

## 布鲁杆菌性脊柱炎术后组织病理与多重PCR检测阳性率分析

张耀 陈佳敏 李慢 张强 赵昌松 何杰 马睿

**【摘要】目的** 分析布鲁杆菌性脊柱炎术后不同组织布鲁杆菌病理阳性率和多重PCR检测阳性率差异。**方法** 2018年11月至2019年12月,首都医科大学附属北京地坛医院骨科收治的22例行手术治疗的布鲁杆菌性脊柱炎患者,其中手术部位为颈椎1例、胸椎2例、胸腰椎3例、腰椎16例,其中19例行胸腰椎后路病灶清除、减压、内固定、植骨融合术,1例行颈椎前路病灶清除、减压、内固定、植骨融合术,2例患者行椎间孔镜下病灶清除术,术中收集病灶区不同组织标本(髓核、软组终板、黄韧带、纤维环等),采用Gimesa染色等进行布鲁杆菌病理学观察,同时对各组织标本行布鲁杆菌多重PCR检测,使用Fisher's精确检验对布鲁杆菌病理阳性率和多重PCR阳性率进行对比。**结果** Gimesa染色发现病灶区任一部位组织标本中存在布鲁杆菌则认定为病理结果阳性,否则为阴性。多重PCR检测发现病灶区任一部位组织标本中存在任何一种属的布鲁杆菌DNA则认定为PCR结果阳性,否则为阴性。22例患者中,多重PCR检测阳性率90.9% (20/22) 高于Gimesa染色阳性率[81.8% (18/22)],但差异无统计学意义( $P=0.664$ )。73份组织标本中,多重PCR检测阳性率[43.8% (32/73)]高于Gimesa染色阳性率[32.9% (24/73)],但差异无统计学意义( $P=0.173$ )。其中,22份髓核的多重PCR检测阳性率[86.4% (20/22)]高于Gimesa染色阳性率[72.7% (16/22)],但差异无统计学意义( $P=0.240$ );21份软骨终板的多重PCR检测阳性率[38.1% (8/21)]高于Gimesa染色阳性率[23.8% (5/21)],但差异无统计学意义( $P=0.505$ );19份黄韧带的多重PCR检测阳性率[10.5% (2/19)]与Gimesa染色阳性率[10.5% (2/19)]相同;11份纤维环的多重PCR检测阳性率[18.2% (2/11)]高于Gimesa染色阳性率[9.1% (1/11)],但差异无统计学意义( $P=1.000$ )。但髓核Gimesa染色阳性率和多重PCR检测阳性率高于其他部位组织标本阳性率,差异均具有统计学意义( $P$ 均 $<0.001$ )。**结论** 多重PCR检测可以作为布鲁杆菌性脊柱炎的有效检测手段,其敏感性和准确率高,尤其适用于术前诊断不清和术后病理结果为阴性的患者。同时布鲁杆菌多存在于髓核部位,术中清理和收集过程中应重点处理。

**【关键词】** 布鲁杆菌性脊柱炎;病理;多重聚合酶链式反应

**Comparative analysis of positive rates of histopathology and multiple polymerase chain reaction detection in surgery of Brucellosis spondylitis** Zhang Yao, Chen Jiamin, Li Man, Zhang Qiang, Zhao Changsong, He Jie, Ma Rui. Department of Orthopedics and Pathology, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China

Corresponding author: Zhang Qiang, Email: zhangqwte@sina.com

**【Abstract】Objective** To compare the positive rates of histopathology and multiple polymerase chain reaction (PCR) detection in different tissue specimens in surgery of brucellosis spondylitis. **Methods** From November 2018 to December 2019, 22 patients with brucellosis spondylitis underwent surgical treatment in Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, whose surgical sites were cervical spine (1 case), thoracic spine (2 cases), thoracolumbar spine (3 cases) and lumbar spine (16 cases); and 19 patients underwent posterior thoracolumbar debridement, decompression, internal fixation, bone graft fusion, 1 patient underwent cervical anterior debridement, decompression, internal fixation, bone graft fusion, 2 patients underwent foraminal debridement. Different tissue specimens (nucleus pulposus, soft endplate, ligamentum flavum, annulus fibrosus, etc.) were collected for Gimesa staining during the operation. While multiple PCR was performed on the tissue specimens, and the positive rates of both methods were comparatively analyzed by Fisher's exact test. **Results**

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2021.06.009

基金项目:北京市中西医结合研究所建设项目;首都医科大学附属北京地坛医院内科研基金“桥梁计划”项目(No. DTQL201803)

