

PCR 技术在钩端螺旋体病例诊断中的应用

汪海波, 谭华, 冯子力, 唐明慧, 史咏梅, 莫秋华, 杨泽

珠海国际旅行卫生保健中心, 广东 珠海 519020

摘要:目的 了解聚合酶链式反应(PCR)检测技术在钩端螺旋体病临床诊断中的作用。方法 利用 PCR 检测技术对根据临床症状和抗体筛查结果已经确诊的病例进行进一步排查。结果 临床诊断的 1 例“阳性”病例和 3 例疑似病例的 PCR 检测结果都为阴性。结论 鉴于目前绝大多数实验室并不开展针对钩端螺旋体的菌体培养分离和显微镜凝集实验, 对于钩端螺旋体病例, 应运用 PCR 检测技术加以甄别, 排除某些抗体检测试剂导致的假阳性, 避免不正当治疗。

关键词: 钩端螺旋体病; 诊断; 聚合酶链式反应(PCR); 应用

中图分类号: R514.4 文献标识码: B

The application of PCR method for the excluding of *Leptospirosis* patient

WANG Hai-bo, TAN Hua, FENG Zi-li, TANG Ming-hui, SHI Yong-mei, MO Qiu-hua, YANG Ze

Zhuhai International Travel Healthcare Center, Zhuhai, Guangdong 519020, China

Abstract: **Objective** To investigate the role of PCR method for the diagnosis of Leptospirosis. **Methods** The cases were diagnosed according to clinical symptoms and antibody screening results first and then confirmed by PCR method. **Results** PCR detection results showed that the ‘positive’ patient and other three suspicious patients were negative for Leptospira. **Conclusion** As currently most laboratories do not conduct Leptospira isolation experiment and microscopic agglutination test, PCR method should be used for the detection of Leptospira in order to exclude false-positive cases generated by clinical diagnosis and antibody screening. Our results have implications for guiding clinical treatment of Leptospirosis.

Key words: Leptospirosis; Diagnosis; PCR; Application

钩端螺旋体病是一种常见的人畜共患传染病, 其病原为致病性钩端螺旋体(*Leptospira interrogans*), 在我国共有 18 个血清群 74 个血清型^[1-2]。钩端螺旋体病的临床症状复杂, 早期极易误诊, 而实验室检测方法中经典的菌体培养法历时较长(7~10 d), 显微镜凝集试验(MAT)存在一定的安全隐患, 抗体检测方法则特异性差, 易出现假阳性结果。随着分子生物学的发展, 许多新的技术(如 PCR 技术)被应用于钩端螺旋体病的检测中。PCR 检测技术通过扩增钩端螺旋体基因组 DNA 上的特异性片段, 可快速、特异地对钩端螺旋体病进行排查和确诊。本实验室运用 PCR 检测技术对 3 例钩端螺旋体病疑似病例和 1 例“阳性”病例进行了排查, 及时发现了 4 例皆为钩端螺旋体核酸阴性, 为临床治疗提供了宝贵的指导意见, 避免了不正当治疗。

1 对象与方法

1.1 对象 1 例钩端螺旋体假阳性病例及 3 例疑似病例。假阳性病例, 男, 50 岁, 于 2013 年 11 月 26 日

因发热, 伴有畏冷, 在珠海斗门某医院门诊就诊, 予静脉输液治疗, 无好转, 其后 1 个月出现反复发热(38.0℃左右), 遂于 2013 年 12 月 28 日到珠海某大型医院入院治疗。临床症状为发热、咳嗽、呼吸不畅, 血常规检测结果为白细胞升高($14.764 \times 10^9/L$), 并自述病前曾接触过有鼠类尿液或粪便污染过的鼠笼。据此, 主治医师怀疑钩端螺旋体感染。血液样本送珠海市疾病预防控制中心(CDC)进行钩端螺旋体抗体筛查, 结果其钩端螺旋体 IgG 为阴性, IgM 为阳性, 被诊断为钩端螺旋体病。密切接触 3 例, 皆接触过有鼠类尿液或粪便污染过的鼠笼, 有轻微的发热, 被诊断为疑似病例。

