

嗜肺军团菌聚合酶链反应检测方法及其应用研究

余传信¹ 万超群¹ 邓长英²

摘要 根据嗜肺军团菌基因组 DNA 的种特异性 DNA 片段序列, 合成一对引物进行聚合酶链反应 (PCR)。经琼脂糖凝胶电泳、EB 染色结果表明, 一条 870bp 的核苷酸区带为嗜肺军团菌 1~14 血清型菌株所共有。PCR 检测水中军团菌, 其敏感性为 350cfu/ml, 而用同位素标记探针、斑点杂交法检测, 其敏感性为 43cfu/ml。PCR 检测人工感染嗜肺军团菌的豚鼠组织标本, 阳性率为 83.3%, 而细菌分离培养的阳性率仅为 26.6%。在现场调查中, 用 PCR 法初步验证了一起由 Lp10 引起的军团菌病爆发。上述结果表明, PCR 法能快速、敏感、特异性检测嗜肺军团菌感染。

关键词 军团菌 聚合酶链反应

军团菌引起呼吸道疾病的主要症状是肺炎。临床上, 一般抗生素治疗无效的肺炎病人之中, 约 95% 为嗜肺军团菌所引起^[1]。由于病原体分离困难, 病人血清中抗军团菌抗体上升较晚, 常常造成误诊和误治, 病死率高达 30%~50%^[2]。因此, 需要建立一个快速、准确的实验室诊断方法。聚合酶链反应技术具有高度特异性和敏感性, 自 1985 年^[3]问世以来, 已经在传染病诊断、遗传学、分子生物学等领域获得广泛应用。本文将介绍嗜肺军团菌检测方法以及在实验动物感染和军团病爆发时的初步应用结果。

材料和方法

一、菌株: 本实验用的军团菌全部来自美国疾病控制中心 (CDC), 其它细菌来自中国科学院微生物所菌种保存室。

二、培养基: (1) 军团菌培养基, 按文献^[4]配制; (2) 普通培养基。

三、引物合成: 按文献^[5]报道的序列, 由中国科学院微生物所合成:

Primer I: 5'-GTCATGAGGAATCTCGCTG-3'

Primer II: 5'-CTGGCTTCTTCCAGCTTCA-3'

四、动物试验: 取豚鼠 (本所动物室饲养) 12 只 (每只重量 200~250g), 分为两组。实验组豚鼠 10 只, 每只腹腔接种对数生长期嗜肺军团菌血清 1 型参考菌株 (philadelphia, ATCC 33152) 菌悬液 1ml, 菌量为 1.2×10^9 cfu/ml^[6]。正常对照组豚鼠 2 只, 每只接种生理盐水 1ml。以相同条件饲养两组豚鼠, 豚鼠死亡后各取肝、肾、肺组织进行 PCR 检测和细菌分离培养, 对照组豚鼠经处死后进行同样处理。

五、细菌基因组 DNA 样品制备: 刮取对数生长期菌苔于 0.5ml TE 液中 (Tris 10 mmol/L, EDTA-Na, 1mmol/L, pH8.0), 洗涤 3 次后, 将沉淀物溶于等量的 TE 中, 100℃ 水浴煮沸 5 分钟, -20℃ 冰冻 10 分钟, 再在 100℃ 煮沸 5 分钟, 再 -20℃ 冰冻, 如此反复 3~5 次, 最后以 500r/min 离心 5 分钟, 取上清液备用。

六、豚鼠组织中 DNA 制备^[7]: 取豚鼠组织 1~3g, 以无菌手续将组织研磨成匀浆, 加入

1 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所 102206
北京市

2 武警北京总队医院

一份组织裂解液 (NaCl 100mmol/L, Tris-HCl 10mmol/L, EDTA-Na, 25mmol/L, SDS 0.5%, 蛋白酶K 0.1mg/ml, pH8.0) 37℃ 裂解过夜, 再用酚: 氯仿抽提两次, 氯仿抽提一次, 用冷无水乙醇沉淀 DNA 抽干, 用TE溶解DNA, 4℃ 保存备用。

