

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.02.010

珠海口岸地区孕妇人群梅毒螺旋体基因分型的初步研究

郑水华¹, 杜明君¹, 宋雅琴¹, 唐喜军^{1△}, 涂成宁²

(1. 广东省珠海市第二人民医院检验科 519000; 2. 珠海检验检疫局卫生保健中心, 广东珠海 519000)

摘要:目的 分析珠海口岸地区孕妇人群的梅毒螺旋体感染情况及基因分型, 探讨先天性梅毒与梅毒基因分型的关系。方法 统计 2016—2017 年该院建档孕妇的梅毒检测例数为 4 414 例, 其中 42 例被确诊为现状梅毒, 其新生儿有 9 例患有先天性梅毒。对梅毒阳性患者血液进行巢式 PCR 检测 arp、tpr 基因并进行分型。结果 42 例现状梅毒孕妇有 25 例检测出 polA 基因阳性, 9 例先天性梅毒患儿检测出 7 例 polA 基因阳性; 最后综合基因分型 14a 型 2 例(6%, 2/32), 13d 型 5 例(16%, 5/32), 14d 型 25 例(78%, 25/32), 其中 7 例 polA 基因阳性的先天性患儿和母亲的型别全为 14d 型。结论 珠海口岸地区梅毒流行基因型主要为 14d 型, 同样在先天性梅毒中基因型也是 14d 型。

关键词:巢式 PCR; 基因分型; 梅毒螺旋体; 先天性梅毒

中图分类号:R446.9

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)02-0177-03

Preliminary study on *Treponema pallidum* genotyping of pregnant women in Zhuhai port area

ZHENG Shuihua¹, DU Mingjun¹, SONG Yaqin¹, TANG Xijun^{1△}, TU Chengning²

(1. Department of Clinical Laboratory, Zhuhai Second People's Hospital, Zhuhai, Guangdong 519000, China;

2. Zhuhai Inspection and Quarantine Bureau Health Care Center, Zhuhai, Guangdong 519000, China)

Abstract: **Objective** To analyze the status and genotyping of *Treponema pallidum* infection in pregnant women in Zhuhai port area, and to investigate the relationship between congenital syphilis and syphilis genotyping. **Methods** The number of syphilis test cases of pregnant women in our hospital was 4 414 from 2016 to 2017, of which 42 cases were diagnosed with current syphilis, their newborn babies, and 9 cases with congenital syphilis. Nest PCR was used to detect the meltox arp gene and tpr gene in the blood of syphilis positive patients and to classify them. **Results** A total of 25 cases of pregnant women with syphilis positive for polA gene, and 9 cases of congenital syphilis tested positive for polA gene in 7 cases. The final comprehensive gene classification type 14a had two cases (6%, 2/32), 13d type had 5 cases (16%, 5/32), 14d type had 25 cases (78%, 25/32). Among them, seven cases of congenital children and mothers with polA gene positive were all type 14d. **Conclusion** Epidemic genotype of Zhuhai port area syphilis is mainly 14d, as well as in congenital syphilis genotype.

Key words: nested PCR; genotyping; *Treponema pallidum*; congenital syphilis

梅毒主要是由梅毒螺旋体通过性交或从母体通过胎盘传入, 侵袭多系统、多器官的慢性传染性疾病, 为古老且经典的性病。早约 16 世纪时, 传入我国广东岭南一带, 当时称为“广东疮”“杨梅疮”, 此后梅毒肆意地向内地扩散。建国初期, 梅毒在我国曾一度被消灭。但近年来, 随着对外开放交流益日频繁, 梅毒重现, 其发病率呈上升趋势, 再次成为影响人类健康的重要疾病。随着实验室检测技术越来越先进, 梅毒检测技术已进入基因检测时代。基于梅毒的高感染率及高端的检测技术, 且珠海处于对外开放的口岸城市。因此, 现探讨珠海口岸地区孕妇梅毒和新生儿先天性梅毒的发病率, 以及其基因分型的关系, 并对珠海地区梅毒螺旋体基因分型进行初步研究。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2016—2017 年广东省珠海市第二人民医院建档孕妇的梅毒检测例数为 4 414 例, 经梅毒螺旋体颗粒凝集试验(TPPA)(日本富士)和环状卡片试验(RPR)(上海科华)及梅毒 IgM 抗体(德国欧蒙)检测, 其中 42 例被确诊为现状梅毒^[1]。跟踪其新生儿, 有 9 例新生儿经 TPPA、RPR 及梅毒 IgM 抗体检测诊断为先天性梅毒^[1]。留取阳性者血液, 送技术合作单位——珠海检验检疫局卫生保健中心, 从阳性者血液提取 DNA, —70℃保存, 然后进行巢式 PCR 检测梅毒酸性重复蛋白质(arp)基因和梅毒重复基因族(tpr)基因。

