维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2005)02－0183－04

缺口－连接酶链反应－酶联免疫吸附(Gap－LCR－ELISA)检测沙眼衣原体的方法学研究

邓　春[1]，吴仕孝[1]，余加林[1]，郭春宝[2]，邓　兵[3]，刘官信[4]

(1.重庆医科大学儿科学院新生儿科;2.重庆医科大学儿科学院外科实验室;
3.重庆医科大学儿科学院分子生物实验室;4.重庆医科大学儿科学院组织培养室,重庆　400014)

【摘　要】目的:探讨敏感性和特异性好的沙眼衣原体(Chlamydia trachomatis,CT)感染的诊断方法。方法:肺炎患儿鼻咽拭子标本分别经细胞培养及质粒探针连接酶链反应分析;计算 TC 和 G－LCR 法敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值,比较两种方法在检测 CT 感染中的差异。结果:按扩大金标准,真阳性共 49 例,阴性共 344 例。TC 法假阴性 12 例,配对 χ^2 检验显示:G－LCR－ELISA 与 TC 比较差异显著,G－LCR 优于 TC。结论:LCR 方法是一种快速而准确的检测 CT 方法,LCR 法敏感性高于 TC,LCR 法特异性高。

【关键词】沙眼衣原体;连结酶链反应;鼻咽拭子
【中国图书分类法分类号】R446.61　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2004－06－18

Investigation methods of diagnosis of Chlamydia trachomatis by Gap ligase chain reaction

DENG Chun, et al

(*Department of Neonate, College of Pediatrics, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the method with good sensitivity, specificity, reliability for diagnosis of Chlamydia trachomatis. *Methods*: Inoculate the nasopharyngeal swabs to detect the Chlamydia trachomatis(CT) with McCoy cell culture and plasmid gene probes labeled with biotin ligase－chain reaction. Then calculate the sensitivity, specificity, positive predicative valuc(PPV) and negative predicative value(NPV) of both TC and G－LCR respectively. Compare the difference of the two methods. *Results*: There were 49 positive specimens and 344 negative by enlarged gold standard. There was significant difference with cell culture, G－LCR－PAGE, G－LCR－ELISA by two－related－samples χ^2 tests($P<0.05$). *Conclusion*: LCR assay is a kind of rapid and accurate method to diagnose Chlamydia trachomatis infection, compared with cell culture. LCR is simple, sensitive and suitable for clinical application.

【Key words】Chlamydia trachomatis; Ligase－chain reaction; Nasopharyngeal swab

沙眼衣原体(Chlamydia Trachomatis,CT)是一种常见的性病病原菌,可传播给新生儿,引起新生儿结膜炎及肺炎,是 1 岁以内特别是 6 个月以下小婴儿的肺炎及毛细支气管炎的主要病原体之一[1]。吴仕孝等[2]报道重庆地区孕妇宫颈拭子 CT 培养阳性率 10.8%(30/278),PCR 阳性率 14%(39/278)。早期诊断治疗 CT 感染、控制及预防并发症迫切需要快速、准确、简便的诊断方法。连结酶链反应 Ligase chain reaction,LCR)具有高度的敏感性和特异性[3]。本试验将 LCR 用于小婴儿 CT 肺炎鼻咽拭子的大规模筛测。

1　材料与方法

1.1　临床病例选择

2002 年 1 月～12 月在我院新生儿科住院的 2 周以上的新生儿及门诊留察室输液治疗的 6 月以内的小婴儿共 393 例。均由胸片确诊为肺炎。其中男 239 例,女 154 例,年龄为 2 周～6 个月。28 天以内新生儿 84 例,28 例～3 个月患儿 160 例,3 个月～6 个月患儿 149 例。

作者介绍:邓　春(1969－　),女,副主任医师,博士,
主要研究方向:新生儿感染性疾病诊断。

基金项目:国家自然科学基金(No:39670766)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.2 标本的采集及质量控制

特制棉拭鼻咽部旋转 5s,置 0.5ml 2SP 液(蔗糖 68.5%,K_2HPO_4 0.21%、KH_2PO_4 0.11%,3% 胎牛血清,50mg/ml 链霉素,万古霉素 50μg/ml)中,洗片刻。4℃ 转运,24h 内接种或贮存于 -70℃ 冰箱。质控采用标本涂片,HE 染色,观察上皮细胞。尽量在入院 24h 之内或应用抗生素之前采集标本,若检测结果有疑问,可按前述方法继续采集病人标本。

