

• 临床检验研究论著 •

利用环介导恒温扩增法快速检测伤寒杆菌*

刘琳琳, 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 利用环介导恒温扩增技术(LAMP),设计快速检测伤寒杆菌的方法,研究其反应特性,以期能应用于临床现场检验。方法 (1)通过基因比对与引物设计,建立针对伤寒杆菌的 LAMP 检测方法。(2)根据该方法对伤寒杆菌及其他干扰菌进行检测时的扩增情况,对其特异性进行评价。(3)根据该 LAMP 方法对不同浓度伤寒杆菌的扩增情况,得出其最低检测限,对其灵敏度进行评价。结果 该 LAMP 检测方法只针对伤寒杆菌有扩增,对其他干扰菌不扩增,显示出良好的特异性。该方法对伤寒杆菌的最低检测限为 1×10^1 CFU/mL,其灵敏度较高。结论 本试验设计出了针对伤寒杆菌的 LAMP 检测方法,该 LAMP 检测方法具有良好的特异性和较高的灵敏度,能够用于伤寒杆菌的临床快速检测。

关键词:敏感性;特异性; 环介导恒温扩增; 伤寒杆菌; 快速检测

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.05.010

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)05-0534-02

Rapid detection of Typhoid Bacillus by loop-mediated isothermal amplification assay*

Liu Linlin, Jiang Dongneng, Pu Xiaoyun[△]

(Department of Clinical Laboratory, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective Use loop mediated isothermal amplification(LAMP) technology to design method for rapid Salmonella typhi detection, and study the reaction's characteristics in order to apply to the clinical inspection. **Methods** (1)By gene alignment and primer design, build LAMP detection method for Salmonella typhi. (2)According to the amplification by LAMP method for the detection of Salmonella typhi and other interference bacteria, its specific assessment was made. (3)Detection of the LAMP method for different concentrations of Salmonella typhi amplification, observe the minimum detection limit, and sensitivity assessment was made. **Results** The LAMP method only worked for Salmonella typhi, other interference bacteria were not amplified, showing good specificity. The minimum detection limit of the method of Salmonella typhi was 1×10^1 CFU/mL, the sensitivity was good. **Conclusion** The research designed a LAMP method for Salmonella typhi detection, the LAMP method has good specificity and high sensitivity, and can be used for Salmonella typhi's clinical inspection.

Key words: sensitivity and specificity; loop-mediated isothermal amplification; typhoid bacillus; rapid detection

伤寒是由伤寒杆菌引起的经消化道传播的一种乙类急性肠道传染病。全年均可发病,全病程均有传染性,目前仍是我国及世界上许多发展中国家较为常见的传染病之一。早期快速诊断是防治该病的关键和重点^[1]。临床上用于确诊伤寒患者的方法主要依靠血液及骨髓中细菌培养和血清学检查,由于细菌培养时间较长,检测过程繁琐,且血清中抑菌物质及抗生素的影响,血培养伤寒沙门菌阳性率逐年下降难以达到早期诊断的目的;经典的肥达氏反应是检测血清中的抗体,时间长假阳性高^[2]。因此,需要一种快速、准确、简便的检测方法,适合于床旁检验及现场快速检测。环介导恒温扩增技术(LAMP)目前已经成为常用的临床现场检验方法之一。本研究的目的在于设计一种利用 LAMP 快速检测伤寒杆菌的方法报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 研究对象为本院 2011 年 7 月至 2012 年 4 月消化科腹泻患者 188 例,其中,男 90 例,年龄 12~55 岁,平均 37 岁;女 98 例,年龄 14~60 岁,平均 36 岁。

1.2 仪器与试剂 标准菌株均购自于上海天呈医流有限公司,包括:伤寒杆菌(ATCC14028);肠道中常见的干扰菌:大肠埃希菌(ATCC 35218),阴沟肠杆菌(ATCC 13047),肠白色念珠菌(ATCC19402),产气杆菌(ATCC19406),黏质沙雷菌(ATCC19606),肺炎克雷伯菌(ATCC700603)弗氏柠檬酸杆菌(ATCC10787)粪肠球菌(ATCC 29212)。DNA-LAMP 扩增

