

• 临床检验研究论著 •

### 3 种实时荧光 PCR 试剂在结核分枝杆菌核酸检测中的临床应用评价

方 莉<sup>1</sup>, 刘芷洁<sup>2</sup>, 赵维皎<sup>1</sup>, 许 媛<sup>1</sup>

(1. 川北医学院附属医院检验科, 四川南充 637000; 2. 川北医学院医学检验系, 四川南充 637000)

**摘要:**目的 评价不同结核分枝杆菌核酸(TB-DNA)试剂盒的性能和应用。方法 本文通过采用中山达安、德国凯杰及上海之江 TB-DNA 检测试剂盒平行检测抗酸染色阳性的临床标本, 并用非结核病患者标本来验证假阳性率。结果 44 例抗酸染色阳性标本中, 中山达安试剂盒检测出 44 例 TB-DNA 阳性, 德国凯杰试剂盒检测出 43 例阳性, 上海之江试剂盒检测出 40 例阳性; 3 种试剂盒检测 20 例非结核患者的标本, TB-DNA 均为阴性。3 种试剂盒的阳性检出率分别为 100%、97.7% 和 90.9%, 差异无统计学意义( $\chi^2=5.40, P>0.05$ )。结论 各实验室可灵活选择临床检测试剂盒。

**关键词:**聚合酶链反应; 结核分枝杆菌; 试剂盒, 诊断

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.08.016

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)08-0977-02

#### The clinical application assessment of three kinds of real-time fluorescence quantitative PCR reagents on the detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA

Fang Li<sup>1</sup>, Liu Zhijie<sup>2</sup>, Zhao Weijiao<sup>1</sup>, Xu Yuan<sup>1</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China; 2. Department of Medical Laboratory, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China)

**Abstract:** Objective To evaluate the difference of three *Mycobacterium tuberculosis* detection kits and provide experimental basis for clinical applications. Methods Three kinds of *Mycobacterium tuberculosis* detection kits which named Zhongshan Da'an, Germany Qiagen and Shanghai Zhijiang were used to detect *Mycobacterium tuberculosis* DNA (TB-DNA) in clinical specimens. Acid-fast staining was positive, and specimens in patients without tuberculosis infection were used to verify the false positive. Results The positive rate of Zhongshan Da'an, Germany Qiagen and Shanghai Zhijiang detection kits were 100% (44/44), 97.7% (43/44) and 90.9% (40/44), respectively, and the difference among those three kits were not statistically significant ( $\chi^2=5.40, P>0.05$ ). TB-DNA detection by using the three kinds of kits in 20 cases of non-tuberculosis infection specimens were all negative. Conclusion Clinical laboratory might choose anyone of these TB-DNA detection kits to the diagnose *Mycobacterium tuberculosis*.

**Key words:** polymerase chain reaction; *Mycobacterium tuberculosis*; reagent kits, diagnostic

结核病是目前严重威胁人类健康的重大传染性疾病之一, 每年有约 200 万人死于该病。结核病的临床表现多样, 可以累及全身各个系统, 尤其是肺外结核病的临床症状往往十分隐匿, 给临床诊断带来极大困难。实验室检查对结核病防治起着不可或缺的作用<sup>[1-2]</sup>。实时荧光定量 PCR 技术自建立以来, 发展迅速、应用广泛, 表明其具有强大的生命力, 由于具有定量、特异、灵敏和快速等特点, 已被国内外公认为一个快速可靠的检测方法<sup>[3-4]</sup>。目前市场上检测结核分枝杆菌核酸(TB-DNA)的试剂较多, 由于核酸提取方法、扩增目的片段等技术不同, 各种试剂的特异性、灵敏度等存在着一定差异。本研究选用国内常用的 3 种 TB-DNA 检测试剂盒(即中山达安、德国凯杰和上海之江)对本院 2013 年 1~6 月抗酸染色阳性的临床标本进行 TB-DNA 检测, 比较 3 种试剂的阳性检出率。

#### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集 2013 年 1~6 月川北医学院附属医院传染科、呼吸内科、儿科、泌尿外科等科室的 64 例患者的标本(包括痰液、尿液和脓液标本), 于 -40℃ 冰箱中保存备用。其中 44 例临床确诊为结核患者(男性 29 例, 女性 15 例, 年龄 12~88 岁)的标本被检验科微生物室检测出抗酸染色阳性, 作为 A 组标本。其余 20 例标本来自非结核患者, 临床诊断为慢性阻塞性肺疾病急性加重(AECOPD), 其中, 男性 10 例, 女性 10 例, 年龄 62~85 岁, 作为 B 组标本。

