

• 技术方法 •

多聚酶链反应在阿米巴病流行病学研究中的应用

郭增柱 祝 宏 安亦军 王正仪

摘要 用两对引物扩增(PCR)溶组织内阿米巴带囊者粪便中的DNA,以鉴别感染虫株的致病性。32例中,致病和非致病性PCR均为阳性者1人(3.1%),仅一项阳性者分别为6人(18.8%)和25人(78.1%)。7例致病性PCR阳性者中,6人有腹泻症状($OR=31.5$)。各种对照标本均呈PCR阴性反应。以PCR法对一小样本人群进行阿米巴病调查,致病和非致病虫株的感染率均为10%。结果表明,在阿米巴病流行病学调查中,可应用PCR鉴别感染虫株的致病性,具有简便快速等优点。

关键词 阿米巴病 溶组织内阿米巴 多聚酶链反应 流行病学调查

Application of the Polymerase Chain Reaction to the Epidemiological Study of Amoebiasis Guo Zeng-zhu, Zhu Hong, An Yi-jun, et al. Beijing Tropical Medicine Research Institute, Beijing 100050

The polymerase chain reaction (PCR) has been used in studying the pathogenicity of *Entamoeba histolytica* in a rural community in Shandong province. Formalin-fixed stool samples were used for extraction of DNA. The PCR amplifications were performed using two sets of primer that discriminate between pathogenic and nonpathogenic *E. histolytica*. All of the 32 cases of cyst carrier diagnosed microscopically were identified as positive. Three groups were defined through PCR analysis: 6 cases (18.8%) were positive for pathogenic but negative for nonpathogenic, 25 cases (78.1%) were negative for pathogenic but positive for nonpathogenic, and only one case (3.1%) was positive for both pathogenic and nonpathogenic. The cases found to be pathogenic by PCR were also closely correlated with their clinical manifestations (diarrhea) ($OR=31.5$, $P<0.005$). All of the control cases showed negative reaction to PCR. PCR has also been used to study the epidemiology of amoebiasis in a small population group with 40 persons in the same province. Both positive rates by PCR on pathogenic and nonpathogenic were 10%. The results showed that this new technique can be applied in the field for the epidemiological studies of pathogenic and non-pathogenic *E. histolytica*.

Key words Amoebiasis *Entamoeba histolytica* PCR Epidemiological study

人体感染溶组织内阿米巴(*Entamoeba histolytica*, E. h)后,约90%的人可无任何症状,仅约10%的人有肠道和/或肠外阿米巴病的临床表现^[1]。此种情况引起国内外学者的广泛关注。近年来已有大量证据证明E. h分为致病和非致病株^[2]。在阿米巴病流行病学研究中,如何采用简便的方法,鉴别感染

虫株的致病性,对于该病的监测和防治具有重要意义。我国曾有很多用粪检和血清学方法调查人群阿米巴病流行的报道,但对E. h致病和非致病株分布的了解甚少^[3]。笔者试用Tachibana等^[4]报道的多聚酶链反应

作者单位:北京热带医学研究所 100050 北京市

(PCR)检测山东省东营市阿米巴肝脓肿高发区的 E. h 带囊者的粪便标本,发现其对 E. h 致病和非致病株的分布的识别,确有较满意的效果。现将结果报道如下。

材料和方法

一、标本来源:在调查现场随机收集500人的新鲜粪便标本,经寄生虫学检查(镜检)后确定:32人感染 E. h; 12人感染结肠内阿米巴 (*E. coli*, *E. c*); 5人感染布氏嗜碘阿米巴 (*I. buetschlii*, *I. b*); 3人感染微小内蜒阿米巴 (*E. nana*, *E. n*); 哈氏内阿米巴 (*E. hartmanni*, *E. har*) 及蓝氏贾第鞭毛虫 (*G. lamblia*, *G. l*) 感染者各1人。分别以这些感染者甲醛固定的粪便作为试验和对照标本。另收集北京地区5名学龄前儿童的粪便标本(粪检阴性)作为正常对照。

