

• 综 述 •

PCR 技术鉴别肠结核病和克罗恩病的应用及进展^{*}

王 策, 刘 欢, 王 娜 综述, 张德新[△] 审校
(第四军医大学西京医院消化科, 西安 710032)

摘 要: 肠结核在临床表现、检验、影像、内镜、病理上与克罗恩病十分相似, 因此临床误诊率很高。然而二者治疗方法截然不同, 误诊可能导致严重后果。因此, 快速准确的鉴别两种疾病非常必要。PCR 作为一种较先进的分子生物学诊断方法, 具有快速、高效、准确等优点, 在鉴别 ITB 和 CD 的研究中受到广泛关注, 该文就 PCR 鉴别肠结核和克罗恩病的应用和进展做一综述。

关键词: 肠结核; 聚合酶链反应; 克罗恩病; 鉴别诊断; 进展

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2018.07.028

中图法分类号: R524

文章编号: 1673-4130(2018)07-0863-05

文献标识码: A

随着 HIV 的流行和大规模的人口迁移, 结核病表现出复苏趋势。据 WHO 报道, 2015 年全世界新发结核病数约为 1 040 万例, 我国属于新发结核病最多的六个国家之一, 肠结核(ITB)的发病率也随之升高。克罗恩病(CD)在临床上需要与 ITB 重点鉴别, 其患病率较前也增长了约 15.7 倍^[1]。ITB 和 CD 有着十分相似的临床、检验、影像和内镜下特点, 病理均表现为慢性肉芽肿性炎, 但治疗原则截然不同, 延迟诊断或误诊都可带来严重后果。将 CD 误诊为 ITB 而使用抗结核治疗, 使患者承受了无意义的不良反应, 而延误 ITB 的诊断会增加肠道狭窄、肠穿孔、感染性休克的风险。反之, 将 ITB 误诊为 CD 而进行了免疫抑制治疗, 则会导致严重后果甚至造成死亡。因此, 准确和快速地鉴别 ITB 和 CD 非常必要。聚合酶链式反应(PCR)具有快速、高效、准确等特点, 在肿瘤、遗传病和微生物检测中具有重要地位, 本文主要就 PCR 在鉴别 ITB 和 CD 的研究现况和进展作一综述。

1 结核杆菌 PCR(TB-PCR)检测基因

1.1 IS6110 IS 是一段可移动遗传单位, 它是一段反向互补的保守核苷酸序列, 在其正反末端拥有 28 bp 的反向互补片段, 在很多组织器官中都有表达, 可作为一个种属基因标志物用于病原体检测。从结核杆菌中分离发现的 IS6110 由 1 361 个核苷酸组成, 目前为止只在结核分枝杆菌中发现, 因此被作为诊断结核杆菌的探针^[2-3]。如今 TB-PCR 已广泛应用于肺、骨关节、中枢神经系统结核病等的诊断^[4-6]。那么 TB-PCR 在 ITB 和 CD 鉴别诊断中的价值如何? GAN 等^[7]进行了一项回顾性研究, 他们收集了 39 例 ITB 患者和 30 例 CD 患者的内镜活检组织, 并分别进行病理诊断和 TB-PCR 检测, 结果发现肠结核患者

PCR 的灵敏度为 64.1%(25/39), 而在 CD 患者中未检测出阳性结果, 且病理诊断为肉芽肿的 ITB 患者中, 其 PCR 阳性率为 71.4%(10/14), 无肉芽肿的 ITB 患者其 PCR 阳性率为 61.1%(11/18)。AMA-RAPURKAR 等^[8]在一项前瞻性研究中也得出, PCR 诊断 ITB 的灵敏度为 82.6%。上述研究均以 IS6110 为目的检测序列进行的 TB-PCR, 在临床研究中得到大量验证和认可, 是目前 TB-PCR 的主要检测目的片段。

