

应用巢式聚合酶链反应在唾液中 检出幽门螺杆菌

宋 敏 李 进 马维芳 徐湘民 张基增

摘要 用互补于幽门螺杆菌(HP)尿素酶A基因的两对引物行巢式聚合酶链反应(N-PCR), 检测1株HP标准菌株、20株HP临床分离株均阳性, 而12种肠道菌均阴性, 特异性100%。该法敏感性好可检测0.1fg细菌DNA。57例因上消化道症状行胃镜检查者, 取粘膜分别做细菌培养、尿素酶试验、组织学检查和N-PCR检测, 其中27例在行胃镜前收集其唾液标本做N-PCR。19例胃粘膜HP阳性者中有11例唾液中检出HP, 而8例胃粘膜HP阴性者中有1例唾液N-PCR阳性。作者认为口腔中确实存在HP, 该菌可能通过口-口途径传播。

关键词 幽门螺杆菌 巢式聚合酶链反应 唾液

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, HP)是慢性胃炎的致病因子之一, 但关于其传播途径和传染源所知甚少。各国学者试图寻找一种敏感、特异的HP检测方法, 不仅用于临床HP感染的诊断, 亦用于流行病学调查。本文用互补于HP尿素酶A基因片段的两对引物建立巢式聚合酶链反应(Nested Polymerase Chain Reaction, N-PCR)检测HP的方法, 对其敏感性和特异性进行了鉴定, 并检测了胃粘膜、胃液和唾液标本, 报告如下。

材料和方法

一、研究对象和取材: 因上消化道症状在南方医院行胃镜检查者57例, 男36例, 女21例, 年龄18~62岁, 在胃窦部钳取粘膜标本7块, 分别进行细菌培养、尿素酶试验、组织学检查和N-PCR检测, 前三种方法作为检测HP的参照方法, 有1项或1项以上阳性者判为HP阳性, 3项皆为阴性者则为HP阴性, 并与N-PCR结果对比。57例中有27例在行胃镜前取唾液, 方法是: 嘱患者用20ml生理盐水漱口15s, 洗漱液用TE液(10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA pH8.2)低温10000r/min离心洗涤2次, 每次10min, 弃上清, 沉淀置

-70℃保存备用。6例在胃镜检查的同时, 吸取胃液10ml, 胃液的离心处理与唾液相同。

二、引物的特异性和敏感性鉴定: 对1株HP标准菌株NCTC14126(中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所陈晶晶研究员惠赠)、20个HP临床分离株(南方医院消化中心提供)和以下12种常见肠道菌进行N-PCR扩增: 结肠弯曲菌(上海第二医科大学微生物学教研室张振华教授惠赠); 空肠弯曲菌、胎儿弯曲菌、大肠杆菌、雷极变形杆菌、伤寒和鼠伤寒沙门氏菌、福氏志贺菌、绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、克雷白氏菌(均由中国药品生物制品检定所提供)。

将HP分离株(B159)进行DNA定量后, 做10倍系列稀释, 浓度从1μg/μl~1ag/μl; 在循环圈数试验中, 对30和40个循环的结果, 通过电泳进行比较, 并将用外引物行第一次扩增的PCR与N-PCR的敏感性做比较。

三、DNA抽提: 分离菌和未取唾液病例的胃粘膜DNA用酚-氯仿提取法^[1,2], 胃液标本亦用此法, 但需向组织抽提缓冲液(50mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, 1% SDS,

100 μ g/ml蛋白酶K, pH8.2)内加入1/10体积的1N NaOH以中和胃酸^[2]。全部唾液标本及同时钳取的胃粘膜标本均用粗提法抽提DNA^[3]。另取5份唾液,各分为二等份,分别用酚-氯仿抽提法和粗提法对DNA进行抽提,行

PCR后比较结果。

四、N-PCR扩增:

1.引物选择:两对引物选自HP尿素酶A基因^[4,5],引物1a和1b为外引物,引物2a和2b为内引物(图1)。

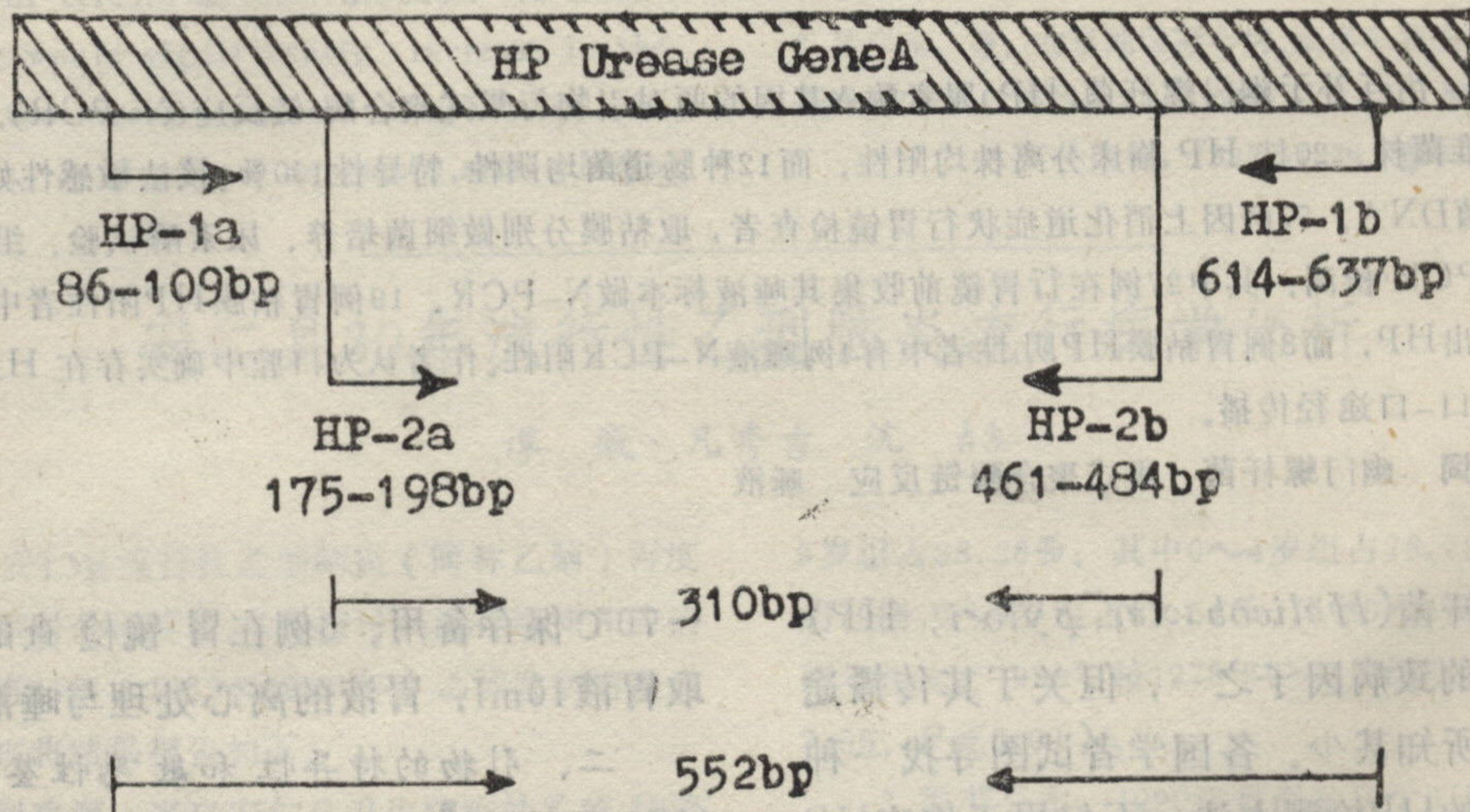


图1 幽门螺杆菌(HP)尿素酶A基因PCR扩增巢式引物选择

2.扩增条件与产物鉴定:先行第1次扩增:在50 μ l反应体积中,一对外引物浓度各为0.4 μ mol/L,四种脱氧核苷酸浓度各为0.2mmol/L, Taq DNA聚合酶(英国HT公司产品)0.5u,模板DNA 2 μ l(约1 μ g DNA)。94 $^{\circ}$ C变性55s, 55 $^{\circ}$ C退火50s, 72 $^{\circ}$ C延伸60s,在Eppendorf自动PCR循环仪上共循环30或40圈,取第1次扩增产物(552bp)1 μ l,用一对内引物行第2次扩增,循环参数与第1次扩增相同。第2次扩增产物(310bp)与第1次扩增产物均用7%聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定。Hae III- ϕ \times 174标准DNA分子量(美国生命技术公司)作参照。

