论著

文章编号:1000-5404(2011)06-0608-03

# Ⅲ型前列腺炎纳米细菌快速检测方法研究及临床评价

唐金元,周占松,沈学成,袁宇峰 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军泌尿外科研究所)

【摘要】 **目的** 通过对几种Ⅲ型前列腺炎纳米细菌感染检测方法评价比较,找出一种最快速、可靠的纳米细菌检测方法。**方法** 以培养后间接免疫荧光鉴定结果为基准对照,分别采用间接免疫荧光法、茜素红钙染色法及PCR法对西南医院泌尿外科门诊150例Ⅲ型前列腺炎患者前列腺液标本进行纳米细菌检测,比较其阳性检出率、灵敏度和特异度差异。**结果** 评价阳性检出率、灵敏度、特异度:间接免疫荧光法依次为23.3%、42.2%、100.0%;茜素红钙染色法依次为21.3%、34.9%、95.5%;PCR法依次为57.3%、95.2%、89.6%。间接免疫荧光法、茜素红钙染色法检出率与培养后间接免疫荧光法比较,均有统计学差异($P<0.05$);而PCR法检出率与培养后间接免疫荧光法比较无统计学差异($P>0.05$)。**结论** PCR法检出率优于间接免疫荧光法及茜素红钙染色法,灵敏度及特异度均较高,可广泛应用于Ⅲ型前列腺炎患者纳米细菌感染快速检测。

【关键词】 慢性前列腺炎;纳米细菌;快速检测
【中图法分类号】 R378;R446.5;R697.33 【文献标志码】 A

# Rapid detection and clinical evaluation of nanobacteria infection in type Ⅲ prostatitis

Tang Jinyuan, Zhou Zhansong, Shen Xuecheng, Yuan Yufeng (Institution of Urology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【**Abstract**】 **Objective** To discover the rapidest and most reliable method for detecting nanobacteria infection in type Ⅲ prostatitis by comparing several available methods. **Methods** Expressed prostatic secretion (EPS) specimens were obtained from 150 outpatients suffering from type Ⅲ prostatitis from the Department of Urology, Southwest Hospital, Chongqing, China. Nanobacteria infection in the EPS specimens was detected by indirect immunofluorescence staining (IIFS), alizarin red staining of calcium, and polymerase chain reaction (PCR). With the result of indirect immunofluorescence staining after culture (IIFSC) as a benchmark, the differences of the concerning the positive detection rate, sensitivity and specificity were compared. **Results** The positive detection rate, sensitivity and specificity of IIFS were 23.3%, 42.2% and 100%, respectively. Those of alizarin red staining of calcium were 21.3%, 34.9% and 95.5%, and those of PCR were 57.3%, 95.2% and 89.6%, respectively. The positive detection rate of IIFS or alizarin red calcium staining had a statistical difference from that of IIFSC ($P<0.05$). However, there was no statistical difference between the positive detection rates of PCR and IIFSC ($P>0.05$). **Conclusion** PCR is superior to IIFS and alizarin red staining of calcium in terms of positive detection rate, and has high sensitivity and specificity as well. Therefore, PCR can be widely used for the rapid detection of nanobacteria infection in type Ⅲ prostatitis.

【**Key words**】 chronic prostatitis; nanobacteria; rapid detection; PCR

Supported by the Tackling Project for Sci & Tech Research of Chongqing (CSTC2009AC5026). Corresponding author: Zhou Zhansong, Tel: 86-23-68754186, E-mail: zhouzhansong@sohu.com

慢性前列腺炎是成年男性泌尿科门诊最常见的疾病之一,发病率11%~16%[1]。其中慢性细菌性前列腺炎病因明确,治疗效果好。慢性非细菌性前列腺炎即Ⅲ型前列腺炎病因不明,治疗也有争论[2]。近来发现纳米细菌与Ⅲ型前列腺炎的发生有密切关系,Ⅲ型前列腺炎患者前列腺液(expressed prostatic secretions, EPS)中检测出纳米细菌,且抗纳米细菌治疗有效[3-4]。但仅限于实验研究。本研究通过对纳米细菌几种快速检测方法比较,筛选出一种快速、可靠,可应用于临床实践的检测方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本采集

