

两种巢氏 PCR 方法检测二期梅毒血液标本的比较

肖勇健, 刘卓然, 李蓓, 刘斌, 彭菁

南华大学第二附属医院检验科, 湖南 衡阳 421001

摘要: **目的** 比较两种巢氏 PCR 方法在检测二期梅毒患者血液标本中的价值。 **方法** 针对 *tpp47* 和 *polA*, 分别建立两个巢氏 PCR 扩增全血中的梅毒螺旋体 DNA。 **结果** 在 353 例梅毒阳性全血中, nPCR-*tpp47* 和 nPCR-*polA* 分别检出 142 例 (40.2%) 和 132 例 (37.4%), 结果差异有统计学意义 ($\chi^2 = 5.79, P < 0.05$); 两种巢氏 PCR 在血清学试验高滴度 (RPR $\geq 1:8$ 或 TPPA $\geq 1:2\ 560$) 组的检出率明显高于低滴度组 (RPR $< 1:8$ 或 TPPA $< 1:2\ 560$)。 **结论** 在检测二期梅毒全血标本 Tp DNA 时, nPCR-*tpp47* 优于 nPCR-*polA*; 巢氏 PCR 方法可作为梅毒血清学试验的补充试验。

关键词: 巢氏 PCR; 二期梅毒; 全血; *tpp47*; *polA*

中图分类号: R446.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2016)08-0904-04 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2016.08.003

Comparison of two nested-PCR methods for detection of *Treponema pallidum* in whole blood from patients with secondary syphilis

XIAO Yong-jian, LIU Zhuo-ran, LI Bei, LIU Bin, PENG Jing

Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of University
of South China, Hengyang, Hunan 421001, China

Abstract: **Objective** To compare the value of two nested-PCR methods in detecting *Treponema pallidum* (Tp) isolates in whole blood from patients with secondary syphilis. **Methods** Two nest-PCR methods targeted at Tp-*tpp47* and Tp-*polA* were developed and used to amplify *Treponema pallidum* DNA in whole blood. **Results** Among 353 Tp seropositive whole blood samples, 142 (40.2%) and 132 (37.4%) samples were respectively positive for nPCR-*tpp47* and nPCR-*polA*, indicating a statistically significant difference ($P < 0.05$). The positive rates detected by the two nested-PCR methods in the group with high titers (RPR $\geq 1:8$ or TPPA $\geq 1:2\ 560$) were significantly higher than those in the group with low titers (RPR $< 1:8$ or TPPA $< 1:2\ 560$). **Conclusions** The nPCR-*tpp47* is superior to the nPCR-*polA* in the detection of *Treponema pallidum* DNA in whole blood from patients with secondary syphilis, and it is a useful supplemental serological test for the diagnosis of syphilis.

Key words: Nested-PCR; Secondary syphilis; *Treponema pallidum*; *tpp47*; *polA*

近年来,我国梅毒的报告感染率和发病率呈直线上升趋势^[1-2],2014 年全国报告发病率达 32.98/10 万,梅毒发病率连续 5 年居全国甲乙类法定传染病的第 3 位^[3]。因此,对梅毒进行有效的监控和防治已成为我国乃至全球公共卫生方面普遍关注的重点^[4]。在《中国预防与控制梅毒规划(2010-2020 年)》白皮书中,我国梅毒控制主要措施就包括提高梅毒实验室检测质量及加强梅毒筛查力度。

梅毒血清学试验分为非特异性梅毒螺旋体血清学试验和特异性梅毒螺旋体(*Treponema pallidum*, Tp)血清学试验,是诊断梅毒的主要实验室依据,现已普及各级医院,然而血清学试验阳性并不能反应出患者真实感染状态,比如血清学试验阳性的胎儿是否能诊断为胎传梅毒、患者究竟是血清固定还是梅毒复发或治疗

