

· 综述 ·

国外全自动沙眼衣原体及淋球菌核酸双检技术新进展^{*}韩 燕 综述, 尹跃平[△] 审校

(中国医学科学院北京协和医学院皮肤病研究所、中国疾病控制预防中心性病控制中心, 江苏南京 210042)

关键词: 沙眼衣原体; 淋球菌; 核酸检测

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.04.026

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2014)04-0441-03

沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*, CT) 和淋球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*, NG) 是全球最主要的性传播疾病的病原体。美国疾病控制预防中心 CDC 推荐 16~25 岁的年轻女性每年进行 CT 的筛查。我国从 2008 年已经开始对 CT 感染进行单独报病, 而 NG 是我国法定上报的传染病。CT 和 NG 的共感染现象非常普遍, 因此研发的诊断技术平台也通常是同时检测两种病原体。

最先发展起来的 CT 和 NG 核酸检测技术是直接检测核酸技术(NAH): 包括 Gen-probe 公司的 PACE2、PACE 2C 和 Digene 公司的杂交捕获 HC2, 但是 NAH 的方法其灵敏度远不如核酸扩增技术。随着核酸扩增技术的出现, 这类方法逐步被取代而失去其应用价值。目前, 美国 FDA 共批准五家公司的商品化试剂用于检测泌尿生殖道的 CT 和 NG 感染检测, 分别是罗氏的 Amplicor CT/NG、Cobas 4800, 雅培公司的 Real Time CT/NG, Gen-probe 公司的 APTIMA Combo2 (AC2), Becton Dickinson(BD) 公司的 Probe Tec ET CT/GC、Probe Tec ET CTQx/GCQx 和 Cepheid 公司的 GeneXpert CT/NG。

1 实时定量 PCR 技术

目前采用实时定量 PCR 技术检测 CT/NG 的主要是罗氏公司和雅培公司的产品。

罗氏公司 Amplicor CT/NG 产品用于检测 CT 的靶基因

位于 CT 隐蔽的质粒基因上, 而用于检测 NG 的靶基因则是 DNA 胞嘧啶甲基转移酶基因, 扩增产物的检测则基于生物素-亲和素的交互作用的 ELISA 方法。该方法由于不能够检测出瑞典的 CT 新变种^[1], 现在该公司已出新的产品——Cobas 4800 CT/NG 以取代该产品。Cobas 4800 CT/NG 检测试剂盒在全自动的平台基础上完成实时定量 PCR 的检测全部步骤。该试剂利用两个靶基因检测 CT, 一个位于隐蔽质粒上, 另外一个靶基因位于编码主要外膜蛋白的 *ompA*, 可以保证能够检测瑞典的 CT 新变种^[2]。而用于检测 NG 的靶基因则分别位于正向重复序列 9(DR9) 及其 DR9 突变区上。该产品通过全自动化的处理, 可有效地预防实验过程中的人为污染, 可在 8 h 内完成高达 278 份的样本量。目前该产品可应用于阴道拭子, 宫颈拭子、尿液等标本。而该产品应用于液基细胞学还在评估当中^[3]。研究者利用已上市的 Gen-probe 的 AC2 和 Becton Dickinson 公司的 Probetec ET CTQx/GCQx 的产品作为参评试剂, 多中心评价罗氏公司的 Cobas 4800 CT/NG 产品的性能, 以患者的患病状态作为诊断的标准, 该产品的敏感性和特异性的结果见表 1。Van Der Pol 等^[4]研究发现罗氏公司的 Cobas 4800 产品利用阴道拭子检测 CT 及 NG 的敏感性和特异性高于宫颈拭子和尿液, 利用阴道拭子可检测出仅定位于尿道或宫颈的 CT 或 NG 的感染。

表 1 罗氏公司 Cobas 4800 检测 CT 和 NG 的临床特性(%)