作者单位:100015 北京,首都医科大学附属北京地坛医院骨科

通信作者:张强, Email: zhangqwte@sina.com

Among the 22 patients, the positive rate of multiplex PCR was 90.9% (20/22), which was higher than Gimesa staining [81.8% (18/22)], but without significant difference ( $P = 0.664$ ). Among the 73 tissue samples, the positive rate of multiplex PCR was 43.8% (32/73), which was higher than that of Gimesa staining [32.9% (24/73)], but without significant difference ( $P = 0.173$ ). There were 22 samples of nucleus pulposus, and the positive rate of multiple PCR detection was 86.4% (20/22), which was higher than that of Gimesa staining [72.7% (16/22)], but without significant difference ( $P = 0.240$ ). Among the 21 cartilage endplates, the positive rate of multiple PCR detection was 38.1% (8/21), which was higher than that of Gimesa staining [23.8% (5/21)], but without significant difference ( $P = 0.505$ ). Among the 19 pieces of ligamentum flavum, the positive rate of multiple PCR was 10.5% (2/19), which was the same as Gimesa staining (2/19). Among the 11 pieces of annulus fibrosus, the positive rate of multiplex PCR was 18.2% (2/11), which was higher than that of Gimesa staining [9.1% (1/11)], but without significant difference ( $P = 1.000$ ). However, the positive rates of both Gimesa staining and multiplex PCR from nucleus pulposus were significantly higher than those of other tissue samples, with significant difference ( $P < 0.001$ ). **Conclusions** Multiplex PCR detection can be used as effective detection method for brucellosis spondylitis, with high sensitivity and accuracy, especially for patients with unclear preoperative diagnosis and negative postoperative pathological observation. Brucella mostly resides in the nucleus pulposus, which should be dealt with in the process of cleaning and collecting during operation.

**【Key words】** Brucellosis spondylitis; Pathology; Multiplex polymerase chain reaction

布鲁杆菌性脊柱炎 (brucellosis spondylitis, BS) 是布鲁杆菌通过侵犯脊柱而引起的脊柱炎, 在布鲁杆菌病中的发病率为6%~58%<sup>[1-2]</sup>, 其中以腰椎好发, 多为L4~5, 其次为胸椎、颈椎和腰骶部<sup>[3-4]</sup>。近年来, 布鲁杆菌性脊柱炎的发病率逐渐增高, 因人们直接或间接接触被感染的牛、羊等动物, 并且该类报道不断增多<sup>[5]</sup>。临床工作中布鲁杆菌性脊柱炎很容易与脊柱结核、化脓性脊柱炎等脊柱感染相混杂, 因此易被误诊和误治<sup>[6]</sup>。尽管目前公认的诊断布鲁杆菌病的金标准是血培养等细菌学检测, 但因检测时间较长、阳性率较低、并且在整个检测过程当中存在感染等风险, 因此大大影响其临床应用。现阶段, 国内诊断布鲁杆菌病的关键方法依然是血清学检测, 但常出现假阳性和假阴性。随着分子生物学的不断发展, 应用聚合酶链式反应技术 (polymerase chain reaction, PCR) 检测布鲁杆菌核酸DNA, 有可能实现对布鲁杆菌病的快速、准确诊断<sup>[7]</sup>。目前, 对布鲁杆菌性脊柱炎的诊断及治疗尚未达成共识, 本研究对比分析各部位组织样本布鲁杆菌病理阳性率和多重PCR检测阳性率, 旨在为布鲁杆菌性脊柱炎的诊断和治疗提供帮助, 报道如下。

## 资料与方法

### 一、样本来源

回顾性分析2018年11月至2019年12月于首都医科大学附属北京地坛医院骨科行手术治疗的22例布鲁杆菌性脊柱炎患者的临床资料。临床主要表现为颈部、胸腰背部疼痛, 颈椎或胸腰椎活动受限, 部分伴有发热、出汗等症状, 其中存在神经症状者12例。所有患者术前均行X线、计算机X线断层扫描 (computed tomography, CT) 及磁共振成像 (magnetic resonance imaging, MRI) 等影像学检查及血常规、红细胞

沉降率 (erythrocyte sedimentation rate, ESR)、C-反应蛋白 (C-reaction protein, CRP)、虎红平板凝集试验等实验室检查。16例患者有不同程度牛、羊或其生鲜制品等接触史, 6例患者无明确病原接触史。22例患者均通过流行病学史、临床表现、体征、影像学、实验室结果及术后组织病理或PCR而确诊为布鲁杆菌性脊柱炎、慢性布鲁杆菌病<sup>[8-11]</sup>。

