

· 技术交流 ·

用聚合酶链反应快速检测血液中伤寒杆菌

杨绍基^① 文 博 高志良 马义跃 姚集鲁 彭文伟

(中山医科大学附属第三医院传染病科, 广州, 510630)

提 要 用聚合酶链反应(PCR)检测伤寒患者血液标本中伤寒杆菌。根据伤寒杆菌鞭毛抗原基因 DNA 的核苷酸序列,合成 2 对寡核苷酸引物,以该基因的 DNA 片段作为模板,经首次 PCR 和巢式 PCR 扩增后,产物分别为 458 bp 和 343 bp 的寡核苷酸片段。首次 PCR 检测的敏感度可达 10 条伤寒杆菌 DNA 水平。对 10 例有伤寒临床表现、血培养有伤寒杆菌生长的患者的血液标本进行了 PCR 检测,结果,首次 PCR 检测 9 例呈阳性;嵌套式 PCR 检测 10 例均呈阳性。对其中 3 例伤寒患者的血清和白细胞分别作 PCR 检测,结果均呈阳性。这些结果提示大部分伤寒患者的血清标本只需作首次 PCR 检测即可呈阳性。由于作者对标本的预处理方法作了改进,于 9h 后可获首次 PCR 结果。

主题词 伤寒/微生物学;沙门氏菌,伤寒/血液;聚合酶链反应

中图分类号 R516.3; 378.23

目前,伤寒在我国和其它发展中国家仍是一种常见的传染病。提高伤寒的治愈率、减少并发症和病死率的关键是早期诊断,及时对病原进行有效的治疗。过去常用肥达试验(Widal test)检测患者血清中特异性抗体,但其检测结果并不十分可靠。试验的敏感性和特异性均存在一定问题^[1]。伤寒的确诊有赖于患者的血液或骨髓标本中培养有伤寒杆菌生长。伤寒杆菌培养的阳性率受患者取血标本时是否已用抗菌药物、血中菌密度和培养条件等因素影响,一般血培养阳性率仅为 45%~70%。骨髓培养的阳性率较高,但对每个病例都作骨髓培养尚有困难,而且常需 3~5d 后才有结果,不利于伤寒的早期诊断^[2,3]。Rubin 等曾用 DNA 探针检测患者血液中伤寒杆菌,发现特异性强,但敏感度低,容易出现假阴性^[4]。用 PCR 检测患者血中伤寒杆菌 DNA 有特异性强、敏感度高和结果出现快之优点,有利于本病的早期诊断与治

疗。我们采用 Song 等的方法^[5],合成 2 对能扩增伤寒杆菌鞭毛抗原基因 DNA 片段的引物,并用强裂菌剂与加热处理血标本,使伤寒杆菌充分裂解释出 DNA,用作扩增的靶 DNA,获得满意的检测结果。

1 材料与方 法

1.1 菌 株

用普通营养琼脂培养基培养伤寒杆菌、甲型副伤寒杆菌、绿脓杆菌、变形杆菌、大肠杆菌、腐生葡萄球菌和丙二酸盐阴性枸橼酸杆菌。培养 3 d 后收集细菌,用 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)制成细菌悬液。用伤寒杆菌作为标准阳性对照,用绿脓杆菌作为标准阴性对照。其它细菌用于作该 PCR 的特异性试验。此外,还用恙虫病立克次体作该 PCR 的特异性试验。

^① 第一作者,男,1944 年出生,副教授

1.2 血标本

血清标本取自10例有伤寒临床表现,如发热、头痛、表情淡漠、玫瑰疹、相对缓脉、肝脾肿大、周围血液白细胞数减少、嗜酸粒细胞减少或消失、肥达试验阳性等患者。于高热时取血3 ml,血液凝固后离心分离血清,置-20℃保存。有3例患者曾取血3 ml,用EDTA Na₂抗凝(最终浓度为0.5 mol/L),离心2 000 r/min,15 min后吸取红细胞层上面的白细胞。用4 ml生理盐水离心洗涤2次后,加入0.5 ml双蒸馏水制成悬液,置-20℃保存。

另外,曾用该PCR对10例非伤寒患者的血清标本作检测,即由福氏痢疾杆菌所致的急性菌痢和慢性菌痢各1例,肺结核病1例,绿脓杆菌性支气管肺炎1例,隐球菌性脑膜炎2例,间日疟2例,恙虫病1例和钩端螺旋体病1例。

1.3 引物

寡核苷酸引物顺序 引物1:5'-ACTGC-TAAAACCACTACT-3'; 引物2:5'-TTAACGCAGTAAAGAGAG-3'; 引物3:5'-AGATGGTACTGGCGTTGCTC-3'; 和引物4:5'-TGGAGACTTCGGTTCGCGTAG-3'。参照Song等的方法^[5],由中国科学院上海细胞生物研究所用DNA合成仪合成。其中,引物1和2用于首次PCR扩增,产物为458 bp片段,相当于伤寒杆菌鞭毛抗原基因中第1 072至1 530核苷酸的DNA片段。引物3和4用于以首次PCR扩增产物为模板的嵌套式PCR扩增,产物为343 bp片段,相当于伤寒杆菌鞭毛抗原基因中第1 092至1 435核苷酸的DNA片段。