1.2 MPB64 MPB64 是一种由结核分枝杆菌群在生长过程中分泌的特异性抗原^[9-10]。LEKHAK 等^[11]在结核性脑膜炎的研究中表明, MPB64 的编码序列作为结核的诊断性指标具有较高的灵敏度和特异度。SINGH 等^[12]收集了 81 个结核患者的淋巴结活检样本, 对这些样本分别以 IS6110 和 MPB64 为目标序列进行 TB-PCR 检测, 结果显示: IS6110 序列 TB-PCR 灵敏度为 69.1%(56/81), 而 MPB64 序列 TB-PCR 灵敏度为 48.2%(39/81), 当两种方法进行联合诊断, 灵敏度上升至 77.8%(63/81), 并且在 8.6%(7/81)的样本中, IS6110 序列检测结果阴性而 MPB64 序列阳性。因此作者提出, 增加一种检测序列可以降低假阴性结果, 尤其对于 IS6110 序列零拷贝的结核杆菌意义更大。JIN 等^[13]利用类似的方法对 ITB 和 CD 患者进行了诊断性研究, 他们采用商品化的试剂盒(A 试剂盒检测 IS6110 和 MPB64, B 试剂盒仅检测 IS6110)对 55 个 ITB 患者的结肠镜活检标本进行巢式 PCR 检测, 结果显示 A、B 试剂盒的灵敏度和特异度分别为 45.5%、88.1% 和 36.4%、100.0%, 而且在 29 例病理误诊为 CD 的样本中, 通过 A 试剂盒又检测出 10 例 ITB, 而 B 试剂盒仅检出 6 例。以上研究表

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81472779)。

[△] 通信作者, E-mail: dx66@163.com。

本文引用格式: 王策, 刘欢, 王娜, 等. PCR 技术鉴别肠结核病和克罗恩病的应用及进展[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(7): 863-867.

明 MPB64 可以作为鉴别诊断 ITB 和 CD 的标记物,并且联合 IS6110 可以提高诊断灵敏度。

1.3 FOXP3 mRNA FOXP3 是 T 调节细胞的内源性标记分子,其表达高低反应了 T 调节细胞的增殖情况。AHUJA 等^[14]进行了一项临床研究,他们对 ITB 和 CD 的肠组织进行基因表达分析发现,与 CD 相比,ITB 有 275 个基因上调和 186 个基因下调,他们还发现,FOXP3 mRNA 表达在 ITB 组、CD 组、对照组中存在明显差异,与 CD 组相比,FOXP3 mRNA 在 ITB 的肠组织中表达明显升高 $[(4.7 \pm 2.21) \text{ vs. } (1.48 \pm 0.31), P=0.016]$ 。ITB 和 CD 的发生是由于肠道黏膜对抗原或病原体过度或不当的免疫应答所导致。不同的是,ITB 的病原体是结核分枝杆菌,而 CD 的病原体或者抗原仍没有明确。T 调节细胞在建立和维持自身免疫耐受中起了重要作用,对许多非自身抗原的免疫反应也有调节作用。研究发现,T 调节细胞能够控制由病原体感染引起的免疫反应,尤其是对于易引起慢性感染的病原体。还有研究表明,在活动性肺结核的患者中,其血液和感染部位的 T 调节细胞增多^[15-16],而一些自身免疫性疾病如 CD,其 T 调节细胞减少^[17]。综上所述,FOXP3 表达情况可以反应 T 调节细胞的增殖情况,而 T 调节细胞在两种疾病中存在明显差异,因此可以推断,FOXP3 在鉴别 ITB 和 CD 或许可以成为一种新的诊断标记物。但 AHUJA 等^[14]的研究受样本量限制,仅纳入了 13 个样本,FOXP3 鉴别 ITB 和 CD 的意义如何,有待于更多临床研究评估。

2 PCR 技术及进展

2.1 常规 PCR PCR 是一种选择性体外扩增 DNA 或 RNA 片段的方法,其最早由美国 Cetus 公司的 Mullis 小组研发,经过 30 多年的发展,该技术已经广泛应用于医疗卫生领域。其基本原理为以拟扩增的 DNA 分子为模板,以一对分别与模板互补的寡核苷酸片段为引物,在 DNA 聚合酶的作用下,按照半保留复制的原理沿着模板链延伸,直至完成新的 DNA 合成。通过不断重复这一过程,可以使目的 DNA 片段得到扩增。国内用于诊断结核的 PCR 主要为常规 PCR,用于诊断 ITB 的研究表明其灵敏度差异较大,从 32% 至 75% 不等^[18-19],这可能与检测过程及样本收集的人为因素有关,但另一方面,常规 PCR 存在诸多不足,如非特异性扩增、引物二聚体形成、电泳法鉴别扩增产物易引起 PCR 产物交叉污染等,这些均可能是 TB-PCR 诊断 ITB 灵敏度差别较大的原因。