样本量(n)	样本类型	敏感性 C4800	对照试剂		特异性 C4800	对照试剂		参考文献
			AC2	CTQ		AC2	CTQ	
CT								
4 316	宫颈拭子	91.6	96.6	95.1	99.8	99.2	99.7	[3]
4 316	女性尿液	92.3	95.8	94.8	99.8	99.5	99.8	[3]
4 248	阴道拭子	92.9	ND	ND	99.7	ND	ND	[4]
768	男性尿液	97.6	96.8	98.4	99.5	98.9	99.2	[5]
NG								
4 316	宫颈拭子	95.6	100	94.3	100	100	99.8	[3]
4 316	女性尿液	98.5	96.9	97	97	99.9	99.9	[3]
4 248	阴道拭子	98.5	ND	ND	100	ND	ND	[4]
768	男性尿液	100	100	100	99.7	100	99.7	[5]

C4800: 罗氏公司 Cobas 4800; AC2: Gen-probe 公司 APTIMA Combo2; CTQ、GCQ: BD 公司的 Probetec ET CTQx/GCQx; ND: 文献中没有提及该数据。

* 基金项目: 国家十二五“重大新药创制”科技重大专项资助项目(2012ZX09301002005)。 作者简介: 韩燕, 女, 助理研究员, 主要从事分子诊断学的研究。 △ 通讯作者, E-mail: yinyp@ncstdlc.org。

雅培公司 RealTime CT/NG 产品依赖于 m2000 全自动系统。该产品目前也包含了 CT 的两个靶基因,其中一个位于隐蔽质粒上,另一对引物同样是为了保证能够检测瑞典的 CT 新变种而选用的 ompA 基因的一段保守序列;而用于检测 NG 的引物位于 Opa 基因上。该产品所用对照是在 DNA 提取步骤中加入的,可以用于评价提取的效率和潜在的 PCR 抑制。该系统可以在 8 h 内一次处理 96 个样品,检测 186 个样品。Gaydos 等^[6]通过多中心的临床试验评估了雅培公司的 RealTime CT/NG 产品,研究中共采集 16 个地区共 3 832 例患者的标本,选用已上市的 Gen-probe 的 AC2 和 Becton Dickinson 公司的 Probetec ET CT/GC 产品作为参评试剂,以患者的患病状态作为诊断标准,研究发现 RealTime CT/NG 产品检测 CT 的敏感性和特异性分别为 92.4% 和 99.2%,NG 的敏感性和特异性分别为 96.9% 和 99.7%,各种类型标本的检测的敏感性和特异性的结果^[6]见附表 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。Cheng 等^[7]选用了 926 例宫颈拭子,45 例女性尿液,6 例男性拭子和 407 例男性尿液标本来评估了 RealTime CT/NG 与罗氏公司 Amplicor 产品在检测 CT 和 NG 的一致性,尿液标本检测 CT 达到 99.6% 的阳性一致率和 97.7% 的阴性一致率,NG 检测达到 100.0% 的阳性一致率和 99.7% 的阴性一致率,宫颈拭子检测 CT 检测的阳性一致率和阴性一致率分别为 98.8% 和 98.5%,检测 NG 的阳性一致率和阴性一致率分别为 96.6% 和 99.8%,研究显示这两者一致性较高。

