

酶,故采用了 ASP-PCR 方法进行检测。与 PCR-RFLP 法比较而言,笔者认为对于 AHSG 基因 SNP 位点的检测 ASP-PCR 法具有以下优点:(1)由于不需要酶切来判断结果,故所需的 PCR 体系体积可较 PCR-RFLP 法明显减少,从而节约 Tag 酶和 dNTP。(2)DNA 模板为 100 ng 即可(本研究中 RFLP-PCR 的 DNA 模板为 200 ng),并且引物浓度也较 PCR-RFLP 方法低,故灵敏度较高。(3)ASP-PCR 法产物中无小的 bp 值的条带产生,易于判断结果。

总而言之,本文对 AHSG 基因 4 个 SNP(rs4917,rs4918,rs1071592,rs2248690)的检测,无论使用 PCR-RFLP 方法,还是使用 ASP-PCR 方法进行多态性的检测,其基因分型结果与 DNA 测序结果一致,说明 2 种方法对基因分型的特异性和准确性均较好。这也提示当 SNP 位点不能用传统的 RFLP-PCR 进行检测时,ASP-PCR 方法不失为一种简便、特异性高、费用少、便于推广(特别是群体基因多态性研究)的 SNP 检测方法。

参考文献

[1] Nachman MW. Single nucleotide polymorphisms and recombination rate in humans[J]. Trends Genet,2001,17(9):481-485.

[2] Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms[J]. Nature,2001,409(6822):928-933.
 [3] 杨昭庆,洪坤学,褚嘉佑.单核苷酸多态性的研究进展[J].国外医学遗传学分册,2002,23(1):4-8.
 [4] 张维铭.现代分子生物学实验手册[M].3版.北京:科学出版社,2003:303-305.
 [5] Myakishev MV, Khripin Y, Hu S, et al. High-throughput SNP genotyping by allele-specific PCR with universal energy-transfer-labeled primers[J]. Genome Res,2001,11(1):163-169.
 [6] Yang YJ, Wang YB, Lei SF, et al. AHSG gene polymorphisms are associated with bone mineral density in Caucasian nuclear families [J]. Eur J Epidemiol,2007,22(8):527-532.
 [7] 李建华,彭惠民. AHSG 基因 SNPs 与 2 型糖尿病相关性研究[J].湖北民族学院学报:医学版,2006,23(3):22-26.
 [8] Oefner PJ. Sequence variation and the biological function of genes: methodological and biological considerations[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci,2002,782(1/2):3-25.

(收稿日期:2010-09-10)

• 检验技术与方法 •

结核生物蛋白芯片技术在结核病临床诊断中的价值探讨

白广红¹,李耀军²

(1.陕西省结核病防治院,西安 710100;2.西安医学院第二附属医院 710038)

摘要:目的 利用结核生物芯片技术,探讨国产重组结核分枝杆菌蛋白 38 kD(γ TPA38)、16 kD(γ TPA16)和脂阿拉伯甘露糖(LAM)用于肺结核与肺外结核的早期诊断价值。**方法** 采用 CCD 原理结合视频采集方法,应用结核生物芯片检测系统,对门诊及住院患者血清标本 3 448 例进行了检测。**结果** LAM、16 kD、38 kD 结核生物蛋白芯片联合检测门诊患者 782 例,阳性 219 例,阳性率为 28.0%(219/782)。住院患者 2 666 例,结核生物蛋白芯片联合检测阳性 1 368 例,阳性率为 52.0%(1 368/2 666)。实验室检查了结核生物蛋白芯片联合检测阳性的 1 386 例住院患者的细菌涂片,其中菌阳患者 213 例,菌阴患者 1 155 例。还对 69 例健康人群及肺部其他疾病患者血清标本进行了 16 kD、38 kD、LAM 抗体的检测,结果阴性 66 例,特异性为 95.7%(66/69),3 448 例患者 3 种抗原联合检测,结果阳性 1 587 例,敏感度为 46.0%(1 587/3 448)。**结论** 结核生物芯片检测系统联合运用 16 kD、38 kD、LAM 3 种抗原检测其对应的抗体有较好的灵敏度和很高的特异性。对结核病血清学诊断有较高的参考价值。

