

明,Hcy 水平升高是心脑血管病重要的、独立危险因素^[4]。高 Hcy 血症可加剧葡萄糖的直接毒性作用及氧化修饰后的葡萄糖对内皮细胞作用,可导致暴露于过多糖基化终末产物的血管内皮细胞损伤^[5]。血清 Hcy 升高可通过影响血管内皮细胞的结构和功能,导致血管平滑肌细胞增殖,激活凝血系统,促进脂质过氧化反应,引起或加速动脉粥样硬化和血栓形成^[6]。近年研究表明,血浆 Hcy 水平与 T2DM 的慢性并发症有关。本研究显示,糖尿病组以及观察组在 Hcy 检测水平上均高于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),糖尿病组和观察组 Hcy 检测结果比较,观察组显著高于糖尿病组,差异有统计学意义($P<0.05$)。提示 Hcy 与 T2DM 伴动脉粥样硬化的发病密切相关。Hcy 是糖尿病并发动脉粥样硬化的重要危险因素,对糖尿病患者的血清 Hcy 水平监测有助于判断血管病变。

综上所述,在 T2DM 患者中,控制血糖水平的同时,可把血清 Hcy 和 hs-CRP 作为糖尿病患者是否发生动脉粥样硬化的临床常规测定筛选指标,以早期预防或延缓动脉粥样硬化的出现。对 Hcy、hs-CRP 升高的 T2DM 患者应积极进行诊断治疗,降低 T2DM 及伴动脉粥样硬化的患病率和病死率。

参考文献

[1] 张敏,李卫征. 2 型糖尿病合并脑梗死患者血清超敏 C 反应蛋白及同型半胱氨酸与颈动脉粥样硬化的关系[J]. 中国全科医学,2012,15(20):2292-2294.

[2] 王俊军,俞春娟,丁奇龙. 超敏 C 反应蛋白与 2 型糖尿病患者动脉粥样硬化的相关性研究[J]. 实用临床医药杂志,2015,19(5):5-7.

[3] 张建萍. 超敏 C 反应蛋白及血脂检测对糖尿病并发动脉粥样硬化的价值[J]. 检验医学与临床,2010,7(4):340-341.

[4] 陈惠,涂文军,王屹,等. 2 型糖尿病患者血清同型半胱氨酸水平分析[J]. 国际检验医学杂志,2012,33(19):2394-2395.

[5] 温建艳,朱焕亮,黄春芬. 2 型糖尿病患者血浆同型半胱氨酸与颈动脉粥样硬化的关系[J]. 浙江实用医学,2009,14(4):285-286.

[6] 李荣红. 血清同型半胱氨酸水平与 2 型糖尿病合并脑梗死的相关性分析[J]. 医药前沿,2012(30):51-52.

(收稿日期:2016-03-21 修回日期:2016-05-28)

全自动核酸分子杂交平台在 HPV 基因分型中的临床应用

马秋林

(广东省东莞市妇幼保健院 523002)

摘要:目的 探索使用全自动核酸分子杂交平台进行人乳头瘤病毒(HPV)基因分型检测。方法 与传统反向斑点杂交(RDB)方法进行试验对比分析。结果 全自动核酸分子杂交平台与传统 RDB 方法检测 HPV 分型结果一致,试验结果的各项指标达到要求。结论 全自动核酸分子杂交平台自动化程度高、准确、无交叉污染,可以推广应用于 HPV 基因分型检测。

关键词:反向斑点杂交; 人乳头瘤病毒; 全自动
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.21.048