1.4 标本预处理

在容积为0.5 ml的小离心管中加入裂解液10 μl,再加入待检的血清或白细胞悬液50 μl,使最终浓度分别为Tris 10 mmol/L, EDTA Na₂ 1 mmol/L和Triton X-100 5%(V/V),经95℃作用20 min后,离心10 000 r/min,5 min,取上清作PCR检测。

1.5 PCR扩增

总体积为30 μl,其中,10倍浓度扩增缓冲液(含Tris-HCl 100 mmol/L, KCl 500 mmol/L, MgCl₂ 15 mmol/L) 3 μl, dNTP (2.5 mmol/L) 3 μl,引物1和引物2(25 pmol/L)各0.5 μl,稀释液(含明胶0.1%, Triton X-100 0.1%) 17.75 μl, Taq DNA聚合酶0.25 μl(0.75 μ),模板DNA液5 μl,混匀,加无菌石蜡油30 μl覆盖。在自动DNA扩增仪(Perkin-Elmer Cetus)中,先经94℃变性5 min,然后作30个循环扩增。每个循环包括94℃ 40 s, 55℃ 40 s和72℃ 1 min。最后于72℃延伸10 min。每次均作标准阴性与标准阳性对照。

1.6 产物判断

每份PCR产物取10 μl,与0.25%溴酚蓝3 μl混匀,经在含溴化乙锭0.5 μg/L的1.5%琼脂糖凝胶中电泳(100 V, 40 min)后,在紫外线透射仪上观察DNA荧光区带,以Gibco BRL的DNA分子量标准参照判断结果。若标本在首次PCR后于458 bp处出现DNA荧光区带和在嵌套式PCR后于343 bp处出现DNA荧光区带都判为阳性结果。

2 结 果

2.1 PCR产物

用标准伤寒杆菌裂解释出的染色体DNA和含有伤寒杆菌DNA的血清或白细胞标本作为该PCR扩增的模板,首次PCR和巢式PCR后产物在含溴化乙锭的1.5%琼脂糖凝胶中电泳后,在紫外线透射仪上观察,可分别在458 bp和343 bp处出现1条清晰的DNA荧光区带。其它细菌,包括绿脓杆菌、变形杆菌、大肠杆菌、腐生葡萄球菌和丙二酸盐阴性枸橼酸杆菌的PCR检测均呈阴性。此外,对恙虫病立克次体和正常人的周围血液白细胞作了该PCR检测,结果均为阴性。但是,甲型副伤寒杆菌的PCR检测则呈弱阳性。

2.2 血清标本的 PCR 检测

对 10 例有伤寒临床表现、血培养有伤寒杆菌生长患者的血清标本进行该 PCR 检测, 结果, 首次 PCR 检测 9 例阳性, 检出率为 9/10。嵌套式 PCR 检测, 则 10 例均呈阳性, 检出率达 10/10。

2.3 周围血液白细胞的 PCR 检测

对其中 3 例伤寒患者分别作血清和血液白细胞的该 PCR 检测, 结果均为阳性。检测结果如附表所示。

附表 PCR 检测 10 例伤寒患者血样本结果 (n/例)

	首次 PCR		嵌套 PCR	
	阳性	阴性	阳性	阴性
血清	9	1	10	0
白细胞	3	0	3	0

作配对计数资料的 χ^2 检验, 结果显示首次 PCR 和巢式 PCR 的检出率无显著性差异 ($\chi^2=0, P>0.05$)。

对 10 例非伤寒患者的血清作首次 PCR 和嵌套式 PCR 检测, 结果均为阴性。

3 讨 论

已知编码伤寒杆菌鞭毛抗原的基因为一段 1530bp 的 DNA。该 PCR 扩增的 DNA 模板位于该基因的稳定区内, 有较高的特异性, 故该 PCR 可用作病人标本检测。已有实验证明, 首次 PCR 检测伤寒杆菌的敏感度较嵌套式 PCR 低, 但其特异性则较嵌套式 PCR 强。用该嵌套式 PCR 检测, 伤寒杆菌和慕尼黑沙门菌 (*Salmonella muenchen*) 均可呈阳性。慕尼黑沙门菌是一种临床上少见的急性胃肠炎致病菌, 极少发生菌血症。其临床表现与伤寒亦有明显差异, 故一般认为该 PCR 检测对伤寒杆菌的特异性已达到临床标本检测的要求^[5]。