1.3 CT 细胞培养碘染色鉴定

标本液加入生长良好的 McCoy 细胞,CT 标准株 B-TW-5、TE-55 作为阳性对照,不加标本作为阴性对照。碘染色鉴定:用 Jone 氏碘染液染色,400 倍光学显微镜下观察有棕黑色包涵体为阳性,记数包涵体数目(图 1)。

1.4 缺口-连接酶链反应(Gap-LCR)

DNA 提取:使用 CT PCR 检测试剂盒(中山医科大学达安基因股份有限公司)提取 DNA;探针分别标记了地高辛和生物素,扩增片段长度为 47bp。Gap-LCR 扩增:体系包括:双蒸水 9.1μl,10×LCR Buffer 2μl,10mmol/L dGTP 0.5μl,引物(20pmol/μl)各 0.5μl,5U/μl TscDNA ligasel μl,TaqDNA 聚合酶(5U/μl)0.4μl,模板 5μl 等混匀,94℃ 预变性 2min,94℃ 30s,60℃ 180s,60 个循环。检测:(1)电泳法:6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳后紫外仪上观察 47bp 特异条带(图 2)。(2)ELISA 方法:以 492nm 为参考波长,以 405nm 为波长测定吸光值 A。阴性对照选用双蒸水,阳性对照选用试剂盒提供 Control peptide。

4 条探针及标记情况为:

5'-Dig Probe 1a　　Probe 1b Bio-3'

GAT, ACT, TCG, CAT, CAT, GTG, TT, CC　AGT, TTC; TTT, GTC, CTC, CTA, TAA, CG

CTA, TGA, AGC, GTA, GTA, CAC, AA　CC, TCA, AAG, AAA, CAG, GAG, GAT, ATT, GC

3'-Bio Probe 2a　　Probe 2b Dig-5'

1.5 主要外膜蛋白基因 omp1 引物 PCR

omp1 引物为:P1 5'-GGC AAG CAA GTT TAG CTC TCT CT-3',P2 5'-GTT CCT ACT GCA ATA CCG CAA GA-3',目的片段 277bp;PCR 循环条件:94℃ 预变性 4min,92℃ 45s,58℃ 45 s,72℃ 1min35 个循环,72℃ 5min。2% 琼脂糖凝胶电泳观察 277bp 特异条带(图 3)。

1.6 CT 共有质粒引物引物 PCR

引物选择:P1 5'-GTTTAAGTGTTCC-CATCATAAAAACATATTC-3',P2 5'-ATCCTTGTATC-CTGTTGGGAAGCCATCAAAG-3',目的片段 503bp;按下列条件扩增:94℃ 4min 预变性,然后按 92℃ 45s,58℃ 45s,72℃ 60s,共 35 循环,最后置 72℃ 充分延伸 5min。2% 琼脂糖凝胶电泳观察 277bp 特异条带(图 4)。

1.7 阳性判断标准

采用扩大的金标准(Expanded gold standard)即以培养或两个原理不相同的非培养方法做为标准[3]。即:1. 培养阳性;2. 培养阴性,一种基因扩增方法阳性,并由另一基因扩增方法证实,则判为阳性。本研究部分标本存在培养阴性,而 LCR 检测结果阳性,对这些检测结果不一致的标本均采用主要外膜蛋白基因 omp1 引物进行 PCR 复核检测。若 PCR 和 LCR 均阳性则判断病人阳性。

1.8 统计学处理

应用 SPSS10.0 统计软件分析,检测数据计数资料采用配对 χ^2 检验,$P<0.05$ 为差异有显著性。

敏感性(sensitivity):本试验方法和金标准皆阳性数/金标准阳性数,

特异性(Specificity):本试验方法和金标准皆阴性数/金标准阴性数,

阳性预测值(PPV):本试验方法和金标准皆阳性数/本试验方法阳性数,

阴性预测值(NPV):本试验方法和金标准皆阴性数/本试验方法阴性数。

2 结　果

2.1 LCR 法引物的特异性

本实验为质粒探针,连接处设计有两个 dGTP 缺口。扩增两种 CT 标准株 B-TW-5、TE-55,在 47bp 处可见一条 DNA 带。而扩增本实验室保存的金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、肺炎链球菌及未感染的 McCoy 细胞标本,均未见特异性条带(图 1)。提示这两对探针具有极强的特异性。

