

PCR 方法捕获环境水样中嗜肺军团菌 DNA

卢锡华¹ 王琳² 万超群¹ 任红宇¹ 宫仕梅¹

摘要 嗜肺军团菌是军团病的主要病原体,它所导致的军团病病例占临床病例的 80% 以上,多数军团病暴发由嗜肺军团菌所引起。通过针对嗜肺军团菌种保守基因(mip gene)设计的引物,我们建立了一种多聚酶链反应(PCR)检测方法,可以准确捕获环境标本中的嗜肺军团菌,同时具有很好的特异性,其最低可检出 18cfu/ml 的细菌。该方法的建立为嗜肺军团菌病的诊断以及在军团病流行病学调查中嗜肺军团菌病原的追踪提供了一条便捷、准确、可靠的途径。

关键词 嗜肺军团菌 多聚酶链反应

The Detection of Legionella Pneumophila DNA with Polymerase Chain Reaction in Water Samples Lu Xi-hua*, Wang Lin, Wan Chao-qun, et al.* Institute of Epidemiology and Microbiology Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 102206

Abstract Legionella pneumophila has been known as an important pathogen causing Legionnaires' Disease (LD), responsible for more than 80 per cent of clinical LD cases and majority of the LD outbreaks. In order to detect the existence of Legionella pneumophila strains in water samples, we have developed a polymerase chain reaction method, using two primers synthesized according to the reported Legionella pneumophila mip gene nucleotide sequence. This method was proved to be highly sensitive (18 cfu/ml) and specific. Two water samples were detected positive. This newly developed method provided a quick, accurate way not only to detect Legionella pneumophila in the diagnosis of LD but also in the capture of suspected pathogen during epidemiologic investigation when LD outbreaks.

Key words Legionella pneumophila Polymerase chain reaction

军团菌是一种革兰氏阴性杆菌,广泛存在于自然环境和人工环境的水体、土壤中,可以通过含菌气溶胶的方式在空气中散布而被吸入人体导致人类感染,发生军团病。自 1976 年美国首次发现军团病,1977 年分离出军团菌以来^[1],全世界许多国家和地区都已有该病的散发及暴发流行情况的报道。一些发达国家已经将军团病纳入法定传染病之列。我国的军团病研究工作始于 1982 年,已报道了数次军团病的暴发流行^[2-4],散发病例则未经明确统计。

嗜肺军团菌是军团菌属内的一个种。在临床军团病病例中,据统计分析,由嗜肺军团菌所引起的病例占 80% 以上,在暴发流行中,嗜肺军团菌所导致的也占绝大多数。军团菌对生长要求较高,培养基价格昂贵,实验室分离不仅费时,而且阳性率低。嗜肺军团菌目前已包括有 15 个血清型^[5],各血清型之间以及与某些非军团菌之间存在交叉反应,给血清学诊断带来了不少困难。为此,本试验通过对嗜肺军团菌种特异性保守基因(即 mip 基因)的 PCR 扩增,以检测标本中的嗜肺军团菌,试图为军团病诊断和军团病流行病学调查病原追踪建立一种敏感、特异、快速、准确的方法。

1 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所
北京 102206

2 中国医科大学呼吸疾病研究所

材料与方 法

一、菌株及其来源: 试验用军团菌参考菌株嗜肺军团菌(Lp)14血清型及其它非嗜肺军团菌(Lb, Ld, Lg, Lj, Ll, Lm)来自美国CDC, 国内军团菌菌株由本实验室分离保存。对照菌株除本所各实验室提供外, 部分购自卫生部检定所。

二、环境水样及模拟环境水样的制备: 2份水样分别采自沈阳市某宾馆的空调系统(1#)和某商厦的自来水系统(2#)。模拟环境水样水来自一次某新兵集训营疑似军团病暴发流调时所采水样(经多次培养和PCR扩增均未发现军团菌), 在其中加入一定量经计数的嗜肺军团菌, 即成模拟标本。

三、细菌染色体DNA的提取: 军团菌经BCYE培养基烛缸35℃48小时培养后收获, 其它细菌按照不同要求培养并收集, 环境水样经离心后收集其沉淀, 进行染色体DNA的提取。具体方法见参考文献^[6]。

四、PCR扩增程序: 根据报道mip基因序列^[7]设计引物, 在50μl反应体系内包括引物2μl(上下游引物各1μl, 2.5μmol/L), 4μl dNTPs(每一种各1μl, 10mmol/L), 2μl DNA模板及3U的Taq酶。94℃变性, 54℃复性, 72℃延伸。详细程序见参考文献^[8]进行。

