

early detection and screening of nasopharyngeal carcinoma[J]. Ai Zheng, 2006, 25(2): 250-256.

[6] Zong YS, Sham JS, Ng MH, et al. Immunoglobulin a against viral capsid antigen of Epstein-Barr virus and indirect Mirror examination of the nasopharynx in the detection of asymptomatic nasopharyngeal carcinoma[J]. Cancer, 1992, 69(1): 3-7.

[7] Ji MF, Wang DK, Yu YL, et al. Sustained elevation of Epstein-Barr virus antibody levels preceding clinical onset of nasopharyngeal carcinoma[J]. Br J Cancer, 2007, 96(4): 623-630.

[8] 李筱莉, 陈燕, 叶倩, 等. EB 病毒抗体联合检测在鼻咽癌血清学诊断和筛查中的应用评价[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(2): 140-141.

[9] 陈云, 刘根焰, 姚堃, 等. 定量检测 EB 病毒 VCA-IgA 和 EA-IgA 抗体对 EB 病毒相关鼻咽癌的诊断意义[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2009, 29(12): 1638-1642.

[10] 罗耀凌, 欧国萍, 池沛冬, 等. 联合检测 EB 病毒相关抗体和抗原对诊断鼻咽癌的价值[J]. 癌症, 2009, 28(1): 96-99.

[11] Chen K, Wang HQ, Zhang Z, et al. Correlation of heat shock protein 70 expression in nasopharyngeal carcinoma to immunoglobulin A against viral capsid antigen of Epstein-Barr virus in sera and its clinical significance[J]. Ai Zheng, 2008, 27(6): 650-653.

[12] 李群, 宗永生, 刘克拉, 等. 鼻咽癌组织 p53 蛋白积聚与血清 EB 病毒抗体 I gA/VCA 的关系[J]. 癌症, 1999, 18(S1): 1-2.

[13] Jalbout M, Bouaouina N, Gargouri J, et al. Polymorphism of the stress protein HSP70-2 gene is associated with the susceptibility to the nasopharyngeal carcinoma[J]. Cancer Lett, 2003, 193(1): 75-81.

[14] 黄玲莎, 朱波, 陈艳华, 等. 肿瘤标志物三项联合检测在鼻咽癌诊断中的意义探讨[J]. 检验医学, 2006, 21(5): 472-474.

[15] 蔡永林, 郑裕明, 成积儒, 等. EB 病毒 Rta/IgG、EBNA1/IgA、VCA/IgA 及 EA/IgA 抗体与鼻咽癌分期的关系[J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(3): 509-511.

[16] 罗晚媛, 唐莹, 何本夫. 血浆 EBV-DNA 表达水平与鼻咽癌分期的相关性分析[J]. 实用癌症杂志, 2015, 30(8): 1116-1118.

[17] Cai YL, Li J, Lu AY, et al. Diagnostic significance of combined detection of Epstein-Barr virus antibodies, VCA/IgA, EA/IgA, Rta/IgG and EBNA1/IgA for nasopharyngeal carcinoma [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(5): 2001-2006.

[18] 陈静平, 龙军, 张宏征. EB 病毒壳抗原抗体定性检测在鼻咽癌筛查中的作用[J]. 南方医科大学学报, 2011, 21(9): 1637-1638.

[19] 郭丽萍, 崔英, 梁新强, 等. EB 病毒抗体联合检测在筛查鼻咽癌高危人群中的应用价值[J]. 中国医药指南, 2012, 10(10): 26-27.

[20] 邱厚匡, 姚亚超, 李磊, 等. EB 病毒抗体及其 DNA 联合检测在鼻咽癌筛查和早期诊断中的价值[J]. 检验医学与临床, 2015, 5(10): 1339-1341.

[21] Twu CW, Wang WY, Liang WM, et al. Comparison of the prognostic impact of serum anti-EBV antibody and plasma EBV DNA assays in nasopharyngeal carcinoma[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2007, 67(1): 130-137.

[22] Neel HB, Pearson GR, Taylor WF. Antibody-dependent cellular cytotoxicity. Relation to stage and disease course in North American patients with nasopharyngeal carcinoma[J]. Arch Otolaryngol, 1984, 110(11): 742-747.

