

# 内脏利什曼病患者骨髓及血内病原体特异性 kDNA 片段 PCR 扩增用于诊断的研究\*

胡孝素<sup>1</sup> 杨文天<sup>1</sup> 马莹<sup>1</sup> 陈建平<sup>1</sup>  
何生全<sup>2</sup> 许庭玺<sup>3</sup> 谢孝全<sup>3</sup>

1 华西医科大学寄生虫学研究室 成都 610041  
2 四川省南坪县人民医院内儿科 南坪 623400  
3 四川省汶川县人民医院 汶川 623000

**摘要 目的:** 建立简易、准确的诊断内脏利什曼病和病原体鉴定技术。**方法:** 采用作者设计的杜氏利什曼原虫 (*L. d.*) 种特异引物 I 和 II, 经 PCR 扩增样品内病原体 kDNA 297 bp 片段, 检测 22 例确诊内脏利什曼病 (VL) 患者骨髓、血、血清共 55 份样品和 4 例临床疑诊为黑热病患者的骨髓 (共 26 例, 59 份样品)。**结果:** (1) PCR 法与骨髓涂片镜检符合率为 96.2% (25/26); (2) PCR 法检测骨髓、血及血清的总阳性率为 95.4% (21/22); (3) PCR 法检测 22 例骨髓、16 例血样品及 17 例血清样品, 阳性率分别为 91% (20/22)、68.8% (11/16) 及 29.4% (5/17)。15 例骨髓对照样品得自 9 例白血病患者及 6 例健康人, 血及血清对照样品各得自 5 例健康人, 全部对照未见扩增产物, 均为阴性。**结论:** 采用引物 I 和 II 进行 PCR 扩增检测血内 kDNA 特异片段诊断内脏利什曼病有较好前景。

**关键词** 内脏利什曼病 诊断 PCR kDNA 骨髓 血 血清

目前, 内脏利什曼病 (黑热病) 仍是我国严重危害人民健康的寄生虫病, 特别是在山丘疫区。患者以儿童为主, 7 岁以下占 73%<sup>[1]</sup>。原虫密度低者, 应用传统的骨髓涂片镜检法, 易漏诊。不少病例经多次骨髓穿刺后, 才查见病原体得以确诊, 但给患者带来痛苦, 特别是婴幼儿患者更难以接受, 以致延误治疗时间。因此, 发展高效、准确的检测及鉴定技术以取代传统的骨髓穿刺法仍是这一领域的重点研究课题。近年的研究报道进一步揭示出利什曼原虫虫种的复杂性, 提出从基因水平进行虫种鉴定的必要性<sup>[2]</sup>。本研究采用作者等研制的杜氏利什曼原虫 (*L. d.*) 种特异引物 (I 和 II)<sup>[3-5]</sup> 进行 PCR 扩增, 证明是一种敏感的诊断技术, 同时又是能鉴定利什曼病病原体的虫种。

## 材料和方法

### 病例资料

病例来自四川省汶川县人民医院检验

科、内科及南坪县人民医院内儿科, 两县均属黑热病疫区。对 26 例临床诊断为黑热病患者进行了骨髓穿刺涂片检查, 其中有 22 例查见利杜体。另 4 例确诊为其他疾病。15 份对照骨髓样品为血液病患者 9 份及健康人骨髓 6 份, 均由华西医科大学附属第一医院提供。健康人血液及血清共 10 份。

### 骨髓、血及血清 DNA 样品的制备

骨髓及血清样品 DNA 制备方法同前文<sup>[4,5]</sup>。

血样品 DNA 制备方法为取血 1 ml, 用低渗溶血法去除红细胞, 收集白细胞, 加生理盐水恢复等渗后, 再加 N-lauroylsarcosine, 蛋白酶 K 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 60  $^{\circ}\text{C}$  水浴消化 2 h, 再进行酚/氯仿抽提。