为了观察该 PCR 的特异性, 作者曾对 10 例非伤寒患者的血清标本作检测, 结果显

示细菌性痢疾、肺结核病、绿脓杆菌性支气管炎、隐球菌性脑膜炎、间日疟、恙虫病和钩端螺旋体病均呈阴性。

本文研究发现, 用该 PCR 检测培养的甲型副伤寒杆菌亦可呈弱阳性。这提示伤寒杆菌和甲型副伤寒杆菌在这段模板 DNA 片段内有一定同源性。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后在紫外线透射仪上观察, 伤寒杆菌的 DNA 荧光区带很清晰、明亮, 而甲型副伤寒杆菌的 DNA 荧光区带则较模糊、暗淡, 两者有较明显差异。是否临床上患副伤寒甲病人的血清标本用该 PCR 检测亦会出现弱阳性这种情况, 则有待作进一步研究。

该 PCR 产物的特异性已经 DNA 杂交证实, 并已证明检测正常人的白细胞不会出现假阳性^[5]。因为作 DNA 杂交试验需作 2 d 时间, 我们认为在临床病人的标本检测中, 不必每次都作 DNA 杂交试验。最重要的是每次都做标准阴性与标准阳性对照。

用首次 PCR 检测连续对倍稀释的伤寒杆菌悬液表明其敏感度仅可达 10 条伤寒杆菌左右。因此, 病人应尽量于用抗抗菌药物治疗前取血液标本进行检测, 以免因血液标本中细菌数量较低而出现假阴性。

在该 PCR 检测中, 作者采用了较强的裂菌液, 使标本中伤寒杆菌充分裂解, 释出染色体 DNA, 增多在 PCR 扩增时的 DNA 模板。Song 等于嵌套 PCR 后才可在电泳后的琼脂糖凝胶中观察到产物 DNA 荧光区带, 我们则可于首次 PCR 后大部分 (9/10) 和嵌套式 PCR 后全部 (10/10) 都可在电泳后的琼脂糖凝胶中清晰地观察到产物 DNA 荧光区带, 提高了该 PCR 检测的敏感度。对于临床上高度怀疑患伤寒的病人, 若首次 PCR 结果为阴性时, 则应以首次 PCR 产物作为模板, 再作嵌套式 PCR 检测, 以免漏诊。

在该 PCR 检测中, 作者省去了标本 DNA 的提取步骤, 使首次 PCR 检测时间从原来的 36 h 减至 9 h, 更快获得检测结果。初步检测结果显示, 用该 PCR 检测病人血清和

血液白细胞中伤寒杆菌的阳性率相仿,故初步认为用血清作检测即可。

参 考 文 献

- 1 Levine MM, Grados O, Gilman RH, et al. Diagnostic value of widal test in areas endemic for typhoid fever. *Am J Trop Med Hyg*, 1978, 27 : 795
- 2 Hoffmañ SL, Edman DC, Punjabi NH, et al. Bone marrow aspirate culture superior to streptokinase clot culture and 8-ml 1 : 10 blood to broth culture for diagnosis of typhoid fever. *Am J Trop Med Hyg*, 1986, 35 : 836
- 3 Edelman R, and Levine MM. Summary of an international workshop on typhoid fever. *Rev Infect Dis*, 1986, 8 : 329
- 4 Rubin FA, Kopecko DJ, Sack RB, et al. Evaluation of a DNA probe for identifying *Salmonella typhi* in Peruvian and Indonesian bacterial isolates. *J Infect Dis*, 1988, 157 : 1051
- 5 Song JH, Cho HL, Park MY, et al. Detection of *Salmonella typhi* in the blood of patients with typhoid fever by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 1993, 31 : 1439

(1995-01-05 收稿 1995-07-10 修回)

RAPID DETECTION OF *Salmonella typhi* IN THE BLOOD BY POLYMERASE CHAIN REACTION

Yang Shaoji Wen Bo Gao zhiliang Ma Yiyue Yao Jilu Peng Wenwei

(Sun Yat-Sen University of Medical Sciences,
Third Affiliated Hospital, Department of Infectious Disease, Guangzhou, 510630)

Salmonella typhi in the blood of patients with typhoid fever was detected by a polymerase chain reaction (PCR). Two pairs of oligonucleotide primers were synthesized according to the sequence of the flagellin gene of *Salmonella typhi*. A 458 bp and a 343 bp DNA fragments were amplified in the first round of the PCR and the nested PCR, respectively. About ten organisms of *Salmonella typhi* could be detected by the first round of the PCR. In ten patients with clinical manifestations of typhoid fever, and positive culture of *Salmonella typhi* in their blood samples, the first round of the PCR was positive in nine, and the nested PCR was positive in all ten patients. Serum samples and leukocyte samples were both positive by the detection of the PCR in three of these patients. These results indicate that detection of the serum samples from patients with typhoid fever by the first round of the PCR will be positive in most of the cases. Results of the first round of the PCR can be available in about nine hours because preparation method of samples for the PCR has been improved. We suggest that the PCR can be used for etiologic diagnosis of typhoid fever in clinical laboratories.

Subject headings typhoid/microbiology; *Salmonella typhi*, typhoid fever/blood; polymerase chain reaction