[23] Neel HB, Taylor WF. Epstein-Barr virus-related antibody. Changes in titers after therapy for nasopharyngeal carcinoma[J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1990, 116(11): 1287-1290.

[24] 凌伟, 曹素梅, 黄启洪, 等. 广东四会鼻咽癌患者治疗前 EB 病毒 VCA/IgA 抗体水平与生存的关系[J]. 癌症, 2009, 28(1): 73-75.

[25] Liu MT, Yeh CY. Prognostic value of anti-Epstein-Barr virus antibodies in nasopharyngeal carcinoma (NPC) [J]. Radiat Med, 1998, 16(2): 113-117.

[26] 刘孟忠, 管迅行, 高剑铭, 等. EB 病毒 VCA-IgA 抗体水平与鼻咽癌病人远期疗效关系[J]. 癌症, 1998, 17(5): 48-50.

[27] 蔡永林, 李军, 陆爱英, 等. 血清 EB 病毒抗体水平与鼻咽癌患者预后的关系[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2013, 27(2): 119-122.

[28] 聂林, 王奕鸣, 李萍, 等. 鼻咽癌治疗前后 TSGF 与 VCA-IgA 的检测意义[J]. 暨南大学学报: 自然科学与医学版, 2006, 27(2): 284-286.

[29] 谭君武, 廖勇, 曹雪秋, 等. 血浆 EB 病毒定量测定对鼻咽癌放疗后监测复发及转移的价值[J]. 湖北民族学院学报: 医学版, 2010, 27(3): 20-21.

[30] 谢堂, 韦正波, 许坚. 外周血 EB 病毒 DNA 的检测在鼻咽癌治疗后监控作用的 Meta 分析[J]. 实用医学杂志, 2009, 25(24): 4152-4154.

(收稿日期: 2015-12-18)

• 综 述 •

白假丝酵母菌生物膜的形成及耐药机制研究进展

刘林波¹, 李亚婷¹综述, 郭瑞林^{2△}审校

(陕西中医药大学: 1. 医学技术系; 2. 第二附属医院检验科, 陕西咸阳 712000)

关键词: 白假丝酵母菌; 生物膜; 耐药机制
DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2016. 10. 033 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-4130(2016)10-1382-04

1976 年 Marshall 第一次提出了生物膜的概念, 指出“生物膜是生长于细菌表面非常细的外聚合物纤维”。时至今日, 人们对生物膜的研究取得了新的进展和认识, 新的定义指出生物膜是微生物群落为了自我保护而产生的一种附着于组织表面、由其自身产生的细胞外基质 (ECM) 包裹的细胞菌群的一种形态。自然界中微生物主要是以生物膜的形式存在, 65%~

作者简介: 刘林波, 女, 在读硕士研究生, 主要从事病原微生物的耐药性研究。 △ 通讯作者, E-mail: szefjyk@126. com。

80% 的人类感染性疾病与生物膜相关^[2]。临床上生物膜广泛存在于各种介入性医学材料表面,诸如支架、分流器、气管内插管、起搏器、其他植入物等。调查显示 60% 的 ICU 患者患有的生物膜相关感染均由使用导管引起^[3],其中白假丝酵母菌是导管相关感染的第三大原因,占总感染率的第 2 位,病死率的第 1 位^[4]。因此,对白假丝酵母菌生物膜的形成及其相关基因、耐药机制以及预防与治疗的研究非常重要。

1 白假丝酵母菌生物膜的形成及其相关基因

1.1 白假丝酵母菌生物膜在体外形成的 4 个阶段 白假丝酵母菌生物膜在体外形成大致可以分为 4 个阶段:(1)以酵母细胞形式黏附于各种介质表面;(2)酵母细胞沿介质表面生长增殖形成一层基底层细胞;(3)酵母细胞转变为菌丝相,大量菌丝的生长伴随着细胞外基质(ECM)的产生,逐渐形成成熟的生物膜;(4)脱落的酵母细胞作为种子传播,形成新的生物膜。ECM 作为生物膜重要的组成部分,为细胞的聚集和黏附提供一个支架并维持生物膜的结构,同时也是细胞吸收水分和营养的必经通道。组成 ECM 的主要大分子物质有:55% 的蛋白质、25% 的碳水化合物、15% 的脂质和 5% 的核酸。其中碳水化合物主要包含 3 种多糖:(1,6)-甘露聚糖占 87%、(1,6)-葡聚糖约 13%、而(1,3)-葡聚糖只占很小一部分,脂质中中性甘油糖脂占 89.1%、极性甘油糖脂 10.4%、鞘脂类 0.5%^[6]。

