

聚合酶链反应检测人胃螺杆菌

陈 焯 王继德 徐智民 周殿元 杨海涛

摘要 人胃螺杆菌(*Hh*)是慢性胃炎的又一病原菌,体外尚不能培养。作者用对应于细菌 16S rRNA 的螺杆菌属特异引物和细菌通用引物配对,建立了一套 PCR 直接检测人胃粘膜活检标本中 *Hh* 的方法。12 例形态学检查证实为 *Hh* 感染者,11 例 PCR 结果阳性,而大肠杆菌、空肠弯曲菌、双歧杆菌等 8 种常见肠道菌均阴性;普通 PCR 灵敏度达 0.1ng DNA 水平,巢式 PCR 则可检测出 0.01ng DNA。

关键词 人胃螺杆菌 聚合酶链反应

Using Polymerase Chain Reaction to Detect *Helicobacter heilmannii* in Gastric Biopsy Materials Chen Ye, Wang Ji-de, Xu Zhi-ming, et al. PLA Institute for Digestive Diseases, Nanfang Hospital, The First Military Medical University, GuangZhou 510515

Abstract *Helicobacter heilmannii* is one of the species of *Helicobacter* other than *Helicobacter pylori* noticed in human gastric mucosa. In our study, a polymerase chain reaction (PCR) was designed for the detection of *Helicobacter heilmannii* in gastric biopsy specimens. Two broad-range bacterial 16S rDNA primers and one *Helicobacter* genus-specific 16S rDNA primer were matched for detecting *Helicobacter* genus bacteria. A *Hp*-specific primer pair was used simultaneously to exclude the presence of *Hp*. The PCR assay detected 11 out of 12 *Hh* strains which were confirmed by smears, but did not amplify DNA extracts from some other enteric bacteria such as *E. coli*, *C. jejuni*, *bifidobacteria*. Serial dilution experiments revealed the detection of as little as 0.1pg DNA by PCR and 0.01pg by nested PCR. Our data showed that PCR is a rapid, accurate and sensitive method for the detection of *Hh* and is thought valuable in the epidemiological investigation of *Helicobacter* and follow-up studies after treatment.

Key words *Helicobacter heilmannii* Polymerase chain reaction

人胃螺杆菌(*Helicobacter heilmannii*, *Hh*)是继幽门螺杆菌(*Hp*)后另一种慢性胃炎相关菌^[1,2],但其检出率低,体外尚不能稳定培养,目前诊断其感染主要依靠形态学方法如直接涂片或切片染色检查,主观性及随机性较大,使检测效率受到一定影响。聚合酶链反应(PCR)能够检测到标本中极微量的 DNA,各种特殊 PCR 方法的建立,更使其敏感性和特异性进一步提高。我们通过一条螺杆菌属特异引物和两条细菌通用引物配对行巢式 PCR,特异扩增螺杆菌属细菌——感染人胃粘膜的仅 *Hp* 和 *Hh*——的 16S rDNA 部分序列,同时利用一对 *Hp* 特异引物排

除 *Hp* 感染的可能,从而建立了一套 PCR 检测 *Hh* 的方法,并对其敏感性和特异性进行了评价。

材料和方法

一、研究对象:562 例因上消化道症状在本院作胃镜检查者,胃粘膜标本经直接涂片 Gram 染色及切片 Warthin-Srarry 银染,油镜下观察,*Hh* 为 Gram 阴性菌,菌体长约 3~10 μ m,有 4~8 个盘绕较紧的螺旋。根据其典型形态,筛检出 *Hh* 感染者 12 例,其中与 *Hp* 混合感染 2 例,该 12 例分别进行 PCR 和巢式 PCR 检测。

上述 12 例中 8 例经得乐 110mg、四环素 0.25g,每日四次,替硝唑 1g、雷尼替丁 150mg,每日一次联合治疗,10 天为一疗程,一月后复查胃

作者单位:第一军医大学南方医院全军消化内科研究所
广州 510515

本课题为国家自然科学基金资助项目

镜,所取胃粘膜组织分别用 *Helicobacter* 属特异引物和 *Hp* 特异引物行 PCR。

二、靶 DNA 提取:按常规法进行^[3]。

三、引物选择:扩增 *Helicobacter* 属的引物序列如下: H1: AGGCTATGACGGGTATCCGGCC TGAGA, H2; CCGTCAATTCATTTGAGTTT, H3: GTATTACCGCGGCTGCTG。分别对应于 *E. coli* 16S rRNA 的第 274~300、926~907、536~519 位碱基,其中 H1 为 *Helicobacter* 属特异引物,H2、H3 为细菌通用引物。H1~H2 扩增片断长 652bp,H1~H3 作为内引物行巢式 PCR 扩增片断长 262bp^[4,5];一对互补于细菌 16S rRNA 的 *Hp* 特异引物用来排除 *Hp* 的存在,扩增片断长 500bp^[6]。

