

环境水中嗜肺军团菌分离培养与巢式PCR检测研究

张然¹ 陈桂冰² 邱亚群¹ 林爱红¹ 余淑苑¹

1 广东省深圳市疾病预防控制中心, 深圳市科技创新委重大传染病监控重点实验室, 广东省深圳市南山区龙苑路8号 518055; 2 深圳市中医院。

[摘要] **目的** 应用分离培养法与巢式聚合酶链反应法(PCR)检测深圳环境水中军团菌最新污染状况。**方法** 于2012年9月-2012年11月采集商场、宾馆和综合性医院三类场所的中央空调冷却水、淋浴水、自来水、景观水, 分别用传统分离培养法与巢式聚合酶链反应法(PCR)检测嗜肺军团菌。**结果** 本次共检测环境水样171份, 其中传统分离培养法检出64份嗜肺军团菌, 巢式聚合酶链反应法(PCR)检出130份嗜肺军团菌, 水样的阳性率分别为37.4%和76%; **结论** 深圳多种水源存在军团菌污染; 巢式聚合酶链反应法(PCR)检出率高于传统分离培养法。

[关键词] 环境水; 嗜肺军团菌; 传统分离培养法; 巢式聚合酶链反应法(PCR);

Detection of *Legionella pneumophila* in environmental water source by conventional culture and nested PCR
ZHANG Ran, CHEN Gui-bing, QIU Ya-qun, LIN Ai-hong, YU Shu-yuan.

Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen, Guangdong 518055, China

Abstract: Objective To detect the contamination by *Legionella pneumophila* in environmental water source of Shenzhen by conventional culture and nested PCR. **Methods** Cooling water, shower warm water, tap water and landscape water from stores, hotels and hospitals were collected during September, 2012 and November, 2012. *Legionella pneumophila* was tested by conventional culture and nested PCR. **Results** Totally, 171 samples were collected. *Legionella pneumophila* was found in 64 samples by conventional culture and in 130 samples by nested PCR. The positive rates of *Legionella pneumophila* by the two methods were 37.4% and 76.0%, respectively. **Conclusions** *Legionella pneumophila* exists in environmental water source of Shenzhen. Detection rate by nested PCR is higher than that by conventional culture.

Key words: Environmental water; *Legionella pneumophila*; Conventional culture; Nested PCR

由于军团菌与水的特殊关系及其生长繁殖和致病特性, 其造成的危害性日益显现, 是城市发展的一个公共卫生问题, 快速、准确的确定病原体是控制该军团菌病的关键。目前, 分离培养仍然是军团菌临床诊断和环境检测的金标准, 适合于环境水体军团菌活菌监测, 以确认军团菌的存活情况。巢式聚合酶链反应法(PCR)通过两轮PCR反应, 使用两套引物扩增特异性的DNA片断, 提高了PCR的敏感性及其反应的特异性。本文对环境水中嗜肺军团菌用传统分离培养与巢式聚合酶链反应法(PCR)检测, 分析深圳环境水中军团菌最新污染状况, 同时为军团菌检测提供有价值的研究依据, 现报告如下。

1. 材料与方法

1.1. 材料

1.1.1 仪器及试剂 BIO-II-A4型生物安全柜(西班牙TELSTAR公司), 3110 series II CO₂培养箱(美国Thermo公司), Microfuge18台式微量离心机(美国 Beckman Coulter公司), 5417R型低温离心机(德国Eppendorf公司), GRADIENT96型PCR扩增仪(德国Biometra公司), Wide Mini-SubGT琼脂糖凝胶电泳仪(美国BIO-RAD公司), Gel Doc2000型凝胶成像系统(美国BIO-RAD公司)。

GVPC培养基、BCYE培养基均购自英国Oxoid公司, 嗜肺军团菌诊断血清(Lp1~Lp15, 日本生研株式会社), E. Z. N. A.™ Water DNA Kit(美国Omega公司), 引物(见表1)由生工生物工程(上

基金项目: 卫生行业专项任务第四单元(201002001)

