

· 技术方法 ·

太原地区妇女儿童淋球菌感染调查及
基因快速诊断

李连青 朱庆义 贺润花 刘建萍 赵瑞珍

摘要 改进并建立快速检测淋球菌基因(NG-DNA)的聚合酶链反应(PCR),同时用涂片染色筛查和培养法作鉴定比较,对太原地区1986~1995年妇女儿童淋球菌感染状况作调查分析,对9204例妇女儿童生殖道感染者作直接涂片染色检菌,阳性率为26.5%,其中1220例同时用培养与PCR法检测,阳性率为12.4%和21.0%。用PCR直接检测临床标本NG-DNA,具有简便、快速、敏感、特异之优点。

关键词 聚合酶链反应 快速诊断 淋病

Using Polymerase Chain Reaction for the Detection of Gonorrhoea in Women and Children in Taiyuan

Li Lian-qing, Zhu Qing-yi, He Run-hua, et al. Department of Molecular Microbiology, Shanxi Maternal and Children's Hospital, Taiyuan 030013

Abstract A polymerase chain reaction (PCR) method was established for the detection of gonococcal gene in samples obtained from women and children with lower genital tract infection. The primers were used for PCR amplification derived from sequence for DNA representing part of the open reading frame (ORF) for the chromosome of *N. gonorrhoea*. In this study, a total number of 9204 specimens were obtained from women and children with lower genital tract infection from 1986 to 1995 in Taiyuan. The positive rate of *N. gonorrhoea* for Gram's stain of smears was 26.5% while the rates for culture and PCR were 12.4% and 21.0%, respectively. The results showed that PCR test was simple, rapid sensitive and specific for the detection of gonococcal gene in clinical specimens.

Key words Polymerase chain reaction Rapid diagnosis Gonorrhoea

淋病奈瑟菌(*N. gonorrhoeae*, NG)(简称淋球菌)是性病的重要病原体^[1]。近年来淋病在我国蔓延呈增高趋势,对妇女儿童的健康危害极大。对淋病的诊断通常取分泌物作直接涂片检菌和分离培养。前者虽简便、快速,但缺乏特异性,不能完全作为病原学诊断的依据。分离培养技术要求严格、费时,并要求有活菌存在,作为临床常规病原学诊断有难处。聚合酶链反应(PCR)是近年来发展的一种基因诊断技术,具有简便、快速、敏感、特异之优点^[2,3]。为了建立一种适合临床实际应用的NG-PCR检测法,我们对其作了实验研究与改进,并对太原地区妇女儿童淋球菌

感染状况作了调查分析,报告如下。

材料与方法

一、临床资料:1986年1月~1995年12月,对在山西省妇幼保健院、儿童医院就诊的9204例妇女儿童生殖道感染者作了淋病筛查,其中14岁以下儿童1547例,14岁以上成人7657例,均为女性。标本采集用灭菌拭子取阴道分泌物于1ml无菌盐水管中,立即送检作病原学检测。

二、试验菌株:(1)标准菌株:2株淋病奈瑟菌;脑膜炎奈瑟菌、肺炎链球菌、乙型链球菌、金黄色葡萄球菌、卡他球菌、肠道病原菌(福氏痢疾杆菌、鼠伤寒沙门菌、莫根变形杆菌、大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌)各1株,由中

国医学菌种保藏中心提供。(2)本院分离的淋球菌 35 株。

三、引物设计和合成:本引物是根据淋球菌染色体基因组中特异的 ORF-1 序列自行设计的。两条引物(NG-1 和 NG-2)分别为 21 和 20 个核苷酸,扩增产物为 397bp,由中国科学院微生物研究所协助合成,引物序列如下。

NG-1, 5'-TTCGCCCAAGTGCGTT AAGGC-3'
NG-2, 5'-CGAGGCATTGAAGCAA AGCG-3'

