

用复合 PCR 检测淋球菌、沙眼衣原体和 解脲支原体的感染研究*

陆应玉¹ 李京培² 陈禹保³

(¹ 安徽医科大学附属医院检验科 合肥 200036)

(² 安徽医科大学微生物教研室 合肥 200036)

(³ 北京美迪科生物技术有限公司 北京 100012)

关键词:淋球菌(NG),沙眼衣原体(CT),解脲支原体(UU),多聚酶链式反应

中图分类号:R37 文献标识码:A 文章编号:0001-6209 (2000) 02-0221-23

在性传播疾病中,泌尿生殖道感染的主要病原体是淋球菌、沙眼衣原体和解脲支原体,目前临床上常有多种病原体混合感染^[1],其临床症状相似或无明显症状,给确诊和治疗带来不便。因此我们应用多重引物 PCR(multiplex-PCR),一次实验能从临床标本中检测出三种病原体的混合感染,旨在了解 STD (Sexually Transmitted Diseases)患者病原体的混合感染情况,以便确诊和治疗。

1 材料和方法

1.1 标本的收集和处理

所有标本均取自本市各大医院性病门诊患者 156 例,其中男 116 例,女 40 例。将采集标本的棉拭子置于 1.5mL 标本传递液中 -70℃ 保存。取含分泌物传递液 1mL 置离心管中 15 000r/min 离心 5min,沉淀加 50μL 样品处理液,置 55℃ 30min,后放 100℃ 水浴 10min,13 000r/min 离心 10min,上清可直接用于 PCR 扩增^[2];阳性对照直接取 5μL DNA 阳性模板。

1.2 寡核苷酸引物

引物设计和合成由北京美迪科生物技术有限公司提供。NG (*Neisseria Gonorrhoeae*)引物序列为:5' - AGGTATATCGGCGGCAGGTTG - 3', 5' - GCTTTGCTGTTCTCGACTGGGC - 3', 扩增产物为 390bp,CT (*Chlamydia Trachomatis*)引物序列为:5' - CGCATGCAAGATATCGATTA - 3', 5' - GACCG-GCCTCTAGCGCTGCG - 3', 扩增产物为 500bp,UU (*Ureaplasma Urealyticum*)引物序列为:5' - CGAT-GAAAACCTCGCACACTAAGCG - 3', 5' - ATACGTCGGTCGTGAGGAATTTC - 3', 扩增产物为 225bp。

1.3 PCR 扩增反应

所有试剂均由美迪科生物技术有限公司提供。按如下加入各试剂确立 PCR 反应混合物:处理样品液 5μL,NG、CT、UU、PCR 缓冲液 10μL,双蒸水 34μL,TaqDNA 聚合酶 1μL,混均,加液体石蜡油 50μL,离心 5s,按 94℃ 45s,55℃ 45s,72℃ 45s 进行 40 次循环,反应后置 72℃ 5min。同时设 NG、CT、UU 阳性对照和阴性对照。

1.4 引物测试

在上述 PCR 反应体系中,引物为 NG、CT、UU,各 2μL,不加标本 DNA,以 NG、CT、UU 混合物为阳性对照。同样条件扩增。

* 北京市科学技术研究院支持项目(9711)

作者简介:陆应玉(1962-),男,安徽医科大学附属医院检验科检验师,主要从事临床分子免疫研究

收稿日期:1999-04-03,修回日期:1999-07-28

1.5 复合 PCR

在上述 PCR 反应体系中,除加入 NG、CT、UU 引物外,加处理好的待检标本上清液 5μL,同样条件扩增,以 NG、CT、UU 混合物为阳性对照。

1.6 扩增产物检测

配置 2% 含溴化乙锭琼脂糖凝胶,取 10μL 扩增产物与 5μL 电泳载样液混合后进行电泳 40min,紫外灯下观察结果。

2 结果

2.1 引物测试

三对引物混合后 PCR 扩增,未见特异 DNA 带,而阳性对照可见一条清晰的带,表明引物之间不会因互相干扰而出现假阳性。

2.2 复合 PCR 与常规 PCR 灵敏度比较

将单纯 NG、CT、UU 感染以及混合感染的标本用平衡稀释法同时做单一 PCR 和复合 PCR。结果表明,单纯 NG、CT、UU 阳性的标本其单一 PCR 和复合 PCR 的结果一致,混合感染的标本两法均能检测到同一稀释度。只是复合 PCR 在靶 DNA 含量较低时,其扩增产物在琼脂糖凝胶中的亮度弱于单一 PCR,但两法的检测在同一数量级内。

2.3 复合 PCR 与单一 PCR 的对比实验

随机抽取 40 例临床标本进行检测,其对比结果如下:9 例阳性标本用复合 PCR 检测结果与单一 PCR 检测结果均为阳性,单纯 NG、CT、UU 阳性标本两法的结果一致;混合感染标本共 11 例,复合 PCR 检出 10 例,其中一例用复合 PCR 检测 UU 为阴性,两法结果基本一致,其符合率为 97.5%。

