DOI:10.16016/j.1000-5404.1994.03.037

上述结果表明:在有目的地培养沙门氏及志贺氏痢疾杆菌时,为了抑制某些细菌生长,可以直接选用SS平板和麦康凯平板[2]。除此之外,很有必要加用血平板联合使用,以提高病原菌的检出率。特别对于不明原因的腹泻患者更为重要。无论是霉菌感染还是细菌感染性腹泻均能收到较好效果。

关键词 腹泻微生物学;肠道病原菌;分离培养

中图法分类号 R574.62

参考文献

1 中华人民共和国医政司.全国临床检验操作规程.南京:东南大学出版社,1991:422

2 叶应妩,李健斋,王玉琛,主编.临床实验诊断学(下册).北京:人民卫生出版社,1989:1950

(收稿:1993-06-28;修回:1994-03-11)

应用PCR技术检测结核标本的评价

熊鸿燕 (第三军医大学医疗医学系流行病学教研室) 630038

薛 强 (第三军医大学西南医院检验科) 630038

近年来结核病(TB)在人群中的发生频率上升,成为当今世界一严重的健康问题[1]时诊断、治疗病人,防治疾病的传播,临床和流行病学的检验急需建立快速准确的检测结核菌的方法。本试验用一结核杆菌特异、重复DNA序列作PCR扩增,用于TB可疑标本和非TB标本的检测。明显提高了快速检测TB标本的准确性。

1 材料与方法

1.1 临床标本的准备

临床可疑TB病人的标本,一部分(约0.3~0.4 ml)直接涂片,荧光染色[2],荧光显微镜查找分枝杆菌;另一部分(0.05~0.5 ml)加等体积1 mol/L NaOH,混匀后置室温10 min,加适量1 mol/L NaH_2PO_4,使pH值为7.0左右,混匀,8 000 rpm离心10 min,弃上清液,将沉淀悬浮于400 μl 50 mmol/L Tris-HCl-5 mmol/L EDTA(pH8.0)中。取200 μl接种于5 ml罗氏培养液[3]中,37℃孵育25~31 d后用荧光染色法查找分枝杆菌;另200 μl用Eisenach[4]法制备DNA。

非结核阴性对照标本取自无TB的上呼吸道感染病人和正常工作人员的痰液;传染科和消化科无TB的肝硬化病人的腹水;心内科病人的胸水。DNA制备方法同前。

1.2 PCR扩增

本试验所选的扩增序列为复合型结核杆菌的一123 bp特异重复片段[5]。引物序列为 $P_1$5′-CCTGCGAGCGTAGGCGTCGG,$P_2$5′-CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG。引物的合成由中国科学院上海细胞生物学研究所完成。Taq DNA多聚酶及四种dNTP由华美生物制品公司提供。

10 μl临床样本DNA溶液加入10 μl 10×PCR扩增缓冲液,两种引物各加140 ng,加入4种dNTP混合液,使其最终浓度均为0.2 mmol/L。加去离子水,使总反应体积为100 μl。将混合液置95℃处理5 min,加入2.5 U Taq DNA多聚酶,置基因扩增仪(GeneAmp PCR system 9600。Perkin-elmer corporation)94℃变性2 min,68℃退火、延伸2 min,重复25~30次。扩增同时,分别设阳性、阴性对照。阳性对照的DNA模板由标准结核菌株H_{37}Rv(北京结核病肺部肿瘤研究所提供)中提取。扩增产物作2%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色后在302 nm紫外观测仪下观察123 bp扩增片段,出现该片段即为阳性结果。

2 结果

把分析的临床样本用涂片荧光染色检查、培养后荧光染色检查和PCR检查,结果表明(见附表),在可疑结核样本中,PCR和培养法检测的灵敏性相近,阳性检测出率分别为19/33、15/33,差异无统计学意义($P>0.05$)。直接荧光染色法的检测灵敏性最差,阳性率为6/33,与PCR相比差异非常显著($P<0.01$)。

附表 可疑结核样本和非结核对照样本检测结果

样本类型	来源(份数)	检测阳性结果数			
		染色	培养	PCR	培养和PCR
可疑结核样本					
	痰 (25)	5	11	13	10
	尿 (4)	0	1	2	1
	胸水 (2)	0	1	2	1
	腹水 (1)	0	1	1	1
	脑脊液(1)	1	1	1	1
非结核对照样本					
	痰 (10)	0	N★	1△	
	腹水 (4)	0	N	0	
	胸水 (2)	0	N	0	