2 转录介导扩增(TMA)技术

Gen-probe 公司生产的 AC2 是利用转录扩增特异性的靶 rRNA 序列,旨在减少或消除扩增抑制,通过磁珠法提取核苷酸,然后转录扩增 CT 的 23S rRNA 和 NG 的 16S rRNA,将扩增产物与标记的寡核苷酸探针杂交,通过化学发光反应进行检测。扩增的过程恒温,操作较简便。该产品可在 TIGRIS 系统上实现自动化,可在 8 h 内检测多达 500 份的样品。为了获得更高的特异性,厂家建议对阳性的标本进行 CT 的 16S rRNA 和 NG 的 16S rRNA(另外一个序列)进行再检测。利用 500 份尿液标本来评估已上市的三个商业化核酸检测产品:Gen-probe 公司 Tigris 平台的 AC2,BD 公司 Viper 平台的 Probe-Tec ET 和雅培公司 m2000 平台的 RealTime CT/NG,三个试剂检测 NG 的特异性均为 100%,而 BD 的灵敏度为 95.8% (23/24),其余两个均为 100%;但是检测 CT 的特异性均高于 99%,灵敏度分别为 98.98%、97.95% 和 96.94%。这三个全自动系统中 Gen-probe 公司 Tigris 系统为最大通量及耗费最小手工劳动。BD 公司的 Viper 系统需要最多的手工劳动,而雅培公司的 m2000 平台一次处理的样品量是最少的(186)^[8-9]。用基于网络筛查项目收集了患者自行采集的阴道拭子评价了这三个商家试剂(BD 公司的 Probe Tec ET、Gen-probe 公司的 AC2 和罗氏的 Cobas Amplicor)检测性能,三个试剂检测 NG 的敏感性和特异性分别为:BD 公司的 Probe Tec ET 80.0%、100%,Gen-probe 公司的 AC2 100%、100%,罗氏的 Cobas Amplicor 100%、98.8%;检测 CT 的敏感性和特异性分别为:BD 公司的 ProbeTec ET 82.6%、100%,Gen-probe 公司的 AC2 100%、100%,罗氏的 Cobas Amplicor 100%、99.3%^[10]。该产品应用于患者自行采集的阴道拭子也具有良好的敏感性和特异性^[11]。

3 链置换扩增(SDA)技术

BD 公司生产的 Probetec ET 是美国 FDA 第一个批准的实时定量检测这两类病原体的产品。该技术以等温(温度为 52.5 °C)SDA 技术为基础。该产品选用 CT 的隐蔽质粒和 NG 的菌毛反相蛋白同系物(PivNg)序列为靶目标基因,利用荧光探针检测扩增后产物。该产品利用扩增后的产物不暴露在环境中以尽可能减少潜在的环境污染,但是无法降低在扩增前携带进去的污染。BD 公司目前已经研发了新一代的产品 CTQx/GCQx,可在 Viper 系统实现自动化。使用 BD Viper 系统(采用 XTR 技术)进行测试时,BD ProbeTec CT Qx/GC Qx DNA 扩增检验会利用 BD 的专利氧化铁、FOX Extraction 和链转移扩增技术对 CT 和 NG 进行直接定性检验。该产品在 8 h 工作时间内可分析 278 个样品。该系统利用双化学扩增检测系统可同时用来检测 CT 和 NG。Van Der Pol 等^[4]通过多中心评估该产品在 Viper 系统中的检测 CT/NG 的临床性能,不同标本检测 NG 的敏感性和特异性分别为:宫颈拭子 98.5%、99.7%,阴道拭子 100.0%、99.1%,女性尿液 98.5%,99.7%,男性尿道拭子 100.0%、99.1%,男性尿液 100.0%,99.1%^[12]。Taylor 等^[13]评估该产品的在宫颈拭子、阴道拭子和女性尿液的 CT 检测的敏感性和特异性分别为:91.3%、96.5% 和 93.0%;98.3%、99.2% 和 99.4%。男性尿道拭子和男性尿液的 CT 检测的敏感性和特异性分别为:92.1% 和 98%;98.4% 和 99.2%。

