

细菌培养与聚合酶链反应(PCR)检测在细菌性痢疾检测中的应用分析^{*}

许丽霞,黄剑芳,刘集鸿(广东省惠州市第一人民医院检验科 516001)

【摘要】 目的 探讨细菌培养与聚合酶链反应(PCR)检测在细菌性痢疾检测中的应用效果。**方法** 选择该院收治的 800 例腹泻患者,分别采用细菌培养与 PCR 法技术检测志贺菌。分析两种方法的检出率及患者一般情况对检出率的影响。**结果** PCR 检出率显著高于细菌培养,差异有统计学意义($P<0.05$)。PCR 平均循环数在培养阴性、非脓血便、年龄大于 5 岁的病例中最高,平均循环数在培养阳性、脓血便、年龄小于 5 岁病例中最低。**结论** 针对 ipaH 基因的 PCR 检测有利于准确评估人群中痢疾疾病。

【关键词】 细菌培养; 聚合酶链反应; ipaH 基因; 细菌性痢疾

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.12.037 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)12-1676-02

细菌性痢疾简称菌痢,为志贺菌属细菌引起的肠道传染病。患者主要临床表现为发热、发冷、腹泻、腹痛、有黏液脓血样便^[1]。随着我国经济的不断发展,卫生条件的逐步改善,细菌性痢疾发病率呈下降趋势,但志贺菌感染仍为我国重要的公共卫生问题之一^[2]。常用的临床检测方法包括细菌培养及聚合酶链反应(PCR)检测等。有临床报道显示,按临床标准诊断为细菌性痢疾的患者中,经细菌学检查确定为福氏菌或志贺菌痢疾比例均不高,细菌学检查结果与临床诊断符合率低,提示肠道门诊中存在菌痢的误诊及漏诊^[3-4]。本研究选择该院 2009 年 1 月至 2013 年 11 月收治的 800 例腹泻患者,分别采用细菌培养与 PCR 技术检测志贺菌,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本组 800 例腹泻患者粪便标本均为该院 2009 年 1 月至 2013 年 11 月肠道门诊患者,患者粪便镜检白细胞每高倍视野 15 个以上,可见少量红细胞。其中男性 500 例,女性 300 例,年龄 18~50 岁,平均年龄(35.6±3.8)岁。所有标本均为患者入院当天留取的新鲜大便,送检后立即培养。

1.2 仪器与试剂 培养基为 SS 及麦康凯培养基、亚硝酸盐增菌培养基、GN 增菌培养基分离培养及增菌培养,双糖铁及三糖铁培养基培养。PCR 试剂盒购自北京晨绿生物有限公司。

1.3 研究方法 每个研究对象由接诊医师填写包括患者年龄、性别等一般情况和临床症状、体征以及体检及治疗方案的首诊卡。本研究腹泻定义为每日 3 次或 3 次以上的稀便或水样便,发热定义为腋温超过 37.5℃。

1.4 检测方法

1.4.1 细菌培养 将粪便标本接种于 SS 及麦康凯培养基中,37℃培养 24 h 后挑出可疑菌落转种于 KIA 及 MIU 生化培养基进行生化鉴定,然后通过血清凝集反应确定血清型。细菌培养可见典型菌落并经生化鉴定确定为志贺菌判定为阳性。

1.4.2 PCR 检测 (1)引物:扩增志贺 ipaH 基因片段引物碱基序列,ipaH1: GTT CCT TGA CCG CCT TTC CGA TAC CGT C; ipaH2: GCC GGT CAG CCA CCC TCT GAG AGT AC。由北京赛百盛生物制剂有限公司合成,并给予脱盐纯化。(2)模板制备:从培养 24 h 的 SS 琼脂平板菌落中提取 DNA,接种单菌落于 LB 或脑心平板,连续划线,37℃培养 18~24 h。再刮取 1~2 接种环菌苔加入 150 μL 三蒸水中,混匀,100℃