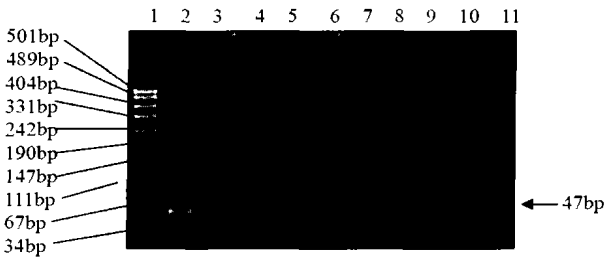


图 1　G-LCR-PAGE 检测结果

1. Marker;2. CT 标准株 B-TW-5;3. 检测阳性标本;4. CT 标准株 TE-55;5. 6. 7. 8. 9. 检测阳性标本;10. 11. 检测阴性标本

2.2 各种方法检测扩大金标准结果

显微镜下鼻咽拭子接种 McCoy 细胞后 24~72h CT 棕黑色包涵体位于细胞浆内,细胞核被挤到一旁(图 2),阳性 37 例,阴性率为 9.4%;LCR-PAGE 检测,在 47bp 处有 DNA 带(图 1)为阳性,得阳性 46 例;LCR-ELISA 检测,阳性 48 例,PAGE 与 ELISA 检测阳性率分别为 11.7% 和 12.2。37 例鼻咽拭子标本 TC 阳性,其中 TC 与质粒 LCR 均阳

维普资讯 http://www.cqvip.com

性 35 例,1 例 TC 与质粒 Gap－LCR－ELISA 均阳性;1 例 TC 阳性而质粒 LCR 阴性;TC 阴性的标本,质粒 LCR 的两种检测方法均阳性,后经 omp1 引物 PCR 证实为真阳性有 10 例(图 3),阴性有 1 例;本实验中有 1 例 TC 阴性,Gap－LCR－PAGE 阴性,而 Gap－LCR－ELISA 阳性,后经 omp1 引物 PCR 证实为真阳性(表 1);所有 344 例 TC 与质粒 LCR 均阴性的标本,经质粒引物(图 4)和 omp1 引的 PCR 检测,1 例同时阳性,符合扩大金标准,其余为阴性(表 2)。即按扩大金标准,真阳性共 49 例,阴性共 344 例。与真阳性 49 例比较,TC 法假阴性 12 例,PAGE 法有 1 例假阳性,4 例假阴性;ELISA 检测法有 1 例假阳性,2 例假阴性。

2.3 TC 与 Gap－LCR－PAGE 及 Gap－LCR－ELISA 比较

表 1 各种方法检测真阳性结果

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
G-LCR PAGE	+	+	−	−	+	+	+	+	−	−	−
ELISA	+	−	+	−	+	+			+	+	−
TC	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−
Omp1 引物	35★	0	1★	1★	10★	1	0	0	1★	0	344

表 2 质粒引物和 omp1 引物 PCR 检测结果

	L	M	N	O
质粒引物	+	+	−	−
Omp1 引物	+	−	+	−
数量	1★	2	0	341

★:真阳性结果

表 3 Gap－LCR－PAGE 和 TC 检测 CT 阳性结果比较

TC	Gap－LCR－PAGE		合计
	阳性	阴性	
阳性	35	2	37
阴性	11	345	356
合计	46	347	393

$P=0.022<0.05$

表 4 Gap－LCR－ELISA 和 TC 检测 CT 阳性结果比较

TC	Gap－LCR－ELISA		合计
	阳性	阴性	
阳性	36	1	37
阴性	12	344	356
合计	48	345	393

$P=0.003<0.05$

表 5 LCR 和 TC 的敏感性,特异性,PPV,NPV 比较

	Gap－LCR－PAGE	Gap－LCR－ELISA	TC
敏感性	91.8%	95.9%	75.5%
特异性	99.7%	99.7%	100%
阳性预测值	97.8%	97.9%	100%
阴性预测值	98.8%	99.4%	96.6%



