

• 检验仪器与试剂评价 •

两种实时荧光定量核酸检测试剂盒测定 TB DNA 结果比较*

龙幼敏, 李国豪, 梁广铁, 明凯华, 雷秀霞[△]

(广州医学院附属广州市第一人民医院检验科, 广东广州 510180)

摘要:目的 探讨两种国产实时荧光定量 PCR(FQ-PCR)试剂盒快速诊断肺结核病的准确性和可行性。方法 选取 60 例活动期肺结核患者样本及正常对照样本、标准品和质控品, 使用两种国产实时荧光定量核酸检测试剂盒分别进行 TB DNA 检测。结果 两种试剂阴阳结果符合率为 100%, 均未出现假阳性和假阴性结果; 两种试剂在 TB DNA 载量为 $10^4 \sim 10^7$ IU/mL 范围内线性关系良好, 重现性试验显示变异系数均小于 4%; 60 例阳性标本中湖南某公司 TB DNA 定量结果高于广州某公司结果 45 例, 低于广州某公司结果 15 例; 两组资料 TB DNA 定量比较, $P < 0.01$; 相应地其 CT 结果均低于广州某公司试剂, CT 相差值的波动范围在 (3.44 ± 1.66) 之间。结论 两种国产实时荧光定量 PCR 试剂盒能快速、有效地诊断肺结核病, 其特异性较高, 能够满足结核早期诊断的要求。

关键词: 结核分枝杆菌; 聚合酶链反应; 实验室技术和方法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.07.052

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)07-0864-02

结核病是由结核分枝杆菌感染引起的疾病, 其诊断方法主要有细菌学涂片染色和培养等, 但由于其局限性限制临床诊疗^[1]。荧光定量 PCR 技术在目前国内的临床诊断中应用最为广泛^[2-3]。本文拟通过使用两种国产实时荧光定量核酸检测试剂盒对 60 例临床确诊的活动期肺结核患者和 5 例健康体检者痰液进行 TB DNA 载量检测, 探讨该两种国产实时荧光定量 PCR 试剂盒快速诊断肺结核病的准确性和可行性。

1 资料与方法

1.1 标本来源 60 例阳性检测样本采自广州市胸科医院活动期肺结核患者, 5 例正常对照样本采自本院健康体检者。样品采集后保存于 -80°C 冰箱备用。

1.2 仪器与试剂 实时荧光定量 PCR 检测试剂盒由广州某基因股份有限公司和湖南某科技有限公司提供; 仪器设备 LightCycler 480 由德国罗氏公司提供; KITMAN-T24 高速冷冻离心机由日本 TOMY 公司提供。

1.3 方法

1.3.1 标本处理 痰液中加入 4 倍体积的 4% NaOH, 摇匀, 室温下放置 30 min 以上液化, 取 1 mL 至 1.5 mL 离心管中, 振荡摇匀, 于冷冻离心机中 12 000 r/min 离心 5 min, 吸弃上清, 沉淀加入 1 mL 无菌生理盐水打匀, 12 000 r/min 离心 5 min; 再重复洗涤一次, 吸弃上清后, 于沉淀中加入 50 μL 无菌生理盐水混匀后平分两管。其中一管加入 50 μL 广州某公司的 DNA 提取液振荡摇匀后 100°C 干浴 10 min, 于冷冻离心机中 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清 2 μL 点样至含 PCR-mix 43 μL 的 PCR 反应管中, 上 PCR 仪扩增。循环参数为: $93^\circ\text{C} \times 2$ min 共 1 个循环; $93^\circ\text{C} 45$ s, $55^\circ\text{C} 60$ s 共 10 个循环; $93^\circ\text{C} 30$ s, $55^\circ\text{C} 45$ s 共 30 个循环。另一管加入 50 μL 湖南某公司的核酸释放剂, 100°C 干浴 10 min 后 12 000 r/min 离心 3 min, 取上清 5 μL 点样至含 PCR-mix 40 μL 的 PCR 反应管中, 上 PCR 仪扩增, 循环参数为: $50^\circ\text{C} 2$ min 一个循环; $94^\circ\text{C} \times 5$ min 一个循环, $94^\circ\text{C} 15$ s, $57^\circ\text{C} 30$ s 共 45 个循环。

1.3.2 线性和重现性分析 将 $10^4 \sim 10^7$ IU/mL 标准品和质控品分别用两种试剂复管 FQ-PCR 扩增, 考察其线性关系、重现性。

1.4 统计学处理 采用统计软件 SPSS17.0, $P < 0.05$ 为差异

具有统计学意义。

2 结果

2.1 两种 FQ-PCR 检测试剂盒阴阳结果符合率 60 例临床确诊的活动期肺结核患者痰液两种试剂均能同时检测出阳性结果, 5 例健康体检者痰液均同时检测为阴性结果, 两种试剂阴阳结果符合率为 100%, 均未出现假阳性和假阴性结果。

