

### 3 讨 论

由于人口老龄化加剧、慢性基础疾病增加、侵入性操作增多、免疫抑制剂应用增加及广谱抗菌药物的不合理使用,呼吸道感染的发生明显增加<sup>[2]</sup>。对医院2012年标本构成分析显示,痰标本占47.02%,位居第1位,本文主要研究临床标本到达检验科后工作人员对标本处理及时性对病原菌检出结果的影响。经对145份痰标本进行分时段接种检测结果显示在呼吸道感染中以革兰阴性杆菌感染居多,其中铜绿假单胞菌最多,其次为鲍曼不动杆菌,大多数为条件致病菌。2 h分时段接种对照研究的方法使笔者大致了解了时间对流感嗜血杆菌、肺炎链球菌具有致死性影响,10株流感嗜血杆菌中20.00%在2 h内死亡,30.00%菌落随接种时间延长明显减少;肺炎链球菌也有25.00%死亡,50.00%出现菌落随接种时间延长明显减少的现象。同时也有4份临床标本在随接种时间的延长出现了新菌落,11份标本菌落生长明显减弱或被其他菌落抑制。嗜麦芽窄食单胞菌、黏质沙雷菌、弗氏柠檬酸杆菌、阴沟肠杆菌和奇异变形杆菌未检出生长变化,可能与检出数量少有关。通过对结果的分析显示,痰培养结果准确性与是否及时接种密切相关,若延迟接种会影响病原菌的判断以致影响最终药敏鉴定的真实性,误导临床治疗。因此为了保证临床结果的准确性与真实性,正确指导临床治疗,检验人员应该对所接收的标本及时处理,最好在30 min内,最长不超过1 h方能取得较好的培养结果。

#### • 检验技术与方法 •

## 聚合酶链反应法检测肝病患者血中纳米细菌的价值评估

郭桂林

(安徽省濉溪县人民医院检验科,安徽濉溪 235100)

**摘要:**目的 对比PCR和ELASA法检测肝病患者血中纳米细菌(NB)感染率,评价PCR法的应用价值。**方法** 选取该院2011年6月至2012年6月肝病科住院肝病患者125例,其中慢性乙型肝炎45例,慢性丙型肝炎36例,肝炎肝硬化患者24例,肝癌(HCC)患者20例,肝病组分为慢性乙型肝炎、慢性丙型肝炎、肝炎肝硬化及肝癌四个亚组,同期健康对照40例。应用PCR及ELASA法检测各组血清中NB,并用投射电镜扫描鉴定,对比两检验方法检测的阳性率,符合率等。**结果** 两种检测方法均提示肝病患者NB感染率高于健康人。ELISA法与PCR法阳性率比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。**结论** 慢性肝病和肝癌患者血液中NB感染率高于健康人,PCR法对NB的检测是一可靠的检测方法。

**关键词:**聚合酶链反应; 酶联免疫吸附测定; 纳米细菌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.16.047

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)16-2158-02

纳米细菌(NB)是由芬兰科学家发现的微小细菌,现已知它可感染人类、牛和其他哺乳动物,是一种人兽共患的致病原<sup>[1]</sup>。研究表明NB与人类的结石、关节炎、动脉粥样硬化、皮肤病、肿瘤及其他人体组织内病理性钙化和硬化的发生发展密切相关<sup>[2]</sup>。国外学者已在健康人血清中,肾结石患者的血液、尿液和结石、风湿性关节炎滑膜液及肝病血清中发现了NB<sup>[3]</sup>。慢性肝病是我国常见病和多发病,患者多免疫力低下,易并发多种感染,有研究提示肝病的发展与NB相关<sup>[4]</sup>。NB的检测可采用细菌培养、免疫组化、电镜、钙染色等方法,但以上各法均繁琐费时,因此探讨简易方便的NB的检测方法是医学界的课题之一,笔者应用PCR及ELISA法检测肝病患者血中NB,并应用投射电镜扫描鉴定,对比两检验方法的优劣。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取本院2011年6月至2012年6月肝病科住院肝病患者125例,其中慢性乙型肝炎45例,慢性丙型肝炎36例,肝炎肝硬化患者24例,肝癌(HCC)患者20例,年龄16~

