

PCR 技术检测体液中结核分枝杆菌的结果分析

胡 静[△], 袁文清

(周口市中心医院检验科, 河南周口 466000)

摘要:目的 应用荧光定量 PCR 技术检测体液中的结核分枝杆菌并对其结果进行讨论分析。方法 荧光定量 PCR 技术以其灵敏、快速、特异性高广泛应用于临床医学中。它可检测出 1 pg 至 100 fg 的 DNA, 相当于 10~100 个结核杆菌从而明显提高了结核病的诊断率。但它较高的假阳性率也给临床鉴别诊断带来了一定影响。结果 笔者对 282 份临床标本的结果进行了回顾性分析, 有些标本的 PCR 检测结果会出现阳性和假阳性。假阳性率为 11.1%, 不同种类标本中的假阳性率还存在有一定的差异。结论 由于目前没有能快速诊断结核病的检测方法, 使用实时荧光定量检测结核患者血清中的 DNA, 如果再能与其他方法有机结合, 可以提高诊断结核的敏感度。

关键词:聚合酶链反应; 结核分枝杆菌; 诊断, 鉴别

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.05.032

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)05-0588-02

结核病是由结核分枝杆菌侵入人体后引起的一种慢性传染性疾病, 并具有较强的传染性。20 世纪 80 年代结核病疫情明显下降, 近年来随着人们对结核病的认识也由恐惧转向淡漠, 结核病全球又有上升与蔓延趋势, 对社会已构成严重的健康威胁^[1]。以往对结核病实验室诊断采用的是细菌学涂片、培养、药敏和菌型鉴定方法^[2]。分子生物学检测技术也就是荧光定量 PCR 技术的临床应用对结核分枝杆菌检测的阳性率由原来的 30%~50% 提高到 70%~90%, 为临床诊断、治疗、疗效评估提供了更多的参考依据。荧光定量 PCR 技术虽然有着灵敏度高、特异性强、快速等优势, 但是, 此检测方法对实验环境和操作技术都有很高标准的要求, 在实际工作中常出现检测结果的假阳性和假阴性, 笔者对 282 例标本的检测结果进行比较分析, 报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 282 份标本取自住院和门诊患者。其中, 痰 156 份, 胸水 27 份, 纤维支气管镜刷取物 59 份, 血 27 份, 尿 8 份, 腹水 2 份, 皮肤活检物 2 份, 心包积液 1 份。结核组合非结核组的诊断根据临床表现、X 线、抗酸染色、纤维支气管镜检、组织病理检查及抗结核治疗效果观察等综合确诊。

1.2 仪器与试剂 中山达安生物工程公司生产的达安 7600PCR 扩增仪, 试剂为达安生产的原装试剂, 抗酸染液为贝索的染色液。

1.3 方法 PCR 采用荧光定量 PCR 技术, 常规方法将标本涂片抗酸染色镜检。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计学软件进行数据分析, 组与组之间的比较采用 χ^2 检验, 显著性检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 PCR 检测和痰涂片阳性结果 见表 1, 在结核组中, PCR 阳性检出率为 74.42%, 而涂片仅为 8.14%, 两组阳性率差异有统计学意义 ($P<0.005$), 而非结核组中 PCR 的假阳性检出率为 11.06%, 涂片组为 0.00%, 两组间也存在显著 ($P<0.005$)。

2.2 PCR 在各类标本中的阳性和假阳性 见表 2, 由于各种标本数量不一, 仅对痰、支气管镜刷取物和血标本组间假阳性率做统计分析, 痰、纤维刷物二种标本与血标本间假阳性率均存

在显著差异 ($P<0.01$)。

表 1 PCR 检测和痰涂片阳性结果

分组	n	PCR 阳性[n(%)]	涂片阳性[n(%)]
结核组	86	64(74.42)	7(8.14)
非结核组	208	23(11.06)	0(0.00)

表 2 不同标本 PCR 检测阳性和假阳性

标本	n	PCR 阳性/结核组(%)	PCR 阳性/非结核组(%)
痰	156	36/51(70.59)	15/105(14.29)*
胸水	27	4/4(100.00)	2/23(8.70)
纤维刷物	59	8/12(66.67)	6/47(12.77)*
血	27	9/10(90.00)	0/17(0.00)
尿	8	4/4(100.00)	0/4(0.00)
腹水	2	2/2(100.00)	0/0(0.00)
皮检物	2	1/2(50.00)	0/0(0.00)
心包积液	1	0/1(0.00)	0/0(0.00)

*: 和血液标本比较, $P<0.01$ 。

3 讨论

PCR 技术因具有高度灵敏度和特异性在临床的病原体检测中已广泛运用。文献报道 PCR 可检测出 10~100 个结核杆菌。本实验中, PCR 阳性率达 74.4%, 而相应的涂片抗酸染色检出率仅为 8.1%。因此 PCR 在结核分支杆菌检测中不失为一种灵敏、快速和简便的方法^[3]。但 PCR 在检测中出现的假阳性也是一直困扰临床应用的一个问题, 结核分支杆菌的假阳性结果对肺结核和肺癌的鉴别诊断增加了难度。一般假阳性来自于试剂污染、实验室污染、采样污染、扩增结果判断错误及引物本身的设计缺陷等方面。实验中, 前三种污染情况较易识别和排除。本科室曾因试剂原因出现过假阳性问题, 但这种情况往往是所有标本均为阳性, 容易排除。也有报道说不同厂家扩增产物片段长度不一样的试剂盒对非结核组的阳性率(假阳性)有一定影响, 扩增产物片段较短, 敏感度高, 但假阳性率也高; 反之, 敏感度和假阳性率则低。

