

• 临床研究 •

聚合酶链反应与分离培养技术检测结核分支杆菌 诊断关节结核的对照研究

孙永生^{1*}, 温建民¹, 吕卫新^{1*}, 娄思权², 焦长庚³, 杨素敏³, 徐海斌³, 段永状³

(1.中国中医科学院望京医院骨关节二科,北京 100102;2.北京大学第三医院骨科;3.新乡医学院第一附属医院结核病研究所)

【摘要】 目的:研究聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR)技术在关节结核标本结核分支杆菌检测方面的作用,探讨 PCR 技术对关节结核诊断的临床价值。**方法:**自 1993 年 6 月至 2001 年 8 月,对 95 例(男 55 例,女 40 例;年龄 2~75 岁)关节结核标本分别应用 PCR 技术和分离培养法盲法检测结核分支杆菌,计算两者检测阳性率,通过统计学处理进行比较。**结果:**95 例关节结核标本结核分支杆菌检测中,PCR 技术检测阳性 78 例,阴性 17 例,阳性率 82%;分离培养法检测阳性 15 例,阴性 80 例,阳性率 16%。PCR 技术与分离培养法比较, $\chi^2=67, P<0.001$,两种方法对于关节结核标本结核分支杆菌的检出率比较差异有统计学意义。PCR 扩增整个过程自动化控制,可在数小时内完成。**结论:**PCR 技术检测关节结核标本具有快速、简便、敏感与特异等优点,明显优于分离培养,对关节结核的早期快速诊断与鉴别诊断具有较重要的临床价值。

【关键词】 结核;骨关节; 聚合酶链反应; 培养技术; 结核分支杆菌; 诊断

Comparison study on polymerase chain reaction (PCR) and standard culture technique in detecting mycobacterium tuberculosis to diagnose of joint tuberculosis SUN Yong-sheng*, WEN Jian-min, LÜ Wei-xin, LOU Si-quan, JIAO Chang-geng, YANG Su-min, XU Hai-bin, DUAN Yong-zhuang. *The 2nd Department of Bone Joint, Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medicine Science, Beijing 100102, China

ABSTRACT Objective: To study the role of PCR technique in detection of mycobacterium tuberculosis in the samples from joint tuberculosis, and to evaluate the clinical value of PCR in diagnosis of joint tuberculosis. **Methods:** From June 1993 to August 2001, PCR was used to detect DNA of mycobacterium tuberculosis, and the standard culture was applied to detect mycobacterium tuberculosis. Mycobacterium tuberculosis were respectively blindly by the two techniques in the samples obtained from 95 patients with joint tuberculosis (55 males and 40 females, the age ranging from 2 to 75 years, with an average of 34 years). The positive rate of mycobacterium tuberculosis detection was calculated. **Results:** In the detection of mycobacterium tuberculosis, positive rate was 82% (78/95) in PCR technique, and 16% (15/95) in standard culture technique. There were statistical differences between the two groups ($\chi^2=67, P<0.001$). The whole process of PCR amplification was automatic and could be finished within several hours, and the detecting time was considerably shorter. **Conclusion:** PCR technique is a rapid, simple, sensitive and specific method for detection of mycobacterium tuberculosis in the samples of joint tuberculosis, showing more marked advantages than the standard culture technique. It is valuable in the early rapid diagnosis and differential diagnosis of joint tuberculosis.

Key words Tuberculosis, osteoarticular; Polymerase chain reaction; Culture techniques; Mycobacterium tuberculosis; Diagnosis

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2009, 22(7): 504-506 www.zggszz.com

关节结核早期明确诊断、及时治疗是防治关节结构破坏、挽救关节功能的关键。然而,关节结核早期临床表现缺乏特异性,早期诊断必须依赖于细菌学检查。结核分支杆菌分离培养

是结核病诊断和治疗方案确定的基本依据,然而其存在敏感性低、检出速度慢等严重问题,远不能满足关节结核早期诊断的需要。聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR)技术的发明以快速、敏感、特异而简便等优点将结核病的病原学诊断提高到基因水平,广泛应用于肺结核与结核性脑膜炎的诊断与鉴别诊断^[1]。但是应用 PCR 技术诊断关节结核的报道极少,且多为散在性的病例报告^[2-10]。笔者既往以一个小样本应

