

改良法基本原理与传统方法是一样的，在操作无失误的情况下两种方法检测数据高度一致。但传统方法是先配制一种储存液(高渗溶液)，试验时再将其稀释成 12~14 种低渗溶液，稀释步骤繁琐，且稍不注意就有可能会稀释错误，导致结果判断错误。而改良法一次性准确配制好各种浓度低渗溶液，试验时无需再稀释，既杜绝了失误，又简化了操作流程，从而确保检验结果准确，完全可以替代传统方法。试剂厂家亦可根据本改良法制成商品试剂盒，在各级检验机构中进行销售，从而更加有利于红细胞渗透脆性试验的规范性操作。

参考文献：

- [1] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].3 版.南京:东南大学出版社,2006:168-169.
- [2] 张碧红,陈纯,岑丹阳,等.遗传性球形红细胞增多症 26 例[J].实用儿科临床杂志,2008,23(15):1162-1164.
- [3] 贾冰,林志芳,纪新梅.常用筛查方法在地中海贫血诊断中的临床应用[J].检验医学与临床,2010,7(13):1339-1340.
- [4] 陈冬,李萍,荣卡彬.地中海贫血筛查实用技术的应用研究[J].中

• 检验技术与方法 •

荧光定量聚合酶链反应在淋球菌检测中的应用评价

王晓莉¹,江秀娟²

(1. 兰州电机厂职工医院检验科;2. 甘肃省肿瘤医院检验科,兰州 730050)

摘要:目的 以淋球菌 porA 假基因为靶序列,建立灵敏度高,且特异性强的荧光定量(FQ)聚合酶链反应(PCR)检测方法。**方法** 以淋球菌 porA 假基因为靶序列设计引物和探针,在实时荧光 PCR Master Mix 基础上优化 PCR 反应体系和方法,并评价方法的灵敏度、特异性和稳定性等。**结果** 经评估表明该法特异性和敏感性均为 100.0%,灵敏度较高,达到检测淋球菌小于 50 CFU/mL 的检测限;批间和批内检测变异系数均小于 5%。**结论** 以淋球菌 porA 假基因为靶序列建立 FQ-PCR 检测方法,灵敏度高,特异性强,且稳定性好,适合于作为淋病临床实验室辅助诊断和淋球菌阳性结果的确证方法。

关键词:奈瑟球菌,淋病; 聚合酶链反应; porA 假基因

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.10.043

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)10-1238-03

淋病是一种极容易传染和重复感染的性病,易出现合并症及后遗症。据 WHO 估计全球每年新发病例超过 6 000 万^[1]。淋病临床实验室诊断方法的“金标准”是分离培养法,但培养法假阳性率高,且灵敏度低,不利于早期诊断和快速筛查^[2]。荧光定量(FQ)聚合酶链反应(PCR)实现了 PCR 从定性到定量的飞跃,以其特异性强、灵敏度高、重复性好、定量准确、速度快、全封闭反应降低污染等优点成为分子生物学研究的重要工具。该技术已被应用于病原体检测、肿瘤基因检测、基因表达分析等多个医学研究领域^[3-4]。本研究旨在应用 FQ-PCR 技术,以淋球菌 porA 假基因为靶序列,建立灵敏度高,且特异性强的新型检测方法。

1 资料与方法

1.1 一般资料 常见奈瑟菌属 ATCC 标准株购自 ATCC,包括淋球菌(ATCC31426、ATCC49226、ATCC19424)、乳酰胺奈瑟菌(ATCC23970)、脑膜炎奈瑟菌(ATCC13077、ATCC13090)、黏液奈瑟菌(ATCC49233)、干燥奈瑟菌(ATCC29193)、微黄色奈瑟球菌(ATCC14799)、浅黄奈瑟菌(ATCC 13115)和灰色奈瑟菌(ATCC14685)等。临床分离株

国优生与遗传杂志,2008,16(6):39-41.