煮沸 10 min。12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,-20℃保存备用。然后加入 PBS 缓冲液洗涤沉淀。在 8 000~10 000 r/min 下离心 1~2 min,重复 2~3 次。收集菌体,加入 TE 缓冲液 467 μL+10% SDS 30 μL+蛋白酶 K(20 g/L)3 μL,于 37℃消化 1 h,酚氯仿抽提。(3)反应体系,10×PBS 缓冲液 5 μL+dNTP 混合物终浓度 200 μmol+MgCl₂ 终浓度 2 mmol+相应引物终浓度 100 pmol+Q-solution 5 μL+Taq-DNA 聚合酶 1.25 U+模板 DNA 2 μL。(4)扩增条件:94℃预变性 7 min,94℃变性 1 min,60℃退火 2 min,72℃延伸 4 min,总共 40 个循环,能检测到产物的循环数小于或等于 38 则为阳性。含有化学试剂 10%福尔马林、苏木素、伊红、EDTA、苯酚、氯仿、2%SDS 对 PCR 存在抑制的阴性标本,采用 Qiagen Stool Kit 进一步纯化。

1.5 统计学处理 所有数据均采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析。分类变量资料使用 χ^2 检验或精确概率法进行统计分析,连续变量资料应用方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同年龄患者细菌性痢疾的检出率比较 PCR 检出率显著高于细菌培养,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 不同年龄患者细菌性痢疾的检出率结果比较			
年龄(岁)	<i>n</i>	细菌培养阳性[<i>n</i> (%)]	PCR 阳性[<i>n</i> (%)]
0~	390	22(2.75)	266(33.25)
5~	50	2(0.25)	24(3.00)
10~	60	2(0.25)	26(3.25)
20~	60	3(0.38)	23(2.88)
30~	60	2(0.25)	20(2.50)
40~	60	2(0.25)	18(2.25)
50~	60	3(0.38)	20(2.50)
60~	30	1(0.13)	18(2.25)
70~	30	1(0.13)	10(1.25)
总计	800	38(4.75)	425(53.13)

2.2 患者临床特征及检测结果 PCR 平均循环数在培养阴性、非脓血便、年龄大于 5 岁的病例中最高,平均循环数在培养阳性、脓血便、年龄小于 5 岁病例中最低。见表 2。

^{*} 基金项目:广东省惠州市科技计划项目(2012Y0980)。

表 2 患者临床特征及检测结果比较(̄x±s)

标本性状	年龄 (岁)	培养阳性				培养阴性			
		腹泻[n(%)]	检测[n(%)]	PCR 阳性[n(%)]	PCR 循环数	腹泻[n(%)]	检测[n(%)]	PCR 阳性[n(%)]	PCR 循环数
便血	<5	2(0.250)	2(0.250)	2(0.250)	20.8±4.2	6(0.750)	4(0.50)	3(0.375)	32.4±3.8
	≥5	15(1.875)	10(1.250)	10(1.250)	21.7±3.2	33(4.125)	8(1.000)	5(0.625)	32.1±3.6
未便血	<5	4(0.500)	8(1.000)	8(1.000)	22.7±3.8	133(16.625)	10(1.250)	6(0.750)	36.4±3.4
	≥5	17(2.125)	10(1.250)	9(1.125)	24.7±3.3	590(73.750)	10(1.250)	5(0.625)	36.6±3.2

3 讨 论

分子生物学技术在细菌流行病学研究中的临床价值报道较多,由于 PCR 快速、高特异性、高敏感性,已被国外学者用于细菌性痢疾的追踪检测中,尤其适用于菌量较少的标本,或有血清学标记无法鉴定的腹泻菌株,或经药物治疗标本中活菌量不多的标本^[5-7]。而传统的培养法及生化法费时费力,操作繁琐,阳性率较低,极易漏诊^[8]。由于细菌性痢疾患者细菌培养结果可能与 PCR 阳性率差异不大,故选择腹泻患者为研究对象,提示 PCR 检测的灵敏性及特异性更佳。

