维普资讯 http://www.cqvip.com

应用PCR对女性生殖道沙眼衣原体感染的快速诊断※

第二医院妇产科 梁咏宪 孙江川
儿科研究所 王宁遂 朱 静 邓 兵

提 要 应用PCR和双链DNA循环测序检测妇女宫颈Ct感染状况。结果表明在57例阴道炎和/或慢性宫颈炎患者的宫颈刮物中检出Ct阳性21例(36.84%)，提示Ct是女性生殖道感染的主要病原，好发于30岁以下的妇女。临床表现多为轻型炎症反应、常有少量粘液脓性白带增多，随宫颈糜烂程度增加Ct感染呈上升趋势。30例正常妇女未检出Ct带病原体者。

关键词 PCR；双链DNA循环测序；沙眼衣原体；女性生殖道感染
中图分类号 R711.3

沙眼衣原体（Chlamydia Trachomatis，Ct）是现今已发现的三种衣原体中的一种。嗜好侵犯柱状上皮细胞。主要引起男、女性泌尿生殖道感染。在发达国家，Ct是引起性传播疾病的主要病因[1-3]。近年来，该病在我国传播已有上升趋势。在女性主要引起阴道炎、宫颈炎、子宫内膜炎、输卵管炎及盆腔炎，并可造成输卵管性不育及宫外孕等后遗症[4]。

11. 赵国华，等．中山医科大学学报 1989;10(1):6
12. Vic P,et al.Cancer Res 1982;42:667

(收稿日期 1995-07-12)

CORRELATION OF ESTROGEN RECEPTOR CONTENT AND MORPHOMETRIC ULTRASTRUCTURE OF BREAST CANCER

Zhang Zhenhuan, et al
Dept.of Surgery,The First Hospital

Estrogen receptor (ER) content of female breast cancer tissue was measured by modified charcoal-gelatin assay, Mitochondria and rough endoplasmic reticulum of tumor cells were evaluated by morphometric methods.It was observed that the volume density of mitochondria in ER(-) group was higher than that in ER(+) group, whereas the specific surface was lower. The numerical density on area of rough endoplasmic reticulum in ER(-) group was lower than that in ER(+) group,No significant differences were observed in either numerical density on area and surface density of mitochondria or surface density of rough endoplasmic reticulum between the two groups.

KEY WORDS Breast cancer,Estrogen receptor, Ultrastructure,Morphometry

※本文系卫生部科教司资助项目

维普资讯 http://www.cqvip.com

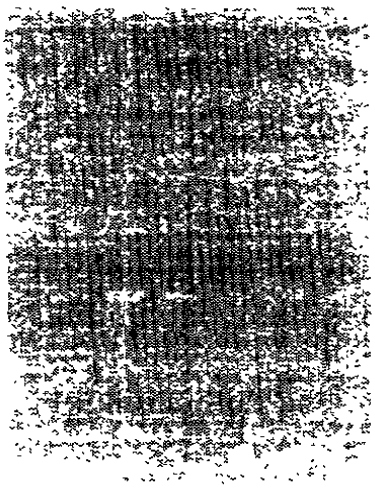
妊娠期感染可引起胎膜早破、早产、低体重儿等。感染可传给后代，导致新生儿眼炎、肺炎等多种疾病。但由于 Ct 感染症状不特异，因而实验室诊断十分重要。以往多采用细胞培养[5]、免疫学方法及 DNA 探针等方法检测病原。但上述方法费时，敏感性、特异性较差。本文采用 PCR 扩增 Ct $PCTT_1$，质粒特异性 DNA 片段，并用双链 DNA 循环测序鉴定扩增产物的方法观察了部份正常妇女、阴道炎和/或宫颈炎患者与 Ct 感染的关系，对女性生殖道 Ct 感染的快速诊断提供了临床和实验室检测的依据和方法。现报告如下：

1 材料和方法

1.1 病例来源与分组 从 1993 年 11 月至 1994 年 10 月随机采集本院妇产科门诊患白带增多和/或慢性宫颈炎者，或伴外阴搔痒、尿频、排尿不适、腹痛、腰痛及不育史中之一、二种表现者 57 例宫颈刮物 57 份为观察组。采集集体体检正常妇女（无阴道炎伴宫颈外观光滑者）30 例宫颈刮物标本 30 份为对照组。