关键词:分枝杆菌; 结核; 生物蛋白芯片

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.05.029

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)05-0597-03

结核病是由结核分枝杆菌引起的呼吸道传染病,其疫情呈现全球性的回升。快速、廉价、简单易用的结核病诊断技术,对诊断、治疗及控制预防结核病的发展均有重要意义。结核病的细菌学诊断是结核病诊断的“金标准”^[1]。但是传统的结核分枝杆菌培养操作复杂、耗时太长^[2]。用 BD-960 结核分枝杆菌培养仪培养费用较高。痰涂片找抗酸杆菌的阳性率较低,经过实验表明,用结核生物蛋白芯片技术对结核分枝杆菌的 16 kD (16 kD Protein)、38 kD(38 kD Protein)、脂阿拉伯甘露糖(lipoarabinomannan, LAM)抗原相对应的 3 种抗体进行联合检测,对结核病的临床诊断有较高的参考价值。对控制结核病的发展起到积极作用。

1 材料与方 法

1.1 标本来源 选取陕西省结核病防治院 2008 年 12 月至 2009 年 11 月间住院及门诊患者 3 448 例的血清标本,还选取了 40 例经过胸透、乙型肝炎等健康体检结果正常者。

1.2 仪器与试剂 结核生物蛋白芯片阅读仪由南京大渊生物技术工程有限 责任公司提供,型号:PBT-X2;批号:苏药管械经

营许 20020059(更号)。结核分枝杆菌抗体检测蛋白芯片试剂盒,由南京大渊生物技术工程有限责任公司提供。

1.3 生物蛋白芯片检测原理 以微孔滤膜为载体,利用微阵列技术将纯化的 LAM、基因工程提纯并纯化的结核分枝杆菌蛋白 16 kD 和 38 kD 等 3 种抗原固相于同一膜上,并利用微孔滤膜的渗透浓缩、凝集作用,使抗原抗体反应在固相膜上快速进行,再以免金作为标记物直接在膜上显色。显色后的芯片放入芯片识别仪,在专门软件的支持下对不同抗原点阵的灰度值进行分析,与临界灰度值比较,大于或等于临界灰度值为阳性。

1.4.1 结核菌细菌学涂片镜检 操作方法参考《结核病诊断细菌学检验规程》^[3]。

1.4.2 生物蛋白芯片检测 先在芯片上标记样本编号,在芯片盒窗口内滴加 200 μ L 试剂 A,使膜表面全浸湿,待完全渗入后,室温放置 1 min,加待检血清 100 μ L,待血清完全渗入后,及时滴加 300 μ L 试剂 B,待试剂 B 完全深入后,滴加 50 μ L 试剂 C,待试剂 C 完全渗入后,最后滴加 300 μ L 试剂 D,反应完

毕后 30 min 内,将芯片放入生物芯片识别仪中进行结果分析。在确保没有开启任何应用程序的情况下,把芯片盒内的小主盘放入光驱,机器盒自动进入“生物芯片检测软件”(首次进入软件需注册,此注册号会随机赠送),按软件程序进行操作,在识别仪系统中,本芯片类型为结核。芯片子类型为 TBO1A。在芯片阅读完成后,仪器会自动给出检测结果,并打印报告,时间只需十几分钟。

1.4.3 判断标准 南京大洲生物技术工程有限责任公司提供的结核生物蛋白芯片试剂盒是用 16 kD、38 kD、LAM 3 种特异性抗原来检测患者血清标本中的抗体。如果任一抗体检测结果为阳性,3 种抗体均为阴性则结果判定为阴性。

2 结 果

结核生物蛋白芯片检测临床血清标本结果见表 1。

表 1 结核生物蛋白芯片检测临床血清标本结果

临床判断	标本例数	抗酸涂片结果	芯片 3 项检测结果	n
肺结核	213	阳性(213)	阳性(184)	184/213
肺结核	1 155	阴性(1155)	阳性(518)	518/1 155
肺部其他疾病	29	阴性(29)	阴性(28)	28/29
体检健康人群	40	阴性(40)	阴性(38)	38/40