22例患者常规采用本院抗布鲁杆菌病方案 (多西环素 + 利福平 + 左氧氟沙星 + 头孢噻肟钠或头孢曲松钠) 治疗2~3个疗程后, 全身症状好转但局部症状无明显好转, 与此同时符合开放手术或微创手术适应证<sup>[12]</sup>。其中20例患者符合开放手术适应证<sup>[9, 13-16]</sup>: ①经药物治疗颈部、胸腰背疼痛得不到缓解, 甚至出现顽固性疼痛; ②椎管内硬膜外脓肿或坏死组织挤压脊髓或神经, 造成神经损坏; ③椎旁脓肿较大, 吸收困难; ④椎体骨破坏区域 > 1 cm 或关节突受损造成脊柱失稳; ⑤发生病理性骨折; 2例患者符合微创手术适应证<sup>[14-15, 17-18]</sup>: 单纯椎间组织病变或椎旁脓肿, 未造成脊柱失稳。

术中收集病灶区不同部位组织标本 (髓核、软终板、黄韧带、纤维环等), 采用Gimesa染色、苏木精-伊红 (Hematoxylin-Eosin, HE) 染色、抗酸染色、碘酸雪夫 (periodic acid schiff, PAS) 染色、六胺银染色、革兰染色等进行组织病理学观察, 同时对各部位组织标本行布鲁杆菌多重PCR检测, 对布鲁杆菌病理阳性率和多重PCR检测阳性率进行分析。

### 二、主要试剂及仪器

Gimesa染色、HE染色、抗酸染色、PAS染色、六胺银染色、革兰染色等染色液均购于北京益利精细化学品有限公司; Multiplex PCR Assay Kit购于上海之江生物科技股份有限公司; GeneRead™ DNA FFPE Kit购于QIAGEN公司; PCR仪采用SLAN-96P购于上海宏石医疗科技有限公司,

NanoDrop 2000购自ThermoFisher公司。

### 三、组织病理染色

所有病变组织样本切取后用磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer solution, PBS) 洗3次, 10%中性甲醛固定24 h, 按照常规石蜡切片程序处理, 4 μm厚度切片。然后按照染色试剂盒的说明书分别行Gimesa染色、HE染色、抗酸染色、PAS染色、六胺银染色、革兰染色, 中性树脂封片, 于光学显微镜下观察各部位组织标本病理改变和布鲁杆菌分布。Gimesa染色油镜下观察布鲁杆菌为短紫色短杆菌, 病理学发现病灶区任一部位组织标本存在布鲁杆菌则认定为病理结果阳性, 否则为阴性。

### 四、多重PCR检测

采用多重PCR检测并鉴定布鲁杆菌种属, 按照GeneRead™ DNA FFPE Kit试剂盒说明提取石蜡组织DNA, NanoDrop 2000测量所提取DNA的浓度和纯度, 引物信息见表1。PCR反应体系为: Multiplex PCR Mix 35 μl, 内参1 μl, 模板4 μl。反应条件为: 94 °C预变性5 min; 94 °C变性20 s, 60 °C退火40 s, 40个循环。多重PCR检测发现病灶区任一部位组织标本中存在任何种属的布鲁杆菌DNA则认定为

PCR结果阳性, 否则为阴性。

### 五、统计学处理

应用SPSS 25.0软件进行统计学分析。计量资料如红细胞沉降率呈正态分布, 采用 $\bar{x} \pm s$ 表示; 非正态分布资料如患者年龄、CRP, 则采用中位数(四分位数) [M (P25, P75)] 表示。不同组织的Gimesa染色及多重PCR检测阳性率等为计数资料, 使用Fisher's确切概率法检验比较不同组织、不同检测方法阳性率差异。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

## 结 果

### 一、患者一般资料

22例行手术治疗的布鲁杆菌性脊柱炎患者中男性13例, 女性9例, 年龄为[59 (48, 64)]岁。其中20例患者术前虎红平板凝集试验阳性, 占90.9% (20/22); 22例患者CRP水平为15.60 (5.98, 41.85) mg/L, 其中18例CRP升高 (5.8~142.6 mg/L); 22例患者ESR为 (42.55 ± 26.92) mm/h, 其中18例ESR升高 (21~104 mm/h)。病变部位: 颈椎1例, 胸椎2例, 胸腰椎3例, 腰椎16例。手术方式: 19例行胸腰椎后路病灶清除、减

表1 布鲁杆菌各种属基因扩增引物 (5'→3')

目标序列	正向引物	反向引物
<i>B. melitensis</i>	TCGCATCGGCAGTTTCAA	CCAGCTTTTGGCCTTTTCC
<i>B. abortus</i>	GCACACTCACCTTCCACAACAA	CCCCGTTCTGCACCAGACT
<i>B. suis</i>	CCTGCAAAAAGCAGCAACCA	CCTCCGCCAGTCGTGAAA
<i>B. canis</i>	AAAATGCGGATCGGCCTT	TCCCGGCCGATTGCT