选取2009年9月至2010年4月在本院泌尿外科门诊经Meares-Stamey四杯法筛选的150例Ⅲ型前列腺炎患者,年龄

【基金项目】 重庆市科技攻关课题项目(CSTC2009AC5026)
【通信作者】 周占松,电话:(023) 68754186,E-mail:zhouzhansong@sohu.com

(29.15 ± 7.22)岁。用新洁尔灭棉球消毒尿道口,行前列腺按摩,无菌操作取 1 ~ 2 ml EPS 冷冻保存备用。

### 1.2 主要仪器及试剂

Olympus Bx41 荧光显微镜(Olympus 公司),Beck Man Avanti-J30i 离心机(Beck Man 公司),Thermo Forma 3111 温控 $CO_2$ 培养箱(Shel Lab 公司),Gelsos 2000™ 凝胶成像仪(Bio-Rad 公司),582 B Ricycler™ Thermal cycler PCR 仪(Bio-Rad 公司),RPMI1640 培养基(北京 HyClone 公司),γ-FBS(美国 Gibco 公司),鼠抗纳米细菌单克隆抗体 8D10(芬兰 Nanobac OY 公司),FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG(北京中杉金桥生物公司),基因组提取试剂盒和 PCR *Taq* MasterMix(北京天根生化技术公司)。引物合成由上海生物工程公司完成。

### 1.3 实验方法

1.3.1 标本处理 门诊取 EPS 标本,编号后用生理盐水稀释 5 倍,经 0.45 μm 滤器过滤,20 000 × *g* 4 ℃离心 40 min,弃上清,留取管底 1 ml 充分混匀,再用无菌生理盐水 5 倍,经 0.22 μm 滤器过滤,20 000 × *g* 4 ℃离心 40 min,弃上清,留取管底 1 ml 充分混匀。制备成纳米细菌菌液,严格无菌操作。同一标本分别进行培养、间接免疫荧光染色、茜素红钙染色及 PCR 扩增纳米细菌 16S rRNA 基因。

1.3.2 纳米细菌的培养 取上述制备菌液 200 μl 加入 3 ml 含 10% 热灭活 γ-FBS 的 RPMI1640 培养基中,置于 37 ℃、5% $CO_2$ 和 95% 空气条件下培养 4 周。每周观察并记录纳米细菌的生长情况。用 10% 热灭活 γ-FBS 的 RPMI1640 加生理盐水作阴性对照。

1.3.3 间接免疫荧光染色(indirect immunofluorescence staining,IIFS) 取制备菌液 1 滴到玻片上,晾干,4% 多聚甲醛固定 15 min,灭菌水洗后 70 ℃烤 10 min。滴加鼠抗纳米细菌单克隆抗体 8D10 (0.1 mg/ml),37 ℃孵育 60 min,PBS(pH 7.4)冲洗 2 min × 3 次。滴加 FITC 标记山羊抗小鼠 IgG(0.015 mg/ml),37 ℃孵育 40 min,PBS (pH7.4),再次灭菌水冲洗 2 min × 3 次。80% 甘油封片,置于荧光显微镜下观察。用 PBS 替代 8D10 抗体作为阴性对照。

1.3.4 茜素红钙染色 取制备菌液标本 1 滴涂片固定,灭菌水冲洗 3 遍,每遍 2 min;2% 茜素红 2 滴染 4 ~ 5 min,灭菌水速洗;0.2% 淡绿水溶液复染 20 ~ 30 s,0.5% 醋酸水溶液速洗;95% 乙醇和 100% 无水乙醇脱水,待烘干二甲苯透明中性树胶封片,油镜观察。