四、DNA 模板提取:将阴道分泌物在盐水中混悬、离心,留取沉淀物 100μl,加 2×PCR 裂解液 100μl,60℃ 水浴 30 分钟,97℃ 10 分钟,离心沉淀,取上清液作 PCR 试验。

五、PCR 程序:于 0.5ml Eppenderf's 管中加 PCR 反应混合液 5μl(含引物各 5μmol/L 1μl, 4×dNTP 各 2mmol/L 1μl, TaqDNA 酶 1U 1μl, 2×PCR 2μl),待检标本 DNA 提取液 20μl,上盖液体石蜡 50μl,置扩增仪中(MJ.PTC-100 型)。94℃ 预变性 2 分钟进入循环,94℃ 1 分钟、58℃ 1 分钟、

72℃ 1 分钟,共 30 周期,再经 72℃ 延伸 5 分钟。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳、EB 染色、紫外检测仪观察,阳性者可见一条 397bp 扩增区带,照像记录。

六、涂片和培养:按本室常规方法操作。

结 果

一、特异性试验:2 株标准淋球菌和 35 株临床病人分离的淋球菌 PCR 均为阳性,10 株非淋球菌菌株(脑膜炎奈瑟菌、卡他球菌、肺炎链球菌、乙型链球菌、金黄色葡萄球菌、福氏痢疾杆菌、鼠伤寒沙门菌、摩根变形杆菌、大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌)均为阴性。结果表明,本引物只能扩增淋球菌,对其他奈瑟菌等均无扩增作用,说明本试验具有高度特异性。

二、敏感性试验:将标准淋球菌株培养物制成 2×10⁸/ml 细菌悬液,按表 1 稀释成不同浓度,然后与等量正常妇女阴道分泌物盐水悬液混合,用直接裂解法提取 DNA,作 PCR 模拟试验(生理盐水作对照),结果见表 1。证明本试验敏感性可检出阴道分泌物中 10 个淋球菌中 DNA 含量。

表 1 模拟试验结果

试验菌株	细 菌 浓 度									
	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁻¹	0
淋球菌 + 生理盐水	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
淋球菌 + 阴道分泌物	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

三、临床标本检测结果:
1. 9 204 例妇女儿童生殖道感染者阴道分泌物标本作直接涂片染色检菌筛查,在细胞内检出 G⁻ 双球菌 1 031 例,阳性率 11.2%;在细胞外检出 G⁻ 双球菌 1 404 例,阳性率 15.3%,涂片染色检菌总阳性率为 26.5%,其中 2 101 例作了培养,淋球菌阳性 261 例,阳性率 12.4%,1 220 例作了 PCR 试验,NG-DNA 阳性 256 例,阳性率 21.0%。
2. 3 种淋球菌检测方法结果比

较:1 220 例妇女儿童生殖道感染者直接涂片检菌,细胞内阳性 138 例(11.3%),细胞外阳性 187 例(15.3%),培养阳性 152 例(12.4%),PCR 阳性 256 例(21.0%)。见表 2。三种方法比较以培养法阳性最为直接可靠,特异性强,但敏感性低,直接涂片检菌细胞内阳性者与 PCR 法基本一致,具有良好的敏感性和特异性,细胞外阳性者特异性较差,假阳性较多,需用 PCR 作进一步鉴定,以便为临床提供早期、准确的病原学诊断。

表 2 1220 例病人 3 种淋球菌检测方法结果比较

方法	PCR		阳性率 (%)	敏感性 (%)	特异性 (%)	准确性 (%)	假阳性 (%)	假阴性 (%)
	+	-						
培养	+	150	2	12.4	58.6	99.8	99.8	0.2
	-	106	962					
涂片 (细胞内)	+	136	2	11.3	99.3	99.6	99.7	0.6
	-	1	453					
涂片 (细胞外)	+	115	72	15.3	96.6	85.8	88.4	14.2
	-	4	437					