从表 1 中可以看出,肺结核患者中的涂片阳性率仅为 15.6% (213/1 386),而蛋白芯片的阳性率为 51.3% (702/1 386),菌阳肺结核患者的结核生物蛋白芯片阳性率达到 86.4% (184/213),菌阴肺结核患者的结核生物蛋白芯片阳性率达到 44.8% (518/1 155)。结核生物蛋白芯片检测结核患者的检测敏感性为 86.4% (184/213),检测特异性为 95.7% (66/69)。

表 2 3 项抗体联合检测阴性结果比较[n(%)]

组别	n	16 kD	38 kD	LAM	3 项联合
门诊患者	782	53(6.8)	131(16.8)	197(25.2)	219(28.0)
住院患者	2 666	271(10.2)	866(32.5)	965(36.2)	1 386(52.0)
菌阳患者	213	52(24.4)	121(56.8)	137(64.3)	184(86.4)
菌阴患者	1 155	143(12.4)	261(22.6)	328(28.4)	507(43.9)
肺部其他疾病(肺炎、肺癌)	29	1(3.4)	0(0.0)	0(0.0)	1(3.4)
体检健康人群	40	2(5.0)	0(0.0)	0(0.0)	2(5.0)

表 2 结果表明,213 例结核分枝杆菌涂片阳性的患者 3 种蛋白联合检测阳性率为 86.4% (184/213)。经过治疗的住院患者 3 项蛋白生物芯片联合检测检出率为 52.0% (1 386/2 666),该 3 项抗体检出率下降。因此,芯片也能监测这 3 种抗体,可用于结核病治疗的疗效观察。

3 讨 论

随着分子生物学的发展,生物芯片技术应用于临床已较为广泛。结核杆菌重组蛋白 16 kD、38 kD 和 LAM 3 种抗原均为结核菌特异性高的抗原,存在于结核菌体中,有较强的免疫原性,用其检测相应的抗体有交好的特异性,适用于结核菌的免疫学诊断。

LAM 抗原是结核菌细胞壁的重要组成成分,结核菌的 LAM 含量明显高于其他分枝杆菌,因此许多研究都认为检测患者血清中的抗 LAM 抗体是诊断结核病的重要标志之一。在世界不同的地区,活动性结核患者的抗 LAM 抗体阳性率为 60%~70%,特异性达到 95%,LAM 抗原的优点是与其他抗

原相比,该抗原有高表达的特异性并且有高免疫原性和高产量,检测抗体有较好的敏感性,并具有很高的特异性,试验检测具有很好的重复性^[4]。

38 kD 蛋白是结核分枝杆菌复合群特异性蛋白,为结核菌的分泌抗原之一^[5-6],并在许多实验室证明其抗体是诊断结核病的有效指标之一。38 kD 蛋白是以单克隆抗体为基础,经亲和层析纯化而成,有学者从结合杆菌中分离了该蛋白的基因,认为 38 kD 能在致病的分枝杆菌中检出。38 kD 蛋白含有特异的 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞抗原决定簇,对人类 B 细胞具有免疫优势,能诱导早期反应。38 kD 蛋白的免疫学活性最强,是结核杆菌的主要免疫源,缺乏抗 38 kD 抗体的血清很难与结核杆菌其他抗原发生反应,因此其灵敏度高、特异性强。

16 kD 蛋白存在于结核菌复合体中,在其他分枝杆菌不存在该抗原的基因,因而也不表达该抗原,而其他分枝杆菌感染不能诱导机体产生抗 16 kD 蛋白的抗体^[7]。16 kD 没有常见环境中的分枝杆菌抗原表位,与常见的非结核分枝杆菌没有血清交叉反应。由于这一特点,16 kD 可以作为结核复合群感染的特异性诊断抗原。

结核病患者受 16 kD、38 kD、LAM 3 种抗原刺激产生的 3 种特异性抗体与患者感染结核菌的严重程度有着较强的正相关关系^[8]。当患者受到结核菌严重感染时,结核抗体水平则会增高;当结核患者受到治疗时,结合抗体水平则会下降。如抗酸染色阳性的菌阳患者,结核生物蛋白芯片检测的阳性率达 86.4% (184/213),经过治疗的住院患者,结核生物蛋白芯片检测的阳性率为 51.3%,抗体水平下降。

运用 16 kD、38 kD、LAM 3 种抗原联合检测可提高检出灵敏度,还可以观察治疗效果,3 种抗原联合检测适用于活动性肺结核引起的疾病、菌阳性肺结核、结核与其他疾病的鉴别及疗效观察,可用肺结核的辅助诊断及大规模流行病学调查。