### 引物和 PCR 反应条件

采用作者设计、合成的一对种特异性寡核苷酸引物 I 和 II<sup>[4]</sup>。引物 I、II 用量为 25

\* 本研究获纽约中华医学基金会资助, 国家教委博士学科点专项基金部分资助

pmol/100  $\mu$ l, Taq DNA 多聚酶 2 U/100  $\mu$ l (购自Life Technologies 及华美公司), 反应总体积为 100  $\mu$ l, 变性温度为 93  $^{\circ}$ C, 60 s, 链延伸温度为 72  $^{\circ}$ C, 60 s; 退火温度为 60  $^{\circ}$ C, 60 s, 循环 30- 32 个周期, 最后 1 个周期链延伸温度延长至 5 min。

**电泳及 Southern 印迹杂交**

待检患者样品及阳性、阴性对照样品扩增完毕后, 取微量样品进行琼脂糖凝胶 (1.5%, w/v) 电泳, E. B. 染色分析。经 Southern 印迹转移至尼龙膜上, 用地高辛 (digoxigenin-11-dUTP) 标记的重组质粒探针 pL K2 进行杂交, 用酶联免疫法检测结果, 方法同前<sup>[3]</sup>。

**结 果**

**PCR 扩增内脏利什曼病患者骨髓样品病原体 kDNA**

对 22 例确诊为内脏利什曼病的 VL 患者骨髓样品, 经 PCR 扩增 (引物 I、II) 后, 琼脂糖凝胶电泳表明, 20 份在 297 bp 位置显现出特定的扩增区带。Southern 印迹与 pL K2 探针杂交, 出现明显的杂交信号 (图 1, 2)。阳性率为 91%、总阳性率 95.4% (表 1)。另有 4 例临床方面疑诊为黑热病者, 骨髓涂片未查见原虫, 经 PCR 检测, 也为阴性反应。后来该 4 例分别确诊为其他疾病。PCR 法与骨髓涂片镜检法符合率为 96.2% (25/26)。15 例骨髓对照样品, 均为阴性。

**PCR 扩增内脏利什曼病患者血及血清样品病原体 kDNA**

上述 22 例确诊 VL 患者中, 有 16 例采集了血样品检测, 结果 11/16 例显示出特定扩增区带 (297 bp), 阳性率 68.8%。17 例血清样品中, 仅 5 例为阳性结果, 阳性率 29.4%, 10 份对照均为阴性 (表 1, 图 3)。

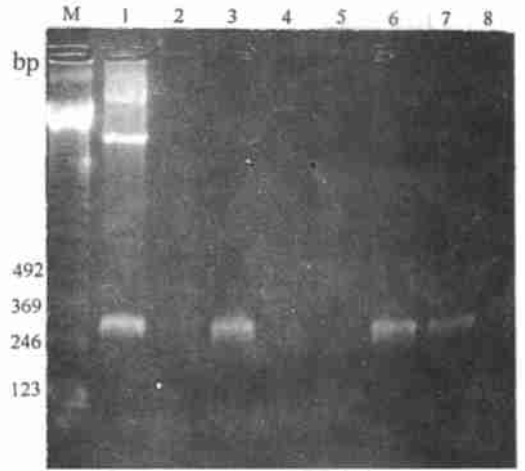


图 1 用引物 I 和 II 进行 PCR 扩增检测 VL 患者骨髓、血及血清样品中病原体 kDNA 的琼脂糖凝胶 (1.5%, w/v) 电泳, E. B. 染色

Fig 1 PCR amplification with primers I and II to detect the kDNA specific fragment in VL patient's bone marrow, blood and serum samples. Electrophoresis was run on 1.5% agarose gel, stained with ethidium bromide.

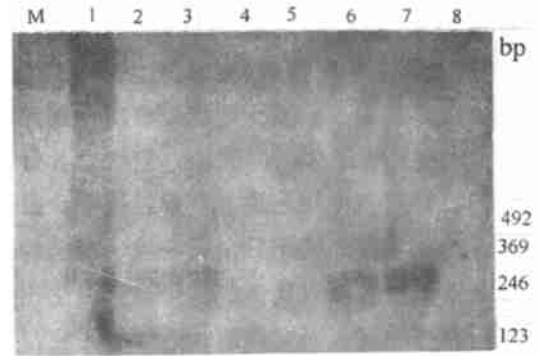


图 2 与重组质粒探针 pL K2 Southern 印迹杂交酶联免疫检测结果

M: DNA 分子标准参照物 (bp); 1: pL K2; 2- 4: 患者 No. 21 骨髓、血及血清样品; 5- 7: 患者 No. 22 骨髓、血及血清样品; 8: 健康人血样品。

Fig 2 Hybridization of Southern blot of Fig 1 with the recombinant plasmid probe pL K2 detected by ELISA.

