

3 种方法在泌尿生殖道沙眼衣原体检测中的应用和评价

王 礼¹,唐恒锋²

(1. 深圳罗岗医院检验科,广东深圳 518112;2. 深圳市观澜人民医院检验科,广东深圳 518110)

摘 要:目的 评价免疫层析法(ICA)、酶联免疫吸附试验(ELISA)及荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)三种方法在检测泌尿生殖道沙眼衣原体(CT)中的应用价值。**方法** 采用 ICA、ELISA 和 FQ-PCR 三种方法同时对该院性病门诊、妇科及泌尿外科门诊 825 份泌尿生殖道标本进行 CT 检测,分别计算三种方法的灵敏度、特异性、约登指数、阴性预测值(NPV)和阳性预测值(PPV)。**结果** 858 例标本中阳性结果 154 例,阴性结果 704 例,阳性率为 21.9%。ICA、ELISA 和 FQ-PCR 三种方法的灵敏度分别为 50.6%、92.9%及 96.7%,约登指数分别为 50.2%、91.5%和 95.7%,NPV 分别为 90.2%、98.4%和 99.3%。经比较,ICA 的灵敏度、约登指数和 NPV 均明显低于 ELISA 和 FQ-PCR,差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** ELISA 与 FQ-PCR 具有较一致灵敏度、特异性、约登指数、NPV 和 PPV,均可为临床治疗和监测 CT 提供可靠的依据;ICA 虽然操作简便,但灵敏度较差,作为实验诊断 CT 感染的方法不太理想。

关键词:沙眼衣原体; 免疫层析法; 酶联免疫吸附试验; 荧光定量聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.11.032 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2013)11-1418-02

沙眼衣原体(CT)是一种常见的性病病原体,会引起泌尿生殖道感染、包涵体包膜炎、性病淋巴肉芽肿等,但其感染在临床上多呈隐性感染,表现为无症状或轻微症状而不为患者所重视^[1]。因此,建立一种快速、敏感、特异的检测方法就显得非常重要。本文选择目前实验室使用较多的免疫层析法(ICA)、酶联免疫吸附试验(ELISA)及荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)三种方法同时对本院性病门诊、妇产科及泌尿外科门诊 825 例泌尿生殖道标本进行 CT 检测,分别计算三种法的灵敏度、特异性、约登指数、阴性预测值(NPV)和阳性预测值(PPV),现报道如下。

1 资料与方法

1.1 标本来源 858 例标本来自本院 2012 年 1~11 月性病门诊、妇产科及泌尿外科门诊人群的泌尿生殖道拭子标本。标本采集:女性用窥器暴露宫颈,用棉签拭去宫颈口周围的黏液及分泌物,再用采样拭子在宫颈管内 2~3 cm 处转动并停留 20 s 再取出;男性拭子深入尿道约 2~3 cm 处旋转一周并停留 10 s 后取出。

1.2 仪器与试剂 ICA 试剂为英国立明产品;ELISA 仪器为美国 Trinity 公司生产的全自动酶标检测仪,试剂为原厂配套的 ELISA 试剂;FQ-PCR 仪器为美国 ABI 公司生产的 ABI-7500 荧光定量 PCR 仪,试剂为中山大学达安基因股份有限公司产品。

1.3 方法 ICA、ELISA 和 FQ-PCR 严格按试剂盒操作说明操作及判断结果。结果判定标准:细胞培养是诊断 CT 的金标准,因其灵敏度低不适合作为现代高灵敏度方法的评价标准。参照文献[2]采用“扩大的金标准”,即 2 种以上方法检测为阳性判定为真阳性,仅有 1 种检测方法阳性或全部方法为阴性则判定为真阴性。以此作为评价三种方法的依据,分别计算三种法的灵敏度、特异度、约登指数、NPV 和 PPV。

1.4 统计学处理 采用 SPSS12.0 统计软件进行统计学分析,采用配对卡方检验两两比较 ICA、ELISA 和 FQ-PCR 三种方法的各项指标的统计学差异。

2 结 果

根据“扩大的金标准”判断,858 例标本中阳性结果 154 例,阴性结果 704 例,阳性率为 21.9%。在 154 例真阳性中,ICA、ELISA 和 FQ-PCR 三种方法检出阳性例数分别为 78 例、