3. 淋球菌感染的年龄分布:9 204 例妇女儿童生殖道感染病例中 14 岁以下儿童淋球菌阳性者 1 078 例,阳性率 11.7%,其中 3 岁以下婴幼儿 257 例(2.8%),3~7 岁小儿 627 例(6.8%),7~14 岁 195 例(2.1%),14 岁以上成年妇女 1 356 例(14.7%)。说明本地区妇女和儿童淋球菌感染的普遍性和严重性。

讨 论

淋病是当今世界上最为常见的一种性传播疾病(STD)^[4]。据美国疾病控制中心 1989 年公布淋病患者达 68.9 万^[5]。我国卫生部 1988 年传染病疫情通报淋病患者 100 224 例^[6],并呈逐年上升趋势,女性患者比例较高,儿童患病率增加。笔者自 1986~1995 年在山西省妇幼保健院、儿童医院对就诊的 9 204 例妇女儿童生殖道感染者,经直接涂片染色筛查和培养、PCR 鉴定,淋球菌阳性者 2 435 例,阳性率达 26.5%,其中 14 岁以下儿童 1 078 例,占 11.7%。可见太原地区妇女和儿童淋球菌感染的普遍性和严重性。孕产妇感染淋病可引起母婴传播,导致分娩异常、异位妊娠、羊膜早破、低出生体重儿和新生儿淋菌性结膜炎等^[7,8],对妇女儿童的健康危害极大。小儿淋病多数与家庭成员淋球菌感染密切相关。亦有一部分患儿是由于不良的公共卫生设施,如公共浴池、游泳池、幼儿园中的公用便盆等不洁物品污染所致,是值得重视的一个社会问题。

关于淋病的病原学诊断以培养法阳性最为直接可靠,而且分离株可进一步作药敏试

验,了解耐药菌株的分布状况,对指导临床用药十分重要,但培养法条件要求严格,要有活菌存在,即使在严格条件下立即送检,阳性率也只能达 85%~95%,而造成敏感性偏低的误差^[9]。直接涂片法简便、快速,但缺乏特异性,唯细胞内阳性者与 PCR 法基本一致,可成为病原学诊断的依据。细胞外阳性者需用 PCR 作进一步鉴定^[10]。笔者对 PCR 试验方法作了改进,用直接裂解法提取临床标本中 DNA 模板,自行设计和合成的寡核苷酸引物只能扩增淋球菌 DNA,对其他奈瑟菌不扩增,其敏感性可检出标本中 10 个淋菌细胞的 DNA 含量,具有良好的敏感性和特异性,在临床实际应用中作为早期病原学诊断提供了一种简便、快速的试验方法。

参 考 文 献

- 1 Vlasploder F, Mutsears JAEM, Blog F, et al. Value of a DNA probe assay (Gen - probe) compared with that of culture for diagnosis of gonococcal infection. J Clin Microbiol, 1993, 31:107.
- 2 Birkenmeyer L, Armstrong AS. Preriminary evaluation of the ligase chain reactrion for specific detection of Neisseria gonorrhoea. J Clin Microbiol, 1992, 30:3098.
- 3 Parke ES, Yang LI, Leist PA, et al. Comparision of Gen - probe DNA probe test and culture for detection of Neisseria gonorrhoea in endocervical specimens. J Clin Microbiol, 1991, 29:883.
- 4 Anomymous. Annual report infection diseases. NTVG, 1991, 135:400.
- 5 Lewis IS. DNA probe confirmatory test for Neisseria gonorrhoea. J Clin Microbiol, 1990, 28:2349.
- 6 林秀珍. 卫生部通报 1989 年传染病疫情. 健康报, 1990, 4:16.
- 7 Edwards LE, Barrada MI, Hamann AA, et al. Gonorrhoea

- in pregnancy. Am J Obstet Gynecol, 1978, 132:637.
- 8 Elliott B, Brunham RC, Laga M, et al. Maternal gonococcal infection as a preventable risk factor for low birth weight. J infect Dis, 1990, 161:531.
- 9 Dillon JR, Carballo M, Pauze M. Evaluation of eight methods for identification of pathogenic meisseria species: Neisseria-kwik, RIM-N, Gonobio-test Minitex, Gonocheck II, GonoGen, phadebact monoclonal GC

OMNI test, and Syva Micro Trak test. J Clin Microbiol, 1988, 26:493.

