



图 6 黄疸对磁珠法检测 HBV DNA 的影响

3 讨 论

抽血及标本离心均可致标本溶血,这在临床上经常遇到,黄疸在肝病中更是十分常见,HBV DNA 检测主要用于 HBV 感染的诊断及治疗效果和抗病毒药物的疗效评价,其对象主要是肝炎患者,临床肝病血清标本不但含有各种离子、而且还有总胆红素、血红蛋白和药物等干扰 PCR 扩增的有机物,不同核酸提取方法去除 PCR 干扰物质能力如何,将对荧光 PCR 定量结果产生重要影响^[2]。目前,血清中 HBV DNA 的提取方法有多种,在提取核酸过程中,不同的提取、检测方法及不同来源的试剂,对临床标本 HBV DNA 定量检测结果影响的程度可能不一样^[3]。陈晓东等^[4]比较肝素对 4 种核酸提取方法的影响,发现对磁珠法的影响最小,本实验结果表明磁珠法对溶血和黄疸的抗干扰能力最好,提示磁珠法提取核酸纯度高,去除干扰成分的能力非常强。

为保证实验结果的可比性,本研究在实验设计上采用除核酸提取过程不同外,其余操作包括模板上样量及扩增试剂均相同,并在同一扩增仪上同时检测。结果显示:当 Hb≤0.5 g/L 时,3 种方法均无明显影响,表明 3 种方法对微量溶血的抗干扰能力无差异;Hb=5.0 g/L 时,仅磁珠法不受影响;Hb=50.0 g/L 时,3 种方法均有较明显影响,一步法与沉淀煮沸法可被抑制呈阴性,这些与扩增模板溶液中存在或未除尽的高浓度的 Hb 及其变性后的衍生物对 Taq 酶的抑制作用有关^[5];实验中不同程度黄疸均对一步法有明显影响,扩增荧光曲线及检测结果显示:不同浓度的总胆红素对一步法的影响大致接近,与 Neumaier 等^[5]的结果不一致,有待进一步研究;而对磁珠法与沉淀煮沸法均无明显影响,说明磁珠法与沉淀煮沸法清除胆红素十分有效。

由于标本成分直接或衍生的干扰,这些干扰可实时反映在

• 检验技术与方法 •

扩增荧光曲线上,从而对实验结果造成影响。为比较在结果判断过程中调整部分参数对实验结果的影响,在允许的范围内,本文对“设定循环范围”及“设定循环范围内的背景倍数”作了适当调试,通过两种方式判断的结果表明:除一步法在总胆红素干扰下差异有统计学意义外其余两种取提法均无统计学意义,调整后结果显示更接近对照值;提示在允许的范围内总胆红素所致的干扰通过调整部分结果判断参数可得到一定程度的修正。

值得一提的是一步法只需将血清和提取试剂混匀后即可与反应液混合直接进行扩增,其操作程序快捷,但标本中的干扰成分几乎全部参与扩增反应,抗干扰能力相对较差。该产家提供的 PCR 反应试剂中含有 ROX 荧光染料,ROX 荧光染料可提高定量数据的精度和重现性,使实验结果数据之间的更具可比性,可降低干扰因素的影响,但要求检测仪器具备多色检测能力。由于本科室使用的扩增仪为双色检测,不能应用并发挥 ROX 荧光的归一作用,这是本研究中一步法对黄疸抗干扰力较差的重要因素。一步法操作简便快捷,从试剂研发推广角度而言,解决了干扰的问题,具有很好的推广应用价值。

参考文献

- [1] 黄翔,王晖,周志明,等.溶血和脂血标本中乙肝病毒 DNA 提取方法的选择与评价[J].中华医学杂志,2004,28(2):123-124.
- [2] Legendre LA, Bienvenue JM, Roper MG, et al. A simple, valveless microfluidic sample preparation device for extraction and amplification of DNA from nanoliter-volume samples[J]. Anal Chem, 2006,78(5):1444-1451.
- [3] 刘佳,徐军,王雪飞,等.三种 HBV DNA 提取方法对荧光定量 PCR 检测结果影响的比较[J].中华检验医学杂志,2008,31(7):780-783.
- [4] 陈晓东,陶志华,周武.核酸提取方法在聚合酶链反应测定乙肝病毒核酸中的评价[J].中华检验医学杂志,2002,25(4):212-214.
- [5] Neumaier M, Braun A, Wagener C. Fundamentals of quality assessment of molecular amplification s in clinical diagnostics[J]. Clin Chem, 1998,44(1):1-26.