体外研究表明,影响白假丝酵母菌生物膜形成常见的因素有(1)血清、温度、pH 值、CO₂ 的影响:加入血清和升高温度(37℃)可以促进其菌丝的生长;当环境 pH>6.5 时可发生酵母相到菌丝相的转变;5% 的 CO₂ 对菌丝生长也有促进作用^[7]。(2)培养基的影响:比较 RPMI-1640 培养基和 YNB(无氨基酵母氮源)培养基对白假丝酵母菌生物膜形成的影响,发现生物膜在 RPMI-1640 中生长较厚,而在 YNB 中仅表现为粘连,不能形成多层结构的生物膜^[8]。(3)氨基酸代谢:脯氨酸和蛋氨酸与 G 耦联蛋白受体 GPR1 结合激活 cAMP-PKA 途径,促进其由酵母相向菌丝相转变^[9]。(4)附着层材料的影响:Hawser 等^[10]比较不同导管材料对白假丝酵母菌生物膜形成的影响发现,乳胶和硅酮弹性体相比聚氯乙烯(PVC)上形成的生物膜略有增加,而在聚氨酯和 100% 的硅胶上形成的生物膜显著下降,即使是同一种材料不同厂家也会有差别。(5)群体感应系统也会影响生物膜的形成:法尼醇是真核细胞中发现的第一个群体感应分子,它可以抑制白假丝酵母菌由酵母相向菌丝相转变,但法尼醇的存在会影响 T 细胞的增殖,造成真菌的细胞免疫逃逸^[11],因此法尼醇对机体的作用具有两重性。

1.2 白假丝酵母菌生物膜形成相关基因 白假丝酵母菌为双相菌,正常情况下一般为酵母相,致病时转化为菌丝相。其生物膜形成最重要的毒力因子就是黏附宿主细胞和菌丝的形成。在黏附宿主细胞的过程中不同时间段表达的黏附因子不同,诱导早期生物膜形成的黏附因子有 ALS1、ALS2、ALS3、ALS4、EAP1、MSB2、PGA6、SIM1、ORF19.2449 和 ORF19.5126,其中 PGA6、ORF19.5126、ALS4、ALS2、SIM1、EAP1 和 ALS1 与浮游菌相比表达增加,说明细胞的黏附需要这 7 个基因^[12]。在菌丝形成的过程中,UME6 起到了重要作用,它可以增加白假丝酵母菌菌丝的生长,促进其生物膜的形成^[13]。

还有一些基因不是直接控制细胞形态变化,而是控制一组目标基因间接的执行特定的功能。该类型的基因目前发现的

主要有 6 个,分别是 BCR1、EFG1、NDT80、ROB1、TEC1、BRG1。其中每个基因对其他 5 个基因都有控制作用,形成一个巨大的网状结构,并间接控制了大约 1 000 个基因^[14]。研究表明,BCR1 通过调控 ALS3 的过表达从而促进生物膜在体外、体内的形成。在体外,若 BCR1/BCR1 突变则无法形成生物膜,但人为增加 ALS3 表达依然可以形成生物膜;若 ALS3/ALS3 突变则不能形成生物膜。而在体内,这种单纯的调控略有不同,体内存在代偿途径,若 BCR1/BCR1 突变,不能使 ALS3 过表达,但会有 ALS1、ECE1、HWP1 代偿性表达,最终形成生物膜^[15]。然而,这 6 个转录因子并不是对所有酵母菌都有相同的调控作用,如 NDT80 可调控白假丝酵母菌生物膜的形成,但对酿酒酵母菌只调节其减数分裂^[16]。

2 白假丝酵母菌生物膜的耐药机制

众所周知,形成生物膜的真菌耐药性明显增加,而要清除成熟的生物膜非常困难。它的耐药模式不排除传统耐药模式如质粒、转座子、个体细胞基因突变等,但也有其独特的耐药机制。目前认为主要有以下 3 种:ECM 延缓药物的渗透;细胞应激反应;耐药基因的出现。

