

· 临床检验研究论著 ·

联合应用实时荧光定量 PCR 和噬菌体生物扩增法 在结核性脑膜炎诊断中的意义

赵 卫

(广东省中山市沙溪隆都医院, 广东中山 528471)

摘要:目的 分析联合应用实时荧光定量 PCR 和噬菌体生物扩增法在结核性脑膜炎诊断中的意义。方法 取该院于 2007 年 4 月至 2011 年 4 月收治的经临床确诊的结核性脑膜炎患者 76 例, 随机分为观察组与对照组各 38 例。对照组患者使用涂片法进行结核分枝杆菌的检查, 观察组联合使用实时荧光定量 PCR 和噬菌体生物扩增法, 比较两者检测结果的真阳性率情况。结果 观察组阳性检出率为 97.37%(37/38), 对照组阳性检出率为 57.89%(22/38), 两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 联合应用实时荧光定量 PCR 和噬菌体生物扩增法可以快速准确检测出早期结核性脑膜炎患者, 改善其预后, 值得推广使用。

关键词:聚合酶链反应; 细菌噬菌体; 结核性脑膜炎

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.21.007

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)21-2574-02

The clinical significance of joint use of real-time fluorescence quantitative PCR and phage amplified biologically assay in the diagnosis of tuberculous meningitis

Zhao Wei

(the People's Hospital of Zhongshan Shaxi Longdu, Zhongshan, Guangdong 528471, China)

Abstract: Objective To explore the diagnostic value of joint use of real-time fluorescence quantitative PCR and phage amplified biologically assay in the diagnosis of tuberculous meningitis. **Methods** 76 patients with tuberculous meningitis in our hospital from April 2007 to April 2011, which were clinically diagnosed and randomly divided into the observation group and the control group with 38 cases in each group. Patients in the control group using the smear method for Mycobacterium tuberculosis screening, the observation group used a combination of real-time fluorescence quantitative PCR and phage amplified biologically assay, comparing detection results of true positive rate. **Results** The observation group positive rate was 97.37%(37/38). The control groups positive rate was 57.89%(22/38). There was significant difference between two groups($P < 0.05$). **Conclusion** There were important values for early diagnosis of tuberculous meningitis in joint use of real-time fluorescence quantitative PCR and phage amplified biologically assay.

Key words: polymerase chain reaction; bacteriophages; tuberculous meningitis

结核性脑膜炎是临床严重脑部疾病,常伴随着身体其他部位的结核原发灶^[1]。该病于潜伏期内并不表现出明显的临床症状,一般检查难以发现,后期进展迅速,可以导致严重后遗症甚至死亡^[2]。因此,结核性脑膜炎的治疗原则为早期诊断早期治疗,避免出现不可逆性损害。以往检测结核分枝杆菌的主要方式为涂片法和结核杆菌培养法,但因其检测周期较长,敏感性及特异性不高,故对于结核性脑膜炎的临床价值有限。目前最新的检测脑脊液结核分枝杆菌的方法为实时荧光定量 PCR 和噬菌体生物扩增法,这两种方法以高效准确著称^[3]。本文主要分析联合应用实时荧光定量 PCR 和噬菌体生物扩增法在结核性脑膜炎诊断中的意义,具体报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 取本院 2007 年 4 月至 2011 年 4 月收治的经临床确诊的结核性脑膜炎患者 76 例,随机分为观察组与对照组各 38 例。观察组患者中男性 21 例,女性 17 例,年龄 2~58 岁,平均(28.3±7.2)岁,其中合并血行播散型肺结核 16 例、浸润型肺结核 14 例、骨结核 8 例;对照组患者中男性 20 例,女性 18 例,年龄 3~61 岁,平均(26.9±6.4)岁,其中合并血行播散型肺结核 13 例、浸润型肺结核 19 例、骨结核 6 例。

1.2 方法

1.2.1 对照组 对照组患者使用涂片法进行结核分枝杆菌的检查,分析其检测真阳性情况。

1.2.2 观察组 利多卡因局部浸润麻醉后对观察组患者进行腰椎穿刺术,取脑脊液 2.5 mL 后即可送检。对送检标本检测时联合使用实时荧光定量 PCR 和噬菌体生物扩增法。实时荧

