



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106498033 B

(45)授权公告日 2019.12.13

(21)申请号 201610857255.9

(22)申请日 2016.09.27

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106498033 A

(43)申请公布日 2017.03.15

(73)专利权人 北京大学
地址 100871 北京市海淀区颐和园路5号

(72)发明人 要茂盛 郑云昊

(74)专利代理机构 北京万象新悦知识产权代理
有限公司 11360

代理人 李稚婷

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6844(2018.01)

C12Q 1/04(2006.01)

(56)对比文件

Jannatul Ferdous, et al. A quick DNA extraction protocol: Without liquid nitrogen in ambient temperature.《African Journal of Biotechnology》.2012,

审查员 翟羽佳

权利要求书1页 说明书3页

(54)发明名称

一种现场快速检测空气与呼吸道病原微生物的方法

(57)摘要

本发明公布了一种现场快速检测空气与呼吸道病原微生物的方法,可用于公共场所空气以及临床呼吸系统感染的病人的致病菌的快速检测。该方法直接采集空气或者病人的咽拭子或呼出气样本,通过反复升降温法提取样本DNA,再使用环介导等温扩增技术对样本进行检测,快速得到常见致病菌的种类,为临床呼吸系统感染治疗提供依据以及评估空气的生物安全。

1. 一种非诊断目的的现场快速检测空气或呼吸道病原微生物的方法,包括以下步骤:
 - 1) 采集空气样本或者待检者的咽拭子样本或呼出气样本;
 - 2) 利用快速反复升降温的方法提取样本的DNA,反复升降温的参数是:90~99°C3min, 20~25°C2min,重复两次或三次;
 - 3) 使用环介导等温扩增方法对样本DNA进行检测,得到致病菌种类信息。
2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤1)中,使用细菌采样管采集待检者的咽拭子样本;使用呼出气采样盒采集待检者的呼出气样本。
3. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤1)使用空气采样器采集空气样本。
4. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤3)根据待检致病菌设计环介导等温扩增体系,进行扩增反应,得到检测结果。

一种现场快速检测空气与呼吸道病原微生物的方法

技术领域

[0001] 本发明属于微生物检测领域,具体涉及一种用于现场快速无创检测呼吸道以及空气病原微生物的方法,主要利用快速升降温模块实现空气或呼吸道样品中致病菌的DNA释放提取,然后通过恒温扩增的方法实现现场病原体快速检测。

背景技术

[0002] 通过空气传播的疾病成为人类的一大隐形杀手,呼吸系统感染每年造成几百万人的死亡,但其感染原因不明朗,且临床上缺乏快速诊断技术,无法保证患者得到及时有效的治疗。而通过呼吸暴露,机会致病菌可能乘虚而入,改变人体呼吸道存在的多种共生益生菌的含量,破坏呼吸道细菌微生态结构,引发更多的呼吸系统感染。研究表明,细菌感染和病毒感染都可能导致呼吸系统感染,两者还存在并发感染;同时,真菌的定植又会加重呼吸道炎症与过敏反应。因此,吸道感染致病原复杂,感染的准确分型难以实现。医生大多根据临床经验利用血常规检测得到的白细胞水平和临床症状如头痛、咳嗽、关节疼痛等症状对感染类型进行判别,然而这种诊断方法缺乏充足的科学依据,无法使患者得到准确及时的诊疗。而且,仅仅根据白细胞水平的增高将患者确诊为细菌性感染会导致抗生素的滥用,进而不仅造成经济损失,还会造成微生物抗药性增强,同时也会抑制其他益生菌,导致人体更容易感染其它疾病。

[0003] 临床上常用的致病原检测方法有胶体金法,可快速检测甲、乙型流感,30分钟内可检测病毒是否阳性,耗时短,但是假阳性和假阴性率高,在临床上的实用价值低。此外,在特殊情况下,实验室还采用RT-qPCR以及基于PCR技术的高通量测序技术检测致病菌,或直接检测细胞因子和血清降钙素原来标志细菌感染和病毒感染,但这几种方法都存在耗时长、成本高等问题,难以在临床上得以应用。

[0004] 综上,针对临床呼吸系统感染的病人,其致病菌的快速检测显得尤为重要,在发生大规模传染病时,现场快速检测的需求也颇为迫切。近年来,环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification,LAMP)日益被用于细菌、病毒的检测。本发明主要结合样本采集、LAMP以及样品细菌DNA的快速提取,针对空气以及呼吸道样品中的致病菌进行快速检测。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种现场快速无创检测空气以及呼吸道病原微生物的方法,该方法可用于公共场所空气以及临床呼吸系统感染的病人的致病菌的快速检测,直接采集空气或者病人的咽拭子和呼出气样本,使用环介导等温扩增技术对样本进行检测,快速得到常见致病菌的种类,为临床呼吸系统感染治疗提供依据以及评估空气的生物安全。

