

- [4] GONZALES P R, MIKHAIL F M. Diagnostic and prognostic utility of fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis in acute myeloid leukemia[J]. Curr Hematol Malig Rep, 2017, 12(6): 568-573.
- [5] MASON J, GRIFFITHS M. Molecular diagnosis of leukemia[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2012, 12(5): 511-526.
- [6] CHEUNG S W, BI W. Novel applications of array comparative genomic hybridization in molecular diagnostics[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2018, 18(6): 531-542.
- [7] SHAHJAHANI M, MOHAMMADIASL J, NOROOZI F, et al. Molecular basis of chronic lymphocytic leukemia diagnosis and prognosis[J]. Cell Oncol (Dordr), 2015, 38(2): 93-109.
- [8] WANG Y, WU N, LIU D, et al. Recurrent fusion genes in leukemia; an attractive target for diagnosis and treatment[J]. Curr Genomics, 2017, 18(5): 378-384.
- [9] YIN J A, O'BRIEN M A, HILLS R K, et al. Minimal residual disease monitoring by quantitative RT-PCR in core binding factor AML allows risk stratification and predicts relapse; results of the United Kingdom MRC AML-15 trial[J]. Blood, 2012, 120(14): 2826-2835.
- [10] QUAN P L, SAUZADE M, BROUZES E. dPCR: a technology review[J]. Sensors (Basel), 2018, 18(4): 1271-1279.
- [11] CILLONI D, PETITI J, ROSSO V, et al. Digital PCR in myeloid malignancies: ready to replace quantitative PCR? [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(9): 2249-2253.
- [12] BRAMBATI C, GALBIATI S, XUE E, et al. Droplet digital polymerase chain reaction for DNMT3A and IDH1/2 mutations to improve early detection of acute myeloid leukemia relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[J]. Haematologica, 2016, 101(4): e157-e161.
- [13] WANG W J, ZHENG C F, LIU Z, et al. Droplet digital PCR for BCR/ABL (P210) detection of chronic myeloid leukemia: a high sensitive method of the minimal residual disease and disease progression [J]. Eur J Haematol, 2018, 101(3): 291-296.
- [14] BULLINGER L, DOHNER K, DOHNER H. Genomics of acute myeloid leukemia diagnosis and pathways[J]. J Clin Oncol, 2017, 35(9): 934-946.
- [15] THOL F, GABDOULLINE R, LIEBICH A, et al. Measurable residual disease monitoring by NGS before allogeneic hematopoietic cell transplantation in AML [J]. Blood, 2018, 132(16): 1703-1713.
- [16] PETTI A A, WILLIAMS S R, MILLER C A, et al. A general approach for detecting expressed mutations in AML cells using single cell RNA-sequencing [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 3660-3671.
- [17] SCHMITT M W, PRITCHARD J R, LEIGHOW S M, et al. Single-molecule sequencing reveals patterns of preexisting drug resistance that suggest treatment strategies in philadelphia-positive leukemias [J]. Clin Cancer Res, 2018, 24(21): 5321-5334.
- [18] LODE L, AMEUR A, COSTE T, et al. Single-molecule DNA sequencing of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes with multiple TP53 alterations[J]. Haematologica, 2018, 103(1): e13-e16.
- [19] HARRINGTON C T, LIN E I, OLSON M T, et al. Fundamentals of pyrosequencing[J]. Arch Pathol Lab Med, 2013, 137(9): 1296-1303.
- [20] SHEYBANI Z, RAHGOZAR S, GHODOUSI E S. The Hedgehog signal transducer and microRNA-326: pathogenesis and regulation of drug resistance in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. Cancer Manag Res, 2019, 11: 7621-7630.
- [21] LI J, WANG L, MAMON H, et al. Replacing PCR with COLD-PCR enriches variant DNA sequences and redefines the sensitivity of genetic testing[J]. Nature Med, 2008, 14(5): 579-584.
- [22] JONES A V, CROSS N C, WHITE H E, et al. Rapid identification of JAK2 exon 12 mutations using high resolution melting analysis[J]. Haematologica, 2008, 93(10): 1560-1564.
- [23] LAMBROS M B, WILKERSON P M, NATRAJAN R, et al. High-throughput detection of fusion genes in cancer using the Sequenom MassARRAY platform[J]. Lab Invest, 2011, 91(10): 1491-1501.

