

• 论 著 •

Tp0259-PCR 的建立及其在二期梅毒诊断中的初步应用*

杨长顺¹, 王三虎¹, 周秀萍^{2△}

(1. 怀化市第一人民医院检验科, 湖南怀化 418000; 2 湖南医药学院, 湖南怀化 418000)

摘要:目的 建立聚合酶链反应(PCR)方法扩增梅毒螺旋体(Tp)0259 基因,探讨其在二期梅毒诊断中的意义,为建立新的梅毒 PCR 诊断方法提供依据。方法 从 Genbank 获取 Tp0259 基因序列设计引物,优化反应条件,建立 Tp0259-PCR 方法;同时通过新构建扩增方法检测泌尿生殖道感染常见病原微生物;以建立的 Tp0259-PCR 方法检测临床 42 例确诊二期梅毒患者的分泌物,同时用血清学方法 Tp 明胶颗粒凝集试验(TPPA)平行检测待测者血清中抗 Tp 抗体。结果 Tp0259-PCR 只在扩增 Tp 时有特异性产物;其他病原微生物未见扩增条带;检测确诊二期梅毒患者标本, Tp0259-PCR 检出率(73.8%)明显高于 TPPA(57.1%) ($P<0.05$),与 TPPA 相比, Tp0259-PCR 特异度为 100%。结论 建立的 Tp0259-PCR 法具有高敏感性和高特异性,初步应用显示其对二期梅毒诊断优于血清学方法,但其临床诊断价值有待对大量临床标本进行反复验证。

关键词:梅毒螺旋体; 聚合酶链反应; 二期梅毒

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.16.006

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)16-2303-03

Establishment and preliminary application to diagnose primary syphilis of Tp0259-PCR*

Yang Changshun¹, Wang Sanhu¹, Zhou Xiuping^{2△}

(1. Department of Clinical Labortary, the First People's Hospital of Huaihua, Huaihua, Hunan 418000, China; 2. Hunan University of Medicine, Huaihua, Hunan 418000, China)

Abstract: Objective To explore the significance of established Tp0259-PCR in diagnosing primary syphilis. To provide basis for establishing new PCR diagnosis method of Treponema pallidum. Methods Specific primers were designed by the gene sequences of Tp0259 which was obtained from Genbank. Tp0259-PCR was established under the optimization reaction condition. Using the new construction of amplification method to detect the common pathogenic microorganism in urinary and reproductive tract infection. 42 clinical secretion specimens suspected primary syphilis were tested by Tp0259-PCR. Serum specimens from the same patients were tested by TPPA. Results Only specific amplicons could be found in amplifying the Treponema pallidum by Tp0259-PCR. The detection rate was 73.8% using Tp0259-PCR which was apparently higher than 57.1% using TPPA ($P<0.05$). The specificity of the established method was 100% comparing with TPPA. Conclusion The established method of Tp0259-PCR has high sensibility and specificity. This method might be better than serological method in diagnosis of primary syphilis, but its clinical diagnosis value need to be repeatedly verified by more clinical specimens.

Key words: Treponema pallidum; polymease chain reaction; primary syphilis

梅毒是一种由梅毒螺旋体(Tp)引起的严重危害成人和新生儿健康的性传播疾病(STD),中国梅毒发病数已多年超过淋病而居 STD 首位,其中先天性梅毒和男-男同性接触伴艾滋病性梅毒病例数近年增长呈直线上升趋势^[1-2]。梅毒是一种慢性、系统的传染性疾病,对健康危害程度仅次于艾滋病,几乎可以累及全身各个器官,导致功能障碍^[3]。由于缺乏疫苗,早期发现和控制传染源成为控制梅毒传播的重要措施^[4]。梅毒临床表现十分复杂,临床诊断主要依赖实验室血清学方法,但此类方法对二期梅毒的敏感性低^[5]。聚合酶链反应(PCR)是诊断二期梅毒敏感、特异的方法,目前针对 Tp 检测的靶基因有:tpf-1、BMP、tmp、 47×10^3 蛋白基因、16S rRNA 等,但这些基因大部分与其他微生物具有同源性,扩增时容易出现假阳性,因此需要寻找 Tp 更为特异的靶基因^[6]。本研究首次建立 Tp0259-PCR 方法,初步评价其在二期梅毒诊断中的应用,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 标准菌株基因组 Tp 标准株的基因组、解脲支原体