M: DNA size marker; 1: pL K2; 2- 4: Bone marrow, blood and serum samples of patient No. 21 respectively; 5- 7: Bone marrow, blood and serum samples of patient No. 22 respectively; 8: Blood samples of normal persons

表1 确诊VL病例与对照例的骨髓、血、血清样品PCR扩增(引物I、II)检测病原体kDNA结果  
Table 1 Results of detecting *L. donovani* kDNA in bone marrow, blood, serum from the confirmed VL patients and controls by PCR amplification with primers I and II

组别 Group	骨髓 Bone marrow	血 Blood	血清 Serum	总阳性率(%) Total positivity (%)
确诊VL病例 Confirmed VL patients	20/22* (91%)**	11/16* (68.8%)**	5/17* (29.4%)**	21/22* (95.4%)**
对照例 Controls	0/15* (0)**	0/5* (0)**	0/5* (0)**	

\* 阳性病例数/检测病例数 Number of positive cases/Number of cases examined

\*\* 阳性率 Positive rate

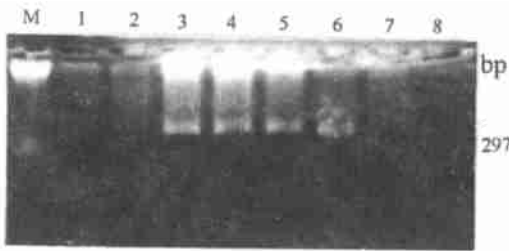


图3 用引物I和II进行PCR扩增检测8份VL患者骨髓样品中病原体kDNA的琼脂糖凝胶(1.5%, w/v)电泳, E. B. 染色

Fig. 3 Detection of kDNA fragment in bone marrow specimens from the 8 VL patients by PCR amplification with primers I and II, PCR products were run on 1.5% agarose gel, stained with ethidium bromide

## 讨论

内脏利什曼病的诊断一直是该病防治工作的重要课题。近年来的研究报道,对利什曼原虫种复杂性有了更深入了解。过去认为,热带利什曼原虫(*L. tropica*)引起皮肤利什曼病,近年文献报道,*L. tropica*可致内脏利什曼病的证据增多<sup>[2,6]</sup>。因而,不仅需要从临床表现加以鉴别,更需要从基因水平鉴别它们<sup>[2]</sup>。

PCR技术以其体外高效特异地扩增目的DNA片段成功地用于多种寄生原虫的检测和原虫病的诊断<sup>[7,8]</sup>。Herbert AA等<sup>[9]</sup>应用PCR扩增检测锥虫微环kDNA分子的高度敏感性。PCR技术随所选择的引物不同可以进行利什曼原虫种系鉴定。杨文天、胡孝素(1993)<sup>[4,5]</sup>报道,用作者设计并合成的寡核

苷酸引物I和II,成功地扩增了杜氏利什曼原虫种特异性kDNA片段。扩增产物聚丙烯酰胺凝胶电泳和斑点杂交结果都表现出杜氏利什曼原虫种特异性,对所试皮肤利什曼病的病原体,均未见特定扩增区带出现<sup>[3]</sup>。在敏感性研究方面,曾扩增系列稀释的纯化*L. d.* kDNA,结果产生阳性的最低模板需要量为1fg。这对引物用于PCR扩增检测22例确诊VL患者的骨髓、血及血清样品,总阳性率为95.4%。另4例非黑热病患者PCR检测显示阴性。这与骨髓涂片镜检阴性和临床治疗效果均一致,提示该法敏感性与特异性均较高。

本文结果表明,PCR检测血样品kDNA阳性率为68.8%(11/17),虽有待改进方法提高其敏感度,但已显示出通过PCR扩增检测血样品内kDNA诊断内脏利什曼病的可喜前景,这和Sm yth等<sup>[10]</sup>近年报道的结果相近。值得提出的是,病例No. 22,用PCR检测血kDNA,显示了特定的阳性扩增区带,并经Southern杂交证实,弥补了该病例骨髓样品的阴性结果(图1-3)。