(收稿日期: 2020-06-10 修回日期: 2020-11-12)

• 综述 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2021.04.040

军团菌检测方法研究进展*

夏兰兰¹, 宿振国²综述, 王 涛^{1△}审校

1. 滨州医学院附属医院检验科, 山东滨州 256600; 2. 滨州医学院烟台附属医院检验科, 山东烟台 264000

关键词: 军团菌; 军团菌病; 分离鉴定; 免疫学; 核酸检测

中图分类号: R446.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2021)04-0555-04

军团菌是一类革兰阴性菌, 1976 年在美国费城召开退伍军人大会议期间, 暴发了一种不明原因的肺炎,

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(201710440056)。

△ 通信作者, E-mail: wangtaoliwang@163.com。

本文引用格式: 夏兰兰, 宿振国, 王涛. 军团菌检测方法研究进展[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(4): 555-558.

称军团病,次年分离出该病的病原菌,故而得名军团菌,由该菌引起的疾病称军团菌病。军团菌专性需氧,广泛存在于自然界,特别是水中,适宜生长温度为 25~37℃,但也可在高于或低于该温度范围的环境中生存,甚至可在限制生长的温度如<20℃或>55℃条件下存活^[1]。该菌为一种机会致病菌,可以气溶胶形式存在于空气中,当人体免疫功能低下时,由呼吸道侵入机体,到达肺泡或终末细支气管部位生长及繁殖,从而导致军团菌病。目前,已确认的军团菌属有 58 种,共 70 个血清型,能引起约 28 种人类疾病,其中对人致病的主要是嗜肺军团菌^[2]。军团菌病在临床上可分为肺炎型、肺外感染型及流感样型。肺炎型又称军团菌肺炎,是军团菌病的主要类型,该病起病急,发展快,病情重,救治不及时可导致死亡;肺外感染型是指感染从肺部播散,导致脑、肾、肝等多器官感染;流感样型又称庞蒂亚克热,是一种自限性疾病^[3]。因临床上大多数军团菌肺炎患者早期临床症状为乏力、肌肉疼痛、头痛,发热伴寒战、咳嗽,有少量黏痰,与其他病原体引起的非典型性肺炎相似,所以很难与其他病原体引起的肺炎相区别,从而造成病死率较高,甚至引起暴发流行^[4]。因此,早期、快速、准确地检测出军团菌,对疾病的诊断、治疗及降低病死率有重要意义。军团菌用吉姆萨染色时菌体呈红色,活体组织标本用镀银染色法染色后菌体呈黑褐色,但标本直接涂片镜检的意义不大,本文不做赘述。军团菌检测的方法较多,包括病原菌的分离鉴定、免疫学检测方法、核酸检测方法等,本文就这些方法进行简要叙述。

1 病原菌的分离鉴定

1.1 细菌培养法 细菌培养法是诊断军团菌病的金标准,其特异度为 100%,灵敏度为 50%~80%^[5]。军团菌检测标本可通过采集痰液、下呼吸道分泌物、支气管灌洗液、胸腔积液、血液等来获取,采集时注意避免气溶胶形成。但军团菌生长对营养要求苛刻,在普通培养基、血琼脂平板、巧克力琼脂平板上均不生长,常用活性炭-酵母浸出液琼脂(BCYE)培养基培养,且生长速度缓慢,一般需 3~5 d,长则需 7~14 d,菌落呈圆形、凸起、灰白色,有光泽,某些菌型在紫外线照射下可发出荧光,在富含 L-络氨酸-苯丙氨酸琼脂平板上产生棕色水溶性色素,活的不可培养军团菌的存在及在培养基上过度生长的其他菌会影响培养法的检测结果。细菌培养法对技术人员要求较高,且操作繁琐,培养时间长,故不能快速得到结果,不利于军团菌病的诊治。随着现代技术的创新,研究者已陆续研制出改良的细菌培养法,可提高培养成功率,如 2011 年朱兵清等^[6]在 BCYE 培养基中添加了可抑制环境水样中杂菌的抗菌药物,提高了嗜肺军团菌的分离率。同时细菌培养法也有不可替代的优点,如发现新菌种等^[7]。总之,当临床怀疑患者为军团菌病时,细菌培养法是不可或缺的一种检测手段。