图 2 CT 的细胞培养法诊断(箭头示 CT 包涵体)

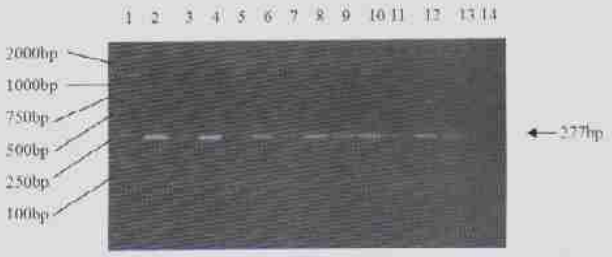


图 3 omp1 引物 PCR 检测结果

1. Marker;2. CT 标准株 B－TW－5;3. 检测阳性标本;4. CT 标准株 TE－55;5. 检测阴性标本;6. 7. 7. 8. 9. 11. 12. 13. 检测阳性标本;14. 检测阴性标本



图 4 质粒引物 PCR 检测结果

1. Marker;2. 检测阳性标本;3. CT 标准株 B－TW－5;4. 5. :检测阴性标本;6. CT 标准株 TE－55

TC 与 Gap－LCR－PAGE 及 Gap－LCR－ELISA 检测结果对比资料分别见表 3 和表 4,用配对 χ^2 检验方法检测 Gap－LCR－PAGE 和培养法及 Gap－LCR－ELISA 与培养法的统计学结果显示:Gap－LCR－PAGE、Gap－LCR－ELISA 与培养法比较均为 $P<0.05$,差异有显著性,Gap－LCR 优于培养法。

2.4 各种方法敏感性、特异性、PPV、NPV 比较

按公式计算,TC,质粒 Gap－LCR－PAGE 和质

维普资讯 http://www.cqvip.com

粒 Gap－LCR－ELISAR 的敏感性，特异性，PPV，NPV 等测定指标对比资料见表 5。可见特异性等其它指标几种检测方法相比差异不大，所以与培养法相比在基本不降低特异性的情况下，Gap－LCR 法可以大大提高检测的敏感性。

3 讨 论

CT 的发育周期发生在宿主细胞的胞浆中，其特点是形成胞浆内包涵体，衣原体就在包涵体中发良。本研究 CT 的 TC 诊断中，观察到了特异的碘染色的棕色包涵体[4]。小儿 CT 感染主要在新生儿和小婴儿发病，从母亲感染者多，来源于母亲衣原体性病。

LCR 方法的优点在特异性方面有聚合酶与连接酶的相加作用。连接处仅发生一个碱基的差异，连接产物就不会形成，特异性强是其显著的优点[5]。在 LCR 反应时，由 Taq DNA 聚合酶介导上述碱基特异填补空缺，随后由连接酶封口，若单一碱基不能与模板 DNA 配对时，连结酶就不能将两条寡核苷酸连成一条新链，靶 DNA 就不能被扩增。这样就增加了 LCR 检测的特异性。目前 LCR 使用的引物有质粒引物和 ompl 基因引物。Schachter[6] 等对照 ompl 基因 LCR 和质粒基因 LCR 的敏感性分别为 83% 和 92%；Dille[7] 等用质粒模板的探针对 CT 的 15 个血清型行 LCR，每个反应体系中仅 3 个原体(EB)亦能扩增到检测水平，而对临床标本中可能出现的其它 16 种细菌，鹦鹉热衣原体(C. ps)以及肺炎衣原体(C. pn)对照检测结果全为阴性，说明其特异性强。本研究中采用质粒的引物扩增两种 CT 标准株 DNA，经电泳在相当 47bp 区内均可见一条 DNA 带。与预测大小吻合。对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌等临床分离株进行扩增，均未见特异性条带。提示质粒引物扩增具有极强的特异性。由于 LCR 扩增的 DNA 片段很小(约 50 个碱基)，因此难以使用常规的水平琼脂糖凝胶电泳，Dille[7] 等利用引物接头的缺口，渗入放射性同位素标记的寡核苷酸，扩增产物经 PAGE 后，放射自显影 3～6h。此方法灵敏度较高但缺点是使用同位素，操作较复杂，时间较长，因此不可能在临床广泛应用。Abbott 公司推出成套 LCx 系统[8]，由于成本高，在我国广大的基层医疗单位不可能引进昂贵的全套设备，故使 Gap－LCR 的开展及随后人规模的 CT 分子流行病学研究困难很大。寻求新的快速而准确的检测方法是本课题的目标之一。