1.3.5 PCR 检测 将剩余菌液标本加入 1 mol /L HCl 0.5 ml 混匀,37 ℃水浴 30 min;加入 1 mol /L Tris 碱 0.5 ml 中和,4 ℃离心 40 min (20 000 × *g*),管底沉淀采用天根细菌基因组提取试剂盒提取纳米细菌基因组,进行 PCR 扩增。依据纳米细菌 16S rRNA 基因序列(GenBank 登录号:X98419)合成引物:上游 5′-AACGAACGACTGGGGCGGCAGGC-3′,下游 5′-CACCCCA-GTCGCTGACCC-3′。PCR 反应体系:PCR 2 × *Taq* PCR Master-Mix 12.5 μl,模板 DNA 3 μl,上下游引物各 1 μl (10 μmol/L),加双蒸水至 25 μl。反应条件:95 ℃5 min,95 ℃30 s,57 ℃ 30 s,72 ℃ 90 s,30 个循环,72 ℃ 7 min。反应结束后取 5 μl 产物,1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.6 培养后间接免疫荧光鉴定(indirect immunofluorescence staining after culture,IIFSC) 将培养 4 周纳米细菌标本 4 ℃离心 30 min (20 000 × *g*),弃上清,留取管底 0.5 ml 充分混匀,取 1 滴到玻片上,余下操作步骤同 1.3.3。判定结果也同 1.3.3。

### 1.4 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件,对各检测法检出结果进行配对样本的 $\chi^2$ 检验。

## 2 结果

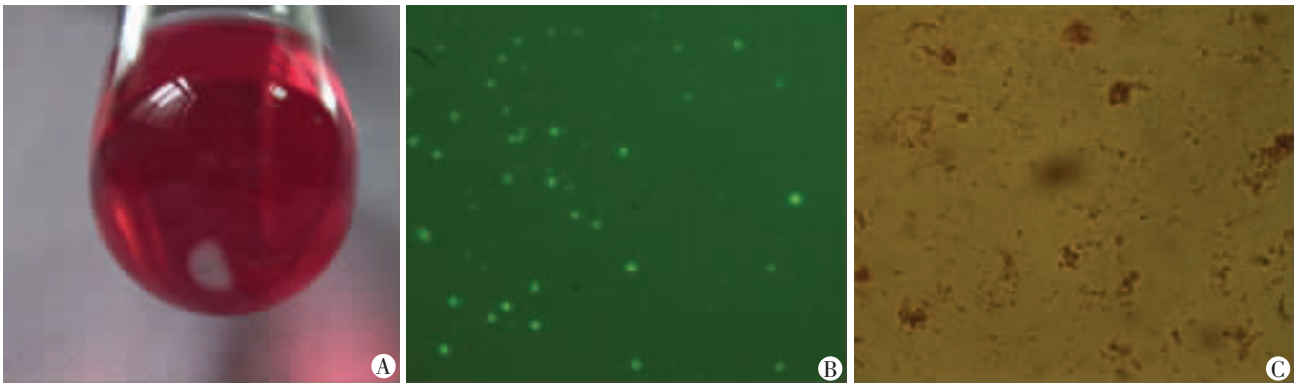
### 2.1 培养结果及纳米细菌 IIFSC 鉴定结果

培养 4 周观察,发现部分管底有纳米细菌贴壁生长,出现白色沉淀或絮状物漂浮(图 1A)。所有培养标本离心后用 IIFSC 法鉴定纳米细菌阳性 83 例,阳性率为 55.3%。

### 2.2 各检测法检出结果及阳性检出率与 IIFSC 比较

2.2.1 IIFS 法检测结果 纳米细菌与小鼠的抗纳米细菌单克隆抗体 8D10 发生特异性结合,在荧光显微镜下可见阳性标本有绿色的杆状或颗粒分布纳米细菌(图 1B)。150 例样本纳米细菌 IIFS 法检测有 35 例为阳性,其阳性检出率为 23.3%。与 IIFSC 比较,二者均为阳性 35 例,均为阴性 67 例,IIFS 阳性而 IIFSC 阴性 0 例,IIFS 阴性而 IIFSC 阳性 48 例。其灵敏度 42.2% (35/83),特异度为 100.0% (67/67)。IIFS 阳性检出率明显低于 IIFSC($P < 0.05$)。