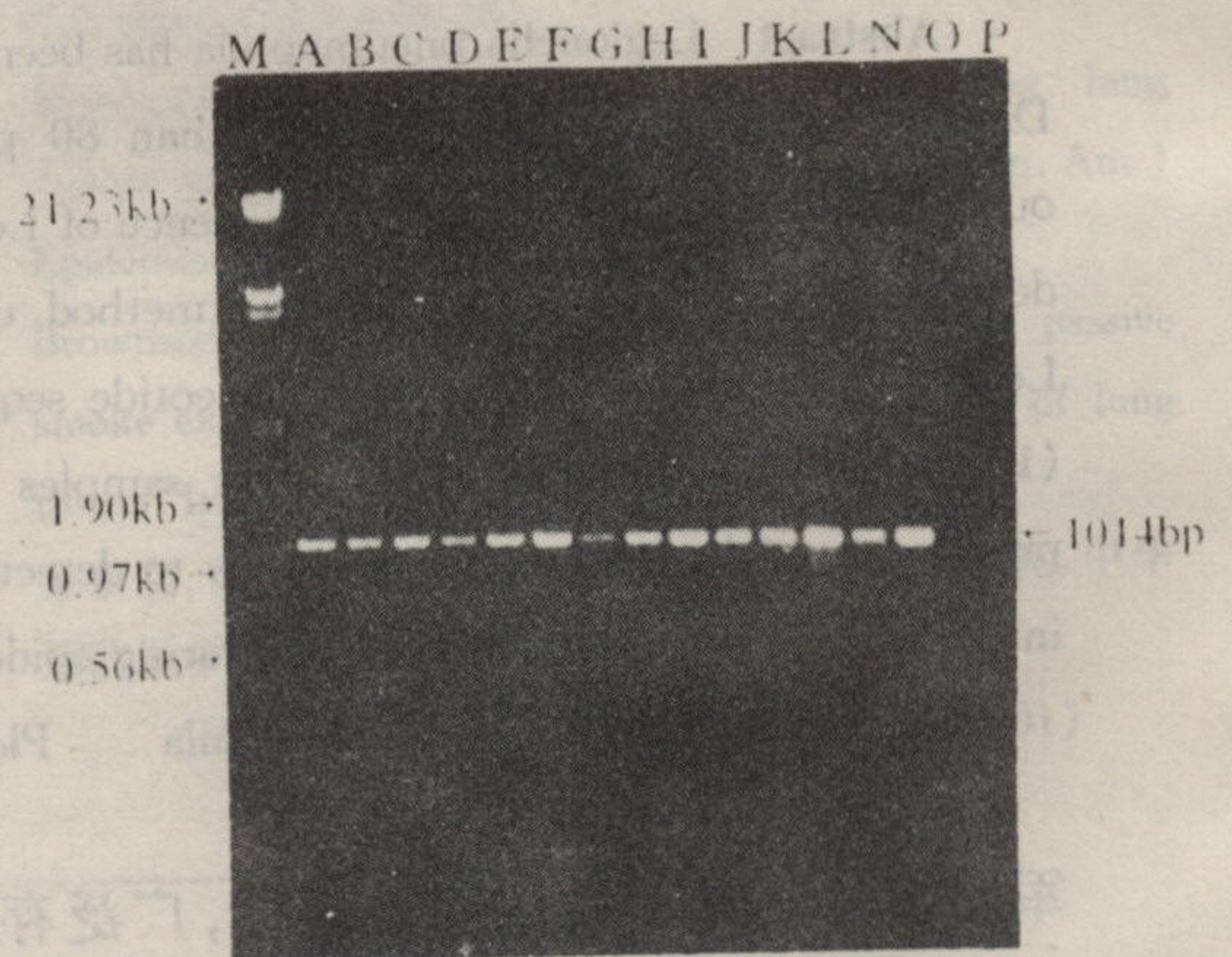
五、结果检测: PCR结束后, 取5~15μl扩增产物与电泳指示剂混匀, 在1×TAE缓冲液, 1%琼脂糖凝胶(含0.5μg/ml溴化乙锭)中以1~5V/cm电泳, 以λDNA/Hind III + EcoR I作分子量标准, 紫外灯下观察结果、拍照。

结 果

一、PCR方法的敏感性与特异性: 本实验可检出模拟环境水样中18cfu/ml的细菌。经多次实验, 嗜肺军团菌1~14血清型参考菌株和国内分离的15株嗜肺军团菌菌株(B1、B2、J1、J2、J3、124-5、302-5、80-82、89-2、JSH7、FSH、YYZH、SHY-2、SHY-

3、SHY-4)的PCR扩增结果均为阳性, 都能扩增出1kb大小的DNA片段, 而非嗜肺军团菌参考菌株 *Legionella bozemanii* (Lb), *Legionella dumoffii* (Ld), *Legionella gormanii* (Lg), *Legionella jordanis* (Lj), *Legionella longbeachae* (Ll), *Legionella micdadei* (Lm) 及对照菌株金黄色葡萄球菌、奇异变形杆菌、枸橼酸盐杆菌、乙型溶血性链球菌、表皮葡萄球菌、绿脓杆菌、肺炎双球菌、流脑奈瑟氏菌、霍乱弧菌、鼠伤寒沙门氏菌、钩端螺旋体、痢疾杆菌、鼠疫杆菌、布鲁氏杆菌及小肠结肠炎耶尔森氏菌的扩增结果均为阴性。可见, 其特异性很高, 并具有很好的稳定性。

