

## · 综 述 ·

## 军团菌检测方法概述

吕 恒, 张锦海, 陈凤娟, 顾海涛, 王 平 综述, 王长军 审校

〔摘要〕 军团菌(*Legionella*)是一种革兰阴性致病菌,广泛存在于天然淡水环境和人工水系中,并引起人呼吸道急性感染,可作为生物战剂使用。目前已知军团菌有 58 个种,3 个亚群,70 多种血清型,与人类疾病相关的有 24 种,嗜肺军团菌(*L. pneumophila*, LP)是引起军团菌肺炎的主要病原菌。由于军团菌病暴发范围广,严重威胁人类健康,因此越来越受到人们的关注。本文就目前军团菌检测方法作一综述,主要包括细菌培养法、免疫学方法和分子生物学方法。

〔关键词〕 军团菌;检测方法

〔中图分类号〕 R378.992 〔文献标志码〕 A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2014.02.021

军团菌(*Legionella*)是引起军团菌病的重要病原体,广泛存在于天然淡水环境和人工水系中,能引起人呼吸道急性感染,可作为生物战剂使用<sup>[1-2]</sup>。目前已知军团菌有 58 个种,3 个亚群,70 多个血清型,与人类疾病相关的有 24 种,是引起军团菌肺炎的主要病原菌<sup>[3-4]</sup>。90% 军团菌肺炎是由嗜肺军团菌(*L. pneumophila*, LP)引起<sup>[5]</sup>。1977 年,McDade 等从 4 例死者肺组织中分离出军团菌,发现是一种新的革兰阴性杆菌。

军团菌病首次爆发是发生在 1976 年美国费城,221 人发病,34 人死亡<sup>[6-8]</sup>。随后欧洲、澳洲等不同国家和地区相继发现军团菌病例报告<sup>[9-10]</sup>,我国于 1982 年在南京地区首次发现军团菌病病例<sup>[11]</sup>。近年来,军团菌病在世界各地时有局部暴发及散发病例,受到各国政府和卫生部门的高度重视。快速、准确地确定病原体是控制该疾病的关键<sup>[12]</sup>,本文就目前常用的军团菌检测方法作一简要综述,主要包括细菌培养法、免疫学方法和分子生物学方法<sup>[13-14]</sup>。

## 1 细菌培养法

细菌培养法即分离培养法,是实验室诊断和流行病学调查中确定军团菌感染的“金标准”,特异性为 100%,敏感性为 50%~80%<sup>[15]</sup>。军团菌属为挑剔型细菌,需要营养丰富的培养基,在含  $\alpha$ -酮戊二酸、L-半胱氨酸和三价铁离子的 BCYE-a 培养基上

生长良好,菌落一般呈灰白色、紫色、蓝色或绿色,而在普通血平板、普通琼脂、巧克力琼脂上不生长。培养法可对各种生物样品、环境样品进行检测。经过预处理后的样品立即接种于 GVPC 选择性培养基上,置于 5% CO<sub>2</sub>、(35±1)℃ 孵育箱或烛缸中,2~3 d 后,观察菌落形态、色素、自发荧光。挑取疑似菌落,分别接种 BCYE- $\alpha$  琼脂平板和 BCYE-Cys 琼脂平板上,在 BCYE-a 培养基上生长,而在 BCYE-Cys 培养基上不生长的菌落即可初步判断为军团菌,再做血清凝集试验和基因分型鉴定。军团菌喜爱潮湿环境,培养湿度不低于 80%,在标本处理过程中避免含 Na<sup>+</sup> 缓冲剂,以免抑制其生长。

培养法的缺点是:易受标本采集质量、操作技术的影响,阳性率不一致;费时较长,约 7~10 d;培养基不易制作,价格较贵,对于进行环境中军团菌的样本量较大的分布调查,其应用受到很大的限制。