2.2 荧光定量 PCR 荧光定量 PCR 是在 PCR 体系中,引入荧光基团,通过荧光信号可以实时监测 PCR 扩增进程,能对标本中的起始 DNA 进行定量,从而提高检测的灵敏度。顾清等^[20]采用荧光定量 PCR 的方法,对 36 例 ITB 患者的内镜活检标本进行检测,结果显示荧光定量 PCR 诊断肠结核的灵敏度和特异度分

别为 63.89% 和 83.33%。FEI 等^[21]用荧光定量 PCR 对 ITB 和 CD 患者的肠道活检标本进行结核杆菌检测,结果在 29 例 ITB 患者中检测出 16 例,而在 36 例 CD 患者中也检测出 2 例,其灵敏度和特异度分别是 55.17% 和 94.44%。荧光定量 PCR 省略了电泳的步骤,在密闭的条件下进行,减少了污染,与传统 PCR 相比,其灵敏度和特异度均较常规 PCR 更高。

2.3 Multiplex PCR Multiplex PCR 是在同一个 PCR 体系里加入两对以上引物,同时扩增后得到多个核酸片段的 PCR 反应,具有高效、系统、经济等特点,可同时对多种微生物进行鉴定,也可以对某种微生物进行分型。在 ITB 的诊断中,HALLUR 等^[22]用 16S rRNA、IS6110、devR 设计了对腹部结核检测的 multiplex PCR,他们纳入的 183 个患者中有 40 例 ITB 和 37 例结核性腹膜炎,Multiplex PCR 显示出很高的灵敏度和特异度,尤其在 ITB 的诊断中联合病理结果的灵敏度可以达到 97.5%。RAJ 等^[23]经筛选后以 MBP64 和 IS6110 为引物设计的 Multiplex PCR,对肺外结核的诊断灵敏度高达 96%,特异度 100%。Multiplex PCR 是对传统 PCR 方法的补充,具有较高的灵敏度和特异度,在 ITB 和 CD 的鉴别诊断中具有重要价值,但在临床应用时,要选用恰当的检测基因序列,同时在评估检测结果时要结合临床及其他检查结果综合考虑,尽可能避免误诊或漏诊。

2.4 GeneXpert 技术 由美国 Cepheid 公司开发的全自动病原体快速检测系统,可以全自动对样品进行核酸提取、纯化及浓缩,并在 GeneXpert 的反应盒中完成扩增与检测的技术。整个过程都在密闭环境中进行,手动时间短,不超过 5 min,对操作者和周围环境安全。GeneXpert 技术从样本制备、核酸提取、目的片段扩增、结果分析等均为全自动过程,大大减少了繁琐的操作步骤,提高了检测效率,更重要的是很大程度上减少了人员操作导致的误差。KUMAR 等^[24]用基于 GeneXpert 技术的 Xpert MTB/RIF 实验对含有 37 例 ITB 和 43 例 CD 的患者进行前瞻性研究,评价其在腹部结核的诊断价值,结果发现,Xpert MTB/RIF 实验诊断 ITB 的灵敏度、特异度分别为 8.0% 和 100.0%,虽然在这项实验中诊断 ITB 的灵敏度较低,但特异度可到达 100.0%,作者认为在结核流行地域,对于难以鉴别的 ITB 和 CD,该实验仍有意义。梅玫等^[25]在研究中得出 Xpert MTB/RIF 实验诊断 ITB 的灵敏度、特异度分别为 59.4% 和 100.0%。Xpert MTB/RIF 实验能同时进行利福平耐药基因检测,可以指导后续抗结核治疗方案,具有很好的临床应用前景。

3 核酸样本来源

3.1 内镜活检组织 活检组织样本来源对 TB-PCR 实验准确性的影响意义较大,包括是否为手术样本或内镜活检样本,是否为新鲜样本或石蜡包埋样本。因

结核分枝杆菌不一定在病变的肠黏膜表面,因此内镜表浅、小范围的取材可能导致 TB-PCR 灵敏度不高,而手术病理标本取材则不存在上述问题。另一方面新鲜样本核酸未分解或分解破坏少,而石蜡标本在提取核酸的过程中破坏较多,降低了 TB-PCR 的灵敏度。目前临床上常用消化道内镜取活检样本提取核酸进行 TB-PCR 检测,其优点是在一次检查过程中可以同时进行内镜诊断、病理诊断和活检组织 TB-PCR 检测及抗酸染色等多种检查,有助于肠结核的综合诊断。但因活检组织的上述差异,国内外研究中采用内镜活检标本进行的 TB-PCR 灵敏度差异较大,解决的办法是尽量多点取样、使用手术标本和新鲜标本提取核酸,而后进行 TB-PCR 检测。

