

两者差异有统计学意义($\chi^2=37.025\ 6, P<0.05$)。见表 1。

表 1 RPR 法与 CLIA 法筛查梅毒结果比较

RPR 法	CLIA 法		合计(n)
	阳性(n)	阴性(n)	
阳性(n)	30	0	30
阴性(n)	39	1 804	1 843
合计(n)	69	1 804	1 873

3 讨 论

RPR 法是目前临床实验室最常用的梅毒筛查、疗效观察及愈后判断的方法^[3-4]。分析其结果时须结合病史、临床表现及其他试验结果综合判断,观察结果时又须用肉眼判断,存在一定的主观性,检测时需手工将样本做系列稀释,不适用于大批量标本的术前筛查。CLIA 法为国内近年来新开发的梅毒特异性抗体检查方法,CLIA 法采用仪器进行检测分析,结果客观准确,数据保存方便,同时也有利于对实验室进行质量控制等规范操作^[5]。其敏感性和特异性与梅毒的确诊试验——梅毒螺旋体抗体明胶颗粒凝集试验(TPPA)相当,可作为 TP-PA 的替代试验,在临床中广泛应用^[6-8]。

临床实验室在进行梅毒血清学检查时,通常选用检测非特异性反应素的方法(如 RPR、TRUST 法等)作为筛查和疗效观察试验,检测特异性抗体的方法(TPPA 法、ELISA 法、CLIA 法等)作为确诊试验,并将两种试验的检测结果相结合来进行临床梅毒的诊断^[9-10]。如果两种方法的检测结果均为阴性,则可排除梅毒或为感染初期;如前一种方法的结果为阳性,后一种方法的结果为阴性,则为假阳性反应或感染初期;如前一种方法的结果为阴性,后一种方法的结果为阳性,则为梅毒治疗期或梅毒晚期;如果两种检测结果均为阳性,则确诊为梅毒^[11]。本组结果显示对手术前标本进行梅毒筛查时,CLIA 法的阳性率显著高于 RPR 法,且本研究中没有出现 RPR 法阳

性、CLIA 法阴性的病例,说明 CLIA 法既适合作为梅毒的确诊试验,也适用于大批量手术前标本的梅毒筛查。

综上所述,CLIA 法作为新开发的梅毒确证方法,仪器操作简单,结果客观,阳性标本漏检率低,数据易保存,非常适合大批量标本的检查,是较为理想的手术前梅毒筛查方法之一。

参考文献

[1] 管世江. 2008~2010 年某区梅毒疫情趋势[J]. 临床和实验医学杂志, 2011, 10(10): 787.

[2] 宇传华. Excel 统计分析与电脑实验[M]. 北京: 电子工业出版社, 2009: 185-191.

[3] 徐志伟, 詹明华, 王莎娜. 梅毒血清学检测方法进展及评价[J]. 河北北方学院学报(医学版), 2010, 27(3): 80-82.

[4] 张建平, 苏良香. 三种梅毒血清试验方法学评价[J]. 现代检验医学杂志, 2010, 25(6): 14-15.

[5] 金月兰, 顾伟鸣, 杨阳, 等. 化学发光免疫分析法与梅毒螺旋体明胶凝集试验检测梅毒螺旋体特异性抗体的比较[J]. 中华检验医学杂志, 2008, 31(11): 1229-1230.

[6] 祝新, 吴志周, 柯建良. 四种梅毒血清学试验检测方法的比较[J]. 热带医学杂志, 2008, 8(9): 933-934.

[7] 吴志周, 祝新. TPPA 法与化学发光法检测梅毒螺旋体特异性抗体的比较[J]. 岭南皮肤性病科杂志, 2008, 15(3): 138-139.

[8] 侯晓菁, 梁艳, 陈洁, 等. 化学发光法检测梅毒螺旋体特异性抗体的试验评价[J]. 检验医学, 2010, 25(5): 365-367.

[9] 陈利琼, 杨桂英, 刘玉平. 梅毒特异性抗体与非特异性抗体的临床应用分析[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(8): 912-913.

[10] 杨飞. TPPA 和 RPR 联合检测在梅毒诊断和疗效观察中的应用价值[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(7): 713-714.

[11] 刘金涛. 梅毒螺旋体检测方法及其临床应用[J]. 国际生物制品学杂志, 2011, 34(1): 36-39.