## 2 免疫学方法

2.1 免疫血清学检测 25%~40% 的军团菌患者在首次症状 1 周后产生抗体,早期主要是特异性 IgM 抗体,为早期诊断的指标;而血清 IgG 抗体出现晚,持续存在时间长,不能用于对疾病的早期诊断,可用于回顾性诊断和军团菌病的流行病学回顾性调查。检测患者血清中抗军团菌 IgM 及 IgG 抗体是检测军团菌感染的临床常用手段,可以做出特异性诊断,敏感性为 70%~80%<sup>[16]</sup>。常用的检测方法有:间接血凝试验(IHA)、间接免疫荧光抗体试验(IFA)、微量凝集试验(MAT)、酶联免疫吸附试验(ELISA)、Dot-ELISA、试管凝集试验(TAT)方法等。军团菌抗体检测中,双份血清(即急性期和恢复期血清)抗体效价呈 4 倍增长。实测血清效价时,

基金项目:江苏省科技支撑计划(社会发展)项目(BE2012609);国家重大传染病专项课题(2013ZX10004-103、2013ZX10004-218);全军医学科技青年培育项目(13QNP51);南京军区重点课题(10Z038、11Z040);全军后勤科研“十二五”重大项目(AWS11C001、AWS11C009)

作者单位:210002 江苏南京,南京军区疾病预防控制中心  
通讯作者:王长军, E-mail: science2008@hotmail.com

间接荧光法达 1:128 或以上。微量凝聚试验达 1:32 或以上。试管凝集试验达 1:320 或以上才有诊断意义。

IHA 可诊断嗜肺军团菌血清 1~4 型的抗体。IFA 是最早用于嗜肺军团菌抗体检测的血清学方法,1977 年由美国疾病预防控制中心建立,该方法抗体滴度达到可用以诊断的水平较晚,且有假阳性结果。ELISA 法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、精确<sup>[17-18]</sup>,可用于回顾性诊断和军团菌感染的流行病学回顾性调查。Dot-ELISA 方法检测军团菌抗体的灵敏度不高,有交叉反应而导致假阳性结果的产生。MAT 方法简便,对军团菌病可早期诊断,能检测出血清中相应 IgM 抗体,其特异性为 97%~99%,敏感性为 80%。Diederens 等<sup>[19]</sup>研究发现 IgM IFA, IgG IFA, IgG ELISA 方法诊断价值低,不适用于诊断,而 IgM ELISA, IgM-plus-IgG ELISA 特异性和敏感性都较高,可用于诊断。

免疫血清学方法容易掌握,检测结果可靠,但也存在许多缺点:20%~30% 的军团菌肺炎患者其抗体滴度并不升高;与其他病原微生物存在交叉反应;部分患者在发病几年后仍可检出军团菌抗体,所以测定单份血清中抗体滴度难以断定是现症还是既往感染。

## 2.2 抗原检测

**2.2.1 直接免疫荧光法(DFA)** 用荧光标记的抗体作用于患者呼吸道分泌物等标本,于显微镜下检查具特异荧光的抗原抗体复合物。DFA 检测法具有快速、特异性高的优点,主要用于检测嗜肺军团菌,对非嗜肺菌株的检测较少。缺点是 DFA 检测法敏感性低,且与其他革兰阴性杆菌、铜绿假单胞菌和大肠杆菌有交叉反应,当标本中军团菌数量较少或病原菌为荧光抗血清未包括的新种(型)时,结果常为阴性。

**2.2.2 尿军团菌抗原检测** 尿中军团菌抗原在有症状后 1d 就可检出,并持续几天或几周。尿抗原检测原理是检测军团菌细胞壁上的具有热稳定性的脂多糖,主要应用于非典型肺炎患者。主要的检测方法有:放射免疫检测法(RIA)、酶免疫检测法(EIA)、免疫层析检测法(ICT)等,这些检测方法主要用于检测嗜肺军团菌 1 型(Lp1)。目前许多公司生产嗜肺军团菌尿抗原检测试剂盒,主要有 Meridian TRU Legionella、Binax NOW ICT、Binax EIA、Bartels EIA、Biotest EIA 等。Bruin 等<sup>[20]</sup>对 Meridian TRU Legionella 这种新的检测试剂盒进行了评价研