(收稿日期:2013-01-16)

胶体金法快速检测结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌的研究

白广红¹,李耀军²,焦向阳¹

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

摘要:目的 应用结核分枝杆菌(TB)抗原胶体金法快速检测 TB 和非结核分枝杆菌(NTM)。方法 用 TB 抗原胶体金法鉴定培养、抗酸染色双阳性标本,对鉴定为 NTM 的标本与罗氏培养鉴别法比较。结果 342 例标本抗原胶体金法检出 284 例 TB(83.0%);检出 58 例 NTM(17.0%)。对 42 例标本重复检测结果符合率为 100%。对 58 例 NTM 标本用传统的罗氏培养鉴别法(PNB、TCH)比较符合率为 91.4%,两者之间差异无统计学意义($\chi^2=3.34, P>0.05$)。结论 TB 抗原胶体金法可快速鉴别 TB 和 NTM,有利于指导临床制定针对性的治疗方案,开展有效的化疗。

关键词:抗原胶体金法; 结核分枝杆菌; 非结核分枝杆菌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.10.034

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)10-1274-03

结核病是结核分枝杆菌(TB)感染引起的严重危害人类健康的传染病。自 20 世纪 90 年代以来,结核病疫情出现“复燃”

趋势^[1]。结核病防治面临两大难题,一是结核耐多药(MOR)的产生与传播,二是非结核分枝杆菌(NTM)发病率的增加。

NTM 耐药性很高,因此在临床上明确病原至关重要。在结核病的诊断中,TB 感染与 NTM 感染临床表现相似,临床难以区分,TB 与 NTM 的感染依赖实验诊断。目前国内采用的传统的罗氏培养鉴定法操作繁琐,需要时间较长,延误诊断治疗。BACTEC960 培养系统培养分枝杆菌虽然快速,但其缺乏鉴定方法,且价格昂贵。近期推出的结核分枝杆菌抗原胶体金法快速检测用以区分 TB 与 NTM,15 min 可以完成诊断检测,有利于指导临床开展早期有效的治疗,笔者对其进行了比对研究,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 2011 年 6~11 月临床诊断为肺结核患者的痰液标本,经过 BACTEC960 系统进行分枝杆菌培养和抗酸染色均阳性,共 342 例。分枝杆菌标准菌株由陕西省结核病防治研究所结核病参比实验室提供。

1.2 仪器与试剂 结核分枝杆菌抗原检测试剂盒(胶体金法,批号 20090111)由杭州创新生物检控技术有限公司提供。结核分枝杆菌培养仪 BACTEC960 系统由美国 BD 公司生产。DNA Engine OPTICON2 实时荧光定量 PCR 分析仪由美国 MJ 公司生产,结核分枝杆菌核酸检测试剂由凯杰生物工程(深圳)有限公司提供(生产批号:2011110212)。

1.3 方法

1.3.1 细菌培养 挑取约 5 mL 痰液至 50 mL 已标记的离心试管中,加等量的 2%NALC-NaOH 前处理液,强力漩涡震荡 20 s,室温静置 15~20 min,加无菌 PAS(PH6.8)至约 50 mL,盖紧盖子,离心 3 000×g,15 min,弃上清液,添加 1~3 mL PBS(PH6.8)以中和 PH 至 6.8,取 0.5 mL 接种至 BACTEC MGIT 960 的培养指示管(MGIT 管)及涂片染色。在标本接种前,在 MGIT 培养管中,先加入 0.5 mL 营养添加剂(OADC)和 0.1 mL 杂菌抑制剂(PNATA)。放入 BACTEC MGIT 960 系统中进行培养。