3.2 粪便样本 通过商品化的试剂盒从粪便中提取 DNA 进行核酸分析,继而诊断细菌等病原体的方法已经用于诸多临床研究^[26-27]。FEI 等^[21]收集了 86 例初诊 ITB 或 CD 的患者的 200 g 大便和内镜活检标本分别提取核酸,以 IS6110 为检测序列进行 TB-PCR 试验,在确诊的 29 例 ITB 及 36 例 CD 患者中,大便样本 PCR 的灵敏度、特异度分别是 82.8% (95%CI: 65.45%~92.4%), 91.7% (95%CI: 78.2%~97.1%); 活检组织 PCR 为 55.2% (95%CI: 37.6%~71.6%), 94.4% (95%CI: 81.9%~98.5%)。RAMADASS 等^[28]及 SEKINE 等^[29]在各自的研究中显示:粪便及内镜组织活检提取 DNA 鉴别 ITB 和 CD 的灵敏度、特异度分别为 79% (95%CI: 57%~92%), 88% (95%CI: 75%~96%); 23% (95%CI: 5.0%~54%), 100% (95%CI: 72%~100%)。以上各自研究中显示,粪便样本较传统内镜活检样本的 TB-PCR 灵敏度更高,而特异度差别不大。这也许是由于粪便提取的核酸样本理论上来自整个肠道的结核杆菌。并且,相较于内镜活检样本,粪便样本收集方便,是一种非侵入性检测,减轻患者经济负担和痛苦,更容易被患者选择接受,很有临床应用前景。

3.3 内镜肠道抽吸液 NAGATA 等^[30]收集了患者的活检和肠道抽吸液样本进行检测,用以区分感染性和非感染性结肠炎。结果显示,在 ITB 患者中,内镜活检样本的 TB-PCR 灵敏度为 63.3%,而肠道抽吸液为 20%。SEKINE 等^[29]也对比了肠镜活检组织、粪便、肠道抽吸液的 TB-PCR 结果,其诊断 ITB 的灵敏度分别为 25%、23%、35%。可以看出,肠道抽吸液以内镜抽吸液进行 TB-PCR 检测的灵敏度不高,这可能是由于患者在行结肠镜检查前均要求进行肠道准备,会影响核酸物质的提取。另一方面,从肠道抽吸液作为核酸提取的样本来源进行 TB-PCR 检测实验,在 ITB 和 CD 鉴别诊断的临床研究中并不多见,缺乏大样本研究,其诊断价值有待进一步评价。

4 小 结

现阶段没有明确指标可用于确定 CD 的诊断,鉴

别 ITB 和 CD 的可靠办法是寻找患者是否有结核杆菌感染的证据。目前,有很多方法可以诊断 ITB,比如结核菌素皮肤试验(TST)、抗酸染色、结核杆菌培养、T-spot 等,但这些检测手段都有一定局限性,比如,TST 假阳性率高,抗酸染色实验灵敏度低,组织结核杆菌培养耗时太长,通常约需 4~8 周,且结果往往准确度不高(25%~35%)^[8],T-spot 不能鉴别潜在感染和活性感染^[31],部分限制了 T-spot 的应用。临床上对于易混淆的疾病,往往进行诊断性抗结核治疗,在临床或内镜表现有改善后明确诊断^[32]。也有研究者对临床指标进行综合分析,通过建立回归方程得出参数值进行鉴别诊断^[33],但大多研究没有包含所有鉴别项目,或研究结果显示诊断特异度不高,因此未能在临床上广泛应用。与上述方法相比,TB-PCR 是一种直接检测结核杆菌的病原学诊断方法,相较于 TST 和 T-spot 而言,其样本直接来源于病变的肠道黏膜,对病变部位的定位诊断具有一定意义。TB-PCR 作为一种分子生物学诊断方法,具有快速、高效、准确等优点,因此在鉴别 ITB 和 CD 的研究中受到广泛关注,具有很好的研究价值和应用前景。但因为部分结核分枝杆菌没有 IS6110 序列而造成结果出现假阴性^[34],或肠镜取材样本量少且部位表浅、PCR 方法滞后等原因造成检测结果差异较大。因此,发现新的检测序列、开发新的 PCR 技术、采取不同的组织标本等是提高检测准确性的一些方向,现在已经有了些研究和进展,但需进一步验证和改进的地方仍有很多,需要研究人员和临床工作者的共同努力。