结 果

一、N-PCR的特异性及敏感性: NCTC 14126 HF标准菌株、20个临床分离株行PCR均阳性(图2),而其它12种肠道菌均为阴性;在敏感性鉴定中,当仅以一对外引物扩增时

(循环40圈),敏感性为1pg,行第二次扩增,循环30圈和40圈,敏感性分别为1fg和0.1fg。

二、胃和唾液标本检测: 57例胃粘膜标本,用参照方法检出阳性39例,阴性18例,与PCR检测结果完全一致。同时取唾液的27例病人,其胃粘膜阳性19例,阴性8例,在19例阳性者中,有11例唾液中HP阳性,而8例阴性者中仅1例阳性。6例胃粘膜HP阳性的病人同时取胃液,PCR检测胃液亦全部为阳性。5例胃粘膜阳性病人的唾液标本各分为两等份,用粗提法提取DNA时,有3例唾液阳性(图2),但行酚-氯仿法提纯DNA时,PCR均为阴性。

讨 论

流行病学调查提示,HP感染有家庭聚集性^[6],有人认为生活环境或粪便中可能存在HP,但由于检测技术的敏感性有限,一直未找到令人信服的证据,因此寻找一种高度敏感和特异的方法实属必要。HO等^[7]应用互补于

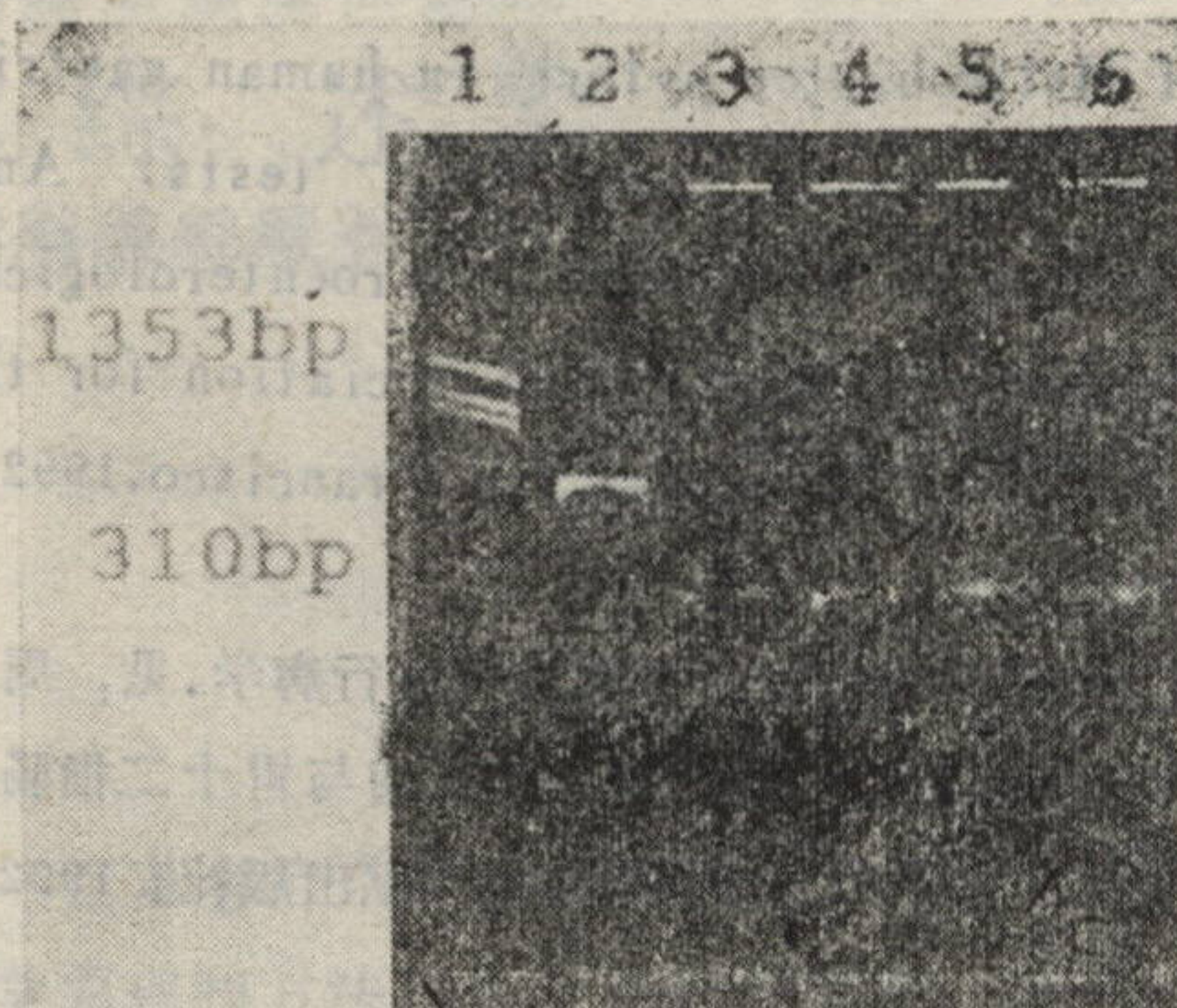


图2 7%聚丙烯酰胺凝胶电泳示幽门螺杆菌
尿素酶A基因巢式PCR扩增产物

1. Hae III- ϕ X174标准DNA分子量
2. 用一对外引物(1a和1b)对HP标准菌株行第1次扩增, 得到552bp产物
3. 取该标准菌株的第1次扩增产物, 用一对内引物(2a, 2b)行第2次扩增, 得到310bp产物
4. 胃粘膜中HP的巢式PCR扩增产物
- 5, 6. 唾液标本用粗提法提取DNA后行巢式PCR, 可见特异性的扩增产物

HP 16S rRNA基因的引物行巢式PCR, 可检测10fg的HP DNA(相当于10个细菌^[7]), 比基因探针检查^[8](可检出5000~10000个细菌)敏感性增加了500~1000倍; 我们在国内首先用PCR从胃粘膜中检出HP^[3], 笔者又建立了扩增HP尿素酶A基因的巢式PCR技术, 目的在于寻找一个更为敏感、特异的检测方法, 为临床应用及流行病学调查提供手段, 因此本文从以下两方面对方法学进行了改进: ①对唾液标本的处理采用DNA粗提法^[3]。