二、环境水样的PCR扩增结果: 两份环境水样都能扩增出1kb大小的DNA片段, 见附图。



附图 部分参考菌株及环境水样PCR扩增琼脂糖凝胶电泳结果

M: λ DNA/Hind III + EcoR I
A~G: Lp1, 2, 5, 6, 9, 10, 12;
H~L: B1, J2, 124-5, 89-2, JSH7;
N: 1#水样; O: 2#水样; P: 阴性对照

讨 论

军团病作为一种新发现的细菌性呼吸道传染病已逐渐被人们所了解。但因为我国对该病的研究起步相对较晚, 以及其它种种限制性因素, 人们对军团病的认识仍然有待进一步提高。军团菌是一种条件致病菌, 各年龄组人群均易感, 但以机体免疫力下降及免

疫抑制者和中老年人多见,军团病在临床上表现为难治性肺炎,同时军团菌及其代谢产物也可损害人体的各个器官,导致多器官衰竭,如得不到及时的诊断和治疗,其死亡率相当高(约为 30%~50%)^[9]。

军团菌可以污染社区内的水体,如自来水,空调系统冷却塔水,水井饮用水,洗浴用水等等,因此可引起军团病的散发和暴发流行。随着我国经济的不断发展,城市建设和农村建设的不断深入,军团病的防治已是一项迫在眉睫的重要任务。

军团病的诊断以及对军团病的流行病学调查最终都有赖于病原菌的确认。军团菌培养基目前尚依赖部分进口试剂,且军团菌的生长周期长,在培养过程中易受其它微生物和杂质的抑制,培养分离的阳性率较低。目前,军团病的诊断一般以血清学诊断为主,但较为繁琐,而且存在交叉反应问题。本实验利用嗜肺军团菌种特异性 DNA 片段 mip 基因(即 macrophage infectivity potentiator gene,巨噬细胞感染力增强子基因),建立了一种快速、准确的病原菌捕获方法,具有很高的特异性,可检出最少为 18cfu/ml 的嗜肺军团菌,其重复性和稳定性都很好,无疑是一种可靠并有较大应用前景的方法。对现场采取的两份环境水样的检测表明,该方法在实际工作中具有很好的应用价值,同时也说明嗜肺军团菌在环境中存在的普遍性。我们在后来的工作中还在两份水样里分离到了两株嗜肺军团菌,经鉴定均为嗜肺军团菌血清 5 型。不过,由于军团菌属自发现以来已检出 39 种

61 血清型^[5],非嗜肺军团菌引起的军团病虽属少数但也不容忽视,因此该方法尚有一定的局限性,有待改善。当然,PCR 方法检出的病原菌虽然无法判断其生物活性,但对进一步分离细菌有指导作用。作为一种快速的筛选试验,该检测方法具有一定的优越性和应用价值。

参 考 文 献

- 1 Mcdade JE, Shepard CS, Fraser DW, et al. Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration its role in other respiratory disease. *N Engl Med*, 1977, 297:1197.
- 2 李锦瑞,杨艾荣,王晓良,等.北京一起嗜肺军团菌病暴发流行调查研究. *中华流行病学杂志*, 1987, 1:1.
- 3 万超群,陈建平,贾力敏,等.北京市郊区建筑工地一起米克戴德军团病暴发流行的初步调查. *中华流行病学杂志*, 1990, 10:274.
- 4 孙以瑜,孙希武,马俊义,等.一起医务人员军团病的暴发. *中华流行病学杂志*, 1991, 12:153.
- 5 谢哲子.军团菌家属及其致病性. *国外医学微生物学分册*, 1996, 19:23.
- 6 Owen RJ. A rapid biochemical method for purifying high molecular weight bacterial chromosomal DNA for restriction enzyme analysis. *Nucleic Acids Research*, 1987, 15:3631.
- 7 Engleberg NC, Carter C, Weber DR, et al. DNA sequence of mip, a *Legionella pneumophila* gene associated with macrophage infectivity. *Infect Immun*, 1989, 57:1263.
- 8 Starnbach MN, Falkow S, Tompkins LS. Species-specific detection of *Legionella pneumophila* in water by DNA amplification and hybridization. *J Clin Microbiol*, 1989, 27:1257.
- 9 Memorandum Epidemiology. Prevention and Control of Legionellosis. Morandum from a WHO meeting. *Bull WHO*, 1990, 68:155.

(收稿:1997-07-09 修回:1997-08-12)