

### 3 讨 论

临床实验室需要检测的多重耐药菌(MDRO)主要是获得性耐药菌<sup>[1]</sup>,而此类耐药菌的耐药生理化学机制有以下几点:(1)灭活酶和纯化酶的产生;(2)抗菌药物渗透障碍;(3)药物作用的靶位改变;(4)代谢途径改变等<sup>[2]</sup>。目前,葡萄球菌对青霉素和大环内酯类抗菌药物具有 50% 以上的耐药率<sup>[3]</sup>。已经可以肯定的是,新抗菌药物的开发无法跟上细菌耐药进化的步伐。因此合理使用现有抗菌药物,控制细菌耐药的传播就成为解决细菌耐药问题的关键<sup>[4]</sup>。

日常细菌耐药性监测工作中需要一种简便、实用的检测多重耐药菌的实验方法。K-B 法是 WHO 推荐的方法,其目的在于技术的简单和可重复性<sup>[5]</sup>,K-B 法还可察觉异型耐药菌株和污染菌株<sup>[6]</sup>,是比较经典的手工药敏试验方法,但目前不能完全自动化操作,工作量大时手工操作费工费时,而且仅对生长较快的细菌,K-B 法药敏试验已经标准化了<sup>[6]</sup>,但适用范围有限。MIC 法是近年来临床微生物实验室应用较多的抗菌药物体外药敏试验方法,其优点是一块板可同时测定多种抗菌药物,但 MIC 法试剂成本昂贵。本实验所用的国产自动化细菌测定系统仪器和试剂成本远低于进口仪器,其鉴定药敏试剂板可用于临床 500 多种病原菌的鉴定和抗菌药物 MIC 半定量分析,基本能满足常见的细菌鉴定和药敏试验,其药敏板的设置和配置的报告软件根据 CLSI 标准进行设计,细菌鉴定和药敏试验报告中可同时报告是否有常见 MDRO 菌株的检测结果,不需再用 K-B 法确认;该系统还配有 WHONET 功能,可与 WHO 推荐的细菌耐药性统计 WHONET 软件连接,根据用户的需求,可将检验结果直接导入 WHONET 系统,不需要重新输

入,利用 WHONET 软件可及时对日常细菌耐药性监测数据进行回顾性分析,可持续改进药敏实验的质量,保证实验数据的可靠性<sup>[7]</sup>。

综上所述,该国产自动化细菌测定系统 MIC 法对葡萄球菌、大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌等 MDRO 检测结果与 K-B 法基本一致,并且操作方便,成本较低,结果可靠,特别适合中小型医院。

### 参考文献

- [1] 马筱玲,鲁怀伟,张艳. 认识细菌的天然耐药和获得性耐药[J]. 中华检验医学杂志,2012,35(8):762-763.
- [2] 倪语星,洪秀华. 细菌耐药性监测与抗感染治疗[M]. 北京:人民军医出版社,2002:26-28.
- [3] 李耘,吕媛,薛峰,等. 我国 2009 至 2010 年 MOHNARIN 项目临床分离常见病原菌的耐药监测[J]. 中华检验医学杂志,2012,35(1):67-87.
- [4] 俞云松. 重视细菌耐药检测,提高耐药监测水平[J]. 中华检验医学杂志,2012,35(1):6-7.
- [5] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京:东南大学出版社,2006:896-905.
- [6] 李影林. 中华医学检验全书(上卷)[M]. 北京:人民卫生出版社,1996:1254.
- [7] 姚蕾,金少鸿. 抗菌药物纸片法敏感性试验的质量评价与改进[J]. 中国抗生素杂志,2004,29(4):209-213.

(收稿日期:2013-02-05)

### • 检验技术与方法 •

## 3 种提取丙型肝炎病毒 RNA 方法的比较

张宝华<sup>1</sup>,王 红<sup>2</sup>,陈 坤<sup>1</sup>

(1. 南京军区福州总医院二部检验科,福建福州 350003;2. 北京总参管理保障部北极寺门诊部,北京 100191)