表2 22例布鲁杆菌性脊柱炎患者的一般资料

患者编号	性别	年龄 (岁)	流行病史	累及椎体	CRP (mg/L)	ESR (mm/h)	虎红平板凝集试验
1	女	64	有	L4~5、L5~S1	36.4	31.0	(+)
2	男	39	有	T12~L1、L4~5	15.3	44.0	(+)
3	男	53	无	L1~2、L5~S1	29.7	9.0	(+)
4	男	61	有	L4~5	9.5	44.0	(+)
5	女	40	有	L3~4、L4~5	13.8	31.0	(-)
6	男	41	有	L5~S1	5.9	4.0	(+)
7	女	62	有	L3~4、L4~5	2.1	20.0	(+)
8	男	61	无	L3~4、L4~5	142.6	88.0	(-)
9	男	48	有	L5~S1	6.0	25.0	(+)
10	女	48	有	L2~3	58.2	81.0	(+)
11	男	64	无	L2~3、L5~S1	24.6	36.0	(+)
12	男	60	无	L3~4	81.8	66.0	(+)
13	女	58	有	L4~5	26.2	73.0	(+)
14	男	48	无	T7~8、T8~9	7.4	48.0	(+)
15	男	52	有	L3~4	8.0	104.0	(+)
16	男	34	有	L3~4	17.5	33.0	(+)
17	女	62	无	C5~6	74.4	51.0	(+)
18	男	67	有	T12~L1、L4~5	15.9	21.0	(+)
19	女	64	有	T6~7	3.9	55.0	(+)
20	女	67	有	L2~3、L3~4	59.3	31.0	(+)
21	男	49	有	L4~5	0.6	1.0	(+)
22	女	66	有	T12~L1、L1~2、L2~3	3.2	40.0	(+)

注: 流行病史: 牛、羊群接或其生鲜制品接触史

压、内固定、植骨融合术, 1例行颈椎前路病灶清除、减压、内固定、植骨融合术, 2例行椎间孔镜下病灶清除术, 见表2。

二、组织病理与多重PCR检测

22例患者术中均获取组织标本, 共收集73份髓核、软骨终板、黄韧带、纤维环不同部位组织标本, 组织获取率为83.0% (73/88), 其中髓核22份, 组织获取率为100% (22/22); 软骨终板21份, 组织获取率为95.5% (21/22); 黄韧带19份, 组织获取率为86.4% (19/22); 纤维环11份, 组织获取率为50.0% (11/22), 其中髓核获取率最高, 见表3。

髓核Gimesa染色阳性率和多重PCR检测阳性率与总体病理Gimesa染色阳性率和总体多重PCR检测阳性率最为接

近, 并且与其他部位组织标本阳性率差异具有统计学意义 ( $P$ 均 $< 0.001$ )。但22例患者病理、髓核、软骨终板、黄韧带、纤维环以及72份标本的整体Gimesa染色阳性率和多重PCR检测阳性率差异均无统计学意义 ( $P$ 均 $> 0.05$ ), 见表3。

