

特点^[4],但是高速运行的试剂针往往因为只进行一遍短暂水洗而难以清洗干净,容易造成分析项目之间的携带污染,影响检验结果的准确性^[5-7]。通常情况下,可以通过以下方法避免项目间的交叉污染:(1)在设定各个项目之间的分析顺序时,要尽量将产生干扰的项目分开,或是将被干扰的项目放置于干扰项目之前;(2)合理利用仪器智能清洗程序及不同成分的清洗液,对生化分析仪的试剂探针进行清洗,避免试剂间干扰的产生。要避免交叉污染,不但需要熟练掌握仪器的操作、性能及原理,更应该了解各试剂反应原理及成分,设定合理的分析顺序及清洗程序,从而保证检测结果的准确性。

参考文献

[1] 赵笔辉.应用 EP7-A2 文件对无机磷测定的干扰评价[J].第三军医大学学报,2010,32(22):2455-2456.

• 检验仪器与试剂评价 •

- [2] Joseph B,Michelle F,Dave A. Reagent carryover studies:preventing analytical error with open clinical chemistry systems [J]. Lab Med,2005,36(11):705-710.
- [3] 尤昕,任淑子,李玉花,等.交叉污染对血清无机磷测定结果的影响[J].延边大学医学学报,2004,27(2):131-133.
- [4] 汝香,林珊.雅培 C8000 全自动生化分析仪的使用体会[J].实验与检验医学,2010,28(2),182-183.
- [5] 于雷.生化自动分析仪项目间试剂的交叉污染及其避免方法[J].临床检验杂志,2003,21(3):168.
- [6] 顾光煜,张葵.临床化学自动分析的携带污染与解除[J].临床检验杂志,2007,25(6):401-403.
- [7] 陈强.全自动生化分析仪试剂交叉污染及清洗实验操作方法的探讨[J].临床和实验医学杂志,2009,8(7):60-61.

(收稿日期:2013-03-10)

新型结核分枝杆菌核酸检测试剂盒的临床应用初步评价

冯庆芳,何小宁,王小婷,周翠蕃

(甘肃省定西市岷县中医院检验科,甘肃定西 748400)

摘要:目的 通过对比实验,对结核分枝杆菌(TB)核酸检测试剂的临床使用效果进行评价。方法 用分离培养法与圣湘生物结核分枝杆菌(TB)核酸检测试剂分别对 202 例临床收集的样本进行结核分枝杆菌的检测并对比其结果,同时,将两种检测方法的检测结果分别与测序法结果进行对比。**结果** 结核分枝杆菌核酸检测试剂与培养法的阳性一致性百分比为 100%,阴性一致性百分比为 98.61%,总一致性百分比为 99.01%;对 2 例不符样本进行测序复核,并对复核后的结果进行 Kappa 检验一致性分析,结果 Kappa 值为 1.000,表明结核分枝杆菌核酸检测试剂结果与金标准分离培养法的结果具有很好的一致性,表现出较好的准确性。**结论** 结核分枝杆菌核酸检测试剂与分离培养法的结果具有很好的一致性,且阳性率较分离培养法更高,所需检测时间大为缩短,具有内标控制假阴性,结果准确,符合临床检测要求,具有较高的临床应用价值。

关键词:结核分枝杆菌; TB DNA; 聚合酶链反应; 培养法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.19.051

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)19-2601-02

结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)简称为结核杆菌(*tubercle bacilli*,TB),是结核病的病原菌^[1]。世界上有 1/3 的人感染了结核分枝杆菌,每年有 800 万新患者出现,300 万人死于结核病,且耐药率的不断上升,给结核病的治疗和控制带来严峻的挑战^[2]。目前对结核病的诊断需要综合临床表现、影像学检查、结核菌检查等资料。结核菌检查是确诊结核病最特异的方法。其中分离培养法被认为是临床诊断结核病的“金标准”。但该方法一般需 2~8 周方能获得结果,灵敏度较低,且易出现漏检,严重影响结核病的早期诊疗^[3]。建立快速、准确、可靠的结核分枝杆菌的检测方法成为研究热点^[4-5]。其中实时荧光定量 PCR 技术以其高灵敏度、高特异性以及简易的操作受到越来越多的关注和应用^[6]。最近,新出现了一种 TB 核酸检测试剂,灵敏度高。该试剂有预防假阴性的内标控制体系和抗污染系统,能有效避免同类产品存在的假阴性及气溶胶污染。本研究拟通过检测临床样本,将其与分离培养法进行比对,来评估这一新试剂的准确性及特异性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本次研究共检测痰液样本 202 份,其中男性病例 109 例(53.9%),女性病例 93(46.1%),-20℃冰箱保存。结核病的诊断标准参照我国卫生部发布《肺结核诊断标准》2008 年版。