七、PCR 扩增: 在 Pharmacia 公司的热循环仪上进行。取一灭菌0.5ml Eppendorf 管, 加入 36μl 无菌双蒸水, 10×Taq DNA 聚合酶反应缓冲液 5μl (KCl 500mmol/L, Tris-HCl 100mmol/L, MgCl₂ 15mmol/L, 明胶0.1%, Triton X-100 1%, pH9.0), 4×dNTP (2mmol/L), Primer I 1μl (20pmol/L), Primer II 1μl (20pmol/L), 模板DNA样品1μl, 混匀, 95℃ 水浴变性10分钟, 冷却, 离心沉下冷却水, 加入 Taq DNA 聚合酶1μl (2.5u), 混匀, 反应体系上面覆以40μl液体石蜡。72℃ 保温2分钟, 然后按下述参数进行循环扩增: 94℃ 变性1分钟, 55℃ 退火1分钟, 72℃ 延长2分钟, 反复循环35次, 最后72℃ 保温5分钟, 冰冻。

八、扩增产物检测:

1. 琼脂糖凝胶电泳检测^[8]。用 TBE 液 (EDTA-Na₂ 2mmol/L; Tris-HCl 89mmol/L, Boric acid 89mmol/L) 配制 1% 的琼脂糖凝胶, 加样, 以6伏/cm稳压, 电泳1小时, 凝胶用0.5μg/ml溴化乙啶染色30分钟, 在紫外灯 (254nm) 上观察结果并照相。

2. DNA斑点杂交检测: 探针按文献^[5]报道的序列合成, 探针的³²P末端标记按标记盒说明书 (标记物购自北京福瑞公司) 进行。斑点杂交按文献^[9]进行。

九、豚鼠组织中军团菌的分离培养: 按文献^[10] 进行酸化处理, 然后划线接种于BCYE 琼脂平板上, 烛缸培养3~7天, 挑取单个菌落进行血清学检查。

结 果

一、PCR检测嗜肺军团菌特异性试验: 刮

取BCYE平板上对数生长期的菌落, 用TE洗涤并制成菌悬液, 提取基因组DNA, 用上述引物进行PCR扩增, 结果如表1和图1所示。

表1 PCR检测嗜肺军团菌的特异性

菌 株	扩增产物 (870 bp)	菌 株	扩增产物 (870 bp)
嗜肺军团菌菌种		其它军团菌	
血清型 1型	+	米克戴德军团菌	—
2型	+	杜莫夫军团菌	—
3型	+	博杰曼军团菌	—
4型	+	长滩军团菌	—
5型	+	非军团菌	
6型	+	枸橼酸盐杆菌	—
7型	+	蜂窝哈夫尼亚杆菌	—
8型	+	肺炎克雷伯氏杆菌	—
9型	+	奇异变形杆菌	—
10型	+	肺炎支原体	—
11型	+	表皮葡萄球菌	—
12型	+	脑膜炎奈瑟氏菌	—
13型	+	肺炎双球菌	—
14型	+	乙型溶血性链球菌	—
		卡他球菌	—