四、PCR:反应体积 25 μl,引物浓度各为 0.4 mmol/L, dNTP 各 0.2 mmol/L, Mg²⁺ 2.0 mmol/L,模板 2 μl, Taq 酶 0.7 单位(Promega 公司产品)。在 DNA 扩增仪(Perkin Elmer 480)上先变性 7 分钟,冰浴中加 Taq 酶,接着进入循环:94℃ 变性 60 秒,52℃ 退火 60 秒,72℃ 延伸 90 秒,35 个循环后 72℃ 延伸 7 分钟。第一次扩增后产物(652bp)取 1 μl 作模板,用 1 对内引物行巢式 PCR,循环数减为 25 个循环。同样条件亦用于 *Hp* 特异引物来排除 *Hp* 感染。1.5% 琼脂糖凝胶电泳观察扩增结果。

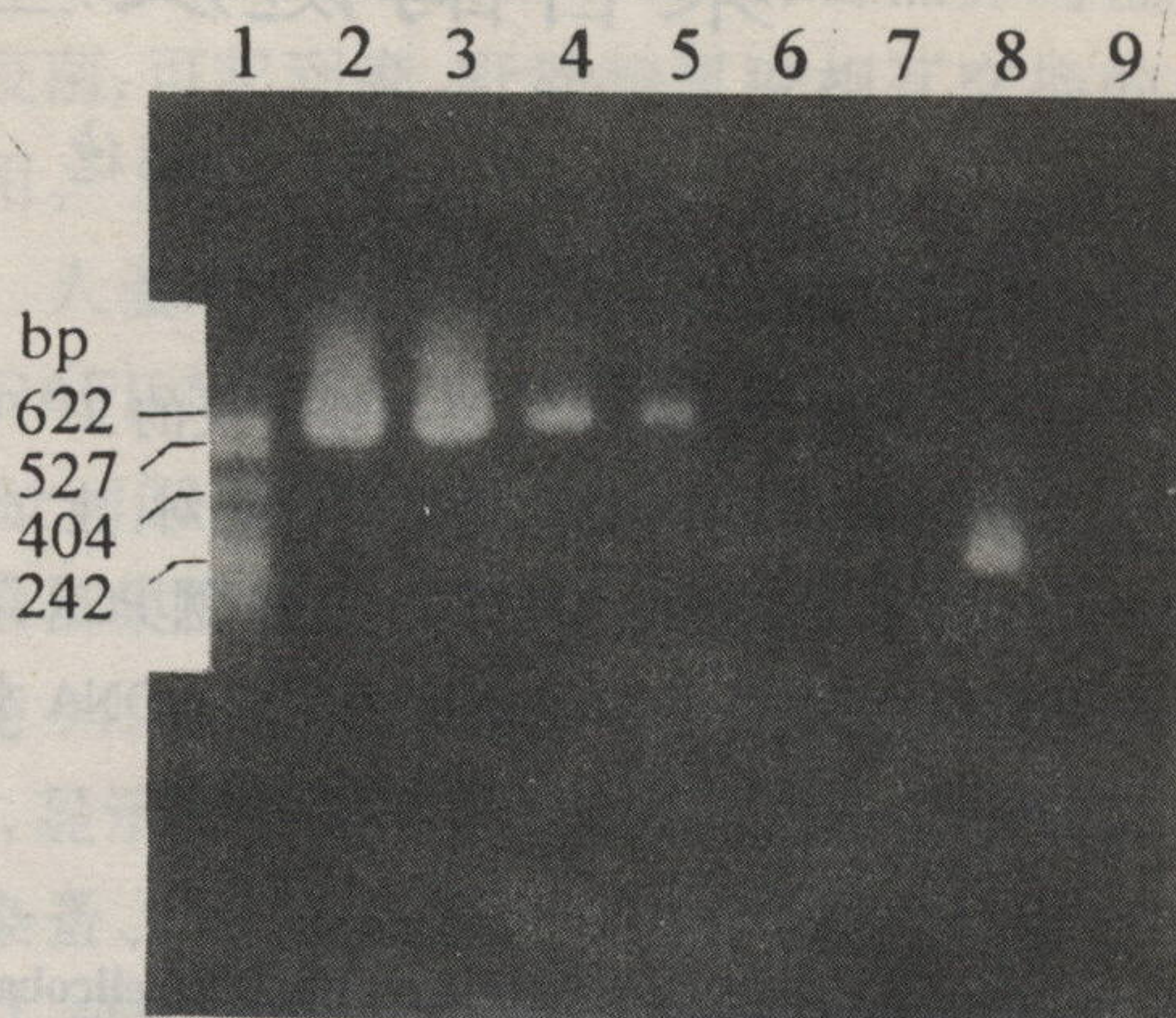
五、特异性和敏感性的评价:PCR 对同属于螺杆菌属的 *Hp* 标准株 NCTC11637, *H. felis* 标准株 ATCC49179, *H. mustelea* (由美国 Los Angeles Wadsworth 医学中心杨海涛教授赠)和以下 8 种肠道常见菌进行扩增:大肠杆菌、空肠弯曲菌、拟杆菌、乳杆菌、双歧杆菌、葡萄球菌、链球菌、消化球菌(均由我所微生态实验室分离培养获得)。