因仅向唾液沉淀标本内加入少许三蒸水在100℃煮沸10min, 故此法简便、省时、经济, 整个提取过程不需任何化学试剂, 10min内即可完成, 且用该法得到的DNA量多, 片段完整, PCR容易成功。②增加循环次数。当第1次和第2次扩增均采用30个循环时, 敏感性为1fg, 当两次循环均为40次(总共80次), 敏感性为0.1fg。因为笔者采用巢式引物, 在得到552bp产物的前提下, 再进行第2次扩增, 所以得到一个更加特异的310bp的产物, 由于特异性高, 方法高度敏感, 实验可使用PCR自动循

环仪, 这将便于临床应用。

用PCR法从唾液中检出HP目前仅在国外有两篇报道: 1991年Westblom等报道在10份唾液标本中检出1例HP阳性^[9], 1992年Hammar等^[10]在胃内HP阳性患者的唾液中, 检出9例HP阳性。本文结果表明, 19例胃内HP阳性者, 11例唾液内检出HP, 8例胃内HP阴性者, 仅1例唾液内检出HP。我们曾用互补于HP16S rRNA基因片段的一对引物行PCR对唾液标本进行检测(敏感性1pg), 没有检出HP(资料未发表), 本文用巢式PCR法敏感性比前者大大提高, 所以从唾液中检出了HP, 说明口腔中确实存在HP, 支持HP通过口-口途径传播, 但因菌量少, 必须采用敏感的方法。有1例唾液阳性但胃内阴性, 可能系HP尚未在胃内定植, 对该病例进行追踪随访, 将提供有价值的资料。

Detection of *Helicobacter pylori* in Human Saliva by Using Nested Polymerase Chain Reaction Song Min, et al., Dept. of Histology and Embryology, First Medical University of PLA, Guangzhou 510515