(Uu)标准株、人型支原体(Mh)标准株、淋球菌(NG)标准株和沙眼衣原体(CT)标准株由南华大学病原生物研究所惠赠。

1.2 临床标本 2013 年 2 月至 2014 年 2 月怀化市第一人民医院皮肤性病科确诊二期梅毒就诊患者 42 例,其中男 24 例,女 18 例,平均 28 岁,均有不洁性接触史,外生殖器有典型硬下疳、红丘疹或糜烂。用无菌棉拭子采集感染部位的分泌物标本用于 PCR 扩增,同时采集相应患者静脉血 2 mL,分离血清用于血清学实验。

1.3 仪器与试剂 Tp0259-PCR 采用美国 eppendorf AG 温度梯度 PCR 仪,凝胶成像系统为美国的 UVP White/Ultraviolet Transilluminator,电泳仪和电泳槽为北京六一仪器厂提供。DNA 提取试剂盒为上海生物工程有限公司产品,PCR 扩增相关产品、DNA 引物购自天根生化科技(北京)有限公司;Tp 明胶颗粒凝集试验(TPPA)试剂为日本富士瑞必欧株式会社产品。

1.4 方法

1.4.1 PCR 引物设计与合成 从 Genbank 获取 Tp0259 基因

* 基金项目:怀化市科技局课题(怀财企指[2013]4 号 1-13);湖南省教育厅课题(11C1014)。 作者简介:杨长顺,男,副主任技师,主要从事临床微生物检验工作研究。 △ 通讯作者, E-mail:xiupingzhou@163.com。

序列(基因序列号:NC_000919),应用 BLAST 软件分析在不同 Tp 临床株的保守区域及与其他物种的特异区域,在此区域再用 NCBI/ Primer-BLAST 在线软件设计以下引物:上游引物:5'-3'ATG TAT CTT GTC TTC ATT GGG GTT C;下游引物:5'-3'GCG CGG ATT TGA GCA AAC TG,引物由 Invitrogen 公司合成。以下为 Tp0259 的碱基序列(包括一部分上游序列和一部分下游序列)。

GAT TTT CCC CAT GAG GTG GCA TGT ATC TTG
TCT TCA TTG GGG TTC TGT GTG AAA ATG GGC CGC
TAT TTT GTC CGG ATT GTG CGT GCA GTC TGG AGG
AGG AGA CGA TGA TGA GGA AGC TTA GTA CGG GCC
TGT TGC TGT GGA TTG CGT TTA TCT CGG GTG TTA
CGT CCT GCA AGT CTG CGC CTC CGG CGG AGG AGC
TCG TGG AAG TTG CGC CGC CTG TGG AGG AGC AGG
AAG AAG AGC CCA TGA CGC CCG TCC CCG AGG AGC
CGC AGG AGC CTA TGG CAG TCG CTC CGC AAG AGG
TGT CGC GTG CTG AGT ACG TGG TCA AAA ACG AAG
ACA CCC TTT CTC AAA TTG CTA AAA AGT TTT ACG
GCT CGC GCA TCC GCG GAT ACT ATT TCC CCA TTA
TTA TGG CCT GTA GTG AGG GCG TGG TAA CGC ATC
CAG ACC GCA TTA GGC CAG GTA TGA AGT TGG TTA
TTC CGA ACT TTG ACG AGT TTA TGG CTG ATC CGG
ATC ATG TCC GCA AGG GGC TTG AGG CAT TCG CCC
AGG TAG AGC GTA TCT ATC GTT CTG AGG GTA AGA
TGA AGC TAG CTG AGT TTA TGA ACA AAC TCG GGG
AAA AAA TCG GCA AGA CCG ATC CTC GGG ACA TGC
CGC GCT AGG AGT CAC TGC GCG CCA GTT TGC TCA
AAT CCG CGC CGG GGT GGC AGC TG。

