

· 实验研究 ·

实时荧光定量 PCR 检测汉赛巴通体

张晶波 温博海 陈梅玲 李丽莉 邱玲 牛东升

【摘要】 目的 采用新型 TaqMan-MGB 探针建立检测汉赛巴通体的实时荧光定量 PCR 方法。**方法** 根据汉赛巴通体特异的 16S~23S rRNA 间隔区序列设计引物和探针,以克隆的 16S~23S rRNA 间隔区基因片段作 DNA 模板,在荧光定量 PCR 检测仪(ABI 7900HT)上建立实时荧光定量检测方法,对所建立的方法分别进行敏感性、特异性及重复性分析,并且对模拟标本进行检测。**结果** 建立的定量标准曲线的循环阈值(C_t)与模板拷贝数呈良好的线性关系($r=0.997$);与普通 PCR 相比较,荧光定量 PCR 检测的灵敏度是其 1000 倍。用荧光定量 PCR 检测其他相关立克次体和细菌 DNA 样本,除军团菌检出微弱信号(2 个拷贝)外,其余检出结果均为 0;对重复性进行了评价,批内和批间的变异系数在 0.2%~1.9% 之间。用荧光定量 PCR 检测汉赛巴通体感染的小鼠血标本,在感染后第 2 天、第 3 天、第 5 天,检出少量的汉赛巴通体,在感染后的第 1 天和第 2 天从脾脏样本中检出大量的汉赛巴通体。**结论** 检测汉赛巴通体实时荧光定量 PCR 方法具有高度特异性和高敏感性以及良好的重复性,可用于快速检测各种样本中的微量汉赛巴通体以及作为汉赛巴通体感染的实验室诊断。

【关键词】 汉赛巴通体;巴通体感染;实时定量 PCR

Development of a quantitative real-time polymerase chain reaction for detecting *Bartonella henselae*
ZHANG Jing-bo*, WEN Bo-hai, CHEN Mei-ling, LI Li-li, QIU Ling, NIU Dong-sheng. *Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China
Corresponding author: WEN Bo-hai, Email: bohaiwen@sohu.com

【Abstract】 Objective To develop a quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) for detecting *Bartonella henselae*. **Methods** According to the 16S-23S rRNA intervening sequences (IVS) specific for *B. henselae*, one pair of primers and one TaqMan-MGB probe were designed. A quantitative real-time PCR was developed with the primers, the probe, and the IVS, a standard template, in DNA sequence detection system (ABI 7900HT). **Results** The standard curve was established with the standard template and the relationship between the value of threshold cycle (C_t) and the DNA copy number was linear ($r=0.997$). The sensitivity of this quantitative real-time PCR was about 1000 times higher than that of a common PCR used to detect homologous DNA. By this quantitative real-time PCR, the DNA sample of *B. henselae* was positively detected but not from other rickettsial or bacterial DNA samples. The variation coefficients of intra- and inter-assay reproducibility were 0.2%-1.9%. Using the real-time quantitative PCR to detect samples from mice that were experimentally infected with *B. henselae*, the small amount of *B. henselae* DNA was detected in blood samples on days 2, 3, and 5 and large amount of *B. henselae* DNA was detected in spleen samples on days 1 and 2 after infection. **Conclusion** Results from our study suggested that this quantitative real-time PCR was highly specific, sensitive and with good repeatability for detection of *B. henselae*. It seemed quite useful for rapid detection of tiny DNA of *B. henselae* in various samples and laboratory diagnosis of bartonellosis caused by *B. henselae*.

