

荧光定量 PCR 检测结核分枝杆菌 DNA 的流行病学特点*

牛宁奎¹, 王自立^{1△}, 施建党¹, 师志云², 赵志军² (宁夏医科大学附属医院: 1. 脊柱外科; 2. 医学实验中心, 银川 750004)

【摘要】 目的 了解结核分枝杆菌 DNA 定量检测的流行病学特点。方法 用荧光定量聚合酶链反应技术对 438 例结核疑似患者进行结核分枝杆菌 DNA 检测, 比较不同标本类型、不同年份、不同性别的感染情况。结果 结核分枝杆菌总阳性率为 10.27%, 晨尿和痰液阳性率较高, 分别为 20.72%、15.79%; 男性和女性阳性率分别为 10.39% 和 8.70%; >31 岁年龄组人群结核分枝杆菌感染者所占比例最高, 为 71.10%; 2009、2010 年阳性检出率分别为 10.81% 和 10.00%, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 结核分枝杆菌 DNA 在银川地区男女两性间的流行特点相同, 2009 年和 2010 年感染率较为稳定。

【关键词】 分枝杆菌, 结核; DNA, 细菌; 聚合酶链反应; 流行病学

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2011.17.001 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)17-2049-02

Epidemiologic features of TB DNA detected by fluorescence quantitative PCR* NIU Ning-kui¹, WANG Zi-li^{1△}, SHI Jian-dang¹, SHI Zhi-yun², ZHAO Zhi-jun² (1. Department of Spine Surgery; 2. Clinical Laboratory Center, Affiliated Hospital, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

【Abstract】 Objective To learn about the epidemiologic features of TB DNA quantitative detection among the patients in our hospital. Methods Samples were taken routinely from 438 suspected TB patients to detect TB DNA by FQ-PCR. Results The total positive rate of Mycobacterium tuberculosis was 10.27%, the positive rates of morning urine and sputum were 20.72% and 15.79% respectively. The positive rates of male and female samples were 10.39% and 8.70% respectively. The patients aged more than 31 years accounted for 71.10%. The overall detection rate was 10.81% in 2009 and 10.00% in 2010 without statistical significance. Conclusion The epidemiologic features of TB DNA between both sexes in Yinchuan region are same. The infection rate of nearly 2 years is more stable.

【Key words】 mycobacterium tuberculosis; DNA, bacterial; polymerase chain reaction; epidemiology

结核病已发展成为世界性严重公共卫生问题, 我国是全球 22 个结核病高发国家之一, 给社会经济造成巨大损失^[1]。现有的结核病实验室诊断方法阳性率较低, 不能满足临床诊治的需要, 因此, 提高诊断阳性率和诊断速度对于防治结核病具有重要意义^[2]。荧光定量聚合酶链反应 (FQ-PCR) 技术具有较高的敏感性和特异性, 已逐步应用到临床结核病的细菌学检测中。该方法能够将诊断时间从几周缩短到几天, 是发现传染源的主要途径和手段, 也是结核病诊治的重要依据^[3]。为了解结核分枝杆菌在宁夏医科大学附属医院患者中的流行病学特点, 作者对 2008 年 7 月至 2010 年 12 月本院就诊的 438 例结核疑似患者采用 FQ-PCR 法进行了结核分枝杆菌检测分析, 现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2008 年 7 月至 2010 年 12 月本院住院和门诊结核疑似患者 438 例, 其中男 230 例, 女 208 例, 年龄 22 d 至 84 岁, 平均 34.38 岁。标本包括痰液、脑脊液、尿液、抗凝血、胸腔积液等, 标本采集后立即送检。

1.2 仪器与试剂 采用美国 ABI 公司 7300 型荧光定量 PCR 仪进行结核分枝杆菌 DNA 测定, 试剂由中山大学达安基因股份有限公司提供。

1.3 方法 (1) 按仪器和试剂相关说明书进行操作: 向痰液中加入 2% NaOH 2~4 倍量, 振荡 5 min, 室温静置 30 min, 期间振荡 2~3 次, 使痰液充分液化。取液化痰液、脑脊液、胸腔积液或尿液 1 mL, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 向沉淀中加入 100 μL 的 DNA 浓缩液混匀, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 向沉淀中加入 20 μL 的 DNA 提取液,

100 °C 恒温处理 10 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 取 3 μL 进行 PCR 反应。(2) 血清处理: 取血清 100 μL 加入 100 μL 的 DNA 浓缩液混匀, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 向沉淀中加入 20 μL 的 DNA 提取液, 100 °C 恒温处理 10 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 取 3 μL 进行 PCR 反应。

1.4 统计学处理 所有数据采用 SPSS 11.0 软件进行 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同标本类型结核分枝杆菌 DNA 阳性检测结果 438 例中结核分枝杆菌 DNA 总阳性率为 10.27%。尿液和痰液的阳性率较高, 分别为 20.72% 和 15.79%。其中尿液与脑脊液、抗凝血标本的阳性率比较差异均有统计学意义 ($\chi^2 = 9.707 0, 21.490 2, P < 0.01$), 尿液与痰液阳性率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。

表 1 438 例患者痰液、尿液、脑脊液、抗凝血结核分枝杆菌检测结果

对比项目	样本例数	阳性例数	阳性率 (%)
尿液	111	23	20.72
痰液	76	12	15.79
脑脊液	110	7	6.36*
抗凝血	119	2	1.68*
其他	22	1	4.55
合计	438	45	10.27

注: 与尿液阳性率比较, * $P < 0.01$ 。

* 基金项目: 宁夏医科大学校级科研课题 (XQ201026)。△ 通讯作者, E-mail: wangzlnx@126.com。

2.2 不同性别间结核分枝杆菌 DNA 阳性检测结果 男性阳性率为 10.39%，女性为 8.70%，男女性检出率相比，差异无统计学意义($P>0.05$)，见表 2。