1.2 方法

1.2.1 抗体检测 IgG/IgM 抗体 ELISA 检测按照试剂盒说明书进行。

1.2.2 PCR 检测 全血和钩端螺旋体培养物中 DNA 提取按照相应的 DNA 提取试剂盒的说明书进行, 测浓度后分装于 -70℃ 保存备用; PCR 反应采用荷兰皇家热带研究院世界卫生组织钩端螺旋体病参

考中心设计的引物^[3]进行。正向引物:5'-CTG AAT CGC TGT ATA AAA GT-3'; 反向引物:5'-GGA AAA CAA ATG GTC GGA AG-3',扩增产物大小为 285 bp。内参为 β -actin, 正向引物:5'-CCA TGC CAT CCT GCG TCTG-3'; 反向引物:5'-ATG TCA CGC ACG ATT TCCC-3', 扩增产物大小为 120 bp。PCR 反应体系为 buffer (含 Mg^{2+})2.5 μ l, dNTPs (各 2.5 mmol/L)2.0 μ l, rTaq DNA 聚合酶(5U/ μ l)0.25 μ l, 引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ l, 模板 2 μ l, ddH₂O 补足至 25 μ l。反应条件为 94℃预变性 5 min, 94℃ 30 s, 58℃30 s, 72℃30 s, 35 个循环; 72℃延伸 10 min, 4℃保存。取 5 μ l 扩增产物和 1 μ l 上样缓冲液混匀后, 用 2% 的琼脂糖凝胶进行电泳并成像观察结果。

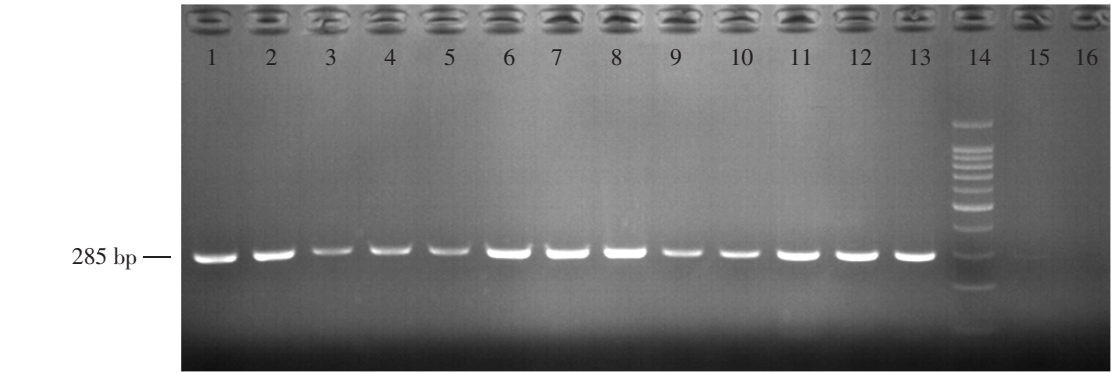
1.3 材料 13 种钩端螺旋体标准株购自中国药品生物制品检定所; ELISA 试剂盒 SERION ELISA classic Leptospira IgG/IgM 购自德国维润赛润 (virion-serion) 公司; 全血/细菌 DNA 提取试剂盒购

自北京天恩泽基因科技公司; 琼脂糖购自美国英潍捷基 (invitrogen) 公司; rTaq, dNTP 和 100 bp DNA ladder Marker 均为 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司产品; C1000 型 PCR 扩增仪和凝胶成像系统为美国伯乐 (Bio-Rad) 公司产品; NanoDrop 2000 型微量紫外分光光度计为美国 Thermo 公司产品。