1.2 质谱分析技术 细菌的传统手工鉴定步骤为分离纯化获得待鉴定菌株,涂片及革兰染色镜检,根据革兰染色性质和菌株形态,辅以氧化酶、触酶、动力、鞭毛染色、氧化发酵等试验,对鉴定细菌进行初步分群或分科(属),再继续应用最小数量的其他试验,逐步缩小鉴定范围,直至最终获得鉴定结果。传统手工鉴定法步骤繁琐,周期长,且对操作人员技术要求高。近年来,基质辅助激光解析电离飞行时间质谱检测技术在临床微生物检验中的应用越来越广泛,使用质谱仪可以大大缩短细菌鉴定时间,并提高准确性,更有利于临床抗菌药物的使用,做到早诊断、早治疗,提高患者的生存率。李曲文等^[8]应用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱对 10 株军团菌进行菌株蛋白质质谱分析比对,鉴定出 8 株为嗜肺军团菌,1 株为米克戴德军团菌,1 株为茴香军团菌,此方法简便、快速、成本低,不足之处是需要进一步规范标本处理、质谱图采集和分析等过程,同时需要不断完善数据库和分析软件。

2 免疫学检测方法

2.1 尿抗原检测 有研究通过动物实验验证在感染军团菌 24 h 后尿中可出现抗原^[9]。军团菌的外膜蛋白、脂多糖和多种蛋白酶可造成肺组织损伤,尿抗原检测针对的靶标即为细菌脂多糖。自 20 世纪 90 年代中期引入尿抗原检测后,其逐渐成为军团菌病的主要诊断方法,占军团菌诊断试验的 70%~80%,包括酶联免疫吸附试验(ELISA)、放射免疫分析,以及最近发展的酶免疫分析(EIA)等,但这些方法主要对嗜肺军团菌血清(Lp)1 型敏感^[10]。由于军团菌病患者的标本可用性较低,因此对不同类型菌株的尿抗原检测评价仍然比较困难。2017 年有研究通过比较 Binax[®]EIA(军团菌尿 EIA)、BinaxNOW[®](军团菌抗原检测)、Sofia[®]FIA(军团菌荧光免疫分析)3 种试剂盒的灵敏度,发现对于 Lp1 型, Soffia[®]FIA 和 Binax[®]EIA 检测限相似, BinaxNOW[®]低于其他两种试剂盒,且与 Lp1 型相比,这 3 种试剂盒对 Lp2~Lp15 型的检测水平均较低。由此可见,这 3 种试剂盒对不同嗜肺军团菌血清型的检测性能不同^[11]。

作为现在军团菌检测主要方法之一,尿抗原检测具有诸多优点,如抗原出现时间早,约 88%的军团菌病患者在发病 1~3 d 即可在尿中检测到抗原,可以为早期诊疗提供依据;此方法操作简单、快速,特异度高,易取得标本,且对患者没有创伤。缺点是只对 Lp1 型敏感,对其他血清型的嗜肺军团菌检测价值不大^[12],且检测试剂盒昂贵,不利于在临床上推广应用。

2.2 血清学诊断 血清学检测对可疑患者诊断有重要意义,因为某些可疑患者无肺部感染症状,或下呼吸道未产生足量分泌物,标本不易获取。血清学诊断包括微量凝集试验和 ELISA。早在 1996 年,米亚英等^[13]就结合此两种方法诊断出国内首例佐丹军团菌