1.3.2 抗酸染色 涂片自然干燥后火焰固定,滴加复红染色剂盖满痰膜,小心火焰加热出现蒸汽后脱离火焰,染色 3 min 用水轻洗,自痰膜外缘滴加脱色剂,脱色至无可视红色为止。用水轻洗,滴加亚甲蓝复染液 30 s,用水轻洗待干后镜检。

1.3.3 抗原检测 用结核分枝杆菌抗原胶体金法进行鉴定。将样本 100 μ L 下滴到检测板的样本滴下部,15 min 后观察检测板的判定部,在 60 s 内判定完毕。检测线(T)处及质控线(C)双方都确认出现紫红色条带为阳性,检测线(T)处没有出现紫红色条带,只是在质控线(C)出现紫红色为阴性。

1.3.4 罗氏鉴别 将鉴定为 NTM 的菌液 0.1 mL(在报阳性后 3 d 之内)接种于罗氏鉴别培养基 PNB 和 TCH 固体培养基上,根据生长情况观察统计结果,有生长菌落为阳性,无菌落生长为阴性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计学软件进行数据分析,抗原胶体金法与罗氏培养鉴定法检测结果的比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抗原胶体金法检测双阳性标本 用抗原胶体金法对 342 例 BACTEC960 培养阳性标本进行检测,共检出 TB 分离株 284 株,检出率为 83.0%,检出 TNM 分离株 58 株,检出率为 17.0%。

2.2 NTM 标本罗氏培养鉴定 对抗原胶体金法检出的 58 株 NTM 分离株,经传统的改良罗氏培养鉴定(PNB、TCH)法进行检测,共检出 TNM 分离株 53 株、TB 分离株 5 株。抗原

胶体金法与传统的罗氏培养鉴定法比较,检测 NTM 的符合率为 91.4%,两种方法之间差异无统计学意义($\chi^2=3.34, P>0.05$)。

3 讨论

中国是全球 22 个结核病高发国家之一,肺结核患者总数居全球第二位。据报道中国活动性肺结核患者 450 万,耐药患者 55.5 万^[2]。NTM 菌株占分离株的 11.1%,其耐药率为 95.9%,耐多药率为 83.7%,给我国社会造成巨大损失^[3]。在临床工作中,TB 引起的结核病与 NTM 引起的疾病临床表现相似,很难区分是 TB 还是 NTM 感染,必须通过菌型鉴定才能进行区分。所以 TB 与 NTM 感染的早期鉴别诊断对指导临床开展有效化疗有重大意义。

菌型鉴定的方法有传统的罗氏培养鉴定法(PNB、TCH 鉴别法)、分子生物学方法、全相色谱技术分析鉴定法。目前临床实验室的 TB 与 NTM 的鉴别主要用传统的罗氏培养鉴别法进行。在结核病的诊断中,结核菌培养是结核病诊断的“金标准”,结核菌的培养方法主要是固体培养和液体培养^[4]。培养法耗时很长,操作复杂,实验室很易产生气溶胶,污染大^[5]。实时荧光定量 PCR 可区分 TB 与 NTM,灵敏度较高,但是该方法试验条件要求高,易污染,假阳性高,操作较复杂,耗时也需 1 d^[6]。气相色谱技术分析鉴定法所用设备昂贵,操作复杂,需要几个小时。因此简便快速的菌型鉴定方法对提高是很有意义的。

本研究采用结核分枝杆菌抗原胶体金法对 342 例经 BACTEC960 培养系统抗酸菌培养阳性的菌液标本和 58 例经抗原胶体金法鉴别的 NTM 进行临床试验。结果显示抗原胶体金法检测 TB 的灵敏度为 83.0%;对抗原胶体金法检测为 NTM 的 58 株分离株,经罗氏培养鉴定法进行检测,53 株为 NTM,5 例为 TB 两种检测方法检测 NTM 的符合率为 91.4%,经统计学分析差异无统计学意义($P>0.05$)。同时在 342 例标本中随机抽取 42 例用抗原胶体金法重复两次检测结果符合率为 100%,说明抗原胶体金法检测的重复性好。