试剂盒、FDR 染料、LA320C 动态浊度仪购自日本荣研公司, VITEK-2 全自动细菌培养鉴定仪及 GN(革兰阴性杆菌)鉴定卡购自法国生物梅里埃公司生产;细菌 DNA 提取试剂盒由天根生化科技(北京)有限公司生产。

1.3 方法

1.3.1 LAMP 引物的设计 基因序列检索自 NCBI(National Center for Biotechnology Information);比对软件:DNA USER chs1.0;引物设计软件:日本荣研化学公司网络在线 LAMP 设计软件 Primerexplorer 4.0。通过软件比对,筛选出伤寒杆菌相对特异的区段;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 向 LAMP 扩增反应管加入 2 μ L 细菌 DNA,12.5 μ L 反应液,1.0 μ L BstDNA 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 4 种引物),5.5 μ L 双蒸水。混匀,在 LAC320 比浊仪上 65 $^{\circ}$ C 恒温扩增 60 min。根据反应管中反应液浊度及颜色变化,检测结果。

1.3.4 LAMP 特异性试验 挑取生长良好的单个菌落,用生理盐水水溶解,取各稀释度样本 1 mL,做倾注培养,37 $^{\circ}$ C 过夜,计数菌落数(CFU),可确定菌液浓度,然后稀释菌液至 1×10^5 CFU/mL。取已稀释好的待测菌液 1 mL 置于 EP 管中,按

* 基金项目:重庆市科委重点攻关项目(2011AB5035)。 作者简介:刘琳琳,女,主管技师,主要从事分子诊断学研究。 [△] 通讯作者, E-mail: puxiaoyun@yahoo.com。

照细菌 DNA 提取试剂盒操作步骤提取 DNA, 然后进行 LAMP 扩增, 检测伤寒杆菌 LAMP 的特异性。

1.3.5 LAMP 灵敏度试验 将伤寒杆菌标准菌株用生理盐水 10 倍比稀释菌液为 1×10^5 CFU/mL $\sim 1 \times 10^0$ CFU/mL 范围内的 6 个浓度梯度, 再分别取各稀释菌液 0.5 mL 于管中, 相同方法提取细菌 DNA 及进行 LAMP 扩增, 测定其最低检测限, 检测伤寒杆菌 LAMP 的灵敏度。

1.3.6 LAMP 检测与细菌培养鉴定的比较 取患者粪便在送检 1 h 内直接接种于 SS 培养基, 经历 37 ℃ 24 h 培养后从 SS 培养基上挑取较小的无色或淡黄色菌落, 一半进行细菌 DNA 提取、LAMP 扩增。另一半用生理盐水稀释为 0.5 麦氏单位的菌悬液, 再接种于 GN 鉴定卡, 通过 VITEK-2 全自动细菌培养仪进行鉴定。最后进行比较, 以细菌鉴定仪为参考方法, 观察伤寒杆菌 LAMP 检测方法与细菌厌氧培养鉴定结果的符合度。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行数据处理, 率的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 引物设计 通过基因比对与筛选, 最终选择伤寒杆菌 invA 基因 (Genbank: EU348365) 为靶基因, 在其相对保守的区域设计出了 LAMP 引物。基因比对及引物序列为 F3: 5'-GGA AAA AGA AGG GTC GTC GT-3', B3: 5'-ATG CTG TTA TCG TCC AGG C-3', FIP: 5'-CCG GCT CTT CGG CAC AAG TAA T-GGA CTG ATT GGC GAT CTC G-3', BIP: 5'-GCT CAA CTT GCG GAG CGT CT-AAC AAT ACT TCC GGC AGG C-3'。

2.2 特异性实验 见图 1, 本伤寒杆菌 LAMP 检测方法能够对伤寒杆菌进行特异性扩增, 对腹泻中常见的干扰菌均无扩增。伤寒杆菌 LAMP 检测方法有较好的特异性。