1.4.2 DNA 模板制备 分泌物标本用 DNA 提取试剂盒提取 DNA 模板,按试剂盒说明书操作。

1.4.3 Tp0259-PCR 建立 通过改变退火温度,优化后 PCR 反应体系与反应条件。反应体系:2X Taq PCR MasterMix 12.5 μL、25 fmol/L 上下游引物各 1.0 μL、Tp 标准株 DNA 模板或磷酸盐缓冲液(PBS,阴性对照)1 μL、加双蒸水补足至 25 μL。扩增条件:95℃ 5 min;94℃ 30 s、59℃ 30 s、72℃ 40 s,共 40 个循环;72℃ 延伸 5 min。取扩增产物 10 μL,用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,核酸染料染色观察,凝胶成像系统记录结果。

1.4.4 Tp029-PCR 检测临床标本 以建立的 Tp0259-PCR 检测确诊一期梅毒的分泌物标本,模板上样量为 1 μL。

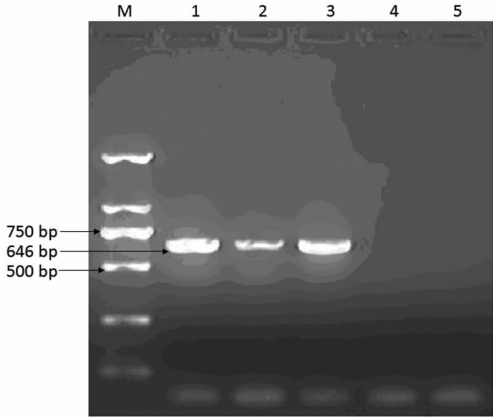
1.4.5 血清学检测抗 Tp 抗体 待测血清采用 TPPA 检测抗 Tp 抗体,严格按试剂盒说明书进行。

1.5 统计学处理 用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析,计数资料以例数表示,组间两两比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

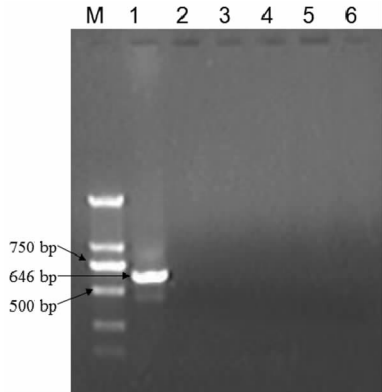
2 结 果

2.1 Tp0259-PCR 的建立 PCR 扩增产物在琼脂糖凝胶电泳中结果见图 1,可见在 646 bp 左右位置见一特异性条带,与预期 DNA 片断大小一致,而阴性对照(PBS)未见条带。

2.2 Tp0259-PCR 特异性检测 新构建 PCR 扩增方法特异性检测见图 2。可见 Tp 标准株在 646 bp 左右位置见一特异性条带,而泌尿生殖道常见感染病原菌均未见扩增条带。



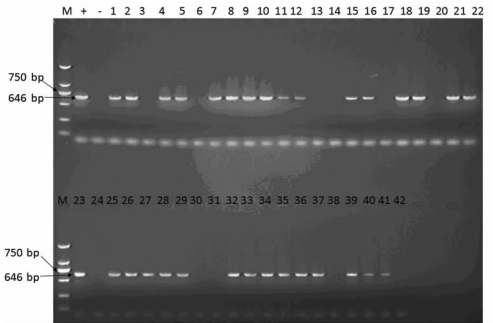
M:DNA 标志物(DL2000);1~3:阳性对照;4~5:阴性对照。
图 1 Tp0259 PCR 产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析



