

• 论 著 •

实时荧光聚合酶链反应检测肺部感染患者痰标本中军团菌*

朱 镠, 祁春茹, 周向红, 张振兴, 朱庆义[△]

(山西省儿童医院分子生物实验室, 山西太原 030013)

摘要:目的 建立实时荧光定量聚合酶链反应(PCR),检测肺部感染患者痰液中军团菌属特异性 16S rRNA 基因。方法 利用军团菌属特异性 16S rRNA 基因保守序列设计引物和探针,优化反应条件和反应体系,对嗜肺军团菌、非嗜肺军团菌及其他病原菌标准菌株进行检测,验证该方法的特异性、敏感性、重复性;并对 577 例肺部感染患者痰液标本进行检测,同时采用 PCR 酶切法作比较,阳性者对基因扩增产物测序做验证试验。结果 该方法检测军团菌属所有标准菌株均出现阳性信号,其他非军团菌属检测结果均为阴性,灵敏度为 10^2 CFU/mL;577 例肺部感染患者的痰液标本,实时荧光定量 PCR 军团菌检出阳性率为 23.1%,PCR 酶切法检出阳性率为 19.9%,经 16S rRNA 基因测序验证军团菌阳性率为 17.2%,3 种方法检出阳性率差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 实时荧光定量 PCR 检测患者痰液标本中军团菌,具有快速、简便的特点,可作为临床军团菌感染患者的一种辅助诊断试验。

关键词:实时荧光聚合酶链反应; 军团菌; 痰液

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.18.024

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)18-2674-03

Real-time fluorescence polymerase chain reaction for detecting Legionella in sputum specimens of patients with pulmonary infection*

Zhu Lei, Qi Chunru, Zhou Xianghong, Zhang Zhenxing, Zhu Qingyi[△]

(Department of Molecular Microbiology, Shanxi Children's Hospital, Taiyuan, Shanxi 030013, China)

Abstract: Objective To establish a real-time fluorescent polymerase chain reaction and detect 16S rRNA gene of Legionella strains isolated from sputum specimens of patients with pulmonary infection by using this method. **Methods** 16s rRNA gene of Legionella was used to design primers and probes. The reaction system and reaction conditions were optimized and the specificity, sensitivity and repeatability of this method were verified by detecting Legionella pneumophila, non-Legionella pneumophila and other bacteria. A total of 577 sputum specimens of patients with pulmonary infection were detected, and PCR-digestion identification method was carried out as control. Otherwise, sequences of 16S rRNA were verified in patients with positive detection results. **Results** The results showed that all reference strains of Legionella were positive, while all of other bacteria were negative, and the sensitivity was 10^2 CFU/mL. Among sputum specimens collected from 577 cases of patients with pulmonary infection, the positive rate of Legionella detected by using real-time fluorescent PCR and PCR-digestion identification method was 23.1% and 19.9% respectively, while the positive rate was 17.2% by verifying the sequences of 16s rRNA. There were no statistically significant differences of positive rate among the three methods($P>0.05$). **Conclusion** The real-time fluorescent PCR is fast and convenient in detection of Legionella strains isolated from sputum specimens of patients, which could be an assisted method for clinically diagnosing Legionella infection.

Key words: real-time fluorescence polymerase chain reaction; Legionella; sputum

军团菌是引起军团菌病的重要病原菌,细菌培养和血清型鉴定是检测军团菌属的传统方法,但在检测范围和检测时间上存在很大的局限性^[1-2]。由嗜肺军团菌引发的重症肺炎缺乏典型的临床症状,不易直接与其他病原菌所致肺炎进行明确的区分,因此这种感染在临床上不易被诊断出来。此外,由于大多数临床医师缺乏军团菌感染的意识,以及该菌的体外培养需要复杂的营养培养基,都进一步增加了诊断的难度。实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)技术是一种简单、快速、高效的方法,该方法基于特异性荧光探针和 PCR,具有较高的特异度和灵敏度,在国外应用荧光定量技术检测军团菌属的方法已被大量报道^[3-4]。本研究根据军团菌属 16S rRNA 基因序列设计引物和探针^[5-6],通过对军团菌属标准菌株及其他细菌进行检测,验证该方法的特异度、灵敏度及重复性,并用此方法对山西省儿童医院和山西医科大学第二医院采集的 577 例肺部感染患者的痰液标本进行检测,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 标本来源 2013 年 11 月至 2014 年 4 月山西省儿童医院肺部感染患儿 237 例纳入儿童组,男 155 例,女 82 例;年龄 0~14 岁,其中新生儿(<30 d)2 例,30 d 至小于 3 岁者 134 例,3~ <7 岁者 71 例,7~14 岁者 30 例;采集痰液或气管抽出液 1 mL,置无菌离心管中。同期山西医科大学第二医院肺部感染患者 340 例纳入成人组,男 211 例,女 129 例;年龄 20~92 岁,其中 20~60 岁者 147 例, >60 岁者 193 例;采集痰液标本,在采集标本前,让患者在清晨先用清水漱口数次,然后用力咳出气管深处的痰,或用吸痰器吸出气管内痰液,盛于灭菌容器中,注意勿混入唾液或鼻咽分泌物,标本采集后立即送检。

