

环介导等温扩增法直接检测阳性血培养瓶中大肠埃希菌

任春阳, 田 杰

(沈阳市第四人民医院检验科, 辽宁沈阳 110031)

[摘要] **目的** 应用环介导等温扩增技术(LAMP)建立一种快速敏感的直接检测阳性血培养瓶中大肠埃希菌的方法。**方法** 根据美国国立卫生研究院基因序列数据库(GenBank)上大肠埃希菌的 lacZ(登录号:M74750)基因序列,设计 4 条特异引物(2 条内引物、2 条外引物),对 lacZ 基因进行扩增,对扩增反应进行优化。分别验证该方法的特异性及敏感性,并与传统培养法进行比较。**结果** 在 300 份阳性血培养瓶中,采用 LAMP 法检测到 68 株大肠埃希菌,所设计引物对大肠埃希菌扩增的特异性及敏感性均较好,与传统培养法比较,灵敏度和特异性均达 100%,但传统培养法的检出时间为 3 d,而 LAMP 法的检出时间只需 1 h。**结论** LAMP 检测大肠埃希菌是快速、低成本、特异性强、灵敏度高的方法,适合临床开展。

[关键词] 环介导等温技术;检测;大肠埃希菌

[中图分类号] R33

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)11-1514-02

Direct detection of Escherichia coli in positive blood culture bottles by loop-mediated isothermal amplification method

Ren Chunyang, Tian Jie

(Department of Clinical Laboratory, Shenyang Municipal Fourth People's Hospital, Shenyang, Liaoning 110031, China)

[Abstract] **Objective** To establish a rapid, sensitive direct method for detecting Escherichia coli(E. coli) in the positive blood culture bottles by using the loop-mediated isothermal amplification(LAMP). **Methods** Based on the lacZ (accession number: M74750) gene sequence of E. coli in the gene sequence GenBank by the National Institutes of Health(NIH), 4 specific primers (2 inner primers and outer primers) were designed, the lacZ gene was amplified and the amplification reaction was optimized. The sensitivity and specificity of this method were verified and its comparison with the traditional culture method was conducted. **Results** Sixty-eight strains of E. coli were detected in 300 positive blood culture bottles by adopting the LAMP method. The designed primers had good sensitivity and good specificity for the amplification of E. coli. The sensitivity and specificity of LAMP all reached 100% compared with the traditional method, but the traditional method needed 3 d to get the results, while LAMP only needed 1 h. **Conclusion** LAMP is extremely rapid for detecting E. coli with low cost, strong specificity and high sensitivity and is suitable for clinical application.

[Key words] loop-mediated isothermal amplification; testing; Escherichia coli

大肠埃希菌是临床常见的重要致病菌,在引起败血症的病原菌中居首位^[1],目前,大肠埃希菌的检测仍以传统的培养方法(如分离培养、生化鉴定等)为主,但传统的培养方法操作繁琐,费时费力,不能快速为临床提供可靠的结果。PCR 方法检测大肠埃希菌具有特异性强、灵敏度高等特点,但检测成本较高,需要专门规划设计的实验室以及昂贵的仪器。2000 年日本学者 Notomi 等^[2]发明了环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP),现在应用非常广泛,包括病原微生物检测^[3-4]、寄生虫检测^[5]、植物病检测^[6-7]、动物胚胎的性别鉴定^[8]及植物种类鉴定^[9]等领域。本研究直接从阳性血培养瓶中提取细菌 DNA,使用 LAMP 扩增大肠埃希菌的 lacZ 基因,判断是否为大肠埃希菌感染,可在 1 h 内完成,缩短最终鉴定时间,以为临床治疗赢得时间。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 收集 2012 年 1 月至 2013 年 4 月沈阳市第四人民医院 300 份阳性血培养瓶,均为非重复株。质控菌株为铜绿假单胞菌 ATCC 27853、大肠埃希菌 ATCC 25922、金黄色葡萄球菌 ATCC 29213,购自卫生部临床检验中心。