后期对经改良罗氏法鉴定的 5 例结核进行了进行了荧光实时定量 PCR 检测,结果 5 例均为 TB。而胶体金抗原法检测 58 份,经 BACTEC960 培养系统培养分枝杆菌阳性菌液,将 5 例 TB 误判为 NTM。分析其原因主要是胶体金抗原法鉴定 TB 与 NTM 还存在一定的局限性,在结核菌中 *Mycobacterium bovis* BCG 的几个亚株(Copenhagen 株、Glaxo 株、Pasteur 株、Tice 株)不产生 MPB64 抗原或当 MPB64 的浓度低于该试剂的检测范围,胶体金抗原法也会将 TB 误判为 NTM。

常用的液体培养方法是美国 BD 公司生产的 BACTEC-960 培养系统,其分枝杆菌培养阳性时间平均 9 d,极大的缩短了培养时间,但其无法区分 TB 与 NTM。实验室经 BACTEC960 培养系统培养分枝杆菌阳性后,对其菌液用结核分枝杆菌抗原胶体金法进行鉴定很快速,仅需 15 min。所以,用结核分枝杆菌抗原胶体金法与其配合作 TB 与 NTM 的鉴定极大的缩短了时间,该方法操作简单、既经济又实用,能有效地解决 BACTEC960 培养系统在分枝杆菌鉴定方面的不足。

结核分枝杆菌抗原胶体金鉴定技术具有特异度强,灵敏度高,重复性好,简便快速等优点。将结核分枝杆菌抗原胶体金法与罗氏培养鉴定法进行联合检测对提高鉴定准确率,指导临床治疗结核病情重大^[7]。

参考文献

[1] 王苏民. 结核病及其实验技术的现状与展望[J]. 中华检验医学杂

志,2001,24(1):71-72.

[2] 全国结核病流行病学抽样调查技术指导组. 第四次全国结核病流行病学抽样调查报告[J]. 中华结核和呼吸杂志,2001,25(1):3-7.

[3] 梁建琴,高华方,李洪敏,等. PCR 荧光探针法快速检测结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌[C]. 中华医学会结核病学分会学术会议论文汇编,2011:20-23.

[4] 毕爱笑,金文国,丁元生,等. TB-SA 结核抗体检测临床应用评价[J]. 同济大学学报:医学版,2007,29(2):77-78.

[5] 端木宏瑾,屠德华,张培元,等. 临床技术操作规范:结核病分册

[M]. 北京:人民军医出版社,2004:25-46.

[6] 高孟秋,初乃惠,王海英,等. 结核分枝杆菌特异度蛋白抗体检测在结核病诊断中的价值[J]. 中华结核和呼吸杂志,2007,30(12):918-920.

[7] 乐军,梁莉,李苏辉,等. 酶联免疫斑点试验快速诊断结核分枝杆菌感染的临床应用价值[J]. 中华检验医学杂志,2006,29(11):1005-1008.

(收稿日期:2013-01-21)

• 检验技术与方法 •

时间分辨荧光免疫分析测定乙型肝炎病毒表面抗原 Cut-off 值的确定

颜永乾

(四川省泸州市第二人民医院,四川 泸州)