2.1 ECM 延缓药物的渗透 药物进入被生物膜包裹的细胞要通过其形成的 ECM,它可以延缓某些药物的扩散,Suci 等^[17]发现铜绿假单胞菌生物膜可延缓环丙沙星的渗透,未形成生物膜的表面只需要 40 s 就可以渗透,而渗透成熟的生物膜需要 21 min。白假丝酵母菌生物膜也有相似的阻碍作用^[18]。然而,不是所有的药物都会出现渗透限制现象,如糖肽类万古霉素和替考拉宁会受到显著的影响,而利福平、克林霉素和大环内酯类不会受到影响或影响较小,这说明 ECM 对药物的渗透与药物的种类有关。大量研究表明,ECM 的这种抗药性可能与生物膜在形成过程中分泌的葡聚糖有关,其中(1,3)-葡聚糖可隔离氟康唑等进入生物膜^[19]。

2.2 细胞的应激反应 白色念珠菌属于条件致病菌,当它感受到生存环境的变化刺激、传导刺激信号(如温度、pH 等)时,就会由酵母相转变为菌丝相生长,而在这个过程中钙调磷酸酶对其刺激信号的传递起到了至关重要的作用,也就是说钙调磷酸酶能让细胞更好的适应生存环境。缺乏钙调磷酸酶的突变株对氟康唑明显敏感^[20]。

2.3 耐药基因 形成生物膜的真菌其耐药相关的主要基因是编码多种药物外排泵的基因和细胞外基质 DNA(eDNA)。目前已确定的 2 种编码多种药物外排泵的转运因子,即 ATP 结合转运蛋白(ABC)编码的 CDR 基因(CDR1 和 CDR2)和易化扩散载体超家族中的多耐药基因 MDR1,这两种基因在白假丝酵母菌生物膜的形成过程中表达增加^[21]。另外,ECM 是白假丝酵母菌生物膜的形成及其耐药的重要原因之一,而 eDNA 是组成 ECM 的 DNA,它对维持生物膜的完整性至关重要,减少 eDNA 可以破坏生物膜的构架;相反,添加外源性的 eDNA 可以促进生物膜的生长^[22]。总之,生物膜的耐药机制较为复杂,可能是多种机制共同作用的结果。

3 白假丝酵母菌生物膜相关感染的预防与治疗

形成生物膜的真菌具有很强的耐药性和免疫逃逸性,导致许多难治性感染。最近有研究显示,两性霉素 B 和棘白菌素(卡泊芬净和米卡芬净)对白假丝酵母菌生物膜有着独特的敏感性,且与法尼醇联合作用有更好的效果。而大剂量的氟康

唑与卡泊芬净联合会有拮抗作用^[24],有趣的是,高浓度的氟康唑作用于白假丝酵母菌生物膜后再用卡泊芬净,会导致卡泊芬净的功效显著减低,这可能与高浓度氟康唑介导的 Hsp90 和钙调磷酸酶产生的细胞应激反应有关^[25]。此外,Taff 等^[26]发现 3 种葡聚糖修饰酶(BGL2,PHR1,XOG1)对(1,3)-葡聚糖的分泌和胞外基质的形成很重要,缺乏这些修饰酶的基因突变体形成的 ECM 中葡聚糖含量降低且 ECM 形成的量减少,对氟康唑的敏感性明显增强,因此,这几种葡聚糖修饰酶的抑制剂可能会成为抗真菌药物的新靶点。

除了药物的治疗,寻找预防白假丝酵母菌生物膜形成的导管性材料也是一条有效的途径。近年发现聚乙烯亚胺(PEI)和聚乙烯胺为基础的纳米粒子(nanoPEI)可抑制细菌和酵母菌生物膜的形成^[27];Anna 等^[28]使用中心静脉导管(CVC)插管的小鼠,将卡泊芬净滴入 CVC 作为预防体内白假丝酵母菌生物膜的新型模型,证明该模型能显著减少生物膜的形成;与此同时,Silva-Dias 等^[29]发现将硝酸铈(铈为镧系元素)作为医疗导管内涂层,能够有效地防止生物膜相关感染的形成。

