

空调冷却塔水与空气军团菌的 PCR 方法快速检测

陈维田¹, J. Burnett¹, 陆勇军², 邓程澧¹, 周世宁^{2*} (1. 香港理工大学, 中国香港; 2. 中山大学生命科学学院, 广州 510275, E-mail: lsszsl@zsu.edu.cn)

摘要: 应用 EnviroAmp PCR-反向杂交法(涉及 5S rRNA 基因和 mip 基因)和半巢式 PCR(涉及 16S rRNA 基因)成功检测人工气溶胶化的军团菌, 这些方法进一步用于检测空调系统冷却塔的水及由其产生的气溶胶中的军团菌, 从空气样品中检测到军团菌属及嗜肺军团菌。检测的冷却塔水样品 100% 含军团菌属细菌, 其中 41.6% 含嗜肺军团菌。2 种方法相比, 半巢式 PCR 法更经济、方便。

关键词: 军团菌; 冷却塔; 多聚酶链反应(PCR)

中图分类号: X830.2 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2000)04-0078-04

Rapid Detection of *Legionella* in Cooling Tower Water and Air with Different PCR Methods

Chan Daniel¹, Burnett John¹, Lu Yongjun², Tang Park L.¹, Zhou Shining² (1. The Hong Kong Polytechnic University, Hong Kong, China; 2. College of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China E-mail: lsszsl@zsu.edu.cn)

Abstract: Artificial aerosolized *Legionella* was collected into buffer and detected by using EnviroAmp *Legionella* detection kit (5S rRNA and mip genes) method and sem inested PCR (16S rRNA gene) method. These methods were also used to detect *Legionella* in aerosol produced from operating cooling towers which were contaminated by *Legionella*. From 200L of collected air sample, not only *Legionella* sp. but also *L. pneumophila* could be detected. Both methods had similar sensitivity. Sem inested PCR method, however, was more simple and more economical, although it failed to detect the species *L. pneumophila* because of only genus specific primers being used in this study. The results also indicated that 100% of cooling tower water samples tested contained *Legionella* sp. and 41.6% of them contained *L. pneumophila*.

Keywords: *Legionella*; cooling tower; polymerase chain reaction(PCR)

近年来对建筑物内外环境水样品军团菌的检出率高达 60% 以上^[1-3]。这些研究均注意到水环境的军团菌污染。然而, 一般认为气传的军团菌才是军团菌病暴发的原因。空调系统中的冷却塔现在已被认为是生物气溶胶的潜在来源^[4-6]。对于军团菌的预防和控制来说, 监控空气中军团菌的存在和分布更加重要。迄今鲜有气传军团菌的研究, 主要原因是由于传统检测方法依赖活菌培养, 不仅效率低, 且灵敏度也低^[1,7-11]。

action, PCR) 方法被用于军团菌的检测, 检测对象为 5S rRNA 基因和 mip 基因, 以及 16S rRNA 基因^[11]。本文应用上述 2 种 PCR 方法对气传和冷却塔水的军团菌进行了检测, 并对该 2 种方法进行了比较。

基金项目: 广州市环保局和香港理工大学研究基金资助项目
作者简介: 陈维田(1959~), 男, 副教授, 主要从事室内环境质量研究

收稿日期: 1999-12-31

* 联系人

目前多聚酶链反应(polymerase chain re-

1 材料与方 法

1.1 细菌培养及人工气溶胶化

军团菌标准菌株从广东省防疫站购入,接种于 BCYE 加 SR110(OXO1D) 选择性平板上, 37℃ 培养 72h. 收获细菌并悬浮于 500ml 无菌水中, 得到含约 10^5 细胞/ml 的悬浮液, 取 10ml 作细胞计数, 其余加福尔马林到 0.04%, 然后 80℃ 加热 30min. 悬浮液通过喷雾装置向一个约 82m³ 的封闭房内气雾化. 喷雾装置高度 1.5m.

1.2 空气采样

气溶胶的采样在喷雾接近完成时开始, 采样器为一真空装置, 通过真空抽吸, 外部空气由漏斗状吸气口和管道进入抽滤瓶中的 150ml 收集缓冲液 (0.3mol/L KH₂PO₄, 1.25ml; 0.4mol/L MgCl₂·6H₂O, 5ml, 加水至 1L) 并用多孔胶管使空气广泛散布到收集液中. 管道连接空气流速计, 维持流速 5L/min. 共采集空气 200L. 分别应用孔径为 0.2μm 的滤膜过滤不同体积的含菌收集液, 所得含菌滤膜用于制备 DNA 和 PCR 分析. 对运作中的冷却塔上空的采样方法与上相似, 吸气口约高于塔顶 1m.