病。但是,微量凝集试验主要以整个菌体作为诊断抗原,这就导致严重的非特异性凝集,导致该试验的特异性较低。ELISA 检测患者血清中嗜肺军团菌 IgG 总抗体,其结果判定更加客观、准确。但是,目前市场上用于诊断嗜肺军团菌的试剂盒是用嗜肺军团菌全细胞蛋白为包衣抗原,往往在不同血清型或种属间存在交叉反应。因此,目前,临床上对于军团菌肺炎的血清学诊断仍缺少一种快速、准确的方法。2015 年有研究曾分离并纯化出嗜肺军团菌蛋白 FLA、MOMP、MIP、IP 和 PILE,并将这 5 种纯化蛋白作为包衣抗原检测嗜肺军团菌血清抗体,其 IgG 抗体的灵敏度为 90.4%,特异度为 97.4%;IgM 抗体的灵敏度为 91.8%,特异度为 95.1%^[14]。王涛等^[15]也成功诱导表达及纯化出重组 MOMP 蛋白,将其作为诊断抗原建立了间接 ELISA,结果显示 IgG 抗体灵敏度为 90.9%,特异度为 91.7%,IgM 抗体灵敏度为 91.4%,特异度为 90.6%,IgA 抗体灵敏度为 92.1%,特异度为 88.9%,这为军团菌病血清学诊断试剂盒的研制奠定了基础。但是,不同军团菌属细菌之间、军团菌与其他细菌之间有交叉抗原,军团菌多克隆抗体与某些细菌可产生交叉反应,故血清学检测只能作为辅助性、回顾性诊断手段。

3 核酸检测方法

3.1 聚合酶链反应(PCR)及其衍生技术 PCR 是一种由 DNA 聚合酶催化的特定序列体外扩增技术,突破了核酸的原料限制,可将极微量的生物标本中靶核酸在短时间内大量复制扩增至可检测范围,具有高效、操作简单的特点,已成为生物学和医学研究,乃至临床疾病诊断不可或缺的工具。嗜肺军团菌常用的检测模板为 16S rRNA、5S rRNA、23S-5S rRNA、mip 或 dotA^[16],PCR 扩增后,不仅可鉴定军团菌,还可以分辨军团菌属。虽然 PCR 特异度高,但灵敏度较差,特别是对于痰液标本,由于含菌量较少,易出现假阴性结果。另外,常规 PCR 在产物分析时需要开盖操作,容易引起交叉感染,导致假阳性。为更快、更好地检测军团菌,学者们已研究出一系列以 PCR 为基础的相关技术。

3.1.1 实时荧光定量 PCR 实时荧光定量 PCR 是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法^[17]。GINEVRA 等^[18]利用全基因组测序数据,开发并验证了一种灵敏度、特异度较高的实时荧光定量 PCR 方法,即通过扩增 lpp1868 基因检测 ST1 克隆复合物中的 Lp1,结果显示灵敏度为 95%,特异度为 100%。这种新的 PCR 检测方法是一种可靠的工具,将有助于改进军团菌的检测和鉴别,为军团菌病的预防和控制进一步奠定了基础。

3.1.2 巢式 PCR 巢式 PCR 需对靶 DNA 进行两次

扩增,第二次扩增所用的模板为第一次扩增的产物。巢式 PCR 通常设计两对引物,第二对引物(第二次扩增所用引物)在靶序列上的位置应设计在第一对引物的内侧。由于巢式 PCR 反应有两次 PCR 扩增,从而降低了扩增多个靶位点的可能性(因为与两套引物都互补的引物很少),增加了检测的灵敏度;有两对 PCR 引物与检测模板的配对,增加了检测的可靠性。

嗜肺军团菌可生活在水域系统中,WEN-CHIEN 等^[19]利用巢式 PCR 结合变性梯度凝胶电泳来检测河水标本中的军团菌群落,发现每种军团菌都有自己的条带模式,从而发现军团菌群落的多样性。同时,这种方法还可能发现环境中存在的未知军团菌,甚至其他病原体。