究,结果显示其在检测嗜肺军团菌 1 型(Lp1 型)患者的尿标本时,敏感性 73%,特异性 100%,如果延长温育时间到 60 min,敏感性可达 81%。Guerrero 等<sup>[21]</sup>通过比较 Bartels EIA, Biotest EIA, Binax NOW ICT 三种试剂盒的敏感性,发现检测未浓缩尿标本时, Bartels EIA, Biotest EIA 检测敏感性(分别为 71.3%、65.1%)明显高于 Binax NOW ICT(37%,  $P < 0.01$ )。浓缩后的尿标本,三种检测试剂盒敏感性无明显差异。

多数研究发现,试剂盒检测敏感性受以下因素影响:尿标本采集时间、感染严重程度、尿液是否经浓缩或冷冻、是否已经抗生素治疗等。

尿抗原检测具有诸多优点:在军团菌病患者的尿中原抗原出现早,该检测方法可为早期诊断治疗提供依据;简便、快速、特异性高、操作简单;标本容易获得,对患者没有创伤。缺点是:对除 Lp1 型以外的其他型检测敏感性很低,且检测试剂盒昂贵,不利于推广应用。

**2.2.3 水中军团菌抗原的检测** 水中军团菌抗原检测有专有试剂盒 Binax Equate™,用于检测水中的 Lp1。Luck 等<sup>[22]</sup>对该试剂盒进行研究评价,发现其最低检测限为 1000 cfu/ml,且无法检测 Lp2~Lp14 型的军团菌。军团菌抗原检测试剂盒的检测敏感性偏低,但其快速、操作简便的优势使其在对检测水样军团菌污染时具有一定的应用价值。

**2.2.4 免疫传感器技术** 免疫传感器是由偶联抗原/抗体分子的生物敏感膜与信号转换器组成的,为基于抗原抗体特异性免疫反应的一种生物传感器。由于蛋白质分子携带有大量电荷、发色基团等,当抗原抗体结合时,会产生电学、光学、化学等变化,通过适当传感器可检测到这些参数。Parthuisot 等<sup>[23]</sup>利用该技术检测水样,检测限达 34 CFU/L,重复性好,适合江河自然水环境军团菌污染监测。

## 3 分子生物学方法

根据军团菌核苷酸序列设计引物或探针,进行扩增或杂交试验来诊断军团菌。目前应用的特异性片段包括 16SrRNA, 5SrRNA, mip 基因, 23S~5S 区间等。

**3.1 核酸探针技术** 根据军团菌核酸序列合成一段寡核苷酸并用其作为探针进行标记。探针与待测标本中的核酸杂交,以鉴定标本中有无军团菌感染。该方法直接使探针与细菌基因组作用,无需提取核酸,具有快速、高敏感性和特异性的特点,并且可以提供微生物群落结构信息<sup>[24]</sup>。

**3.2 常规 PCR** 目前常用于检测的特异性片段包括 16SrRNA, 5SrRNA, mip 基因, 23S ~ 5S 区间等。方法简便, 快速、特异性较高, 但敏感性较差, 特别是对于临床痰液标本, 由于军团菌量较少, 易出现假阴性结果。Chang 等<sup>[25]</sup> 综合使用叠氮溴化乙锭 (EMA) 和 PCR 结合的检测方法, 既可用于检测水环境是否存在活的军团菌, 亦可评价水消毒效果。