1.1.2 仪器与试剂 VIT EK 2 全自动微生物分析仪及其配套试剂为法国生物梅里埃公司产品, BACTEC9050 全自动血

培养仪由美国 BD 公司提供,恒温箱为上海医疗器械厂产品,低温高速离心机为贝克曼公司产品, Bst DNA 聚合酶(含 10× Bst buffer)购自 New England Biolabs 公司;甜菜碱(betaine)购自 Sigma 公司;dNTP、MgSO₄、DNA 标志物购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.1.3 引物 根据 GenBank 中大肠埃希菌 lacZ 基因序列,使用 Primer ExplorerV4 软件设计一套 LAMP 引物, F3: 5'-CAT GGG GGA TCC CAA GCT-3', B3: 5'-TTG TTA GCA GCC GGA TCA G-3', BIP: 5'-CCT TGC AGC ACA TCC CCC TTT GTT GGG AAG GGC GAT C-3', FIP: 5'-CGA CGT TGT AAA ACG ACG GCC ATA GAG GTA CCG CAT GCG ATA-3'。其中 F3 与 B3 为外引物, FIP 与 BIP 为内引物。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成,用 ddH₂O 溶解后分装, -20℃ 冰箱保存备用。

1.2 方法

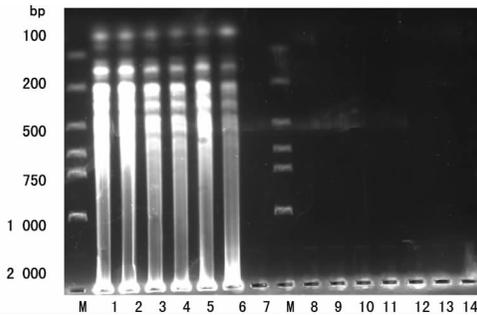
1.2.1 细菌 DNA 模板制备 采取盐酸胍-苯甲醇法:(1)从阳性血培养瓶中以无菌方式取 100 μL 培养物置入 1.5 mL 的 EP 管中,加入 5 mol 盐酸胍缓冲液 100 μL,涡旋振荡 5 min;(2)依次加入 400 μL 双蒸水和 800 μL 苯甲醇,涡旋振荡 1 min,在 4℃ 下以 7 000 r/min 离心 5 min;(3)取上层水相约 0.4 mL 到一新 EP 管,依次加入 3 mol/L 醋酸钠缓冲液 40 μL 和异丙醇

0.44 mL, 在 4 °C 下 16 000 r/min 离心 15 min; (4) 倒掉上层液体, 加入 1 mL 70% 乙醇洗涤, 在 4 °C 下 16 000 r/min 离心 10 min, 接着倒掉上层的乙醇, 待干燥后加入 100 μL 双蒸水溶解管底的 DNA 沉淀备用。

1.2.2 LAMP 检测大肠埃希菌 本试验在先期研究中确定的最佳反应体系如下: Bst DNA 聚合酶 (8 U) 1.00 μL、Bst DNA 聚合酶缓冲液 (10×) 2.50 μL、dNTP (10 mmol/L) 1.20 μL、Betaine (5 mol/L) 5.00 μL、MgSO₄ (100 nmol/L) 1.50 μL、F3 与 B3 (引物浓度为 20 μmol/L) 各 0.25 μL、BIP 与 FIP (引物浓度为 20 μmol/L) 各 2.00 μL、DNA 模板 2.00 μL、H₂O 7.30 μL。混匀后, 65 °C 等温扩增 1 h。

2 结果

2.2 LAMP 特异性分析 在 300 份阳性血培养瓶中, 采用传统方法检出大肠埃希菌 68 株, LAMP 法产物电泳均有特征性条带出现, 非大肠埃希菌为阴性结果, 见图 1。



M: 标志物; 1: 大肠埃希菌 ATCC 25922; 2~6: 临床分离株; 7: 阴性对照; 8: 肺炎克雷伯菌; 9: 铜绿假单胞菌; 10: 鲍曼不动杆菌; 11: 金黄色葡萄球菌; 12: 表皮葡萄球菌; 13: 变形菌属; 14: 肺炎链球菌。