1.2 标准试验菌株 5 株嗜肺军团菌国际标准参考株(Sg1-ATCC33152、Sg2-ATCC33154、Sg4-ATCC33156、Sg6-ATCC33215 和 ATCC43703);5 株非嗜肺军团菌标准参考株(长滩军团菌 ATCC33462、麦氏军团菌 ATCC33218、菲氏军团菌 ATCC35072、橡

* 基金项目:山西省留学归国基金项目(2010-105)。作者简介:朱镠,男,主管技师,主要从事微生物学和免疫学工作研究。△ 通讯作者, E-mail: zhuqingyi1938@163.com。

树岭军团菌 ATCC33761 和戈氏军团菌 ATCC33342);10 株其他病原菌(肺炎克雷伯菌 ATCC35657、奈瑟脑膜炎球菌 WSB0702、流感嗜血杆菌 ATCC10211、大肠埃希菌 ATCC25922、粪肠球菌 ATCC29212、铜绿假单胞菌 ATCC27853、嗜麦芽寡养单胞菌 ATCC51331、金黄色葡萄球菌 ATCC6358、阴沟肠杆菌 ATCC13047 和奇异变形杆菌 ATCC35659),均由广州金域医学检验中心提供。

1.3 仪器与试剂 美国 ABI 公司 7300 型实时荧光定量 PCR 仪和美国 MJ 公司 PTC-200 PCR 扩增仪,其他耗材包括标本采集管,扩增管,移液枪头等,均为无菌;军团菌核酸检测试剂盒(实时荧光定量 PCR 法),由上海复星长征公司提供,试剂盒主要组成成分包括 PCR 缓冲液,军团菌引物和荧光探针(引物序列:F1-5'-AGG GTT GAT AGG TTA AGA CG-3';R1-5'-CCA ACA GCT AGT TGA CAT CG-3';探针序列:5'-FAM-CAG GTA GCC GCC TTC GCC ACT G-DABCYC-3'),Taq 酶,尿嘧啶 DNA 糖苷酶(UNG),内参(合成病毒),军团菌阳性和阴性对照,DNA 提取液(磁珠法)。军团菌酶切分型检测试剂由广州金域医学检验中心科研部提供。

1.4 方法

1.4.1 DNA 提取(磁珠法) 采用 TGuide M16 全自动核酸提取仪,在痰液标本中加入等量军团菌痰消化液,37 °C 30 min 液化痰标本。在核酸提取仪的第 1 槽中加痰消化液 400 μ L、DNA 裂解液 600 μ L、磁珠 20 μ L,混合 10 min,磁吸 60 s;第 2 槽(清洗),加入核酸清洗液 500 μ L,混合 1 min,磁吸 60 s;第 3 槽(清洗),加入 80%乙醇 500 μ L,混合 1 min,磁吸 60 s;第 4 槽(清洗),加入 80%乙醇 500 μ L,混合 1 min,磁吸 60 s;第 5 步,70 °C 加热 5 min;第 6 槽,加入核酸洗脱液 50 μ L,洗脱 DNA,吸出放置环氧树脂(EP)管中,-20 °C 保存,供做 PCR 试验。