**3.3 巢式 PCR (nested PCR)** 选用两对引物先后进行两次扩增, 后一次 PCR 扩增引物互补于前一次 PCR 扩增序列的内侧, 可提高检测的敏感性。Ginevra 等<sup>[26]</sup> 应用套式 PCR 检测 63 例标本, 敏感性达到 90.5%, 显示了套式 PCR 检测军团菌的高敏感性。

**3.4 多重 PCR (multiplex PCR)** 多重 PCR 是在同一反应体系中加入两对或多对特异性核酸引物, 同时扩增出一条以上 DNA 片段。王中民等<sup>[27]</sup> 设计两对引物, 分别扩增军团菌的 16S rRNA 和 Mip 基因, 检测环境水样军团菌, 其灵敏度为  $5.8 \times 10^2$  cfu/ml。邱琼等<sup>[28]</sup> 设计的双重 PCR 扩增临床标本, 其最小检出限为 20 cfu/ml, 不仅能够检测嗜肺军团菌, 而且能够检测非嗜肺的军团菌, 克服了单一引物应用时的不足, 检测简便、快捷, 具有很高的特异性和敏感性。

**3.5 实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-PCR)** 该法是针对特异片段设计一对引物和一条探针, 通过连续监测荧光信号强弱的变化来即时测定特异性产物的量, 并推断目的基因的初始量, 具有定性和定量的优点。该法特异性强、速度快、无需电泳。Diederer 等<sup>[29]</sup> 用荧光定量 PCR 方法检测 68 例患者临床血清标本, 分别针对 5S rRNA、mip 和 16S rRNA 进行检测, 结果阳性率分别为 54.4%、52.9%、30.9%。Fard 等<sup>[30]</sup> 建立实时荧光定量 PCR 法检测 262 例重症军团肺炎患者呼吸道标本, 结果敏感性 100%, 特异性为 96.9%。Joly 等<sup>[31]</sup> 用荧光定量 PCR 方法对 92 份热水系统进行检测, 76 份是阳性。

**3.6 核酸分型鉴别** 军团菌的分型对军团菌流行病学研究和军团菌病病因诊断与治疗有重要意义。核酸分型主要有扩增片段长度多态性分型 (AFLP)、PCR-酶切分型等。

AFLP 由一个简单的限制性连接反应和 PCR 扩增两步组成, 通过凝胶检测基因组 DNA 限制性片段长度多态性。该方法快速、有效, 而且对人体或环境中分离的嗜肺军团菌分型有良好的可重复性。胡朝晖等<sup>[32]</sup> 对广东地区分离的 41 株嗜肺军团菌和 2 株

标准嗜肺军团菌 (ATCC-33153, 33154) 作了 AFLP 基因分型, 可分为 18 个群, 33 个基因型。AFLP 基因分型对于军团菌病分子流行病学调查具有重要意义, 但只适合嗜肺军团菌, 不能对其他军团菌进行分型鉴定。

**PCR-酶切分型:** 该方法通过对军团菌特异性基因片段进行 PCR-酶切来检测军团菌, 具有仪器设备要求简单、灵敏度高等优点。Zhan 等<sup>[33]</sup> 发现在军团菌 16S rRNA gene 386 bp 片段有 1 个嗜肺军团菌特有的 Hpy CH4 III 核酸内切酶位点, 可鉴别嗜肺军团菌和非嗜肺军团菌; 对 3 家省级医院 1062 例呼吸道感染患者痰液标本作临床观察, 并通过基因测序作验证试验, 军团菌阳性检出率分别为 3.65%、7.71%、8.95%, 表明我国临床肺部感染患者, 确实存在不少军团菌感染病例, 应引起足够的重视。

**3.7 环介导等温扩增 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP)** 该技术是针对靶基因的 6 个区域设计 4 种特异引物, 利用一种链置换型 DNA 聚合酶在恒温 65℃ 左右保温几十分钟后快速进行核酸扩增的方法, 具有快速、简便、特异性好、灵敏度高、成本低等优点。Lu 等<sup>[34]</sup> 用该法设计两套 LAMP 引物成功检测军团菌, 并且能够区分嗜肺军团菌与非嗜肺军团菌, 特异性 100%, 两套 LAMP 引物敏感性分别为 91.59% 和 93.33%。