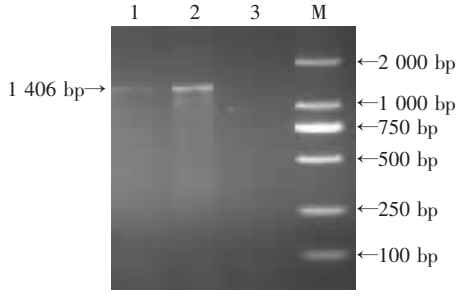
2.2.2 茜素红钙染色法检测结果 油镜下观察纳米细菌微小,聚集成簇(图 1C)。150 例样本中有 32 例纳米细菌茜素红钙染色法检测阳性,阳性检出率为 21.3%。与 IIFSC 比较,二者均阳性 29 例,均阴性 64 例,茜素红钙染色阳性而 IIFSC 阴性 3 例,茜素红钙染色阴性而 IIFSC 阳性 54 例。其灵敏度 34.9% (29/83),特异度为 95.5% (64/67)。茜素红钙染色的阳性检出率也明显低于 IIFSC($P < 0.05$)。




A:培养 4 周纳米细菌观察;B:纳米细菌 IIFS 染色(荧光显微镜 ×400);C:纳米细菌茜素红钙染色(LM ×1 000)

**图 1 纳米细菌培养及各种染色法检测结果**

2.2.3 PCR法检测结果 PCR法扩增纳米细菌16S rRNA基因，阳性标本在1 406 bp处可见特异性条带（图2）。150例样本中有86例纳米细菌PCR检测阳性，其阳性检出率为57.3%。与IIFSC比较，二者均阳性79例，均阴性60例，PCR阳性而IIFSC阴性7例，PCR阴性而IIFSC阳性4例。其灵敏度95.2%（79/83），特异度为89.6%（60/67）。PCR法的阳性检出率与IIFSC相当（$P>0.05$）。




1-2：PCR扩增阳性；3：PCR扩增阴性；M：DNA标准（DL 2000）

**图2 不同标本纳米细菌16S rRNA基因PCR扩增结果**

## 3 讨论

纳米细菌是1992年芬兰科学家Kajander等发现呈球状或球杆状微小病原体，直径仅50～500 nm，普通培养基不能生长，而在培养哺乳动物细胞的RPMI 1640或DMEM培养基中能够生长，其生长缓慢，3 d左右繁殖1代，1个月左右才能出培养结果，具有独特的生物矿化作用[5]。纳米细菌与多种疾病关系密切，如动脉硬化、肿瘤、HIV等[6-8]，尤其是泌尿系统疾病[9-10]。Shen等[11]从病因学研究证实纳米细菌能诱发Ⅲ型前列腺炎疾病发生。近来学者也多倡导Ⅲ型前列腺炎针对不同病因的个体化治疗[12]。因此，提供一种快速准确的纳米细菌检测方法用于临床纳米细菌感染Ⅲ型前列腺炎的诊断有重要意义。但是，纳米细菌生长周期长及独特生物矿化特性成为纳米细菌的临床检测的障碍。目前纳米细菌检测方法仅局限实验研究阶段，且基本是培养后再检测，而无各种检测方法的综合评估。8D10是抗纳米细菌单克隆抗体，能结合纳米细菌外膜特异的通道蛋白和糖多肽，是目前研究者较公认的特异性抗体，并一直用于纳米细菌的鉴定[13-15]。沈学成等[9]也以培养后间接免疫荧光法为鉴定基准，鉴定人前列腺结石和胆汁中纳米细菌的存在。因此本研究我们选择以培养后间接免疫荧光为基准，通过比较间接免疫荧光法、茜素红钙染色法和PCR法，发现新鲜标本直接进行间接免疫荧光法和茜素红钙染色检测纳米细菌检出率较低，灵敏度分别为42.2%、34.9%，与IIFSC法比较有统计学差异（$P<0.05$），我们推测可能与检测样本纳米细菌浓度及有无矿化外壳形成有关，提示传统临床检测其他微生物方法在检测纳米细菌时存在困难。PCR检测技术常用于临床难培养、生长周期长的病原微生物，如结核分枝杆菌[16]。我们在PCR法检测纳米细菌16S rRNA基因中，发现其灵敏度及特异性均较高，分别为95.2%、89.6%，与IIFSC法比较无统计学差异（$P>0.05$），且本实验中采用盐酸浸泡方法去除纳米细菌矿化外壳，有利于菌体裂解和核酸暴露，提高检出率。同时我们对EPS标本经0.45、0.22 μm滤器过滤处理，去除了其他污染杂菌，有利于提高PCR法检测特异性。PCR法检测Ⅲ型前列腺炎纳米细菌感染，能有效缩短检测时间，是一种有效临床检测手段。我们期待PCR技术能在Ⅲ型前列腺炎纳米细菌感染检测中发挥重要作用。