【Key words】 *Bartonella henselae*; Bartonellosis; Real-time quantitative PCR

汉赛巴通体 (*Bartonella henselae*) 是 1990 年从美国 HIV 感染者的血液中首次分离到的一种新病

原体。经过十多年的研究,发现该病原体是一种呈世界性分布的重要人兽共患病原体,该病原体可以引起急性发热、淋巴肿大,长期感染可以引起心内膜炎、骨髓炎、肉芽肿性肝炎、肾小球肾炎、脑膜炎等^[1]。我国虽然没有实验室确诊的巴通体感染病例报告,但是近年从我国云南省的蜱和动物样本中已分离到伊丽莎白巴通体,证明我国有巴通体的存在,同时提示我国可能有人巴通体感染的存在。由于巴通体生长缓

基金项目:国家科技攻关资助项目(2003BA712A04-07)

作者单位:100071 北京,军事医学科学院微生物流行病学研究所病原微生物安全国家重点实验室(张晶波、温博海、陈梅玲、李丽莉、邱玲、牛东升)

第一作者现工作单位:100029 北京市西城区疾病预防控制中心

通讯作者:温博海, Email: bohaiwen@sohu.com

慢,使得巴通体感染的实验室病原体的分离鉴定很困难。因此,有必要建立敏感、有效的检测方法对我国临床可疑巴通体感染的样本进行确认。

目前,巴通体感染的实验室快速检测方法主要是 PCR 方法。依据巴通体的 16S rRNA、16S~23S rRNA 基因间隔区序列、*htrA*、*rpoB* 基因序列等^[2-5],建立了多种检测巴通体的 PCR 方法。但 PCR 检测的假阳性和假阴性等缺点限制了它在临床上的推广应用。实时荧光定量 PCR 是一种快速检测病原体的高特异和高敏感技术,国外已报道采用 SYBR 技术^[6]建立了检测巴通体的定量 PCR 方法。我们基于巴通体 16S~23S rRNA 基因间序列,采用最新的 TaqMan-MGB 探针^[7]技术建立了检测汉赛巴通体的实时定量 PCR 方法。

材料与方 法

1. 菌株和 DNA: 贝氏柯克斯体(新桥株)、普氏立克次体(E 株)、立氏立克次体(R 株)、恙虫病东方体(Gilliam 株)、汉赛巴通体(Houston-1)、查非埃立克体 DNA 为本室保存,人粒细胞埃立克体抗原为本所流行病研究室赠送,五日热巴通体 DNA 为美国加州大学惠赠。出血性大肠埃希菌(O157:H7 EDL933)、福氏 2a 志贺菌(301)、金黄色葡萄球菌(26066)、肺炎链球菌(31004)、嗜肺军团菌(12 型)、炭疽杆菌(A16R)、鼠疫杆菌(EV76)、猪型布鲁氏菌(104M)、伯氏疏螺旋体(太一株)、鹦鹉热衣原体(AR39)等来自本所或中国疾病预防控制中心传染病预防控制所。

2. 实验动物: 6~8 周龄的雄性 BALB/c 小鼠,由军事医学科学院实验动物中心提供。

3. 主要试剂: DNA 回收试剂盒购自上海生工生物工程公司; T 载体试剂盒购自 Promega 公司; 质粒提取试剂盒、血 DNA 提取试剂盒和脏器 DNA 提取试剂盒购自德国 Qiagen 公司; 荧光定量 PCR 检测专用 96 孔板和盖膜以及 TaqMan Universal PCR Master Mix 由美国 ABI 公司生产。TaqMan-MGB 探针由上海基康公司合成,引物由上海生工生物工程公司合成。

4. 仪器: PE2400 DNA 热循环仪(美国 PE 公司), Beckman Du 640 核酸定量仪, ABI 7900HT 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。基因测序均由上海华诺公司完成。

5. 汉赛巴通体(Houston-1, ATCC 49882T)的培

养: 采用含有 5% 新鲜脱纤维兔血的脑心浸液培养基(DIFCO 公司),在 5% CO₂ 孵箱中培养 10 d 左右复苏了汉赛巴通体。用 Gimenez 染色和 Giemsa 染色对汉赛巴通体进行染色镜检^[8],经巴通体通用引物鉴定后,收集菌落提取 DNA 备用。