基金项目:河南省科技攻关项目(编号:0124170412)

通讯作者:吕卫新 Tel:010-84739008

*该作者原单位为新乡医学院第一附属医院

用 PCR 技术检测关节结核标本中的结核分支杆菌 DNA, 初步发现 PCR 技术在结核分支杆菌的检测阳性率和检测速度等方面明显优于传统的涂片镜检和分离培养法^[1,11]。在此基础上, 以一个大大样本, 对 PCR 和分离培养技术检测关节结核标本结核分支杆菌进行对照研究, 进一步探讨 PCR 技术检测关节结核标本中结核分支杆菌 DNA 诊断关节结核的临床价值。

1 资料与方法

1.1 主要试剂及仪器 结核分支杆菌 PCR 诊断试剂盒: 中国郑州健龙生物技术公司提供。PCR 扩增仪: 480 型, 美国 P-E 公司提供。电泳仪: 国产 DY-B 型。培养基: 改良罗氏培养基。

1.2 临床资料

1.2.1 关节结核诊断标准 具备下述 3 项中任何一项即确定诊断为关节结核: ①病理组织学检查确诊为结核性病变; ②细菌学检查检测出结核分支杆菌; ③典型的临床特征, 即典型的临床表现、典型的影像学表现、手术中所见为典型的关节结核病理变化及抗结核治疗有效。

1.2.2 一般资料 本研究 95 例关节结核均系 1993 年 6 月至 2001 年 8 月在新乡医学院第一附属医院及新乡医学院结核病研究所住院患者, 均符合上述诊断标准。其中, 男 55 例, 女 40 例, 男:女=1.38:1; 年龄 2~75 岁, 平均 34 岁。结核发生部位: 膝关节 32 例, 髋关节 24 例, 踝关节 14 例, 腕关节 7 例, 肘关节 6 例, 骶髂关节 5 例, 跗跖关节 3 例, 跗骨间关节 2 例, 肩关节 1 例, 指间关节 1 例。其中单纯滑膜结核 2 例, 早期全关节结核 5 例。

1.3 标本的收集 一般情况下, 关节穿刺, 抽取关节积液; 周围形成脓肿者, 抽取脓液; 窦道形成者, 取窦道渗出物或窦道中肉芽组织; 部分手术过程中取标本。所有标本均置于无菌管中送检, 在标本的收集过程中注意严格的“无菌”操作。

1.4 结核分支杆菌的检测

对 95 例关节结核标本分别应用 PCR 技术及分离培养法盲法检测结核分支杆菌。

1.4.1 PCR 技术检测结核分支杆菌 DNA 严格按照 PCR 操作规程和所用诊断试剂盒的使用说明进行, 每一步骤由专人操作, 实行盲法。

(1) 标本中 DNA 提取: ①关节液、脓液及其他渗出液, 直接离心沉淀, 弃上清, 加裂解液, 经过裂解程序后, 离心取上清液, 反复抽提 3 次, 制作模板。②块状组织, 取米粒大小放入小研钵内, 用小刀切碎, 加 100 mM Tris·HCl 1 000 μ l, 3 M NaOH 100 μ l 与裂解液 30 μ l, 研成乳状。将研后的组织悬液放入玻璃管内煮沸 (100 $^{\circ}$ C) 20 min, 离心取上清液制作模板。

(2) PCR 扩增: 反应总体积 25 μ l, 包括反应液 8 μ l, DNA 模板 16 μ l 与 TaqDNA 聚合酶 1 μ l。94 $^{\circ}$ C 1 min, 65 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min。循环 35 次, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

(3) PCR 扩增产物的检测: 取扩增产物 10~15 μ l 加溴酚兰 3 μ l 混匀后, 于 2% 琼脂糖凝胶上电泳 (100 V, 30 min), 然后在紫外线灯下观察, 如有 245 bp 扩增区带者为阳性, 未见 245 bp 扩增区带者为阴性。

(4) 阴性对照与阳性对照: 每次 PCR 试验均设立空白阴性对照与阳性对照。如果阳性对照呈阴性或阴性对照呈阳性则该试验视为无效试验。

1.4.2 结核分支杆菌的分离培养及菌型鉴定 按照中国防痨协会结核病细菌学检查方法规程进行。

1.5 统计学处理 对 PCR 技术在关节结核标本结核分支杆菌检出阳性率方面和培养法之间的差异性进行统计学处理, 卡方检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