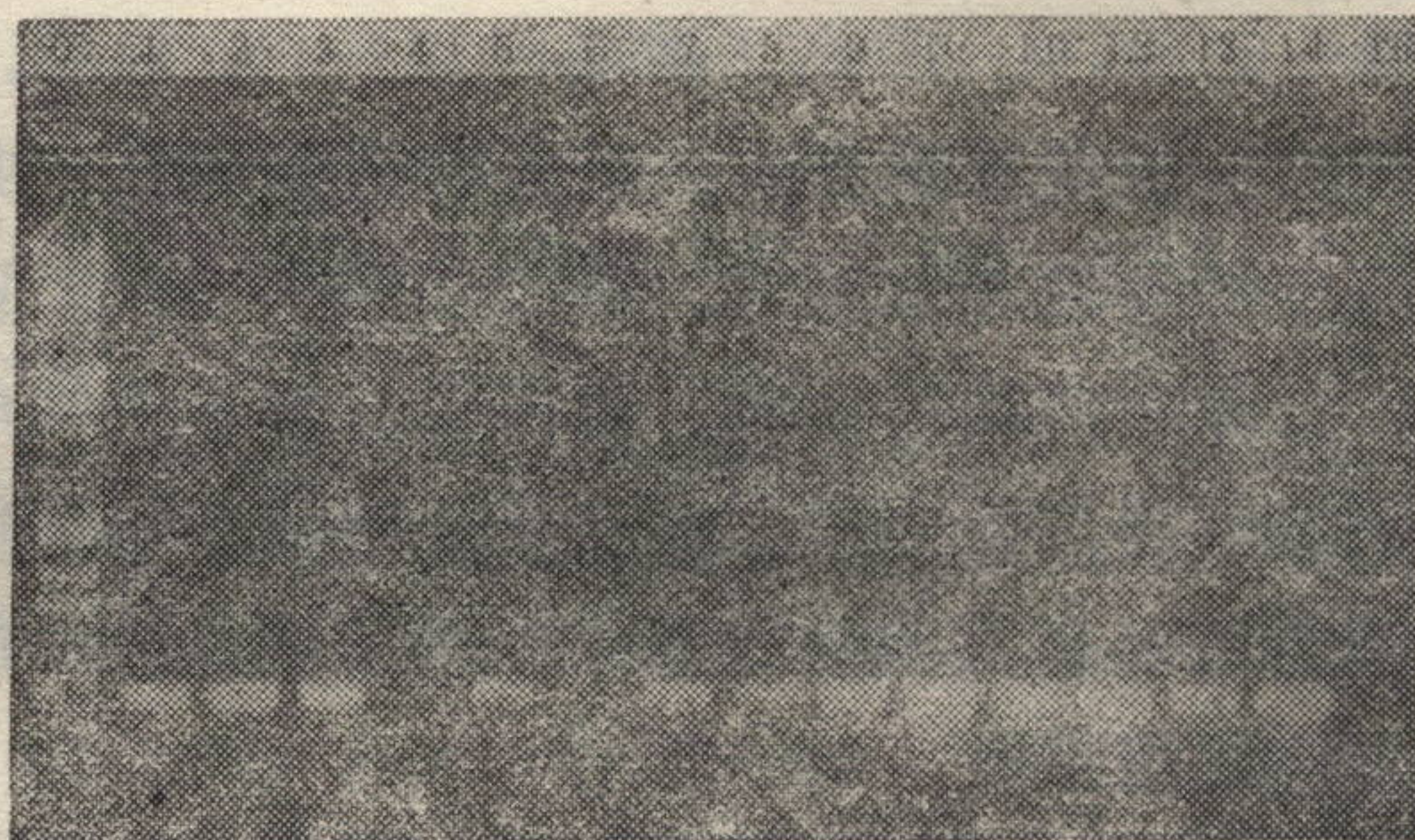


图1 PCR扩增嗜肺军团菌1~14血清型菌株基因组DNA结果

0 DNA标准大小, λ噬菌体DNA/EcoRI+HindIII;
1~14 嗜肺军团菌1~14血清型菌株 DNA扩增产物;
15 对照

嗜肺军团菌Lp1~14都能产生一条870bp的DNA区带, 而其它军团菌和非军团菌则无任何DNA区带出现, 说明该引物对嗜肺军团菌具有高度特异性。

二、PCR检测嗜肺军团菌基因组DNA的敏

感性试验：将嗜肺军团菌生长物制成不同稀释度的菌悬液〔即含不同的菌落形成单位(cfu/ml)〕，制备基因组DNA样品进行PCR扩增，通过琼脂糖电泳检测扩增产物，结果表明，其敏感性为350cfu/ml，如用同位素标记的DNA探针进行斑点杂交来检测扩增产物，其敏感性为43cfu/ml。

三、PCR检测豚鼠组织中嗜肺军团菌效果：用PCR检测10只人工感染豚鼠组织标本共30份，2只正常对照豚鼠组织标本6份，同时进行军团菌的分离培养，结果见表2。实验组豚鼠组织中嗜肺军团菌PCR检出阳性率为83.3%，而细菌分离培养阳性率只有26.6%，经统计学处理两者具有显著性差异（ $P < 0.01$ ），6份正常对照豚鼠组织标本两种方法检测均为阴性。

表2 PCR检测豚鼠组织中嗜肺军团菌的阳性率

组别	例数	阳性	
		PCR	培养法
实验组	30	25(83.3%)	8(26.6%)
对照组	6	0	0

四、PCR在一次Lp10引起的爆发中的初步应用结果：在一次Lp10军团菌引起的爆发中（经血清学调查，Lp10感染者占22.2%，并从鱼池水中分离到1株细菌，除用常规方法进行鉴定外，经PCR扩增检测亦表明为嗜肺军团菌血清10型，有可能这起爆发与鱼池水有关。结果见图2。

讨论

实验结果表明，通过PCR扩增，有一条870bp的DNA片段，为嗜肺军团菌血清1~14型所共有。而其它种军团菌和一些非军团菌扩增结果则为阴性。引物序列是决定PCR方法特异性的主要因素。用琼脂糖凝胶电泳、溴化乙啶染色检测扩增产物，敏感性为350cfu/ml，与文献报道〔11〕的探针检测的 $10^4 \sim 10^5$ 个细菌