- 10 Hillier SL, Krohn MA, Nugent RP, et al. Characteristics of three vaginal flora patterns assessed by Gram stain among pregnant women. Am J Obstet Gynecol, 1992, 166:938.

(收稿:1996-07-20 修回:1996-08-24)

重庆地区不同人群妇女加德纳菌感染情况的调查

魏永中* 张国威 何云志 王志安

阴道加德纳菌(GV)目前被认为是细菌性阴道病的主要病原体,感染率高,并可经性传播,且与早产、妇产科手术后感染、子宫颈癌等密切相关。为了解不同人群妇女 GV 感染情况,对 272 名妇女进行了 GV 感染的初步调查。调查对象为新收容的性罪错妇女 76 名、STD 门诊患者 63 例、妇科门诊患者 61 例、产科门诊孕妇 38 名、健康体检妇女(均系已婚)34 名,年龄 17~46 岁,平均 24.6 岁。结果共 52

例检出 GV。阳性率:STD 患者 30.2%,性罪错妇女 26.3%,妇科门诊患者 11.5%,孕妇 7.9%,体检妇女 8.8%,总阳性率 19.1%。研究表明:STD 患者及性罪错妇女 GV 阳性率显著高于其他 3 组人群($P < 0.05$),而妇科门诊患者与孕妇受检者及体检妇女无显著性差异($P > 0.05$)。多性伴者 GV 分离率显著高于单一性伴者($P < 0.05$),由于条件所限,未能对无性经历女性和老年女性进行调查,但仍提示 GV 是一种性传播病原体。由于 GV 与妇产科多种并发症相关,因此,对 GV 所致感染及时诊断和治疗是必要的。

(收稿:1996-10-16 修回:1996-11-26)

作者单位:第三军医大学新桥医院皮肤科 重庆

630037

* 现工作单位:解放军第三二四医院皮肤科 (重庆 630020)

乙型肝炎病毒抗原成分在其相关性肾炎中的分布

赵战云 颜炳丽 王建英 牟美玲

乙型肝炎病毒(HBV)可引起相关性肾炎(HBVGN),发病机理不明。我们于 1992~1995 年对住院的 HBVGN 患者用酶联免疫吸附法检测血清 HBsAg、HBeAg 及抗-HBc,用酶标法检测肾组织切片 HBsAg、HBeAg 及 HBcAg,以探讨不同 HBV 抗原成分在肾脏的分布。

一、结果:共收治 31 例 HBVGN 患者,男 18 例,女 13 例,平均年龄 40.5 岁,其血清 HBsAg、HBeAg、抗-HBc 阳性率分别为 100.0%、74.2% 及 77.4%。肾组织标本的 HBsAg、HBeAg 及 HBcAg 阳性率分别为 93.6%、6.4% 及 58%。肾组织 HBeAg 阳性率明

显低于血清($P < 0.01$),而 HBsAg 与 HBcAg 则无明显差异($P > 0.05$)。肾组织标本中,13 例仅 HBsAg 阳性,14 例仅 HBsAg 及 HBcAg 阳性,22 例(70.9%)病理改变为膜性肾病。

二、讨论:HBV 主要有 3 种颗粒成分(HBsAg、HBeAg 及 HBcAg),它们在肾组织中的分布情况报道较少。我们的研究表明,HBsAg 及 HBcAg 在患者肾组织中分布较多,表明,HBsAg 及 HBcAg 在 HBVGN 的发病中起主要作用,究其原因,可能为这两种颗粒直径大于肾小球滤过膜基底膜层滤过孔的直径,可被基底膜截留而诱发自身免疫反应,而 HBeAg 为可溶性抗原,不会被截留。

(收稿:1996-10-28 修回:1996-12-10)

作者单位:山东省潍坊市人民医院 261041