★:N表示未做此项检测;△:进一步将扩增产物用Sal I内切酶消化,出现阴性结果

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

阴性对照样本的本测中有1份标本扩增后出现阳性结果。

3 讨论

本项试验表明，培养法所得结果比较可靠，也较灵敏，但其耗时太长，检验结果受多种因素的影响，如结核菌存活情况、培养条件、检测人员技术等。而 PCR 是一特异、灵敏、快速的检测方法。本实验所用特异 DNA 序列为复合型结核菌（人型和牛型结核菌的各亚种）的一重复特异序列，每个菌中约含10～16个拷贝[5]，大大提高了检测的灵敏性，实验中只需0.025 ml 的痰液即可检出阳性结果，对尿、腹水、胸水、脑脊液等结核菌含量很低的标本阳性检出率也比较高，此结果与国内外研究相符合[6]。

本实验扩增序列中有一 Sal I 内切酶位点，阳性扩增产物可经该内切酶消化后作12%聚丙烯凝胶电泳，观察内切产物，以进一步肯定阳性结果。我们曾将可疑 TB 样本的阳性产物3份（随机选取）、标准结核菌扩增产物2份、以及阴性对照产生的一份阳性产物用 Sal I 内切酶消化，电泳、染色后见到，前面5份标本出现两条分子量小于123 bp 的产物带，而阴性对照样本中的一份阳性产物未见任何产物带，追踪提供这份痰液的工作人员，未发现任何 TB 症状。这些研究说明该扩增片段进行的 PCR 不能完全排除有非特异扩增的可能，但可通过对阳性产物进行进一步内切酶消化处理，以保证结果的正确。

本试验选用较高的退火温度（68℃）以提高特异性，且由于扩增片段为123 bp，退火、延伸可在同一温度下完成[7]，省略了引物延伸步骤的时间，对临床检测标本只需12 h 即可得出。

实验结果中有一份可疑的 TB 标本 PCR 检测结果为阴性，而其涂片、培养检测均为阳性。这样的结果与 PCR 高度灵敏性很不相符。其原因可能是该标本分枝杆菌种类不属本试验所用序列检测的复合型结核菌之范围内[5]，这有待进一步研究证明。

目前临床 TB 的诊断主要依靠临床征状和涂片（或培养）检查，这往往引起很高的漏诊和过诊率[8]。我们认为，在现实条件下，TB 的诊断应在加强常规诊断方法效能（如集体阅 X 光片、多次涂片检查、尽量用培养方法检测）的基础上尽可能在有条件的实验室和人群开展 PCR 检测，以达到尽快发现病人、治疗病人、防治传播的目的。

（本试验得到本校生物工程教研室谭骏同志，生化教研室甘立霞同志的指导和帮助，特此谢意！）

关键词　结核杆菌；多聚酶链反应*（PCR）

中图法分类号　R378.91

参考文献

1 Kochi A. The global tuberculosis situation and the new control stvategy of the world health organzation. Tubercle, 1991,72:1

2 叶应妩，李健斋，王玉琛，主编. 临床实验诊断学（下册）. 北京：人民卫生出版社，1989:1798

3 薛广波，主编. 实用消毒学. 北京：解放军出版社，1986:540

4 Eisenach KD, Crawford JT, Bates JH. Genetic relatedness among strains of the mycobacterium tuberculosis complen: analysis of restriction fragment heterogeneity using cloned DNA probes. Am Rev Respir Dis, 1986, 133:1065

5 Eisenach KD, Cave MD, Bates JH. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for mycobacterium tuberculosis. J Infec DIsease, 1990, 161:977

6 Shanker P, Manjunath N, Mohan KK, et al. Rapid diagnosis of tuberculosis meningitis by polymerase chain reaction. The Lancet, 1991, 337:5

7 朱　平　主编. PCR 基因扩增实验操作手册. 北京：中国科学技术出版社，1992:527～529

8 宋　拓，赵和平，许卫国，等. 农村菌阴肺结核病人诊断质量调查. 中华结核和呼吸杂志，1993.16(2):88

（收稿：1993-08-01；修回：1994-04-22）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net