二、DNA 抽提:从粪便中抽提 DNA 按文献 [5] 方法进行。

三、PCR 技术:采用两对引物进行 PCR 扩增,其寡核苷酸顺序分别为:致病性虫株引物 P11 5'-GGAGGAGTAGGAAAGTT GAC-3' 和 P12 5'-TTCTTGCAATTCCT GCTTCGA-3'; 非致病性虫株引物 P13 5'-AGGAGGAGTAGGAAAATTAGG-3' 和 P14 5'-TTCTTGAAACTCCTGTTTC TAC-3' [4]。采用华美生物工程公司生产的 Tag DNA 多聚酶。致病性 PCR (P-PCR) 和非致病性 PCR (NP-PCR) 均采用 25 μ l 反应体系,其中含 Tag 酶 0.8U 和相应引物 1 μ mol/L。主要的反应参数是:94℃起始变性6分钟;然后按 94℃变性1分钟,59℃退火1.5分钟,72℃延伸1.5分钟的程序进行45次循环;最后一次循环后维持 72℃延伸反应 310 秒。取 10 μ l 扩增产物,在 2% 琼脂糖凝胶中(含溴乙啶 0.5 μ g/ml)电泳,在紫外光下观察结果并摄影。

每次试验均设立阳性和空白对照对试验进行定性质量控制。以致病株 HB1 和非致病株 HB3 为阳性对照。前者扩增产物为 100 bp

DNA 片段,具有 EcoT22I 酶切位点;后者则为 101 bp 片段,具有 Hinf I 酶切位点。空白对照则在反应系统中去除模板 DNA。

结 果

一、各种粪便标本的 PCR 检测结果:见表 1。32 例 E. h 包囊携带者的粪便标本经 PCR 检测均呈阳性反应,其中 6 例的扩增产物为 100bp DNA,与致病株 HB1 的相同;25 例的与非致病株 HB3 者相同,为 101bp 片段;另有 1 例扩增产物中既有 100 bp 又有 101 bp DNA 片段,属于致病和非致病性 E. h 的混合感染。其它受试者(共 27 例)的粪便标本均呈 PCR 阴性反应。

表1 各种粪便标本的 PCR 检测结果

标本来源	检查例数	PCR 阳性(%)		
		P-PCR (100bp)	NP-PCR (101bp)	混合
E. h 感染者	32	6(18.8)	25(78.1)	1(3.1)
E. c 感染者	12	0	0	0
E. n 感染者	3	0	0	0
I. b 感染者	5	0	0	0
E. har 感染者	1	0	0	0
G. l 感染者	1	0	0	0
正常儿童	5	0	0	0

32 例 E. h 包囊携带者中 10 人有腹泻症状,其中 6 人感染的为致病株 (P-PCR 阳性),4 人的为非致病株 (NP-PCR 阳性)。其余 22 例无症状 E. h 带囊者中,1 人感染的为致病株,21 人的为非致病株。经优势比 (OR) 分析, E. h 致病株感染与腹泻有密切关系 (OR = 31.5; 95% CI = 4.46, 222.15; $P < 0.005$)。

二、小样本人群的阿米巴病流行病学调查结果:应用粪便直接涂片镜检、P-PCR 和 NP-PCR 以及血清抗体 (ELISA) 检测等四种方法在调查现场随机抽取 40 位村民进行对比性研究。3 人粪检阳性 (7.5%), 其中 1 人为 P-PCR 阳性, ELISA 抗体亦阳性 (1:1 280); 2 人为 NP-PCR 阳性, 未查到阿米巴抗体。PCR 和 ELISA 结果如表 2: 4 例 P-PCR 阳性

者的血清抗体均为阳性,滴度亦较高,为1:640~1:1 280;而4例 NP-PCR 阳性者中3人未查到阿米巴抗体,1人的 ELISA 虽为阳性,但滴度仅为1:320。