- [5] 何雅军,杨小华,马福广,等.红细胞平均体积和脆性及血红蛋白电泳联合检测在地中海贫血诊断中的价值[J].中华检验医学杂志,2005,28(3):244-246.
- [6] 吴学礼,周玉球,肖鸽飞,等.三种红细胞渗透脆性试验用于地中海贫血筛查的临床应用评价[J].海南医学,2004,15(4):15-17.
- [7] 孙扭君,李汉金,王秀云,等. MCV 和红细胞脆性试验在地中海贫血筛查中的诊断价值[J].中国优生与遗传杂志,2007,15(8):115-116.
- [8] 李长钢,石红松,王缨,等.MCV 及红细胞渗透脆性试验在诊断地中海贫血的临床价值[J].中华现代儿科学杂志,2004,1(3):210-212.
- [9] 陈加力,区丽群.地中海贫血患者血液 MCV、MCH、RDW 及红细胞脆性试验的探讨[J].现代检验医学杂志,2004,19(4):32-33.
- [10] 谭齐贤.临床血液学和血液检验[M].3 版.北京:人民卫生出版社,2005:112.

(收稿日期:2011-10-08)

由兰州电机厂职工医院、甘肃省肿瘤医院检验科收集、分离和鉴定,细菌采用分离培养及生化方法鉴定,病毒采用有 SFDA 医疗器械批号的核酸或免疫学检测试剂盒鉴定,其中淋球菌 40 株,脑膜炎奈瑟菌 5 株,灰色奈瑟菌 1 株,多糖奈瑟菌 1 株,乳糖奈瑟球 2 株,沙眼衣原体 3 株,解脲脲原体 5 株,人乳头瘤病毒(HPV)18 型阳性样本 3 份,HPV 16 型阳性样本 4 份,HPV 11 型阳性样本 2 份,HPV 6 型阳性样本 2 份,单纯疱疹病毒(HSV)1 型阳性样本 2 份,HSV 2 型阳性样本 4 份,大肠埃希菌 2 株,金黄色葡萄球菌 3 株和沙门菌属 2 株。120 例疑似淋病患者用棉拭子采集分泌物后冻存于 -70 °C。

1.2 仪器与试剂 Wizard 基因组 DNA 纯化试剂盒购自 Promega 公司,实时荧光 PCR Master Mix(For Taqman)试剂盒购自 TOYOBO 公司,ABI 7500 FQ-PCR 仪购自美国 ABI 公司。

1.3 DNA 的提取

1.3.1 标准菌株及临床分离株 DNA 分离、纯化 使用 Promega 公司 Wizard 基因组 DNA 纯化试剂盒,按照产品说明书操作,分离、纯化 DNA。

1.3.2 临床样本 DNA 的提取 将含有分泌物的棉拭子在 2

mL 磷酸盐缓冲液(PBS)中挤压洗 1~2 min,再用 Vortex 漩涡振荡器振荡 1 min,以便分泌物尽量溶于生理盐水中,将棉拭子弃去,悬浮液于 3 000 r/min(离心半径 16 cm)离心 5 min,弃上清液,再用 1 mL 无菌生理盐水悬浮细胞,3 000 r/min(离心半径 16 cm)离心 5 min,吸尽上清液,细胞重新溶于 100 μL 1 × TE 缓冲液中,然后 100 °C 加热煮沸 10 min, 12 000 r/min(离心半径 16 cm)离心 10 min,上清液含 DNA 模板。

1.4 淋球菌引物和探针设计 引物和探针设计以淋球菌 pro-A 假基因(GenBank: AJ223448.1)为靶序列,使用 ABI(Applied Biosystems)公司软件 Primer Express3.0 设计。上游引物(NG-F)序列为:5'-TAC GAT TCC CCC GGA TTT TC-3';下游引物(NG-R)序列为:5'-GCC GGA ACT GGT TTC ATC TG-3';Taqman 探针(NG-P)序列为:5'-FAM-TCC GCC TAT ACG CCT GCT ACT TTC ACG-BHQ-1-3'。引物和探针序列与文献[5-6]以及 GenBank 中所有淋球菌 proA 假基因进行比对,而且在 NCBI 数据库中进行核酸序列比对(Blast),发现引物及探针序列保守性好,且特异性高。特异性 PCR 产物大小为 125 bp。引物和探针由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.5 PCR 反应体系和反应方法 PCR 反应体系的优化在 TOYOB0 公司实时荧光 PCR Master Mix(For Taqman)试剂盒基础上进行,该试剂已包括除引物、探针和模板 DNA 外所有 PCR 所需组分,引物浓度在终浓度为 0.2~1.0 μmol/L 范围内进行优化,探针浓度在终浓度为 0.05~0.30 μmol/L 范围内进行优化。反应方法参照产品说明书,仪器使用 ABI 公司 7500 FQ-PCR 仪,采用两步法优化复性/延伸步骤、温度和时间。