2 结 果

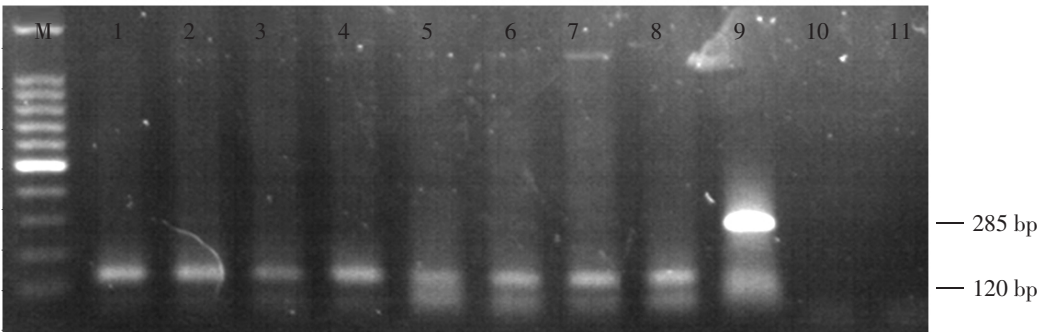
2.1 抗体检测结果 经过先后两次的抗体检测, 病例 1, 钩端螺旋体 IgG/IgM 抗体均为阴性, 密切接触者中有 1 例为钩端螺旋体 IgM 抗体阳性。

2.2 PCR 检测结果 从 13 种不同血清型的钩端螺旋体标准株中可以扩增得到 1 条钩端螺旋体特异性的目的条带(图 1), 而对于该“阳性”病例及其密切接触者, 只出现了内参 β -actin 的 120 bp 条带和一些非特异性的扩增, 经条件优化后仍然不能得到钩端螺旋体特异性的 285 bp 条带(图 2), 表明这些样本中未能检测到钩端螺旋体核酸。



注:1~13.黄疸出血群、爪哇群、犬群、致热群、秋季群、澳洲群、波摩那群、七日热群、巴达维亚群、塔拉索夫群、曼耗群、赛罗群和明尼群; M.100 bp Marker; 14.阴性对照; 15.空白对照

图 1 不同血清群的钩端螺旋体标准株的 PCR 扩增结果



注: M; 100bp Marker; 1.假阳性病例; 2~4.密切接触者; 5~8.健康人对照; 9.阳性对照; 10.阴性对照; 11.空白对照

图 2 假阳性及密切接触者 PCR 扩增结果

3 讨 论

钩端螺旋体病分布广泛, 对我国人民健康危害

严重。由于钩端螺旋体侵犯人体的多种脏器, 所以临床表现复杂, 涵盖流感伤寒型、肺出血及肺弥漫性出血型、黄疸出血型、肾型及脑膜炎型等多种类型。

如不及时诊治,或者治疗失误,将导致病人死亡等严重后果^[4]。因此,钩端螺旋体病的早期诊断是降低其病死率的关键。

在本研究中,假阳性病例由于有过鼠类接触史,临床症状部分符合钩端螺旋体病症状,使用德国SERION ELISA classic *Leptospira* IgG/IgM 试剂盒检测结果呈阳性反应,在查找不到其他致病原的情况下,被诊断为钩端螺旋体“阳性”病例,是符合临床诊断要求的。但是,在检测时没有考虑到抗体检测可能出现的假阳性结果,以及没有使用其他方法进行验证,是此次诊断最大的问题所在。

根据珠海市 CDC 上报的主要传染病流行病学统计数据,珠海属于钩端螺旋体病的低发地区,每年仅报告数例,有些年份(1993 年、1995 年、1997 年–1999 年等)甚至没有钩端螺旋体病病例报告,加上本研究中假阳性病例缺少典型的钩端螺旋体病临床症状,如三症状(即寒热、酸痛、全身乏力)、三体征(即眼红、腿痛、淋巴结肿大)等,且该病例有血小板数目不降反升,没有明显的器官损害,大剂量的青霉素治疗并不能减轻病情的事实,出于对患者负责的态度,本实验室遂组织了对该病例的实验室排查工作。