摘要:目的 利用受试者工作曲线(ROC)验证和重新确定时间分辨荧光免疫分析(TR-FIA)测定乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)的诊断阈值(Cut-off)。方法 回顾性分析该院门诊、住院及社会体检人群的 HBsAg 的定量值。以不同的 Cut-off 值进行数据分组。再根据灵敏度和特异度绘制 ROC 曲线。**结果** 该科现用的试剂说明书给定的 Cut-off 值为 0.2 ng/mL,其灵敏度和特异度分别是 0.998 7,0.330 4,尤登指数为 0.329 1;以 0.4 ng/mL 为 Cut-off 值时,其灵敏度和特异度分别是 0.986 2,0.959 9 尤登指数为 0.946 1。**结论** 应用 ROC 曲线对临床实验室、该区域人群进行分析,可以更科学地得出适合该实验室、该区域人群的临床诊断的灵敏性和特异度,进而找到最理想的临床诊断界点,即 Cut-off 值。也可以对不同仪器、试剂进行相应参数的比较和调整。

关键词:时间分辨荧光免疫分析; ROC 曲线; 肝炎表面抗原,乙型

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.10.035 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2013)10-1276-03

TR-FIA 具有灵敏度高、特异度好、采用自动化分析系统、易于大规模批量操作等优点,已广泛应用于临床,并逐步受到人们的重视^[1-2]。但其 Cut-off 值的设定,各家不尽相同,有的点连溯源值和单位也不同(比如:MIU/mL,PEIU/mL,NCE/mL,DRU/mL),试剂厂家所使用的定值参考人群也不同。因此,各商家试剂产品说明书提供的 Cut-off 值存在一定的差别。进口试剂的差别更大。因此,Cut-off 值的确定是 TR-FIA 自动化和标准化的关键。建立本实验室的 Cut-off 值是迫切需要解决的问题。本文就对 TR-FIA 定量测定 HBsAg 的 Cut-off 值设定进行回顾性分析,并验证试剂说明书提供的 Cut-off 值以及确定本实验室的 Cut-off 值。从而为临床提供更为可靠实用的诊断效能。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本院门诊、住院和社会体检人群的 HBsAg 定量测定结果(以发出报告数据结果为准)按结果数据大小排列,并进行分组。经微粒子酶免分析确定,HBsAg 阳性组 720 例,男 341 例,年龄 0~81 岁;女 379 例,年龄 0~84 岁。HBsAg 阴性组 14 970 例,男 6 890 例,年龄 0~82 岁;女 8 080 例,年龄 0~79 岁。

1.2 仪器与试剂 ANYTEST 时间分辨荧光分析仪,EFFI-CUTA 全自动样本前处理系统。HBsAg 诊断试剂盒为苏州新波生物技术有限公司产品,试剂批号 20120515。试剂盒随带的 A:0 ng/mL,B:0.22 ng/mL,C:1.00 ng/mL。试剂批号:20120515。

1.3 方法 按试剂盒说明书操作,由前处理系统完成加样、孵育、加试剂、洗涤。然后由荧光分析仪进行荧光值的判读。

1.4 统计学处理 利用 SPSS13.0 软件作数据分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 数据分析与验证 因试剂盒设定的 Cut-off 值为 0.2 ng/mL(浓度值大于或等于 0.2 ng/mL 时判为阳性)。故以 0.2 ng/mL 为中心设定 0.050、0.100、0.150、0.200、0.250、0.400、0.500、1.000、2.000、5.000 的 10 个 Cut-off 值,再根据 HBsAg 阳性和阴性数据分布表(见表 1),获得不同测定值的标本例数,作 ROC 曲线分析,得出 HBsAg 阴性和阳性监测结果按不同 Cut-off 值的判断列表(见表 2)。初步验证以 0.2 ng/mL 为 Cut-off 值时,其尤登指数为 0.329 1。以 0.4 ng/mL 为 Cut-off 值会得到更接近 1 的尤登指数。

表 1 720 份 HBsAg 阳性和 14 970 份 HBsAg 阴性标本测定值分布(n)

测定值	阳性分布	阴性分布
<0.05	0	870
0.05~0.10	0	840
0.10~0.15	0	1 240
0.15~0.20	1	1 996
0.20~0.25	3	956
0.25~0.40	6	8467
0.40~0.50	8	102
0.50~1.00	33	298
1.00~2.00	18	124
2.00~5.00	32	56
>5.00	619	21
合计	720	14 970