4 模块筒为基础的实时定量 PCR 技术

Cepheid GeneXpert CT/NG 是最近刚被 FDA 批准的体外定量检测 CT 和 NG 的分子诊断技术,该技术首次使同时感染 CT/NG 两种病原体的患者可在同一天内得到诊断和治疗。该试剂选用 NG 基因组染色体 DNA 上两个相对保守且不相连的基因作为检测 NG 的靶基因,选用 CT 染色体基因作为 CT 的靶基因,并选用细胞看家基因作为样品对照基因,该对照基因不要求完整的细胞只需要有样本含有 DNA 即可。该产品是通过模块筒为基础的平台对子宫颈拭子、阴道拭子和尿液标本的 DNA 进行基因组 DNA 的纯化、浓缩、检测和并利用硅法暴露多重基因靶标,然后进行实时定量 PCR 的方法进行检测,可在 2 h 之内对 1~96 个标本进行处理分析,可以最大程度地减少处理的步骤和污染的可能。该全自动系统可将样品准备、定量 PCR 扩增及荧光检测集于一体并自动进行核酸检测分析。Gaydos 等^[14]通过多中心的临床试验评估了 Cepheid 公司的 GeneXpert CT/NG 产品,研究中共招募 1 722 例女性患者和 1 387 例男性患者,选用已上市的 Gen-probe 的 AC2 和 BD 公司的 Probetec ET CT/GC 的产品作为参评试剂,以患者的患病状态作为诊断标准。结果显示女性宫颈拭子、阴道拭子及尿液检测 CT 的敏感性分别为 97.4%、98.7% 和 97.6%,男性尿液检测的敏感性为 97.5%,所有标本检测的特异性均高于 99.4%;而女性宫颈拭子、阴道拭子及尿液检测 NG 的敏感性分别为 100.0%、100.0% 及 95.6%,男性尿液检测的敏感性为 98.0%,所有标本检测的特异性均高于 99.8%。而该产品应用于眼部检测 CT 也具有良好的敏感性和特异性^[15]。

5 小结

目前所有 FDA 批准的商业化核酸检测产品都仅限用于泌尿生殖道标本的临床诊断,其敏感性和特异性都比较好,其中

Genprobe 是检测 RNA, 其余均是 DNA 检测。全自动化的系统中, 罗氏和雅培的核酸提取和实时定量检测是在不同的仪器中完成的。其中 Genprobe 和 BD 公司是等温的扩增系统, 但有样本量检测的限制。而 Cepheid 是目前唯一没有样本量限制的, 可自由实现 1~96 个标本的检测。

生殖道外的标本如直肠和咽部拭子还未被批准, 但是越来越多的证据显示核酸扩增的检测技术在这些部位的敏感性要高于培养法^[16~17]。其中主要的原因在于 NG 核酸检测的特异性一直遭受诟病, 多个研究表明商业化的核酸检测试剂盒可与非 NG 菌属有交叉反应。利用 234 非 NG 的奈瑟菌素及有着紧密相关的细菌菌株来评价市场经 FDA 批准的 4 家公司的 6 个产品, 研究发现罗氏公司的 Amplicor 及 BD 公司的 Probe Tec GC QX 的假阳性率较高, 分别占 14.1% (33/234) 和 11.1% (26/234); 而 Gene probe 的 AC2、GC, 雅培公司的 Real-Time CT/NG 以及罗氏公司的 Cobas 4800 的假阳性率(交叉反应)较低, 仅在 1.0%~2.1%^[18]。因此建议在生殖道外部位检测出阳性的标本仍需要进一步的实验排除假阳性, 选用于咽部拭子检测的核酸诊断试剂能够避免交叉反应的核酸检测试剂。

