

· 论 著 ·

基因芯片快速分枝杆菌鉴定技术与涂片抗酸染色技术的临床应用比较*

侯 沪, 李爱敏, 唐曙明

(深圳市人民医院龙华分院检验科, 广东深圳 518000)

摘要:目的 比较基因芯片快速鉴定分枝杆菌与经典涂片抗酸染色镜检技术的临床应用效果, 评估两种方法的优劣性。方法 2011~2014 年间以基因芯片与涂片抗酸染色两种技术对深圳市所有综合性医院临床怀疑有分枝杆菌感染的标本进行检验。 χ^2 检验两种方法阳性率的差异性。结果 共有标本 2 481 例, 涂片抗酸染色技术检出阳性标本 193 例, 阳性率 7.8%。基因芯片技术检出阳性标本 317 例, 阳性率 12.8%。基因芯片鉴定技术比涂片抗酸染色技术阳性率高, 两者间比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。317 例阳性标本经基因芯片技术分类为 263 例结核分枝杆菌(MTB), 27 例脓肿分枝杆菌, 18 例胞内分枝杆菌, 3 例胃溃疡分枝杆菌, 3 例鸟分枝杆菌, 1 例戈登分枝杆菌, 1 例海分枝杆菌, 1 例堪萨斯分枝杆菌。结论 基因芯片技术快速、准确, 阳性率比涂片抗酸染色技术高。菌株的分类鉴定, 有利于临床明确病原, 对个体化抗分枝杆菌感染治疗有指导意义。

关键词: 基因芯片; 涂片抗酸染色; 分枝杆菌

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.16.018

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)16-2335-03

Clinical application and comparison of rapid and accurate identification of mycobacterium by gene chip microarray and smear acid-fast staining*

Hou Hu, Li Aimin, Tang Shuming

(Department of Clinical Laboratory, Longhua Branch of Shenzhen People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518000, China)

Abstract: Objective To compare the clinical effect of application of gene chip microscopy technique for rapid identification of Mycobacterium and classic smear acid-fast staining, and to assess the advantages and disadvantages of the two methods. **Methods** From 2011 to 2014, gene chip microarray and smear acid fast staining were used to identify the mycobacterium tuberculosis in specimens suspicious of the infection from all the general hospitals of Shenzhen city. Chi-square test was used to compare the positive rates of the two methods. **Results** A total of 2 481 specimens were collected from clinic. With smear acid-fast staining technique, the positive specimens of 193 cases were found and the positive rate was 7.8%. Meanwhile, 317 positive samples were detected by the technology of gene chip microarray, and the positive rate was 12.8%. The positive rate of Gene chip microarray technology was higher than that of the smear acid fast staining, and there was significant difference between them ($P < 0.05$). The 317 positive samples identified by Gene chip microarray, included 263 cases of Mycobacterium tuberculosis, 27 cases of Mycobacterium abscessus, 18 cases of Mycobacterium intracellulare, 3 cases of Mycobacterium gastric ulcer, 3 cases of Mycobacterium avium, 1 case of Mycobacterium Gordoniae, 1 case of Mycobacterium marinum and 1 case of Mycobacterium Kansas. **Conclusion** The gene chip microarray technology is fast, accurate, and its positive rate is higher than that of smear acid-fast staining technique. Classification and identification of Mycobacterium is very helpful for clinical individualized treatment of anti mycobacterium infection.

Key words: gene chip; smear acid-fast staining; mycobacterium

分枝杆菌种类较多, 可分为结核分枝杆菌(MTB)复合群、非结核分枝杆菌(NTM)和麻风分枝杆菌 3 类。分枝杆菌的细胞壁含有大量分枝菌酸, 染色后能抵抗强脱色剂盐酸乙醇的脱色, 故又称为抗酸杆菌。MTB 是引起结核病的病原菌, 可侵犯全身各器官, 但以肺结核为最多见^[1]。近年来, 因艾滋病、吸毒等社会原因及免疫抑制剂的应用, 分枝杆菌发病率, 尤其是 NTM 感染呈上升趋势。2010 年第五次全国结核病流行病学抽样调查结果显示, NTM 在分枝杆菌分离菌株中占比高达 22.9%, 相比 1990 年的 4.9%, 涨幅超过 360%。NTM 病和结核病有着相似临床表现, 但对药物的敏感性完全不同, 若当成结核病用药, 其耐药率为 95.9%; 耐多药率为 83.7%, 往往导致治疗失败^[2-3]。因此, 建立一种快速、简便的分枝杆菌菌种鉴定方法以及及时、准确地鉴定分枝杆菌菌种, 对诊断、控制和治疗分枝杆菌感染引起的疾病具有重要的意义。本研究在已经建立了基于基因芯片技术的检测技术基础上, 将之与传统涂片