参考文献

- [1] OUYANG Q, XUE L Y. Inflammatory bowel disease in the 21(st) century in China: turning challenges into opportunities[J]. J Dig Dis, 2012, 13(4): 195-199.
- [2] THIERRY D, CAVE M D, EISENACH K D, et al. IS6110, an IS-like element of Mycobacterium tuberculosis complex[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(1): 188.
- [3] BALAMURUGAN R, VENKATARAMAN S, JOHN K R, et al. PCR amplification of the IS6110 insertion element of Mycobacterium tuberculosis in fecal samples from patients with intestinal tuberculosis[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(5): 1884-1886.
- [4] TANG Y, YIN L, TANG S, et al. Application of molecular, microbiological, and immunological tests for the diagnosis of bone and joint tuberculosis[J]. J Clin Lab Anal, 2018, 32(2): 22260.
- [5] MANKE S D, HUSAIN A A, DAGINAWALA H F, et al. Comparative diagnostic utility of IS6110 PCR assay in CSF and peripheral blood samples of tuberculous meningitis patients; a pilot study from central India[J]. J Clin Diagn Res, 2017, 11(4): BC13-17.
- [6] MARANGU D, DEVINE B, JOHN-STEWART G. Diagnostic accuracy of nucleic acid amplification tests in urine