[0006] 本发明采用的技术方案如下:

[0007] 一种现场快速检测空气或呼吸道病原微生物的方法,包括以下步骤:

[0008] 1) 采集空气样本或者待检者的咽拭子样本或呼出气样本;

- [0009] 2) 利用快速反复升降温的方法提取样本的DNA;
- [0010] 3) 使用环介导等温扩增方法对样本DNA进行检测,得到致病菌种类信息。
- [0011] 上述步骤1)中,采集待检者的咽拭子样本可以使用通用的细菌采样管;采集待检者的呼出气样本可以使用呼出气采样盒,例如发明名称为“一种呼出气采样盒和采样方法”的中国专利ZL.201110020115.3公开的呼出气采样盒,在3-5min内采集上呼吸道感染病人的呼出气样本;
- [0012] 上述步骤1)中,采集空气样本可以使用市售的空气采样器,例如安德森(Andersen)采样器,在传统琼脂培养基上盛放有一定量无菌水,在一定的采集流量下收集空气一段时间,获得所需空气样品。
- [0013] 上述步骤2)中,反复升降温的具体参数可以是:90~99℃3min,20~25℃2min,重复两次或三次。
- [0014] 上述步骤3)可以根据具体情况和常见致病菌,设计环介导等温扩增体系,进行扩增反应,得到检测结果。
- [0015] 本发明的方法在样本的采集方面,无论是对于无创的咽拭子或呼出气样本,还是对于空气样品,都非常简便易得;反复升降温法提取样本DNA与环介导等温扩增技术(LAMP)的结合,大大缩短了样本的处理和检测时间,1小时内可得到检测结果。本发明方法实现了空气以及呼吸道样品中致病菌的快速检测,能够方便快捷地为评估空气的生物安全性和临床呼吸系统感染治疗提供依据。

具体实施方式

[0016] 下面结合实施例进一步阐述本发明,本领域技术人员应理解,以下实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的保护范围。

[0017] 实施例1:对发热门诊呼吸道感染病人的致病菌检测

[0018] 1) 使用生物通用细菌采样管,采集上呼吸道感染病人的咽拭子样本,将采样拭子放入转存液后震荡15min,取50μL样本待测;

[0019] 2) 使用呼出气采样盒采集呼出气样本,采集并收集至1.5mL离心管中,取50μL待测;

[0020] 3) 利用升降温方法,提取上述咽拭子和呼出气样本的DNA,具体反应参数为:99℃3min,20℃2min,重复两次;

[0021] 4) 对于提取完成的样本,使用环介导等温扩增(LAMP)的方法进行扩增反应,检测流感嗜血杆菌。反应体系为25μL,包含2μL DNA模板,1.6μM的FIP和BIP,0.2μM的F3和B3,0.8μM的LF和LB,8U Bst酶,以及12.5μL的2×RM,使用ddH₂O补齐体积。将混合体系至于浊度仪(LA-500,Kyoto,Japan)中,64℃反应60min,最后80℃加热灭活处理2min。

[0022] 5) 共计检测咽拭子和呼出气样本46份,平均每个样本前处理与检测时间在60-90min之内。流感嗜血杆菌阳性率为45.7%(21/46),其中咽拭子样本阳性率为59.3%(16/27)。表明该检测方法体系可以实现对病原菌的快速检测。

[0023] 实施例2:对实验室空气中致病菌的检测

[0024] 1) 在实验室环境中,使用Andersen采样器,在传统琼脂培养基上盛放有2mL无菌水,在采集流量为28.3L/min的情况下收集环境空气10分钟;

[0025] 2) 将上述2mL的水倒入试管中,获得所需空气样品;

[0026] 3) 将上述空气样品离心浓缩至1mL;

[0027] 4) 取50 μ L上述空气样本,进行升降温反应,具体反应参数为:99 $^{\circ}$ C3min,20 $^{\circ}$ C2min,重复两次;

[0028] 5) 对提取的样本,使用环介导等温扩增(LAMP)的方法进行扩增,反应体系为25 μ L,包含2 μ L DNA模板,1.6 μ M的FIP和BIP,0.2 μ M的F3和B3,0.8 μ M的LF和LB,8U Bst酶,以及12.5 μ L的2 \times RM,使用ddH₂O补齐体积。将混合体系至于浊度仪(LA-500,Kyoto,Japan)中,64 $^{\circ}$ C反应60min,最后80 $^{\circ}$ C加热灭活处理2min。

[0029] 共计检测空气样本10例,流感嗜血杆菌和铜绿假单胞菌均呈现阴性,反应体系阳性对照正常。