失败等。病原学检查是诊断感染性疾病的直接证据,然而目前 Tp 在人工培养基尚不能培养,且患者硬性下疳自愈进入二期梅毒后, Tp 随血流播散至全身使得暗视野镜检无法实现。因而,近年来许多学者不断探索采用针对不同靶基因建立 PCR 方法来检测 Tp^[5-10],其中常见的靶基因为 *tpp47* 和 *polA*, *tpp47* 编码的外膜蛋白有很强的免疫原性,为致病菌特有蛋白, *polA* 普遍存在各种微生物,在 DNA 复制和修复时必不可少,在其保守的功能区含有与其它绝大多数生物细胞不同的核苷酸序列,编码的蛋白含有较多的半胱氨酸残基,具有高度的特异性^[16]。本文采用巢氏 PCR 方法,比较 *tpp47* 和 *polA* 作为靶基因在二期梅毒血液标本中的诊断价值。

1 材料与方法

1.1 标本与菌株 收集 2014 年 1 月-2015 年 1 月间在南华大学第二附属医院,南华大学第一附属医院皮

基金项目: 湖南省科技厅一般项目(2014TT2025)

作者简介: 肖勇健(1972-),男,湖南衡阳人,硕士,副主任技师,主要从事临床微生物检验工作, E-mail: marlish@126.com。

肤性病门诊就诊患者的全血。二期梅毒诊断依据 2007 年中国卫生部发布并实施的梅毒诊断标准。共收集到二期梅毒患者全血 353 份,20 份健康献血者全血(来源于衡阳市中心血站),Tp Nichols 标准株(来源于南华大学病原生物研究所),钩端螺旋体(来源于湖南省疾病预防控制中心)及伯氏螺旋体(来源于中国疾病预防控制中心)。

1.2 仪器及试剂 PCR 仪(珠海黑马医学仪器有限公司)、电泳仪(北京六一仪器厂)、凝胶成像仪(Bio-rad 公司)、RPR 试剂盒(珠海丽珠)、TPPA 试剂盒(日本富士株式会社)、血液基因组 DNA 提取试剂盒(TIANGEN 公司)、细菌基因组 DNA 提取试剂盒(TIANGEN 公司)、2×Taq PCR MasterMix(TIANGEN 公司)、100 bp DNA Marker(TIANGEN 公司)。

1.3 方法

1.3.1 血清学试验 全血标本分离出血浆后分别采用 RPR 和 TPPA 进行定量检测,操作步骤及结果判定严格按照试剂盒说明书进行。

1.3.2 DNA 提取 取 1 ml EDTA 抗凝全血(分别来源于 353 例二期梅毒患者、20 例健康献血者),按照血液基因组 DNA 提取试剂盒中的说明书提取 DNA 模板。Tp Nichols 标准株、钩端螺旋体及伯氏螺旋体按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒中的说明书提取 DNA。所有 DNA 模板置-80℃保存。

1.3.3 nested-PCR 引物与扩增条件参考文献^[7-8,10],引物序列由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,引物见表 1。反应体系为 25 μl:2×Taq PCR MasterMix 12.5 μl、10 μM 引物各 1.5 μl、DNA 模板 5 μl(第二轮反应时,DNA 模板为 1:20 稀释的第一轮扩增产物),加灭菌双蒸水 4.5 μl。同时设对照组(阳性对照为 Tp Nichols 标准株、阴性对照为钩端螺旋

体和伯氏螺旋体、正常对照组为健康献血者、空白对照为灭菌双蒸水)。反应条件:*tpp47*-F1/*tpp47*-R1 及 *tpp47*-F2/*tpp47*-R2 扩增(94℃ 3 min,94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 1 min,36 个循环,终延伸 72℃ 5 min);*polA*-F1/*polA*-R1 及 *polA*-F1/*polA*-R2 扩增(94℃ 3 min,94℃ 30 s,65℃ 30 s,72℃ 1 min,36 个循环,终延伸 72℃ 5 min)。取扩增产物 10 μl,用预加入 SYBR Green I 染料的 2% 琼脂糖凝胶电泳(80 mA,50 min),凝胶成像仪分析结果。