1.2 标本采集方法 宫颈刮物标本采用拭去宫颈分泌物后，以消毒宫颈刮片于宫颈外口上皮移行带部位轻轻旋转 360°刮取浅层宫颈上皮细胞置入新鲜标本液 2ml 中，4℃保存，备 24h 内检测。标本液中含磷酸缓冲液（20mmol/L PH7.0）、蔗糖 200mmol/L、链霉素 50μg/ml、丁胺卡那 100μg/ml、制霉菌素 25μ/ml。经高压灭菌，加 5%BSA4℃保存备用。

1.3 PCR 过程 取含宫颈刮物标本液 2ml，离心弃上清液，加 250Tris—HCl 缓冲液 10mmol/L（PH8.3）、含 KCl50mmol/L、$MgCl_2$ 2.5mmol/L、45%NP－40、0.45%TWeen－20、蛋白酶 K300μg/ml。PCR 引物序列：P_1：5′－TATCATCTTGCGGTTGCG－3′，P_2：5′－GCTAGCATTTCTTTCTCCC－3′（自行设计，由上海细胞生物学研究所负责合成）。扩增 Ct$PCTT_1$ 质粒 317bP 特异性 DNA 片段。设总体积为 50μl，含 10X 缓冲液、10μl 上述反应液，dNTP200μmol/L，引物各 20Pmol/L，于 95℃变性 7min、冰浴中加 TaqDNA 聚合酶 2.5μ（华



1. 2. 3. 4. 5. 6.

图 1 C. PCR 灵敏度检测图

＊1. 标准参照 20 1μg
3. 1ng 4. 1ng
5. 100fg 6. 1fg

※Φ174Hae Ⅲ digest 片段长度依次为：
1353bp 1078bp 872bp 603bp 310bp 281bp 271bp 234bp 194bp 118bp 72bp

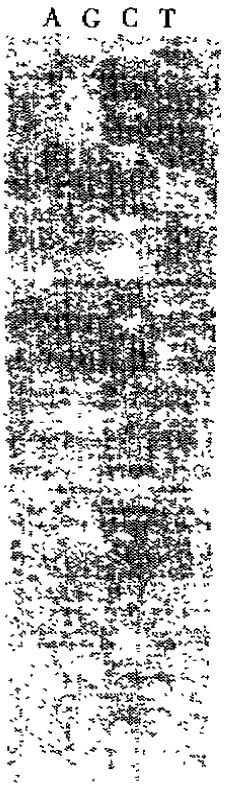


图 2 C. $PCTT_1$ 质粒部分 DNA 测序图（667～743bp）

维普资讯 http://www.cqvip.com

美生物技术公司)、矿物油 40μl。设 93℃30s、50℃30s、72℃1min 为一个循环，共 30 循环。PCR 过程在 DNA 热循环仪(Perkin－Elmer－Cetus)。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离，EB 染色、紫外灯观察 ryt 增结果。

1.4 双链 DNA 循环测序[6]

1.4.1 引物末端标记：总体积 5μl、含 5X 缓冲液、T4 多核苷酸激酶，一种引物 1Pmol/L，[r－^{32}P] ATP 10μci(>5000Ci/mmol、北京福瑞公司)，37℃孵育 30min、55℃终止反应 10min。

1.4.2 测序反应和聚丙烯酰胺电流 于标记的引物混合液中，加 10X 测序缓冲液，PCR 产物 10μl，TaqDNA 聚合酶 2.5μ(BRL)、总体积 36μl。上述混合液分装 4 个反应管，各 8μl。分别加 G、A、T 和 C 终止混合液 2μl，按上述 PCR 程序完成 30 个循环。各管加终止液 4μl、90℃变性 5min，进行 8% 聚丙烯酰胺电泳(尿素 7M)、恒功率 53W、电泳时间 3h，用 10% 乙酸—甲醇液固定凝胶 20min，80℃真空干燥 1.5h，室温下放射性自显影 2～3d。

