

· 综述 ·

连接酶链反应诊断沙眼衣原体感染

李敬风* 综述 王大斌* 审校

(十堰市太和医院儿科 湖北 十堰 442000)

[中图分类号] R374+.1 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2002)01-0079-02

沙眼衣原体(chlamydia trachomatis, CT)是目前性传播疾病中居首位的病原体,主要通过产道传播给新生儿^[1]。CT感染的母亲经产道分娩的婴儿50%~70%可感染CT,CT感染的发病率为0.28%。6个月以内因下呼吸道疾病住院的1/4和3/4婴儿无热肺炎系由CT引起。因此CT的早期诊断对控制疾病的传播和预防并发症十分重要。

目前用于CT感染的检测方法较多,但由于儿科病人收集标本比较困难,尤其是标本的收集不易被患儿及其家长所接受,给临床检测及早期诊断带来了一定的困难。为寻求敏感性和特异性高、适应于儿童CT感染的检测方法,本文对连接酶链反应(LCR)的原理,标本的制备及在诊断CT感染中的应用,作一综述。

1 LCR 概述

1991年,Barany从生栖热菌(thermus aquaticus)中提取耐热DNA连接酶并用该酶扩增DNA获得成功,正式将这种方法命名为连接酶链反应(ligase chain reaction, LCR)。LCR是一种新的分子生物学技术,经重复变性-复性-连接40个循环,可将连接产物扩增 10^5 以上,其敏感性与PCR相同,并且没有PCR非特异性扩增,大大改善了扩增反应的特异性和敏感性。LCR对各种类型的CT标本都有很高的敏感性^[2],如LCR检测尿标本中CT的敏感性在93%以上,特异性在99%以上^[3,4]。LCR的敏感范围为84%~100%,PCR的敏感性范围为62%~100%,明显高于组织培养的敏感性(30%~88%)。CT的细胞培养的敏感性仅为52%~

92%^[5,6],特异性可达100%。在特异性方面,LCR为99.5%以上,比聚合酶链反应(PCR)的特异性稍高。

2 LCR 反应原理

LCR技术是利用耐热DNA连接酶构建共价键,特异地连接双链DNA,经变性、退火和连接等步骤的反复循环,从而使靶DNA大量扩增。与PCR相比,LCR需要两对引物1、2和3、4,其中引物1与3互补,引物2与4互补。在模板DNA,连接酶、引物以及相应反应条件下,加热使双链DNA变性,然后退火使两对引物与互补的模板DNA复性,复性后引物1和4的3'端与5'端紧邻且互补,连接酶可修复二者之间的缺口,形成下一个模板DNA参与反应,反复循环,从而使扩增呈指数增长^[4,5]。为保证引物与靶DNA的特异杂交,LCR反应所用的寡核苷酸引物应足够长(20~25个核苷酸)。设计的4条引物的解链温度(T_m)值应在一个狭小的范围内波动。目前使用的引物有针对质粒的引物和主要外膜蛋白(MOMP)基因引物。CT 7.5 kb的隐蔽质粒是所有CT共同的,相对较稳定,有7~10个拷贝数,较只有一个拷贝的MOMP基因易于扩增,选择性质粒的引物敏感且可扩增CT所有血清型的DNA。目前多用质粒引物对CT进行检测,而用MOMP基因引物做证实实验^[7,8]。

3 LCR 反应的标本制备及反应步骤

LCR包括3个必需步骤:标本的制备、特异的

核酸序列扩增和扩增产物的检测。

3.1 标本的来源

因小儿 CT 感染与其父母 CT 感染有一定的关系。因此可收集父母与患儿的标本同时进行检测。Puolakkainen^[8]等用不同取材部位的标本做 LCR 敏感性和特异性分析,发现拭子和长时间不排尿后首次排尿(FVU)——清晨首次排尿的 LCR 敏感性相似,分别为 93.1%和 93.3%,特异性是 100%。男性可取尿道分泌物及 FVU 标本;女性可取外阴、宫颈及阴道分泌物拭子做标本^[2,9]。小儿可收集 FVU 尿液标本、眼分泌物及鼻分泌物拭子做标本。

3.2 特异的核酸序列扩增

标准的 50 μ l LCR 反应体系中含有 4 条引物、Taq DNA 多聚酶、耐热 DNA 连接酶、核苷酸底物和反应缓冲液。在热循环扩增仪中,97℃ 变性 1 s,55℃ 1 s,62℃ 50 s 完成变性、缺口修复和连接,共 40 个循环^[3]。或 93℃ 1 s 完成变性过程,然后在 59℃ 1 s 62℃ 70 s 完成复性和连接过程^[10]。与 PCR 相比,不需延伸步骤。