**摘要:**目的 比较 3 种核酸提取方法提取血清丙型肝炎病毒(HCV)RNA 的效率及抗干扰能力。方法 收集 336 例丙型肝炎伴高脂血症、高胆红素血症或高免疫球蛋白血症患者血清,采用 Trizol-氯仿法、异硫氰酸胍法和固相吸附法提取血清中病毒 RNA。以 HCV RNA 荧光定量 PCR 检测结果评价不同提取方法对 HCV 检出率的影响。结果 在高脂血症、高胆红素血症和高免疫球蛋白血症情况下,利用固相吸附法提取的 RNA 模板,定量 PCR 反应的 HCV 检出率均为最高( $P < 0.05$ )。结论 提取血清 HCV RNA 以固相吸附法为佳。

**关键词:**丙型肝炎病毒; RNA 提取; 聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.20.048

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2013)20-2736-02

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)是单股正链 RNA 病毒,属于黄病毒科嗜肝病毒属<sup>[1]</sup>。HCV 是非甲非乙型肝炎中导致慢性肝病的主要原因,全球约有 1.7 亿人感染<sup>[2]</sup>。HCV 主要经血液和血制品传播,因此,筛查血液及其制品中的 HCV 可有效降低 HCV 的传播概率。本文通过 Trizol-氯仿、异硫氰酸胍、固相吸附法 3 种核酸提取方法对已经确认高血脂、高胆红素和高免疫球蛋白丙型肝炎阳性患者血清进行病毒 RNA 提取,最后对病毒 RNA 荧光定量检测来比较 3 种方法的检出率。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集临床送检的 HCV 阳性血清,经荧光定量 PCR 和酶联免疫测定均符合实验的阳性标本。其中,高血

脂样本 158 例,高胆红素样本 107 例,高免疫球蛋白样本 71 例。

**1.2 试剂** Trizol 购于 Invitrogen 公司,异硫氰酸胍购自南京探求生物技术有限公司,氯仿、无水乙醇、异丙醇等购于西陇化工公司,用于固相吸附的二氧化硅颗粒购买于西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司, HCV RNA 试剂盒,英科新创(厦门)生物公司生产,仪器为厦门安普利生物公司生产的全自动医用 PCR 分析系统型号 Genelight 9800(试剂为该公司的配套试剂)。

### 1.3 方法

**1.3.1 RNA 提取方法** (1)Trizol-氯仿法:严格参照 Invitrogen 公司试剂盒说明书进行操作。(2)异硫氰酸胍法:取 50  $\mu$ L

血清,加入 RNA 提取液 100  $\mu$ L 混旋 10 s, (60  $\pm$  5)  $^{\circ}$ C 温育 10 min. 平衡至室温,加入异丙醇 200  $\mu$ L,充分混匀 15 s, 15 000 r/min,离心 15 min,吸去上清液,加入 500 mL 75% 乙醇,15 000 r/min 离心 10 min,最终得到总 RNA。(3)固相吸附法:固相吸附法主要通过固相二氧化硅颗粒作为吸附介质来吸附核酸物质,具体方法参考文献<sup>[5]</sup>。

**1.3.2 定量测定** 制备的沉淀分别用反应缓冲液 50  $\mu$ L 混悬,取 45  $\mu$ L 依次加入反应管中,混匀,稍微离心,置入荧光 PCR 扩增仪内。上机检测:(1)循环条件设置 42  $^{\circ}$ C 30 min, 95  $^{\circ}$ C 2 min。(2)进入以下循环:95  $^{\circ}$ C 15 s,52  $^{\circ}$ C 50 s(30 s 后

读荧光),40 循环。(3)仪器检测通道选择荧光素设定为 F1 (FAM)及 F2(HEX);荧光信号采集设在 52  $^{\circ}$ C 30 s;具体设置方法严格参考仪器使用说明书。读取相应的 CT 值,根据文献<sup>[6-7]</sup>来判定结果。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS17.0 统计软件进行统计学分析,计数资料用相对数表示,率的比较采用卡方检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

固相吸附的方法在 HCV RNA 的检测中具有更好的检测能力,荧光定量 PCR 判定结果见表 1。

表 1 3 种方法提取 HCV RNA 阳性率[n(%)]

提取方法	n	Trizol-氯仿法	异硫氰酸胍法	固相吸附法	$\chi^2$	P
高脂血样本	158	95 (60.13)	101(63.92)	149(94.30)	55.979	0.000
高胆红素血样本	107	78(72.90)	80(74.77)	98(91.59)	14.044	0.001
高免疫球蛋白血样本	71	45(63.38)	43(60.56)	69(97.18)	30.429	0.000
$\chi^2$	—	4.655	4.884	2.421	—	—
P	—	0.098	0.087	0.298	—	—