80岁,男71例,女54例,肝病组分为慢性乙型肝炎、慢性丙型肝炎、肝炎肝硬化和肝癌四个亚组,选取同期健康对照40例,年龄18~80岁,男21例,女19例。

**1.2 仪器与试剂** 鼠抗NB单克隆抗体(8D10)购于芬兰Nanobac OY公司;生物素化羊抗鼠IgG、ABC试剂盒、DAB显色试剂盒、DNA样品处理试剂盒及阳性对照购于武汉博士德公司,日本JEOL公司JEM-1230型透射电镜。RPMI-1640细胞培养基为Gibco公司产品, $\gamma$ 射线照射过的胎牛血清购自Sigma公司,滤膜为上海兴亚净化材料厂生产的滤器与0.45 $\mu\text{m}$ 和0.2 $\mu\text{m}$ 滤膜,细胞培养实验中所用无热源注射器和细胞培养板为Sigma公司产品;北京第六仪器厂PE5700型PCR仪、165-5051低压电源电泳仪。

### 1.3 方法

**1.3.1 ELASA法** 严格按照试剂盒说明书进行操作。

**1.3.2 PCR法** 将10 $\mu\text{L}$ 血清样本加入装有10 $\mu\text{L}$ 颗粒的PCR反应管中,并加入50 $\mu\text{L}$ 裂解液,混合均匀。振荡30 s,室

(收稿日期:2013-04-28)

温静置 5 min 后置磁力架上,使颗粒吸附到一侧管壁上,吸弃全部液相。含有颗粒的 PCR 管中加入 100  $\mu$ L 包被液,置涡旋振荡器上振荡 30 s,室温静置 30 s,使颗粒吸附在侧管壁上,吸弃全部液相。上游引物(5'~3'):GGA GGA ACA CCA GTG GCG AAG G;下游引物(5'~3'):GCC CGT AAG GCA ATG AGG AC。由中国科学院上海生物工程中心合成成。扩增片段长度 511 bp,20  $\mu$ L 反应体系,Taq 酶 1 U。反应条件:94 °C 预变性 5 min 后进入循环,条件为 94 °C 变性 30 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,经 35 个循环,72 °C 继续延伸 5 min,取 5  $\mu$ L 加于 2% 琼脂糖凝胶电泳,长波紫外灯下观察结果。

**1.3.3 透射电镜扫描法(TEM)** 在无菌无致热源条件下取抗凝血浆 1 mL,用生理盐水稀释 5 倍后,依次经 0.45  $\mu$ m 和 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤,离心 45 min;取管底 1 mL 充分混匀后,加入含有  $\gamma$  射线照射过的胎牛血清的 RPMI 1640 培养基;混匀后将标本在 37 °C、pH 值 7.4、5% CO<sub>2</sub> 和 95% 空气条件下培养 45 d。取部分 NB 的培养物标本 8 000 r/min 离心 10 min,置于 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH7.0)配制的 2.5% 戊二醛固定液及 1% 四氧化锇固定液中进行双同定;乙醇系列脱水,低黏度树脂包埋、聚合;超薄切片经醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色后,透射电镜下观察拍照。阳性判定:培养物标本可发现 50 nm 左右和较大的细菌样颗粒,而阴性则无。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS18.0 软件分析数据,计数资料以率表示,计数资料采用四格表  $\chi^2$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 两种检测 NB 阳性率结果比较** ELISA 法检测慢性乙型肝炎亚组、慢性丙型肝炎亚组、肝硬化亚组、肝癌亚组、肝病组和健康人 NB 阳性率分别为 40.0%、38.9%、16.7%、10.0%、30.4% 和 7.50%,肝病患者 NB 总感染率与健康对照组比较有明显差异( $\chi^2 = 8.51, P < 0.05$ );PCR 技术检测慢性乙型肝炎亚组、慢性丙型肝炎亚组、肝硬化亚组、肝癌亚组、肝病组和健康人 NB 阳性率分别为 31.1%、27.8%、25.0%、20.0%、27.2% 和 5.0%,肝病患者 NB 总感染率与健康对照组比较有统计学意义( $\chi^2 = 8.75, P < 0.005$ ),两种检测方法均提示肝病患者 NB 感染率高于健康人。

## 2.2 ELISA 法及 PCR 技术法与透射电镜扫描确认比较结果

肝病患者血清两种方法检测阳性结果经透射电镜扫描确认,阳性结果 32 例,阴性结果 88 例;ELISA 法阳性率 30.4%(38/125),PCR 技术检测法阳性率 27.2%(34/125),两者比较无统计学意义( $\chi^2 = 0.312, P = 0.675$ ),ELISA 法阳性 38 例,假阳性 4 例,阳性符合率 84.2%,阴性符合率 95.3%;PCR 技术检测法阳性结果 34 例,假阳性 2 例,符合率 94.1%;阴性符合率 97.7%。