作者简介: 张然(1966-), 女, 大专, 副主任技师, 主要从事微生物检验研究

海)有限公司北京合成部合成; PCR 反应体系为2×Taq PCRMasterMix 反应体系(北京天根公司), Goldview DNA染料、DNA Ladder Marker (TAKARA宝生物(大连)工程有限公司), 嗜肺军团菌阳性标准菌株: ATCC33152, (上海宝录生物科技有限公司), 金黄色葡萄球菌ATCC6538菌株(北京军事医学科学院)。

表 1 嗜肺军团菌巢式 PCR 法所用引物序列

引物名称	核苷酸序列(5'-3')	扩增基因
MC forward	GCTACAGACAAGGATAAGTTG	Mip
MC reverse	GTTTTGTATGACTTTAATTCA	
MD forward	ATTGGTGCCGATTTGGGGAA	
MD reverse	GGCCATATGCAAGACCTGAG	

1.1.2. 水样采集 2012年9月-2012年11月采集商场、宾馆和综合性医院三类场所的中央空调冷却水、淋浴水、自来水、景观水, 共采集171份环境水源。采用灭菌玻璃瓶按照无菌操作的规程, 每个采集点采集水样两瓶, 各500 ml, 分别用于嗜肺军团菌的分离培养和巢式PCR检测, 当日送实验室进行检测。

1.2. 方法

1.2.1. 嗜肺军团菌分离培养与鉴定 分别取未处理、热处理、酸处理标本0.2mL, 接种GVPC平板, 置37℃, CO₂ 培养箱(浓度为5%)培养, 注意保湿, 每日观察生长情况, 48h 内生长的菌落为非军团菌, 48-72h 长出的为可疑军团菌, 72h 后生长出的菌落进行计数并继续进行鉴定。

从GVPC平板中挑选菌落形态为可疑菌落进行革兰氏染色, 同时接种于BCYE和血琼脂平板上, 在BCYE平板生长, 在血平板上不生长者, 初步可认定为军团菌, 并对初步鉴定的菌株进行生化试验和血清凝集鉴定分型。

1.2.2. 嗜肺军团菌巢式PCR的检测 以嗜肺军团菌标准菌株ATCC33152为阳性对照, 金黄色葡萄球菌标准菌株ATCC6538 为阴性对照, 使用针对嗜肺军团菌种Mip 基因的引物MC 和MD 进行扩增, 引物序列见表1。

1.2.2.1. 水样DNA 模板的制备 500 ml 水样经0.45 μm 滤膜过滤, 四分法剪滤膜于50 ml 离心管中, 采用OMEGA公司E. Z. N. A.™ Water DNA Kit 试剂盒提取水样品中的DNA, Omega公司采用结合柱纯化方式和独特的溶液系统, 有效去除水体中各种影响实验(PCR)的抑制因子如腐殖酸、金属离子等, 高效回收水体中的基因组DNA。抽提后的DNA 经DNA 结合柱纯化后, 溶于试剂盒自带的100 μl DNA 储存液中, 置于-20 ℃保存备用。

1.2.2.2. 扩增体系 两次扩增的反应体系均为 2×Taq PCR MasterMix 反应体系基础 12.5 μl, 上下游引物各 1 μl (10 μmol/l), 模版 1 μl, 补足双蒸水至 25 μl。首先使用 MC 组引物进行扩增, 扩增产物经无核酸酶的去离子水 100 倍稀释后作为模板, 然后使用 MD 组引物进行第二次扩增。

1.2.2.3. 扩增条件 两次扩增条件: 94℃预变性 5 min; 按 93℃变性 30 s、50℃退火 30 s、72℃延伸 1 min, 循环 35 次; 72℃复延伸 5 min。扩增产物-20℃保存, 待测。

1.2.2.4. 电泳检测 取 5 μl 二次扩增产物经 1.5%的琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 采用Gel Doc2000 型凝胶成像系统进行观察, 可见到 486bp 条带的为嗜肺军团菌, 未出现条带的则不是嗜肺

