菌^[15]等细菌类病原微生物。

3.3 随机扩增多态性 DNA 技术(RAPD) RAPD 技术利用一系列不同的随机排列碱基顺序的寡聚核苷酸单链为引物, 对所研究基因组 DNA 进行 PCR 扩增进而产生一系列片段。根据这些片段的数量或者大小然后对不同的分离物进行分类鉴定。它具有特异性强、操作简便、快速等特点, 进一步弥补了标准 PCR 方法只能应用于已知 DNA 序列的缺陷^[16]。池细悌等^[17]对院内感染的多重耐药鲍曼不动杆菌进行了随机多态性 DNA 分型; 莫秋华等^[18]建立基于随机扩增多态性 DNA 分析的霍乱弧菌简便快速分子分型方法。

3.4 生物芯片技术 生物芯片技术按照载体的差异可分为固相芯片和液相芯片。固相芯片指的是先将核酸、蛋白质等生物分子固定在固相载体上, 在一定条件下与标记的样品反应, 最后对标记信号进行综合分析从而得到样品的检测结果^[19]。液相芯片的检测原理是一种以经过可识别、特殊编码的微球作为生物分子(抗原、抗体、蛋白质、核酸等)反应及信号检测载体的阵列分析技术, 该反应是通过混悬于液相中的微球表面上进行, 同时也称为悬浮式点阵技术^[20]。其技术特点是: 重复性好, 每个指标的反应单元有 1 000~5 000 个, 分析 100 次再取平均值, CV 值小于 5%; 灵敏度高, 低限可达 0.01 pg/mL; 线性范围宽, 动态范围高达 4~6 个数量级; 快速省时, 最快高达每小时 10 000 测试; 高通量, 微量(10 μL)标本, 1 次检测 100 个指标^[21-22]。朱海红等^[23]基于悬浮芯片技术建立了 56 种细菌高通量检测微生物诊断技术平台, 实现了病原微生物准确、快速和高通量的检出。

随着科学技术日新月异的发展使得细菌的检测方法在鉴定技术有新突破、免疫学技术有新发展、分子生物学技术有新探索, 不仅实现了对病原微生物进行准确鉴定, 而且在灵敏度、特异性和实用性方面, 更适合于病原菌全面、快速、高通量检测的需要, 为临床提供及时准确的细菌鉴定结果, 在一定程度上有助于缓解抗菌药物过度使用的问题, 减轻了家庭和国家的经济负担, 促进了人民生活的健康发展。

参考文献

- [1] Fedorko DP, Williams EC. Use of cycloserine-cefoxitin-fructose agar and L-proline-aminopeptidase(PRO Discs) in the rapid identification of *Clostridium difficile*[J]. *J Clin Microbiol*, 1997, 35 (5):1258-1259.
- [2] Clark AG, McLaughlin J. Simple color tests based on an alanyl peptidase reaction which differentiate *Listeria monocytogenes* from other *Listeria* species[J]. *J Clin Microbiol*, 1997, 35 (8): 2155-2156.
- [3] 康琳, 李楠, 高宏伟, 等. 质谱技术在微生物检测和鉴定中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 32(10): 2613-2615.
- [4] 陈信忠, 龚艳清, 郭书林. MALDI-TOF-MS 在病原微生物鉴定中的研究进展[J]. 生物技术通报, 2012, 20(6): 43-48.
- [5] 余楠, 车小燕. 免疫磁珠技术在病原微生物检测中的应用前景[J]. 中华检验医学杂志, 2011, 34(3): 280-283.
- [6] 李洪卫, 景怀琦, 逢波, 等. 徐州市 2000 年肠出血性大肠埃希菌 O157:H7 感染性腹泻的调查[J]. 中华流行病学杂志, 2002, 35 (2): 44-47.
- [7] 肖敏, 易勇, 毛旭虎, 等. 免疫磁分离及免疫比浊分析对福氏志贺菌的自动快速定量检测[J]. 免疫学杂志, 2009, 25(3): 341-345.
- [8] Escamilla-Gómez V, Campuzano S, Pedrero M, et al. Immunosen-sor for the determination of *Staphylococcus aureus* using a tyrosi-nase-mercaptopropionic acid modified electrode as an amperometric transducer[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2008, 391(3): 837-845.
- [9] Guo X, Lin CS, Chen SH, et al. A piezoelectric immunosensor for specific capture and enrichment of viable pathogens by quartz crystal microbalance sensor, followed by detection with antibody-functionalized gold nanoparticles[J]. *Biosens Bioelectron*, 2012, 38 (1): 177-183.
- [10] Ohk SH, Bhunia AK. Multiplex fiber optic biosensor for detection of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmo-nella enterica* from ready-to-eat meat samples[J]. *Food Microbiol*, 2013, 33(2): 166-171.
- [11] 王佃鹏, 董瑞玲, 张艳芳, 等. 细菌直接 PCR 和双引物策略鉴定 16S rRNA 基因技术的建立[J]. 热带医学杂志, 2012, 12(2): 181-183.
- [12] 肖维威, 周琳华, 郑文岭, 等. 环介导等温扩增技术及其在病原微生物检测中的应用[J]. 基础医学与临床, 2013, 33(1): 19-23.
- [13] Yamazaki W. Sensitive and rapid detection of cholera toxin-producing *Vibrio cholerae* using loop-mediated isothermal amplification [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 739(2): 13-22.
- [14] Kim DW, Kilgore PE, Kim EJ, et al. The enhanced pneumococcal LAMP assay: a clinical tool for the diagnosis of meningitis due to *Streptococcus pneumoniae*[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e42954.
- [15] Dugan L, Bearinger J, Hinckley A, et al. Detection of *Bacillus anthracis* from spores and cells by loop-mediated isothermal amplification without sample preparation[J]. *J Microbiol Methods*, 2012, 90(3): 280-284.
- [16] 李明莹, 杨立国, 刘世强, 等. 简单实用的分子标记技术—随机扩增多态性 DNA(RAPD)[J]. 杂粮作物, 2000, 23(1): 21-24.
- [17] 池细悌, 高世华, 陈家龙, 等. 多重耐药鲍曼不动杆菌随机多态性 DNA 分型与院内感染相关性研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2013, 20(6): 609-613.
- [18] 莫秋华, 谭华, 安胜利, 等. 基于随机扩增多态性 DNA 分析的霍乱弧菌分子分型方法的建立[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2012, 32 (1): 1-5.
- [19] 张国强. 病原微生物高通量检测方法的研究进展[J]. 中国免疫学杂志, 2010, 20(9): 859-863.
- [20] 何英, 陆学东. 液相芯片技术及其临床应用[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(12): 1107-1108.
- [21] 胡瑞, 王景林. 多重快速鉴别病原微生物的新技术: xMAP 液态芯片[J]. 卫生研究, 2007, 20(6): 759-762.
- [22] Dunbar SA, Vander ZC, Oliver KG, et al. Quantitative, multi-plexed detection of bacterial pathogens: DNA and protein applica-tions of the Luminex LabMAP system[J]. *J Microbiol Methods*, 2003, 53(2): 245-252.
- [23] 朱海红, 蒋汉梁, 陈智, 等. 基于悬浮芯片技术的 56 种病原微生物的高通量检测[J]. 浙江大学学报: 医学版, 2007, 32(6): 524-530.

(收稿日期: 2014-03-28)