结核蛋白芯片利用纯化的 16 kDa、38 kDa、LAM 菌体蛋白为抗原,检测其相对应的抗体,灵敏度是 46.0%,本文检测的结果较报道的偏低,但其该方法的敏感性、特异性均高,敏感性达 86.4%,特异性达 95.6%。其是结核病实验室诊断的一种好方法。

本实验中,健康人群中有 2 例,肺部其他疾病患者中有 1 例,结核生物蛋白芯片检测结果为阳性。经过复检,发现其结核菌素纯蛋白衍生物(PPD)为阳性,可能感染结核。肺结核患者的涂片阳性率为 15.3% (213/1 386),而住院患者结核生物蛋白芯片检测阳性率达 52.0%,门诊患者结核生物蛋白芯片检测阳性率为 28.0% (219/782)这表明,结核生物蛋白芯片检测可提高结核病检测的灵敏度,还不影响特异性。

结核菌多种抗原的蛋白芯片测抗体的方法敏感性低一些,但特异性较高,方法简便快速,操作简单,只需 10 min 左右即可出报告。蛋白芯片反应及检测结果电脑打印并储存,便于检查,是结核病诊断、治疗的较好的辅助检查方法,其为高质量的结核分枝杆菌血清学诊断提供了切实可行的手段^[9]。

参考文献

[1] 王魁民.应用蛋白芯片技术快速诊断肺结核的研究[J].中国防痨杂志,2007,29(4):379-318.
 [2] 中国防痨协会.结核病诊断细菌学检验规程[J].中国防痨杂志,1996,18(1):28-31.
 [3] 李洪敏.结核生物蛋白芯片技术在临床诊断中的意义[J].现代检验医学杂志,2008,23(3):5-7.

[4] 吴玉平, 赵月娟, 王永明, 等. 血清抗脂阿拉伯甘露糖抗体对活动性肺结核的诊断价值[J]. 中国微生物学杂志, 2000, 12(8): 344-345.

[5] 王恩兰, 刘文涛, 李涛, 等. 三种结核分枝杆菌分泌抗原的血清学诊断价值[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2006, 29(6): 466-469.

[6] 王继萍, 郑孝炳, 陈晓玲, 等. 蛋白芯片检测法与 DIGFA 阴法检测结核多种抗原的 IgG 抗体的方法比较研究[J]. 中华中西医医学杂志, 2005, 3(3): 93-94.

[7] 尹少蕾. 血清学方法诊断结核病的研究[J]. 中国防痨杂志, 1990, 12(10): 42-45.

[8] 温贵华, 薛碧媚, 郭玲, 等. 痰涂片检查在结核病控制项目工作中的实验评价[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 5(5): 405-406.

[9] 刘菊林, 易小兵. 蛋白质芯片技术及其在临床检测中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(9): 70-72.

(收稿日期: 2010-09-22)

• 检验技术与方法 •

女性生殖道支原体感染及耐药性分析

陈忠领, 罗凯亮, 刘 甦, 范美珍, 孟宪玲, 柯美津

(广东省深圳市宝安计划生育专科医院 518101)

摘要:目的 了解女性生殖道解脲支原体(UU)和人型支原体(MH)感染及耐药性情况。方法 对疑为支原体感染的阴道分泌物标本采用支原体鉴定药敏试剂盒进行检测。结果 4 822 例标本经培养鉴定, 共检出 1 709 例阳性, 总检出率为 35.44%; 其中单纯 UU 阳性率 24.16%(1 165/4 822)明显高于单纯 MH 阳性率 1.76%(85/4 822)以及 UU 合并 MH 感染检出率 9.52%(459/4 822); 支原体感染主要发生在 20~40 岁年龄段。支原体对交沙霉素、美满霉素、克拉霉素和强力霉素较为敏感, 而对环丙沙星、司帕沙星、氧氟沙星耐药性较高。结论 女性生殖道支原体感染以 UU 为主, UU 和 MH 混合感染也较为常见, 在年轻性活跃时期感染率高, 并对多种抗菌剂耐药。支原体培养应同时进行药敏试验, 便于指导治疗。