1.3 细菌 DNA 制备

将滤有细菌的滤膜放入 500μl 细胞裂解液中, 强烈混旋将菌从滤膜洗脱并裂解, 于 99℃ 加热 20min, 离心 (10,000r/min), 取 400μl 上清液, 以等量异丙醇抽提, 加入载体分子使 DNA 沉淀, 异丙醇洗 1 次, 沉淀溶于 160μl 纯净无菌水中, 所得 DNA 制取物备用.

1.4 半巢式 PCR 与电泳检测

引物设计及 PCR 条件参考文献 [13], 第一步 PCR 中, 2 个引物用于扩增军团菌 16S rRNA 基因中的 654bp 片段, 在第二步 PCR 中, 上述引物中的一个与另一新的引物共同扩增了第一步产物 654bp 片段中的一部分 (430bp). PCR 产物通过 3% 浓度的琼脂糖凝胶电泳分离, 溴化乙锭染色, 紫外照相.

1.5 EnviroAmp PCR 与反向杂交检测

EnviroAmp 军团菌 PCR 扩增盒及 EnviroAmp

军团菌 PCR 检测盒均购自 Perkin-Elmer 公司, PCR 引物分别针对军团菌属专一的 5S rRNA 基因和嗜肺军团菌专一的 mip 基因设计. PCR 产物需与已作标记的探针杂交, 并显色. 所有步骤参照试剂盒使用说明书, 但对 DNA 杂交操作进行了改动, 应用空气式杂交炉 (Robbins Scientific co, Model 1000) 代替水浴式, 并用螺帽小管代替杂交盒. 为了保证杂交温度的准确性, 把杂交反应的小管放于水浴中.

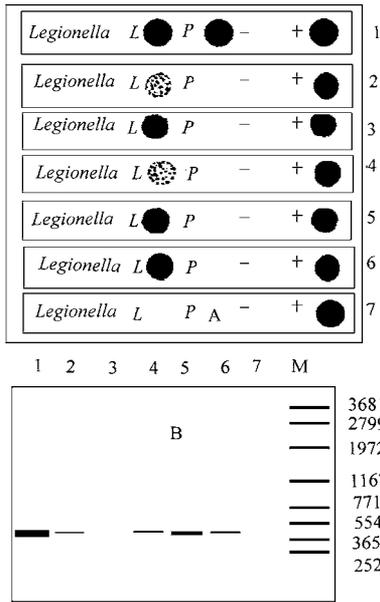
2 结果与讨论

2.1 人工气溶胶化的军团菌的采样和检测

在 EnviroAmp PCR 方法中应用 5ml 和 10ml 含菌收集液时, 给出了清楚的军团菌阳性; 而当应用 2ml 含菌收集液时, 在杂交条膜的 L (军团菌属) 符号旁边仅有一很淡的蓝斑 (图 1A), 表示有低浓度的军团菌存在. 这一浓度应接近检测的最低浓度. 当用半巢式 PCR 法对 5ml 和 10ml 含菌收集液作检测时, 也均得到阳性结果 (图 1B), 第二步 PCR 的产物 430bp 片段的电泳带能明显见到; 但当应用 2ml 含菌收集液作检测时, 相应的电泳带极微弱. 在半巢式 PCR 第一步反应中, 没有一个样品能从电泳结果看到其产物 654bp 片段的带, 表明军团菌含量不高. 这些实验表明虽然大量的含标准军团菌的悬浮液被喷雾于空气中, 但能收集到的并不很多. 其原因可能是部分细胞没有形成稳定的气溶胶, 另外可能是收集效果差, 细胞随气流进入收集液后, 一部分又重新随气流排向空间. 尽管如此, 在本实验中只要应用多于 2ml 的含菌收集液, 2 种方法均能成功检测到该菌. 当空气中军团菌浓度低时, 可以增加含菌收集液的用量, 以增加灵敏度. 本实验中含菌收集液共有 150ml, 留有足够的余地.