## 4 小 结

军团菌病在国内外时有暴发流行, 我国对于军团菌的研究还比较薄弱, 特别是对军团菌病的诊断, 至今还没有一种得到国家食品药品监督管理局 (SFDA) 批文的诊断试剂。细菌培养作为金标准, 技术难度大, 耗时长; 直接荧光抗体法、尿抗原测定诊断试剂大多依赖进口, 价格昂贵; 基因诊断方法简便、快速, 但是目前国内医院运用甚少。鉴于我国确实存在不少军团菌感染病例, 希望卫生部门重视对军团菌病诊断技术的研究, 提高我国军团菌病的诊断水平。

## 【参考文献】

- [1] Fields BS, Benson RF, Besser RE. Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation [J]. Clin Microbiol Rev, 2002, 15 (3): 506-526.
- [2] Diederer BMW. Legionella spp. and Legionnaires' disease [J]. J Infect, 2008, 56 (1): 1-12.
- [3] Euzéby JP. List of prokaryotic names with standing in nomenclature-genus Legionella. <http://www.bacterio.cict.fr/1/legionella.html>.

- [4] Newton HJ, Ang DKY, van Driel IR, et al. Molecular pathogenesis of infections caused by legionella pneumophila[J]. Clin Microbiol Rev, 2010, 23(2): 274-298.
- [5] Diederer BM, de Jong CM, Marmouk F, et al. Evaluation of real-time PCR for the early detection of legionella pneumophila DNA in serum samples[J]. J Med Microbiol, 2007, 56(1): 94-101.
- [6] McDade JE. Legionnaires' disease[J]. New Eng J Med, 1977, 29(7): 1197-1202.
- [7] Brenner DJ, Steigerwalt AG, McDade JE. Classification of the legionnaires' disease bacterium; legionella pneumophila, genus novum, species nova, of the family legionellaceae, familia nova[J]. Ann Intern Med, 1979, 90(4): 656-658.
- [8] Diederer BM. Legionella spp and Legionnaires' disease[J]. J Infect, 2008, 56(1): 1-12.
- [9] Ricketts KD, Joseph CA, EWGLI. Legionnaires' disease in Europe; 2005-2006[J]. Euro Surveill, 2007, 12(12): E7-8.
- [10] Lim I, Sangster N, Reid DP, et al. Legionella longbeachae pneumonia; report of two cases[J]. Med J Aust, 1989, 150(10): 599-601.
- [11] 李珍大, 武建国. 病人痰液分离出一株嗜肺军团杆菌[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 1984, 4(2): 101.
- [12] 方健, 宋海燕, 陈从新, 等. 一起小规模军团肺炎链球菌感染流行的报告[J]. 东南国防医药, 2011, 13(6): 485-487.
- [13] Knez K, Janssen KP, Spasic D, et al. Spherical nucleic acid enhanced FO-SPR DNA melting for detection of mutations in legionella pneumophila[J]. Anal Chem, 2013, 85(3): 1734-1742.
- [14] Foudeh AM, Daoud JT, Faucher SP, et al. Sub-femtomole detection of 16s rRNA from legionella pneumophila using surface plasmon resonance imaging[J]. Biosens Bioelectron, 2014, 52: 129-135.
- [15] Matthias M, Jurgen HH. Laboratory methods for the diagnosis of Legionella infections[J]. J Microbiol Methods, 1998, 33: 59-79.
- [16] Matsioto-Bernard P, Piksouni E, Legakis N, et al. Evaluation of commercial amplification kit for detection legionella pneumonia in clinical specimens[J]. J Clin Microbiol, 1994, 32(6): 1503-1505.
- [17] Den Boer JW, Yzerman EP. Diagnosis of legionella infection in legionnaires' disease[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2004, 23(12): 871-878.
- [18] Malan AK, Martins TB, Jaskowski TD, et al. Comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assays with an immunofluorescence assay for detection of legionella pneumophila types 1 to 6[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(7): 3060-3063.
- [19] Diederer BM, Kluytmans JA, Peeters MF. Evaluation of vircell enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence assay for detection of antibodies against legionella pneumophila[J]. Clin Vaccine Immunol, 2006, 13(3): 361-364.