文献标识码:A **文章编号:**1673-4130(2016)21-3065-03

人乳头瘤病毒(HPV)检测有助于宫颈癌早期筛查及诊断、治疗,目前已发现有 100 余种亚型,其中近一半可以感染生殖器。根据 HPV 感染与宫颈癌的密切程度,可将其分为高危型和低危型,低危型 HPV(6、11、42、43 和 44 型)等感染常引起寻常疣或肛门生殖器尖锐湿疣,以及低度宫颈上皮内病变(CIN I),一般不诱发癌变;而高危型 HPV(16、18、31、33、35、39、45、51、52、56 和 58 型)等感染可导致细胞周期调控失常,发生高度宫颈上皮内病变(CIN II、CIN III)及癌变,所以有必要进行 HPV 基因分型。对于 HPV 分型的检测方法,现采用最多的实验室方法为反向斑点杂交(RDB),基于聚合酶链反应(PCR)-等位特异性寡核苷酸杂交(ASO)技术发展而来^[1],具有灵敏性高(可达 10^3 U/mL)^[2]、准确性高、经济、通量大、易于推广等优点,被广泛用于基因分型、病原体检测、肿瘤研究等。基于 RDB 本身需要杂交、洗膜、显色等过程,且上述过程都需要手工完成,存在操作步骤繁琐、时间长、效率低等缺点。本文旨探讨通过对传统 RDB 方法进行改进,减少人工操作,使用全自动核酸分子杂交平台对 HPV 基因分型检测,简化流

程、提高通量、提高工作效率,对 HPV 分型检测的推广意义重大。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本院 2015 年 5~9 月门诊妇产科 HPV 分型检测样本 526 例。

1.2 仪器与试剂 试剂采用深圳亚能 HPV 基因分型(23 型)检测试剂盒及配套 DNA 提取试剂、辅助试剂(SDS、SSC、柠檬酸钠、POD、 H_2O_2 、TMB)等。采用广州洁特 15 mL 杂交管和 50 mL 杂交管,江苏康健吸嘴和 1.5 mL 离心管等。仪器采用深圳亚能生物全自动核酸分子杂交平台、美国 UVP HB1000 杂交炉、美国 ABI 9700 扩增仪、德国 EPPENDORF 5810R 离心机、美国 THERMO 1389 生物安全柜等设备。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 以专用宫颈脱落细胞采集器进行采样,标本采集后尽快送检或放入 2~8℃ 保存备检。对普通 526 例样本进行盲测,不作筛选,有利于阴性结果和阳性结果的对比分析。

1.3.2 样本处理 充分洗脱宫颈刷后,取 1 mL 液体转移到 1.5 mL 离心管中,13 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,保留管底的细胞沉淀。再加入 100 μ L 裂解液悬浮沉淀,放到干式恒温加热器上加热 10 min,随后 13 000 r/min 离心 10 min,保留上清液待用。

1.3.3 PCR 扩增 每个样本对应取出 2 个反应液管,低速离心,在管盖上做好标记,然后分别加入已提取的待测样本 DNA 5 μ L,阴性质控品和阳性质控品随样本相同处理,加样量均为 5 μ L,反应总体积为 25 μ L,低速离心。扩增条件如下:95 $^{\circ}$ C 变性 10 min,94 $^{\circ}$ C 10 s,42 $^{\circ}$ C 90 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,10 个循环,94 $^{\circ}$ C 10 s,46 $^{\circ}$ C 60 s,72 $^{\circ}$ C 20 s,30 个循环,72 $^{\circ}$ C 5 min。

1.3.4 试剂配制 A 液:100 mL 20 $\times$ SSC,10 mL 10%SDS 加纯水定容至 1 000 mL,常温保存。B 液:25 mL 20 $\times$ SSC,10 mL 10%SDS 加纯水定容至 1 000 mL,常温保存。C 液:100 mL 1 mol/L 柠檬酸钠加纯水定容至 1 000 mL,常温保存。孵育液,A 液:POD=2 000:1。显色液,19 mL C 液加入 1 mL TMB 和 2 μ L 30% H_2O_2 。

