

文章编号:1000-7423(2006)-02-0144-02

利用 PCR 技术检测阴道毛滴虫体内的人型支原体

方顺丽, 肖建春, 伦照荣*

【摘要】 采用人型支原体 16S rDNA 的特异引物, 对从广州市多所医院门诊患者分离到的 28 株阴道毛滴虫进行 PCR 检测, 结果有 12 株感染了人型支原体, 感染率为 42.9%。这显示了阴道毛滴虫和人型支原体之间的共生关系在中国具有普遍性。

【关键词】 阴道毛滴虫; 人型支原体; PCR 检测

中图分类号: R382.211

文献标识码: B

Detection of *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis* by PCR

FANG Shun-li, XIAO Jian-chun, LUN Zhao-rong*

(Center for Parasitic Organisms, School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

【Abstract】 Twelve of 28 isolates of *Trichomonas vaginalis* collected from patients in hospitals in Guangzhou were found naturally infected with *Mycoplasma hominis* by PCR using specific primers. It suggests that the symbiosis of *M. hominis* in *T. vaginalis* also commonly occurs in China.

【Key words】 *Trichomonas vaginalis*; *Mycoplasma hominis*; PCR detection

Supported in part by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (036606 and 04105510).

* Corresponding author, E-mail: Lsszr@mail.sysu.edu.cn

人型支原体(*Mycoplasma hominis*)是一种常见的寄生于人体泌尿道和生殖道的病原体^[1], 与自发性流产、产褥热、子宫内膜异位、输卵管炎等密切相关, 并可致不育。Rappelli 等^[2]于 1998 年首次报道在阴道毛滴虫滋养体内发现人型支原体, 其后经实验证实两者成共生关系^[3]。从进化的角度考虑, 阴道毛滴虫很有可能使人型支原体免受宿主免疫系统的攻击^[4], 使其广泛传播。本实验通过 PCR 检测手段, 对阴道毛滴虫的广州分离虫株进行人型支原体检测。

1 材料与方 法

1.1 虫株来源及培养 28 株阴道毛滴虫虫株, 为 2003 年 11 月至 2004 年 7 月间从广州各医院妇科门诊患者中所得。以消毒棉花拭子在阴道后穹隆、子宫颈及阴道壁上拭取分泌物镜检, 将收集的毛滴虫阳性患者的临床样品接种到含抗生素的 Diamond 培养基^[5]中, 37℃培养 48 h, 传代 2~3 次, 然后将 0.5~1 ml 带毛滴虫的混悬液接种到 LB 培养基, 37℃培养 24 h, 若未出现浑浊, 且取样镜检未见污染, 即证明该样品已纯化。

1.2 阴道毛滴虫基因组 DNA 提取 将含毛滴虫的混悬液于 3 000 × g 离心 3 min, 收集阴道毛滴虫, PBS 冲洗 3 次, 去上清, 加裂解液 [1 mol/L Tris 缓冲碱, 0.5 mol/L 二乙胺四乙酸 (EDTA), 10% 葡萄糖, 2 mg/ml 溶菌酶] 裂解细胞, 然后加去

蛋白液 (0.2 mol/L NaOH、1% 十二烷基磺酸钠和 5 mol/L 醋酸钾), 经酚-氯仿抽提, 70% 乙醇沉淀, 最后溶解在 pH 8.0 的 TE 缓冲液^[6]。DNA 溶液用分光光度计 (Ultraspec 2000, 美国 Pharmacia Biotech 公司) 定量浓度和纯度。

1.3 阴道毛滴虫体内的人型支原体的 PCR 检测 用于 PCR 扩增人型支原体的 16s rDNA 中的特异引物源于 Blanchard 等^[7], 其产物大小为 334 bp, 引物序列为, Mh1: 5'-CAATGGCTAAT-GCCGATACGC-3'; Mh2: 5'-GGTACCGTCAGTCTGCAAT-3'。PCR 总反应体积为 25 μl, 反应体系中含有: 1×PCR 缓冲液, 3 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L 脱氧核苷三磷酸 (dNTPs), 1.25 U Taq DNA 聚合酶 (加拿大 BBI 公司), 引物 Mh1 和 Mh2 各为 25 pmol/L, DNA 模板为 10~20 ng。扩增反应条件为: 95℃ 10 min, 95℃ 15 s, 60℃ 60 s, 72℃ 30 s, 进行 35 个循环, 最后 72℃ 5 min^[8]。实验在同等条件下重复 3 次, 扩增产物用溴化乙锭 (EB) 预染的 1.5% 琼脂糖凝胶作电泳分析, 并用 Biostep 凝胶成像分析系统 (德国 Biostep 公司) 拍照。