2.2 两种 FQ-PCR 检测试剂盒线性和重现性分析 两种试剂在 TB DNA 载量为 $10^4 \sim 10^7$ IU/mL 范围内线性关系良好, 相关系数分别为: $r_{\text{广州某公司}} = 0.996 2$, $r_{\text{湖南某公司}} = 0.999 9$; 重现性试验结果显示各组数据变异系数均小于 4%, 重现性较好。

2.3 两种试剂 TB DNA 载量对数值结果比较 FQ-PCR 结果显示, 60 例阳性标本中湖南某公司 TB DNA 定量结果高于广州某公司的 45 例, 低于广州某公司的 15 例, 两组资料含量比较, $P < 0.01$; 两种试剂盒检测的病毒载量对数值呈很好的线性关系, $P < 0.01$ 。

2.4 两种试剂 TB DNA 载量 CT 值结果比较 FQ-PCR 结果显示, 湖南某公司 TB DNA CT 结果均低于广州某公司, CT 相差值的波动范围在 (3.44 ± 1.66) 。两组资料 CT 值比较, $P < 0.01$; 两种试剂盒检测的病毒载量 CT 值呈很好的线性关系, $P < 0.01$ 。

3 讨论

PCR 技术在生命科学研究中得到了广泛的应用^[4]。金建东^[5]对 51 例已确诊的结核病标本进行直接涂片、浓集涂片找抗酸杆菌、痰结核杆菌培养和 FQ-PCR 检测 TB DNA, 阳性率分别为 21.5%、35.2%、33.3% 和 72.5%, 结果显示 FQ-PCR 法检测 TB DNA 阳性率高, 建议列入 TB 实验诊断的常规项目, 并可作为疗效观察指标。张东浩和李影^[6]与吕中全等^[7]分别采取荧光定量 PCR、抗酸菌涂片染色和改良罗氏培养三种方法进行检测, 阳性率分别为 72.66%、28.37%、48.10%, 结果显示荧光定量 PCR 检测具有灵敏度高、操作简便、快速的特点, 可作为结核病的常规诊断方法。

本研究结果显示两种 FQ-PCR 检测试剂盒对 TB DNA 的检测准确度较高, 未出现假阳性和假阴性结果, 在 $10^4 \sim 10^7$ IU/mL 范围内线性关系和重现性良好; 60 例阳性标本中湖南

* 基金项目: 广州市中医药、中西医结合科研资助项目(2010A06)。 [△] 通讯作者, E-mail: leixx999@163.com。

某公司 TB DNA 定量结果普遍高于广州某公司,相应地 CT 结果均低于广州某公司试剂,CT 相差值的波动范围在(3.44±1.66)之间。究其原因可能有两个:一是由于湖南某公司试剂使用的核酸释放剂是一种加入了表面活性肽的专利产品,能高效快速地释放出样品中核酸,有效地提高了检测灵敏度和产物量;另一个原因可能是由于湖南某公司试剂使用的模板量是 5 μL 反应总体积为 45 μL,相对于广州某公司试剂使用的模板量是 2 μL,反应总体积为 45 μL,湖南某公司试剂使用了更多的模板量,但更多的模板量就意味着干扰 PCR 反应的干扰物质含量也就更多,这样就要求其 PCR-mix 中缓冲液的抗干扰能力要更强,湖南某公司试剂 PCR-mix 中缓冲液显示了较强的抗干扰能力,因此就有效地提高了扩增过程中的产物量。王伟华和刘伟^[8]建立了双探针实时 PCR 方法能快速、准确地检测结核分枝杆菌 rpoB 基因位点的突变,快速诊断结核分枝杆菌利福平(RFP)耐药。罗丹等^[9]使用膜反向斑点杂交技术快速、简便地检测了部分结核分枝杆菌对异烟肼、利福平和链霉素的耐药性。

由此可见,PCR 技术是目前诊断结核病快速、有效的方法,其特异度和敏感度均较高,能够满足结核早期诊治的要求,在临床应用上有良好的前景。余春开和冯瑞娥^[10]认为重复性好、自动化程度高且结果可靠的分子生物学诊断技术的研究是今后结核病早期诊断治疗的重点研究方向。

参考文献

[1] 李文丽,李金明. 结核病实验室诊断新进展[J]. 实用医院临床杂志. 检验仪器与试剂评价.