- for pulmonary tuberculosis: a meta-analysis[J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2015, 19(11): 1339-1347.
- [7] GAN H T, CHEN Y Q, OUYANG Q, et al. Differentiation between intestinal tuberculosis and Crohn's disease in endoscopic biopsy specimens by polymerase chain reaction [J]. *Am J Gastroenterol*, 2002, 97(6): 1446-1451.
- [8] AMARAPURKAR D N, PATEL N D, RANE P S. Diagnosis of crohn's disease in India where tuberculosis is widely prevalent[J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(5): 741-746.
- [9] WIKER H G, NAGAI S, HARBOE M, et al. A family of cross-reacting proteins secreted by *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Scand J Immunol*, 1992, 36(2): 307-319.
- [10] NAKAMURA R M, VELMONTE M A, KAWAJIRI K, et al. MPB64 mycobacterial antigen: a new skin-test reagent through patch method for rapid diagnosis of active tuberculosis[J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 1998, 2(7): 541-546.
- [11] LEKHAK S P, SHARMA L, RAJBHANDARI R, et al. Evaluation of multiplex PCR using MPB64 and IS6110 primers for rapid diagnosis of tuberculous meningitis[J]. *Tuberculosis (Edinb)*, 2016, 100: 1-4.
- [12] SINGH H B, SINGH P, JADAUN G P, et al. Simultaneous use of two PCR systems targeting IS6110 and MPB64 for confirmation of diagnosis of tuberculous lymphadenitis[J]. *J Commun Dis*, 2006, 38(3): 274-279.
- [13] JIN X J, KIM J M, KIM H K, et al. Histopathology and TB-PCR kit analysis in differentiating the diagnosis of intestinal tuberculosis and Crohn's disease [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(20): 2496-2503.
- [14] AHUJA V, SUBODH S, TUTEJA A, et al. Genome-wide gene expression analysis for target genes to differentiate patients with intestinal tuberculosis and Crohn's disease and discriminative value of FOXP3 mRNA expression [J]. *Gastroenterol Rep (Oxf)*, 2015, 4(1): 59-67.
- [15] RIBEIRO-RODRIGUES R, RESENDE CO T, ROJAS R, et al. A role for CD4⁺ CD25⁺ T cells in regulation of the immune response during human tuberculosis[J]. *Clin Exp Immunol*, 2006, 144(1): 25-34.
- [16] GUYOT-REVOL V, INNES J A, HACKFORTH S, et al. Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006, 173(7): 803-810.
- [17] SARUTA M, YU Q T, FLESHNER P R, et al. Characterization of FOXP3⁺ CD4⁺ regulatory T cells in Crohn's disease[J]. *Clin Immunol*, 2007, 125(3): 281-290.
- [18] 陈瑜君, 何瑶, 陈白莉, 等. PCR 法检测结核分枝杆菌 DNA 在鉴别克罗恩病与肠结核中的价值[J]. *中国病理生理杂志*, 2013, 29(1): 188-192.
- [19] 甘华田, 欧阳钦, 步宏, 等. 聚合酶链反应对肠结核和克隆病的诊断价值[J]. *中华内科杂志*, 1995, 84(1): 30-33.
- [20] 顾清, 欧阳钦, 夏庆杰. FQ-PCR 检测肠黏膜结核杆菌 DNA 对肠结核的诊断价值[J]. *中国实验诊断学*, 2009, 13(6): 741-744.
- [21] FEI B Y, LV H X, ZHENG W H. Fluorescent quantitative PCR of *Mycobacterium tuberculosis* for differentiating intestinal tuberculosis from Crohn's disease[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2014, 47(2): 166-170.
- [22] HALLUR V, SHARMA M, SETHI S, et al. Development and evaluation of multiplex PCR in rapid diagnosis of abdominal tuberculosis [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2013, 76(1): 51-55.
- [23] RAJ A, SINGH N, GUPTA K B, et al. Comparative evaluation of several gene targets for designing a Multiplex-PCR for an early diagnosis of extrapulmonary tuberculosis[J]. *Yonsei Med J*, 2016, 57(1): 88-96.
- [24] KUMAR S, BOPANNA S, KEDIA S, et al. Evaluation of xpert MTB/RIF assay performance in the diagnosis of abdominal tuberculosis [J]. *Intest Res*, 2017, 15(2): 187-194.
- [25] 梅玫, 罗雁, 刘会领. XpertMTB/RIF 检测在肠结核快速诊断中的应用观察[J]. *实用医学杂志*, 2016, 32(18): 3073-3075.
- [26] FOCK-CHOW-THO D, TOPP E, IBEAGHA-AWEMU E A, et al. Comparison of commercial DNA extraction kits and quantitative PCR systems for better sensitivity in detecting the causative agent of paratuberculosis in dairy cow fecal samples [J]. *J Dairy Sci*, 2017, 100(1): 572-581.
- [27] ZEBARDAST N, YEGANEH F, GHARAVI M J, et al. Simultaneous detection and differentiation of *Entamoeba histolytica*, *E. dispar*, *E. moshkovskii*, *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium* spp. in human fecal samples using multiplex PCR and qPCR-MCA [J]. *Acta Trop*, 2016, 162: 233-238.
- [28] RAMADASS B, CHITTARANJAN S, SUBRAMANIAN V, et al. Fecal polymerase chain reaction for *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 to distinguish Crohn's disease from intestinal tuberculosis [J]. *Indian J Gastroenterol*, 2010, 29(4): 152-156.
- [29] SEKINE K, NAGATA N, SHINDO T, et al. Combined identifying granuloma and biopsy culture is useful for diagnosing intestinal tuberculosis [J]. *Int J Colorectal Dis*, 2015, 30(7): 939-945.
- [30] NAGATA N, SHIMBO T, SEKINE K, et al. Combined endoscopy, aspiration, and biopsy analysis for identifying infectious colitis in patients with ileocecal ulcers [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2013, 11(6): 673-680.
- [31] PAI M, O'BRIEN R. New diagnostics for latent and active tuberculosis: state of the art and future prospects [J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2008, 29(5): 560-568.
- [32] PRATAP MOULI V, MUNOT K, ANANTHAKRISHNAN A, et al. Endoscopic and clinical responses to anti-tubercular therapy can differentiate intestinal tuberculosis from Crohn's disease [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2017, 45(1): 27-36.
- [33] ZHANG T, FAN R, WANG Z, et al. Differential diagnosis between Crohn's disease and intestinal tuberculosis u-

sing integrated parameters including clinical manifestations, T-SPOT, endoscopy and CT enterography[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(10):17578-17589.

[34] VAN SOOLINGEN D, DE HAAS P E, HERMANS P W, et al. Comparison of various repetitive DNA elements

as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. J Clin Microbiol, 1993, 31(8):1987-1995.