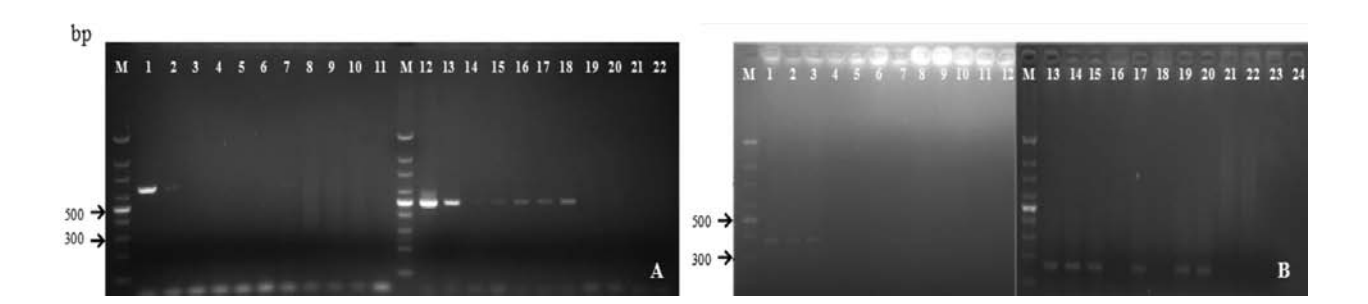
表 1 nested-PCR 引物序列

引物	靶基因	
	<i>tpp47</i>	<i>polA</i>
F1	5'-GACAATGCTCACTGAGGATAGT-3'	5'-CGTCTGCTGATGTCAGAAATGACTG-3'
R1	5'-ACGCACAGAACCGAATTCCTTG-3'	5'-CACAGTCTCTCAAAAACGCCCTGCAOG-3'
F2	5'-TTCTGCTAGACACGGTGGGTAC-3'	
R2	5'-TGATCGCTGACAAGCTTAGGCT-3'	5'-TGCACATGTACACTGAGTTGACTCGG-3'

1.3.4 统计学处理 使用 SPSS12.0 统计软件分析,比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Nested-PCR 扩增 *tpp47* 和 *polA* *tpp47* 外引物预期扩增片段为 658 bp,内引物 496 bp;*polA* 外引物预期扩增片段为 377 bp,内引物 174 bp。阳性对照(Tp Nichols 标准株)均出现目的条带,阴性对照组(钩端螺旋体、伯氏螺旋体和健康献血者)及空白对照组(灭菌双蒸水)均未见目的条带,见图 1。其中 *tpp47* 外引物扩增出阳性 35 例,内引物扩增出 142 例,阳性率 40.2%;*polA* 外引物扩增出阳性 27 例,内引物扩增出 132 例,阳性率 37.4%,见表 2。经卡方检验,nPCR-*tpp47* 和 nPCR-*polA* 在检测二期梅毒患者全血标本中的 Tp DNA 时,差异有统计学意义($\chi^2 = 5.79, P < 0.05$),nPCR-*tpp47* 检出率高于 nPCR-*polA*。



注:M, 100bp DNA Marker; A: 1, 12 lane 为 Tp nichols 标准株; 2~7 lane 和 13~18 lane 分别为外引物和内引物检测临床全血标本 PCR 产物; 8~11 lane 依次为外引物扩增钩端螺旋体、伯氏螺旋体、健康献血者及空白对照; 19~22 lane 依次为内引物扩增钩端螺旋体、伯氏螺旋体、健康献血者及空白对照。B: 1, 13 lane 为 Tp nichols 标准株; 2~8 lane 和 14~20 lane 分别为外引物和内引物检测临床全血标本 PCR 产物; 9~12 lane 依次为外引物扩增钩端螺旋体、伯氏螺旋体、健康献血者及空白对照; 21~24 lane 依次为内引物扩增钩端螺旋体、伯氏螺旋体、健康献血者及空白对照。

图 1 nPCR-*tpp47*(A) 和 nPCR-*polA*(B) 扩增产物 2% 琼脂糖凝胶电泳

组别	nPCR- <i>tpp47</i>		合计	
	+	-		
nPCR- <i>polA</i>	+	130	2	132
	-	12	209	221
合计		142	211	353