M:DNA 标志物(DL2000);1:Tp 标准株;2:阴性对照;3:NG 标准株;4:Uu 标准株;5:Mh 标准株;6:CT 标准株。

图 2 新构建扩增方法特异性检测结果

2.3 Tp0259-PCR 检测临床株 Tp029-PCR 检测 42 例确诊一期梅毒的部分结果见图 3。



M:DNA 标志物(DL2000);+:Tp 标准株;-:阴性对照;1~42:Tp 临床株。

图 3 Tp0259-PCR 产物检测一期梅毒的 Tp 临床株(部分)

表 1 Tp0259-PCR 与 TPPA 检测一期梅毒结果比较(n)

Tp0259-PCR	TPPA		合计
	+	-	
+	24	7	31
-	0	11	11
合计	24	18	42

2.3 Tp0259-PCR 与 TPPA 检测结果比较 Tp0259-PCR 与

TPPA 检测见表 1。从表可知, Tp0259-PCR 对确诊一期梅毒的检出率(73.8%, 31/42)高于 TPPA(57.1%, 24/42), 差异有统计学意义($P<0.05$); 与 TPPA 法相比, Tp0259-PCR 特异度为 100%。

3 讨 论

梅毒实验室诊断包括病原学和血清学方法。血清学方法确诊梅毒主要依赖检测抗 Tp 特异性抗体, 是目前临床诊断的主要方法, 包括 TPPA、荧光密螺旋体抗体吸收试验(FTA-Abs)、基于 Tp 重组抗原的酶联免疫吸附试验(ELISA)等。以 Tp 天然蛋白或重组抗原为诊断抗原, 特异性非常高, 目前常作为梅毒诊断的金标准^[7], 对二期梅毒、潜伏期梅毒的灵敏度高, 但由于 Tp 感染后 2~3 周才开始出现特异性 IgM 类抗体, 因而此类方法对一期梅毒的灵敏度较低^[7], 对一期梅毒常造成漏诊。本结果显示, TPPA 对疑似一期梅毒的检出率为 57.1%。

一期梅毒典型的临床表现是外生殖器局部出现无痛性硬下疳, 其溃疡面含 Tp, 但对于一些不典型病例, 容易与生殖器疱疹、软下疳及细菌性或霉菌性龟头炎(阴道炎)混淆。由于 Tp 至今还不能人工培养, 病原学检测 Tp 的常规方法是暗视野显微镜(DFM)和免疫荧光染色观察临床标本, DFM 在螺旋体数量较少时灵敏度低, 而且 Tp 形态易与其他螺旋体混淆, 受主观因素影响, 观察时需要经验丰富的技师。因此, 当临床上出现血清学和 DFM 呈阴性的一期梅毒时, PCR 显示出其独特的优越性。PCR 是一种体外核酸扩增方法, 可在数小时内将特异性目的片段扩增上百万倍, 与 DFM 相比, 具有敏感、特异、客观的优点, 尤其适用于抗体尚未产生前的一期梅毒^[7], 在此期其灵敏度高于血清学方法。

目前针对 Tp 检测的靶基因已有 tpf-1、BMP、tmp、 47×10^3 蛋白基因、16S rRNA 等, 但这些基因大部分与其他微生物具有同源性, 扩增时易出现假阳性, 因此有待发现更为特异的靶基因^[8]。2010 年, McGill 发现了包括 Tp0259 在内的几个 Tp 特异性蛋白, 笔者推测这几个蛋白及其编码基因具有潜在的诊断价值^[9], 是本研究选题的依据。特异性和敏感性是 PCR 方法基因诊断的两个主要问题。PCR 的引物设计必须遵循保守性和特异性原则, 保守性是指扩增引物序列在临床株间高度保守, 以保证扩增出各种不同临床株。特异性是指在其他生物种中无此序列, 以保证不扩出非特异性产物。笔者应用 BLAST 分析 Tp0259 基因, 设计特异性引物。PCR 敏感性主要影响因素为退火温度, 通过反复摸索反应条件, 发现在 59℃退火时产