(收稿日期:2017-09-12 修回日期:2017-11-12)

• 综 述 •

MRSA 的分子生物学检测方法研究进展*

谢 跃¹综述, 魏莲花^{2△}审校

(1. 甘肃中医药大学, 兰州 730000; 2. 甘肃省人民医院, 兰州 730000)

摘 要:耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)是引起院内感染和社区感染的重要病原菌之一。由于 MRSA 感染的治疗选择有限, 且传播速度较快, 暴发流行的概率较高, 现已成为一个全球性的难题, 因此, 使临床医生在第一时间获得 MRSA 感染的准确信息, 对疾病的及时治疗有着重要意义。目前, 关于 MRSA 的分子生物学检测方法的研究热点主要集中在高效可靠、成本低廉、简单易行 3 个方面, 本文就近年来 MRSA 的分子生物学检测方法的研究现状及发展趋势作一综述。

关键词:MRSA; 分子生物学; 核酸杂交; PCR; 等温扩增

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.07.029

中图法分类号:R378.11

文章编号:1673-4130(2018)07-0867-04

文献标识码:A

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)自二十世纪六十年代被发现以来, 在世界范围内大范围快速传播, 防控形势严峻, 特别是其多重耐药性给临床治疗带来极大困难^[1], 包括医院获得性(HA)-MRSA 和社区获得性(CA)-MRSA 的持续出现, 使其对公众健康的威胁日益增加。因此, 在 MRSA 的基因结构已被阐明的基础之上, 利用分子生物学技术早期、快速、敏感、特异地检测病原体核酸, 筛出耐药菌株, 对于临床抗菌药物的合理使用、减少耐药甚至是多重耐药菌株的产生和传播具有决定性指导意义^[2-3]。本文现对近年来 MRSA 的分子生物学检验方法中的核酸杂交技术、PCR 技术、等温扩增技术的研究进展介绍如下。

1 核酸杂交技术

1.1 传统核酸杂交技术 已有研究显示, *mecA* 是 MRSA 的耐药决定基因, 只存在于葡萄球菌中, 编码与 β -内酰胺类抗菌药物亲和力极低的青霉素结合蛋白 2a(PBP2a), 促进细菌胞壁合成而耐药; *femA* 是甲氧西林耐药的辅助基因, 它只存在于金黄色葡萄球菌。因此, *femA* 和 *mecA* 基因联合扩增早在 90 年代已成功用于检测 MRSA。随后, 据此设计了针对 *mecA* 与 *femA* 的放射性核素、荧光素或酶标记的 DNA 探针用于检测鉴定 MRSA。传统核酸杂交技术有菌落原位杂交、荧光原位杂交等。KIPP 等^[4]通过 16S rRNA 定向原位杂交技术从 1 例 45 岁脑病患者的组织样本和脓液中鉴定出了致病性的 MRSA 变异

体, 随后联合用药成功对该患者进行了治疗。OLIVEIRA 等^[5]运用肽核酸荧光原位杂交(PNA-FISH)直接从包含革兰阳性球菌群(GPCC)的阳性血液培养瓶中鉴定金黄色葡萄球菌, 这一方法基于荧光标记的 DNA 探针, 其靶向金黄色葡萄球菌的 16S rRNA 的物种特异性序列, 用 17 种参考菌株和 48 种临床分离株(包括甲氧西林抗性和甲氧西林敏感的金黄色葡萄球菌菌种、凝固酶阴性葡萄球菌菌种和其他临床相关的与系统发育相关的细菌和酵母菌种)进行的评价显示, 该测定具有 100% 的灵敏度、96% 特异度; 在含有 87 个 GPCC 血培养阳性标本的临床试验中, 从 37 个通过标准微生物学方法鉴定为金黄色葡萄球菌的阳性培养物中鉴定出 36 个, 阳性和阴性预测值分别为 100% 和 98%。但也应该指出, 传统核酸杂交技术也存在操作繁杂、自动化程度低、操作序列数量少、检测效率低等不足。

1.2 基因芯片技术 基因芯片技术代表了近年来分子生物学技术的最新发展趋势。该技术系指将大量探针分子固定于支持物上后, 与带荧光标记的 DNA 或其他生物分子(例如蛋白或小分子)进行杂交, 通过检测各个探针分子的杂交信号强度, 进而获取样本分子的数量及序列信息。MONECKE 等^[6]将 DNA 芯片用于研究从牛分离的金黄色葡萄球菌中的 144 种不同的靶标基因, 包括抗性基因和编码外毒素的基因, 测试了来自德国和瑞士的 128 种分离株, 从中检

* 基金项目: 甘肃省卫生行业科研计划(GSWST2012-04)。

△ 通信作者, E-mail: weilianhua0199@sina.com。

本文引用格式: 谢跃, 魏莲花. MRSA 的分子生物学检测方法研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(7): 867-870.