6. 定量 PCR 探针和引物的设计: 依据巴通体的 16S~23S rRNA 基因间序列的比较,选择汉赛巴通体种特异性序列,使用 ABI Primer Express 2.0 software 设计并合成荧光定量 PCR 的引物和 TaqMan-MGB 探针。引物为 FP-63(5'-cca ccg tgg gct ttg aaa-3')和 RP-125(5'-ggg cat cct ctt ata aaa cgc tta-3'), TaqMan-MGB 探针为 probe-83(5'-cgc ttt cct tga taa aa-3')。引物扩增的目的片段长度为 63 bp(5'-cca ccg tgg gct ttg aaa aac gct ttc ctt gat aaa att taa gcg ttt tat aag agg atg ccc-3')。

7. 标准 DNA 制备: 依据参考文献[9]中巴通体的 16S~23S rRNA 基因间区序列,设计并合成 PCR 引物 B1(5'-tct tcg ttt ctc ttt ctt ca-3')和 B2(5'-aac caa ctg agc tac aag cc-3'),扩增产物大小为 172 bp。扩增条件: 95℃ 预变性 2 min; 95℃ 1 min, 60℃ 1 min, 72℃ 30 s, 循环 30 次; 72℃ 延伸 5 min。将扩增产物连接到 T 载体上,构建重组质粒。对重组质粒中的汉赛巴通体 DNA 片段测序,确定序列无误后用试剂盒提取重组质粒。将提取的质粒进行 DNA 定量,定量结果为 73.38 μg/ml,计算模板的拷贝数为 2.2 × 10¹⁰ 个/μl。系列稀释质粒至 5 拷贝/μl,将稀释质粒作为本次实验绝对定量的标准 DNA。

8. 荧光定量 PCR 反应体系: 采用 25 μl 反应体积,每个反应中含 12.5 μl 通用 PCR 反应混合物(TaqMan Universal PCR Master Mix); 5 μl 引物和探针混合物[100 μl 混合物中含引物 FP 和 RP 各 3 μl (50 μmol/L), 探针 2 μl (50 μmol/L), 去离子水 92 μl], 5.5 μl 去离子水, 2 μl DNA 模板。反应条件为 50℃ 2 min 和 95℃ 10 min 后,用 95℃ 15 s 和 60℃ 1 min 循环 45 次。

9. 动物感染^[10]: ①用接种环刮取培养基上的汉赛巴通体菌落放入 Eppendorf 管,离心后,用 PBS 重悬后,分装冻存。取冻存菌液用肉汤进行 10⁻²~10⁻⁷ 的系列稀释,涂板后培养,待长出菌落后计数克隆形成单位(CFU); 经过计数,原液浓度为 8 × 10⁸ CFU/ml。②21 只 BALB/c 小鼠(6~8 周龄,雌性),每只小鼠用 1.2 × 10⁷ CFU/ml 菌液经腹腔感染。在感染后每天活杀 3 只小鼠,取其血液和脾脏;用试剂

盒从血液和脾脏样本中提取 DNA,用实时荧光定量 PCR 检测 DNA 样本。

10. 模拟血标本的制备:将汉赛巴通体基因组 DNA 进行倍比稀释为 6 个浓度(10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³、10² 拷贝/100 μl),将 200 μl 不同浓度的 DNA 与等量的正常 BALB/c 小鼠抗凝血混匀后,用血 DNA 提取试剂盒(Qiagen 公司)提取模拟感染血样本中的 DNA。

结 果

1. 敏感性分析:荧光定量 PCR 所测定的反应曲线和标准曲线见图 1。标准 DNA 的拷贝数与循环阈值(C_t)的相关值(r²)为 0.997,呈线性相关。该方法检测汉赛巴通体的最低检出量为 10 个拷贝的模板 DNA,普通 PCR 能检出 10⁻³ 稀释度模板 DNA (2.9 × 10⁴ 个拷贝)(图 2),荧光定量 PCR 法的检测灵敏度约为该普通 PCR 的 1000 倍。