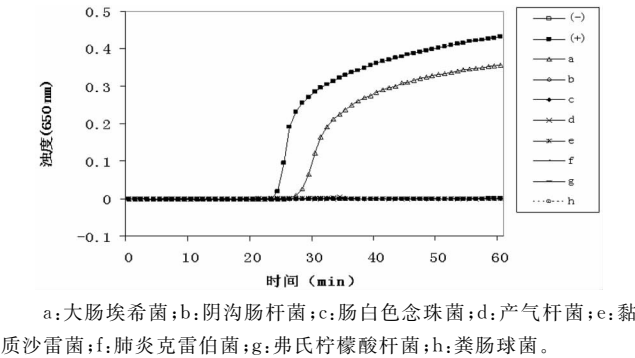


图 1 特异性实验

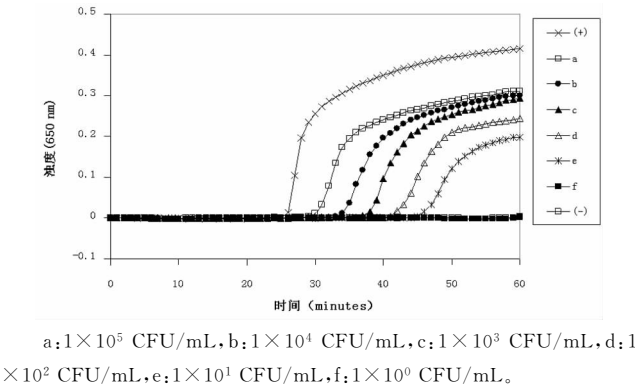


图 2 灵敏度实验

2.3 灵敏度实验 见图 2, 伤寒杆菌标准菌株 (ATCC14028) $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^5$ CFU/mL 各浓度检测结果均为阳性, 而 $1 \times$

10^0 CFU/mL 为阴性。伤寒杆菌 LAMP 检测方法的最低检测限为 1×10^1 CFU/mL, 有较高的灵敏度。

2.4 LAMP 检测与细菌培养鉴定的比较 见表 2, 本研究所述检测方法与全自动细菌培养仪培养鉴定结果一致, 具有很高的符合度。灵敏度为 92.59%, 特异度为 98.14%, 准确度为 97.34%, 阳性率差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.2, P = 0.65$)。

表 2 LAMP 检测与细菌培养鉴定的比较

细菌培养	LAMP 扩增	
	(+)	(-)
伤寒杆菌	25	2
鉴定为其他细菌	3	158

3 讨 论

目前, 用于确诊伤寒患者的方法主要依靠血液及骨髓中细菌培养和血清学检查, 由于细菌培养时间较长, 检测过程繁琐, 且血清中抑菌物质及抗生素的影响, 血培养伤寒沙门菌阳性率逐年下降难以达到早期诊断的目的; 经典的肥达反应是检测血清中的抗体, 亦无早期诊断意义, 常规 PCR 扩增。厌氧培养法培养条件高、耗时长 (约 18~72 h), 往往使患者错过最佳治疗时间, 造成严重后果; 常规 PCR 扩增主要是利用荧光定量 PCR 技术, 有较好的特异性。但现行的 PCR 技术条件要求高, 操作复杂, 步骤多。检测时间长, 耗时 3~4h。因此制约了 PCR 在床旁检验及现场紧急检测中的应用 [3]。