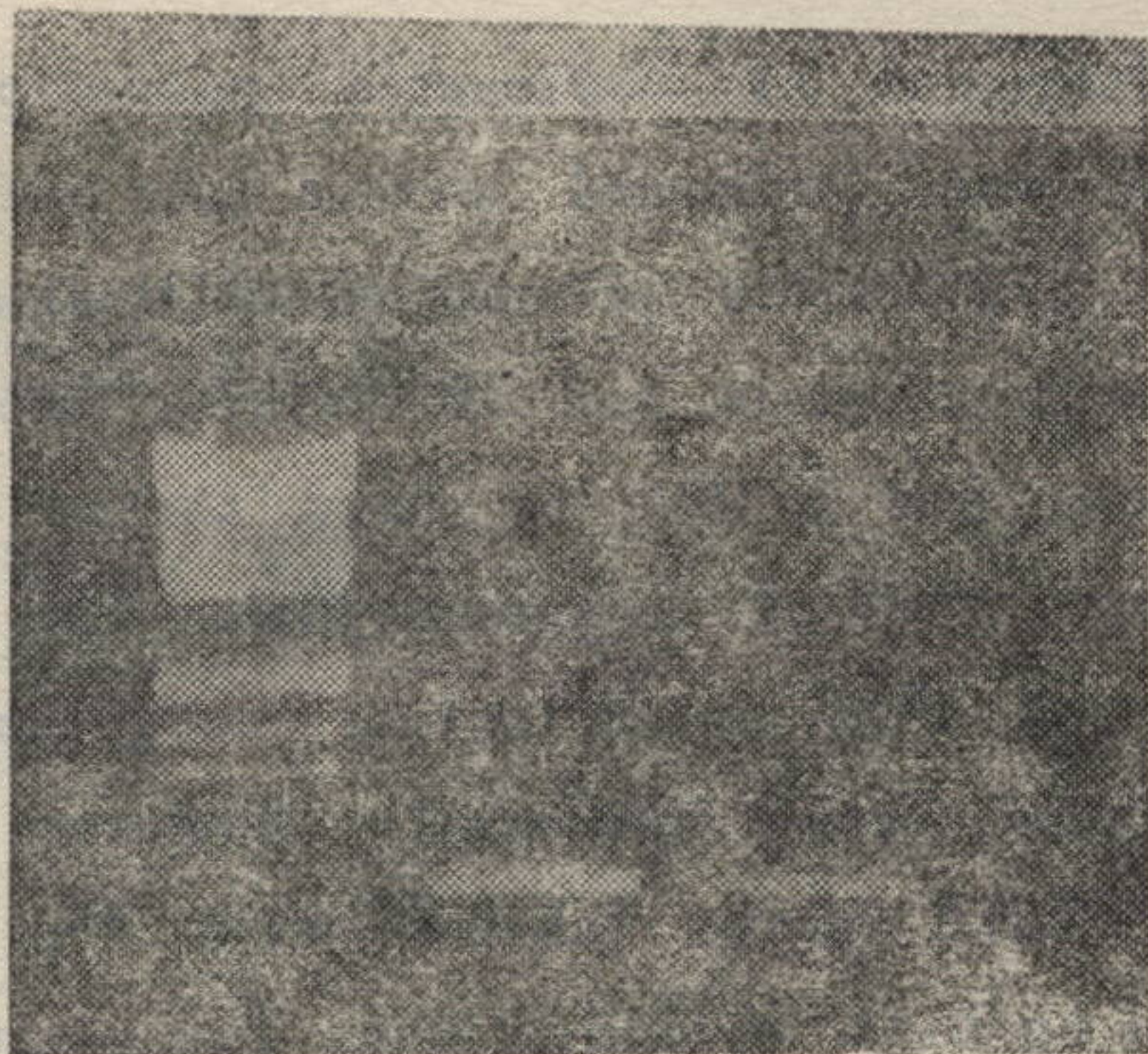


图2 鱼池水分离物DNA扩增结果

- 1.核酸标准参照物(λ phage DNA/EcoRI+HindⅢ)
- 2.嗜肺军团菌血清10型参考株(Leiden-1)阳性对照
- 3.鱼池水分离物BJ92100
- 4.未加模板DNA阴性对照