3.1.3 多重 PCR 常用的 PCR 仅应用一对引物,通过扩增后产生一个核酸片段,主要用于单一致病因子检测。多重 PCR 又称多重引物 PCR 或复合 PCR,它是在同一 PCR 反应体系里加入多对引物,同时扩增一份 DNA 样品中同一靶 DNA 或不同靶 DNA 的多个不同序列片段。临床上常用于病原体分型或鉴定。2014 年吴冬雪等^[20]建立了一种多重 PCR 技术结合基因芯片的检测方法,成功研制了嗜肺军团菌 O 血清型分型基因芯片,实现了嗜肺军团菌 15 种血清型的快速、准确检测,使军团菌的诊断又迈出了一大步,并提供了新的思路与方向。

3.2 环介导等温扩增技术(LAMP) LAMP 是 NOTOMI 等^[21]于 2000 年开发的一种在等温条件下对 DNA 进行高特异度、高效率、快速扩增的检测方法,即利用 1 种 DNA 聚合酶和 4 种特殊设计的引物在等温条件(63℃左右)下保温 30~60 min,完成核酸扩增反应。LAMP 作为一种全新的核酸扩增方法,与常规 PCR 相比,具有简单、快速、特异度高的特点。目前,许多病原体都可通过 LAMP 进行快速检测,如沙眼衣原体^[22]。

LAMP 的创新又为检测军团菌提供了新思路,如 MOOSAVIAN 等^[23]就曾采用培养法、PCR 和 LAMP 对 2016 年 6 月至 2017 年 3 月在伊朗阿瓦兹教学医院住院的肺炎患者的痰液和支气管肺泡灌洗液标本进行军团菌检测,结果表明,培养法阳性率为 1%,PCR 和 LAMP 检测军团菌阳性率分别为 3%和 7%,由此可以得出,LAMP 检测军团菌优于培养法和 PCR。

4 其他

军团菌主要污染供水系统、空调冷却水、呼吸机等,也可形成带菌气溶胶,通过空气传播,一旦暴发流行将严重危害人们的健康。2016 年范晓珊等^[24]将军团菌的 16S rRNA 基因作为基因芯片,创立基因芯片检测技术,对空调冷却系统等公共卫生环境中的军团菌进行实时监控,取得一定成果。但是,此方法成本过高,不利于推广。因为临床上军团菌肺炎与其他肺炎症状相似,不易区分,MIYASHITA 等^[25]根据“男

性、无咳嗽、呼吸困难、C 反应蛋白和乳酸脱氢酶升高及低钠”等条件,制订出了一种新的军团菌评分标准来区分军团菌肺炎和非军团菌肺炎,如果得分 ≥ 3 分,则诊断为军团菌肺炎,此方法的灵敏度为 93%,特异度为 75%,也可作为军团菌的一种评估方法。

目前,军团菌病在国内外时有暴发流行,在美国和欧洲国家的发病率也一直在增加^[26],且感染存在地区及季节差异,是影响公众健康的一大隐患。因此,准确高效地检测军团菌,对军团菌病的防控具有重要意义。随着科技和知识的发展,用于检测军团菌的方法越来越多,笔者相信会有更简便、快速、准确的检测方法出现,为军团菌的检测提供更有力的保障,为人们的健康增添一重防护。