1.2 仪器与试剂 结核分枝杆菌核酸检测试剂购自湖南圣湘生物科技有限公司,具有内标监控假阴性,最低检测限为每毫升 1 个菌;核酸扩增仪采用美国 Stratagene 公司的 Mx3000P

实时荧光定量 PCR 仪。分离培养法使用改良罗氏培养基(4~8 周),灵敏度为每毫升 $10^1 \sim 10^3$ 个菌。克隆测序于 ABI3130 (ABI 公司,美国)基因分析仪上进行。

1.3 方法 分别采用该新型 PCR 检测试剂和分离培养法对 202 例临床样本(每例样本一分为三,保留一份样本作为复检)进行检测,方法如下:在样本中加入 2~3 倍体积的 4%NaOH 溶液,震荡混匀后,静置液化 30 min。取液化后的样本 500 μ L 于 1.5 mL 离心管(避免吸出明显的固体杂质),12 000 r/min,离心 3 min,吸除上清;加入 1 mL 无菌生理盐水重悬沉淀,12 000 r/min,离心 3 min,吸除上清;加入 50 μ L 核酸释放剂,100℃处理 10 min,12 000 r/min,离心 3 min,上清作为待测样本备用。取 5 μ L 作为 PCR 反应的模板加入 PCR-mix 40 μ L 上机检测即可。参考相关文献设计复检引物,正义链:TIS-F:5'-ACG GAT AGG GGA TCT CAG TAC AC-3',反义链:TIS-R:5'-CGT CTC GGC TAG TGC ATT GTC-3'。将不符样本用复检试剂进行 PCR 扩增,并将 PCR 产物通过电泳和克隆测序进行复核。PCR 反应体系:总体积 50 μ L,包括 20 pmol PCR 引物,25 mmol/L MgCl₂,2.5 pmol/L dNTPs,2 μ L Taq 酶及 PCR 缓冲液。PCR 反应条件:95℃15 min;(95℃20 s,60℃40 s,72℃40 s)35 循环;72℃30 min。

1.4 统计学处理 数据进行阴阳性一致性分析,灵敏度、特异度分析和 kappa 检验一致性分析。

2 结果

2.1 分离培养法与新型试剂检测结果 根据金标准分离培养

表 1 分离培养法与新型试剂检测结果(n)

新型试剂检测结果	分离培养法		合计
	阳性	阴性	
阳性	58	2	60
阴性	0	142	142
总数	58	144	202

2.2 新型试剂检测结核患者结果 见表 2。

表 2 新型试剂检测结核患者结果(n)

新型试剂检测结果	结核患者		合计
	菌培阳性	菌培阴性	
阳性	58	2	60
阴性	0	0	0
总数	58	2	60

2.3 新型试剂检测非结患者结果

非结核病患者,包括与 TB 症状相似的患者(如肺癌、肺炎等)、其他患者(如哮喘、气管炎等),见表 3。

表 3 新型试剂检测非结核患者结果(n)