Epidemiologic studies suggest person to person spread of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), but the exact mechanism is unknown. Spread through oral secretions has been suggested, however it has proved very difficult to grow the organism from areas outside the stomach. A nested polymerase chain reaction (N-PCR) for the specific detection of *H. pylori* was developed with two primer pairs (nested primers) derived from the urease gene A of *H. pylori*. The N-PCR could detect all 21 *H. pylori* strains, including 20 isolated strains and 1 reference strain NCTC 14123, but could not detect other bacterial species, showing the N-PCR assay to be 100% specific. Tenfold serial dilution experiments revealed the detection of as little as 0.1fg DNA by N-PCR. To evaluate the PCR assay for clinical samples, gastric biopsy and aspirate specimens were tested by N-PCR, and the results were compared with those of culture,

urease test and histologic examination(reference standard, RS). Among 57 biopsy specimens, *H. pylori* sequence was detected by PCR in 39 of 39 (100%) positive tissues and in none of 18 negative tissues. *H. pylori* was detected in saliva of 11 out of 19 cases in which *H. pylori* was positive in gastric mucosa by PCR. Whereas, PCR was positive in saliva of only one out of 8 cases in which *H. pylori* was negative in gastric mucosa. Six gastric aspirate specimens were positive by N-PCR. PCR is an accurate and sensitive method that can detect the presence of *H. pylori* without the need of culture.

Key words *Helicobacter pylori*

Nested PCR Saliva

参 考 文 献

1 林万明.细菌DNA的提取.见:林万明编著.细菌分子遗传学分类鉴定法.第1版.上海:上海科学技术出版社,1990.58~59.
 2 Valentine JL, RR Arthur, HLT Mobley, et al. Detection of *Helicobacter pylori* by using the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol, 1991, 29: 689.
 3 宋敏,李进,杨海涛,等.聚合酶链反应检测幽门螺杆菌.中华医学杂志,1992,72(8):455.
 4 Clayton CL, MJ Pallen, H Kleanthous, et al. Nucleotide sequence of two genes from *Helicobacter pylori* encoding for urease subunits. Nucleic Acid Research, 1989, 18(2):362.

5 Wing KK, H.Lin, LD Ferrell, et al. Detection of *Helicobacter pylori* in human gastric carcinoma tissue by nested-PCR tests. Annual Meeting of American Gastroenterological Association and American Association for the Study of Liver Diseases. San Francisco,1992, 5, 10~13.
 6 李子旭,杨海涛.幽门螺杆菌感染的流行病学.见:周殿元,杨海涛,张万岱主编.幽门螺杆菌与胃十二指肠疾病.第1版.上海:上海科学技术文献出版社,1992. 139~145.
 7 HO SA, JA Heyle, FA Lewis, et al. Direct polymerase chain reaction test for detection of *Helicobacter pylori* in human and animals. J Clin Microbiol, 1991, 29: 2543.
 8 Morotomi M, S Hoshina, P Green, et al. Oligonucleotide probe for detection and identification of *Campylobacter pylori*. J Clin Microbiol, 1989, 27: 2652.
 9 Westblom TU, S Phadnis, S Ndrmark. Sensitivity of assay for detection of *Helicobacter pylori* in human saliva using polymerase chain reaction (PCR). Microbial Eco Health Dis, 1991, 4(S): s156.
 10 Hammar M, T Tyszkiewicz, T Wadstrom, et al. Rapid detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy material by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol, 1992, 30: 54.
 (收稿:1993-02-02 修回:1993-03-05)

一起游泳引起红眼病的病原学调查

林永成 詹旭东 赵群 田云屏

云南化工厂将锅炉冷却水排放于养鱼池内供学生暑期游泳。自6月27日至7月18日在游泳的240名学生中有166人(69.16%)出现高热、眼结合膜炎、咽充血、扁桃体肿大和严重的中毒症状。

一、病毒分离:采取病人眼拭及咽喉液标本10份,经自制人胚肺传代细胞(6代以上)及肾原代细胞分离,获得5株致CPE病毒。

二、病毒鉴定:①耐乙醚试验:5株病毒的50%细胞感染量(TCD)各为8.0、8.5、7.5、7.0和6.5,经耐乙醚试验,其滴度变化很少或不变,仍保持其感

染力。②动物致病性试验:对鸡胚、新生小白鼠和家兔均不引起病变。③电镜检查:5株病毒均能观察到典型的腺病毒颗粒。④微量中和试验:5株病毒与ad-3和ad-7型血清中和结果,证实为腺病毒Ⅲ型。

三、讨论:结合膜热多由腺病毒Ⅱ、Ⅶ型所引起。传染源主要是病人或无症状病毒携带者,通过空气或接触传播,多发生在夏季学龄儿童中。本次的红眼病系结合膜热爆发。

(收稿:1993-01-29)

本文作者单位:云南省卫生防疫站 650022 昆明市