物最多、条带最亮, 以此作为优化后的反应体系和条件, 建立 PCR 扩增 Tp0259 基因。以此建立的方法检测确诊一期梅毒的分泌物标本, 阳性率为 73.8%, 明显高于 TPPA 法的 57.1%, 而在 TPPA 阴性的待检标本中未检出阳性, 表明该 PCR 方法具有高度特异性。

综上所述, 本研究首次建立的 Tp0259-PCR 方法具有高灵敏度和特异度, 在一期梅毒的诊断中敏感性高于血清学方法, 显示出良好的应用前景, 但需要通过大量临床标本进行反复验证, 有待深入研究。

参考文献

[1] Tucker JD, Chen XS, Peeling RW. social upheaval in China[J]. N Engl J Med, 2010, 362(18):1658-1661.

[2] Xiao Y, Sun J, Li C, et al. Prevalence and correlates of HIV and syphilis infections among men who have sex with men in seven provinces in China with historically low HIV prevalence[J], 2010, 3(1):66-73.

[3] 廖群, 刘小玲, 郭惠. 时间分辨免疫荧光法用于梅毒抗体测定的探讨[J]. 中国实验诊断学, 2014, 18(3):447-450.

[4] Lafond RE, Lukehart SA. Biological basis for syphilis[J]. Clin Microbiol Rev, 2006, 19(1):29-49.

[5] Van Voorhis WC, Barrett LK, Lukehart SA, et al. Serodiagnosis of syphilis: antibodies to recombinant Tp0453, Tp92, and Gpd proteins are sensitive and specific indicators of infection by Treponema pallidum[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(8):3668-3674.

[6] Liu H, Rodes B, Chen CY, et al. New tests for syphilis: rational design of a PCR method for detection of Treponema pallidum in clinical specimens using unique regions of the DNA polymerase I gene[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(5):1941-1946.

[7] Castro R, Prieto ES, Aguas MJ, et al. Evaluation of the treponema pallidum particle agglutination technique (TP. PA) in the diagnosis of neurosyphilis[J]. J Clin Lab Anal, 2006, 20(6):233-238.

[8] Heymans R, van der Helm JJ, de Vries HJ, et al. Clinical value of Treponema pallidum real-time PCR for diagnosis of syphilis[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(2):497-502.

[9] McGill MA, Edmondson DG, Carroll JA, et al. Characterization and serologic analysis of the Treponema pallidum proteome[J]. Infect Immun, 2010, 78(6):2631-2643.

(收稿日期:2015-05-31)

(上接第 2302 页)

的经验, 培养符合本市实践的临床病理学家, 使其成为有效增强医院整体诊疗水平的桥梁和助推器。只有将临床实践与检验医学有机结合, 运用好实验诊断学这门学科才能提高对疾病的诊治水平。

参考文献

[1] 降钙素原急诊临床应用专家共识组. 2012 降钙素原(PCT)急诊临床应用的专家共识[J]. 中华急诊医学杂志, 2012, 21(9):12-13.

[2] 丛玉隆. 检验分析前质量控制存在的问题与对策[J]. 中国医学论坛报, 2005, 11(16):524.

(收稿日期:2015-05-26)

[3] 蒋炳林. 医学检验数据的临床应用问题与对策[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(24):3434.

[4] 张正. 加强检验科与临床结合的探讨[J]. 中华检验医学杂志, 2003, 26(1):60-61.

[5] 李栋, 李艳, 余红, 等. 现代医院检验科“速度管理”的必要性[J]. 中华检验医学杂志, 2004, 27(6):344-345.

[6] 丛玉隆. 加强检验科与临床交流促进检验科与临床结合[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(1):2-5.