目前对白假丝酵母菌生物膜的形成过程已逐渐明了,多种生物膜形成的相关基因被发现,多种耐药机制与生物膜的形成有关,但是具体耐药机制尚不清楚。传统的抗真菌药物已不能满足治疗产生物膜真菌引起的感染,所以,研究生物膜的形成以及它的相关的基因、耐药机制对研发新的抗真菌治疗靶点具有非常重要的意义。

参考文献

- [1] Marshall KC. Interfaces in microbial ecology[M]. S. l. harvard university press,1976.
- [2] Donlan RM, Costerton JW. Biofilms; survival mechanisms of clinically relevant microorganisms[J]. Clin Microbiol Rev, 2002, 15(2):167-193.
- [3] Seddiki SL, Boucherit-Otmani Z, Boucherit K, et al. Assessment of the types of catheter infectivity caused by Candida species and their biofilm formation. First study in an intensive care unit in Algeria[J]. Int J Gen Med, 2013, 6:1-7.
- [4] Ramage G, Saville SP, Thomas DP, et al. Candida biofilms; an update[J]. Eukaryot Cell, 2005, 4(4):633-638.
- [5] Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, et al. Denture stomatitis: a role for Candida biofilms[J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2004, 98(1):53-59.
- [6] Zarnowski R, Westler WM, Lacmbouh GA, et al. Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia [J]. MBio, 2014, 5(4): e01314-01333.
- [7] Shapiro RS, Robbins N, Cowen LE. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2011, 75(2):213-267.
- [8] Kuchariková S, Tournu H, Lagrou K, et al. Detailed comparison of Candida albicans and Candida glabrata biofilms under different conditions and their susceptibility to caspofungin and anidulafungin[J]. J Med Microbiol, 2011, 60(9):1261-1269.
- [9] Maidan MM, De Rop L, Serneels J, et al. The G protein-coupled receptor Gpr1 and the Galpha protein Gpa2 act through the cAMP-protein kinase A pathway to induce morphogenesis in Candida albicans[J]. Mol Biol Cell, 2005, 16(4):1971-1986.
- [10] Hawser SP, Douglas LJ. Biofilm formation by Candida species on the surface of catheter materials in vitro[J]. Infect Immun, 1994, 62(3):915-921.
- [11] Leonhardt I, Spielberg S, Weber M, et al. The fungal quorum-sensing molecule farnesol activates innate immune cells but suppresses cellular adaptive immunity[J]. MBio, 2015, 6(2):e00143.
- [12] Fox EP, Bui CK, Nett JE, et al. An expanded regulatory network temporally controls Candida albicans biofilm formation[J]. Mol Microbiol, 2015, 96(6):1226-1239.
- [13] Banerjee M, Uppuluri P, Zhao XR, et al. Expression of UME6, a key regulator of Candida albicans hyphal development, enhances biofilm formation via Hgc1- and Sun41-dependent mechanisms [J]. Eukaryot Cell, 2013, 12(2):224-232.
- [14] Fox EP, Nobile CJ. A sticky situation: untangling the transcriptional network controlling biofilm development in Candida albicans[J]. Transcription, 2013, 3(6):315-322.
- [15] Fanning S, Xu W, Solis N, et al. Divergent targets of Candida albicans biofilm regulator Bcr1 in vitro and in vivo[J]. Eukaryot Cell, 2012, 11(7):896-904.
- [16] Nobile CJ, Fox EP, Nett JE, et al. A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in Candida albicans [J]. Cell, 2012, 148(1/2):126-138.
- [17] Suci PA, Mittelman MW, Yu FP, et al. Investigation of ciprofloxacin penetration into Pseudomonas aeruginosa biofilms[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1994, 38(9):2125-2133.
- [18] Mah TF, O'toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents[J]. Trends Microbiol, 2001, 9(1):34-39.
- [19] Mitchell KF, Taff HT, Cuevas MA, et al. Role of matrix β -1,3 glucan in antifungal resistance of non-albicans Candida biofilms [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(4):1918-1920.
- [20] Uppuluri P, Nett J, Heitman J, et al. Synergistic effect of calcineurin inhibitors and fluconazole against Candida albicans biofilms [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(3):1127-1132.
- [21] Shah AH, Singh A, Dhamgaye S, et al. Novel role of a family of major facilitator transporters in biofilm development and virulence of Candida albicans[J]. Biochem J, 2014, 460(2):223-235.
- [22] Martins M, Uppuluri P, Thomas DP, et al. Presence of extracellular DNA in the Candida albicans biofilm matrix and its contribution to biofilms[J]. Mycopathologia, 2010, 169(5):323-331.
- [23] Katragkou A, McCarthy M, Alexander EL, et al. In vitro interactions between farnesol and fluconazole, amphotericin B or micafungin against Candida albicans biofilms [J]. J Antimicrob Chemother, 2015, 70(2):470-478.
- [24] Bachmann SP, Ramage G, Vandewalle K, et al. Antifungal combinations against Candida albicans biofilms in vitro[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2003, 47(11):3657-3659.
- [25] Sarkar S, Uppuluri P, Pierce CG, et al. In vitro study of sequential fluconazole and caspofungin treatment against Candida albicans biofilms[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(2):1183-1186.
- [26] Taff HT, Nett JE, Zarnowski R, et al. A candida biofilm-induced pathway for matrix glucan delivery; implications for drug resistance[J]. PLoS Pathog, 2012, 8(8):e1002848.
- [27] Azevedo MM, Ramalho P, Silva AP, et al. Polyethyleneimine and polyethyleneimine-based nanoparticles; novel bacterial and yeast