## 参考文献

- 1 吴远祥,李国茹,高斌,等 四川省黑热病人死因分析 地方病通报 1995;10:47
- 2 Dobner P, Loscher T, Rinder H. Intra- and interspecific polymorphisms of *L. donovani* and *L. tropica* in circle DNA. Parasitol Res 1994; 80:474
- 3 杨文天,胡孝素,吕洪刚 地高辛标记杜氏利什曼原虫kDNA片段特异性分析和序列测定 中国寄生虫病防治杂志 1994;7:94
- 4 杨文天,胡孝素 PCR扩增技术用于犬内脏利什曼病病原体kDNA的检测 实用寄生虫病杂志 1993;1(1):6
- 5 杨文天,胡孝素 杜氏利什曼原虫特异性kDNA片段扩增及用于内脏利什曼病的研究 实用寄生虫病杂志 1993;1(3):1

- 6 Kreutzer RD, Grogil M, Ncva FA, et al Identification and genetic comparison of leishmanial parasites causing viscerotropic and cutaneous disease in soldiers returning from operation Desert Storm. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 49: 357
  - 7 Rodgers MR, Popper ST, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *L. eishmania*. *Exp Parasitol* 1990; 71: 267
  - 8 万磊, 陈培霞, 薛采芳, 等. 套式 PCR 扩增特定 SSU rDNA 片段诊断恶性疟研究. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志* 1995; 13: 174
  - 9 Herbert AA, David SS, Lee MC, et al. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol* 1991; 48: 211
  - 10 Smyth AJ, Ghosh A, Hassan MQ, et al. Rapid and sensitive detection of *L. eishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala azar patients. *Parasitology* 1992; 105: 183
- 1996年3月16日收稿 1996年10月21日修回  
(编辑: 李雅卿)

## STUDIES ON DIAGNOSIS OF VISCERAL LEISHMANIASIS BASED ON PCR AMPLIFICATION OF LEISHMANIA DONOVANI kDNA FRAGMENT FROM BONE MARROW AND BLOOD SAMPLES OF VISCERAL LEISHMANIASIS PATIENTS\*

Hu Xiaosu<sup>1</sup>, Yang Wentian<sup>1</sup>, Ma Ying<sup>1</sup>, Chen Jianping<sup>1</sup>  
He Shengquan<sup>2</sup>, Xu Tingxi<sup>3</sup>, Xie Xiaquan<sup>3</sup>

- 1 Laboratory of Parasitology, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041
- 2 Nanping County People's Hospital, Nanping 623400
- 3 Wenchuan County People's Hospital, Wenchuan 623000

### ABSTRACT

**AM:** To develop a simple and accurate technique for the diagnosis of visceral leishmaniasis (VL) and identification of *L. eishmania* pathogen. **METHODS:** Based on a set of oligonucleotide primers I and II designed by the authors with *L. donovani* specificity, a polymerase chain reaction (PCR) was conducted to amplify a minicircle kDNA fragment (297 bp) for identification and detection of *L. donovani* in the bone marrow, blood and serum samples from 22 confirmed VL patients and 4 bone marrow samples from 4 clinically diagnosed cases (59 samples collected from 26 cases). **RESULTS:** (1) The coincidence rate between PCR and bone marrow smear method was 96.2% (25/26); (2) The total positivity of PCR with the bone marrow, blood and serum was 95.4% (21/22); (3) The positive rate of PCR amplification with bone marrow, blood and serum specimens were 91.0% (20/22), 68.8% (11/16) and 29.4% (5/17), respectively. The controls included 15 bone marrow samples from 9 leukemia patients and 6 normal persons; 5 blood and 5 serum samples of normal persons. No amplification product was showed from all of the controls. **CONCLUSION:** The result shows that the diagnosis of visceral leishmaniasis based on detecting kDNA in blood by PCR amplification with primers I and II is promising.

**Key words:** Visceral leishmaniasis, diagnosis, PCR, kDNA, bone marrow, blood, serum

\* Project supported by the China Medical Board of New York, and in part from the Special Fund for Doctoral Program in Universities of Chinese Educational Committee