1.6 试剂性能评价 使用优化好的 PCR 反应体系和反应方法检测奈瑟菌属 ATCC 标准株和已知临床分离株或样本 DNA,分析该试剂特异性。将 1 株标准株淋球菌(ATCC49226)和 1 株淋球菌临床分离株培养至吸光度为 0.6 左右的培养物按 10 倍梯度稀释,从 10⁻³ 至 10⁻⁹,取 5 μL 每个浓度梯度的菌液涂布于巧克力平版上,在 5%CO₂ 培养箱中 37 °C 条件下培养 48 h,用菌落计数法确定每个梯度细菌数,浓度以 CFU/mL 为单位计算。同时每个梯度取 200 μL 菌液提取 DNA 后用于 PCR 扩增,确定本方法的分析灵敏度。使用不同时间配制 3 批试剂同时检测标准株淋球菌(ATCC49226)4 种不同浓度的 DNA 模板,测试试剂的批间重复性;取其中 1 批试剂分 3 次检测标准株淋球菌(ATCC49226)4 种不同浓度的 DNA 模板,测试试剂的批内重复性;分析本方法的稳定性。试剂稳定性性能用变异系数(CV)评价。CV<5% 为试剂稳定性好。

1.7 临床样本检测的特异性和敏感性 同时使用本试剂和有 SFDA 医疗器械批号的淋球菌 FQ-PCR 检测试剂盒对 120 例临床样本的 DNA 进行检测,对于二者不相符的样本采用核酸测序法进行确认,靶序列选择 16S rRNA,上游引物序列为:5'-TAT CGG AAC GTA CCG GGT AGC-3',下游引物序列为 5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA-3',PCR 扩增反应体系和方法参照文献[7],PCR 产物送上海英骏生物技术有限公司测序,测序结果与标准株淋球菌(ATCC49226)的核酸序列进行比对,同时在 NCBI 数据库的 GenBank 中进行核酸序列比对(Blast, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/> Genbank-

Search.html),确认不相符的样本是否为淋球菌。最后计算出本方法的临床特异性和敏感性。

2 结 果

2.1 确定的 PCR 反应体系和方法 在 TOYOB0 公司实时荧光 PCR 试剂盒基础上通过调整引物和探针浓度和比例,根据扩增曲线的效率和荧光信号强度,确定总体积为 20 μL 的 PCR 反应体系中各成分加入量为:10 μL 实时荧光 PCR Master Mix(2×)、0.6 μL NG-F(10 μmol/L)、0.5 μL NG-R(10 μmol/L)、0.2 μL NG-P(10 μmol/L)、2 μL 模板 DNA 和 6.7 μL 无菌双蒸水。在 TOYOB0 公司实时荧光 PCR 试剂产品说明书基础上优化 PCR 反应条件为:95 °C 预变性 2 min;扩增 45 个循环,包括 95 °C 变性 15 s,60 °C 扩增 45 s。

2.2 方法的特异性 通过检测奈瑟菌属 ATCC 标准株和已知临床分离株或样本 DNA,所有淋球菌 DNA 均为阳性,其他样本 DNA 均为阴性。

2.3 方法的灵敏度 通过测试和单位换算,检测淋球菌(ATCC49226)的灵敏度达到 20 CFU/mL,检测淋球菌临床分离株的灵敏度达到 40 CFU/mL,达到检测淋球菌小于 50 CFU/mL 的检测限。