2.2 冷却塔水中军团菌的检测

应用 EnviroAmp PCR-反应杂交和半巢式 PCR 法, 对 12 个空调系统冷却塔的水样品进行了检测. 无论应用何种方法, 所有样品均发现军团菌属细菌. 在 EnviroAmp PCR-反向杂交方法中, 发现 12 个样品中的 5 个是 mip 基因阳



(A) EnviroAmp PCR-杂交法: 1. 标准嗜肺军团菌 DNA
2. 军团菌悬液 100 倍稀释液 1ml 3. 军团菌悬液 1ml 4、
5、6. 含菌空气收集液 2ml、5ml、10ml 7. 对照, 气溶胶化
前室内空气收集液 5ml
(B) 半巢式 PCR 法: 1. 军团菌悬液 1ml 2. 军团菌悬液
100 倍稀释液 1ml 3、4、5. 含菌空气收集液 2ml、5ml、
10ml 6. 已知军团菌制备的 DNA 7. 对照同(A)7.

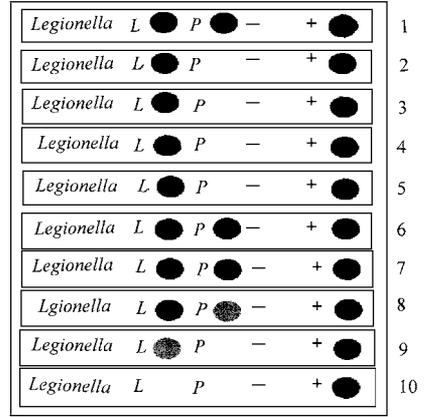
图 1 人工气溶胶化军团菌的检测

性, 含有嗜肺军团菌种, 占总样品数的 41.6%. 这 5 个样品不仅使杂交条膜上 L (军团菌属) 符号旁出现了蓝色斑点, 在 P (嗜肺军团菌) 符号旁也出现了蓝斑. 图 2 是部分样品的 EnviroAmp PCR-反向杂交法检测结果; 在半巢式 PCR 方法中, 所有样品均能在第二步反应中扩增出预料中的 430bp 片段的电泳带, 部分样品检测结果见图 3A. 2 种方法的检测结果总结于表 1.

2.3 运行冷却塔周围空气的军团菌检测

根据表 1, 冷却塔 No. 3 和 No. 4 受到了军团菌和嗜肺军团菌污染. 每塔各取 10ml 和 100ml 含菌的收集液进行过滤和检测. 结果表明, 不论 EnviroAmp PCR-反向杂交法还是半巢式 PCR 法, 此 2 种体积的样品均呈现军团菌阳性(图 3), 在 EnviroAmp PCR 方法中, 2 个塔 100ml 样品均呈微弱的嗜肺军团菌阳性

(图 3B), 这表明除含其他军团菌外, 2 冷却塔上部空气中尚有较低浓度的嗜肺军团菌存在.



1. 标准嗜肺军团菌 DNA 2~9. 部分冷却塔水样品
10. 无菌 d H₂O 20ml; L 军团菌属 Legionella sp.; P 嗜肺
军团菌 L. pneumophila; - 阴性对照; + 阳性对照

图 2 冷却塔水样品的军团菌检测

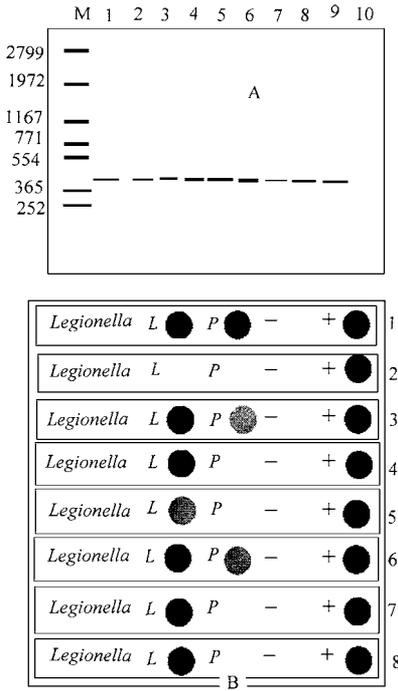
表 1 冷却塔水样中军团菌检测¹⁾

冷却塔编号	EnviroAmp PCR		半巢式 PCR
	L	LP	(430bp)
1	+	-	+
2	+	+	+
3	+	-	+
4	+	+	+
5	+	+	+
6	+	-	+
7	+	-	+
8	+	-	+
9	+	+	+
10	+	-	+
11	+	+	+
12	+	-	+