抗酸染色技术进行比较, 探讨基因芯片技术的临床应用价值与优势。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2 481 例标本来自深圳市人民医院 2011~2014 年期间门诊和住院患者。临床怀疑可能分枝杆菌感染, 并留取相应标本。标本类型有痰液、脓液、胸腔积液、尿液与支气管刷片等。

1.2 仪器与试剂 ABI 公司的 PCR 扩增仪; 韩国 FINE PCR 公司分子杂交箱; BASO 抗酸杆菌染色试剂盒; 分枝杆菌菌种鉴定采用亚能生物技术(深圳)有限公司研制的分枝杆菌菌种鉴定基因检测试剂盒。

1.3 检测方法

1.3.1 涂片抗酸染色法 痰液经 2% N-乙酰半胱氨酸-氢氧化钠前处理, 加无菌 PBS(PH 6.8)洗涤, 3 000 r/min, 离心 15 min 取沉淀涂片。其他体液类标本均经离心取沉淀。初

* 基金项目: 深圳市科技局资助项目(201102151)。 作者简介: 侯沪, 女, 检验技师, 主要从事临床检验工作。

染:涂片上滴加石碳酸复红液,用火焰加热至产生蒸汽,约 5 min,水洗。脱色:第二液脱色约 1 min,轻轻摇动玻片,无红色脱出或略呈粉红色时为止,水洗。复染:第三液复染染色 30 s,水洗。自然干燥后镜检。镜检,抗酸杆菌呈红色。

1.3.2 基因芯片检测法 (1)提取样本 DNA:收集临床痰样,加入等量 2% N-乙酰半胱氨酸-氢氧化钠试剂,充分振荡直至痰液完全液化。取 1.2 mL 痰样消化液到 1.5 mL 离心管中,12 000 r/min,离心 5min,弃上清液,留沉淀备用。向沉淀中加入 1mL 分枝杆菌洗液,混匀,12 000 r/min,离心 2min,弃上清液。向沉淀中加入 50 mL MTB 裂解液,充分混匀,沸水浴 10 min,12 000 r/min,离心 2 min,留上清液。(2)PCR 扩增:取出 PCR 反应管,加入已提取的待测样品 DNA 4 uL。同时取两管 PCR 反应管分别加入 4 uL MTB 阳性质控品和 MTB 阴性质控品,作为产品使用过程的质量控制。(3)杂交:取 15 mL 塑料离心管,放入标有患者编号的膜条,加入杂交液 5~6 mL 及所有 PCR 产物后沸水浴 10 min,再放入杂交箱 57 °C 杂交 1.5 h;阳性质控品和阴性质控品同步处理。同时将 B 液在杂交箱中预热至 57 °C 待用。(4)洗膜:取出膜条,移至预热至 57 °C 的 B 液中洗膜 15 min。(5)显色:室温轻摇孵育 30 min,然后用杂交液洗两次,每次 5 min,同时配制显色液。将膜条浸泡于显色液中避光显色 10~15 min 即观察结果。

1.3.3 基因测序分析 经芯片鉴定为分枝杆菌的临床分离株进一步送上海英骏生物技术有限公司进行基因测序鉴定,以检测 PCR 扩增的特异性和芯片鉴定结果的准确性。

1.4 统计学处理 根据所有标本数与两种方法同时检测得出的结果列交叉列表,进行配对 χ^2 检验两种方法的差异性,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 检测结果 从 2 481 例临床疑似分枝杆菌感染患者标本中,涂片抗酸染色技术检测出 193 例阳性,阳性率 7.8%(193/2 481)。此法不能区分出 MTB 与 NTM。基因芯片检测技术检出 317 例阳性,阳性率 12.8%(317/2 481)。其中鉴定分类出 MTB 263 例,占 82.9%(263/317),NTM 占 17.1%(54/317)。连续校正 χ^2 检验显示,两种方法比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。交叉列表见表 1。

表 1 涂片抗酸染色与基因芯片鉴定两种方法检测结果统计(n)

基因芯片	涂片抗酸染色		合计	χ^2	P
	阳性	阴性			
阳性	191	126	317	1 396.664	0.000
阴性	2	2 162	2 164		
合计	193	2 288	2 481		

2.2 分枝杆菌分布 基因芯片检测出的 317 株分枝杆菌,均为单一菌感染。MTB 占有绝对优势,NTM 中以脓肿分枝杆菌为主,其他种类散见。菌种具体分布见表 2。