1.2 仪器与试剂 电泳仪系统(北京六一), PCR 仪

(罗氏),琼脂糖(上海生工),图像分析仪(珠海黑马)。PCR 引物及试剂(上海生工),Mse I 限制性内切酶(NEB)。

1.3 梅毒 DNA 阳性标本筛查 采用梅毒螺旋体 *poA* 基因 PCR 法筛查,*poA* 基因引物 377 bp,上游引物:5'-TGCGCGTGTGCGAATGGTGTGGTC-3',下游引物:5'-CACAGTGCTCAAAAACGCCTGCACG-3',PCR 反应体系总液体质量 50 μ L:1 μ L dNTPs,100 pmol 引物,10 μ L 标本 DNA,10 $\times$ buffer 10 μ L,1.75 U Taq 酶。PCR 反应流程:94 $^{\circ}$ C 5 min,1 个循环;94 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,30 个循环;94 $^{\circ}$ C 30 s,65 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,30 个循环;75 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物分析:10 μ L 反应产物,2%琼脂糖凝胶电泳,100 V,1 h。

1.4 梅毒基因分型检测

1.4.1 arp 基因检测 将梅毒 DNA 筛查阳性标本,进行 arp 基因 PCR 法检测。arp 探针引物:上游引物:5'-CAAGTCAGGACGGACTGTCC-3',下游引物:5'-GGTATCACCTGGGATGC-3',PCR 反应体系总液体质量 50 μ L:1 μ L dNTPs,100 pmol 引物,10 μ L 标本 DNA,10 $\times$ buffer 10 μ L,1.75 U Taq 酶。PCR 反应流程:第 1 循环 94 $^{\circ}$ C 5 min,62 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min;94 $^{\circ}$ C 1 min,62 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min,45 个循环;75 $^{\circ}$ C 7 min。PCR 产物分析:10 μ L 反应产物,1.5%琼脂糖凝胶电泳,100 V,1 h。

1.4.2 tpr 基因检测 将梅毒 DNA 筛查阳性标本,进行 tpr 基因巢式 PCR 法检测。第 1 次 PCR 检测,Tpr 探针引物为外引物 B1:5'-ACTGGCTCTGCCA-CACTTGA-3', A2: 5'-CTACCAGGAGAGGGT-GACGC-3',PCR 反应体系总液体质量 50 μ L:2 μ L dNTPs,60 pmol 引物,5 μ L 标本 DNA,10 $\times$ buffer 10 μ L,3.5 U Taq 酶。PCR 反应流程:94 $^{\circ}$ C 1 min,64 $^{\circ}$ C 1 min,68 $^{\circ}$ C 1 min,35 个循环;68 $^{\circ}$ C 7 min。第 2 次 PCR 检测,内引物 IP6:5'-CAGGTTTTGCCGT-TAAGC-3', IP7: 5'-AATCAAGGGAGAATAC-CGTC-3',PCR 反应体系总液体质量 50 μ L:2 μ L dNTPs,60 pmol 引物,5 μ L 标本 DNA(第 1 次 PCR 产物),10 $\times$ buffer 10 μ L,3.5 U Taq 酶。PCR 反应流程:94 $^{\circ}$ C 1 min,63 $^{\circ}$ C 1 min,68 $^{\circ}$ C 1 min,45 个循环;68 $^{\circ}$ C 7 min。PCR 产物分析:采用 Mse I 内切酶进行 RFLP 分析,酶切体系总液体质量 50 μ L:Mse I 内切酶(30 U/ μ L)2.0 μ L,10 $\times$ buffer 5.0 μ L,tprDNA 产物 13.0 μ L,ddH₂O 30 μ L,37 $^{\circ}$ C 5 h。10 μ L 酶切后产物,2%琼脂糖凝胶电泳,100 V,1 h。