图 1 特异性试验结果

2.2 LAMP 灵敏度分析 将过夜培养的大肠埃希菌 ATCC 25922 制备成 0.50 麦氏浊度 (相当于 1.50×10^8 CFU), 进行 10 倍比稀释, 然后提取不同浓度的大肠埃希菌基因组 DNA 为模板, 进行 LAMP 反应, 加入 SYBR Green I 后, 观察结果, 随后进行电泳, 结果呈绿色的反应产物电泳时均出现特异性的阶梯状条带, 出现 LAMP 扩增反应, 其颜色变化情况与电泳结果一致, 可以判定本方法的检测极限约 1.50×10 CFU/mL。与传统培养法比较, 灵敏度和特异性均达 100%, 但是传统培养法的检出时间为 3 d, 而 LAMP 法的检出时间只需 1 h。

3 讨论

大肠埃希菌是人体肠道中的正常寄生菌, 但也是临床各部位感染的重要致病菌, 在引起血流感染的病原菌中占首位^[10]。传统上, 对大肠埃希菌的诊断主要依靠平板培养分离鉴定法, 但该方法检测周期长达 3 d, 费时、费力, 不利于临床的快速诊断, 所以寻找更快速、更简易、更准确的检测方法是临床工作的发展方向。目前应用最多的是 PCR 及其衍生出的 real-time PCR、巢式 PCR、RT-PCR 等方法^[11]。这些方法的优点是操作简单, 灵敏性高, 可在短时间内得到实验结果。但是这些方法在检测过程中, 对精密仪器设备的要求极高且要掌握准确繁琐的实验程序步骤, 对实验室平台及操作人员均有很高的要求。

LAMP 是一种在等温条件下快速、特异性、灵敏度高的扩增靶序列 DNA 技术, 无需昂贵的仪器设备, 可 1 h 内即可完成全部反应, 使对大肠埃希菌的快速诊断成为可能。本研究采用盐酸胍-苯甲醇法直接从阳性血培养瓶中提取细菌 DNA, 使用 LAMP 法检测大肠埃希菌的 lacZ 基因, 结果显示大肠埃希菌呈阳性反应, 其他对照菌呈阴性反应, 可见 LAMP 法具有良好

的灵敏度和特异性, 如果以传统培养法为“金标准”, 其灵敏度和特异性均达到 100%。而且该方法具有观察结果方便、无需特殊仪器等优点, 适合各级医院开展, 尤其是一些中小型医疗机构。

对于结果的观察, 可以采用肉眼观察反应体系中是否形成白色沉淀来定性判断 LAMP 反应^[12], 但该方法的灵敏度较在反应体系中加入荧光染料要低^[13]。目前通常添加荧光染料如 EB、SYBR Green I^[14]、EvaGreen^[15] 等进行结果判断。但也存在一定的缺陷, SYBR Green I 和 EvaGreen 对 LAMP 反应有抑制作用, 而且需在反应结束后添加, 由于 LAMP 灵敏度高, 较剧烈地摇动反应管或开盖都可形成气溶胶而导致污染, 引起假阳性结果的出现。所以寻找一种能在反应前加入且不影响反应的指示剂, 避免开盖操作是亟待解决的问题。

综上所述, LAMP 法检测阳性血培养瓶中大肠埃希菌的方法简便快速, 灵敏度和特异度非常高, 检测时间为 1 h 左右, 较传统方法明显缩短, 为患者的治疗赢得了时间。但本方法的试验未能检测耐药基因, 这将需要进一步的研究。