实验	非结核患者		合计
	TB 症状相似	其他患者	
阳性	0	0	60
阴性	72	70	142
总数	72	70	142

2.4 不符样本的复核结果及其分析 根据对比结果,有 2 例样本新型试剂与分离培养法检测结果不符,均为培养法结果阴性,结核分枝杆菌核酸检测试剂检测结果为阳性。自行设计设计复核扩增引物对,对这 2 例样本进行 PCR 扩增,通过电泳和克隆测序进行复核。发现 2 例不符样本的扩增产物电泳结果显示产物为目标长度,扩增产物的克隆测序结果显示见图 1、2。扩增片段序列为 TB-DNA 序列。证明 2 例不符样本中均包含 TB-DNA 序列。两种方法结果的差异可能是由于培养法检测自身的局限性所导致,由于这些样本的病菌载量较低,培养法在检测低浓度样本时,检测灵敏度限制,容易出现的假阴性结果。

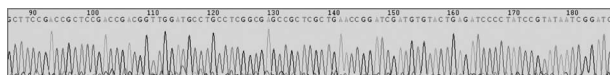


图 1 不符样本 a

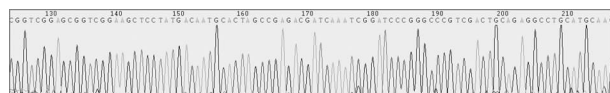


图 2 不符样本 b

3 讨论

目前国内临床上主要采用分离培养对结核分枝杆菌进行检测,具体是用吸管吸取痰液 0.1 mL,均匀接种在整个培养基斜面,每份标本接种在改良罗氏培养基上。接种后培养基斜面向上,于 37℃ 孵箱内平放 24 h 后检查培养基污染情况,拧紧瓶盖直立放置 37℃ 孵箱内继续培养。培养满 2~8 后观察菌落生长情况。该方法操作过程较复杂,菌落生长耗时长,在得到分离培养物后仍需 2~8 周方能获得结果,且检测过程中外界因素对检验结果的准确性干扰较大,操作要求高。另外,灵敏度较低,易出现假阴性而漏检,严重影响了结核病的早期诊断和治疗。

本研究对基于荧光定量 PCR 技术的结核分枝杆菌核酸检测试剂与常规分离培养法法进行对比研究。荧光定量 PCR 的方法检测,可最大限度缩短检测时间,及时的反馈检测结果,帮助医生做出准确及时的临床诊断,实验操作简单,结果重复性好^[6]。扩增和荧光检测均由仪器自动进行,通过查看样本的 Ct 值判断阴阳性,能够大大减轻检测工作量,并保证较高的特异性和灵敏度。

本次研究共检测样本 202 例,根据分离培养法检测结果分为两组;其中阳性组 58 例,阴性组 142 例。结核分枝杆菌荧光定量 PCR 法试剂与分离培养法的阳性一致性百分比为 100%,阴性一致性百分比为 98.61%,总一致性百分比为 99.01%;对 2 例不符样本的复核结果表明:2 例样本的测序结果均与荧光定量 PCR 法试剂的检测结果相符。对复核后的结果进行 Kappa 检验一致性分析;结果 Kappa 值为 1.000,表明该结核分枝杆菌核酸检测试剂与分离培养法及克隆测序的结果具有很好的一致性。

通过本次对比结果可以看出,该结核分枝杆菌核酸检测试剂特异性好,有内标监控假阴性,结果准确,操作简便,检测时间短,比分离培养法具更好的灵敏度和准确性,具有较高的临床应用价值。

参考文献

- [1] 李春林,孙峰. 结核分枝杆菌检测方法临床应用的对比研究[J]. 检验医学与临床,2012,9(17):2164-2164.
- [2] 邓云峰,郑建礼,景辉,等. 结核分枝杆菌传播的分子流行病学特征[J]. 中华医院感染学杂志,2010,20(10):1380-1383.
- [3] 杜彦懿,王平,张文莉,等. 涂片镜检法与培养法检测结核分枝杆菌的结果比较[J]. 内蒙古中医药,2011,24(2):93.
- [4] 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.
- [5] 梁建琴,高华方,李洪敏,等. PCR-荧光探针法检测临床痰标本结核分枝杆菌的可靠性研究[J]. 中国防痨杂志,2012,34(5):271-274.
- [6] Renton BJ, Morrell PD, Cooke RPD, et al. Direct real-time PCR examination for *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory samples can be cost effective[J]. Health,2009,1(2):63-66.