1.3.5 杂交、洗膜、显色操作 传统 RDB 方法。取 15 mL 塑料离心管,放入标有样本编号的膜条(应在膜条编号处用中性笔标记),加入 A 液 5 mL 及所有对应的 PCR 产物,将离心管盖拧紧,再稍微拧松,以避免加热时管盖爆开。将离心管放入沸水浴中加热 10 min(确保杂交液液面完全位于沸水浴液面下),取出拧紧离心管盖,放入杂交仪 51 $^{\circ}$ C 杂交 2 h。取 50 mL 杂交管,加入 45 mL B 液于杂交炉中预热至 51 $^{\circ}$ C,阴性质控和阳性质控相同处理。准备装有 B 液的盒子。取出膜条,放入此盒中涮洗一下(每 200 mL B 液涮洗 30 张膜条),然后转移至装有预热 B 液的 50 mL 离心管中,于 51 $^{\circ}$ C 轻摇洗涤 5 min。膜条放入孵育盒中室温轻摇浸泡 30 min,弃去孵育液。用 A 液室温轻摇洗涤 2 次,每次 5 min。用 C 液室温洗涤 1~2 次,同时配制显色液。将膜条浸泡于显色液中避光显色 30 min,然后将膜条转移至去离子水中浸泡即可观察结果。

全自动核酸分子杂交平台。产物变性:将 PCR 产物置于 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min 后,立即转入冰水混合物中放置 5 min,置于 2~8 $^{\circ}$ C 冰箱备用。(1)试剂准备:按照 A 液 1 000 mL/次、C 液 300 mL/次、纯水 300 mL/次、B 液(5*n*+100)mL/次配置试剂。(2)试剂准备:准确加入 POD(2.5*n*+10) μ L 于孵育液盒中。(3)杂交盒准备:将杂交盒置于加热槽中,为保证硅胶膜平衡,每个加热槽均应放置杂交盒。(4)膜条准备:在膜条上写好样本编号,严格按照仪器加液顺序将膜条加入杂交盒中。(5)运行程序:打开仪器,点击“样本数”右侧数字,输入样本数,然后点击“开始杂交”,程序开始运行。(6)加入 PCR 产物:报警提示后,根据膜条顺序依次加入 PCR 产物,然后盖上硅胶膜和盖板,点击“PCR 确认”,仪器自动完成杂交过程。(7)添加显色液:报警提示后,配置显色液,点击“显色液确认”,仪器自动完成显色并注入纯水终止显色。(8)结果判读:报警提示后,点击“排水确认”完成排水后,点击“试验完成”,揭开盖板及硅胶膜,取出膜条保存并判读试验结果。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0,采用 χ^2 检验对 2 种方法检测 HPV 分型结果进行比较,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

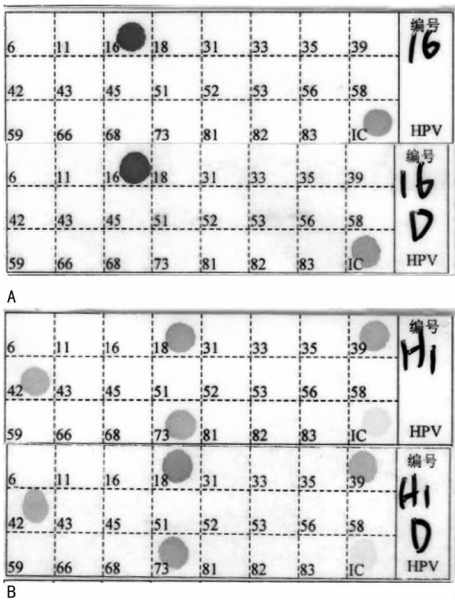
2 结 果

根据出现蓝色的斑点进行结果判读,526 例样本,传统

RDB 方法检测阳性 82 例(阳性率为 15.5%),阴性 444 例;全自动杂交平台检测阳性 82 例(阳性率为 15.5%),阴性 444 例,两者差异无统计学意义($P>0.05$)。两者一致性较好,符合率 100%,检测结果一致,背景好,未发现有非特异性扩增点,多重感染斑点一致。见图 1、表 1。