3.3 对扩增引物的检测

检测方法有两种,将³²P 标记的寡核苷酸(通常是 dCTP 或 dGTP)掺入反应体系,对扩增产物行凝胶电泳后放射自显影,或用美国 Abbott 实验室的自动分析诊断试剂盒(LCX),对扩增产物用微粒酶免疫检测法(MEIA)测定,操作简单,一次可检测 24 个标本(包括 6 个对照),总反应时间为 2~4 h。

4 LCR 检测在小儿 CT 感染诊断中的应用及优势

LCR 自 1995 年被美国食品和药物管理局批准运用于临床检测 CT 以来,已取得广泛运用。Lee^[11]等提出了诊断 CT 的扩大金标准:①组织培养阳性;②组织培养阴性,但 LCR 阳性经直接荧光检测证实;③组织培养阴性,而 MOMP-LCR 阳性。LCR 在国外已广泛用于成人泌尿生殖道标本 CT 的检测,但用于诊断小儿 CT 结膜炎和肺炎的文献不多。国内尚无使用 LCR 诊断小儿 CT 感染的报告。利用尿液进行 LCR 检测来诊断 CT 泌尿生殖道感染,是 CT 诊断上的突破,具有很高的敏感性和特异性。LCR 的拭子标本和 FVU 标本容易获得,且操作为无创伤性,可减轻患儿痛苦和减少医源性感染,

对无症状人群的普查易于接受。为小儿 CT 感染的临床诊断及流行病学调查,控制小儿 CT 感染、提高全民身体素质提供了一个重要的检测方法。

【参考文献】

- [1] 朱雪萍,张瑞宣,丁蕴芳,等. 新生儿沙眼衣原体肺炎的临床表现[J]. 中国实用儿科杂志,1997,12(2):97-98.
- [2] Stry A, Najin B, Lee HH, et al. Vulval swabs as alternative specimens for ligase chain reaction detection of genital Chlamydia infection in women[J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(4):836-838.
- [3] Rumpianesi F, Donati M, Luo CC, et al. Detection of Chlamydia trachomatis by a ligase chain reaction amplification method[J]. Sex Trans Dis, 1996, 23(3):177-180.
- [4] Stry A, Tomazic-Allen S, Choueiri B, et al. Comparison of DNA amplification methods for the detection of Chlamydia trachomatis in first-void urine from asymptomatic military recruits[J]. Sex Trans Dis, 1996, 33(2):97-102.
- [5] Bssiri M, Hu HY, Thomas BJ, et al. Detection of Chlamydia trachomatis in urine specimens from women by ligase chain reaction[J]. Clin Microbiol, 1995, 33(4):898-900.
- [6] Schachter J, Stamm WE, BJ Quinn TC, et al. Ligase chain reaction to detect Chlamydia trachomatis infection of the cervix[J]. J Clin Microbiol, 1994, 32(10):2540-2543.
- [7] Schepetiuk S, Kok T, Martin L, et al. Detection of Chlamydia trachomatis in urine samples by nucleic acid tests: comparison with culture and enzyme immunoassay of genital swab specimens[J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(12):3355-3357.
- [8] Puolakkainen M, Hiltunen-Back E, Reunala T, et al. Comparison of performances of two commercially available tests, a PCR assay and a ligase chain reaction test, in detection of urogenital Chlamydia trachomatis infection[J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(6):1489-1493.
- [9] Steingrimsdottir O, Jonsdottir K, Olafsson JH, et al. Comparison of Roche Cobas Amplicor and Abbott LCx for the rapid detection of Chlamydia trachomatis in specimens from high-risk patients[J]. Sex Trans Dis, 1998, 25(1):44-48.
- [10] Carroll KC, Aldeen WE, Morrison M, et al. Evaluation of the Abbott LCx ligase chain reaction assay for detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae in urine and genital swab specimens from a sexually transmitted disease clinic population[J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(6):1630-1633.
- [11] Lee HH, Chenesky MA, Schachter J, et al. Diagnosis of Chlamydia trachomatis genitourinary infection in women by ligase chain reaction assay of urine[J]. Lancet, 1995, 345(8944):213-216.

(本文编辑:俞燕)