143 例及 149 例;在 704 例真阴性中,ICA、ELISA 和 FQ-PCR 三种方法检出阴性例数分别为 701 例、694 例及 697 例,具体情况见表 1。ICA、ELISA 和 FQ-PCR 三种方法的灵敏度分别为 50.6%、92.9%及 96.7%,约登指数分别为 50.2%、91.5%和 95.7%,NPV 分别为 90.2%、98.4%和 99.3%,经比较 ICA 的灵敏度、约登指数和 NPV 均明显低于 ELISA 和 FQ-PCR 的灵敏度、约登指数和 NPV($P<0.01$)。具体情况见表 2。

表 1 三种方法的检测结果比较(n)

组别	ICA		ELISA		PCR	
	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
扩大金标准阳性(n=154)	78	76	143	11	149	5
扩大金标准阴性(n=704)	3	701	10	694	7	697

表 2 三种方法的各项指标比较(%)

方法	灵敏度	特异度	约登指数	PPV	NPV
ICA	50.6	99.6	50.2	96.3	90.2
ELISA	92.9*	98.6	91.5*	93.5	98.4*
FQ-PCR	96.7*	99.0	95.7*	95.5	99.3*

*: $P<0.01$,与 ICA 比较。

3 讨 论

泌尿生殖道 CT 感染是我国常见的性传播疾病之一,因其发病率高,流行广泛,对人的健康损害很大,已成为较为严重的公共卫生问题,《全国性病监测点监测方案》将其作为单独监测的病种^[1]。CT 是引起非淋菌性尿道炎的主要病原体之一。因此,选择特异、敏感、高效快速的检测方法辅助 CT 感染的早发现早治疗有重要的临床意义。

现阶段实验室诊断 CT 的方法主要有:细胞培养、直接免疫荧光染色、ICA、ELISA 和 FQ-PCR。其中仍以细胞培养作为金标准,其检测的是有繁殖能力的活体 CT,特异性强、结果可靠、无假阳性,阳性结果是临床诊断 CT 感染最直接的依据,但其操作繁琐,周期长,技术要求高,成本高,不利于临床大量标本的检测,且敏感性易受标本采集、运送、冻存、解冻、接种等过程中病原体量的丢失和病菌活力减弱或失活以及标本中抑制物质等因素的影响降低阳性检出率。ICA 检测时间短,操作

简单,无需特殊的设备,有较高的特异性但灵敏度低^[3],容易漏检。ELISA 法具有操作简便、快速、有仪器的自动化、结果易于判断的特点,适于大批量标本检测^[4]。FQ-PCR 是近年来发展应用的新技术,它融合了 PCR 的高敏感性和 DNA 杂交技术的高特异性以及光谱技术的高精确定量为一体,在全封闭下操作而避免污染造成假阳性,达到简便、快速、准确的检测病原体,还可以通过定量检测病原体的变化进行疗效观察^[5]。本文结果显示,三种方法的特异性高,均在 98.5% 以上,说明它们对真阴性标本检出能力高;三种方法的 PPV 高,均在 93.5% 以上,说明它们的假阳性率低;ICA 的灵敏度明显低于 ELISA 和 FQ-PCR 的灵敏度($P<0.01$),说明其对真阳性标本检出能力低,容易发生阳性漏检;ICA 的约登指数明显低于 ELISA 和 FQ-PCR 的约登指数($P<0.01$),说明其发现阳性和阴性标本的总能力都较低;ICA 的 NPV 明显低于 ELISA 和 FQ-PCR 的 NPV($P<0.01$),说明其假阴性率较高。

综上所述,ELISA 和 FQ-PCR 作为临床 CT 感染的实验室检测方法,其灵敏度、特异性均接近理想诊断方法的标准,两者的诊断符合率十分接近,均可作为临床治疗和监测 CT 提供可靠的依据;ICA 的灵敏度低,作为实验诊断 CT 感染的方法不太理想^[6]。因此,笔者建议有条件的实验室采用 FQ-PCR,标本

量大的实验室采用 ELISA,最好不用 ICA。

参考文献

- [1] 王千秋. 重视生殖道沙眼衣原体感染的防治[J]. 中华皮肤科杂志, 2007, 40(5): 257-259.
- [2] Black CM. Current methods of laboratory diagnosis of Chlamydia trachomatis infections[J]. Clin Microbiol Rev, 1997, 10(1): 160-184.
- [3] Yin YP, Peeling RW, Chen XS, et al. Clinic-based evaluation of Clearview Chlamydia MF for detection of Chlamydia trachomatis in vaginal and cervical specimens from women at high risk in China[J]. Sex Transm Infect, 2006, 82(suppl 5): v33-37.
- [4] 薛耀华, 郑和平, 薛秀娟, 等. 酶联免疫吸附试验和直接免疫荧光检测沙眼衣原体的方法学比较[J]. 岭南皮肤性病科杂志, 2009, 16(1): 38-40.
- [5] 廖启洪, 梁志东. 实时定量 PCR 和细胞培养及金标法检测不孕妇女沙眼衣原体[J]. 广东医学, 2006, 27(1): 81-82.
- [6] 乐宏元, 张振国, 刘晓虹, 等. 四种检测沙眼衣原体方法的诊断符合率分析[J]. 中国微生态学杂志, 2011, 23(6): 566-567.