2 结果

2.1 PCR 及双链 DNA 测序检测结果 57 例观察组宫颈刮物标本，经 PCR 扩增后 21 例(36.84%)标本显示一条 317bp 特异性 DNA 片段，灵敏度为 1fg(图 1)。同时用人基因 DNA 作阴性对照，用培养阳性的 CtDNA 作阳性对照，未发现假阴性和假阳性。观察组其余 36 例及对照组 30 例宫颈刮物标本中未发现扩增条带出现。随机抽取两分 PCR 阳性标本，经双链 DNA 循环测序证实该扩增产物为 Ct PCTT1 质粒 DNA 片段。与该质粒 DNA 中第 666～779 位核苷酸序列完全一致。(图 2)

2.2 年龄与 Ct 感染的关系 观察组中 Ct 阳性、阴性者及对照组各最小年龄分别为 19、20 及 26 岁；最大年龄分别为 52、60 及 66 岁；各组平均年龄分别为 27.6、29.3 及 44.7 岁。Ct 阳性者以小于 30 岁者发病数最高，随年龄增加而逐渐下降(见图 3)。

2.3 婚姻状况与 Ct 感染的关系 Ct 阳性、阴性者各有未婚妇女 2 例(分别占 9.09% 及 5.56%)。已婚妇女分别为 19 例(90.01%)及 34 例(94.44%)。对照组 30 例均为已婚妇女。

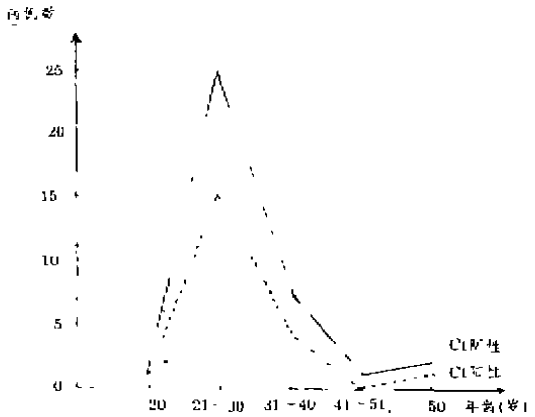
2.4 阴道炎与 Ct 感染的关系(见表 1) 白带增多者 Ct 阳性与 Ct 阴性者之间无显著差异($x^2=2.5$ $P>0.05$)。伴外阴搔痒者 Ct 阳性与阴性者之间无显著差异($x^2=0.094$ $P>0.05$)。

2.5 慢性宫颈炎宫颈糜烂程度与 Ct 感染的关系(见表 1) 宫颈外观光滑与糜烂者在 Ct 阳性与阴性者之间无显著差异($x^2=1.42$ $P>0.05$)。≥Ⅱ°糜烂者 Ct 阳性与阴性者之间无显著差异($x^2=1.357$ $P>0.05$)。

3 讨论

Ct 引起的女性生殖道感染是欧美等国常见的性传播疾病。近年来在我国的发病情况已受到关注。本文 57 例阴道炎和/或宫颈炎病例的宫颈刮物经 PCR 检测 Ct 阳性 21 例，阳性率为 36.84%。与国外报导大体一致[7]。显示 Ct 发病率高，是女性生殖道感染的主要病原。Ct 感染好发于年轻妇女，本文以<30 岁者发病数最高(16/21 例占 76.19%)，其中<25 岁者 10/21 例占 47.62%)。随年龄增加而呈下降趋势。Ct 患者表现有白带增多或伴外阴搔痒，和/或伴宫颈糜烂与 Ct 阴性者之间无显著差异($P>0.05$)，提示由 Ct 或其它病原引起的女性生殖道感染或混合感染在临床表现方面无明显区别。但 Ct 阳性者增多的白带常为少～中量粘液脓性白带。其中白带清洁度Ⅱ°者 12/21 例(57.14%)，说明 Ct 感染症状多较轻而不易被病人重视。当合并淋菌或其它病原感染时白带可为脓性。Ct 阳性者宫颈光滑、Ⅰ°糜烂及≥Ⅱ°糜烂者分别为 6 例(28.57%)、6 例(28.57%)及 9 例(42.86%)提示随宫颈糜烂程度增加 Ct 感染呈升高趋势。其中宫颈光滑者可能由于部份血清型的 Ct(如 D～K 型)因毒力不强且嗜好侵犯柱状上皮细胞[3]而感染局限于宫颈上皮移行带上部所致。提示在临床诊断时，除有少～中量白带增多伴宫颈糜烂者应考虑 Ct