LAMP 的基本原理是针对靶基因的 6 个区域设计 1 对内引物和 1 对外引物, 在恒温 63~67 ℃ 进行扩增反应, 利用高活性链置换 DNA 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 [4]。该技术是应用 6 个特异部位设定的 4 条引物, 因此具备很高的特异性; 操作简单, 反应迅速; 灵敏度高; 扩增模板可达 10 拷贝或更少; 本法有无扩增反应是通过反应过程中获得的副产物焦磷酸镁所形成的白色沉淀的浑浊度来判定, 也可通过琼脂糖电泳进行检测 [5]。但 LAMP 法也有很多自身局限性, 它对引物的设计要求很高, 且需设计多对引物, 要求扩增的靶序列长度在 300 bp 以下; 电泳阳性反应呈现梯度条带, 一旦产生非特异性扩增, 不易鉴别; 由于该法十分灵敏, 因此容易污染, 需要注意操作 [6]。进一步的研究表明, 通过环引物的添加, 可以大大加快反应的速度 [7]。目前, LAMP 检测技术研究得到了广泛的应用。国外报道, LAMP 被广泛患者标本、食品、化妆品等的病原菌的快速检测中。如对巴西芽生菌 (Paracoccidioides brasiliensis) [8]、非洲锥虫病 (African trypanosomiasis) [9]、虾中的白斑综合征病毒 (white spot syndrome virus in shrimp) [10]、志贺菌属 (Shigella)、大肠杆菌 O157 (Escherichia coli O157: H7) [11-12]、恶性疟疾 (Falciparum malaria) [13] 等, 都实现了快速检测。

本研究所述方法依据 LAMP 的基本原理, 选择伤寒杆菌 invA 基因 (Salmonella typhimurium strain CVCC541 invasion protein (invA) gene, Genbank: EU348365) 为靶基因, 设计 LAMP 引物。对基因序列进行了比对, 并在其相对保守的区域设计出了 LAMP 引物, 基因序列来源于美国 NCBI 基因数据库。通过 NCBI 检索得到种伤寒杆菌基因序列, 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网站 Primerexplorer4.0 在线设计软件, 在保守区段上设计 LAMP 引物, 在此基础上建立伤寒杆菌的 LAMP 检测方法 [14]。通过实验发现: 伤寒杆菌 LAMP 检测方法只针对伤寒杆菌扩增, 对其他干扰菌不扩增, 显示出良好的特异性。伤 (下转第 538 页)

- tion by oxidized low density lipoprotein[J]. *Arterioscler Thromb*, 1992, 12(4):461-467.
- [2] Upadhyaya S, Mooteri S, Peckham N, et al. Atherogenic effect of interleukin-2 and antiatherogenic effect of interleukin-2 antibody in apo-E-deficient mice[J]. *Angiology*, 2004, 55(3):289-294.
 - [3] Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways[J]. *Physiol Rev*, 2006, 86(2):515-581.
 - [4] Fernandes JL, Mamoni RL, Orford JL, et al. Increased Th1 activity in patients with coronary artery disease[J]. *Cytokine*, 2004, 26(3):131-137.
 - [5] Eid RE, Rao DA, Zhou J, et al. Interleukin-17 and interferon-gamma are produced concomitantly by human coronary artery-infiltrating T cells and act synergistically on vascular smooth muscle cells[J]. *Circulation*, 2009, 119(10):1424-1432.
 - [6] Guo M, Mao X, Ji Q, et al. Inhibition of IFN regulatory factor-1 down-regulate Th1 cell function in patients with acute coronary syndrome[J]. *J Clin Immunol*, 2010, 30(2):241-252.
 - [7] Hao XR, Cao DL, Hu YW, et al. IFN-gamma down-regulates ABCA1 expression by inhibiting LXRalpha in a JAK/STAT signaling pathway-dependent manner[J]. *Atherosclerosis*, 2009, 203(2):417-428.
 - [8] Nareika A, Sundararaj KP, Im YB, et al. High glucose and interferon gamma synergistically stimulate MMP-1 expression in U937 macrophages by increasing transcription factor STAT1 activity[J]. *Atherosclerosis*, 2009, 202(2):363-371.
 - [9] Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, et al. Serum level of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 is an important prognostic determinant in patients with acute coronary syndromes[J]. *Circulation*, 2003, 107(16):2109-2114.
 - [10] Butcher M, Galkina E. Current views on the functions of interleukin-17A-producing cells in atherosclerosis[J]. *Thromb Haemost*, 2011, 106(5):787-795.
 - [11] Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, et al. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages[J]. *J Immunol*, 1998, 160(7):3513-3521.
 - [12] Numasaki M, Takahashi H, Tomioka Y, et al. Regulatory roles of IL-17 and IL-17F in G-CSF production by lung microvascular endothelial cells stimulated with IL-1beta and/or TNF-alpha[J]. *Immunol Lett*, 2004, 95(1):97-104.
 - [13] Numasaki M, Tomioka Y, Takahashi H, et al. IL-17 and IL-17F modulate GM-CSF production by lung microvascular endothelial cells stimulated with IL-1beta and/or TNF-alpha[J]. *Immunol Lett*, 2004, 95(2):175-184.
 - [14] Miljkovic Dj, Cvetkovic I, Vuckovic O, et al. The role of interleukin-17 in inducible nitric oxide synthase-mediated nitric oxide production in endothelial cells[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2003, 60(3):518-525.
 - [15] Liao YH, Xia N, Zhou SF, et al. Interleukin-17a contributes to myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating cardiomyocyte apoptosis and neutrophil infiltration[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2012, 59(4):420-429.
 - [16] 农少云, 梁娟英. 冠心病患者血脂和总胆汁酸测定结果及临床意义[J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(19):2414-2415.
 - [17] 郑红云, 李艳, 岳永奇, 等. 脂蛋白、载脂蛋白与超敏 C 反应蛋白联合检测在冠心病诊断中的意义[J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(15):1884-1886.