1.4.2 PCR 酶切法^[5] 在 50 μ L 反应体系中含 2 \times PCR Master Mix 25 μ L,引物 Leg P1 和 P2(10 μ mol/L)各 2.0 μ L,灭菌双蒸水(dd-H₂O)16 μ L,基因组 DNA 5 μ L,置于 PTC-200 PCR 扩增仪 95 °C 预变性 3 min,进入循环:95 °C 30 s,57 °C 30 s,72 °C 30 s,共 35 个周期;最后 72 °C 延伸 5 min。每次反应均设阳性、阴性和空白对照,取 5 μ L PCR 产物于 1.5%琼脂糖凝胶电泳,100 V,电泳至琼脂糖凝胶 2/3 处,DNA 分子量标志分别为 100、200、300、400、500、600 bp,用美国 Bio-Rad 公司凝胶成像仪观察结果,扩增片段为 226 bp,PCR 试验阳性者,做酶切分型,鉴定嗜肺军团菌和其他非嗜肺军团菌,最后做基因测序验证。

1.4.3 实时荧光定量 PCR (1)扩增程序:在 30 μ L 反应体系中,含 2 \times PCR 缓冲液 15 μ L,氯化镁(MgCl₂)3 μ L,引物 F1 和 R1 各 1.5 μ L,军团菌荧光探针 3 μ L,Taq 酶 2 μ L,模板 DNA 4 μ L。反应程序:50 °C 2 min,94 °C 2 min;94 °C 20 s,60 °C 45 s,循环 40 次;60 °C 采集 FAM、JOE 荧光通道的信号,按操作说明书进行。(2)质量控制:试剂盒中提供军团菌阳性和阴性对照各 1 支,每次试验必须设置阳性和阴性对照各 1 管。临床痰液标本实时荧光定量 PCR 检测,如试剂质量完好且操作准确,军团菌阳性对照应为阳性,FAM 通道 Ct_阳<Ct_阴<32 (Ct 值为循环阈值,即每个反应管内荧光信号达到设定的域值时所经历的循环数);阴性对照为阴性,JOE 通道 Ct=40,而且阳性对照扩增曲线呈明显对数增长长期曲线形态,每个样品内参 JOE 通道的 Ct 值要求小于 35,检测结果应达到上述要求的标准。(3)结果判断:PCR 扩增结束后按仪器和软件要求保存结果和数据分析。取高于样品噪声线和阴性对照的荧光值作为检测阈值。以 FAM 通道的 Ct 值判断军团菌 DNA 的存在。Ct \leq 35 为阳性;35 < Ct < 40 为弱阳性(属于检测灰区,需复

检);Ct=40 为阴性。灰区样品要求重复检测 2 次,如检查结果出现至少 1 次 Ct<40 判断为弱阳性。否则,判断该管阴性。

1.4.4 阳性样品测序试验 实时荧光定量 PCR 试验阳性标本,做军团菌 16S rRNA 基因测序鉴定,PCR 引物设计参考文献[6],序列如下,Leg 386F:5'-AGG GTT GAT AGG TTA AGA GC-3';Leg 386R:5'-CCA ACA GCT AGT TGA CAT CG-3'。引物由广州英骏生物技术有限公司协助合成,所测得序列经美国国家生物技术信息中心(NCBI)的 Blast 搜索引擎在 GenBank 军团菌核酸序列数据库中进行比对,获得各菌株鉴定结果。

1.4.5 特异性检验 选取 10 株军团菌属(嗜肺军团菌和非嗜肺军团菌各 5 株)及 10 株其他病原菌,配制成 10³/mL 浓度的菌液提取 DNA,进行实时荧光定量 PCR 试验,检测特异性。

1.4.6 敏感性检验 提取浓度 10⁴、10³、10²、10¹、10⁰/mL 的嗜肺军团菌 1 型(ATCC33152)DNA,进行实时荧光定量 PCR 试验,检测敏感性。

1.4.7 重复性检验 取 3 个不同 DNA 浓度嗜肺军团菌 1 型样品,对每个浓度样品做 3 次重复检测,计算 Ct 值的变异系数,以验证检测体系的稳定性。

1.5 统计学处理 采用 SPSS19.0 进行数据处理与统计分析,计数资料以例数或百分率表示,实时荧光定量 PCR 和 16S rRNA 基因测序验证试验结果比较采用 χ^2 检验。计算阳性符合率=A/(A+C) \times 100%,其中 A 为两种方法均为阳性例数,C 为实时荧光定量 PCR 阴性而 16S rRNA 基因测序阳性例数。阴性符合率=D/(B+D) \times 100%,其中 D 为两种方法均为阴性例数,B 为实时荧光定量 PCR 阳性而 16S rRNA 基因测序阴性例数。总符合率=(A+D)/(A+B+C+D) \times 100%。