## 3 讨 论

NB 是上世纪 90 年发现的一微小的细菌,其生物学特性为革兰阴性菌,呈球杆状或球状,直径 50~500  $\mu$ m,细菌壁厚,无荚膜与鞭毛,可以通过 0.1~0.4 nm 的滤菌膜,在 pH7.4 的生理性钙磷浓度中能形成羟石灰碳酸盐结晶,产生坚硬的矿化外壳覆盖于菌体周围,使其在高温强酸等许多微生物难以生存

的条件下仍然能够存活<sup>[5]</sup>。NB 生长比较缓慢,倍增大约为时间为 1~3 d,无典型的形态学特征。近期研究发现 NB 在许多疾病的发生发展过程中起着重要的作用<sup>[6]</sup>,如关节炎、动脉粥样硬化、肿瘤及其他人体组织内病理性钙化和硬化等<sup>[7]</sup>。NB 在生理性钙磷浓度中就能在其周围形成矿化外壳,引起结石、钙化或在组织器官内同时可产生脂多糖成分,参与炎症过程,为参与多种疾病发生发展机制提供了可能<sup>[8]</sup>。肝病是我国常见病和多发病,有研究提示肝病的发展与 NB 相关<sup>[9]</sup>,笔者用 PCR 及 ELISA 检测肝病患者血中 NB,联合应用投射电镜扫描对 125 个肝病患者及健康对照 40 例进行检测,两种检测方法均提示肝病患者 NB 感染率高于健康人。目前用于 NB 检测的方法很多如细菌培养、免疫组化、免疫荧光检测、免疫抗体检测、电镜、钙染色等方法,而透射电子显微镜是最有效的方法之一,但以上各法均繁琐、费时、复杂<sup>[10]</sup>。将 NB 的 PCR 测定与 ELISA 法结果进行比较,两种检测方法阳性检出率无明显差异( $P > 0.05$ ),证明 PCR 可作为一种可靠的方法用于 NB 的检测。NB 感染机体组织和细胞,分泌钙化脂多糖生物膜,并在感染过程中,可出现炎症因子反应,导致凋亡<sup>[11]</sup>。肝病如慢性乙型肝炎、肝硬化和肝癌均是我国常见病和多发病,慢性乙型肝炎-肝硬化-肝癌的详细发生机制尚未明了,本研究证实部分慢性肝病、肝癌患者血清、组织中存在 NB 感染,慢性肝病血清中 NB 感染率高于健康人,相信如果 NB 的病因学理论能够确立,将为这些疾病的预防提供新的、有效的方法。

## 参 考 文 献

- [1] 赵家锋,叶观瑞.纳米细菌的生物学特性及其与疾病的关系[J].医学综述,2006,12(8):459-460.
- [2] Sheikh FA,Khullar M,Singh SK. Lithogenesis:induction of renal calcifications by nanobacteria[J]. Urol Res,2006,34(1):53-57.
- [3] 明爱民,张新际,郭君毅,等.纳米细菌感染致 SD 大鼠前列腺结石的实验研究[J].中华泌尿外科杂志,2011,32(2):122-125.
- [4] 王学军,杨竹林,文字,等.慢性肝病、原发性肝癌病人血清、肝组织纳米细菌的检测[J].中华肝胆外科杂志,2006,12(3):193-196.
- [5] 刘亚楠,王星伟,马立人.胆汁纳米细菌培养及鉴定[J].华北煤炭医学院学报,2011,13(3):312-314.
- [6] 区德明,廖贵清.“纳米细菌”与疾病的研究进展[J].微生物与感染,2008,3(3):182-184.
- [7] 刘长庚,范珍明.纳米细菌及其与人类疾病关系的研究进展[J].中国医师杂志,2008,10(2):284-286.
- [8] 史剑,吴丽娟,龙学德.纳米细菌与疾病及其研究进展[J].西南国防医药,2007,17(5):661-663.
- [9] 朱明利,娄国强,罗英,等.慢性肝病和肝癌患者血液中纳米细菌的检测[J].中国人兽共患病学报,2008,24(7):621-625,630.
- [10] 朱明利.纳米细菌及其检测方法研究进展[J].中国人兽共患病学报,2008,24(4):372-375.
- [11] 薛金雄,陈捷.纳米细菌在泌尿系疾病中的研究进展[J].临床医学工程,2011,18(12):1990-1991,1994.

(收稿日期:2013-05-07)