2 结果和讨论

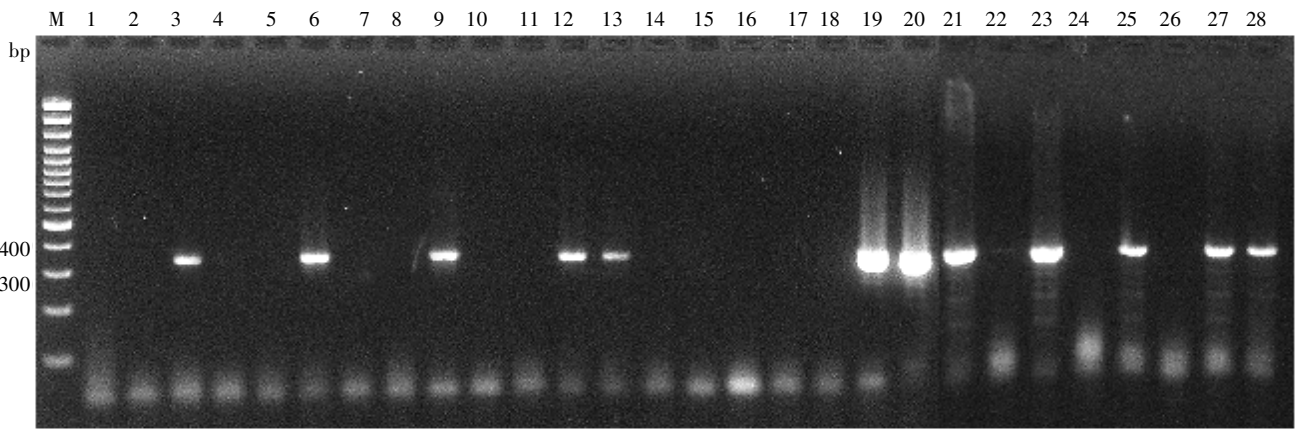
实验结果显示, 28 株阴道毛滴虫虫株 (GZTv1~28) 中有 12 株 (GZTv03、GZTv06、GZTv09、GZTv12、GZTv13、GZTv19、GZTv20、GZTv21、GZTv23、GZTv25、GZTv27、GZTv28) 扩增出 DNA 片段长度为 334 bp 的特异产物。与设计的人型支原体 16s rDNA 的片段相符, 可判定为人型支原体检测呈阳性, 阳性率为 42.9% (图 1)。

Koch 等^[9]于 1997 年发现阴道毛滴虫感染和人型支原体感

基金项目: 广东省自然科学科学基金 (036606 和 04105510)

作者单位: 中山大学生命科学学院, 华南寄生物研究中心, 广州 510275

* 通讯作者, E-mail: Lsszr@mail.sysu.edu.cn



M: DNA 标志物 100 bp, 1~28: 各分离虫株的编号。

图 1 28 个阴道毛滴虫虫株的人型支原体 PCR 检测产物电泳图谱

染存在相关性。Rappelli 等^[2]在阴道毛滴虫体内发现人型支原体, 在其所检测的 35 株阴道毛滴虫中有 33 株带有人型支原体, 阳性率为 94.3%。Rappelli 等^[3]在 40 株阴道毛滴虫中检测出 37 株人型支原体阳性(阳性率 92.5%)。并进一步用 PCR、培养和免疫法等手段证实阴道毛滴虫携带人型支原体的数目因虫株不同而异。与人型支原体共生的阴道毛滴虫不仅可以把支原体传给无人型支原体共生的毛滴虫虫株, 而且还可将其传递到上皮细胞。Dessi 等^[4]用双荧光免疫等手段进一步证实了这 2 种病原体的共生关系, 并指出人型支原体很有可能通过这种方式使其更容易感染宿主, 逃避宿主免疫系统及药物的攻击, 说明阴道毛滴虫是携带和传播人型支原体的载体。由于这种共生关系的发现, 有必要重新评估其在流行病学上产生的影响。