相比，敏感性有较大的提高，用同位素标记的探针与扩增产物进行斑点杂交，敏感性为43cfu/ml。因此对于含病原体很少的标本，用PCR扩增目标DNA的数量，再用探针检测，两者结合起来可以大大提高病原体的检出率。

用此法检查10只人工感染豚鼠的30份组织标本，阳性率为83.3%（25/30）。发现每只感染豚鼠至少有两个脏器标本为阳性，说明军团病是涉及多个脏器的细菌性疾病，与国外报道相符〔11, 12〕。细菌培养的阳性率只有26.6%，与PCR法比较低得多。有可能酸化处理过程中，低pH值除杀死非军团菌外，亦可能杀死某些军团菌或者使之成为活的非可培养状态，尚有待研究。

PCR技术具有早期、快速、特异性及敏感性高等优点，有希望用于军团病的早期诊断和流行病学调查分析。本文对一起Lp10爆发的初步分析尚需进一步完善。

Studies on the Detection of Legionella pneumophila by the Application of Polymerase Chain Reaction (PCR) Yu Chuanxin, Wan Chaoqun, Deng Changying. Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 102206

According to the sequence of genomic

DNA fragment of *Legionella pneumophila*, the PCR was performed with a pair of artificial synthesized primer. Results of agarose electrophoresis and EB staining showed that there was a 870 bp band shared by serogroups 1~14 of *L. pneumophila*. The sensitivity of PCR in detecting *Legionella* from water was 350cfu/ml, however, the specific DNA probe labeled with ^{32}p was 43cfu/ml by blot hybridization. The positive rate of tissue specimens from infected guinea-pigs with *Legionella pneumophila* was 83.3% by PCR detection, and only 26.6% by bacteriological culture method. An outbreak caused by Lp10 was verified by PCR. The result showed that the PCR could detect the infection of *Legionella* rapidly, specifically and sensitively.

Key words *Legionella* PCR

参 考 文 献

- 1 Ruf B, Schurman D, Horbach I, et al. Prevalence and Diagnosis of *Legionella* pneumonia: A 3-year Prospective Study with Empersis on Application of Urinary Antigen. *J Infect Dis*, 1990, 162: 1341.
- 2 Epidemiology, prevention and control of Legionellosis. Memioandum from a WHO Meeting. *Bull WHO*, 1990, 68(2): 155.
- 3 Saiki RK, Scharfs, Faloona F, et al. Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 1985, 230: 1350.
- 4 武建国, 万超群, 康晓明, 等. 军团菌病. 东南大学出版社, 1990: 131.
- 5 Starnbach MN, Falkon S, Tompkins LS. Species Specific Detection of *Legionella pneumophila* in Water by DNA Amplification and Hybridization. *J Clin Microbiol*, 1989, 29(6): 1257.
- 6 Bollin G, Plouffe J, Para M, et al. Difference in Virulence of Environmental Isolates of *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol*, 1985, 21(5): 676.
- 7 Ruudj Van Ketel Janter Scgegget, Zanen HC. Molecular Epidemiology of *Legionella pneumophila* serogroup. *J Clin Microbiol*, 1984, 20(3): 2362.
- 8 Maniatis T, Sumsrook J, Fritsch EF, et al. Molecular Cloning. Cold spring Harbor Laboratory, 1982, 6.30.
- 9 林万明, 杨瑞馥, 王津, 等. 核酸探针杂交技术. 北京: 科学技术出版社, 1991.97.
- 10 Buesching WJ, Brust RA, Ayers LW. Enhanced primary Isolation of *Legionella pneumophila* from clinical Specimens by Low pH Treatment. *J Clin Microbiol*, 1983, 17(6): 1153.
- 11 Engleberg NC, Carter C, Demarsh P, et al. A *Legionella*-specific DNA probe detects Organism in Lung Tissue homogenates from intranasally infected Mice. *Isr J Med Sci*, 1986, 22: 269.
- 12 Hervas JA, Lopez P. Angeles de la Fren-te. Multiple Organ System Failure in an Infant with *Legionella* Infection. *Pediatr Infect Dis*, 1986, 7: 671.
- 13 Monforte R, Marco F, Campo E. Multiple Organ Involvement by *Legionella pneumophila* in a Fatal case of Legionnaires Disease. *J Infect Dis*, 1989, 159(4): 809.

(收稿: 1993-05-03)