对 95 例关节结核标本分别应用 PCR 技术检测结核分支杆菌 DNA 和分离培养法检测结核分支杆菌, 结果见表 1。结果显示 PCR 技术与分离培养法对于关节结核标本结核分支杆菌的阳性检出率有差异, PCR 技术优于分离培养法。

表 1 PCR 技术与分离培养法检测关节结核标本结核分支杆菌的比较

Tab.1 Comparison between PCR and standard culture technique in detection of mycobacterium tuberculosis in samples from joint tuberculosis

检测方法	结果(例)		阳性率(%)
	阳性	阴性	
分离培养	15	80	16
PCR 技术	78	17	82

注: PCR 技术与分离培养法比较, $\chi^2=67, P<0.001$

Note: Comparison between PCR and standard culture technique, $\chi^2=67, P<0.001$

3 讨论

目前, 关节结核的诊断主要根据病史、临床表现、实验室检查及 X 线检查, 而关节结核起病隐匿、发展缓慢, 早期关节结核——单纯滑膜结核、单纯骨结核及其相应早期全关节结核缺乏特征性临床表现, X 线检查等影像学检查也缺乏特异性, 确诊相当困难。待出现典型的临床表现时往往已发展至晚期全关节结核, 关节结构严重破坏, 治愈后也遗留关节功能障碍, 甚至残畸。本组 95 例关节结核中早期关节结核仅 7 例(单纯滑膜结核 2 例, 早期全关节结核 5 例), 93% 为晚期全关节结核。所以关节结核的早期确诊只能依赖于细菌学检查。

结核分支杆菌的分离培养是结核病病原学的直接证据, 对于关节结核的诊断具有极其重要而特殊的意义, 但是分离培养法存在严重问题: ①阳性率很低, 本研究中分离培养法的阳性率仅 16%; ②费时间, 一般需 4~8 周; ③需要较高的检验条件与技术, 难以推广普及; ④分离培养易受结核分支杆菌生物学性状和抗结核治疗的影响, 常致使临床培养通常为阴性。所以分离培养在临床上受到很大限制, 远远不能满足于关节结核现代诊疗的需要。

PCR 技术是根据 DNA 的复制原理而设计的 DNA 体外扩增技术, 可使很微量的靶 DNA 在短时间内扩增至 10^6 倍以上, 具有高度的敏感性及特异性, 为结核病的病原学诊断开拓了一条崭新的途径, 被广泛应用于肺结核与结核性脑膜炎的诊断和鉴别诊断^[1], 极大地推动了结核病诊断的发展。PCR 技术在骨与关节结核诊断方面的研究极少, 且多为散在性的病例报道^[2-12]。本研究结果显示 PCR 技术明显优于分离培养法, 提高了关节结核标本结核分支杆菌的阳性检出率。PCR 扩增整个过程自动化控制, 可在数小时内完成。其灵敏度很

• 骨伤论坛 •

损伤控制骨科在胸腰椎骨折伴脊髓损伤治疗中的应用

陈建良,张龙君,叶锋,郑晓东,王晓,许勇
(上虞市中医院骨科,浙江 上虞 312300)

关键词 胸椎; 腰椎; 骨折; 脊髓损伤

Damage control surgery for thoracolumbar fracture and spinal cord injury CHEN Jian-liang, ZHANG Long-jun, YE Feng, ZHENG Xiao-dong, WANG Xiao, XU Yong. Department of Orthopaedics, Traditional Chinese Medical Hospital of Shangyu, Shangyu 312300, Zhejiang, China

Key words Thoracic vertebra; Lumbar vertebra; Fractures; Spinal cord injury

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2009, 22(7):506-507 www.zggszz.com

随着高速公路及机动车辆的普及,高层建筑的增多,使得创伤发生率有增无减。且致伤因素的动量明显增大,严重创伤和多发伤的比例显著增加,同样合并胸腰椎骨折伴脊髓损伤的严重多发伤也显著增加。自 2006 年 11 月至 2007 年 12 月