光定量 PCR 法:取患者脑脊液 1 mL,10 000 r/min 离心 5 min,吸净上清后加入无菌生理盐水洗涤,再次离心后取沉淀,加入 DNA 提取液 40 μ L 放置于 37 $^{\circ}$ C 恒温孵箱 20 min 后取出放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱,降至室温后取出备用。吸取样本的上清液 2 μ L,离心 5 s,8 000 r/s,置于 PE-5700 型 PCR 仪(Perkin Elmer 公司)中按设定程序扩增分析。扩增条件为首先在 93 $^{\circ}$ C 下预变性 2 min,然后按 93 $^{\circ}$ C 45 s,55 $^{\circ}$ C 2 min,作 40 个循环。结核分枝杆菌 DNA(TB-DNA)结果由电脑自动分析计算,用拷贝/毫升表示,并绘制标准曲线^[4]。噬菌体生物扩增法:标本在使用前用硫酸缓冲液离心 10 min 后去除上清,吸取下层沉淀 1 mL 置于 37 $^{\circ}$ C 孵育 24 h 左右备用。取制备好的样本 1 mL 加入反应管中,同时加入杀毒剂溶液,室温下放置 5 min,加入营养液以及敏感细胞溶液,倒入培养板中,加 5 mL 液态琼脂,37 $^{\circ}$ C 孵育 24 h 后查看结果。结果判断:若大小、数量不等的噬菌斑相互融合,并表现为透明状,则为阳性;若指示细胞在培养基生长过程中,无噬菌斑出现,则为阴性。

1.3 检查真阳性率 分析观察组与对照组患者经过检测后的阳性率情况,比较两组差异。

1.4 统计学处理 使用统计学软件 SPSS18.0 对所得数据进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验,计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 观察组与对照组患者的一般情况如性别、年龄、伴随疾病等无统计学差异($P > 0.05$),具有可比性,见表 1。

2.2 检测真阳性率 观察组患者的检测真阳性率为 97.37%

(37/38) 高于对照组的 57.89% (22/38), 两者比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 观察组与对照组的一般情况比较

组别	n	性别(男/女, n/n)	年龄(岁)	伴随疾病[n(%)]		
				血行播散型肺结核	浸润型肺结核	骨结核
观察组	38	21/17	28.3±7.2	16(42.11)	14(36.84)	8(21.05)
对照组	38	20/18	26.9±6.4	13(34.21)	19(50.00)	6(15.79)
P 值		>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

3 讨 论

结核性脑膜炎多发于 3 岁以下的小儿,且在结核菌感染后的 1 年内发病,若不及时发现与治疗,可导致严重的后遗症甚至死亡,给患者家庭及社会带来巨大的损失。结核性脑膜炎患者一般临床症状明显^[5],但是也存在一部分患者症状不典型。以往的结核性脑膜炎诊断主要方法为涂片抗酸染色镜检法及结核菌培养法,涂片法敏感性及特异性均较差,结核菌培养法敏感性低,诊断周期长,许多患者在送检期就出现了疾病的不可逆性进展^[6],损害脑组织功能,故此两种方法均不符合结核性脑膜炎早期诊断,早期治疗的要求。

随着科技的发展,更多更优质的检测方法不断出现,为结核性脑膜炎的早期确诊提供了可能,实时荧光定量 PCR 和噬菌体生物扩增法就是目前较新的快速确诊方式^[7]。实时荧光定量 PCR 将寡核苷酸探针用荧光标记,与产物杂交后可以大大提高其检测的特异性,其灵敏度可达到 5~100 fg。另外,该技术在封闭状态下进行,避免了因扩增产物污染而导致的假阳性^[8]。噬菌体生物扩增法于 1997 年新建立的快速检测结核分枝杆菌的全新技术,噬菌体感染具有活性的结核分枝杆菌后,在其内部大量增殖,并裂解菌体释放出子代噬菌体,之后又重新感染新加入的细胞后使之裂解,此时可在琼脂培养板上看到透亮的噬菌斑。噬菌斑的出现情况及出现的个数可用来判断具有活性的结核分枝杆菌的存在情况^[9]。

本文主要分析联合应用实时荧光定量 PCR 和噬菌体生物扩增法在结核性脑膜炎诊断中的意义,在对 76 例肺结核患者的检测中,实时荧光定量 PCR 和噬菌体生物扩增法观察组阳性检出率为 97.37% (37/38),涂片法对照组阳性检出率为 57.89% (25/38),二者差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。可见联合应用实时荧光定量 PCR 和噬菌体生物扩增法诊断疑似结

核性脑膜炎患者,具有较高的灵敏度及较强特异性,能够快速、简便地进行检测,且真阳性率较高,有助于患者的早期治疗,避免出现后遗症。而且该方法只需进行标准的微生物学操作,无需昂贵的自动化仪器,值得在临床广泛推广应用。