首先是抗体检测。IgM 抗体检测中常用的方法有捕获法和间接法。捕获法是用抗人 IgM 抗体 μ 链包被 ELISA 板,在样本孵育时 IgM 抗体可被固相抗体 μ 链捕获进而被检测到^[5];间接法常采用基因工程重组特异性抗原作为固相抗原,样本孵育时与固相抗原相互作用从而被检测到。本次诊断中采用的是临床实验室常用的 SERION ELISA classic *Leptospira* IgG/IgM 试剂盒。该试剂盒采用的是间接法,固相上包被的是钩端螺旋体特异性抗原^[6]。间接法测 IgM 抗体易受多种因素影响,一是样本中可能存在的高浓度 IgG 抗体,易与 IgM 抗体竞争固相抗原,干扰 IgM 抗体的检测;二是内风湿因子(RF)的存在,会与抗体复合物结合导致假阳性^[7];三是非特异性的 IgM 抗体可与特异 IgM 竞争固相抗体的结合,会影响检测的灵敏度。本次检测采用的试剂盒虽然通过高倍稀释以减少 IgG 和非特异性 IgM 的影响,并加入了 RF 吸附剂去除 RF 的影响,但是仍然未能给出准确的诊断结果,说明钩端螺旋体病检测时抗体检测法并不可靠。因此,对于阳性结果必须慎重对待。

鉴于此,只能采用其他方法对其进行检测。PCR 检测技术可通过特异性扩增使钩端螺旋体 DNA 信号放大进而检测钩端螺旋体核酸的存在,具有高特

异性、高效、高通量等优点^[8]。本次 PCR 检测采用了荷兰皇家热带研究院世界卫生组织钩端螺旋体病参考中心设计的引物,该引物也是我国卫生行业标准推荐的引物。通过对 PCR 反应条件的优化,13 种不同血清群的钩端螺旋体标准株都可以扩增得到一条特异性的 285 bp 目的片段条带,说明经过优化的 PCR 检测技术具有较宽的广谱性和较强的特异性。而在对这 4 例临床样本进行 PCR 检测时,电泳结果显示只能检测到很弱的非特异性扩增,未能出现特异性的 285 bp 目的片段条带。因此,综合流行病学调查分析结果、临床症状、初期治疗结果、抗体检测结果和 PCR 检测结果,应该对这些病例出具钩端螺旋体病阴性报告。这些结果被及时地报告给医院负责该病例的主治医师,为调整抗生素治疗方案提供了有力的参考依据。

此次排查工作,揭示了在钩端螺旋体病检测当中抗体检测结果的不可靠性,提醒在钩端螺旋体病的快速诊断中应该慎用抗体检测方法,即使使用,也应该用不同厂家的试剂进行同步比较。与此相反,PCR 检测技术则表现出了较好的特异性和广谱性。因此,在将来的钩端螺旋体病检测中应当大力推广 PCR 检测技术。另外,此次排查工作对于今后类似病例或者其他类型的病例的临床检测也具有重要的启示作用。

参考文献

- [1] 时曼华,蒋秀高.五十年来中国钩端螺旋体病流行病学研究进展[J].中华流行病学杂志,2000,21(3):228–230.
- [2] 余录根.国内钩端螺旋体病的流行特征与外膜菌苗研究进展[J].预防医学论坛,2006,12(1):69–71.
- [3] Gravekamp C,H. van de Kemp,M. Franzen,et al. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers[J]. J. Gen. Microbiol. 1993,139(8):1691–1700.
- [4] 罗文英.钩端螺旋体病的实验室诊断及研究进展[J].现代预防医学杂志,2008,35(20):18–19.
- [5] Hansen K, K Pii, A Lebech. Improved immunoglobulin M serodiagnosis in Lyme borreliosis by using a mu-capture enzyme-linked immunosorbent assay with biotinylated *Borrelia burgdorferi* flagella[J]. J. Clin. Microbiol. 1991,29(1):166–173.
- [6] Chalayon P, P Chanket, T Boonchawalit, et al. Leptospirosis serodiagnosis by ELISA based on recombinant outer membrane protein[J]. Trans R Soc Trop Med Hyg,2011,105(5):289–297.
- [7] Smits H, C Eapen, S Sugathan, et al. Lateral-Flow Assay for Rapid Serodiagnosis of Human Leptospirosis [J]. Clin Vaccine Immunol,2001,8(1):166–169.
- [8] 唐雨德,周东明,陈永红,等.应用 PCR 技术检测致病性钩端螺旋体[J].中国公共卫生,2004,20(9):1042.

收稿日期 2014–08–16