表 2 基因芯片检测分枝杆菌病原菌分布

菌种名称	菌株数(n)	构成比(%)
MTB	263	82.9
NTM	54	17.1
脓肿分枝杆菌	27	8.5

续表 2 基因芯片检测分枝杆菌病原菌分布

菌种名称	菌株数(n)	构成比(%)
胞内分枝杆菌	18	5.7
胃/溃疡分枝杆菌	3	1.0
鸟分枝杆菌	3	1.0
海分枝杆菌	1	0.3
戈登分枝杆菌	1	0.3
堪萨斯分枝杆菌	1	0.3

2.3 测序结果 根据芯片鉴定结果,随机挑选出 20 株 MTB 复合群与 53 例 NTM 进行 DNA 测序。测序结果与基因库中标准序列进行对照分析,基因芯片鉴定结果与测序结果完全一致。图 1 显示为脓肿分枝杆菌测序结果。

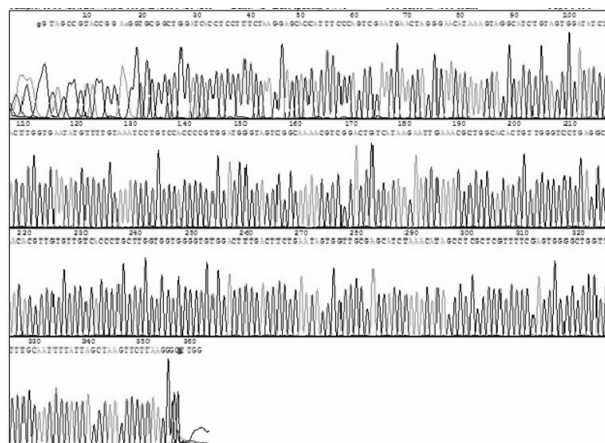


图 1 脓肿分枝杆菌测序结果

3 讨 论

本研究中,针对近 3 年临床标本进行检测分析,涂片抗酸染色法检出 193 例阳性,阳性率只有 7.8%。涂片抗酸染色镜检技术为分枝杆菌诊断的最经典,应用最普遍的方法,但其敏感度较差。操作步骤过程中对检验员个人能力素质要求严格,受到干扰因素较多,易造成结果漏检或漏报。虽然近年来,发展衍生出荧光染色镜检技术和发光二极管显微镜检技术等,但其敏感性仍存在差异^[2]。涂片染色法不能区分 MTB 与 NTM,导致临床诊治上的误差,特别容易造成 NTM 感染治疗失败^[4]。

其他学科的发展,给分枝杆菌的检验带来新的技术革命。其中,免疫学与分子生物学领域的研究尤其活跃。相比传统染色镜检技术,新技术具有反应快速、重复性好、灵敏性高等诸多优点。而将显色技术与聚合酶链反应相结合的基因芯片技术还可同时检测多个基因序列,检测保守序列可以进行分枝杆菌菌种的鉴定,还可检测基因突变引起的耐药现象等^[5]。这些技术对检验人员掌握新知识与技术提出了新的要求,有效地降低了人为因素在操作过程对结果的干扰。

本文利用最新的基因芯片检测技术与涂片染色法同时分析 3 年临床标本,共检出阳性标本 317 例,阳性率 12.8%,较涂片抗酸染色高。连续校正 χ^2 检验两者间差异有统计学意义($P < 0.05$),涂片染色法阳性的标本,基因芯片法 99.0%(191/193)检出阳性,且分类鉴定出 NTM,包括 19 例脓肿分枝杆菌,7 例胞内分枝杆菌,1 例戈登分枝杆菌。而涂片染色法阴性标本中,基因芯片法检出 126 例阳性,(下转第 2338 页)

运输箱在放置冷源 0.5 h 后,各点温度均在 2~10 ℃,可用于运输红细胞类血液;冷链保持 2~10 ℃,最长时间为 2 h,见表 3。

表 2 运血箱冷链监控情况(℃)

芯片摆放位置	放冷源后 0.5 h 温度	最低温度	最高温度
左下	7.5	6.5	7.5
中上	6.5	6.0	7.0
中下	8.5	8.0	8.5
右上	8.0	8.5	9.0
右下	8.5	8.0	9.0

表 3 运血箱冷链监控情况(℃)

芯片摆放位置	放冷源后 0.5 h 温度	最低温度	最高温度
左下	8.5	9.0	9.5
中上	7.0	7.5	8.0
中下	9.0	9.0	9.5
右上	8.0	8.5	9.5
右下	8.0	8.0	9.0

3 讨 论

冷链是保证血液质量的一项重要措施,也是血站质量管理控制的关键环节。对于全血及红细胞类成分血,温度对红细胞的影响至关重要,控制冷链,一方面可以降低葡萄糖的消耗速度,保存细胞活力,另一方面使细菌的生长被抑制到最小程度^[1-3]。而对于新鲜浆、冷沉淀等产品,冷链又是影响内源性凝血因子活性衰减至关重要的因素。所以,运输过程中的冷链保证是采供血全过程重要的环节^[4]。