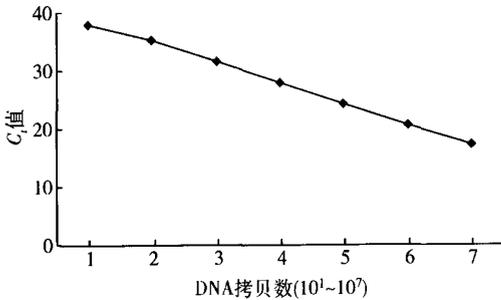
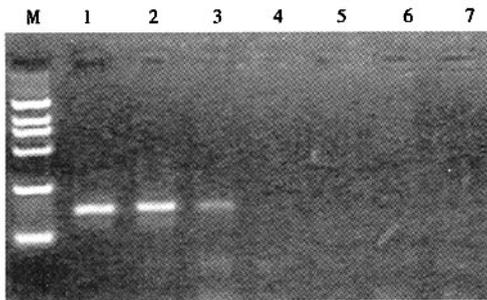


图1 汉赛巴通体荧光定量 PCR 标准曲线



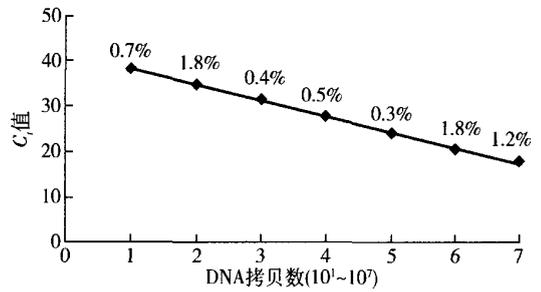
M:DNA 分子量标准; 1~6:汉赛巴通体 DNA 模板稀释度分别为 10⁻¹~10⁻⁶; 7:阴性对照

图2 PCR 方法检测汉赛巴通体 DNA 的敏感性

2. 特异性分析:用荧光定量 PCR 分别检测了其 他立克次体和细菌的 DNA,均未见荧光信号,即检测结果为 0;检测其他细菌 DNA,只有军团菌出现微弱信号(2 拷贝),其余均为 0。

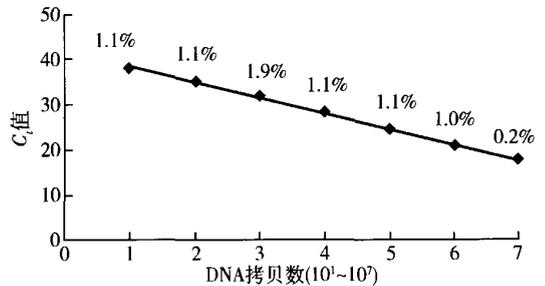
3. 重复性分析:将同一批次和不同批次的倍比

稀释标准品 10⁷~10¹ 拷贝检测后,根据 C_t 值的变异系数(CV)对重复性进行了评价,结果见图 3、4。批内 CV 为 0.3%~1.8%,批间 CV 为 0.2%~1.9%。



横坐标为稀释的标准 DNA 模板拷贝数(从左至右分别为 0, 10¹, 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷),每个稀释度做 2 次

图3 汉赛巴通体荧光定量 PCR 方法的批内重复性分析



横坐标为稀释的标准 DNA 模板拷贝数(从左至右分别为 0, 10¹, 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷),每个稀释度做 4 次

图4 汉赛巴通体荧光定量 PCR 方法的批间重复性分析

4. 汉赛巴通体感染标本的检测:实时荧光定量 PCR 检测 BALB/c 小鼠的血液和脾脏 DNA 样本:在感染后第 2 天、第 3 天、第 5 天,定量 PCR 从感染小鼠的血标本中检出少量的汉赛巴通体,其他时相检出结果为阴性(图 5)。而在感染后的第 1 天和第 2 天从感染小鼠的脾脏样本中检出大量的汉赛巴通体(图 6)。

5. 模拟感染血标本的检测:模拟血标本中汉赛巴通体基因组 DNA 最初掺入总量分别为 2 × 10², 2 × 10³, 2 × 10⁴, 2 × 10⁵, 2 × 10⁶, 2 × 10⁷ 拷贝,与等量的正常 BALB/c 小鼠抗凝血混匀后,用血 DNA 提取试剂盒提取模拟感染血样本中 DNA,用所建立的荧光定量 PCR 检测提取后的 DNA 样本,DNA 总量检测结果分别为 0, 0.8 × 10¹, 1.1 × 10³, 5.3 × 10⁴, 5.4 × 10⁵, 5.5 × 10⁶ 拷贝,结果表明掺入的 DNA 在提取过程中损失了一部分,提取后定量结果还是保持原始样本的浓度梯度。