本研究在 28 个阴道毛滴虫虫株中检出 12 株人型支原体阳性(42.9%), 表明从中国广州分离的阴道毛滴虫虫株与人型支原体共生的现象也较普遍。因而, 进一步从生理、药理、遗传等多方面了解这 2 种病原体的关系及其对人体的影响更具意义。其中, 人型支原体的共生对阴道毛滴虫的致病性和毒力有无明显的影响, 共生性的人型支原体在基因型上有无特殊性, 两者的共生与其产生抗药性是否有关系等问题均有待探讨。

值得注意的是, 迄今尚未证实阴道毛滴虫与其他种类的支原体[如解脲支原体(*Ureaplasma urealyticum*)和生殖支原体(*Mycoplasma genitalium*)等]具有这种共生关系^[23]; 是什么因素将阴道毛滴虫和人型支原体联系在一起, 有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Brouqui P, Raoult D. Endocarditis due to rare and fastidious bacteria [J]. Clin Microbiol Rev, 2001, 14: 177-207.
- [2] Rappelli P, Addis MF, Carta F, et al. Mycoplasma hominis parasitism of Trichomonas vaginalis [J]. Lancet, 1998, 352: 1286.
- [3] Rappelli P, Carta F, Delogu G, et al. Mycoplasma hominis and Trichomonas vaginalis symbiosis: multiplicity of infection and transmissibility of M. hominis to human cells [J]. Arch Microbiol, 2001, 175: 70-74.
- [4] Dessi D, Delogu G, Emonte E, et al. Long-term survival and intracellular replication of Mycoplasma hominis in Trichomonas vaginalis cells: potential role of the protozoan in transmitting bacterial infection [J]. Infect Immun, 2005, 73: 1180-1186.
- [5] Diamond LS. The establishment of various trichomonads of animal and man in axenic culture [J]. J Parasitol, 1957, 43: 488-490.
- [6] Lawing LF, Hedges SR, Schwelke JR. Detection of trichomonosis in vaginal and urine specimens from women by culture and PCR [J]. J Clin Microbiol, 2000, 38: 3585-3588.
- [7] Blanchard A, Yanez A, Dybvig K, et al. Evaluation of intraspecies genetic variation within the 16S rRNA gene of Mycoplasma hominis and detection by polymerase chain reaction [J]. J Clin Microbiol, 1993, 31: 1358-1361.
- [8] Stellrecht KA, Woron AM, Mishrik NG, et al. Comparison of multiplex PCR assay with culture for detection of genital mycoplasmas [J]. J Clin Microbiol, 2004, 42: 1528-1533.
- [9] Koch A, Bilina A, Teodorowicz L, et al. Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum in patients with sexually transmitted diseases [J]. Wien Klin Wochenschr, 1997, 109: 584-589.

(收稿日期:2005-08-08 编辑:伯韦)

(上接第 143 页)

- [27] Zhu X, Chilton NB, Jacobs DE, et al. Characterization of Ascaris from human and pig hosts by nuclear ribosomal DNA sequences [J]. Int J Parasitol, 1999, 29: 469-478.
- [28] Lin D, Liu Q, Jiang JS. Application of polymerase chain reaction linked restriction fragment length polymorphism in the interspecific differentiation of Ascarides [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica sinica, 2002, 33: 585-590. (in Chinese)
(蔺东, 刘群, 蒋金书. PCR-RFLP 方法在蛔虫种间鉴别上的应用 [J]. 畜牧兽医学报, 2002, 33: 585-590.)
- [29] Peng W, Yuan K, Zhou X, et al. Molecular epidemiological investigation of Ascaris genotypes in China based on single-strand conformation polymorphism analysis of ribosomal DNA [J]. Elec-

trophoresis, 2003, 24: 2308-2315.

- [30] Peng W, Yuan K, Hu M, et al. Mutation scanning-coupled analysis of haplotypic variability in mitochondrial DNA regions reveals low gene flow between human and porcine Ascaris in endemic regions of China [J]. Electrophoresis, 2005, 26: 4317-4326.
- [31] Anderson TJ. Ascaris infections in humans from North America: molecular evidence for cross-infection [J]. Parasitology, 1995, 110: 215-219.
- [32] Nejsum P, Parker ED Jr, Frydenberg J, et al. Ascariasis is a zoonosis in Denmark [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43: 1142-1148.

(收稿日期:2004-09-16 编辑:伯韦)