- biofilm inhibitors[J]. J Med Microbiol, 2014, 63(9):1167-1173.
- [28] Lazzell AL, Chaturvedi AK, Pierce CG, et al. Treatment and prevention of *Candida albicans* biofilms with caspofungin in a novel central venous catheter murine model of candidiasis[J]. J Antimicrob Chemother, 2009, 64(3):567-570.
- [29] Silva-Dias A, Miranda IM, Branco J, et al. In vitro antifungal ac-

tivity and in vivo antibiofilm activity of Cerium nitrate against *Candida* species[J]. J Antimicrob Chemother, 2015, 70(4):1083-1093.

(收稿日期:2015-12-07)

• 综 述 •

高通量 LAMP 检测常见肠道病原体的可行性分析

疏义林, 张雪峰, 万 琴, 谢进维 综述, 张守德[△] 审核
(安陆市疾病预防控制中心, 湖北孝感 432600)

关键词: 病原体; LAMP; 高通量; 分子诊断; 传染性疾病

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2016. 10. 034

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)10-1385-03

人类粪-口途径传播的病原体主要是病原菌和一些病毒, 如志贺菌、沙门菌、大肠杆菌 O157、霍乱弧菌、弯曲杆菌、小肠结肠炎耶尔森菌、金黄色葡萄球菌、甲肝病毒、戊肝病毒、轮状病毒、诺如病毒、星状病毒等, 它们会引起肠道疾病等。人体携带这些病原体, 是严重危害公众健康的重大问题, 也是造成食品和水体污染的间接因素。每年我国发生由病原菌引起的食物中毒事件占食物中毒事件总数的 30%~90%, 中毒人数占食物中毒总人数的 60%~90%, 人们的身体健康受到严重危害^[1]。目前病毒性肝炎被世界卫生组织(WHO)列为全球第 9 大引起死亡的疾病, 在我国, 病毒性肝炎发病数位居法定管理传染病的第一位^[2]。甲型和戊型肝炎病毒, 主要通过粪-口途径传播, 病毒随粪便排出体外, 通过污染水源、食物、食具等传播途径造成散发性流行或大流行。针对粪-口途径传播的病原体的快速检测是预防和控制突发性肠道疾病关键措施, 而目前对病原体检测主要依靠病原体分离法、免疫方法和核酸扩增及其衍生技术方法, 虽然病原体分离是金标准, 但操作繁琐费时; 免疫方法敏感性高、操作简单和快速, 但易受到其他物质干扰和抗体特异性差异的影响, 从而会导致误诊或漏诊; PCR 及其衍生技术方法检测快速、敏感性高和特异性强, 已经广泛应用于一些病原体的检测, 但由于需要特殊仪器设备且操作复杂, 导致其不容易在基层单位实验室推广应用于病原体检测。