2 结 果

2.1 梅毒总感染率结果 孕妇梅毒总感染率为 9.5%(42/441),先天性梅毒感染率为 21%(9/42)。

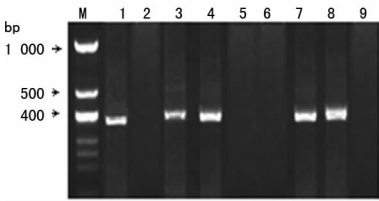
2.2 梅毒 DNA 阳性标本筛查结果 PCR 扩增检测梅毒螺旋体 *poA* 基因,42 例现状梅毒孕妇有 25 例检测出 *poA* 基因阳性,9 例先天性梅毒患儿检测出 7 例 *poA* 基因阳性。见图 1。

2.3 梅毒基因分型检测结果

2.3.1 arp 基因检测 32 例梅毒 DNA 筛查阳性标本,通过 arp 基因检测后,按照 PILLAY 等^[2]分型标准:重复序列主要为 13 型和 14 型,其中 13 型 5 例(16%,5/32),14 型 27 例(85%,27/32)。见图 2。

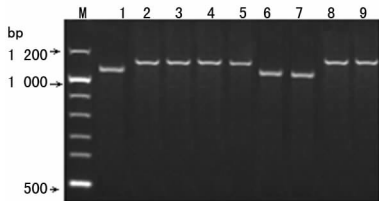
2.3.2 tpr 基因检测 32 例梅毒 DNA 筛查阳性标本,通过 tpr 基因检测及 RFLP 分析后,按照分型标准:EFLP 型别分析主要为 a 型和 d 型,其中 a 型 2 例(6%,2/32),d 型 30 例(94%,30/32)。见图 3。

2.3.3 综合 arp 和 tpr 基因分析 14a 型 2 例(6%,2/32),13d 型 5 例(16%,5/32),14d 型 25 例(78%,25/32)。14d 型为珠海地区孕妇梅毒的主要流行基因型,且 7 例 *poA* 基因阳性的先天性患儿和其母亲的型别全为 14d 型。



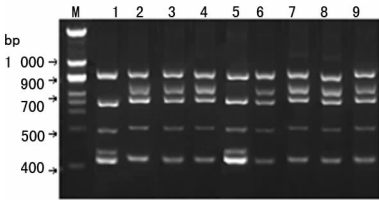
注:M 为标记物;1~9 条带为患者条带,其中 1、3、7、8 条带为阳性条带(377 bp),2、5、6、9 条带为阴性条带

图 1 *poA* 基因的 PCR 扩增产物电泳分析(部分)



注:M 为标记物;1~9 条带为患者条带,其中 1、6、7 条带为 13 型(1 099 bp),2、3、4、5、8、9 条带为 14 型(1 155 bp)

图 2 arp 基因的 PCR 扩增产物电泳分析(部分)



注:M 为标记物;1~9 条带为患者条带,其中 1、5 条带为 a 型,2、3、4、6、7、8、9 条带为 d 型

图 3 tpr 基因的 PCR 扩增产物酶切后 RFLP 电泳分析(部分)

3 讨 论

随着检测技术的日益更新,PILLAY 等^[2]首次通过 PCR 检测 arp 基因和 tpr 基因,提出了梅毒螺旋体

的基因分型,提高了梅毒的检测手段,成为近期梅毒流行病研究的热门方向。本研究探讨先天性梅毒的基因型,主要是通过研究珠海口岸地区的孕妇人群及其新生儿中的梅毒流行性情况,回顾性发现梅毒阳性孕妇,大部分是外地流动人口,未参加孕前或孕期间相关传染病的检查。在普及优生优育的时代,孕前和孕期的相关检查非常必要,因为梅毒及时检查发现,及时治疗,可以治愈。另外,虽然目前母婴阻断技术方面比较成熟,但还是有一定的感染概率。本研究结果表明,胎传的先天性梅毒可能与梅毒的基因亚型相关:珠海地区孕妇及先天性梅毒的基因型主要是 14d 型。与其他研究一致^[3-7]。可能与 14d 型梅毒株的梅毒血清固定(赖药性),毒力及传染性都较强有关^[8]。其次,本研究还发现 13d 型和 14a 型,其中 14a 国外多报道为欧洲(主要葡萄牙)流行广泛亚型株^[9-10]。珠海地区的出现可能原因:珠海地区为开放城市,且地处出入境口岸地区,外来国外人员(主要葡萄牙人)出入频繁,或国人出入澳门地区,很有可能将此亚型梅毒株带入珠海。

本研究由于缺少梅毒 Nichols 株作对照,通过电泳图像分析片段大小,但得出的模式与 PILLAY 等^[2]提出的梅毒螺旋体的基因分型一致。其次本研究采用血液标本,阳性率只有 63%(32/51),可能比其他标本类型(皮损分泌物等标本)要低,导致阳性标本数量不多,分类统计数据不全,但对梅毒流行性研究还是有一定的临床价值^[11-12]。

参考文献

[1] KINGSTON M, FRENCH P, HIGGINS S, et al. UK national guidelines on the management of syphilis 2015[J]. International Journal of STD&AIDS, 2015, 27(6): 421-447.