(收稿日期: 2012-01-26)

• 检验技术与方法 •

葡萄糖消耗定量分析法在粪便肠道菌群总数检测中的应用

王书华, 葛才保

(江苏省溧水县人民医院检验科 211200)

摘 要:目的 建立一种以葡萄糖消耗为定量依据的肠道菌群总数分析方法。方法 观察肠道菌群在生长、繁殖过程中的葡萄糖消耗规律, 确定能够反映细菌生长状况的葡萄糖测定时间。通过测定已知大肠杆菌含量样本在规定培养时间内的葡萄糖剩余量, 建立细菌含量和葡萄糖消耗量的关系。结果 肠道菌群 37 ℃ 培养 5 h, 培养基葡萄糖含量变化明显, 能较好地反映细菌生长情况。样本细菌含量与葡萄糖消耗呈正相关, $Y=82.475X+2.149\ 2, r^2=0.932\ 5$, 可以通过葡萄糖消耗量, 计算样本细菌含量。结论 该方法结果准确, 操作简便。

关键词: 肠道菌群; 大肠杆菌; 葡萄糖消耗

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 08. 037

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)08-0969-02

肠道菌群是人体重要的组成部分, 在维持肠道的正常结构和生理功能、拮抗病原微生物、在定植与感染、刺激或调控人体的免疫功能方面具有重要的作用。但现代饮食结构的改变和各种抗生素的使用, 使肠道菌群的数量或各分组属群数量发生改变而产生肠道菌群失调, 并与许多疾病的发生、发展密切相关^[1-2]。研究发现肠道菌群总数、各属群比例还和机体的能量摄取、免疫功能相关^[3-4]。因此有必要建立一种能了解各种生理、病理状态下肠道菌群总数变化或能比较多少的临床实用检测方法。

1 资料与方法

1.1 一般资料 该院健康体检者(排除腹泻、便秘、近期抗生素使用、活菌制剂使用及心血管、代谢性疾病)59 例, 其中男 32 例, 女 27 例, 年龄 35~62 岁, 平均年龄 48 岁。

1.2 仪器与试剂 HITAICHI 7600 生化分析仪, 配套 CEN-TRONIC 葡萄糖试剂(批号: GF02101L66L)用于葡萄糖测定。生物梅里埃 ATBTM Medium (批号: 866960601)培养基, 37 ℃ 培养。经该院微生物室鉴定的标准大肠埃希菌菌株。

1.3 方法 挑选匀质成形大便 1 g 于 1.0 mL 培养基中,充分混匀,37 ℃ 培养 5 h 后,4 000 r/min 离心沉淀,测定上清液葡萄糖浓度。葡萄糖消耗量=培养基原有葡萄糖量-培养后葡萄糖剩余量。

1.4 统计学处理 Excel 2003 制作图表,样本中细菌含量与培养基中葡萄糖消耗量经回归分析建立回归方程。

2 结果

2.1 肠道菌群生长过程中葡萄糖变化 健康成人 5 例,各挑选匀质成形大便 1 g 于 1.0 mL 培养基中,充分混匀。再将此 5 例培养基混合均匀,37 ℃ 培养,在不同时间取出部分培养基,离心沉淀,测定上清液葡萄糖浓度。细菌培养过程中,随细菌生长、繁殖,葡萄糖不断被消耗。培养 2~7 h 之间,细菌进入对数生长期,葡萄糖快速下降,5 h 测定葡萄糖能充分了解细菌生长情况。

2.2 不同大肠杆菌含量样本与培养基葡萄糖消耗量的相关性 取标准大肠埃希杆菌菌株,普通培养基培养 24 h,生理盐水调制大肠菌液,经传统稀释培养法调制为 1×10^{10} /mL 大肠杆菌菌液。接种 0.1 mL 浓菌液于 0.9 mL 培养基中,混匀,编 1 号培养管。1 号培养管中取 0.1 mL 菌液接种于 0.9 mL 培养液中,编 2 号管,以此类推,分别制成含大肠杆菌 ($1 \sim 100\,000$) $\times 10^5$ /mL 浓度的标准菌液管。37 ℃ 培养,5 h 后测定上清液葡萄糖浓度,测定未使用培养基的葡萄糖浓度,并计算葡萄糖消耗量。样本中细菌含量与培养基中葡萄糖消耗量呈正相关,回归方程: $Y = 82.475X + 2.149\,2$, $r^2 = 0.932\,5$ 。样本细菌含量高,葡萄糖消耗量也高。

2.3 健康人群分析 经 5 h 培养后,培养基葡萄糖剩余量在 $4.0 \sim 6.0$ $\mu\text{mol/L}$ 之间,葡萄糖消耗量在 $8.0 \sim 10.0$ $\mu\text{mol/L}$ 之间,肠道菌群含量为 $(1\,000 \sim 8\,500) \times 10^6$ /g 大便。

3 讨论

本组直接使用健康人群混合大便,充分反映了肠道菌群的组成。通过对培养过程中的葡萄糖监测,观察到随着肠道菌群在培养基中的生长、繁殖,葡萄糖被不断消耗,2 h 后细菌进入对数生长期,葡萄糖被快速消耗,剩余葡萄糖直线下降,在 5 h 测定葡萄糖能较好地反映细菌生长过程中葡萄糖的消耗量。通过测定不同大肠杆菌浓度在 37 ℃ 培养 5 h 后的葡萄糖剩余量,并计算出培养基中的葡萄糖消耗量,经回归分析, $r^2 = 0.932\,5$,相关性较好,样本细菌含量与葡萄糖消耗量密切相关。选用大肠杆菌作为标准菌种,基本代表了肠道菌群的主要菌种,避免因生长、繁殖速度不同而造成的实验误差,并可以根据回归公式准确计算出测定样本的细菌含量。