随着分子生物学技术不断发展, 不断产生新的核酸扩增技术。近年来, 一种新的恒温核酸扩增技术, 环介导等温扩增技术(LAMP)已被开发应用, 该技术操作简单、特异性强、灵敏度高、耐受性强, 已在病原体快速检测中得到广泛应用^[3-14], 有望解决突发性肠道疾病的相关病原体的快速检测的基层应用难题。结合本单位正在开展的 LAMP 技术检测甲型肝炎病毒和戊型肝炎病毒等病原体的相关研究, 对 LAMP 技术进行介绍和其高通量检测 12 种常见肠道病原体的可行性分析。

1 LAMP 技术简介

1.1 LAMP 技术原理 LAMP 技术是 2000 年 Notomi 等^[15]人发明的恒温核酸扩增方法。原理是根据序列保守区域设计的一对外引物和一对内引物特异性识别目标序列上的 6 个相应区域, 在 Bst 聚合酶的作用下进行自循环链置换反应, 在 60~65℃ 恒温内, 60 min 内大量扩增目标 DNA 片段, 可达到 10⁹ copies 以上, 同时伴随副产物白色焦磷酸镁沉淀的产生。

目前, LAMP 技术已经发展为普通 LAMP、RT-LAMP、实时浊度定量 LAMP 等。

1.2 LAMP 技术引物设计 LAMP 扩增引物包含 F3、B3、FIP 和 BIP 引物, 能结合目的序列 6 个不同区域。上游外部引物 F3 与目的序列 F3c 区域互补, 下游外部引物 B3 与目的序列 B3c 区域互补。上游内部引物 FIP, 由 F2 序列和 F1c 序列, 中间有 TTTT 连接组成, F2 序列与目的序列 3'端的 F2c 区域互补, F1c 序列与目的序列 5'端的 F1c 区域序列相同。下游内部引物 BIP, 由 B2 序列和 B1c 序列, 中间有 TTTT 连接组成, B2 序列与目的序列 3'端的 B2c 区域互补, B1c 区域与目的序列 5'端的 B1c 区域序列相同。引物设计示意图如图 1。Loop 引物(Loop F, Loop B)是有助于提高灵敏度, 缩短反应时间的引物^[16]。LAMP 技术的关键就是引物的设计。应用在线 LAMP 引物设计软件 Primer Explorer V4 (<http://primerexplorer.jp/e>) 设计引物序列, 结合 DNASTAR 的 MegAlign 和 Olig6.0 对引物分析, 避免引物二聚体等产生, 再将设计好的引物, 在 Gene Bank 中进行比对, 进一步验证引物的特异性。LAMP 引物设计一般选取一段长约 130~300 bp 的保守序列作为靶序列。一般引物间距要求: F2 的 5'端到 B2 的 5'端的距离, 最好控制在 120~180 bp; F2 的前端和 F3 引物之间以及 B2 的前端与 B3 引物之间的距离应该在 0~20 bp; F2 与 F1 距离和 B2 与 B1 距离保持在 40~60 bp。引物的 Tm 值要求: Tm 主要由模板的 GC 含量决定, 通常 Tm 值为 60~65℃, 富含 AT 区域 Tm 值为 55~60℃, 同时引物 Tm 值应该满足 F2>60℃, B2<65℃, F3 和 B3<F2 和 B2<F1 和 B1。GC 含量约 40%~65%, 以 50%~60% 为最佳, 太高或太低都会影响结合效率。避免形成发卡结构, 3'端不应存在富 AT 区, 不能与其他引物互补。F2、F3、B2、B3 的 3'端稳定性很重要, F1c 和 B1c 的 5'端扩增以后相当于 F1 和 B1 的 3'端, 其稳定性同样很重要, 它们的 3'端或 5'端自由能改变值要求一般小于或等 -4 kcal/mol。

1.3 LAMP 反应体系及扩增结果鉴别方法 LAMP 反应体系包含了模板 DNA、dNTP、Bst DNA 聚合酶甜菜碱、缓冲液、引物、Mg²⁺ 和 ddH₂O。通常用 25 μL 反应体系: 模板 DNA 1~4 μL, FIP、BIP、F3、B3 各 0.2~2.0 μmol/L, 10×Bst DNA Polymerase Buffer 2.5 μL, dNTP Mixture (10 mmol/L) 3.5