

三重聚合酶链反应检测 STD 病原体

朱 威 连 石 张维京

(首都医科大学宣武医院皮肤科 北京 100053)

摘要 本文对 100 例性罪错人员应用三重聚合酶链反应 (PCR) 一次扩增快速检测淋球菌、沙眼衣原体、解脲支原体混合感染, 三种病原体的检出率分别为 24%、38%、37%, 混合感染率为 22.22%, 提示在 STD 诊治中必须重视多种病原体混合感染。另外, 对三重 PCR 法与常规方法和经典 PCR 进行比较有良好的符合率, 显示其在临床检测方面的优势。

关键词 聚合酶链反应, 淋球菌, 衣原体, 支原体

分类号 R374

在性传播疾病 (Sexually Transmitted Diseases, STD) 中, 多种病原体混合感染的病例越来越多。有些病原体引起的泌尿生殖道感染的临床表现相似或不明显, 容易造成漏检和漏诊, 我们应用三重引物聚合酶链反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 一次扩增快速检出奈瑟氏淋球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*, NG)、沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*, CT)、解脲支原体 (*ureaplasma urealyticum*, UU) 混合感染, 现报告如下:

1 材料和方法

1.1 标本

北京地区收审的性罪错人员共 100 例, 其中男性 50 例、女性 50 例, 年龄 15—50 岁, 收审前二个月内性伴数为 2—10 个不等, 十天内未使用任何治疗 STD 的药物。男性由尿道取材, 女性由宫颈取材。

1.2 标准株来源

NG 株为男性尿道分离株、CT 株为 L₂ 型 CT 标准株, 两者均由卫生部中丹培训中心提供。UU 株为 UU1-14 型由首都儿科研究所提供。

1.3 寡核苷酸引物

根据引物合成原则和产物检测要求选取

1997-12-27 收稿

NG、CT、UU 保守区序列设计三对引物, 序列分别为: UU: 5-CGATGAAACTCGCACACTAGCG-3, 5-ATACGTCGGTCGTGAGGAATTTC-3; NG: 5-GCTACGCATACCCGCGTTGC-3, 5-CGAAGACCTTCGAGCAGACA-3; CT: 5-TATTTCTCTTGACCACAGCGA-3, 5-TACTCTCCCATTTCTCCACACA-3, 扩增片段大小分别为 UU225bp, NG390bp, CT500bp.

1.4 三重 PCR

试剂购自中国科学院北京科海医疗生物工程公司。在 PCR 反应体系中加入 NG、CT、UU 引物, 再加入待检标本 5 μ l, 置入美国 PE 公司 2400 型扩增仪中, 按 94 $^{\circ}$ C 45s, 55 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 45s 顺序扩增 35 个循环, 最后一次循环延伸 5min。以 NG、CT、UU 菌株 DNA 混合物为阳性对照, 正常人尿道、宫颈分泌物为阴性对照, 产物以 2% 琼脂糖凝胶电泳进行分析。

2 结果

2.1 三重 PCR 与常规方法对比

随机抽取 CT、UU 阳性标本各 20 例, NG 阳性标本 10 例, 分别与常规检测方法比较, CT 检测采用英国 Oxoid 公司的衣原体抗原快速酶免疫测定试剂盒, 结果显示两者符合率为 95% (19/20)。UU 检测采用法国生物-梅里埃公司的 Mycoplasma IST 试剂盒进行培养, 结果显示两者符合率为 100% (20/20)。NG 培养采用法国生物-梅里埃公司 Gonoline 培养基, 结果显示两者符合率为 100% (10/10)。

2.2 三重 PCR 与经典 PCR 对比

随机抽取 40 例检测标本, 分别进行三重 PCR 和经典 PCR 检测结果显示两者符合率为 100% (40/40)。

2.3 标本三重 PCR 结果

单一感染者只有一条特异性 DNA 带, 混合感染者可见二条或三条特异性扩增带。100 例研究对象混合感染 NG + CT、CT + UU、NG + UU、NG + CT + UU 阳性例数分别为 8、7、5、2。不同性别的研究对象三种病原体感染情况见表 1。

表1 不同性别研究对象的三重PCR检测阳性例数(%)

性别	检测例数	CT	UU	NG
男	50	16(32.0)	12(24.0)	9(18.0)
女	50	22(44.0)	25(50.0)	15(30.0)

经统计学处理男女三种病原体感染率无显著性差异 ($P > 0.05$)

3 讨论

本研究显示三种病原体的检出率依次为 CT38%、UU37%、NG24%。STD 的构成比中 CT、UU 感染率增长较快而 NG 感染率呈下降趋势, 这与目前国内外 STD 的流行态势相似^[1-2]。另外在女性组 UU 感染率高于 CT 感染率, 这与近期国内报道也相似^[3], UU 感染率增高有待进一步研究。还有 22 例为二重感染和三重感染, 混合感染率为 22.22%, 所以在 STD 诊治时对多种病原体混合感染必须给予足够的重视。

近年来 PCR 用于人类疾病的诊断已显示出广阔的前景, 特别是对一些不易培养或抗原性弱的病原体。多重 PCR 运用多对引物针对多个相对应的靶 DNA 进行 PCR, 其基本原理和方法同经典 PCR 一样, 不同之处在于一次 PCR 反应中加入多对引物对可根据需要选择 2 至 9 对, 由于不同引物与靶 DNA 都有高度特异性各靶目标不会有交叉反应^[4-5]。经典 PCR 一次只能检测一种病原体, 混合感染检测显得操作繁琐、费时, 成本较高, 多重 PCR 有效地解决了这些问题, 使混合感染的检测变得简便, 基本上不增加费用和工作量, 有效地减少了漏诊率, 提高了检验效率, 与常规培养法和免疫法比较也显示了良好的符合率。所以, 多重 PCR 是实验室诊断或病原学调查的一种有力手段, 值得进一步研究和探讨。

参 考 文 献

- [1] 徐红, 廖万清, 赵瑾. 中国皮肤性病学杂志, 1997, 11(2): 96~97.
- [2] Domeika M, Bassiri M, Mardh PA. J Clin Microbiol, 1994, 32(3): 2350~2352.
- [3] 程云英, 李明发, 周怀君等. 中华医学检验杂志, 1995, 18(3): 167~168.
- [4] Saiki PK, Scharf S, Faloona F et al. Science, 1985, 230(2): 1350~1351.
- [5] Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE et al. Nucleic Acids Res, 1988, 16(1): 1141~1143.