2.2 Nested-PCR 和血清学方法检测结果 见表 3。nPCR 在血清学试验高滴度 (RPR≥1:8 或 TPPA≥1:2 560) 时阳性率明显高于低滴度 (RPR<1:8 或 TPPA<1:2 560), 其中 nPCR-*tpp47* 在 RPR≥1:8 组阳性率 (59.6%) 显著高于在 RPR<1:8 组阳性率 (8.9%) ($\chi^2=89.14, P<0.01$); nPCR-*tpp47* 在 TPPA≥1:2 560 组阳性率 (45.2%), 显著高于在 TPPA<1:2 560 组阳性率 (11.5%) ($\chi^2=20.94, P<0.01$)。另外 nPCR-*polA* 在 RPR≥1:8 组阳性率 (56.9%) 显著高于在 RPR<1:8 组的阳性率 (5.9%) ($\chi^2=92.63, P<0.01$); nPCR-*polA* 在 TPPA≥1:2 560 组时阳性率 (41.5%) 显著高于在 TPPA<1:2 560 组的阳性率 (13.7%) ($\chi^2=14.85, P<0.01$)。

表 3 353 例 nPCR 结果与血清学结果比较 (n, %)

组别	RPR		TPPA	
	<1:8 (n=135)	≥1:8 (n=218)	<1:2560 (n=52)	≥1:2560 (n=301)
nPCR- <i>tpp47</i>				
阳性	12 (8.9)	130 (59.6)	6 (11.5)	136 (45.2)
阴性	123 (91.1)	88 (39.5)	46 (88.5)	165 (54.8)
nPCR- <i>polA</i>				
阳性	8 (5.9)	124 (56.9)	7 (13.5)	125 (41.5)
阴性	127 (94.1)	94 (43.1)	45 (86.5)	176 (58.5)

3 讨 论

二期梅毒的损害多种多样, 在性接触感染后 3 个月内, 临床表现最为典型, 出现高含量梅毒螺旋体血症峰值期, 并发生全身感染, 具有全身各系统及粘膜表现。最常见的临床表现为弥漫性丘疹、扁平湿疣、脓疱疹、梅毒性脱发等, 另外还可出现骨骼、感觉器官及神经损害, 比如脑膜炎、眼部炎症、粘膜斑块、肝炎和胃动力障碍等症状^[11], 临床上易造成误诊和漏诊。

PCR 作为梅毒诊断的一种新手段, 是 Tp 感染存在的直接证据。近十年来, 应用 PCR 技术可检测 Tp 的临床样本多种多样^[5, 10, 12-13]。有研究表明, 采用 PCR 技术检测一期梅毒患者体内 Tp DNA 最适合的标本是生殖器溃疡分泌物, 敏感性和特异性分别可达 85% 和 95%^[5, 10]。而在二期梅毒时, 随着梅毒下疳的清除, 分泌物难以获得, 此时 Tp 随血流播散至全身各组织器官^[11, 14], 梅毒症状变化多样, 若仅凭借梅毒螺旋体特异性抗体来诊断疾病, 易与其他疾病混淆, 此时联合检测血液标本中 Tp DNA 较为理想。近年来针对梅毒患

者血液标本的 Tp-PCR 报道显示阳性率从 24%~38% 不等, 究其原因, 可能为血液中存在 PCR 抑制物, 另外血液标本中 Tp DNA 载量过低也是一个主要因素, 以及靶基因的敏感性较低等原因, 但特异性可达 100%^[7, 9, 12]。其中最常用的靶基因是 *tpp47* 和 *polA*^[7, 9-10, 12-13]。