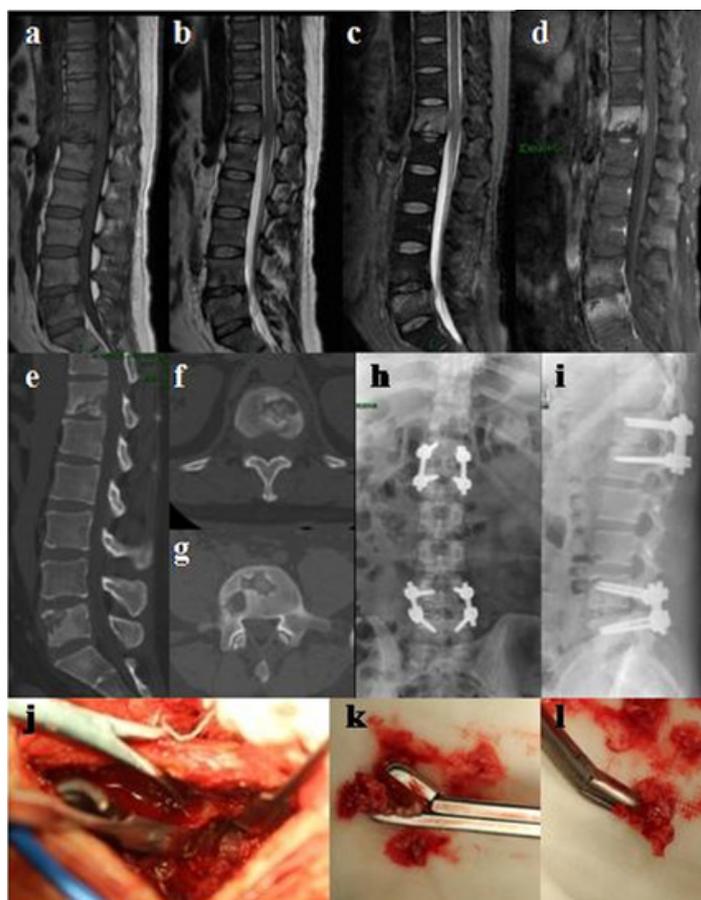
三、典型病例分析

典型病例: 男性、39岁, 发热伴剧烈胸腰背疼痛6个月, 临床诊断为布鲁杆菌性脊柱炎、慢性布鲁菌病, 经过胸腰部制动保护、抗布鲁杆菌病药物治疗、止疼对症等处理后, 体温恢复正常, 胸腰背疼痛未见明显减轻, 最后行胸腰椎后路病灶清除、减压、植骨、植骨融合术。手术前后影像学资料见图1及术后组织病理和多重PCR检测结果资料见图2。

表 3 患者组织病理与多重 PCR 检测结果 [ 例 ( % ) ]

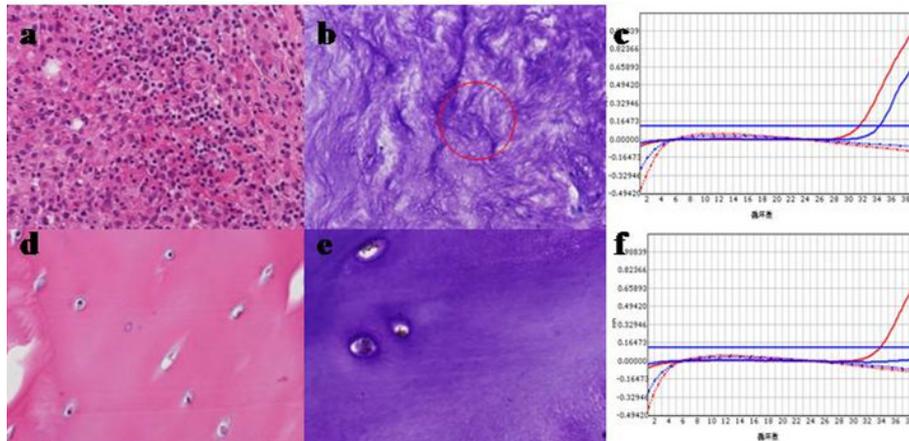
指标	例数 (n = 22)	髓核 (n = 22)	软骨终板 (n = 21)	黄韧带 (n = 19)	纤维环 (n = 11)	全部标本 (n = 73)	P值
Gimesa阳性率	18 (81.8)	16 (72.7)	5 (23.8)	10.5 (2/19)	9.1 (1/11)	32.9 (24/73)	$< 0.001$
多重PCR阳性率	20 (90.9)	20 (86.4)	38.1 (8/21)	10.5 (2/19)	18.2 (2/11)	43.8 (32/73)	$< 0.001$
P值	0.664	0.240	0.505	1.000	1.000	0.173	

注: Fisher's 精确检验法



注: a~d: 术前MRI可见胸11~12、腰4~5椎体及椎间盘在T1WI呈低信号, T2WI及压脂T2WI呈混杂高信号, 增强可见强化; e~g: 术前CT显示胸11~12、腰4~5椎间隙变窄, 椎体骨质破坏; h~i: 术后X线显示胸腰椎曲度及椎间隙高度恢复; j: 胸腰椎后路病灶清除、减压、内固定、植骨融合术; k: 病变髓核; l: 病变软骨终板

图1 典型患者手术前后影像学



注: a: 髓核HE染色可见大量中性粒细胞、淋巴细胞及嗜酸性细胞浸润, 伴脓肿形成( $\times 100$ ); b: 髓核Gimesa染色可见大量阳性布鲁杆菌( $\times 1000$ ); c: 髓核多重PCR检测结果显示第32个循环检测出羊种布鲁杆菌DNA, 第35个循环检测出犬型布鲁杆菌DNA(红实线: 羊种, 蓝实线: 犬种, 红虚线: 牛种, 蓝虚线: 猪种); d: 软骨终板HE染色未见明显炎症细胞浸润( $\times 100$ ); e: 软骨终板Gimesa染色未见布鲁杆菌( $\times 1000$ ); f: 软骨终板多重PCR检测结果显示第34个循环检测出羊种布鲁杆菌DNA