—:此项无数据。

**3 讨 论**

提取 RNA 时由于 RNA 酶的广泛存在性,通过 Trizol-氯仿法、异硫氰酸胍法等方法,操作过程比较繁琐,步骤较多,因此提取的核酸接触 RNA 酶的概率大大增加。这直接导致提取 RNA 的提取效率大大降低。因此采取一种有效的提取方法对于 RNA 检测来说是至关重要的。

固相吸附法是利用特定固相载体,通过不同的作用力,如静电作业,正负电荷等作用力的作用在适宜条件下,选择性的吸附核酸,而不吸附蛋白质、脂类及糖类物质,从而实现纯化核酸的目的。固相吸附法具有快速简单, RNA 产物收率高、纯度和稳定性好,反应重现性好等特点。对于血液筛查和检测来说有要求这种提取方法要操作简便、重复性好、减少交叉污染、能进行大量样本的处理等。因此固相吸附法通过固相吸附核酸,直接在封闭的管进行荧光定量 PCR,操作步骤少,重复性强、交叉污染少等是血液筛查和检测的最适方法。本研究发现,通过固相吸附法测得的阳性样本阳性率较 Trizol-氯仿法和异硫氰酸胍法有很大的提高,而且对于不同类的血样来说检测效率都没有发生太大的变化。这就说明固相吸附法有很好的稳定性。

高脂样本、高胆红素样本和高免疫球蛋白样本是 HCV 感染患者中经常出现的。因此对于溶剂裂解过程中对不同的样本类型,提取 RNA 的结果也有一定的影响。在 Trizol-氯仿法和异硫氰酸胍法中可以看到,对于高脂和高免疫球蛋白样本来说高胆红素样本阳性检测率都较低。这其中的原因可能是高脂样本和高免疫球蛋白样本中存在一定的乳糜微粒和蛋白质<sup>[9]</sup>。对于溶剂提取 RNA 过程中裂解离心去上清存在一定的影响,而胆红素样本并不会对此影响。对于固相吸附方法来说吸附的过程中直接去除一些蛋白质等杂质,只吸附核酸。因此对于样本类型的影响并没有前两种方法大,阳性率都在

90% 以上。检测过程出现了一些假阴性,其原因可能在于低值 HCV 样本在运输或者低温条件下保存时间长短不同会导致样本的降解<sup>[10]</sup>,因此对样本的处理应低温运输,并且在最短的时间内进行检测<sup>[11]</sup>。

**参考文献**

- [1] Ferron F, Bussetta C, Dutartre H et al. The modeled structure of the RNA dependent RNA polymerase of GBV-C virus suggests a role for motif E in Flaviviridae RNA polymerases[J]. BMC Bioinformatics, 2005, 6:255.
- [2] Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection[J]. N Engl J Med, 2001, 345(1):41-52.
- [3] 蒋向辉, 余朝文, 赫博飞, 等. 杉木总 RNA3 种提取方法的比较研究[J]. 江西农业科学, 2009, (6):81-82.
- [4] 吴艳华, 李杰, 高岚, 等. 生物组织总 RNA 的高效提取[J]. 兰州大学学报:自然科学版, 2008, 44(2):144-146.
- [5] 杨湛, 吕凌. 改良二氧化硅吸附法检测丙型肝炎病毒核酸[J]. 中华医学检验杂志, 1994, 17(5):290-292.
- [6] 袁小珍, 陈伟烈, 魏绍静, 等. 实时荧光 PCR 技术在丙型肝炎病毒基因型检测中的应用[J]. 广东医学, 2011, 32(5):582-584.
- [7] 姚敏, 王琼玲. 定量检测丙型肝炎病毒核酸的临床意义[J]. 中华临床医学杂志, 2006, 7(3):19-20.
- [8] 陈晓华, 赵田. 影响 FQ-PCR 检测 HCVRNA 结果的标本因素[J]. 中国误诊学杂志, 2010, 10(4):798-799.
- [9] 熊玉娟, 周华友. 不同保存条件对丙型肝炎核酸稳定性的影响[J]. 中国输血杂志, 2012, 25(6):549-552.
- [10] 陈勇, 周华蓉. 不同保存条件对血清荧光定量 HCVRNA 检测的影响[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2009, 1(4):245-247.

(收稿日期:2013-06-08)