#### 1.2 仪器与试剂

**1.2.1 仪器** 瑞士 Roche Light Cycler 480 II 实时荧光定量 PCR 仪、Heal Force 生物安全柜、离心机、高速离心机、恒温金属浴、混匀器、微量加样器等。

**1.2.2 试剂** 消化液为 4% NaOH 溶液(自配), TB-DNA 检测试剂盒由中山达安、德国凯杰及上海之江试剂公司分别提供。

**1.2.3 试剂盒阳性判定标准** 3 种试剂盒检测阳性判定标准为: 在增长曲线呈 S 型的情况下, 中山达安 TB-DNA 检测试剂盒以 CT 值小于 30 判定为阳性, 德国凯杰 TB-DNA 检测试剂盒以 CT 值小于或等于 37 判定为阳性, 上海之江 TB-DNA 检测试剂盒以 CT 值小于或等于 38 判定为阳性。在 CT 值超过检测上限时, 需重复测定或者稀释后测定, 再根据以上条件进行判定。

#### 1.3 方法

**1.3.1 不同试剂的反应条件** 引物探针浓度和反应条件均按照每个试剂盒优化后的最佳条件进行。反应条件如下: 中山达安(93℃ 2 min; 93℃ 45 s, 55℃ 60 s 10 个循环; 93℃ 30 s, 55℃ 45 s 30 个循环), 德国凯杰(37℃ 3 min; 93℃ 1 min; 93℃ 5 s, 60℃ 40 s 40 个循环), 上海之江(37℃ 2 min; 94℃ 2 min; 93℃ 15 s, 60℃ 60 s 40 个循环)。仪器通道选择 F1 通道, 荧光信号分别在 55℃、60℃、60℃ 收集, 收集方式为 SIN-

GLE。

1.3.2 不同试剂的反应体系 见表 1。

| 表 1 3 种试剂的反应体系(μL) |      |      |      |
|--------------------|------|------|------|
| 试剂                 | 中山达安 | 德国凯杰 | 上海之江 |
| TB PCR 反应液         | 40.0 | 17.8 | 36.0 |
| Taq 酶+UNG 酶        | 3.0  | 0.2  | 0.4  |
| DNA 模板             | 2.0  | 2.0  | 4.0  |
| 总反应体系              | 45.0 | 20.0 | 40.0 |

1.3.3 A、B 组标本的检测

1.3.3.1 TB-DNA 的提取 将收集到的痰液及脓液标本加 4% 的 NaOH 溶液充分液化后,吸上清至 1.5 mL EP 管内,尿液则直接离心取沉淀,然后按照试剂盒说明书提取 DNA。

1.3.3.2 TB-DNA 的检测 对收集到的 64 例标本运用中山达安、德国凯杰及上海之江公司提供的 TB-DNA 检测试剂盒分别进行检测。

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行统计学分析,不同方法检测的阳性率的比较采用  $\chi^2$  检验,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

各试剂盒的检测结果见表 2。A 组的 44 例标本,其中,中山达安 TB-DNA 检测试剂盒阳性检出率为 100%,德国凯杰 TB-DNA 检测试剂盒阳性检出率为 97.7%,上海之江 TB-DNA 检测试剂盒阳性检出率为 90.9%。B 组 20 例标本 3 种试剂检测均为阴性。3 种方法检测 TB-DNA 的结果进行比较,差异无统计学意义( $\chi^2=5.40, P>0.05$ )。

| 表 2 3 种试剂检测结核阳性标本结果[n(%)] |    |           |          |          |
|---------------------------|----|-----------|----------|----------|
| 组别                        | n  | 中山达安      | 德国凯杰     | 上海之江     |
| A 组                       | 44 | 44(100.0) | 43(97.7) | 40(90.9) |
| B 组                       | 20 | 0(0.0)    | 0(0.0)   | 0(0.0)   |

3 讨 论

结核病原学实验诊断方法的研究一直为人们所关注。国内目前的检测方法以抗酸染色查找抗酸杆菌为主,该方法因简便、快速、费用低廉等优点而在结核病诊断中发挥着重大作用,但也存在着敏感度低、特异性差,无法辨别死菌与活菌等缺点<sup>[5-6]</sup>。细菌培养法被誉为结核病诊断的“金标准”,该方法是鉴定死菌与活菌的可靠方法,但传统结核分枝杆菌细菌培养法,细菌的生长繁殖速度过于缓慢,单个菌落在固体培养基中生长成直径 1 mm 的菌落需 4 周,难以得到理想的检出速度,现临床上较少使用<sup>[7]</sup>。实时荧光定量 PCR 是通过荧光染料或荧光标记的特异性探针,对 PCR 产物进行标记跟踪,实时在线监控反应过程,并结合相应的软件对产物进行分析,计算待测样品初始模板量的一种方法<sup>[8]</sup>。该方法较上述两种方法具有反应灵敏、特异性高、高效快速等优点。就结核病诊疗而言,国内外已有不少研究报道,实时荧光定量 PCR 是结核病诊断的有效方法之一<sup>[9-10]</sup>。在确保标本的正确处理,DNA 提取操作的规范化前提下,实时荧光定量 PCR 核酸检测试剂盒的选取是影响结核分枝杆菌阳性检出率的重要因素。