表 1 2 种方法结果统计

组别	阳性[n(%)]	阴性[n(%)]	合计(n)
传统斑点杂交	82(15.5)	444(84.5)	526
全自动杂交平台	82(15.5)	444(84.5)	526
合计	164(100.0)	888(100.0)	1 052



注:A 为单一 HPV 感染结果;B 为多重 HPV 感染结果。

图 1 2 种方法检测结果

3 讨 论

RDB 法利用生物素等标记的探针和特异性扩增 PCR 产物(靶 DNA 序列)杂交,先将待用探针分别点到硝酸纤维素膜或尼龙膜上,再将待测 DNA 样本(一般为经 PCR 特异性扩增的产物,在 PCR 引物 5'端预先进行生物素标记,使扩增产物相应标记有生物素)与之杂交,使待检样本与具有同源序列的探针结合,经洗涤去除未结合的 DNA 样本。由于待测 DNA 样本具有生物素类标志物,结合了待测 DNA 的探针点上同样带有生物素类标志物,再经相应显色反应后即可显出杂交信号。该技术较正向斑点杂交和凝胶电泳印迹转移杂交有快速、简便、高敏感性、特异性强等特点,尤其在基因分型、基因突变检测和病原体检测方面有独特优势(比如珠蛋白生成障碍性贫血基因诊断和结核菌耐药基因检测)^[3-4]。目前大部分医疗机构 HPV 分型检测基于 RDB 方法,已有研究表明 PCR-RDB 法对 HPV 基因分型能提升宫颈癌的早期诊断价值^[5]。此方法准确、操作简便,但也存在通量小,人为因素干扰多等缺点。使用全自动核酸分子杂交系统代替传统手工操作,可避免人为干扰,保证同一批次检测样本的试验均一性、试验结果的准确性和稳定性,也减轻了操作人员的负担,符合检验项目自动化发展方向,值得推广应用。

参考文献

[1] 林炳生,张太松,胥顺,等.改进的反向斑点杂交方法[J].分子诊断与治疗杂志,2011,3(1):18-21.

[2] 张太松,董瑞华,李建芳,等.反向斑点杂交技术检测 HBV YMDD 基序变异的应用和评价[J].中山大学学报(医学科学版),2009,30(4):428-432.

[3] 张银辉,张允奇,黄烈,等.地中海贫血诊断实验的选择在临床的应用价值[J].中华全科医学,2011,9(3):454-456.

[4] 何敏,万逢洁,周凌云,等.反向杂交膜片检测结核菌耐利福平基因突变[J].中国公共卫生,2005,21(12):1420-1422.

[5] 肖琳,赵帅.PCR 反向点杂交法检测人乳头瘤病毒分型在确定早期宫颈癌中的价值[J].中外医学研究,2014,12(33):5-6.

(收稿日期:2016-03-21 修回日期:2016-05-28)

• 临床研究 •

尿路感染主要病原菌耐药性分析

柯永坚,朱红军,陈乐川
(广东省汕头市中心医院检验科 515031)

摘要:目的 了解医院 2014~2015 年尿路感染主要病原菌的分布及对常用抗菌药物的耐药情况,为临床合理应用抗菌药物提供参考。方法 采用法国生物梅里埃公司全自动微生物分析系统 VITEK-2 compact 及配套试剂对该院 2014~2015 年住院及门诊尿路感染患者中段尿进行细菌培养鉴定及药敏分析。结果 共分离出细菌 613 株,其中革兰阴性杆菌 381 株(占 62.2%),革兰阳性球菌 130 株(占 21.2%),真菌 102 株(占 16.6%)。产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌检出率分别达 68.9%和 57.1%。尿、粪肠球菌对高水平庆大霉素耐药率分别达 80.6%和 62.5%,对高水平链霉素耐药率分别达 77.3%和 43.3%;耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌(MRSCN)达 66.7%,呈对抗菌药物的多重耐药。结论 该院尿路感染菌种以革兰阴性杆菌居多,细菌耐药率高,真菌感染的数量显著增加;临床应积极开展尿路感染病原学检查,合理、安全使用抗菌药物,以有效控制尿路感染和减少耐药菌株的产生。