2 结果

2.1 特异性 通过对 10 株标准军团菌属和 10 株其他病原菌进行实时荧光定量 PCR 扩增试验,10 株军团菌属:嗜肺军团菌(1 型、2 型、4 型、6 型、14 型)和非嗜肺军团菌各 5 株,均呈阳性扩增反应;10 株其他病原菌(肺炎克雷伯菌、粪肠球菌、嗜麦芽寡养单胞、奈瑟脑膜炎球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、阴沟肠杆菌、奇异变形杆菌和流感嗜血杆菌)均为阴性,说明该方法具有良好的特异性。

2.2 敏感性 通过对嗜肺军团菌血清型 1 型不同浓度的菌液进行培养计数,结果显示 10⁴、10³、10²、10¹、10⁰/mL 浓度菌液的平皿,平均菌落数分别为 381、53、10、0、0 CFU/mL。经 70 °C 1 h 灭活后提取基因组 DNA,采用 PCR 酶切法和实时荧光定量 PCR 检测。PCR 酶切检测的灵敏度为 381 CFU/mL,而实时荧光定量 PCR 检测的灵敏度为 10² CFU/mL。可见实时荧光定量 PCR 检测灵敏度高于常规 PCR 方法。

2.3 重复性 通过对菌液浓度为 10⁴、10³、10²/mL 等不同浓度梯度嗜肺军团菌 1 型进行实时荧光定量 PCR 试验,每个重复 3 次,计算各重复样品 Ct 值的变异系数,分别为 0.320%、0.364%、0.235%。结果表明该试验具有较好的重复性。

2.4 临床痰液标本检测结果 16S rRNA 基因测序验证成人组、儿童组军团菌阳性率分别为 15.9%(54/340)、19.0%(45/237);实时荧光定量 PCR 检出成人组、儿童组军团菌阳性率分别为 18.8(64/340)、29.1(69/237);PCR 酶切法检出成人组、儿童组军团菌阳性率分别为 16.8%(57/340)、24.5%(58/237)。实时荧光定量 PCR、PCR 酶切与 16S rRNA 基因测序检测两组军团菌总阳性率比较,差异无统计学意义($\chi^2=0.025,P=3.116$)。不同方法检测各年龄段临床痰液标本结果,见表 1。以军团 16S rRNA 基因测序作为验证试验,实时荧

光定量 PCR 阳性符合率为 100.00%，阴性符合率为 92.89%，总符合率为 94.11%；PCR 酶切法阳性符合率为 100.00%，阴性符合率为 96.65%，总符合率 97.22%。

表 1 不同检测方法检出各年龄段临床痰液标本军团菌阳性率[n(%)]

年龄组别	n	PCR 酶切	实时荧光定量 PCR	16S rRNA 基因测序
成人组				
20~60 岁	147	32(21.8)	35(23.8)	31(21.1)
>60 岁	193	25(13.0)	29(15.0)	23(11.9)
儿童组				
<30 d	2	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
30 d 至小于 3 岁	134	33(24.6)	39(29.1)	25(18.6)
3~<7 岁	71	17(23.9)	21(29.6)	14(19.7)
7~14 岁	30	8(26.7)	9(30.0)	6(20.0)
合计	577	115(19.9)	133(23.1)	99(17.2)

3 讨 论

军团菌肺炎的临床症状不典型,很难明确地与其他病原菌所致肺炎相区分,而检测军团菌的传统方法主要依靠培养和血清型鉴定,受到了检测时间和范围的限制,都给临床诊断造成极大困难[1-2]。本试验根据军团菌 16S rRNA 基因序列设计引物和探针[5-6],建立实时荧光定量 PCR 试验方法,并摸索试验条件,优化试验程序,改进试验方法,采用磁珠法提取样品中 DNA,提高了试验的灵敏度,可用于检测临床患者痰液标本中军团菌。共收集儿童和成人肺部感染患者 577 例,实时荧光定量 PCR 法检出军团菌阳性 133 例(23.1%),PCR 酶切法检出阳性 115 例(19.9%),16S rRNA 基因测序验证阳性 99 例(17.2%)。其中儿童组 237 例,实时荧光定量 PCR 检出军团菌阳性 69 例(29.1%),PCR 酶切法检出阳性 58 例(24.5%),16S rRNA 基因测序验证阳性 45 例(19.0%),说明小儿呼吸道感染患者中,确实存在军团菌感染性肺炎。成人组 340 例,实时荧光定量 PCR 检出军团菌阳性 64 例(18.8%),16S rRNA 基因测序验证阳性 54 例(15.9%),其中 10 例测序结果阴性,视其为假阳性病例。对实时荧光定量 PCR 法、PCR 酶切法和 16S rRNA 基因测序检测军团菌的总阳性率进行比较,