参考文献

- [1] 文细毛, 任南, 吴安华, 等. 全国医院感染监控网医院感染病原菌分布及变化趋势[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(2): 350-355.
- [2] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): E63.
- [3] Luo Y, Sahin O, Dai L, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid, sensitive and specific detection of a *Campylobacter jejuni* clone [J]. J Vet Med Sci, 2012, 74(5): 591-596.
- [4] Huy NT, Hang le TT, Boamah D, et al. Development of a single-tube loop-mediated isothermal amplification assay for detection of four pathogens of bacterial meningitis [J]. FEMS Microbiol Lett, 2012, 337(1): 25-30.
- [5] Salant H, Abbasi I, Hamburger J. The development of a loop-mediated isothermal amplification method (LAMP) for *Echinococcus granulosus* coproduct detection [J]. Am J Trop Med Hyg, 2012, 87(5): 883-887.
- [6] Tsutsumi N, Yanagisawa H, Fujiwara Y, et al. Detection of potato spindle tuber viroid by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification [J]. Res Bull Plant Prot Japan, 2010, 46(1): 61-67.
- [7] Niessen L. Loop-mediated isothermal amplification-based detection of *Fusarium graminearum* [J]. Methods Mol Biol, 2013(968): 177-193.
- [8] Fu S, Qu G, Guo S, et al. Applications of Loop-Mediated Isothermal DNA Amplification [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2011, 163(7): 845-850.
- [9] Focke F, Haase I, Fischer M. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): Methods for Plant Species Identification in Food [J]. J Agric Food Chem, 2013, 61(12): 2943-2949.
- [10] 王芳, 冯海艳. 血流感染病原菌分布及耐药性分析 [J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(17): 4319-4323.
- [11] Gómez-Duarte OG, Bai J, Newell E. Detection (下转第 1518 页)

续表 2 部分分枝杆菌标准株不同浓度的
检出结果 (copy/mL)

菌种	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
海分枝杆菌	阳性	阳性	阴性	阴性
戈登分枝杆菌	阳性	阳性	阴性	阴性
脓肿分枝杆菌	阳性	阳性	阴性	阴性
胞内分枝杆菌	阳性	阳性	阴性	阴性

3 讨 论

NTM 引起的感染日益增多,特别是由其引发的医院感染出现频率逐渐增高,已越来越受到人们的关注^[4-6]。快速、准确、灵敏、特异地对致病性分枝杆菌做出诊断,是有效预防分枝杆菌病发生和控制其迅速传播的前提和关键,对治疗和疫情控制具有重要意义。传统的分枝杆菌筛查方法主要有涂片抗酸染色法、罗氏培养基培养法和结核抗体金标法,其中抗酸染色涂片法具有简便、快捷、价格低廉的优点,但其敏感性太低;而罗氏培养基培养法报告时间较长(2~8 周);结核抗体金标法则只能检测结核分枝杆菌,对 NTM 检测无效。后期发展的 BACTEC 快速菌种鉴定法可初步鉴别 MTC 和 NTM,但其培养周期仍较长(2~6 d),有研究对 BACTECTB460 检测出来的 NTM 进行菌种鉴定,发现有 7.7% 的菌株为结核分枝杆菌^[7]。随着分子生物学技术的飞速发展,PCR-单链构象多态性方法也被应用于分枝杆菌菌种鉴定,该方法通过分析分枝杆菌 16S rRNA,根据其电泳图谱与标准株的相似性进行菌种鉴定,但结果显示对结核分枝杆菌、牛结核分枝杆菌及堪萨斯分枝杆菌、胃分支杆菌之间不能特异性区分^[8]。前述方法敏感性或特异性不强,很难满足临床诊断的需要。

基因芯片技术是伴随人类基因组计划的实施而发展起来的一门新兴技术,该技术将成千上万个 DNA 或寡核苷酸片段固定在玻璃、尼龙膜或硅片等载体上,与标记的样品杂交,分析样品中基因表达、基因序列、基因突变和多态性变化等情况。该技术将 PCR 技术的高灵敏度和反向点杂交技术的高特异性相结合,真正达到了快速检测的要求,其结果更加准确可靠。本研究以测序法为对照,采用本院与亚能生物技术(深圳)有限公司联合研发的分枝杆菌菌种鉴定试剂盒,利用膜芯片技术,在膜上固定一系列的特异性探针,根据分枝杆菌 16S~23S rRNA 基因间隔区序列设计引物,利用 PCR 体外扩增各菌株的 DNA,与固定在膜上的基因型特异探针杂交,再通过显色判断分枝杆菌菌种。实验结果显示,本研究中基因芯片上的探针只与 23 种分枝杆菌的扩增产物杂交,与 9 种非分枝杆菌标准株扩增产物均不杂交,为进一步验证本芯片的准确性,将 16 株临床 NTM 进行 DNA 测序,证实与 GenBank 对应序列相一