通讯作者:陈建良 E-mail:chjil8168@yahoo.com.cn

救治 6 例合并胸腰椎骨折伴脊髓损伤患者,采用损伤控制骨科理念指导其相关治疗,效果良好,报告如下。

1 临床资料

本组 6 例,男 5 例,女 1 例;年龄 25~45 岁,平均 35 岁。致伤原因:交通伤 3 例,高处坠落伤 3 例。部位:T₁₂ 2 例,L₁ 3 例,L₂ 1 例,均为爆裂性骨折。CT 检查椎管内骨块占位大于 2/3

高,可检测到 1~100 fg 纯结核分支杆菌 DNA,约相当于 1~20 条结核分支杆菌,目的基因只需 pg 水平,待测标本只需微量。其检测靶 DNA,所以不论标本中结核分支杆菌数量多少,也不管是活菌或是死菌,只要有靶 DNA 存在,即可将其扩增而检出。此充分说明 PCR 技术是一种简便、快速、敏感、特异、标本微量的关节结核标本结核分支杆菌检测方法,对于关节结核的早期诊断与鉴别诊断具有重要价值。

PCR 技术作为一种新的检查方法,其临床价值已得到充分肯定,然而,近年来的临床实践证明 PCR 技术也有一定的局限性,主要表现在假阳性与假阴性两个方面。本研究中 PCR 技术假阴性率为 18%。其假阴性和假阳性的原因比较复杂,主要为引物特异性较低、检测过程中污染、对照体系不严密、操作不规范、非典型分支杆菌感染等^[1]。采取高质量的试剂、高水平的检测系统、严密的对照体系、规范化的技术操作及严格的污染控制,是减少假阳性及假阴性的发生、确保 PCR 技术的准确性与可靠性的重要措施。

参考文献

[1] 孙永生,焦长庚,李立新,等. DNA 体外扩增技术诊断关节结核的临床研究. 中华骨科杂志, 1997, 17(10): 628-631.

[2] 李勇,刘兴炎,甄平,等. 儿童多关节滑膜结核 7 例. 中国骨伤, 2004, 17(12): 724-725.

[3] Papagelopoulos PJ, Papadopoulos EC, Mavrogenis AF, et al. Tuberculous sacroiliitis. A case report and review of the literature. Eur Spine J, 2005, 14(7): 683-688.

[4] Asaka T, Takizawa Y, Kariya T, et al. Tuberculosis tenosynovitis in the elbow joint. Intern Med, 1996, 35(2): 162-165.

[5] Hunfeld KP, Rittmeister M, Wichelhaus TA, et al. Two cases of chronic arthritis of the forearm due to mycobacterium tuberculosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1998, 17(5): 344-348.

[6] Beauvais C, Veillon L, Prier A, et al. Present status of Poncet's tuberculous rheumatism: a new case. Rev Rhum Ed Fr, 1993, 60(12): 919-921.

[7] Verettas D, Kazakos C, Tilkeridis C, et al. Polymerase chain reaction for the detection of Mycobacterium tuberculosis in synovial fluid, tissue samples, bone marrow aspirate and peripheral blood. Acta Orthop Belg, 2003, 69(5): 396-399.

[8] Malhan K, Kumar A, Sherman KP. Use of polymerase chain reaction in diagnosis of occult tuberculosis of the fibula. Acta Orthop Belg, 2001, 67(5): 510-512.

[9] Vyshnevskaya EB, Mazurenko SI, Santavirta S, et al. Use of polymerase chain reaction to diagnose tuberculous arthritis from joint tissues and synovial fluid. Arch Pathol Lab Med, 2004, 128(2): 205-209.

[10] Yun YJ, Lee KH, Haihua L, et al. Detection and identification of Mycobacterium tuberculosis in joint biopsy specimens by rpoB PCR cloning and sequencing. J Clin Microbiol, 2005, 43(1): 174-178.

[11] 孙永生,卢朝晖,原晓景,等. 聚合酶链反应在关节结核诊断与鉴别诊断中的临床价值. 中国实用外科杂志, 1996, 16(10): 602-604.

[12] 孙永生,张永利,卢朝晖,等. 核酸体外扩增技术诊断骨结核的临床研究. 中华结核和呼吸杂志, 1997, 20(3): 145-148.

(收稿日期:2008-12-02 本文编辑:连智华)