荧光定量 PCR 检测病理组织中结核分枝杆菌的临床价值

余 琦,李 宁,宋业颖,李彩云,杨江辉 (解放军第 309 医院病理科,北京 100091)

[摘 要] **目的** 探讨应用荧光定量 PCR(FQ-PCR)技术在病理组织中检测结核分枝杆菌 DNA(TB-DNA)的临床应用价值。**方法** 对 196 例临床诊断结核的穿刺病理活检标本进行石蜡包埋切片,采用实时荧光定量 PCR 技术检测 TB-DNA,并行抗酸染色及组织病理学检查,对三种检测与临床诊断符合率进行比较。**结果** 在 196 例临床诊断结核的石蜡包埋组织中,荧光定量 PCR 检测阳性 136 例,阳性率为 69.39%,抗酸染色检测阳性 69 例,阳性率为 35.20%,组织病理学检查阳性 102 例,阳性率为 52.04%,荧光定量 PCR 检测阳性率最高。**结论** 荧光定量 PCR 技术简便、快捷,敏感性强、特异性高,可作为结核病分子病理诊断的重要检测方法,具有较高的临床应用价值。

[关键词] 结核分枝杆菌;病理学;PCR
[中图分类号] R446.8;R52;R378.91 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2012)06-0590-03

Clinical value of quantitative PCR technology for detection of mycobacterium tuberculosis in pathological tissue

YU Qi, LI Ning, SONG Ye-ying, LI Cai-yun, YANG Jiang-hui (Department of Pathology, 309th Hospital of PLA, Beijing 100091, China)

Abstract: Objective To explore the application of fluorescent quantitative PCR(FQ-PCR) and its clinical value for histopathological detection of mycobacterium tuberculosis DNA(TB-DNA). **Methods** The paraffin-embedded needle biopsy sections from 196 cases with tuberculosis were detected by quantitative PCR technique with TB-DNA in real time, and acid-fast staining and histopathological examinations were conducted at the same time. **Results** Among 196 cases with the clinical diagnosis of tuberculosis in paraffin-embedded tissues, there were 136 cases(69.39%) screened positive by fluorescence quantitative PCR, 69 cases(35.20%) screened positive by acid-fast staining examination, and 102 cases(52.04%) screened positive by histopathological examination. The fluorescence quantitative PCR detection is of the highest positive rate. **Conclusion** The fluorescence quantitative polymerase chain reaction technology is simple, efficient, and of sensitivity and high specificity. Since it is of high clinical value, it can be used as a pathological diagnostic method for tuberculosis molecular detection.

Keywords: mycobacterium tuberculosis; pathology; PCR

结核分枝杆菌(mycobacterium tuberculosis)引起的结核病为世界三大传染病之一[1]。近年来,我国结核病发病率持续上升,肺结核患病人数居全球第二位,结核病的发病率和死亡率在我国 27 种法定传染病中均占据首位。传统的结核杆菌检测法如细菌培养法、抗酸染色法等检测时间周期较长,或阳性率低,漏检率较高。为了克服以往检测方法的固有缺陷,需要发展敏感性高、特异性强的结核杆菌快速检测技术[2]。随着分子生物学技术的成熟发展,荧光定量 PCR(FQ-PCR)技术已被广泛应用于各种临床病原体的检测。本文采用 FQ-PCR 检测法对石蜡包埋病理组织中的结核分枝杆菌 DNA(TB-DNA)进行检测,并与抗酸染色和组织病理形态学检查进行比较,评价其在结核分枝杆菌检测中的临床应用价值[3]。

1 资料与方法

1.1 标本来源

2011 年 2 月至 2012 年 2 月期间我院临床诊断肺结核的病理组织石蜡包埋标本 196 例,其中肺穿刺活检组织标本 62 例,胸膜活检组织标本 60 例,淋巴结穿刺活检标本 30 例,支气管活检组织标本 46 例。

1.2 主要试剂与仪器

TB-DNA 探针及引物试剂盒(北京新基永康基因科技有限公司提供),SLAN 全自动荧光定量 PCR 检测仪(上海宏石医疗科技有限公司提供),苯酚品红染液,4% NaOH 溶液。

1.3 PCR 检测方法

将蜡块组织切取 5 μm 薄片装入 EP 管中,每切取 1 例标本之后,即采用 0.3% 次氯酸钠消毒液清洁刀口及周围部分,防止污染,将 EP 管中加入 220 μl buffer TL,90 ℃ 1 h。室温放置 1 min,12 000 r/min 离心 2 min,小心穿过石蜡层,吸取 200 μl 液体(包含组织)转至新的 1.5 mL EP 管,加入 20 μl OB 蛋白酶,简短离心,收集管盖上液体。55 ℃水浴 2 h,以组织基本都消化为准;中间每隔 20 min 混匀 1 次;室温 12 000 r/min 离心 2