(收稿日期: 2013-02-03)

单管巢式 PCR 结合测序技术检测 HBV YMDD 突变

唐 彦

(重庆市中医骨科医院检验科, 重庆 400010)

摘要:目的 为了进一步提高 HBV 低载量标本 YMDD 突变检测灵敏度, 建立一种快速检测方法。方法 分别采用单管巢式 PCR、双管巢式 PCR 和单管 PCR 对临床选择的 35 例标本进行 PCR 扩增, 然后进行 Sanger 测序验证, 对几种方法进行比较。结果 实验结果显示, 单管巢式 PCR 和双管巢式 PCR 的吻合度一致, 阳性率均为 [91.4% (32/35)], 而单管 PCR 的阳性率 [54.3% (19/35)] 显著低于单管巢式 PCR 和双管巢式 PCR, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。结论 单管巢式 PCR 不仅能够显著提高 HBV YMDD 突变检测灵敏度, 而且相比于双管巢式 PCR, 具有显著降低污染、缩短实验时间的优点, 为一种高效、安全的检测方法。

关键词: 单管巢式 PCR; YMDD 突变; 肝炎病毒, 乙型

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.11.033

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)11-1419-03

拉米夫定是当前应用最为广泛的核苷酸类药物之一。它能显著降低 HBV DNA 水平, 但拉米夫定的长期应用, 常因 HBV P 基因的 YMDD 基因发生变异而对其产生耐药性。治疗 1 年的耐药率为 17%~46%, 治疗 3~4 年的耐药率可达 67%~75%^[1-2]。产生耐药的主要机制是由于拉米夫定作用位点 YMDD 位点的突变, 如能迅速、及时检测到 HBV YMDD 突变, 可以帮助医生及时改变用药方案。目前检测 YMDD 突变的方法很多, 有实时定量 PCR 法、芯片法、测序法等, 但灵敏度均较低, 尤其是对于 HBV DNA 载量低于 10×10^4 copies/mL 的标本, 各种方法的检测均很难 100% 检出^[3-4], 所以希望寻找一种快速、高效的方法用于检测这些低病毒载量的标本。

1 资料与方法

1.1 标本来源 选取乙型肝炎患者血清标本 35 例。所有标本经过达安基因公司 HBV 定量检测试剂盒进行过载量检测, 均为阳性, HBV 载量为 100~108 copies/mL, 诊断均按照中华医学会传染病与寄生虫病学分会 2000 年西安会议修订的诊断标准。其中男性 13 例, 女性 22 例, 年龄 20~67 岁, 平均年龄 44.8 岁。

1.2 仪器与试剂 DNA 纯化回收试剂盒(北京天根公司); HS Taq 酶(北京天根公司); dNTP(北京天根公司); PCR 及测序用引物来源于文献或使用 Primer5 软件设计, 并由生工生物工程(上海)有限公司合成; ABI3130 型遗传分析仪(美国 Life Technologies 公司), HBV 定量检测试剂盒采购于广州达安基因检测公司。

1.3 方法

1.3.1 引物和探针设计 根据 NCBI 的 HBV 序列, 进行 HBV 耐药区引物设计, 其中包括外侧引物 F1/R1, 和内侧引物 F2/R2, 引物由上海生工技术服务有限公司进行合成。见表 1。

1.3.2 标本收集 用一次性无菌注射器抽取受检者静脉血 1 mL, 注入无菌的干燥玻璃管, 1 500 r/min 离心 3 min, 吸取上层血清, 转移至 1.5 mL 灭菌离心管中。标本可立即用于处理, 也可以保存于 -20 ℃ 储存备用。

1.3.3 HBV DNA 提取 采用裂解液煮沸法进行 DNA 提取^[5], 略有修改, 裂解液配制 (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 20 mmol/L NaCl, 1% SDS, pH9.5), 100 μL 待测样本加入 50 μL 裂解液, 煮沸 10 min, 1 2000×g 离心 10 min, 该上