2.4 方法的稳定性 本方法的批间和批内检测 CV 均小于 5%。

2.5 方法的临床特异性及敏感性 120 例临床样本中使用本试剂检测结果为阳性 82 例,阴性 38 例;使用对比试剂对 82 例阳性样本进行检测,结果均为阳性,而使用对比试剂对 38 例阴性样本进行检测,结果为阴性 37 例,阳性 1 例。1 例不符合样本经测序结果比对发现为浅黄奈瑟菌。本方法的临床特异性和敏感性均为 100.0%,对比试剂的临床特异性和敏感性分别为 97.4% 和 100.0%。

3 讨 论

目前淋病的临床实验室诊断方法的“金标准”为分离培养法。但淋球菌离体后很快死亡,导致在转运培养基中成活率低;且淋球菌对培养营养要求高,培养时间长和对理化因素的抵抗力差等因素影响了其检出率。所以培养法假阳性率高和灵敏度低,不利于早期诊断和快速筛查^[2]。因此,非培养法越来越多地用于诊断淋球菌感染,其中包括核酸扩增技术(nucleic acid amplification tests, NAATs)。NAATs 灵敏度远高于培养法,目前商业化的淋球菌核酸扩增试剂盒已成为诊断淋球菌感染的重要补充。由于奈瑟菌属种间基因组同源性很高,许多商业化 NG 核酸扩增试剂盒或实验室核酸检测方法有交叉反应,降低了 NG 核酸检测的特异性,如随 Roche Amplicor 检测系统的广泛应用,有学者发现以胞嘧啶 DNA 甲基转移酶基因为扩增靶目标的 PCR 敏感性较低,且存在与脑膜炎球菌、黄热病球菌等发生交叉反应而出现假阳性结果,其阳性结果需要另外一种 PCR 确证^[8]。选择合适的靶序列是建立淋球菌核酸检测方法的关键。有学者对 porA 假基因测序发现,该基因很适合作为淋球菌检测的靶基因,porA 基因或假基因仅存在于奈瑟菌属的脑膜炎球菌和淋球菌中,不存在于与淋球菌共生的其他奈瑟菌中,大大降低了交叉反应概率。淋球菌 porA 假基因和脑膜炎球菌 porA 基因是有差异的。另外由于假基因不表达蛋白,受环境选择压力影响小,很稳定,更适合作为核酸检测的靶基因^[9-11]。Whiley 等^[12]最新研究表明以 porA 假基因

为靶序列建立的淋球菌 PCR 检测方法,特异性好,且灵敏度高;检测的 636 份临床样本中呈现 100.0% 敏感性和特异性,与所测试的 102 株共生奈瑟球菌株无交叉反应。本研究结果也证明 porA 假基因为靶序列建立的淋球菌 PCR 检测方法敏感度和特异性均为 100.0%,适于作为淋病临床实验室辅助诊断和淋球菌阳性结果的确证方法。

参考文献:

- [1] Gerbase AC, Rowley JT, Heymann DHL, et al. Global prevalence and incidence estimates of selected curable STDs[J]. Sex Transm Inf, 1998, 74(1): 12-16.
- [2] Koumans EH, Johnson RE, Knapp JS, et al. Laboratory testing for Neisseria gonorrhoeae by recently introduced nonculture tests: a performance review with clinical and public health considerations [J]. Clin Infect Dis, 1998, 27(5): 1171-1180.
- [3] 周刚, 邱大卫, 秦大江, 等. 二重荧光定量 RT-PCR 检测胰腺癌患者 CD44v6 基因的表达[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(18): 2051-2053.
- [4] 张金菊, 牛桓彩. 实时荧光定量 RT-PCR 在麻疹和风疹病毒检测中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(2): 256-257.
- [5] Whiley DM, Sloots TP. Comparison of three in-house multiplex PCR assays for the detection of Neisseria gonorrhoeae and Chlamydia trachomatis using real-time and conventional detection methodologies[J]. Pathology, 2005, 37(5): 364-370.
- [6] Hjelmevoll SO, Olsen ME, Sollid JU, et al. A fast real-time poly-
- [7] Boel CHE, Herk CMC, Berretty PJM, et al. Evaluation of conventional and real-time PCR assays using two targets for confirmation of results of the COBAS AMPLICOR chlamydia trachomatis/neisseria gonorrhoeae test for detection of neisseria gonorrhoeae in clinical samples[J]. J Clin. Microbiol, 2005, 43(5): 2231-2235.
- [8] Whiley DM, Tapsall JW, Sloots TP. Nucleic acid amplification testing for Neisseria gonorrhoeae[J]. J Mol Diagn, 2006, 8(1): 3-15.
- [9] Martin D, Cadieux N, Hamel J, et al. Highly conserved Neisseria meningitidis surface protein confers protection against experimental infection[J]. J Exp Fed, 1997, 185(7): 1173-1184.
- [10] Feavers IM, Maiden MC. A gonococcal porA pseudogene: implications for understanding the evolution and pathogenicity of Neisseria gonorrhoeae[J]. Mol Microbiol, 1998, 30(3): 647-656.
- [11] Unemo M, Norle'n O, Fredlund H. The porA pseudogene of Neisseria gonorrhoeae-low level of genetic polymorphism and a few, mainly identical, inactivating mutations[J]. APMIS, 2005, 113(6): 410-419.
- [12] Whiley DM, Buda PJ, Bayliss J, et al. A new confirmatory Neisseria gonorrhoeae real-time PCR assay targeting the porA pseudogene[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2004, 23(9): 705-710.