(上接第 176 页)

[9] 唐慧嫻. CRISPR/Cas9 技术用于清除乙型肝炎病毒的研究进展[J]. 医学研究生学报, 2017, 30(8): 865-868.

[10] WONG D K, SETO W K, CHEUNG K S, et al. Hepatitis B virus core-related antigen as a surrogate marker for covalently closed circular DNA [J]. Liver Inter, 2017, 37(7): 995-1001.

[11] 于乐成, 侯金林. 乙型肝炎病毒感染抗病毒治疗临床转归评估指标现状及展望[J]. 中华肝脏病杂志, 2017, 25(7): 162-166.

[12] 李春艳, 陈延平, 徐光华, 等. 慢性乙型肝炎患者肝组织中 HBV cccDNA 定量检测方法的建立[J]. 肝脏, 2017, 22(10): 930-933.

[13] HONG X P, KIM E S, GUO H T. Epigenetic regulation

[2] PILLAY A, LIU H, CHEN C Y, et al. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* [J]. Sex Transm Dis, 1998, 25(8): 408-414.

[3] 曾铁兵, 吴移谋, 黄澍杰, 等. 衡阳和江门地区梅毒螺旋体基因分型的初步研究[J]. 中华皮肤科杂志, 2004, 37(12): 692-694.

[4] 郑和平, 欧志英, 胡玉山, 等. 梅毒螺旋体的巢式 PCR 检测与基因分型[J]. 中华皮肤科杂志, 2005, 38(9): 408-414.

[5] 曾铁兵, 吴移谋, 黄澍杰, 等. 巢式 PCR 扩增梅毒螺旋体 *pol Ae* 及其临床应用的研究[J]. 中国皮肤性病杂志, 2004, 18(2): 74-76.

[6] 吴奇, 王丽, 季灵婷, 等. 上海闸北地区妊娠梅毒分子流行病学特征分析[J]. 检验医学杂志, 2016, 31(6): 486-490.

[7] 汤镇. 梅毒螺旋体基因分型及临床相关性研究进展[J]. 临床医学与临床杂志, 2016, 13(3): 420-422.

[8] 杨文生, 杨文林, 杨健, 等. 梅毒血清固定与梅毒螺旋体 *trp* 基因亚型关系的初步研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2011, 21(16): 1821-1825.

[9] FLORINDO C, REIGADO V, GOMES J P, et al. Molecular typing of *Treponema pallidum* clinical strains from Lisbon, Portugal [J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(11): 3802-3803.

[10] CASTRO R, PRIETO E, AGUAS M J, et al. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* subsp. *Pallidum* in Lisbon, Portugal [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(8): 2510-2512.

[11] 王林娜, 樊硕, 郑和义, 等. 外周血检测梅毒螺旋体 DNA 及其分子亚型的初步观察[J]. 中华医学杂志, 2014, 94(12): 928-931.

[12] 杨文生, 杨文林, 杨健. 梅毒 PCR 诊断与梅毒螺旋体基因分型研究进展 [J]. 广东医学杂志, 2010, 31(19): 2597-2599.

(收稿日期: 2018-05-29 修回日期: 2018-09-03)

of hepatitis B virus covalently closed circular DNA: implications for epigenetic therapy against chronic hepatitis B [J]. Hepatology, 2017, 66(6): 2066-2077.

[14] 叶爱珠, 刘灿, 欧启水. 乙型肝炎病毒共价闭合环状 DNA 检测技术的研究进展[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2017, 37(2): 155-160.

[15] 毛水燕, 王晨, 杨悦. 慢性乙型肝炎的抗病毒药物及靶点的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2016, 9(17): 1973-1978.

[16] 董晓琴, 张英俊, 任青云, 等. 甲磺酸莫非赛定抑制 Hep-AD38 细胞内乙型肝炎病毒共价闭合环状 DNA 转录活性的研究[J]. 中华传染病杂志, 2017, 35(5): 216-219.

(收稿日期: 2018-05-29 修回日期: 2018-08-28)