- [20] Bruin JP, Diederer BM. Evaluation of meridian TRU legionella, a new rapid test for detection of legionella pneumophila serogroup 1 antigen in urine samples[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2013, 32(3): 333-334.
- [21] Guerrero C, Toldos CM, Yagüe G, et al. Comparison of diagnostic sensitivities of three assays [Bartels enzyme immunoassay (EIA), Biotech EIA, and Binax NOW immunochromatographic test] for detection of legionella pneumophila serogroup 1 antigen in urine[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(1): 467-468.
- [22] Luck PC, Liebscher B. Detection of legionella pneumophila in water samples by quantitative culture and an antigen detection assay[J]. Int J Hyg Environ Health, 2003, 206(3): 201-204.
- [23] Parthuisot N, Binet M, Touron-Bodilis A, et al. Total and viable legionella pneumophila cells in hot and natural waters as measured by immunofluorescence-based assays and solid-phase cytometry[J]. Appl Environ Microbiol, 2011, 77(17): 6225-6232.
- [24] Whitley H, Taylor M, Bentham R. Detection of legionella species in potting mixes using fluorescent in situ hybridisation (FISH)[J]. J Microbiol Methods, 2011, 86(3): 304-309.
- [25] Chang B, Sugiyama K, Taguri T, et al. Specific detection of viable legionella cells by combined use of photoactivated ethidium monoazide and PCR/real-time PCR[J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75(1): 147-153.
- [26] Ginevra C, Lopez M, Forey F, et al. Evaluation of a nested-PCR-derived sequence-based typing method applied directly to respiratory samples from patients with legionnaires' disease[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(4): 981-987.
- [27] 王中民, 杨国芬, 谭崇阳, 等. 军团菌双重 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(3): 297-299.
- [28] 邱琼, 万超群, 刘双, 等. 军团菌双重 PCR 检测方法的建立及其应用研究[J]. 中国人兽共患病杂志, 2000, 16(5): 13-16.
- [29] Diederer BM, de Jong CM, Marmouk F, et al. Evaluation of real-time PCR for the early detection of legionella pneumophila DNA in serum samples[J]. J Med Microbiol, 2007, 56(Pt 1): 94-101.
- [30] Fard SY, Nomanpour B, Fatollahzadeh B, et al. Hospital acquired pneumonia; comparison of culture and real-time PCR assays for detection of legionella pneumophila from respiratory specimens at Tehran hospitals[J]. Acta Microbiol Immunol Hung, 2012, 59(3): 355-365.
- [31] Joly P, Falconnet PA, André J, et al. Quantitative real-time legionella PCR for environmental water samples; data interpretation[J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(4): 2801-2808.
- [32] 胡朝晖, 屈平华, 朱庆义, 等. 广东地区嗜肺军团菌的扩增片段长度多态性分析[J]. 微生物学报, 2008, 48(12): 1659-1665.
- [33] Zhan XY, Li LQ, Hu CH, et al. Two-step scheme for rapid identification and differentiation of legionella pneumophila and non-legionella pneumophila species[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(2): 433-439.
- [34] Lu X, Mo ZY, Zhao HB, et al. LAMP-based method for a rapid identification of legionella spp. And legionella pneumophila[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2011, 92(1): 179-187.

(收稿日期: 2013-10-30; 修回日期: 2013-11-12)

(本文编辑: 张仲书)