参考文献

- [1] Velicko I, Kühlmann-Berenzon S, Blaxhult A. Reasons for the sharp increase of genital chlamydia infections reported in the first months of 2007 in Sweden[J]. Euro Surveill, 2007, 12(10):E5-6.
- [2] Hadad R, Fredlund H, Unemo M. Evaluation of the new COBAS TaqMan CT test v2.0 and impact on the proportion of new variant Chlamydia trachomatis by the introduction of diagnostics detecting new variant C trachomatis in Orebro county, Sweden[J]. Sex Transm Infect, 2009, 85(3):190-193.
- [3] Van Der Pol B, Liesenfeld O, Williams JA, et al. Performance of the cobas CT/NG test compared to the Aptima AC2 and Viper CTQ/GCQ assays for detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(7):2244-2249.
- [4] Van Der Pol B, Taylor SN, Liesenfeld O, et al. Vaginal swabs are the optimal specimen for detection of genital Chlamydia trachomatis or Neisseria gonorrhoeae using the Cobas 4800 CT/NG test [J]. Sex Transm Dis, 2013, 40(3):247-250.
- [5] Taylor SN, Liesenfeld O, Lillis RA, et al. Evaluation of the roche cobas CT/NG test for detection of chlamydia trachomatis and neisseria gonorrhoeae in male urine[J]. Sex Transm Dis, 2012, 39(7):543-549.
- [6] Gaydos CA, Cartwright CP, Colaninno P, et al. Performance of the abbott RealTime CT/NG for detection of chlamydia trachomatis and neisseria gonorrhoeae[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(9):3236-3243.
- [7] Cheng A, Qian Q, Kirby JE. Evaluation of the abbott RealTime CT/NG assay in comparison to the roche cobas amplicor CT/NG assay[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(4):1294-1300.
- [8] Levett PN, Brandt K, Olenius K, et al. Evaluation of three automated nucleic acid amplification systems for detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae in first-void urine specimens[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(6):2109-2111.
- [9] Mushanski LM, Brandt K, Coffin N, et al. Comparison of the BD viper system with XTR technology to the Gen-Probe APTIMA COMBO 2 assay using the Tigris DTS system for the detection of chlamydia trachomatis and neisseria gonorrhoeae in urine specimens[J]. Sex Transm Dis, 2012, 39(7):514-517.
- [10] Masek BJ, Arora N, Quinn N, et al. Performance of three nucleic acid amplification tests for detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae by use of self-collected vaginal swabs obtained via an internet-based screening program[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(6):1663-1667.
- [11] Crucitti T, De Deken B, Smet H, et al. Evaluation of the APTIMA combo 2 assay using self-administered vaginal swabs for the detection of chlamydia trachomatis and neisseria gonorrhoeae[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2013, 76(3):385-386.
- [12] Van Der Pol B, Taylor SN, Lebar W, et al. Clinical evaluation of the BD ProbeTecTM Neisseria gonorrhoeae Qx amplified DNA assay on the BD ViperTM system with XTRTM technology[J]. Sex Transm Dis, 2012, 39(2):147-153.
- [13] Taylor SN, Van Der Pol B, Lillis R, et al. Clinical evaluation of the BD ProbeTecTM Chlamydia trachomatis Qx amplified DNA assay on the BD ViperTM system with XTRTM technology[J]. Sex Transm Dis, 2011, 38(7):603-609.
- [14] Gaydos CA, Van Der Pol B, Jett-Goheen M, et al. Performance of the cepheid CT/NG xpert rapid PCR test for detection of chlamydia trachomatis and neisseria gonorrhoeae[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(6):1666-1672.
- [15] Dize L, West S, Williams JA, et al. Comparison of the abbott m2000 RealTime CT assay and the cepheid GeneXpert CT/NG assay to the roche amplicor CT assay for detection of chlamydia trachomatis in ocular samples from Tanzania[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(5):1611-1613.
- [16] Geelen TH, Rossen JW, Beerens AM, et al. Performance of cobas 4800 and m2000 real-timeTM assays for detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae in rectal and self-collected vaginal specimen[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2013, 77(2):101-105.
- [17] Bachmann LH, Johnson RE, Cheng H, et al. Nucleic acid amplification tests for diagnosis of Neisseria gonorrhoeae oropharyngeal infections[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(4):902-907.
- [18] Tabrizi SN, Unemo M, Limnios AE, et al. Evaluation of six commercial nucleic acid amplification tests for detection of Neisseria gonorrhoeae and other Neisseria species[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(10):3610-3615.

(收稿日期:2013-09-29)