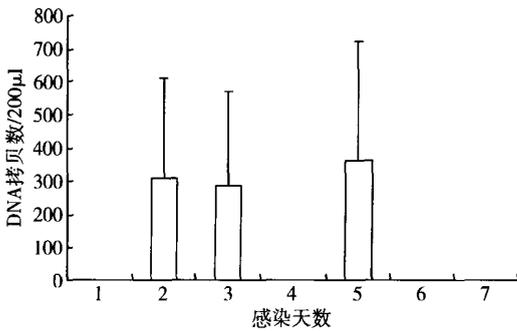


图5 定量 PCR 方法检测小鼠血标本

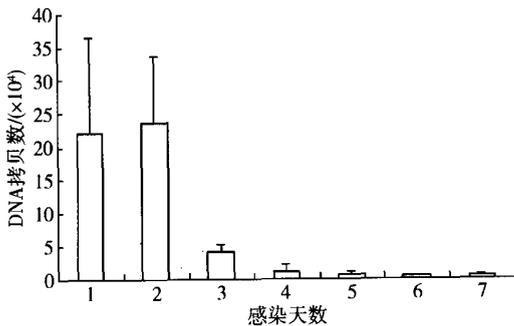


图6 定量 PCR 方法检测小鼠脾标本

讨 论

汉赛巴通体感染常见于免疫低下或免疫缺陷患者^[1,11],由于临床缺少快速、有效的巴通体检测方法,巴通体感染常常被误诊。虽然我国未见巴通体感染病例报告,但是美洲、欧洲和亚洲等许多国家发现汉赛巴通体感染的病例和分离到病原体,因此,我国也会有汉赛巴通体感染的存在。目前,国外的汉赛巴通体的分离方法主要为人工培养基分离,临床汉赛巴通体感染的实验室诊断方法主要为汉赛巴通体特异性抗体的检测,有条件的实验室采用 PCR 法检测巴通体 DNA^[2-5]。我们通过对巴通体 16S~23S rRNA 基因间隔区序列分析,找出汉赛巴通体的种特异性序列,依据种特异性序列设计汉赛巴通体的特异性引物和 TaqMan-MGB 探针,构建了检测汉赛巴通体的荧光定量 PCR 方法。

尽管目前国内外已建立了许多快速检测病原体的实时荧光定量 PCR 方法,但采用新型 TaqMan-MGB 探针技术还很少见^[6,9]。国外报告采用 SYBR 荧光染料结合 DNA 的实时荧光定量 PCR 实验室诊断巴通体心内膜炎^[6]。本研究根据汉赛巴通体特异的 16S~23S rRNA 基因间隔区序列设计特异的引物和 TaqMan-MGB 探针,用克隆的 16S~23S rRNA

基因间隔区序列 DNA 片段作为标准 DNA 模板建立标准曲线, C_t 值与标准 DNA 拷贝数呈明显的线性相关($r^2 = 0.997$)。用实时荧光定量 PCR 检测标准 DNA 模板,检测灵敏度为普通 PCR 检测相同目的 DNA 片段的 1000 倍。用建立的荧光定量 PCR 检测其他立克次体 DNA 和细菌 DNA,检出结果除军团菌检出微弱信号(2 拷贝)外其余均为 0,显示该荧光定量 PCR 的高度特异性。定量 PCR 检出微弱信号(<5 拷贝)可以是定量 PCR 仪的非特异性检出信号,可以视为阴性。对汉赛巴通体的定量 PCR 引物和探针序列在 GenBank 进行检索,它们与军团菌等细菌 DNA 无交叉反应。用该荧光定量 PCR 分别检测标准样品,其批内和批间的变异系数 < 2%,说明该定量 PCR 的重复性良好。以上结果显示所建立的检测汉赛巴通体的荧光定量 PCR 为高特异和高敏感的定量检测方法,其定量分析的重复性良好。