图2 典型患者术后病灶组织病理染色和PCR结果

## 讨 论

目前, 国内外关于布鲁杆菌性脊柱炎的临床诊断尚无一致性共识, 主要根据患者流行病学史、临床表现、体征、影像学检查、实验室结果及局部组织病理确诊。因此, 若有一种快速且准确率高的检测方法, 对其早期诊断非常关键。现阶段, 国内常用的布鲁杆菌病血清学检测主要包括虎红平板凝集试验、试管凝集实验、抗人免疫球蛋白试验、酶联免疫吸附试验和间接荧光抗体试验, 但常出现假阳性和假阴性。目前, 国内外比较公认的诊断布鲁杆菌病的金标准为血培养等细菌学检测, 但因菌血症为间歇性发作, 只有在急性期血培养阳性率才较高, 且血培养检测时间较长、在整个检测过程中存在感染等风险, 因此大大影响其临床应用<sup>[19]</sup>。随着分子生物学技术的不断进步, 应用PCR技术检测布鲁杆菌, 可能实现对布鲁杆菌病快速且准确的诊断, 为布鲁杆菌性脊柱炎的治疗和康复提供帮助。

关于布鲁杆菌性脊柱炎病理机制的研究表明, 因椎体上终板血运比较充足, 成为布鲁杆菌最初侵犯的位置, 随后逐步侵犯椎间盘以及椎体。但不同组织的布鲁杆菌分布是否存在差异, 或者布鲁杆菌更易存在于哪种类型组织中, 对术中清理重点和范围及后续治疗具有指导意义。本研究通过手术直接获取不同部位病变组织, 较以往获取单一组织样本更加全面。本研究22例患者中病变组织获取率: 髓核 > 软骨终板 > 黄韧带 > 纤维环, 髓核最容易获取。同时, Gimesa染色阳性率: 髓核 > 软骨终板 > 黄韧带 > 纤维环, 其中髓核Gimesa染色阳性率与总体病理Gimesa染色阳性率最为接近, 且与其他部位组织标本阳性

率差异有统计学意义。因此, 手术过程中应重点清除病变髓核组织, 术后病理Gimesa染色寻找布鲁杆菌时尽量选择病变髓核组织。对高度怀疑布鲁杆菌性脊柱炎的患者, 尤其通过术前流行病学史、实验室检查及影像学检测检查等无法确诊的, 术中有针对性地清除留取组织标本将有助于提高诊断阳性率。

PCR检测布鲁杆菌具有高度灵敏性和特异性, 可大大提高布鲁杆菌病的诊断效率。Dal等<sup>[20]</sup>认为PCR检测能够更加快速、准确地对布鲁杆菌种属进行鉴别。鉴于PCR检测具有快速、准确、定量等优势, 故被大量应用于各类感染性疾病。但现阶段国内外能够应用于临床检测布鲁杆菌的商品化试剂盒比较少, 主要还是科研领域的应用<sup>[21-23]</sup>。现阶段, 布鲁杆菌PCR检测主要包括单重PCR检测、多重PCR检测及荧光定量PCR检测等。1990年Bossery等<sup>[24]</sup>首次应用PCR检测样本中的布鲁杆菌。1994年Brickerg等<sup>[25]</sup>参照不同种属布鲁杆菌基因IS711插入序列的不同部位而设计能够鉴别布鲁杆菌分型的多重PCR方法, 能够鉴别1、2、4型牛种, 1、2、3型羊种以及C1型猪种。1997年唐浏英等<sup>[26]</sup>通过多重PCR方法检测6个不同种属布鲁杆菌结果均为阳性。2013年Reza等<sup>[27]</sup>采用3对引物扩增IS711基因片段显示多重PCR能够对布鲁杆菌种属进行鉴别。2014年陈思等<sup>[28]</sup>参照布鲁杆菌IS711基因的缺失序列构建4对引物, 设计出能够迅速鉴别布鲁杆菌种属的多重PCR方法, 灵敏度分别为 $1.1 \times 10^2$ 、 $5.1 \times 10^2$ 、 $3.5 \times 10^2$ 、 $2.5 \times 10^2$  CFU/ml。2015年Zamanian等<sup>[29]</sup>对PCR引物B4/B5、F4/R2和JPF/JPR检测布鲁杆菌的敏感性进行了分析, B4/B5、F4/R2和JPF/JPR能从1 ml样本中分别检测到 $9 \times 10^2$ 、 $9 \times 10^3$ 和 $9 \times 10^5$ 布鲁杆菌。同时, 煮沸法分离DNA时F4/R2和B4/B5在纯化和检测布鲁杆菌方面敏感度最高。