1) + 阳性, - 阴性, L 军团菌属, LP 嗜肺军团菌

3 结语

人工气溶胶化实验及实地的空气检测实验表明, 应用 16S rRNA 基因的半巢式 PCR 扩增法或 EnviroAmp 检测盒进行 5S rRNA 基因和 mip 基因扩增法均能快速地检测到空气中的军团菌, 时间仅需 6h 到 1 个工作日. 2 种方法均可用于水样品和空气样品检测, 并有相似的敏感性. 如果仅调查军团菌属的存在, 似乎不必收集 200L 空气, 但假如需检测嗜肺军团菌, 收集 200L 或更多的空气是合适的. 敏感性可以通过



(A) 半巢式 PCR 法: 1~ 5. 第 3、4、8、9 和 10 号冷却塔水样; 6、7. 第 3 号冷却塔空气收集液 10m l 和 100m l; 8、9. 第 4 号冷却塔空气收集液 10m l 和 100m l; 10. 离冷却塔 1000m 处空气收集液 50m l.
 (B) EnviroAmp PCR-杂交: 1. 标准嗜肺军团菌 DNA; 2. 同(A)10; 3、4. 第 4 号冷却塔空气收集液 100m l 和 10m l; 5. 第 4 号冷却塔水样品; 6、7. 第 3 号冷却塔空气收集液 100m l 和 10m l; 8. 第 3 号冷却塔水样品.

图 3 冷却塔水及周围空气中军团菌的检测

过滤更多含菌收集液而获得提高. EnviroAmp 反向杂交方法不仅可检测军团菌属细菌, 并且能够检出嗜肺军团菌; 在本实验中半巢式 PCR 方法只能检测到属, 但通过种专一性引物的设计, 检测到种是可能的. 半巢式 PCR 法的优点是经济、简便, 费用比 EnviroAmp 法低几十倍, 且无需 DNA 分子杂交、显色等设施. 半巢式 PCR 有相当好的专一性, 并且特别适用于含有 PCR 抑制物的环境样品的检测^[13].

参考文献:

1 Atlas R M, Williams J F, Huntington M K. *Legionella* contamination of dental-unit waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, **61**(2): 1208~ 1213.

2 Maiwald M, Kissel K, Srimuang S et al. Comparison of PCR and conventional culture for the detection of *Legionella* on hospital water samples. *J. Appl. Bacteriol.*, 1994, **76**(3): 216~ 225.
 3 Koide M, Saito A, Kusano N et al. Detection of *Legionella* in cooling tower water by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, **59**(6): 1943~ 1946.
 4 Dondero T J, Rendtorff R C, Mallison G F et al. An outbreak of Legionnaires' disease associated with a contaminated air-conditioning cooling tower. *N. Engl. J. Med.*, 1980, **302**(6): 365~ 370.
 5 Hoge C W, Brieman R F. Advances in the epidemiology and control of *Legionella* infections. *Epidemiol. Rev.*, 1991, **13**: 329~ 340.
 6 Keller D W, Hajjeh R, DeMaria A Jr et al. Community outbreak of Legionnaires' disease: An investigation confirming the potential for cooling towers to transmit *Legionella* species. *Clin. Infect. Dis.*, 1996, **22**(2): 257~ 261.
 7 Stetzenbach L D. Airborne microorganisms. In J. Lederberg (ed.), *Encyclopedia of microbiology*. Harcourt Brace Jovanovich Publishers, San Diego, California: Academic Press, 1992. 53~ 56.
 8 Thorne P S, Kiekhaefer M S, Whitten P et al. Comparison of bioaerosol sampling methods in barns housing swine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, **58**(8): 2543~ 2551.
 9 Lee T C, Vickers R M, Yu V L et al. Growth of 28 *Legionella* species on selective culture media: a comparative study. *J. Clin. Microbiol.*, 1993, **31**(9): 2746~ 2768.
 10 Palmer C J, Tsai Y L, Paszko-Kolva C et al. Detection of *Legionella* species in sewage and ocean water by polymerase chain reaction, direct fluorescent-antibody, and plate culture methods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, **59**(11): 3618~ 3624.
 11 Miller L A, Beebe J L, Butler J C et al. Use of polymerase chain reaction in an epidemiologic investigation of pontiac fever. *J. Infect. Dis.*, 1993, **168**: 769~ 772.
 12 Palmer C J, Bonilla G F, Roll B et al. Detection of *Legionella* species in reclaimed water and air with the EnviroAmp *Legionella* PCR Kit and direct fluorescent antibody staining. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, **61**(2): 407~ 412.
 13 Miyamoto H, Yamamoto H, Arima K et al. Development of a new seminested PCR method for detection of *Legionella* species and its application to surveillance of *Legionella* in hospital cooling tower. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, **63**(7): 2489~ 2494.