重庆市血液中心一直重视采供血全过程的质量控制,积极探索可操作的、有效的监控运输过程冷链的方法。结合血液运输要求,应用目前先进的智能温度芯片,对现用规格的血液运输箱冷链温度监控方法进行了探索实践。运输血液产品时,由于每袋血液之间容量的差异,冷源的多少要由所运输的血液体

质量决定,不应单纯的计算血液袋数^[5]。而使用智能温度芯片代替温度计,可以连续监控箱内温度的变化情况,减少人工反复打开箱子读数时对血液运输箱内温度的影响,同时,其监控结果可以数据形式电子备份,或打印出来纸质存档^[6],值得推广。

在不同的季节,环境温度变化较大,当冷源与血液体质量比固定时,而随着环境温度的变化,血液运输箱可使用时间也要随之变化。本试验设计的不同环境温度(12、25、44 ℃)基本上能代表重庆地区不同季节气温情况。表 1 的环境温度可以代表冬季,此时若运输红细胞类血液,冷链最长可以保证 8 h。表 2 的环境温度可以代表春秋季节,此时运输红细胞类血液,冷链最长可以保证 4.5 h。表 3 环境温度代表夏季,此时,单纯使用血液运输箱运输红细胞类血液,冷链最长只能保证 2 h。血液运输要求附录 A 中要求血液运输箱内适宜温度维持时间应至少比最长运输时间长 2 h,因此,冬季血液运输箱的最佳使用时间为 6 h,春秋季节血液运输箱最佳使用时间为 2.5 h,夏季血液运输箱需要将运血箱放入冷链车中,降低运血箱周围的环境温度,延长运血箱使用时间,充分保证运输血液产品冷链满足要求,使血液产品的质量得到保证。

参考文献

- [1] 兰竹,谢映明,陈永超. 血液运输过程中“冷链”的现状分析及优化[J]. 中山大学学报, 2006, 27(3): 225-226.
- [2] 苏庆军,唐茂林,陈建国. 野战条件下血液运输冷链的维护[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(2): 245-246.
- [3] 杨振宇,谭萍,张福,等. 血液运输过程的冷链控制分析[J]. 云南医药, 2013, 7(4): 324-326.
- [4] 严秀娟,吴才良,蒋清波,等. 温度控制与血液质量的关系探讨[J]. 中国输血杂志, 2003, 16(5): 320-322.
- [5] 邹晓萍,黎美君,樊小蓉,等. 血液运输工具确认方法的探讨[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(19): 2359-2360.
- [6] 田纳,石海燕,梁健,等. 温度芯片在血液运输中的监测与应用[J]. 哈尔滨医药, 2010, 10(2): 44-45.

(收稿日期:2015-05-24)

(上接第 2336 页)

其中 NTM 包括 8 例脓肿分枝杆菌,11 例胞内分枝杆菌,3 例胃/溃疡分枝杆菌,3 例鸟分枝杆菌,1 例堪萨斯分枝杆菌和 1 例海分枝杆菌。通过基因测序法对这些结果进行鉴定,基因芯片法的鉴定结果正确率 100%。

基因芯片法具有高通量性,且能同时检测临床上常见的具有致病性的 NTM。可直接利用痰液标本进行检测,操作过程简便、快速,具有很高的检测灵敏度和特异度^[6]。结果用肉眼即可直接观测,无需特殊设备。该项技术对于临床分枝杆菌感染的诊断与治疗具有很高的应用价值,适用于综合医院、专科医院和研究机构广泛开展。

参考文献

- [1] 周珍文. 分枝杆菌的实验室诊断[J]. 中华检验医学杂志, 2014, 37(3): 239-240.

- [2] 王黎霞,成诗明,陈明亭,等. 2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告[J]. 中国防痨杂志, 2012, 34(8): 485-508.
- [3] Wu XE, Yang YR, Zhang JX, et al. Comparison of antibody responses to Seventeen antigens from Mycobacterium tuberculosis[J]. Clin Chim Acta, 2010, 411(19/20): 1520-1528.
- [4] 马小波,梁朝霞,徐庆雷,等. 11 例非结核分枝杆菌耐药性分析[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(24): 2748-2749.
- [5] Caoili JC, Mayorova A, Sikes D, et al. Evaluation of the TB-Biochip oligonucleotide microarray system for rapid detection of rifampin resistance in mycobacterium tuberculosis[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(3): 2378-2381.
- [6] 赵连爽,代娣,陈昕,等. 基因芯片在分枝杆菌菌种鉴定及结核耐药基因检测的诊断价值[J]. 检验医学与临床, 2014, 11(12): 1595-1598.

(收稿日期:2015-03-14)