2018年Christoforidou等<sup>[30]</sup>改进了两种新的多重PCR方法,采用限制性片段长度多态性分析鉴别疫苗株Rev.1。通过多重PCR以及实时PCR对71个菌株进行了鉴定,发现有62个(87.3%)为*B. melitensis* biovar 3, 8个(11.3%)为biovar 1, 仅有1个(1.4%)为biovar 2。新的多重PCR方法与实时PCR方法获取的数据基本一致,因此新的多重PCR方法有助于布鲁杆菌的检测和鉴别。本研究应用多重PCR方法对不同组织标本进行检测,不仅可检测是否存在布鲁杆菌,还能对其种属进行鉴别,结果显示多重PCR检测阳性率:髓核 > 软骨终板 > 纤维环 > 黄韧带,其中髓核多重PCR检测阳性率与总体多重PCR检测阳性率最为接近,且与其他部位组织标本阳性率差异有统计学意义。同时,本研究所检出的布鲁杆菌均为羊种,仅病例2的髓核多重PCR检测羊种和犬种均为阳性。

Zamanian等<sup>[28]</sup>通过比较血培养与多重PCR法检测样本中羊布鲁杆菌和牛布鲁杆菌阳性率差异,显示血培养阳性率为47.5%,其中羊种占56.58%,牛种占43.42%;多重PCR法检测阳性率为67.5%,其中羊种占54.6%,牛种占45.4%。认为多重PCR法较血培养具有速度快、准确高优势。但PCR法阳性率是否高于组织病理学尚无相关对比分析。本研究对不同组织标本进行组织病理学和多重PCR检测,结果显示22例患者中,多重PCR检测阳性率 > Gimesa染色阳性率;73份组织标本中,多重PCR检测阳性率 > Gimesa染色阳性率,其中22份髓核,21份软骨终板,11份纤维环标本多重PCR检测阳性率 > Gimesa染色阳性率,但差异均无统计学意义;19份黄韧带标本多重PCR检测阳性率与Gimesa染色阳性率一致。本文为回顾性研究,22例患者术前结合流行病学、临床表现、体征、影像学、实验室结果确诊为布鲁杆菌性脊柱炎、慢性布鲁杆菌病者20例,2例患者通过术后组织病理或多重PCR检测而确诊,其中病例5通过术后多重PCR检测而确诊,病例8通过术后组织病理Gimesa染色和多重PCR检测确诊。因此,推测多重PCR检测较病理Gimesa染色更加敏感,准确率更高:①PCR检测较组织病理观察更科学;②组织病理观察主观性强,可能存在漏报。

综上,以PCR技术为基础的分子生物学检测敏感性高、特异性强、耗时短、成本低,且能够对布鲁杆菌种属进行鉴别,可广泛应用于临床检测。同时,布鲁杆菌多存在于髓核部位,在术中清理和收集过程中应重点处理,尤其对于术前诊断不清和术后病理观察阴性的患者。但因本研究样本量所限,仍需要进一步探讨。