作者以临床实验室用户的角度来探讨了 3 种不同厂家的试剂检测结果是否存在差异。A 组标本由中山达安试剂盒检测的阳性检出率为 100%,德国凯杰试剂盒检测的阳性检出率

为 97.7%,上海之江试剂盒检测的阳性检出率为 90.9%。B 组标本由 3 种试剂进行检测,结果均为阴性,假阳性率为 0。结果显示,3 种试剂盒检测结果的差异无统计学意义( $P>0.05$ )。本次研究中,3 种试剂对 64 例样本检测共有 4 例样本结果不符。44 例抗酸染色阳性样本中,实时荧光定量 PCR 检测结果中有 4 例为阴性(上海之江阴性 3 例,德国凯杰和上海之江均为阴性 1 例)。本研究未对样本进行结核分枝杆菌培养,4 例阴性结果的出现可能是实时荧光定量 PCR 检测过程中出现的假阴性。实时荧光定量 PCR 检测的假阴性常见原因有:(1)PCR 试剂盒本身原因,Taq 酶实时荧光定量 PCR 是利用 Taq 酶在 60℃ 水解荧光探针的特性,采用两步法扩增,通过适时检测荧光信号从而实现定量分析。此时,反应系统中引物和探针的退火温度变成了 60℃,一旦有引物与模板或探针与模板的不匹配,就有可能导致假阴性的发生<sup>[11]</sup>。(2)PCR 反应可以被存在于特定样本中的物质所抑制<sup>[12]</sup>。(3)PCR 反应过程中的人为因素,3 种试剂盒 TB-DNA 的提取方法均为煮沸裂解法,该方法在核酸提取过程中手工操作步骤较多,需用手工吸取裂解上清液至扩增反应液中,然后在 PCR 仪上进行扩增,核酸扩增结果还需人为调整设置各项参数才能得出。操作不当就可能引起 DNA 的丢失,造成检测结果的假阴性。

本研究对 3 种试剂进行了综合比较,可指导 TB-DNA 检测试剂盒的合理选择,对结核病感染的及时诊治有实用价值。3 种试剂盒结果的符合率比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),各实验室可灵活选择临床检测试剂盒。

参考文献

[1] 王华钧,孙小军,金法祥,等. 4 种结核分枝杆菌检测方法的比较[J]. 中华医院感染学杂志,2012,22(11):2472-2474.

[2] 刘家云,郝晓柯. 结核病实验室诊断方法新进展[J]. 临床检验杂志,2013,31(2):115-117.

[3] 施巧霞,李晓非,杨惠仙,等. 实时荧光定量 PCR 在肺结核诊断中的临床应用[J]. 云南医药,2007,28(1):22-24.

[4] 梁晓海,黄平东. 实时荧光定量聚合酶链反应法检测肺结核患者痰标本价值的对照研究[J]. 现代中西医结合杂志,2006,15(3):287-288.

[5] 谭守勇,刘志辉,邓向斌. 荧光定量 PCR 检测抗酸染色涂片刮削物中结核分枝杆菌 DNA 的可行性[J]. 实用医学杂志,2012,28(12):2067-2069.

[6] 张翊,卢建平,叶森. 四种结核分枝杆菌检测方法的临床应用评价[J]. 中国防痨杂志,2006,28(1):14-17.

[7] 陆宇,朱莉贞,段连山. 结核分枝杆菌活菌检测方法及应用[J]. 中华结核和呼吸杂志,2004,27(6):423-426.

[8] Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, et al. The real-time polymerase chain reaction[J]. Mol Aspects Med, 2006, 27(2/3):95-125.

[9] 陈红兵,周志红,贺润年,等. 荧光定量 PCR 技术在结核杆菌检测中的应用[J]. 实用医学杂志,2008,24(21):3765-3767.

[10] Cleary TJ, Roudel G, Casillas O, et al. Rapid and specific detection of Mycobacterium tuberculosis by using the Smart Cycler instrument and a specific fluorogenic probe[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(10):4783-4786.

[11] 丁世雄,翁彭剑,梁晓岳,等. Taq Man 荧光定量 PCR 检测 HBV-DNA 的假阴性原因分析[J]. 浙江医学,2004,26(12):943-944.

[12] 纪冬,辛绍杰. 实时荧光定量 PCR 的发展和数据分析[J]. 生物技术通讯,2009,20(4):598-600.