2.3 不同年龄组患者结核分枝杆菌感染的构成分布 ≥ 31 岁组结核分枝杆菌感染者比例最高(71.11%)，见表 3。

2.4 不同年度结核分枝杆菌的阳性检测结果 2010 年与 2009 年结核分枝杆菌总阳性率无明显变化，差异无统计学意义($P>0.05$)；痰液阳性率两年份之间相比差异有统计学意义($\chi^2=4.8360, P<0.05$)，见表 4。

表 2 不同性别间结核分枝杆菌阳性检出情况

对比项目	n	男性		女性		χ^2	P
		n	阳性(%)	n	阳性(%)		
尿液	111	52	12(23.08)	59	11(18.64)	0.3306	>0.05
痰液	76	45	7(15.56)	31	2(6.45)	0.7157	>0.05
脑脊液	110	58	3(5.17)	52	4(7.69)	0.0223	>0.05
抗凝血	119	59	1(1.69)	60	1(1.67)	0.4916	>0.05
其他	22	17	1(5.88)	5	0(0.00)	0.4437	>0.05
合计	438	231	24(10.39)	207	18(8.70)	0.3613	>0.05

表 3 结核分枝杆菌阳性患者的年龄构成[n(%)]

年龄(岁)	痰液	尿液	脑脊液	抗凝血	其他	合计
0~20	1(8.33)	1(4.35)	3(42.86)	1(50.00)	0(0.00)	6(13.33)
21~30	4(33.33)	2(8.70)	1(14.29)	0(0.00)	0(0.00)	7(15.56)
31~40	1(8.33)	7(30.43)	2(28.57)	1(50.00)	0(0.00)	11(24.44)
41~50	3(25.00)	7(30.43)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	10(22.22)
≥ 51	3(25.00)	6(26.09)	1(14.29)	0(0.00)	1(100.00)	11(24.44)
合计	12(100.00)	23(100.00)	7(100.00)	2(100.00)	1(100.00)	45(100.00)

表 4 不同年份结核分枝杆菌阳性检出情况[n(%)]

年度	例数	痰液	尿液	脑脊液	抗凝血	其他	合计
2009	148	9(6.08)	5(3.38)	1(0.68)	1(0.68)	0(0.00)	16(10.81)
2010	220	3(1.36)*	13(5.90)*	4(1.82)	1(0.45)	1(0.45)	22(10.00)

注：与 2009 年比较，* $P<0.05$ 。

3 讨 论

结核的细菌学检查是发现传染源的主要途径和手段，是确定结核病诊断和化疗方案的重要依据。但由于存在灵敏度低、特异性差、耗时长等问题，可能导致结核病治疗延迟或对非结核病和非典型结核感染患者的不恰当抗结核治疗^[4]。近年来出现的 FQ-PCR 技术以快速、特异、敏感、准确定量的特点，被用于结核病的快速确诊研究^[5-7]。

本研究应用 FQ-PCR 技术检测宁夏某医院患者结核分枝杆菌的总阳性率为 10.27%，尿液、痰液、脑脊液、抗凝血的阳性率分别为 20.72%、15.79%、6.36% 和 1.68%；性别感染率比较中，男、女性阳性率分别为 10.39% 和 8.70%；从年龄构成分布显示， ≥ 31 岁年龄组人群感染者占总数的 71.11%；不同年度比较中，2010 年与 2009 年结核分枝杆菌总阳性率无明显变化。本次采用 FQ-PCR 技术在血液中检测出 2 例结核分枝杆菌，阳性率比国内研究报道的 27.5% 低^[8]。由于外周血中结核分枝杆菌的含量甚微，血清学方法和物理方法均难达到确诊的目的，因此阳性率虽然不高，但对结核分枝杆菌血症的早期诊断和治疗具有重要指导意义，并可防止继发性结核病灶的形成。在疑似结核分枝杆菌感染的诊断中，建议采用涂片、培养及 FQ-PCR 联合检测方法，以便更好地为临床服务。

参考文献

[1] 方梅,陆巧荣,洪志强.分子信标荧光定量 PCR 技术检测结核分枝杆菌方法建立及其临床应用[J]. 四川大学学

报;医学版,2010,41(1):162-165.

[2] Piersimoni C, Scarparo C. Relevance of commercial amplification-methods for detection of mycobacterium tuberculosis complex in clinical samples [J]. J Clin Microbio, 2003, 41: 5355-5365.

[3] Parashar D, Chauhan DS, Sharma VD, et al. Applications of real-time PCR technology to mycobacterial research [J]. Indian J Med Res, 2006, 124(4): 385-398.

[4] Negi SS, Khan SF, Gupta S, et al. Comparison of the conventional diagnostic modalities, bacterial culture and polymerase chain reaction test for diagnosis of tuberculosis [J]. Indian J Med Microbiol, 2005, 23(1): 29-33.

[5] 李秀武, 刘建强. FQ-PCR 技术在肺外结核中的诊断价值 [J]. 中国防痨杂志, 2010, 32(12): 818-820.

[6] 李素华, 陈莉. 脑脊液中 TB-DNA 实时荧光定量 PCR 分析的临床应用价值评价 [J]. 西南国防医药, 2010, 20(6): 641-642.

[7] 刘建强, 李秀武. 荧光定量 PCR 技术在泌尿系统结核中的诊断价值 [J]. 河北医药, 2011, 33(4): 524-525.

[8] 张永乐, 朱明利, 张利诚, 等. 增菌荧光定量 PCR 检测痰及血液中结核杆菌的临床应用 [J]. 中国卫生检验, 2008, 18(9): 1945-1947.

(收稿日期: 2011-03-07)