关键词:尿路感染; 耐药性; 药敏试验; 超广谱 β -内酰胺酶
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.21.049 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2016)21-3067-03

尿路感染是临床常见的感染性疾病。随着抗菌药物、免疫抑制剂、激素和侵入性操作等治疗措施的广泛应用,尿路感染的发生率和细菌耐药率显著升高。为解本院尿路感染患者的病原菌分布及其耐药特点,并为临床合理使用抗菌药物提供参考,本文对实验室尿液培养分离的菌株进行分析。报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 标本来自本院 2014~2015 年住院尿路感染患者。细菌性尿路感染的诊断标准按照叶任高等^[1]的细菌性尿路感染诊断标准执行。

1.2 菌株鉴定与药敏试验 病原菌严格按《全国临床检验操作规程》第 3 版要求进行培养^[2],采用法国生物梅里埃公司全自动微生物分析系统 VITEK-2 compact 及配套试剂进行鉴定和药敏试验,严格按美国临床和实验室标准协会(CLSI)的试验要求和标准来判定药敏结果。真菌药敏采用 ATB-FUNGUS 方法。

1.3 质量控制 质控菌株:金黄色葡萄球菌 ATCC29213,大肠埃希菌 ATCC25922,铜绿假单胞菌 ATCC27853。均购自卫生部临床检验中心。标准菌株的鉴定率均为 99%以上,药敏试验均符合 CLSI 试验要求和标准且在其标准范围内。

2 结果

2.1 尿路感染的病原菌分布 613 株病原菌中,革兰阴性杆菌 381 株(占 62.2%),其中大肠埃希菌 231 株、铜绿假单胞菌 59 株、肺炎克雷伯菌 28 株、阴沟肠杆菌 10 株、鲍曼不动杆菌 6

株,其他革兰阴性杆菌共 47 株;革兰阳性球菌 130 株(占 21.2%),其中屎肠球菌 69 株、粪肠球菌 33 株、凝固酶阴性葡萄球菌 10 株、金黄色葡萄球菌 6 株,其他革兰阳性球菌共 12 株;念珠菌属真菌 102 株(占 16.6%)、白色假丝酵母菌 47 株、热带假丝酵母菌 30 株、近平滑假丝酵母菌 12 株、光滑假丝酵母菌 8 株,其他念珠菌属真菌共 5 株。

2.2 主要革兰阴性杆菌耐药性 5 种主要革兰阴性杆菌对美罗培南敏感性最高,对氨苄西林耐药率高达 90.9%~100.0%。铜绿假单胞菌及阴沟肠杆菌多重耐药现象严重。见表 1。

2.3 主要革兰阳性球菌耐药性 在革兰阳性球菌中,所有葡萄球菌均对万古霉素、利奈唑烷、替加环素敏感。1 株粪肠球菌耐万古霉素(占 3.3%),粪肠球菌和屎肠球菌多重耐药严重。见表 1。

2.4 真菌耐药率 白色假丝酵母菌、热带假丝酵母菌、近平滑假丝酵母菌对 5 种抗真菌药物敏感性高,未分离出耐药株。光滑假丝酵母菌对 5-氟胞嘧啶、两性霉素 B 最敏感,敏感性为 100%,但对氟康唑、伏立康唑、伊曲康唑敏感性较低,甚至为 0。

2.5 产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)菌及耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌(MRSCN)检出率 ESBLs 大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌检出率分别为 68.9%、57.1%。MRSCN 检出率为 66.7%。