Kosek 等^[9]建立多重 PCR 检测志贺菌属的 ipaH 及 ial 致病基因诊断细菌性痢疾,结果显示标本中 ipaH PCR 结果阳性并不一定发病,可能为志贺菌属携带者,而 ipaH 及 ial 双基因同时检测阳性标本为菌痢现症患者。本组比较 PCR 与粪便培养在检测志贺菌上的差异,结果显示 800 例标本中,PCR 检测阳性 425 例,而细菌培养阳性仅为 38 例。ipaH 基因检出与细菌培养基结果,临床症状、体征及感染月份有关。有发热、脓血便的腹泻患者标本较无上述症状的腹泻患者标本更易检测到 ipaH 基因,可能与标本中细菌载量差异有关^[10-11]。

脓血便、发热为判断志贺菌感染程度的指标之一,重症感染为肠上皮黏膜破裂引起病原菌快速、大量增殖所致。相对于轻症病例,重症感染者的排泄物中细菌载量更高。PCR 检测的循环数与被检标本中目标物的含量相关。粪便培养阳性及脓血便的病理标本,PCR 检测的平均循环数显著低于培养阴性的非脓血便患者。本组在分别选择培养法及 PCR 检测后,采用随机抽样的方式选择腹泻病例分别根据临床症状、年龄抽取样本比较,避免再次重复检测带来的繁重工作量。

有报道显示,除志贺菌属外,EIEC 也有 ipaH 基因,将会对针对 ipaH 基因的 PCR 检测造成干扰^[12]。然而在中国及亚洲地区报道的 EIEC 流行率远低于志贺菌的流行率,使得研究结果与实际结果差异不大。

细菌培养结果受较多因素影响,常见的有:(1)标本采集。标本采集直接影响志贺菌的检出率,有研究显示,采用直接采便与普通留便检出率差异无统计学意义($P>0.05$)。为及时对大便样本进行接种,本组遵循即时接种制度,在解便后不超过 20 min 即接种于培养基上。(2)分离培养基的选择。分离培养基的质量为影响细菌检出率的主要因素之一。目前常用的培养基有 SS 培养基、麦康凯培养基、亚硝酸盐增菌培养基、GN 增菌培养基分离培养及增菌培养基、双糖铁及三糖铁培养基等。SS 培养基的质量与胆盐及各成分有关,柠檬酸钠及硫代硫酸钠浓度一般为 0.85%,使用药品所含的结晶水不同,导致培养基对非病原性细菌抑制力较弱,故在培养基制备时应减去结晶水。(3)菌落挑选。自分离培养基上挑选可疑菌落时,由于各类培养基的不同,菌落性状不同,一般在 SS 琼脂培养基上致病菌菌落呈无色,扁平边缘整齐、均匀、浑浊或半透明。

取菌时可见黏液状,可与变形杆菌区别。挑选菌落接种双糖培养基时,应多挑几个菌落,以免漏掉致病菌。但培养基上生长出的纯致病菌菌落可取 1 个菌落接种。若培养基上长出几种无色疑似致病菌的菌落时,应将每种不同性状的菌落分别接种于双糖培养基上。(4)血清凝集试验。双糖培养基上,多数致病菌呈明显标准反应,可初步区别致病菌或非致病菌。但志贺菌 2 型少数菌株斜面产酸,故出现此双糖培养基结果时,应进一步做血清学鉴定。行血清学鉴定时,应注意肠道菌的交叉抗原,凝集不佳或不凝集者,应进一步做生化鉴定。尤其是在诊断血清中缺少鲍氏痢疾杆菌血清时,即使生化反应典型而不被血清凝集的菌株极少见^[13]。

综上所述,PCR 检测克服了传统细菌培养因标本中细菌载量、细菌间的竞争抑制等因素影响而导致检出率偏低的缺陷,针对 ipaH 基因的 PCR 检测有利于准确评估人群中痢疾的疾病发病率。

参考文献

[1] 王松梅,郝志勇,马景臣,等. PCR 检测与细菌培养方法在细菌性痢疾监测中的应用比较[J]. 复旦大学学报,2012,33(6):766-769.

[2] 王晶晶,陈爱英,阎碧茹. 211 例细菌性痢疾便标本细菌培养及药敏试验结果[J]. 山西医科大学学报,2012,29(2):125-127.