新近发展的代谢酶分析法、rRNA 序列分析法、racA 基因序列分析法、表型指纹图谱分析法、基因指纹图谱分析法、脉冲凝胶电泳法、变性梯度凝胶电泳分析法,因实验条件复杂、技术要求高、分析成本高、分析周期长、死亡菌体进入分析范围等,不利于临床实际应用^[5]。陈章捷等^[6]采用高效离子交换色谱分离分析方法建立了动物肠道菌群的分析,但也不利于大批量样本检测。余道君等^[7]建立的悬浮芯片快速检测系统能否用于肠道菌群分析,有待进一步研究,但也要经过 18 h 培养。本组建立的以培养基中的葡萄糖消耗量比较样本细菌的多少具有简单、方便和结果可靠的优点,具有临床应用价值。

本组所用培养基为普通培养基,经实际测定,葡萄糖含量为 14.0 $\mu\text{mol/L}$,能适应大肠杆菌等肠道菌群生长。刘俭等^[8]研究表明,此葡萄糖浓度能适应大肠杆菌等大部分肠道菌群生长。经 5 h 培养后,葡萄糖浓度在 $2 \sim 10$ $\mu\text{mol/L}$ 左右,也在常

规葡萄糖测定线性范围内,本组方法可靠,结果准确。由于肠道菌群是个复杂群体,还包括许多厌氧性细菌,只要改变培养条件即可比较厌氧菌的多少,也可以选用其他选择性培养基作特定菌群的比较分析,所以本组只是探讨了一个可选择的活菌计数方法。对肠壁定植菌群和一些不能在此培养基生长的细菌,依然不能有效判断其多少。本组测得健康人群肠道菌群含量为 $(1\,000 \sim 8\,500) \times 10^6$ /g 大便,只是大肠杆菌等非厌氧类细菌的活菌总数。

近年来肠道菌群和人体疾病相关性研究得到重视,基因组研究表明,肠道菌群有 300 多万个基因,在人体疾病发生和正常机能发挥方面具有重要作用^[9]。赵立平和张晨虹^[10]提出了肠源性疾病概念,Zeng 等^[11]报道肠道菌群改变促进心血管疾病的发生。葛才保等^[12]通过细胞外 ATP 研究,发现肠道菌群可能通过释放 ATP 而影响肌体机能发挥和促进 2 型糖尿病的发生。肠道菌群的定量分析技术也在不断发展中,竞争性 PCR 技术和荧光定量分析技术也可以用于肠道菌群的定量分析^[13]。本组建立的以葡萄糖消耗量定量分析肠道菌群总数方法,有益于肠道菌群的比较研究,也为肠道菌群和机体疾病研究提供了新的途径。

参考文献

- [1] 赵琳,苏本利. 肠道菌群与代谢综合征[J]. 医学与哲学(临床决策论坛版),2008,29(12):18-20.
- [2] 管远志. 肠道菌群及其生物学意义[J]. 临床儿科杂志,2009,27(11):1095-1097.
- [3] Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, et al. An obesity—associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest[J]. Nature,2006,444(12):1027-1031.
- [4] Mizuho H. A transitions in oral and intestinal microflora composition and innate immune receptor-dependent stimulation during mouse development infection and immunity[J]. Blood,2010,78(2):639-650.
- [5] Daniel J, Sullivan C. Methods for analysis of the intestinal microflora[J]. Curr Issues Intest Microbiol,2000,1(2):39-50.
- [6] 陈章捷,刘敏,赵志平,等. 采用高效离子交换色谱分离分析动物肠道菌群方法初探[J]. 应用与环境生物学报,2006,12(2):278-282.
- [7] 余道君,周舟,韦跃,等. 悬浮芯片系统快速检测常见葡萄球菌的初步实验研究[J]. 国际检验医学杂志,2008,29(3):193-195.
- [8] 刘俭,高蕊,陈刚,等. 高糖培养基对人体正常菌群生长代谢的影响[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(9):937-938.
- [9] 魏晓,汤意琳,周国勇,等. 人类肠道菌群与疾病关系的元基因组学研究进展[J]. 中国微生态学杂志,2011,23(1):75-80.
- [10] 赵立平,张晨虹. 肥胖相关的肠道微生物群落结构动力学与功能解析研究[J]. 生命科学,2010,12(8):1247-1253.
- [11] Zeng W, Liu L, Zhao XY, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease[J]. Nature,2011,472(16):57-63.
- [12] 葛才保,陈六生,张力. 细胞外三磷酸腺苷在细胞膜物质转运中的作用机制与 2 型糖尿病和肿瘤的病因研究[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(1):75-76.
- [13] 廖杨,刘作义. 分子生物学技术对肠道菌群检测分析的研究现状[J]. 中国微生态学杂志,2009,21(3):285-287.