对 *Hp* 标准株的 DNA 进行吸光度测定和定量,倍比稀释后浓度从 0.05ng~0.01pg/ml,对每个浓度各行巢式 PCR 2 次。

结 果

一、PCR 敏感性和特异性鉴定:PCR 及巢式 PCR 扩增 *Hp*、*H. felis*、*H. mustelea* 阳性,而 8 种肠道菌均阴性;在敏感性鉴定中普通 PCR 可检

测出 0.1 pg DNA,巢式 PCR 灵敏度则可达 0.01pg DNA(相当于 10 个细菌)水平(附图)。



附图 PCR 灵敏度测定(1.5% 琼脂糖凝胶电泳)

1. PBR322/Msp1 DNA Marker; 2~6. DNA 浓度分别为 500、50、5、0.5、0.1、0.01pg/μl,片断长 652bp;7. 双蒸水对照;8. 巢式 PCR, DNA 浓度为 0.01pg/μl,片断为 262bp;9. 巢式 PCR, 双蒸水对照

二、12 例标本检测结果:11 例巢式 PCR 结果阳性,其中 6 例第一次扩增即显示 652bp 条带,第二次扩增后 262bp 条带更明显,1 例始终阴性。

三、治疗前后检测结果比较:见附表。

附表 治疗前后 *Hh*、*Hp* 检测结果比较

	尿素酶 试验	涂片 染色	切片 银染	巢式 PCR (P1 + P2)	PCR
治疗前阳性数	6	8	4	7	0
治疗后阳性数	1	0	0	2	1

讨 论

Hh 于 1987 年由 Dent^[1]首次报道发现,起初归入螺旋菌属,后经 16S rRNA 基因序列测定及同源性比较,证明该菌同 *Hp* 一样同为螺杆菌属细菌^[7],但其感染率远低于 *Hp*,主要引起患者轻至中度慢性胃炎,欧美等国内镜检出率为 0.20%~0.95%^[1,2],国内达 2% 以上。由于体外培养尚未成功,现有检测手段较少,限制了对该菌更深入的了解。

尽管 PCR 技术已广泛应用于多种细菌的鉴定,但对 *Hh* 的检测几无报道。主要由于 *Hh* 的已知基因序列十分有限,为引物设计带来了困难。Solnick^[7]曾运用细菌 16S rRNA 通用引物扩

增两例 *Hh* 并对其序列进行分析,从而得以将 *Hh* 正式归入螺杆菌属,但其必须将感染 *Hh* 的人胃粘膜接种于 SPF 小鼠以大量增菌,通过获得高产量的 *Hh* DNA 模板来保证 PCR 的特异性。我们选择一条对应于细菌 16S rRNA 的螺杆菌属特异引物与细菌通用引物配对,直接对人胃粘膜标本进行检测,在排除了 *Hp* 感染的情况下,对 *Hh* 具有很高的特异性,而采用巢式引物,在第一次扩增得到 652bp 产物的前提下,用内引物行第二次扩增,可以得到一个更加特异的 262bp 产物,敏感性进一步提高,由检测出 0.1pgDNA 上升到可测出 0.01pgDNA(相当于 10 个细菌)水平。