巢氏 PCR 在常规 PCR 的基础上, 引入一对特异性内引物对常规 PCR 产物进行再一轮扩增, 极大地提高了 PCR 的敏感性和特异性, 弥补了常规 PCR 由于全血中病原体载量过低而导致检出率低的缺点; 此外, 也避免了全血标本中 DNA 信息量大, 可能存在未知的、具有与引物相似序列的 DNA 片段从而导致出现非特异性片段。张然等^[17]采用巢氏 PCR 检测环境水源中的嗜肺军团菌时, 显示出较好的敏感性和特异性。本研究应用巢氏 PCR 技术针对 Tp-PCR 常用的两个靶基因, 来检测二期梅毒患者的全血标本, 均得到较好的效果, 阳性率稍高于文献报道^[7, 9, 12], 其中采用 nPCR-*tpp47* 来检测二期梅毒患者血液标本阳性率要高于 nPCR-*polA*, 显示 *tpp47* 作为靶基因在检测血液中的 Tp DNA 时, 要优于 *polA*。值得注意的是, 将血清学试验结果分为高滴度组 (TPPA≥1:2 560 或 RPR≥1:8) 和低滴度组时 (TPPA<1:2 560 或 RPR<1:8), nPCR 在高滴度组的检出率要显著高于低滴度组, 可能是二期梅毒时机体产生体液免疫应答与血液中的梅毒螺旋体载量正相关, 表明在梅毒血清学试验出现高滴度结果时, 可辅以 Tp-PCR 检测, 以进一步明确诊断以及作为临床疗效监测的指标。

目前, 梅毒血清学试验仍是梅毒实验室诊断的主流方法。而 Tp-PCR 在我国仅限于研究层次, 尤其应用于检测全血样本时, 存在较低的阳性率。但在欧洲有学者认为 Tp-PCR 可作为明确早期梅毒和二期梅毒诊断的直接证据^[15]。随着 PCR 技术在梅毒诊断中的不断完善, 将其结合血清学试验, 在梅毒的诊断、疗效监测、判定血液是否有传染性、流行病学调查等方面将起着重要作用。

参考文献

[1] 龚向东, 岳晓丽, 滕菲, 等. 2000-2013 年中国梅毒流行特征与趋势分析[J]. 中华皮肤科杂志, 2014, 47(5): 310-315.

[2] 覃碧云, 陈曦, 陈碧云, 等. 湖南省 1995-2009 年梅毒流行病学分析[J]. 实用预防医学, 2011, 18(10): 2001-2003.

[3] 陶长余, 章士军, 陈郁. 2005-2014 年我国梅毒发病率趋势分析及预测[J]. 职业与健康, 2015, 31(21): 3026-3030.

[4] Stephenson J. Medical news & perspectives: syphilis outbreak sparks concerns[J]. JAMA, 2003, 289(8): 974.

[5] Martin IE, Tsang RSW, Sutherland K, et al. Molecular characterization of syphilis in patients in Canada: azitromycin resistance and detection of *Treponema pallidum* DNA in whole-blood samples versus ulcerative swabs[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(6): 1668-1673.

2013 年长沙市高一新生急救知识现状分析

成美娟¹, 谭红专², 朱丽辉¹, 王可为¹, 朱晟¹, 仇君¹

1. 湖南省儿童医院, 湖南 长沙 410007; 2. 中南大学公共卫生学院

摘要: **目的** 通过对长沙市高一新生急救知识的掌握现状进行抽样调查, 了解长沙市中学生急救知识掌握的现状。**方法** 2013 年采取随机整群抽样的原则, 抽取长沙市 7 687 名高一新生作为本次研究的对象, 通过问卷调查的方法掌握高一新生对急救科普知识和技能掌握的现状。采用 SPSS18.0 进行数据分析, 计数资料采用频数分析和卡方检验。**结果** 高一新生获取急救知识的主要途径依次为书本 (62.16%)、电视 (60.22%)、网络 (55.54%) 和学校 (54.04%)。本研究对 5 项急救常识进行调查发现, 高一新生对急救电话号码知晓率最高 (97.46%), 其他急救常识均低于 50%。对 5 项急救措施调查发现, 高一新生对一氧化碳中毒急救措施的知晓率最高 (88.07%), 其次为足踝部外伤, 知晓率为 73.92%, 对其他 3 项急救措施知晓程度低于 30%。高一新生对严重创伤的现场急救原则和脊柱骨折伤员的搬运原则的知晓程度较开放性骨折处理原则的知晓度高, 前两者知晓率在 60% 以上, 后者知晓率仅达到 30%。对于“急救现场第一反应”和“烫伤的急救措施”的知晓率分别为 38.09% 和 13.79%, 曾经接受过培训的高一新生知晓率高于未接受过培训的高一新生, 经统计学分析差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 2013 年长沙市高一新生对急救知识的了解率低, 因此增加高一新生对常见意外伤害的急救知识和处理原则的培训迫在眉睫。