[通讯作者] 李 宁,主任医师,E-mail:davidlee65@sina.com.cn
[收稿日期] 2012-05-27 [修回日期] 2012-06-11

min,转移上清至新的 1.5 mL 离心管,加入 220 μl buffer BL 和 4 μl linear acrylamide,颠倒混匀,简短离心,收集管盖上液体,70 ℃水浴 10 min。加入 220 μl 无水乙醇,颠倒充分混匀;转移混合液至 HiBind 柱中,放置 1 min;室温 8 000 r/min 离心 30 s,弃去滤液;加入 500 μl HB buffer,放置 1 min;室温 8 000 r/min 离心 30 s,弃去滤液;加入 500 μl DNA washing buffer,放置 1 min;室温 8 000 r/min 离心 30 s,弃去滤液;室温 12 000 r/min 离心2 min,以尽量去除 DNA 吸附膜上的乙醇;将柱子装到新的无菌 1.5 mL EP 中,加入 70 ℃预热的 Elution buffer 50 μl,室温静置 2 min,12 000 r/min 离心 2 min;将提取好的组织 DNA 与配制好的 PCR 扩增试剂混匀,按顺序置于 PCR 仪上,编辑样本信息,设定循环参数。

1.4 抗酸染色检测方法

石蜡包埋组织 3 μm 切片,常规二甲苯脱蜡入水。将配制好的苯酚品红溶液滴加在组织切片上,放入湿盒,常温下染色 10 min。切片入流水冲洗 3 min,常规酒精脱水,中性树胶封片。

1.5 病理组织学检测

以病理最终诊断报告中出现“符合结核病变”作为阳性结果判定标准,否则判定为阴性结果。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 11.0 统计软件进行统计分析,定性资料采用百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验,$P<0.05$ 为差别具有统计学意义。

2 结果

在 196 例临床诊断结核阳性样本中,应用 FQ-PCR 法(图 1)、抗酸染色法(图 2)和组织病理学检测的阳性率分别为 69.39%、35.20% 和 52.04%,三者阳性率比较有统计学意义($P<0.01$),见表 1。不同部位组织在不同检测方法中的阳性例数见表 2。

表 1 三种方法对 196 例阳性样本的检测情况

检测方法	阳性例数(n)	阳性率(%)
FQ-PCR	136	69.39*#
抗酸染色	69	35.20*
组织病理学	102	52.04

*:与组织病理学比较,$P<0.01$;#:与抗酸染色比较,$P<0.01$

表 2 三种方法检测不同部位组织的阳性例数(n)

组织标本	FQ-PCR	抗酸染色	组织病理学
肺穿刺标本($n=62$)	51	31	42
胸膜穿刺标本($n=60$)	32	23	30
淋巴结穿刺标本($n=30$)	13	0	10
支气管活检标本($n=46$)	40	15	20
合计	136	69	102

a:阳性图形;b:阴性图形

图 1 荧光定量 PCR(熔解曲线法)检测结果

图 2 支气管结核干酪样坏死中阳性杆菌(抗酸染色 ×400)

3 讨论

结核病是结核分枝杆菌感染引起的一种慢性传染病,已成为全球性公共卫生问题[4]。临床诊断工作中通常需要病理诊断来确定病变是否为结核分枝杆菌感染,从而确定治疗方案。抗酸染色检测法的优点是简便、快速、价廉,缺点是特异性差,不能区分结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌[5],容易造成漏诊和误诊。传统组织病理学依据组织形态学改变,如肉芽肿病变、坏死的特点等,在缺乏典型的组织形态特点时往往难以确诊,不能及时有效地为临床治疗提供有利的诊断依据。PCR 方法已广泛应用于微生物检测和研究[6]。近年出现的 FQ-PCR 技术,是将实时荧光监测与普通 PCR 技术相结合,能够对目标微生物进行实时定量检测,已被成功用于微生物快速定量检测[7-8]。本研究采用分枝杆菌菌种 DNA 探针鉴定产品,检测试剂以 Real-time PCR 仪为平台,利用不对称 PCR 扩增技术,通过分析比较特异的荧光标记寡核苷酸探针同与其完全互补单链 PCR 产物(结核分枝杆菌)以及存在错配的单链