本实验中假阳性率为 11.06%, 但各种标本中的假阳性率

[△] 通讯作者, E-mail:1132947646@qq.com。

却有差异,在几种主要标本中,痰、纤刷物及胸水中的假阳性率较高,而在 27 份血标本中检出阳性 9 例,与临床诊断对比,阳性检出率为 90.00%,而假阳性率为 0。此结果说明不同标本 PCR 检测分枝杆菌假阳性率存在明显差别。另几种标本因数量较少,在此未作统计分析,有待进一步研究。

15 例假阳性痰标本做普通细菌培养,9 例痰菌阳性,其中卡他布兰汉氏菌 4 例,卡他布兰汉氏菌和甲型链球菌混合感染 3 例,卡他布兰汉氏菌和产气肠杆菌混合感染 1 例,摩根氏变形杆菌 1 例。在这 15 例中,病理诊断为支气管鳞癌 1 例,腺癌 6 例,非何金氏淋巴瘤 1 例,其中 2 例合并卡他布兰汉氏菌感染。纤刷物和胸水未作细菌培养,而各例血、尿标本普通细菌培养均为阴性。说明标本中杂菌和癌细胞 DNA 的存在可能是造成 PCR 假阳性扩增或影响结果判断的重要原因。对于皮肤检出物标本的处理,笔者加入 1 mol/L NaOH 后 15 min 均浆标本,其余步骤同一般标本处理,效果较好。

综上所述,在痰涂片阴性患者中能够检测到 TB-DNA,又由于目前没有能快速诊断结核病的检测方法,使用实时荧光定量检测结核患者血清中的 DNA,如果再能与其他方法有机结合,可以提高诊断结核的敏感度^[4]。实验证明,荧光定量 PCR 是一种快速、灵敏、特异的基因诊断技术,此技术在结核分枝杆菌检测方面有许多优势,但由于影响 PCR 检测结果的诸多因素影响如:环境、操作、及标本污染等会造成检测结果的假阳性,因此有待进一步改进。所以分枝杆菌 PCR 检测结果与结

• 检验技术与方法 •

高效液相色谱法测定血液透析液中醋酸根离子含量

王丽兰¹,廖淑君^{2△}

(1. 桂林医学院附属医院检验实验室,广西桂林 541001; 2. 桂林优利特医疗电子有限公司,广西桂林 541001)

摘要:目的 建立一种测定血液透析用浓缩物中醋酸根离子含量的方法。方法 采用高效液相离子排阻色谱法测定血液透析液中醋酸根离子的含量。色谱条件如下,色谱柱:Reae ROA-Organic Acid H⁺ (50×7.8mm);检测波长:220 nm;流速:0.6 mL/min;流动相:0.015 mol/L 硫酸水溶液。结果 醋酸根离子线性范围是 2.4~5.6 mmol/L($r=0.9997, n=5$),平均加样回收率为 100.3%,RSD=0.24%($n=3$)。结论 高效液相色谱法测定血液透析液中醋酸根离子含量操作简单,准确度高,可用于常规试剂分析。

关键词:色谱法,高压液相; 醋酸根离子; 透析液

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.05.033

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)05-0589-03

目前,慢性肾衰竭的发病率在世界范围内呈持续增高趋势,且大多数都有高血压或低血压,而且不易控制,甚至引起继发性甲状旁腺功能亢进^[1-3]。世界卫生组织(WHO)发表研究报告指出,血液透析是慢性肾功能衰竭尿毒症患者肾脏替代治疗的重要手段^[4]。研究表明超纯透析液能显著改善慢性肾衰竭患者营养状况及贫血,且与炎症状况改善有关^[5-6]。醋酸在透析液中主要起调节 pH,稳定溶液的酸度的作用。醋酸根离子含量过低,会导致透析液酸度达不到要求,透析液中的 Ca²⁺ 和 HCO₃⁻ 发生反应形成 CaCO₃ 沉淀,损坏透析机^[7]。另外醋酸根离子含量过高,在体内蓄积过多,超过机体代谢能力,在临床上常发生恶心、疲倦、肌肉痛性痉挛等不良反应,所以要对血液透析液中醋酸根离子的含量加以控制。目前对于血液透析液中醋酸根离子含量测定主要有线性滴定法^[8]、Grans 图解法^[9]、紫外分光光度法^[10]、pH 指示剂吸收度比值法^[11]和离子交换

分离法^[12],这些方法操作复杂,费时,而且容易引起误差。笔者采用高效液相色谱法,使用阴离子排阻色谱柱测定血液透析液中醋酸根离子的含量,并进行了方法学考察。

参考文献

- [1] 方梅,陆巧荣,洪志强. 分子信标荧光定量 PCR 技术检测结核分枝杆菌方法建立及其临床应用[J]. 四川大学学报:医学版,2010,41(1):162-165.
- [2] 金建东. 荧光定量 PCR 检测痰结核杆菌 DNA 及其临床应用[J]. 齐齐哈尔医学院学报,2010,31(22):3565-3566.
- [3] 魏建华,薛晓红,熊建军,等. 结核分枝杆菌 DNA 分子生物学检测[J]. 预防医学情报杂志,2012,28(1):76-78.
- [4] 陈建文. PCR 荧光定量检测血清结核杆菌 DNA 在临床的应用[J]. 临床肺科杂志,2009,14(7):960.
- [5] 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.
- [6] 牛宁奎,王自立,施建党,等. 荧光定量 PCR 检测结核分枝杆菌 DNA 的流行病学特点[J]. 检验医学与临床,2011,08(17):2049-2050.

(收稿日期:2012-10-01)

△ 通讯作者,E-mail:wanglilan1963@163.com。