参考文献

- [1] 李国钊. 实时荧光定量 PCR 技术及在结核病诊断实验室的研究和应用[J]. 临床肺科杂志, 2008, 13(10): 1315-1317.
- [2] 李洪敏, 王志伟, 张霞. 探讨荧光定量 PCR 在结核菌检测中的应用[J]. 临床肺科杂志, 2008, 13(11): 1438.
- [3] 彭丽, 罗永艾, 王国治. 噬菌体生物扩增法快速检测结核分枝杆菌标准化研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2010, 27(12): 806-810.
- [4] 张华生, 施浩, 林健雄, 等. 噬菌体裂解法与 TaqMan-PCR 法检测结核分枝杆菌的比较[J]. 中国误诊杂志, 2004, 4(9): 1401-1403.
- [5] Wilson SM, Al-Suwaidi Z, McNerney R, et al. Evaluation of a new rapid bacteriophage-based method for the drug susceptibility testing of mycobacterium tuberculosis[J]. Nat Med, 2010, 3(4): 465-468.
- [6] 薛长江, 刘慧. PCR 等 3 种检测技术在结核菌检测中的应用及评价[J]. 齐鲁医学检验, 2010, 16(1): 311-321.
- [7] 王邦松, 李庆兴, 卢明芹, 等. 荧光定量 PCR 诊断结核性脑膜炎的临床价值[J]. 中国微生态学杂志, 2009, 17(4): 314.
- [8] Alcaide F, Gali N, Dominguez J, et al. Usefulness of a new mycobacteriophage-based technique for rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis[J]. J Clin Microbiol, 2008, 41(7): 2867-2871.
- [9] 向成玉, 邓正华, 邓剑, 等. 荧光定量 PCR 检测 TB-DNA 与抗酸染色阳性率的比较[J]. 实用预防医学, 2009, 11(5): 101.

(收稿日期: 2012-05-09)

(上接第 2573 页)

LPS 水平的升高与肝功能障碍密切相关,且反映肝硬化损害的程度,联合检测肝硬化患者血浆中 NO、ET-1 和 LPS 含量的变化,对观察病情,指导治疗,改善预后均具有十分重要的临床价值。

参 考 文 献

- [1] 杜兰霞, 褚燕君, 贾百灵. 肝硬化腹水患者血清二胺氧化酶、内毒素和 IL-18 水平的改变及其临床意义[J]. 实用医学杂志, 2011, 27(14): 2547-2548.
- [2] 郑玉宝, 徐希岳, 王启之. 一氧化氮及内皮素对肝硬化患者动脉血氧分压的影响[J]. 实用全科医学, 2006, 4(2): 140-141.
- [3] 赵鑫杰. 七氟醚和丙泊酚全身麻醉对腹腔镜手术患者血浆一氧化氮/内皮素-1 的影响[J]. 中国基层医药, 2010, 17(5): 640-641.
- [4] 王颖琦, 韩运锋, 苏诚坚. 感觉神经损伤性盐敏感性高血压大鼠血浆血管紧张素 II 和内皮素的变化[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2009, 1(4): 207-210.
- [5] 韦光龙, 李龙. 肝硬化患者血浆降钙素基因相关肽和内皮素水平

的观察[J]. 临床荟萃, 2005, 20(4): 200-201.

- [6] 刘琴, 周力, 邱秉胜, 等. 肝硬化门脉血流动力学与一氧化氮、内皮素[J]. 临床肝胆杂志, 2002, 18(2): 93-98.
- [7] Bauer TM, Schwacha H, Steinbrückner B, et al. Small intestinal bacterial overgrowth in human cirrhosis is associated with systemic endotoxemia[J]. Am J Gastroenterol, 2002, 97(9): 2364-2370.
- [8] 周华坚, 曾宏, 温帆渊. 肝硬化患者血清内毒素与一氧化氮、肿瘤坏死因子- α 水平及其相关性[J]. 广东医学, 2004, 25(7): 817-818.
- [9] Frances R, Rodriguez E, Munoz C, et al. Intracellular cytokine expression in peritoneal monocyte/macrophages obtained from patients with cirrhosis and presence of bacterial DNA[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2005, 17(1): 45-51.
- [10] Jirillo E, Caccavo D, Magrone T, et al. The role of the liver in the response to Lps: experimental and clinical findings. J Endotoxin Res, 2002, 8(5): 319-327.

(收稿日期: 2012-05-24)