军团菌。

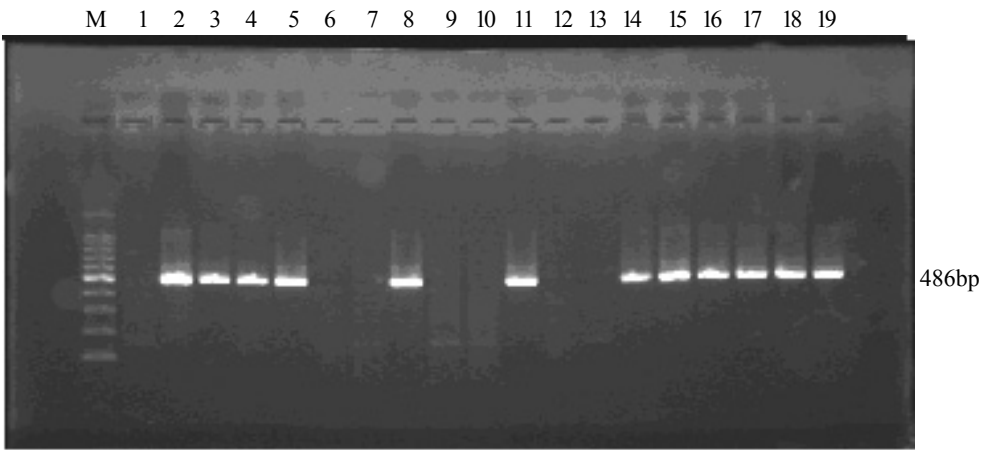
2 . 结果

2.1 水样嗜肺军团菌的分离培养结果 分别采用未处理、酸处理和热处理三种方法对三类公共场所 171 份环境水样进行分离培养，共有 64 份水样检出嗜肺军团菌，嗜肺军团菌总检出率为 37.4%(64/171)，冷却水、淋浴水、自来水、景观水嗜肺军团菌阳性率分别为 45.3%(24/53)，37.5%(18/48)，43.1%(22/51)，0%(0/19)，其中冷却水以商场/超市的阳性率最高。血清型以 LP1 型为主，占 64.1%(41/64)，其次为 LP3 型，占 25.0%(16/64)。见表 2。

表 2 水样中嗜肺军团菌（LP）分离培养及巢式 PCR 检测结果

场所类型	样品类型	样品数 (份)	分离培养结果		巢式 PCR 结果	
			LP(份)	LP 阳性率(%)	LP(份)	LP 阳性率(%)
商场/超市	冷却水	18	11	61.1	17	94.5
	景观水	2	0	0	1	50
宾馆/饭店	冷却水	23	8	34.8	20	86.7
	淋浴水	48	18	37.5	39	81.3
	自来水	51	22	43.1	34	66.7
	景观水	17	0	0	8	47.4
综合性医院	冷却水	12	5	41.7	11	91.7
合计	水样	171	64	37.4	130	76.0

2. 水样嗜肺军团菌的巢式 PCR 检测结果 采用巢式 PCR 对 171 份环境水样进行嗜肺军团检测，共有 130 份水样检出嗜肺军团菌，嗜肺军团菌总检出率为 76.0%(130/171)，冷却水、淋浴水、自来水、景观水嗜肺军团菌阳性率分别为 90.57%(48/53)，81.3%(39/48)，66.7%(34/51)，47.4%(9/19)，冷却水以商场/超市的阳性率最高，见表 2。图 1 为部分水样嗜肺军团菌 Mip 基因扩增产物电泳图。