## 参考文献：

[1] Forrest J B, Nickel J C, Moldwin R M. Chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome and male interstitial cystitis: enigmas and opportunities[J]. Urology, 2007, 69(4 Suppl): 60-63.

[2] Shoskes D A, Nickel J C, Rackley R R, *et al*. Clinical phenotyping in chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome and interstitial cystitis: a management strategy for urologic chronic pelvic pain syndromes [J]. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2009, 12(2): 177-183.

[3] Shoskes D A, Thomas K D, Gomez E. Anti-nanobacterial therapy for men with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome and prostatic stones: preliminary experience[J]. J Urol, 2005, 173(2): 474-477.

[4] Zhou Z, Hong L, Shen X, *et al*. Detection of nanobacteria infection in type Ⅲ prostatitis [J]. Urology, 2008, 71(6): 1091- 1095.

[5] Kajander E O. Nanobacteria—propagating calcifying nanoparticles[J]. Lett Appl Microbiol, 2006, 42 (6): 549-552.

[6] Bratos-Perez M A, Sanchez P L, Garcia-de-Cruz S, *et al*. Association between self-replicating calcifying nanoparticles and aortic stenosis: a possible link to valve calcification[J]. Eur Heart J, 2008, 29(3): 371-376.

[7] Hudelist G, Singer C F, Kubista E, *et al*. Presence of nanobacteria in psammoma bodies of ovarian cancer: evidence for pathogenetic role in intratumoral biomineralization[J]. Histopathology, 2004, 45 (6): 633-637.

[8] Sommer A P, Milankovits M, Mester A R. Nanobacteria, HIV and magic bullets—update of perspectives 2005 [J]. Chemotherapy, 2006, 52(2): 95-97.

[9] 沈学成，杨杰，饶贤才，等. 前列腺结石患者结石中纳米细菌的培养和形态学鉴定[J]. 第三军医大学学报，2008，30(12)：1122-1124.

[10] Zhang Q H, Shen X C, Zhou Z S, *et al*. Decreased nanobacteria levels and symptoms of nanobacteria-associated interstitial cystitis/painful bladder syndrome after tetracycline treatment [J]. Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct, 2009, 21(1): 103-109.

[11] Shen X, Ming A, Li X, *et al*. Nanobacteria: a possible etiology for type iii prostatitis[J]. J Urol, 2010, 184(1): 364-369.

[12] Shoskes D A, Nickel J C, Kattan M W. Phenotypically directed multimodal therapy for chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome: a prospective study using UPOINT[J]. Urology, 2010, 75(6): 1249-1253.

[13] Hu Y R, ZhaoY, Sun Y W, *et al*. Detection of nanobacteria-like material from calcified cardiac valves with rheumatic heart disease[J]. Cardiovasc Pathol, 2010, 19(5): 286-292.

[14] 于澄钒，黄晓波，陈亮，等. 纳米细菌对肾小管上皮细胞的损伤及晶体滞留的影响[J]. 北京大学学报：医学版，2010，42(4)：436-442.

[15] Zhang Q H, Lu G S, Shen X C, *et al*. Nanobacteria may be linked to testicular microlithiasis in infertility[J]. J Androl, 2010, 31(2): 121-125.

[16] 彭哲，朱朝敏，幸琳琳，等. 结核分支杆菌北京基因型菌株与重庆地区结核患儿耐药表型的相关分析[J]. 第三军医大学学报，2010，32(23)：2545-2548.

（收稿：2010-12-02 修回：2010-01-04）

（编辑 栾 嘉）