志,2012,9(3):11-14.
[2] 季红兵,朱蓉. 荧光 PCR 检测尿中结核分枝杆菌的价值[J]. 中国误诊学杂志,2007,10(24):5753-5754.
[3] 胡荣盛,徐亚丽. 荧光定量 PCR 法在结核杆菌检测中的价值[J]. 现代实用医学,2008,20(10):767-769.
[4] 李金明. 实时荧光定量 PCR 技术[M]. 北京:人民军医出版社,2007:1-13.
[5] 金建东. 荧光定量 PCR 检测痰结核杆菌 DNA 及其临床应用[J]. 齐齐哈尔医学院学报,2010,31(22):3565-3566.
[6] 张东浩,李影. 荧光定量 PCR 痰检测痰结核分枝杆菌 DNA 的应用价值[J]. 临床研究,2012,10(1):90-91.
[7] 吕中全,张明新,张慧. 荧光定量聚合酶链反应检测结核分枝杆菌的价值[J]. 新乡医学院学报,2011,28(4):435-436.
[8] 王伟华,刘伟. 快速方法检测耐利福平结核分枝杆菌基因突变的研究[J]. 山东医药,2009,49(9):89-90.
[9] 罗丹,向延根,潘建华,等. 反向斑点杂交技术检测结核分枝杆菌 C 种耐药相关基因[J]. 吉林大学学报:医学版,2011,37(4):759-762.
[10] 余春开,冯瑞娥. 结核分子生物学诊断技术的研究进展[J]. 中华肺部疾病杂志:电子版,2011,4(4):324-329.

(收稿日期:2012-11-07)

AU5400 两个单元检测结果的差异与对策

江泽友,徐 灿

(成都中医药大学附属医院检验科,四川成都 610072)

摘要:目的 通过项目设置方案及试剂开瓶效期管理流程的优化提高 AU5400 检测系统的检测质量。方法 通过新鲜样本的比对试验计算两个单元检测相同项目结果的偏倚。比较 AU5400 两个单元独立设置检测项目和两个单元平均分配检测项目两种方案对检测系统的精密度和系统稳定性的影响。结果 两个单元平均设置检测项目的方案可以明显提高检测系统的准确度、精密度及稳定性,以及有效地控制失控的概率。结论 AU5400 两个单元平均分配检测项目的方案能优化试剂使用、管理流程,提高检测系统检测结果的质量。

关键词:实验室技术和方法; 检测系统; 指示剂和试剂
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.07.053

文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2013)07-0865-02

AU5400 为日本 OLYMPUS 生产的大型高端全自动生化分析仪,本科室使用北京中生北控和四川迈克公司的 AU 配套试剂,由于两个单元试剂的使用量几乎相同,因此几乎是每天都要添加试剂,造成机内试剂待机时间较长,有时还会出现不同批号的试剂混用及更换试剂没有作校准的情况;针对实际工作中出现的问题对项目设置方案进行调整以保证检测结果的质量^[1-2]。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 OLYMPUS AU5400 全自动生化分析仪,项目参数按试剂说明书设置。CREA、MG 检测使用德国罗氏试剂;ALT、AST、GLU、UREA、UA、CA、CHO、TG、CK、LDH、HBDH 检测使用北京中生北控试剂;TP、ALB、AKP、GGT、TBIL、DBIL、P 检测使用四川迈克试剂。

1.2 方法 两个单元采用相同的试剂及校准品校准且检测室内质控均在控,每天检测 8 例样本按正反两个顺序分别测定 1

次,连续测定 5 个工作日,共测定 40 例样本,样本浓度要求在分析测量范围均匀分布;计算两组结果的偏倚^[3-7]。精密度评价采用两种方案各一个月的室内质控的 CV% 的大小,而系统稳定性则是观察方案 1 和方案 2^[8-9]。方案 1:AU5400 两个单元分别独立设置 T 检测项目,两个单元上的检测项目完全相同,每个项目占用一个试剂位。案 2:一单元设置 TP、ALB、ALT、AST、CREA、UA、CA、CHO、TG、CK 等检测项目;二单元设置其余检测项目,两个单元上的检测项目不重合,每个项目可以占用 2~3 个试剂位。

2 结 果

2.1 AU5400 两个单元检测相同项目结果比较 MG、CR、TP、ALB、ALT、AST、GGT、DBIL 等项目的偏倚大于 2%,其中 DBIL 的偏倚为 6.19%。

2.2 系统精密度和稳定性 比较方案 1 和方案 2 在 1 个月室