表2 40名受试者的 PCR 与 ELISA 检查结果

ELISA	PCR			合 计
	P-PCR (+)	NP-PCR (+)	(-)	
+	4	1	5	10(25)
-	0	3	27	30(75)
合 计	4(10)	4(10)	32(80)	40(100)

注:括号内数字为百分率

讨 论

粪便检查和血清学调查是进行阿米巴病流行病学研究的重要方法。前者能够查出人群中 E. h 传染源,但无法鉴别虫株的致病性,而且检出率与粪检方法、标本质量、复检次数及检验者的技术熟练程度等因素有很大的关系。后者虽能反映受试者组织受 E. h 侵袭的情况,但它反映的是人群发病的累积情况,不能查出传染源。应用 PCR 法则可较好地解决这些问题:它既能查清传染源,又能区分感染虫株的致病性;它的检出率不仅较高,而且所得结果与感染者的临床表现和抗体水平有较好的一致性。从本文有限例数的 E. h 带囊者的检测结果看,山东省东营市郊阿米巴肝脓肿高发区人群中仍以 E. h 非致病株感染占优势(表1),但致病株感染的比例高于国内外报道^[6,7]。而从该地小样本人群的调查结果看,虽然粪检阳性率并不高(仅7.5%),但 P-PCR 和 NP-PCR 的阳性率均达10%,血清抗体流行率更是高达25%(表2)。此两者都很高的情况,与当地现在和过去阿米巴肝脓肿高发病率的情况甚为相符^[3]。

本文 PCR 阳性率高于粪检阳性率,其原因系由于 PCR 检测的粪便标本先经甲醛-醋酸乙酯沉淀法浓集了包囊以及 PCR 法本身

所具有的高度敏感性(每 ml 粪便中有几个包囊即可查出)所致^[5]。本文直接从甲醛固定的粪便标本中提取 DNA 进行 PCR 检测,以鉴别 E. h 的致病性,较 Tachibana 等^[6]和程训佳等^[7]的 PCR 法以及同工酶法^[8]简便,无需从患者粪便中分离培养 E. h。由于本文检测的例数较少,其结果的可靠性若能在大样本人群阿米巴病调查中得到进一步证实,则具有较高的实用价值。

(日本东海大学医学院 Dr. H. Tachibana 为本研究提供引物;东营市卫生防疫站宋丹华、刘旭业、刘伟等,北京热带医学研究所纪爱平、吴娟曾参加现场工作。致谢)

参 考 文 献

- 1 Davis A, Pawlowski ZS. Amoebiasis and its control. Bull WHO. 1985, 63:417.
- 2 Diamond LS. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. J Euk Microbiol, 1993, 40:340.
- 3 刘伟,刘旭业,锡景柱,等. 东营市郊阿米巴感染调查和181例阿米巴肝脓肿临床分析. 中国寄生虫病防治杂志, 1993, 6:300.
- 4 Tachibana H, Kobayashi S, Takckoshi M, et al. Distinguishing pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica* by polymerase chain reaction. J Infect Dis, 1991, 164:825.
- 5 Acuna-Soto R, Samuelson J, Girolam PD, et al. Application of the polymerase chain reaction to the epidemiology of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica*. Am J Trop Med Hyg, 1993, 48:58.
- 6 Tachibana H, Kobayashi S, Paz KC, et al. Analysis of pathogenicity by restriction endonuclease digestion of amplified genomic DNA of *Entamoeba histolytica* isolated in Pernambuco, Brazil. Parasitol Res, 1992, 78:433.
- 7 程训佳, Tachibana H, Kobayashi S, 等. 多聚酶链反应分析溶组织内阿米巴的致病性. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1993, 11:172.
- 8 Gathiram V, Jackson TFHG. Frequency distribution of *Entamoeba histolytica* zymedemes in a rural South Africa. Lancet, 1985, 1 (8430): 719.

(收稿:1994-11-20 修回:1995-02-14)