PCR 产物(非结核分枝杆菌)结合所产生熔解曲线 Tm 值的变化,来检测标本中是否存在分枝杆菌感染,并区分结核分枝杆菌(复合群)与非结核分枝杆菌(NTM)。当发生 NTM 感染时,其熔解曲线峰所示的 Tm 值与结核分枝杆菌相比会有所降低。该方法将 TagMan 探针技术和实时荧光定量 PCR 技术相结合,即能鉴定是否有分枝杆菌感染,还能对菌株进行分型。按照结核分枝杆菌与非结核分枝杆菌的特异性序列设计引物和探针,分别标记不同的荧光。当反应体系中有目的基因存在时,随着 PCR 反应的进行,就会释放出荧光,通过实时监测不同通道的荧光信号,可以进行结核分枝杆菌与非结核分枝杆菌两者的区分鉴定。具有检测速度快,灵敏度高,准确度高的特性。本研究还比对了不同部位组织中用不同方法的阳性检出率,FQ-PCR 检测法的阳性检出率均高于其他检测方法,这说明了荧光探针杂交检测具有较高的特异性[9],在李秀斌等[10]报道中病理诊断为结核者石蜡包埋组织 TB-DNA 阳性率为 93.14%,也支持了本研究的观点。

综上所述,FQ-PCR 检测石蜡切片组织标本的 TB-DNA,具有简便、灵敏、特异的优点,与病理学检查相结合,可进一步提高病理组织中结核分枝杆菌感染诊断的准确度和特异性,适合临床检验和实验室应用,在结核病的早期诊断上具有临床实用价值[11]。

[参考文献]

[1] Maartens G, Wilkinson RJ. Tuberculosis[J]. Lancet, 2007, 370(9604): 2030 - 2043.

[2] Lima SS, Clemente WT, Palaci M, et al. Conventional and molecular techniques in the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a comparative study[J]. J Bras Pneumol, 2008, 34(12): 1056 - 1062.

[3] Davies PDO, Pai M. 结核病的诊断与误诊[J]. 国际结核病与肺部疾病杂志(中文版), 2009, 4(1): 38 - 46.

[4] Ma Z, Lienhardt C, Mcllleron H, et al. Global tuberculosis drug development pipeline: the need and the reality[J]. Lancet, 2010, 375(9731): 2100 - 2109.

[5] 谭 笑. 结核病实验室快速诊断方法的研究[J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2007, 4(2): 58-59.

[6] 万颖杰, 张俊磊, 安 静. 细胞培养中细菌类微生物污染的快速检测[J]. 局解手术学杂志, 2005, 14(2): 88 - 90.

[7] Harris KA, Turner P, Green EA, et al. Duplex real-time PCR assay for detection of streptococcus pneumoniae in clinical samples and determination of penicillin susceptibility[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(8): 2751 - 2758.

[8] Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing[J]. Clin Microbiol Rev, 2006, 19(1): 165 - 256.

[9] 李国利. 实时荧光定量 PCR 技术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.

[10] 李秀斌, 李幸彬, 杜秀然, 等. 石蜡包埋组织实时荧光定量聚合酶链反应检测在结核病诊断中的价值[J]. 中国防痨杂志, 2010, 32(5): 272 - 275.

[11] 韩纪勤. 荧光定量聚合酶链反应诊断结核病临床应用研究[J]. 山西医科大学学报, 2006, 37(2): 180 - 181.

(编辑:余汇洋)

(上接第 589 页)

在肾移植手术中,要选择与受体相匹配的血管进行重建,从而保证移植肾良好的血液供应。副肾动脉从下腔静脉前面越过,使下腔静脉受压,导致受压处上、下静脉管径的扩张,严重的情况下,会出现下腔静脉血流障碍而引起一系列的并发症。本例变异,副肾动脉粗大,较少见,了解此变异可供肾脏疾病的诊断、肾移植和病肾切除术中参考,并对解剖学形态变异资料的收集及数值的增补有重要的意义。

1:右前肾静脉;2:右肾动脉;3:右后肾静脉;4:输尿管;5:右副肾动脉;6:下腔静脉;7:腹主动脉;8:肠系膜下动脉

图 1 双肾静脉及副肾动脉

门入肾的动脉。副肾动脉发生率高达 41.8%,来源于肾动脉或其初级干、腹主动脉、肾上腺中与下动脉、膈下动脉等[2]。本例来源于腹主动脉。在行肾和肾上腺手术时,应注意副肾动脉,如错误的结扎,则导致分布区肾缺血性坏死。副肾动脉起始端管径平均 1.87 mm[3],本例起始端管径 3.10 mm,粗大,较少见。

[参考文献]

[1] 郭永强, 曹 勇, 张学佳, 等. 双侧多囊肾伴左肾双输尿管及左肾动脉变异 1 例[J]. 局解手术学杂志, 2010, 19(1): 60.

[2] 中国解剖学会体质调查委员会. 中国人解剖学数值[M]. 北京: 人民卫生出社, 2002: 295.

[3] 雷 田, 王歧本, 蒙艳斌. 副肾动脉的应用解剖学研究[J]. 解剖学研究, 2010, 32(5): 399 - 400.

(编辑:左艳芳)