维普资讯 http://www.cqvip.com



感染可能外，对伴外观光滑者仍应慎重除外Ct感染。在采取女性生殖道Ct感染标本时应取自宫颈外口上皮移行带部位以提高实验室诊断阳性率。(另一组取自阴道分泌物或宫颈刮物标本中检出Ct阳性35/112例阳性率为31.2%)。本文因同时伴有尿频、排尿不适(尿路感染可能)或腹痛、腰痛、不育及淋菌感染者例数少尚待继续观察。但如果伴有以上情况者应考虑本病之可能。本文对照组30例宫颈刮物未检出Ct提示女性生殖道无症状及体征者未发现Ct携带者。

Ct感染的病原学诊断，以往多采用细胞培养及免疫学方法。但前者费时。操作复杂，而且临床标本运送、贮存过程中衣原体易失去活性，以及临床标本对培养基单层细胞具有毒性作用而成功率较低，易出现假阴性。免疫学方法如直接荧光抗体检测、酶联免疫反应、抗体检测等虽较简便但敏感性、特异性较差。由于衣原体和其它微生物存在交叉抗原性而试验结果易出现假阳性。本文采用最先进的PCR方法检测Ct感染，方法简便，快速，其灵敏度为1fg提示敏感性、特异性高。同时可避免其它方法存在的缺点。利用双链DNA循环测序鉴定扩增产物，证示扩增DNA片段确系Ct PCTT$_1$质粒序列，较其它分子杂交方法更为准确。Ct虽然分为15个血清型，但经分子杂交证实该质粒核苷酸序列相同。因此只要选择一对与PCTT$_1$质粒DNA互补的寡核苷酸作为引物，扩增该质粒的特异性DNA片段即可快速、准确地诊断Ct感染。对照组30例Ct阴性更证明了PCR方法的准确性。

图3　C_t阳性与阴性者年龄分布图

表1　观察组临床表现

	病例总数	白带增多	外阴搔痒	光滑	宫糜 Ⅰ°	颈烂 ≥Ⅱ°	尿路症状	腹痛腰痛	淋菌PCR(t)
C_t阳性	21	21	12	6	6	9	1	4	2
C_t阴性	36	32	22	16	10	10	7	6	3
合　计	57	54	34	22	16	19	8	10	5

参考文献

1　WHO. Working Group: Bull WHO 1986; 64(4): 481

2、Pearlman, MD et al. Obstet Gynecol Surv, 1992; 47(7): 448

3、杨　洪．国外医学 流行病学传染病学分册 1993; 20(3): 116

4　Soong YK, et al, Feertility and Sterili

维普资讯 http://www.cqvip.com

ty 1990;54(5):815
5. Claas HCJ, et al. J Clin Microbiol 1991;29(1):42
6. 邓 兵,等. 中华血液学杂志,1994;15(9):490
7. Ostor taavd L, et al. J clin Microbiol. 1990;28(6):1254

(收稿日期 1995年6月15日)

RAPID DIGNOSIS OF CHLAMYDIA TRACHOMATIS INFECTION IN THE GENITAL TRACT OF WOMEN BY THE POLYMERASE CHAIN REACTION

Liang Yongni, et al

Dept.of Gynecology and Obstetrics, The Second Hospital

A rapid polymerase chain reaction (PCR) - based assay for detection of Chlamydia trachomatis in cervical specimens is presented. The results revealed that Chlamydia trachomatis was found in cervical specimens in 21 of 57 cases (36.84%) of vaginitis and /of chronic cervical inflammation. It is known that Chlamydia trachomatis is the main pathogen in the genital tract of women. Most patients are below 30. Clinical manifestations include mild infection in the genital tract of most cases and a little purulent discharge. The severity of Chlamydia trachomatis infection is added along with cervical erosions worsened. Chlamydia trachomatis can not be found in the genital tract of normal women. To detect Chlamydia trachomatis with PCR provides a rapid, handy sensitive and accurate method of diagnosis. Key Words: PCR Chlamydia trachomatis; Infection in the genital tract of women.

KEY WORDS PCR Circuldating measuremeat of double - DNA Segaeace; Chamydia Thachomatis; Infection In The Geulter Tract Of Women