致,其检测特异性达到了 100%。据报道,基因芯片检测灵敏度比 PCR-电泳法高 10 倍^[9-10],从本研究对 23 种类型的分枝杆菌标准菌株的系列稀释检测结果可以看出,该方法的最低检出限达到了 10³ copy/mL,解决了传统方法对临床标本中低浓度分枝杆菌不能检出的难题,提高了检测灵敏度。

上述实验结果显示,本研究所建立的基因芯片法具备高通量、高特异性、高灵敏度、操作简便、结果直观的优点,且能在 6~8 h 内直接测定痰液标本中的 MTC 和其他 22 种 NTM,具有很好的临床应用价值,是一项值得推广的技术。

参考文献

- [1] 王黎霞,成诗明,陈明亭,等. 2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告[J]. 中国防痨杂志, 2012, 34(8): 485-507.
- [2] Wu X, Yang Y, Zhang J, et al. Comparison of antibody responses to seventeen antigens from *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Clin Chim Acta*, 2010, 411(19): 1520-1528.
- [3] 张翊,卢建平,叶森. 四种结核分枝杆菌检测方法的临床应用评价[J]. 中国防痨杂志, 2006, 28(1): 14-17.
- [4] Somoskovi A, Mester J, Hale YM, et al. Laboratory diagnosis of nontuberculous mycobacteria [J]. *Clin Chest Med*, 2002, 23(6): 585-597.
- [5] 朱晓娥,袁耿彪. 基因芯片技术在基因突变诊断中的应用及其前景[J]. 重庆医学, 2010, 39(22): 3128-3131.
- [6] Sumi S, Radhakrishnan VV. Diagnostic significance of humoral immune responses to recombinant antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in patients with pleural tuberculosis [J]. *J Clin Lab Anal*, 2010, 24(5): 283-288.
- [7] 赵亭,潘欣. 应用 BACTEC 460TB 系统区分出的非结核分枝杆菌进一步菌种鉴定意义的探讨[J]. 中国防痨杂志, 1998, 20(1): 29-31.
- [8] 吴雪琼,张俊仙,刘佳文,等. PCR-SSCP 分枝杆菌菌种初步鉴定方法的建立及其应用[J]. 中国现代医学杂志, 2000, 10(7): 25-26.
- [9] 翟俊辉,宋亚军,杜宗敏,等. 通用基因芯片检测感染性细菌方法的研究[J]. 中国公共卫生, 2003, 19(4): 430-431.
- [10] Jeda A, Witek A, Janikowska G, et al. Expression profile of genes associated with the histaminergic system estimated by oligonucleotide microarray analysis HG-U133A in women with endometrial adenocarcinoma [J]. *Ginekol Pol*, 2014, 85(3): 172-179.

(收稿日期:2014-10-28 修回日期:2015-01-20)

(上接第 1515 页)

of *Escherichia coli*, *Sallmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, and *Campylobacter* spp. enteropathogens by 3-reaction multiplex polymerase chain reaction [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2009, 63(1): 1-9.

- [12] 姜侃,吕沁风,汪新,等. 三重 LAMP 法检测食品中沙门氏菌、单增李斯特菌和金黄色葡萄球菌[J]. 食品科学, 2013, 34(24): 182-187.
- [13] 许邹亮,南文龙,周洁,等. 布鲁氏菌环介导等温扩增(LAMP)可视化检测方法的建立[J]. 中国动物检疫, 2011, 28(8): 37-40.

- [14] Kaneko H, Iida T, Aoki K, et al. Sensitive and rapid detection of herpes simplex virus and varicella zoster virus DNA by Loop-mediated isothermal amplification [J]. *Clin Microbiol*, 2005, 43(7): 3290-3296.

- [15] Deng X, Qi X, Gao NY, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of reticuloendotheliosis virus [J]. *J Virol Methods*, 2010, 16(8): 82-86.

(收稿日期:2014-11-01 修回日期:2015-01-16)