(收稿日期:2011-10-08)

• 检验技术与方法 •

光镜下尿红细胞形态检查在血尿诊断中的应用价值

许艳茹

(广东省东莞市大朗医院检验科 523770)

摘要:目的 探讨光镜下尿红细胞形态检查对血尿定位诊断的作用及临床意义。**方法** 用光学显微镜对血尿中红细胞进行计数及形态分型;应用 Midtron Juion II 尿干化学分析仪对尿酸碱度、蛋白、隐血试验进行分析。对照肾小球性血尿判断标准区分肾性和非肾性血尿。**结果** 肾小球肾炎组光镜下尿中红细胞数及畸形率比非肾小球疾病组显著升高。尿畸形红细胞对诊断肾小球性血尿的敏感性为 87.1%,特异性为 91.9%,与文献报道大致相符。**结论** 光镜下尿红细胞形态检查对血尿来源的定位诊断具有指导作用,敏感性和特异性高,且无需特殊仪器设备,适于基层医院普及,是一种值得推广的方法。

关键词:尿; 红细胞; 血尿; 显微镜检查; 畸形红细胞

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.10.044

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)10-1240-02

目前应用相差显微镜观察血尿中红细胞形态(红细胞位相检查)来鉴别肾小球性和非肾小球性血尿已有较多研究。因相差显微镜价格不菲,基层单位难以购置,并且使用相差显微镜需要一定技术,使其应用受限。为普及应用,作者对其进行了改进,在光镜下观察尿红细胞形态,计数尿红细胞及畸形红细胞数,肾小球性血尿由于抗体、酸碱度、渗透压和挤压的影响易发生形态改变,同时用尿干化学法进行尿常规检测,用 pH、蛋白、隐血试验作为参考,对照肾小球性血尿判断标准,判断血尿来源,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2011 年 3~11 月本院门诊肾内科及泌尿外科 170 例患者尿液标本,其中肾小球肾炎组 100 例,男 28

例,女 72 例,年龄 14~75 岁;非肾小球性疾病组 70 例,男 22 例,女 48 例,年龄 12~80 岁。

- 1.2 器材** Olympus 显微镜、改良牛鲍计数板、离心机、离心管、Midtron Junior II 尿干化学分析仪等。
- 1.3 方法** 患者早晨留取尿液 30~50 mL 并及时送检。在离心管中倒入充分混匀的清洁晨尿 10 mL,1 500 r/min 离心 5 min,弃上清液,保留 0.2 mL 尿沉渣^[1-2],轻轻混匀后取 1 滴直接滴入牛鲍计数池中调节光学显微镜聚光镜强度,在暗视野中观察尿红细胞形态,计算尿红细胞数、异形红细胞数以及异形红细胞所占比例。对照肾小球性血尿判断标准:尿红细胞大于 8 000 个/毫升;畸形红细胞大于 80% 以上^[3]。同时用尿干化学分析仪进行尿常规检测作为参考。