12 例治疗前经形态学方法诊断为 *Hh* 感染者中,有一例巢式 PCR 阴性,分析原因可能是由于 *Hh* 多散在分布或是局灶性定植,涂片或切片所用与 DNA 提取所用并非同一块活检标本所致,亦可能由于感染菌量过少,在 DNA 提取过程中丢失。

对 *Hh* 的清除似乎并不象清除 *Hp* 那样困难,国外 Heilman 和国内杨海涛用铋剂治疗,4 周后 *Hh* 即消失。我们对 8 例感染者采用铋剂 + 抗生素四联疗法,1 个月后 6 例 *Hh* 消失,1 例 *Hh* 仍存留,1 例继发 *Hp* 感染,PCR 可以精确反映上述变化,而形态学方法则不能。

在缺乏 *Hh* 特异引物的情况下,运用螺杆菌

属特异引物扩增 *Hh* 尚难成为临床检测的常规手段;但 PCR 灵敏度极高,短期内呈指数增加的拷贝数为分子克隆、直接测序等进一步检测提供了可能,从而有望成为 *Hh* 流行病学调查、分子遗传学研究以及治疗后随访中非常理想的应用工具。

参 考 文 献

- 1 Dent JC, McNalty CAM, Uff JC, et al. Spiral organisms in the gastric antrum. *Lancet*, 1987, 2:96.
- 2 Heilmann KL, Borchard F. Gastritis due to spiral shaped bacterial other than *Helicobacter pylori*: clinical, histological, and ultrastructural findings. *Gut*, 1991, 32:137.
- 3 姜 泊,张亚历,周殿元.分子生物学常用实验方法.北京:人民军医出版社,1995,107.
- 4 Fox JG, Paster BJ, Dewhirst FE, et al. *Helicobacter* isolation from feces of ferrets: evidence to support fecal-oral transmission of gastric *Helicobacter*. *Infect Immun*, 1992, 60:606.
- 5 Paster BJ, Dewhirst FE. Phylogeny of *Compylobacters*, *Wolinellas*, *Bacteroides gracilis*, and *bacteroides ureolyticus* by 16S ribosomal ribonucleic acid sequencing. *Int J Syst Bacteriol*, 1988, 38(1):56.
- 6 Hoshina S, Kahn SM, Jiang W. Direct detection and amplification of *Helicobacter pylori* ribosomal 16S gene segments from gastric endoscopic biopsies. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1990, 13:473.
- 7 Solnick JV, O'Rourke J, Lee A. An uncultured gastric spiral organism is a newly identified *Helicobacter* in humans. *J Infect Dis*, 1993, 168:379.

(收稿:1997-01-07 修回:1997-04-24)

一起青年学生麻疹暴发的调查分析

张 芹 龙东洋

南充农业学校 1996 年 10 月 28 日~12 月 6 日发生一起麻疹暴发。10 月 28 日首发病例因发热、头痛、流涕、咳嗽被个体医生初诊为上呼吸道感染,治疗后病情并无好转,至 7 天后出现典型皮疹校医务室才诊断为麻疹。11 月 17 日,护理他的同学以相同前驱症状发病,18~25 日发病数最高,26 日发病逐渐减少,至 12 月 6 日消失。患者总数 31 例,罹患率为 1.48%,男生 23 例,女生

8 例,男、女之比 3:1。年龄 16~21 岁,发病散布于 3 个年级 21 个班。引起疫情暴发的原因:①首发病例的误诊,造成隔离不及时;②冬季是麻疹好发时期,学生宿舍拥挤,通风不良,不能做到病人单室隔离;③95% 以上学生来自农村,均出生于 70 年代末 80 年代初,由于当时疫苗冷藏保管条件差,加之接种技术不当,使疫苗效价降低,造成免疫成功率低或无效接种;④随着年龄增大,免疫力逐步衰减,又未及时得到加强免疫,造成大年龄组易感人群积累。

作者单位:四川省南充市卫生防疫站 637000

(收稿:1997-05-16)