[3] Lindsay B,Ochieng JB,Ikumapayi UN,et al. Quantitative PCR for detection of Shigella improves ascertainment of Shigella burden in children with moderate-to-severe diarrhea in low-income countries[J]. J Clin Microbiol,2013,51(6):1740-1746.

[4] 曾桂芬,龙北国,姜容,等. LAMP 和 PCR 法检测痢疾志贺菌的特异性和灵敏性比较[J]. 热带医学杂志,2012,12(5):547-549.

[5] Mokhtari W,Nsaibia S,Gharbi A,et al. Real-time PCR using SYBR Green for the detection of Shigella spp. in food and stool samples[J]. Mol Cell Probes,2013,27(1):53-59.

[6] 温艳,阴赓宏,黄敏君,等. PCR 诊断细菌性痢疾的临床价值[J]. 首都医科大学学报,2011,27(2):171-176.

[7] Schnupf P,Sansonetti PJ. Quantitative RT-PCR profiling of the rabbit immune response:assessment of acute Shigella flexneri infection[J]. PLoS One,2012,7(6):366.

[8] 王国富,吴利先,薛士鹏. 志贺菌感染的多重 PCR 快速诊断技术的建立[J]. 中国现代药物应用,2012,6(12):130-135.

(下转第 1679 页)

射波时间以及大动脉僵硬度所决定。其中,大动脉僵硬度及反射波是 PP 的主要决定因素。动脉硬化使得收缩压增加,舒张压下降,从而导致 PP 增加。近年来随着临床对 AD 研究的不断深入,逐渐发现血管源性因素在 AD 的发生、发展中起到了至关重要的作用^[1]。有研究也证实 AD 与患者的高收缩压与低舒张压水平相关,而低舒张压与高收缩压归结于脉压的增大,PP 是反映大动脉弹性的指标,是全身动脉硬化的外周表现^[2-3]。而脑动脉硬化是导致脑血流下降的主要因素,其一是脑动脉狭窄或闭塞导致脑组织灌注流量降低,其二是脑组织功能的兴奋性降低,导致了脑代谢率的降低和脑血流量下降。脑缺血造成大脑皮层损伤是引起不同类型认知障碍的常见原因。在脑细胞缺血缺氧状态下,通过能量消耗和酸中毒,细胞内 Ca^{2+} 超载,自由基损伤,兴奋性毒素、炎性细胞因子等多种途径导致脑白质损伤,轴突运输受损,神经网络的环路连接遭到损害,使信息传递发生障碍。同时,有学者研究发现,随着 PP 的增高,一些用来评价脑血流动力学的指标,如血管搏动指数 (PI)、平均血流速度 (V_m) 会降低,导致脑血流量的下降,使脑组织缺血缺氧,从而导致患者认知功能障碍^[4-5]。所以动脉硬化在 AD 的发病过程中有着重要的作用,而 PP 是反映机体动脉硬化程度既简便又准确的指标。

对于 MHD 患者长期高血压,较健康者更容易出现动脉硬化,PP 是 MHD 患者大动脉僵硬度增加的独立危险因素,所以 MHD 患者 PP 水平高于健康者。有研究表明认知功能障碍在 MHD 患者中是普遍存在^[6-7]。本研究同样显示 MHD 患者 PP 平均水平为 $(58.6 \pm 18.5) \text{ mm Hg}$,而健康者 PP 平均值为 $(45.9 \pm 16.5) \text{ mm Hg}$,MHD 患者明显高于健康者。相反,MHD 患者 MoCA 评分 (23.65 ± 5.12) 分,明显低于健康者得分 (27.34 ± 4.63) 分,从而证明 MHD 患者较健康者的认知功能降低,这与以往的研究是相符的^[8-9]。同时随脉压差的不断增加,患者的 MoCA 得分呈逐渐减少趋势,所以进一步证明 PP 与 MHD 患者认知功能密切相关。