关键词:生殖道; 支原体感染; 耐药性

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.05.030

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)05-0599-02

解脲支原体(Ureaplasma Urealyticum, UU)和人型支原体(Mycoplasma hominis, MH)是人类泌尿生殖道常见且公认有致病作用的支原体, 已成为性传播疾病最常见的病原体之一^[1], 除可引起尿道炎外, 尚可导致男性附睾炎、前列腺炎、女性宫颈炎、盆腔炎、更可能导致不孕和流产, 以及新生儿眼炎和肺炎等, 受到人们广泛的关注^[2-4]。由于广谱抗生素的滥用使耐药菌株日益增多, 给临床诊断和治疗带来了较大的困难, 并且多数女性感染者症状轻微或无症状常被忽视, 目前该病的患病率呈上升趋势^[5]。因此, 了解女性生殖道支原体感染及耐药性情况具有重要的临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2007 年 3 月至 2010 年 10 月本院妇产科门诊女性生殖道感染者共 4 822 例, 年龄为 18~55 岁。病史最长的 1 年多, 最短的 1 周。

1.2 试剂 由珠海市银科医学工程有限公司生产, 试剂盒由培养基和试剂条组成, 培养基含有蛋白胨、酵母抽提物、血清、生长因子等营养物, 并加有尿素、精氨酸。当有 UU 和 MH 生长时, 培养基中的尿素和精氨酸被分解生成的碱性物质使 pH 值升高, 培养基由黄色变成红色。培养基内加有抑菌剂, 可抑制泌尿生殖道中细菌和真菌的生长。试剂条有 26 个微孔, 可用于对 UU 和 MH 的鉴定, 同时可进行强力霉素(DOX)、美满霉素(MIN)、环丙沙星(CPF)、氧氟沙星(OFL)、司帕沙星(SPA)、罗红霉素(ROX)、阿齐霉素(AZI)、克拉霉素(CLA)、交沙霉素(JOS)、壮观霉素(SPE)等 10 种抗菌剂的药敏测定。

1.3 标本采集 女性用阴道窥器扩张后先用无菌棉签拭去宫颈口分泌物, 再用另一支棉拭子插入宫颈 2~4 cm, 旋转数周取分泌物。

1.4 培养、鉴定与药敏试验 将取得的标本迅速接种到尿素-精氨酸肉汤培养基中混匀, 从中取出 100 μL 含菌培养液分别放入试剂条的每一个微孔中, 各加一滴石蜡油覆盖, 然后置于

37 °C 培养箱孵育, 分别于 24 h、48 h 观察培养、鉴定和药敏结果。

2 结果

2.1 支原体检出情况 4 822 例生殖道感染者的标本, 经培养鉴定, 检出支原体阳性 1 709 例, 总检出率为 35.44%; 其中单纯检出 UU 1 165 例, 检出率为 24.16%(1 165/4 822); 单纯检出 MH 85 例, 检出率为 1.76%(85/4 822); 同时检出 UU 和 MH 459 例, 检出率为 9.52%(459/4 822)。UU 检出率明显高于 MH 检出率。

表 1 4 822 例各年龄组 UU 及 MH 感染情况

年龄组(岁)	检测例数	支原体培养阳性			阳性合计
		UU	MH	UU+MH	
~20	113	13	0	2	15
>20~30	2 412	625	43	242	910
>30~40	1 839	451	38	173	662
> 40	458	76	4	42	122
合计	4 822	1 165	85	459	1 709

表 2 4 822 例支原体阳性药敏试验结果[n(%)]

药物	敏感	中敏	耐药
交沙霉素	1 423(83.3)	77(4.5)	209(12.2)
美满霉素	1 406(82.3)	103(6.0)	200(11.7)
克拉霉素	1 386(81.1)	80(4.7)	243(14.2)
强力霉素	1 239(72.5)	272(15.9)	198(11.6)
阿奇霉素	1 064(62.3)	197(11.5)	448(26.2)
罗红霉素	800(46.8)	338(19.8)	571(33.4)
壮观霉素	772(45.2)	215(12.6)	722(42.2)
司帕沙星	548(32.1)	239(14.0)	922(53.9)
氧氟沙星	458(23.8)	466(27.3)	785(48.9)
环丙沙星	196(11.5)	321(18.8)	1 192(69.7)