差异无统计学意义($P>0.05$)。说明实时荧光定量 PCR 和 PCR 酶切法是一种高效、快速、简单的方法,具有较高的灵敏度和特异度,通过活菌计数法检测其灵敏度可检测到 10^2 个细菌 DNA 浓度,可作为儿童和成人军团菌感染的一种辅助诊断试验。

嗜肺军团菌是一种细胞内致病菌,3 岁以下儿童、60 岁以上老年人对军团菌易感,其感染高于其他年龄段;此外,其他免疫功能低下者也是军团菌病的易感人群。军团菌感染患者最小年龄 45 d,最大年龄 84 岁。60 岁以上老年人和 3 岁以下小儿患病率较高,说明老年人和小儿等免疫力低下人群是军团菌肺炎的易感人群。

综上所述,实时荧光定量 PCR 法检测患者痰液标本中军团菌,具有快速、简便的特点,且特异性、灵敏性、重复性好,可作为临床军团菌感染患者的一种辅助诊断试验。

参考文献

- [1] Fields BS, Benson RF, Besser RE. Legionella and legionnaires' disease: 25 years of investigation[J]. Clin Microbiol Rev, 2002, 15(3):506-526.
- [2] Abad Sanz I, Velasco Rodriguez MJ, Marin Riaño ME, et al. Outbreak of legionnaires' disease in a restaurant in the community of Madrid, Spain[J]. Revista española de salud pública, 2014, 88(5): 661-669.
- [3] Reischl U, Linde HJ, Lehn N, et al. Direct detection and differentiation of Legionella spp. and Legionella pneumophila in clinical specimens by dual-color real-time PCR and melting curve analysis[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(10): 3814-3817.
- [4] Graham RM, Doyle CJ, Jennison AV. Real-time investigation of a Legionella pneumophila outbreak using whole genome sequencing[J]. Epidemiol Infect, 2014, 142(11): 2347-2351.
- [5] Zhan XY, Li LQ, Hu CH, et al. Two-step scheme for rapid identification and differentiation of Legionella pneumophila and non-Legionella pneumophila species[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(2): 433-439.
- [6] Stolhaug A, Bergh K. Identification and differentiation of Legionella pneumophila and Legionella spp. with real-time PCR targeting the 16S rRNA gene and species identification by mip sequencing[J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(9): 6394-6398.

(收稿日期:2015-06-28)

(上接第 2673 页)

- [5] 叶伊琳,唐洁,刘琴,等.复方补骨脂擦剂对豚鼠白癜风模型作用的实验研究[J].北京中医药大学学报,2014,37(4):252-254.
- [6] 黄波,欧阳书云,黄小容,等.2 味治疗白癜风中药的有效单体成分鉴定[J].中国药房,2011,26(3):238-240.
- [7] 张春艳,许爱娥.治疗白癜风的中药外用制剂总结分析[J].中华中医药学刊,2012,31(9):2074-2077.
- [8] 陈惠英,许爱娥.白癜风表皮微环境研究进展[J].中国皮肤性病杂志,2008,22(2):113-115.
- [9] 沈丽,黄云英,王雪妮,等.菟丝子外用对实验性豚鼠白癜风的药效[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(16):199-202.
- [10] 祝逸平,王遂泉,卢良君,等.卤米松、黄芩提取物联合用

药对白癜风小鼠模型的影响[J].中国药理学通报,2014,30(4):554-558.

- [11] 李雪,周梅华,吴迪,等.白癜风皮损边缘黑素细胞线粒体超微结构的电镜观察[J].中华皮肤科杂志,2013,46(9): 19-22.
- [12] 李伟,李世远,陆健群,等.白癜风患者皮肤组织液氧化-抗氧化物水平比较分析[J].中国皮肤性病杂志,2012,26(4):303-305.

(收稿日期:2015-03-18)