参考文献

- [1] MERCANTE J W, WINCHELL J M. Current and emerging Legionella diagnostics for laboratory and outbreak investigations[J]. Clin Microbiol Rev, 2015, 28(1): 95-133.
- [2] PRUSSIN A J, SCHWAKE D O, LINSEY C M. Ten questions concerning the aerosolization and transmission of Legionella in the built environment[J]. Build Environ, 2017, 123: 684-695.
- [3] 林韵,肖晓臻,肖贤声,等.嗜肺军团菌分子检测最新进展[J].生物技术通讯,2017,28(5):704-708.
- [4] JULIEN B. The European Legionnaires' Disease Surveillance Network. Legionnaires' disease in Europe, 2011 to 2015[J]. Eurosurveillance, 2017, 22(27): 30566.
- [5] CATTAN S, THIZY G, MICHON A, et al. Actualités sur les infections à Legionella[J]. La Revue de Médecine Interne, 2019, 40(12): 791-798.
- [6] 朱兵清,任红宇,周海健,等.我国九省(市、区)82株嗜肺军团菌血清 1 型菌株的序列分型[J].中华预防医学杂志,2011,45(10):890-894.
- [7] 袁展红,周日东,吴灿权,等.传统细菌培养法、实时荧光 PCR 法在冷却水中的比较[J].中国医学创新,2015,12(19):135-136.
- [8] 李曲文,郑恩惠,徐海滨,等.基于基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱对 10 株军团菌的检测分析[J].医学检验与临床,2019,30(8):15-18.
- [9] YU C, TATEDA K, FUJITA K, et al. Sequential changes of Legionella antigens and bacterial load in the lungs and urines of a mouse model of pneumonia[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2010, 66(3): 253-260.
- [10] JAMES C, MATTHEW A M, BHANOT N, et al. Potential false-positive urine Legionella enzyme immunoassay test results[J]. Eur J Clin Microbiol, 2019, 38(7): 1377-1382.
- [11] ANNE-GAËLLE R, CARPENTIER M, BERAUD L, et al. Legionella pneumophila LPS to evaluate urinary antigen tests[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2017, 89(2): 89-91.
- [12] 吕恒,张锦海,陈凤娟,等.军团菌检测方法概述[J].东南国防医药,2014,29(2):177-180.
- [13] 米亚英,谢哲子,薛有忠,等.国内首例佐丹军团菌病血清学诊断研究[J].大同医学学报,1996,17(1):5-6.
- [14] HUI S, MA H F, LI L, et al. A new ELISA method for serological diagnosis of legionella pneumophila: use of five purified proteins, FLA, MOMP, MIP, IP, and PILE, as diagnostic antigen[J]. Clin Lab, 2015, 61(3/4): 275-282.
- [15] 王涛,张彩霞,曹秀琴,等.嗜肺军团菌重组 MOMP 蛋白间接 ELISA 方法的建立及其在血清学诊断中的应用[J].细胞与分子免疫学杂志,2013,29(12):1322-1326.
- [16] MONIKA J, PALUSINSKA-SZYSZ M. PCR method for the rapid detection and discrimination of Legionella spp. based on the amplification of pcs, pmtA, and 16S rRNA genes[J]. J Appl Genet, 2016, 57(2): 251-261.
- [17] COLLINS S, JORGENSEN F, WILLIS C, et al. Real-time PCR to supplement gold-standard culture-based detection of Legionella in environmental samples[J]. J Appl Microbiol, 2015, 119(4): 1158-1169.
- [18] GINEVRA C, CHASTANG J, DAVID S, et al. A real-time PCR for specific detection of the Legionella pneumophila serogroup 1 ST1 complex[J]. Clin Microb Infect, 2020, 26(4): 514. e1-514. e6.
- [19] WEN-CHIEN H, HSIN-CHI T, TAO C W, et al. Approach to determine the diversity of Legionella species by nested PCR-DGGE in aquatic environments[J]. PLoS One, 2017, 12(2): e0170992.
- [20] 吴冬雪,王乃福,黄晨,等.嗜肺军团菌 15 种血清型基因芯片检测方法的建立[J].食品研究与开发,2014,35(14):99-102.
- [21] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H A, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): E63.
- [22] 李若琳,曹月,梁宇晨,等.利用环介导等温扩增技术快速检测沙眼衣原体方法的建立[J].中国测试,2020,46(4):65-69.
- [23] MOOSAVIAN M, SEYED-MOHAMMADI S, SAKI M, et al. Loop-mediated isothermal amplification for detection of legionella pneumophila in respiratory specimens of hospitalized patients in ahvaz, southwest Iran [J]. Infect Drug Resist, 2019, 12: 529-534.
- [24] 范晓娜,严慧,朱庆义.基因芯片在军团菌分型检测中的应用[J/CD].中华临床实验室管理电子杂志,2016,4(2):82-85.
- [25] MIYASHITA N, HORITA N, HIGA F, et al. Validation of a diagnostic score model for the prediction of Legionella pneumophila pneumonia [J]. J Infect Chemother, 2019, 25(6): 407-412.
- [26] HERWALDT L A, MARRA A R. Legionella: a re-emerging pathogen[J]. Curr Opin in Infect Dis, 2018, 31(4): 325-333.