用检测汉赛巴通体的荧光定量 PCR 检测汉赛巴通体感染 BALB/c 小鼠的血和脾脏样本,在感染后第 1 天和第 2 天的脾脏样本中检出大量的汉赛巴通体,但是在第 1 天血标本中则未能检出巴通体,提示从腹腔注入的巴通体进入脾脏,而后从脾脏释放入血。在感染后的第 2 天开始从血标本中检出汉赛巴通体,提示可在巴通体感染早期,用该荧光定量 PCR 对患者的血标本进行检测作为汉赛巴通体感染的早期诊断。定量 PCR 检测感染小鼠脾脏,发现随着感染时间延长,汉赛巴通体在脾脏中量逐渐减少,说明 BALB/c 小鼠对汉赛巴通体感染不敏感,其机体免疫系统的激活可以抵抗汉赛巴通体的感染。

此外,将汉赛巴通体基因组 DNA 分别掺入到小鼠的抗凝血中制备模拟汉赛巴通体感染血标本,用相应的荧光定量 PCR 检测模拟血标本 DNA,除检测的 DNA 拷贝数有所减少外,检测结果仍与标准 DNA 的稀释度密切相关,说明所建立检测汉赛巴通体荧光定量 PCR 方法和血标本的 DNA 提取方法适用于临床患者血标本的检测。

基于以上研究结果,说明本文所建立的检测汉赛巴通体实时荧光定量 PCR 具有很高的特异性和敏感性,其检测敏感性显著高于普通 PCR 和巢式 PCR,适合快速检测血标本和其他样本中的微量的汉赛巴通体,可用于汉赛巴通体感染的临床实验室诊断。

参 考 文 献

- [1] Adal KA. *Bartonella*: new species and new diseases. Rev Med Microbiol, 1995, 6: 155-164.
- [2] Sander A, Posselt M, Bohm N, et al. Detection of *Bartonella henselae* DNA by two different PCR assays and determination of the genotypes of strains involved in histologically defined cat scratch disease. J Clin Microbiol, 1999, 37: 993-997.
- [3] Renesto P, Gouvernet J, Drancourt M, et al. Use of *rpoB* gene analysis for detection and identification of *Bartonella* species. J Clin Microbiol, 2001, 39: 430-437.
- [4] Johnson G, Ayers M, McClure SCC, et al. Detection and identification of *Bartonella* species pathogenic for human by PCR amplification targeting the riboflavin synthase gene (*ribC*). J Clin Microbiol, 2003, 41: 1069-1072.
- [5] Jensen WA, Fall MZ, Rooney J, et al. Rapid identification and differentiation of *Bartonella* species using a single-step PCR assay. J Clin Microbiol, 2000, 38: 1717-1722.
- [6] Zeiter Z, Fournier PE, Gilbert G, et al. Diagnosis of bartonella endocarditis by a real-time nested PCR assay using serum. J Clin Microbiol, 2003, 41: 919-925.
- [7] Kutyavin IV, Afonina IA, Mills A, et al. 3-minor groove binding-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperature. Nucleic Acids Res, 2000, 28: 655-661.
- [8] 俞树荣. Q热的病原与防治. 重庆: 科学技术出版社重庆分社, 1990.
- [9] Brennan RE, Samuel JE. Evaluation *Coxiella burnetii* antibiotic susceptibilities by real time PCR assay. J Clin Microbiol, 2003, 41: 1869-1874.
- [10] Karem KL, Dubois KA, McGill SL, et al. Characterization of *Bartonella henselae*-specific immunity in BALB/c mice. Immunology, 1999, 97: 352-358.
- [11] Brenner DJ, O'Connor SP, Winkler HH, et al. Proposals to unify the genera *Bartonella* and *Rochalimaea*, with descriptions of *Bartonella quintana* comb. nov., and to remove the family *Bartonellaceae* from the order *Rickettsiales*. Int J Syst Bacteriol, 1993, 43: 777.