ELISA 为我国多数实验室常规工作，具有敏感性高、操作简便、设备简单、需时短等优点[9]。因此本实验将 Gap－LCR 的寡核苷酸探针两端分别标记地高辛和生物素，进行 Gap－LCR 扩增后，即可得 3'和 5'端同时带有生物素利地高辛的扩增产物，并通过自动酶标仪读取结果。ELSA 检测的新方法，结合了 LCR 的高度敏感性和 ELISA 的特异性，而且判断结果客观，有助于实验检测的自动化，为临床诊断 CT 感染提供了一个很好的试验方法[10]。

TC 由于其所具有的特点，一直被认为是检测 CT 的金标准，随着 DFA、EIA、PCR 和 LCR 等技术的应用，学者们开始采用扩大的金标准，即 TC 阳性或质粒－LCR 阳性并为 DFA 或 PCR 等非培养方法所证实[11]。本实验利用扩大的金标准研究 LCR 与 TC 方法，对比其敏感性的差别，结果发现，TC 法判断结果的敏感性低，漏检的可能性较大；LCR 也有假阳性和假阴性的可能，但是 LCR 具有较 TC 方法更强的特异性和敏感性，在本研究中虽然 LCR 检测有假阳性的可能，但是本研究证实其发生率很低，而且判断结果客观，有助于实验检测的自动化，为临床诊断 CT 感染提供了一个很好的试验方法。

从上述研究可以得出结论，LCR 具有高度的敏感性和特异性。LCR 在检测临床 CT 感染的应用中，有极其重要的意义，LCR 若能降低成本，操作程序标准化，将成为最有前途的 CT 检测方法，但由于它不能鉴别标本中 CT 的死活情况，故还不能完全取代 CT 培养。

参 考 文 献

[1] Martinez A, Lehman TA, Modali R, et al. Screening of mutations in the ras family of oncogenes by polymerase chain reaction－based ligase chain reaction[J]. Methods Mol Med, 2003;74:187－200.

[2] 吴仕孝，沈 犁，刘官信. 母婴垂直传播沙眼衣原体的聚合酶链反应及测序研究[J]. 中华儿科杂志，1997;35:203－205.

[3] Pannekoek Y, Westenberg SM, Eijk PP, et al. Assessment of Chlamydia trachomatis infection of semen specimens by ligase chain reaction[J]. J Med Microbiol, 2003;52:777－779.

[4] Schachter J, McCormack WM, Chemesky MA, et al. Vaginal swabs are appropriate specimens for （下转第 190 页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

强,如成纤维细胞分泌胶原增加,同时其分泌生长因子,如转化生长因子 - β_1(TGF - β_1)也增加。而 TGF - β_1 可减少基质金属蛋白酶 - 1(MMP - 1)的合成,并促进 MMP - 1 的抑制物(TIMP - 1)的合成,从而抑制胶原降解,促进纤维化的发生[6],TGF - β_1 还可增加纤维连接蛋白和胶原在细胞外基质的沉积[7],导致心房间质纤维化。

在纤维化方面,也观察到慢性房颤患者 CVF 较窦性节律组明显增加,同时,在慢性房颤患者,用 ACEI 组较未用 ACEI 组其心房 ERK2、pERK 表达明显下调,可能与 ACEI 减少局部 Ang Ⅱ 的生成,减弱后者在局部的效应,表现为信号通路(如 MAPK 途径)中 ERK2、pERK 表达下调,进一步证实了慢性房颤时心房局部 RAS 的激活,经 MAPK 途径介导了组织学重构。在纤维化指标方面,用 ACEI 组较未用 ACEI 组 CVF 有下降趋势,但无统计学意义,这可能与以下几个方面有关:①本研究样本数量有限;②心房局部 Ang Ⅱ 的生成除了 ACE 经典途径外,还有糜酶途径的存在,单用 ACEI 只能部分抑制其生成;③房颤持续时间不一,ACEI 只是对新的胶原沉积、基质增加有影响,应用后对已沉积的胶原和增加的基质影响不大,并且部分未用 ACEI 组患者,在其病程中亦曾间断服用 ACEI。