### 参 考 文 献

- [1] Deng Y, Liu X, Duan K, et al. Research progress on Brucellosis [J]. *Curr Med Chem*,2019,26(30):5598-5608.
- [2] Liu X, Zheng M, Jiang Z, Wang G, et al. Computed tomography imaging characteristics help to differentiate pyogenic spondylitis from brucellar spondylitis [J]. *Eur Spine J*,2020,29(7):1490-1498.
- [3] Zhou Y, Xie S, Zheng R, et al. Brucellar reproductive system injury: A retrospective study of 22 cases and review of the literature[J]. *J Int Med Res*,2020,48(6):300060520924548.
- [4] Sade R, Polat G, Ogul H, et al. Brucella spondylodiscitis[J]. *Med Clin (Barc)*,2017,149(5):234.
- [5] Unuvar GK, Kilic AU, Doganay M. Current therapeutic strategy in osteoarticular brucellosis[J]. *North Clin Istanbul*,2019,6(4):415-420.
- [6] Yao Y, Yang XM. The senile Brucellosis spondylitis clinical diagnosis and treatment on as evaluation were retrospectively analyzed[J]. *Surg Sci*,2018,9(8):262-280.
- [7] Li M, Zhou X, Li J, et al. Real-time PCR assays for diagnosing brucellar spondylitis using formalin-fixed paraffin-embedded tissues[J]. *Medicine (Baltimore)*,2018,97(9):e0062.
- [8] Liu X, Li H, Jin C, et al. Differentiation between brucellar and tuberculous spondylodiscitis in the acute and subacute stages by MRI: A retrospective observational study[J]. *Acad Radiol*,2018,25(9):1183-1189.
- [9] 闫君杰, 赵建民, 刘瑞, 等. 布氏杆菌性脊柱炎诊断与治疗研究进展[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*,2019,33(6):615-618.
- [10] 李会侠, 王祺, 张建中, 等. 磁共振成像对布氏杆菌性脊柱炎诊断的临床应用价值[J]. *中国医学杂志*,2019,99(37):2935-2938.
- [11] Esmailnejad-Ganji SM, Esmailnejad-Ganji SM. Osteoarticular manifestations of human brucellosis: A review[J]. *World J Orthop*,2019,10(2):54-62.
- [12] 中华人民共和国卫生部. 布鲁氏菌病诊疗指南(试行)[J]. *传染病信息*,2012,25(6):323-324, 359.
- [13] 胥少汀, 葛宝丰, 刘肃, 等. 实用骨科学[M]. 4版. 北京: 人民军医出版社,2012,2218-2222.
- [14] 张耀, 张强, 赵昌松. 布氏杆菌性脊柱炎的临床治疗方法的研究进展[J]. *中华医学杂志*,2016,96(3):237-239.
- [15] 陈丽星, 杨新明, 张瑛. 布病脊柱炎的诊断及治疗研究进展[J]. *河北北方学院学报*,2020,36(4):57-60.
- [16] Unuvar GK, Kilic AU, Doganay M. Current therapeutic strategy in osteoarticular brucellosis[J]. *North Clin Istanbul*,2019,6(4):415-420.
- [17] Hadjipavlou AG, Katonis PK, Gaitanis IN, et al. Percutaneous transpedicular discectomy and drainage in pyogenic spondylodiscitis[J]. *Eur Spine J*,2004,13(8):707-713.
- [18] 段力军, 武永刚, 阿尔宾, 等. 布氏菌性脊柱炎的微创手术治疗[J]. *中华骨与关节外科杂志*,2015,8(1):78-80.
- [19] Yagupsky P, Morata P, Colmenero JD. Laboratory diagnosis of human brucellosis[J]. *Clin Microbiol Rev*,2019,33(1):e00073-19.
- [20] Dal T, Kara SS, Cikman A, et al. Comparison of multiplex real-time polymerase chain reaction with serological tests and culture for diagnosing human brucellosis[J]. *J Infect Public Health*,2019,12(3):337-342.
- [21] Li M, Zhou X, Li J, et al. Real-time PCR assays for diagnosing brucellar spondylitis using formalin-fixed paraffin-embedded tissues[J]. *Medicine (Baltimore)*,2018,97(9):e0062.
- [22] Che LH, Qi C, Bao WG, et al. Monitoring the course of Brucella infection with qPCR-based detection[J]. *Int J Infect Dis*,2019,89:66-71.

- [23] Zeybek H, Acikgoz ZC, Dal T, et al. Optimization and validation of a real-time polymerase chain reaction protocol for the diagnosis of human brucellosis[J]. Folia Microbiol (Praha),2020,65(2):353-361.
- [24] Bosseray N, Plommet M. Brucella suis S2, brucella melitensis Rev. 1 and Brucella abortus S19 living vaccines: residual virulence and immunity induced against three Brucella species challenge strains in mice[J]. Vaccine,1990,8(5):462-468.
- [25] Bricker BJ, Halling SM. Enhancement of the Brucella AMOS PCR assay for differentiation of Brucella abortus vaccine strains S19 and RB51[J]. J Clin Microbiol,1995,33(6):1640-1642.
- [26] 唐浏英, 邱海燕, 李元凯. 应用分子生物学技术检测布鲁氏菌抗原的研究- II PCR技术在动物布鲁氏菌病早期诊断中的应用[J]. 中国地方病防治杂志,1997,12(4):207-208, 256.
- [27] Reza M, AliR V, Ali A, et al. Comparison of culture and multiplex PCR technique for detection of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* from human blood samples[J]. Zahedan J ResMed Sci,2013,15(12):5-8.
- [28] 陈思, 王秀然, 钱晶. 牛, 羊, 猪, 犬布鲁氏菌病多重方法的建立[J]. 中国畜牧兽医,2014,41(2):29-34.
- [29] Zamanian M, Hashemi TGR, Rad M, et al. Evaluation of different primers for detection of Brucella in human and animal serum samples by using PCR method[J]. Arch Iranian Medicine,2015,18(1):44-50.
- [30] Christoforidou S, Boukouval AE, Zdraga SA, et al. Novel diagnostic approach on the identification of Brucella melitensis Greek endemic strains-discrimination from the vaccine strain Rev.1 by PCR-RFLP assay[J]. Vet MedSci,2018,4(3):172-182.

(收稿日期: 2021-02-27)

(本文编辑: 孙荣华)

张耀, 陈佳敏, 李慢, 等. 布鲁杆菌性脊柱炎术后组织病理与多重PCR检测阳性率分析[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2021,15(6):419-425.