M—DNA maker； 1 —金黄色葡萄球菌ATCC6538 菌株；2-18—环境水样品；
19—嗜肺军团菌 ATCC33152 菌株；

图 21 环境水样嗜肺军团菌的巢式 PCR 结果

3 讨论

3.1 本研究采用传统分离培养方法和巢式PCR方法同时对171份环境水源进行嗜肺军团菌检测，结

基金项目：卫生行业专项任务第四单元（201002001）

作者简介：张然(1966-)，女，大专，副主任技师，主要从事微生物检验研究

果显示商场、宾馆和医院三类公共场所的冷却水、淋浴水、自来水、景观水均检出嗜肺军团菌，表明深圳环境水中广泛存在军团菌污染，只要有适合的传播途径(冷却塔水气溶胶、污染水样的气雾化)和易感人群，军团病发病的风险不能排除^[1]。本次我们共调查6家宾馆（三星级以上），所采集的冷却水、淋浴水、自来水均分离培养出嗜肺军团菌，阳性率分别为 34.8%，37.5%，43.1%，以自来水的阳性率最高，提示自来水是军团菌污染主要来源。军团菌普遍存在于自然水体之中，它可以随源水进入自来水，而这6家宾馆的自来水均为二次供水，二次供水水箱经过长时间的沉淀，积累了各种有机物提供了微生物繁殖的物资基础，其特殊的微生物群落(某些原生动物、藻类和细菌)为军团菌提供了必要的营养并保护军团菌免遭包括消毒剂在内的伤害^[2]，军团菌在自来水中存活、繁殖，自来水作为冷却水、淋浴水、景观水的水源，是军团菌污染的来源，因此控制自来水即生活饮用水中军团菌的污染，便可从源头上控制军团菌病的发生。国际标准化组织（ISO）也把军团菌作为水质标准的细菌学检查内容^[3]，为了从源头上控制军团菌，控制生活饮用水中的军团菌已显得十分必要。

3.2 巢式PCR是常规PCR 的发展和完善，使用两对PCR引物扩增完整的片段。第一对PCR引物扩增片段和普通PCR相似，第二对引物称为巢式引物（因为他们在第一次PCR扩增片段的内部），结合在第一次PCR产物内部，使得第二次PCR扩增片段短于第一次扩增。巢式PCR的好处在于，如果第一次扩增产生了错误片段，则第二次能在错误片段上进行引物配对并扩增的概率极低，因此，巢式PCR的扩增非常特异，特别适用于环境样本的检测。实验发现，适当稀释第一次的扩增产物再进行第二次扩增，能明显减少和消除终产物中的非特异性扩增和拖带现象^[4]。本次用传统分离培养方法和巢式PCR方法同时对171份环境水源进行嗜肺军团菌检测，阳性率分别为37. %、76.0%，传统分离培养方法适用于环境水体中军团菌活菌监测，而巢式PCR 方法，除能检测活菌外，还可检出水中存在极微量的军团菌或死菌，在所测试水样中，76%嗜肺军团菌DNA为阳性，细菌培养法只有37.4%为阳性，显示了巢式PCR检测军团菌的高敏感性和特异性^[3]。此次巢式PCR方法有24.0%的水样阴性检测是环境水源未受到嗜肺军团菌污染的指示标志，因此，用分离培养方法和巢式PCR方法不同的检测结果组合可以为评估环境受污染风险情况及提出风险预警，提供一定的科学依据^[6]，为处理不明原因呼吸道突发公共卫生事件中原因排查、分析诊断提供快速溯源以达到控制疫情的需求。

参考文献

- [1] 胡元玮，徐卸佐，朱淑英，等. 公共场所中央空调系统军团菌污染环节的调查（J）. 中国卫生检验杂志，2010，20（4）：879-900.
- [2] 胡巖，张濛，高葆真，等. 在生活饮用水卫生标准中新增军团菌项目的探讨（J）. 中国公共卫生管理，2008，24（1）：98-100.
- [3] WHO. Guidelines for Drinking Water Quality (third edition) . 2004.
- [4] 丁国允，李小波，等. 军团菌及其实验室检测方法研究进展（J）. 中国卫生检验杂志，2013，23（5）：1335-1337.
- [5] 张旭，马妮，郑洪. 环境中军团菌快速检测方法的研究进展（J）. 中国卫生检验杂志，2009，19（1）：240-241.
- [6] 陈健，赵志荣，施明美，等. 公共场所中央空调系统冷却塔水及气溶胶军团菌污染的风险评估和预警研究（J）. 环境与健康杂志，2011，28（6）：529-531.

基金项目：卫生行业专项任务第四单元（201002001）

作者简介：张然(1966-)，女，大专，副主任技师，主要从事微生物检验研究