房颤时心房间质纤维化所涉及的信号通路较为复杂,ERK 信号通路是迄今研究得最为透彻的一条 MAPK 信号通路。本研究也发现风心病房颤患者心房 ERK 途径中 ERK2、pERK 表达和相应的纤维化指标的增加,Ang Ⅱ 与 AT_1R 结合后,除了经 ERK 途径产生效应外,还可能通过其它信号转导途径。相信通过对这些途径的深入研究,可以进一步明确其在房颤心房组织学重构中的作用。

参 考 文 献

[1] De Mello WC, Jan Denser A. H. Angiotensin and the heart on the intracrine RAS[J]. Hypertension, 2000; 35(6): 1183 - 1188.

[2] Horiuchi M, Hayasbida W, Kambe T, et al. Angiotensin type2 receptor dephosphorylates BCL - 2 by activating mitogen activated protein kinase phosphatetase - 1 and induces apoptosis [J]. Biol Chem, 1997; 272(30): 18022 - 19026.

[3] Goette A, Stack T, Rocken C, et al. Increased expression of extracellular signal - regulated kinase and angiotensin - converting enzyme in human atria during atrial fibrillation[J]. J Am Coll Cardiol, 2000; 35(6): 1669 - 1677.

[4] 许春萱,黄明方,张建成,等.心房颤动患者心房组织中血管紧张素转换酶和血管紧张素受体 mRNA 表达的研究[J].中华心血管病杂志,2003;31(1):55 - 56.

[5] 伍伟峰,黄从新,刘唐威,等.风湿性心脏病心房颤动患者心房细胞外信号调节蛋白与纤维化的关系[J].中国心脏起搏与心电生理杂志,2002;16(2):100 - 103.

[6] Conception L, Nerea V, Javier F, et al. Abnormalitier of the extracellular degradation of collagen type Ⅰ in essential hypertension[J]. Circulation, 1998; 98(5): 535 - 540.

[7] Lijnen P, Petrov V. Induction of cardiac fibrosis by aldosterone[J]. J Mol Cell Cardiol, 2000; 32(6): 865 - 879.

(上接第 186 页)

diagnosis of genital tract infection with Chlamydia trachomatis [J]. J Clin Microbiol, 2003; 41: 3784 - 3789.

[5] Anguenot JL, de Marval F, Vassilakos P, et al. Combined screening for Chlamydia trachomatis and squamous intra - epithelial lesions using a single liquid - based cervical sample[J]. Hum Reprod, 2001; 16: 2206 - 2210.

[6] Schachter J, Stature WE, Quirm JC, et al. Ligase chain reaction to detect Chlamydia trachomatis infection of the cervix [J]. J Clin Microbiol, 1994; 32: 2540.

[7] Dille BJ, Butzen CC, Birkenmeyer LG. Amplification of Chlamydia trachomatis DNA by ligase chain reaction[J]. J Clin Microbiol, 1993; 31: 729 - 731.

[8] Golden MR, Astete SG, Galvan R, et al. Pilot study of COBAS PCR and ligase chain reaction for detection of rectal infections due to Chlamydia trachomatis[J]. J Clin Microbiol, 2003; 41: 2174 - 2175.

[9] Kacena KA, Dohnal K, Benesova V, et al. Chlamydia, gonorrhea, and HIV - 1 prevalence among five populations of women in the Czech and Slovak Republics[J]. Sex Transm Dis, 2001; 28: 356 - 362.

[10] Noguchi Y, Yabushita H, Noguchi M, et al. Detection of Chlamydia trachomatis infection with DNA extracted from formalin - fixed paraffin - embedded tissues[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2002; 43: 1 - 6.

[11] Braverman PK, Schwarz DF, Mph M, et al. Use of ligase chain reaction for laboratory identification of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae in adolescent women[J]. J Pediatr Adolesc Gynecol, 2002; 15: 37 - 41.