关键词: 急救知识; 高一新生; 意外伤害

中图分类号: R193 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2016)08-0907-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2016.08.004

Current situation of first aid knowledge in high school freshmen in Changsha City, 2013

CHENG Mei-juan*, TAN Hong-zhuan, ZHU Li-hui, WANG Ke-wei, ZHU Sheng, QIU Jun

* Hunan Children's Hospital, Changsha, Hunan 410007, China

Corresponding author: QIU Jun, E-mail: qijuntrevor@163.com

Abstract: **Objective** To investigate the current situation of first aid knowledge in high school freshmen in Changsha City by a sampling survey. **Methods** A total of 7,687 high school freshmen selected by random cluster sampling in Changsha City in 2013 served as the research subjects. The current status of the freshmen's first aid knowledge and skills was investigated through a questionnaire survey. The results were statistically analyzed by SPSS18.0. The categorical data were analyzed by frequency analysis and Chi-square test. **Results** First aid knowledge of the freshmen was mainly acquired from books (62.16%), television

基金项目: 湖南省科技厅重点项目 (2013ZK2053)

作者简介: 成美娟, 女, 湖南永州人, 硕士, 研究方向: 儿童保健。

通讯作者: 仇君, E-mail: qijuntrevor@163.com。

- [6] Casal CA, Silva MO, Costa IB, et al. Molecular detection of *Treponema pallidum* sp. *pallidum* in blood samples of VDRL-seroreactive women with lethal pregnancy outcomes: a retrospective observational study in northern Brazil[J]. Rev Soc Bras Med Trop, 2011, 44:451-456.
- [7] 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.
- [8] Burstain JM, Grimpel E, Lukehart SA, et al. Sensitive detection of *Treponema pallidum* by using the polymerase chain reaction[J]. J Clin Microbiol, 1991, 29(1):62-69.
- [9] Castro R, Prieto E, Aguas MJ, et al. Detection of *Treponema pallidum* sp *pallidum* DNA in latent syphilis[J]. Int J STD AIDS, 2007, 18:842-845.
- [10] Grange PA, Gressier L, Dion PL, et al. Evaluation of a PCR test for detection of *Treponema pallidum* in swabs and blood[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(3):546-552.
- [11] LaFond RE, Lukehart SA. Biological basis for syphilis[J]. Clin Microbiol Rev, 2006, 19:29-49.
- [12] Gayet-Ageron A, Ninet B, Toutous-Trellu L, et al. Assessment of a real-time PCR test to diagnose syphilis from diverse biological samples [J]. Sex Transm Infect, 2009, 85(4):264-269.
- [13] Kouznetsov AV, Weisenseel P, Trommler P, et al. Detection of the 47-kilodalton membrane immunogen gene of *Treponema pallidum* in various tissue sources of patients with syphilis[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2005, 51:143-145.
- [14] Salazar JC, Rathi A, Michael NL, et al. Assessment of the kinetics of *Treponema pallidum* dissemination into blood and tissues in experimental syphilis by real-time quantitative PCR[J]. Infect Immun, 2007, 75:2954-2958.
- [15] Janier M, Hegyi V, Dupin N, et al. 2014 European guideline on the management of syphilis[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2014, 28:1581-1593.
- [16] Rodes B, Liu H, Johnson S, et al. Molecular cloning of a gene (*polA*) coding for an unusual DNA polymerase I from *Treponema pallidum*[J]. J. Med. Microbiol, 49:657-667.
- [17] 张然, 陈桂冰, 邱亚群, 等. 环境水中嗜肺军团菌分离培养与巢氏 PCR 检测研究[J]. 实用预防医学, 2015, 22(1):31-33.

收稿日期: 2016-01-11