(收稿日期:2012-12-06)

(上接第 535 页)

寒杆菌 LAMP 检测方法的最低检测限为 1×10^4 CFU/mL 左右,说明伤寒杆菌 LAMP 检测方法灵敏度较高。结果表明,本试验设计的伤寒杆菌 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,有望用于伤寒杆菌的临床现场检验。

参考文献

- [1] 黄剑芳. 浅谈伤寒杆菌不同检查方法的比较[J]. *中外医疗*, 2011, 30(12):112-112.
- [2] 滕小春. 伤寒检测方法探讨及结果分析[J]. *检验医学与临床*, 2011, 08(9):1130-1131.
- [3] 黄永亮. 伤寒杆菌实验室诊断研究进展[J]. *实用医技杂志*, 2007, 14(17):2400-2402.
- [4] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(12):E63.
- [5] Yano A, Ishimaru R, Hujikata R. Rapid and sensitive detection of heat-labile I and heat-stable I enterotoxin genes of enterotoxigenic *Escherichia coli* by Loop-Mediated Isothermal Amplification[J]. *J Microbiol Methods*, 2007, 68(2):414-420.
- [6] Xiao B, Zhu YH, Zou QM. A simple and sensitive technique-Loop-mediated isothermal amplification(LAMP)[J]. *Chin J Lab Med*, 2005, 28(6):761-763.
- [7] Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers[J]. *Mol Cell Probes*, 2002, 16(3):223-229.
- [8] Endo S, Komori T, Ricci G, et al. Detection of gp43 of paracoccidiosis brasiliensis by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, 234(1):93-97.
- [9] Njiru ZK, Mikosza AS, Matovu E, et al. African trypanosomiasis: sensitive and rapid detection of the sub-genus Trypanozoon by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of parasite DNA[J]. *Int J Parasitol*, 2008, 38(5):589-599.
- [10] Kono T, Savan R, Sakai M, et al. Detection of white spot syndrome virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification[J]. *J Virol Methods*, 2004, 115(1):59-65.
- [11] 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.
- [12] Kawasaki ST, Kawamoto S. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances[J]. *J Biochem Biophys Methods*, 2007, 70(3):499-501.
- [13] Poon LL, Wong BW, Ma EH, et al. Sensitive and inexpensive molecular test for falciparum malaria: detecting *Plasmodium falciparum* DNA directly from heat-treated blood by loop-mediated isothermal amplification[J]. *Clin Chem*, 2006, 52(2):303-306.
- [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.

(收稿日期:2012-11-02)