综上所述,轻度认知功能异常是痴呆的早期阶段,可导致患者独立生活能力下降,病死率也显著增加,给社会、家庭都带来很大影响^[10-11]。这一现象在 MHD 患者中更为明显,CoCA 在 MHD 患者轻度认知障碍筛查中具有很好的敏感性,PP 与 MHD 患者认知功能密切相关。研究提示轻度认知功能障碍被认为是痴呆干预治疗的较好时机,因此,监测 PP 水平能早期发现,从而有效干预,降低患者认知功能减退的发生危险,具有重要的临床意义。

(上接第 1677 页)

[9] Kosek M, Yori PP, Gilman RH, et al. Facilitated molecular typing of Shigella isolates using ERIC-PCR[J]. Am J Trop Med Hyg, 2012, 86(6): 1018-1025.

[10] van Beld MJ, Reubsat FA. Differentiation between Shigella, enteroinvasive Escherichia coli (EIEC) and noninvasive Escherichia coli[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2012, 31(6): 899-904.

[11] Sarker P, Ahmed S, Tiash S, et al. Phenylbutyrate counteracts Shigella mediated downregulation of cathelicidin in rabbit lung and intestinal epithelia: a potential therapeutic strategy[J]. PLoS One, 2011, 6(6): 206-207.

参考文献

[1] de Torre JC. Is Alzheimer's disease; a neurodegenerative or a vascular disorder data, dogma, and dialectics[J]. Neurol, 2004, 3(3): 184-190.

[2] Qiu C, van Strauss E, Fastbom J, et al. Low blood pressure and risk of dementia in the Kungsholmen project: a 6-year follow-up study[J]. Arch Neurol, 2003, 60(2): 223-228.

[3] Obisesan TO, Obisesan OA, Martins S, et al. High blood pressure, hypertension, and high pulse pressure are associated with poorer cognitive function in persons aged 60 and older; the Third National Health and Nutrition Examination Survey[J]. J Am Geriatr Soc, 2008, 56(3): 501-509.

[4] 倪建芳, 吴雪莲, 贝小敏. 老年原发性高血压血压水平与脑血流动力学的关系[J]. 心脑血管病防治, 2006, 6(3): 162-164.

[5] 甘良英, 王梅. 血液透析患者的动脉僵硬度及相关因素[J]. 中华肾脏病杂志, 2008, 24(4): 245-248.

[6] Kurella C, Tamura M, Yaffe K, et al. Dementia and cognitive impairment in ESRD: diagnostic and therapeutic strategies[J]. Kidney Int, 2011, 79(1): 14-22.

[7] 李静, 侯国存, 孙秀丽, 等. 蒙特利尔认知评估量表在维持性血液透析患者轻度认知功能障碍筛查中的应用[J]. 中国血液净化, 2012, 11(3): 144-146.

[8] 李春红, 田洁, 王洪玲, 等. 影响维持性血液透析患者甲状腺素水平的相关因素分析[J]. 天津医药, 2010, 11(3): 234-235.

[9] 张燕燕, 张晓东, 李瑛, 等. 维持性血液透析对慢性肾衰合并心功能不全患者体内 N 端脑钠肽前体及心脏功能的影响[J]. 海南医学院学报, 2012, 18(11): 1546-1549.

[10] 韦振忠, 吴杰. 血液透析联合血液灌流治疗急性肾功能衰竭的临床研究[J]. 海南医学院学报, 2013, 19(3): 343-349.

[11] 郭泽丽. 血液透析患者营养状况调查分析[J]. 海南医学院学报, 2013, 19(2): 275-277.

(收稿日期: 2013-11-15 修回日期: 2014-01-25)

[12] Hsu BM, Wu SF, Huang SW, et al. Differentiation and identification of Shigella spp. and enteroinvasive Escherichia coli in environmental waters by a molecular method and biochemical test[J]. Water Res, 2010, 44(3): 949-955.

[13] Farfán MJ, Garay TA, Prado CA, et al. A new multiplex PCR for differential identification of Shigella flexneri and Shigella sonnei and detection of Shigella virulence determinants[J]. Epidemiol Infect, 2010, 138(4): 525-533.

(收稿日期: 2013-12-18 修回日期: 2014-02-14)