(收稿日期: 2006-03-17)

(本文编辑: 王多春)

· 巴斯德医苑 ·

北京市海淀区 2626 例被动物致伤患者流行病学分析

左永波 杜松涛

为统计北京市海淀区被动物致伤人群的流行病学特点, 减少被动物致伤而带来的经济损失, 预防狂犬病的发生, 对 2006 年 1-3 月海淀医院狂犬病免疫门诊登记在册的被动动物致伤人群进行流行病学分析。

1. 流行病学特征: 分析资料来源于海淀医院狂犬病免疫门诊登记。2006 年 1-3 月共接诊被动物致伤患者共 2626 例, 其中男性 1237 例 (47.1%), 女性 1389 例 (52.9%)。伤者中年龄最小 9 个月, 最大 86 岁, 其中 0~6 岁 109 例 (4.15%), 7~16 岁 243 例 (9.25%), 17~26 岁 793 例 (30.20%), 27~36 岁 448 例 (17.06%), 37~46 岁 346 例 (13.18%), 47~56 岁 423 例 (16.11%), ≥ 57 岁 264 例 (10.05%)。致伤动物分析, 其中犬致伤 2131 例 (81.2%), 猫 406 例 (15.5%), 鼠 72 例 (2.7%), 其他动物 (兔、猴、蝙蝠等) 17 例 (0.6%)。致伤地点在海淀区 2347 例, 其他区县 162 例, 北京市以外地区 115 例, 国外 2 例。致伤部位在上肢 1860 例 (70.8%), 下肢 540 例 (20.6%), 头颈颜面 181 例 (6.9%), 躯干 45 例 (1.7%)。动物致伤后 <24 h 就诊 2318 例 (88.27%), 24-48 h 就诊 243 例 (9.25%), 3-10 d 就诊 50 例, >10 d 就诊 12 例。

2. 讨论: 狂犬病一旦发病, 病死率 100%, 目前狂犬病仍然居法定传染病报告死亡数首位。北京市卫生局、北京市疾病预防控制中心为规范动物致伤患者的伤口处理及狂犬病免疫预防工作, 于 2005 年 12 月 15 日在北京市 18 个区县指定 45 家医院设立狂犬病免疫门诊, 海淀医院为指定狂犬病

免疫门诊。从海淀医院登记资料看, 男性伤者占 47.1%, 女性占 52.9%, 经检验 (适用统计软件 SPSS 10.0), 男女之间差异有统计学意义 ($\chi^2 = 17.795, P = 0.001$), 17~26 岁年龄组中被动动物致伤患者最多 (占 30.20%), 经检验, 该年龄组较其他年龄组差异有统计学意义 ($\chi^2 = 756.242, P = 0.001$)。这与海淀区教育资源发达在校学生多有一定关系, 且此年龄段人群喜欢养宠物, 户外活动多, 故较其他年龄组有明显差异。女性较男性容易受到动物致伤, 宠物多由女性喂养照顾, 故相对容易受伤。所以应当对女性、17~26 岁年龄段养宠物人员加强教育, 防止受伤。伤人动物主要是犬、猫、宠物鼠等, 以犬最多, 且部分为流浪犬 (猫、宠物鼠) 等, 故相关部门有必要加强对流浪动物及宠物店的管理。从致伤部位看, 多数是上肢受伤, 多为嬉弄动物, 给动物喂食时, 或动物间撕扯咬斗时意外受伤。

多数居民被动物致伤后, 能够初步处理伤口, 及时来医院就诊, 这与近年来对狂犬病的加大宣传有一定影响。另外有 4 例来院救治行暴露前免疫, 均为高危人群 (中国农业大学兽医学院、中国科学院动物所及宠物医院工作人员)。暴露前的疫苗接种可使 99% 以上的接种者有免疫应答^[1], 从而避免暴露后抗狂犬病血清的注射所带来的过敏反应。

参 考 文 献

- [1] WHO. Position on rabies vaccine. WHO Drug Information, 2002, 16(1): 4-7.

(收稿日期: 2006-06-23)

(本文编辑: 张林东)