2.4 临床标本符合 PCR 检测结果

扩增产物电泳有一条特异 DNA 带为单纯感染,可见有 2 或 3 条特异 DNA 带为混合感染。156 例 STD 受检者中有 58 例为一种病原体感染,男 48/116(41.37%),女 10/40(25%);19/98(19.38%)有混合感染,其中男 9/66(13.64%),女 10/32(31.25%),差异有显著性($X^2 = 4.82, P < 0.05$),NG + CT,NG + UU,CT + UU 和 NG + CT + UU 阳性例数分别为 10(6.41%)、4(2.36%)、3(1.92%)和 2(1.28%)。各病原体检出率见表 1。

表 1 同一反应体系中不同性别患者复合 PCR 检出率/%

性别	例数	NG		CT		UU	
		阳性数	阳性率	阳性数	阳性率	阳性数	阳性率
男	116	31	26.72	21	18.10	14	12.10
女	40	9	22.50	10	25.00	13	32.50
合计	156	40	24.61	31	19.87	27	17.31

UU 男;女 $X^2 = 8.675 \quad P < 0.01$

3 讨论

复合 PCR 是在单一 PCR 基础上改进和发展起来的新技术^[2,8],是在同一 PCR 体系中加入多对特异性引物,一次扩增多个 DNA 片段,实现多个基因型别或多种病原体的同时检出。单一 PCR 一次只能检测一种病原体或一个基因型别;基因分型或混合感染检测显得操作烦琐,费时且成本高;复合 PCR 可有效的解决上述问题,使得从事感染的诊断及基因分型变得简捷,减少漏诊。

复合 PCR 对引物的选择和设计比单一 PCR 更严格,必须充分考虑到多对引物之间的关系,即它们之间形成粘性末端或双链;同样也必须排除产物之间粘连的可能性;否则就会出现假阳性。另外在两法的结果有一例混合感染标本用复合 PCR 未能检出 UU,其原因可能为该标本中 UU 模板量很低或它与

NG、CT 模板量相差悬殊,扩增片段相差亦大有关。

由表 1 可知,应用 复合 PCR 对 156 例 STD 患者 NG、CT、UU 三种病原体进行检测,特别是混合感染状况的调查结果,与其他学者以常规单一 PCR 调查结果基本相似^[3-6]。表中三种病原体总检出率 20.51%,依次为 NG:24.61%,CT:19.87%,UU:17.31%。可见淋病在性病的构成中有重要地位,且 NG、CT 感染无性别差异,而 UU 感染女性(32.5%)明显高于男性(12.1%),这可能与女性,尤其是已婚女性生殖道解脲支原体感染率较高有关。本文 58/156 例有一种病原体感染,其中 19.83%有混合感染,且女性见多(31.25%)较男性有非常显著性的差异。各病原体混合感染率中 CT 最高 48.38%(15/31),NG 次之 40%(16/40),UU 最低 33.33%(9/27)。

可见任何一种性病均可促进其他性病的发生,故对性病高危人群同时作多项 STD 病原体的检查,对性病的防治有十分重要的意义,而复合 PCR 在降低检测成本和减少工作量的前提下,提高检验效率,有利于 PCR 检测项目的开展,同时也可以解决混合感染患者临床症状不明显、检出率低等问题。

参 考 文 献

- [1] 徐峰极.实用妇产科杂志,1998,4:118.
- [2] Van Den Brule, Meijer A J, Bakels C J, et al. J Clin Microbiol, 1990, 28:2739.
- [3] 伍欣星,赵先文,杨 平,等.中华实验和临床病毒学杂志,1995,9:151.
- [4] 马逸聪,张兴良,涂耀顺,等.中国皮肤性病杂志,1996,2:90.
- [5] 王 哲,韩卫国,李 宏,等.中国性病爱滋病防治,1995,1(1):45.
- [6] 孔繁荣,朱学峻,王雪红,等.中华流行病学杂志,1995,(4):27.
- [7] 范雪莉(摘).国外医学皮肤病学分册,1994,20:254.
- [8] 陈禹保,曾灵芳.微生物学通报,1996,6:238.
- [9] 陈禹保,曾灵芳.生物工程进展,1996,2:36.

DETECTION OF NEISSERIA GONORRHOEAE(NG), CHLAMYDIA TRACHOMATIS(CT) AND UREAPLASMA UREALYTICUM(UU) BY MULTIPLE PRIMER PCR

Lu Yingyu¹ Li Jingpei² Chen Yubao³

(1 Department of Microbiology Anhui Medical University, Hefei 200036)

(2 Department of Microbiology Anhui Medical University, Hefei 200036)

(3 Beijing MDC Biotech Co., Ltd. Beijing 10012)

Abstract: For the detection of *Neisseria gonorrhoeae*(NG), *Chlamydia trachomatis*(CT) and *Ureaplasma urealyticum*(UU) in urogenital infection in one specimen, multiple primer PCR was used in 156 sex transmitted disease patients, it was shown that in 156 specimens there were 40 NG positive and 31 CT positive and 27 UU positive, 10 NG + CT positive, 4 NG + UU positive, 3 CT + UU positive and 2 NG + CT + UU positive respectively. The results were in correspondence with each other. It is suggested that multiple primer PCR is a quick, sensitive, simple and specific technique which can be applied in clinical test.

Key words: *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, PCR