

DIGFA 与 FQ-PCR 法联合检测淋病奈瑟球菌

肖春红¹, 袁建芬², 喻海忠^{2△} (1. 江苏省南通市肿瘤医院 226361; 2. 江苏省南通市中医院 226001)

【摘要】 目的 探索一种快速、经济、敏感的方法诊断泌尿生殖道中淋病奈瑟球菌(N. gonorrhoeae, NG)。**方法** 用斑点金免疫渗滤法(dot immunogold filtration assay DIGFA)与实时荧光定量 PCR 法(fluorogenic quantitative polymerase chain reaction, FQ-PCR)联合检测泌尿生殖道中淋病奈瑟球菌。**结果** 对 186 例临床标本进行检测, DIGFA 阳性率为 67.2%(125/186), FQ-PCR 阳性率为 81.2%(151/186), 培养法阳性率为 66.1%(123/186), DIGFA 与培养法二者差异无统计学意义($P>0.05$)。FQ-PCR 与培养法二者阳性率差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** DIGFA 与 FQ-PCR 联合检测 NG 具有简便、快速、检出率高的优点。

【关键词】 淋病奈瑟菌; 聚合酶链反应; 细菌培养

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2010.23.024

中图分类号:R446.5 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2010)23-2613-02

淋病奈瑟球菌(N. gonorrhoeae, 简称 NG)习称淋球菌, 目前是我国性传播性疾病(STD)中发病率最高的病种^[1]常引起男性尿道、女性尿道及阴道炎; 可并发淋菌性关节炎、结膜炎、前列腺炎、新生儿的淋病性结膜炎等多种疾病, 也是女性盆腔炎的病原菌, 并与男性不育及女性不孕有关, 可引起习惯性流产, 并通过血液、骨髓感染新生儿。是引起淋病奈瑟菌性尿道炎的主要致病菌。在培养基上进行淋病奈瑟球菌(NG)培养是确诊 NG 感染的“金指标”, 但其所需时间长、花费大、技术要求高且有假阴性^[2]。而近年来 NG 感染有增多趋势, 因此需要有检测速度更快、敏感性更高的方法。作者对 186 例尿道、生殖道分泌物运用斑点金免疫渗滤法(dot immunogold filtration assay DIGFA)与实时荧光定量 PCR(Fluorogenic Quantitative Polymerase Chain Reaction, FQ-PCR)联合检测淋病奈瑟球菌(NG)^[3-4]。在被检测的 186 例中, DIGFA(检测淋病奈瑟球菌抗原)阳性 125 例(67.2%), FQ-PCR 法阳性 151 例(81.2%), 培养法阳性 123 例(66.1%)。

1 资料与方法

1.1 材料 菌株及标本来源: 本试验所用 13 种标准菌株(NG)、脑膜炎奈瑟菌、干燥奈瑟菌、表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、绿脓假单胞菌、假白喉棒状杆菌、草绿色链球菌、肺炎链球菌、肺炎克雷伯菌、卡他布兰汉菌、大肠埃希菌、星形奴卡菌)来源于中国药品生物制品检定所。临床标本来源于泌尿门诊患者 186 例, 男 106 例, 女 80 例, 年龄 22~65 岁。女性采用白带标本, 男性采用前列腺液标本。其收集如李丽和高良^[5]所述的 Meares-Stamey 的方法。

1.2 仪器与方法

1.2.1 仪器与试剂 FQ-PCR 试剂盒由上海申友生物工程有限公司提供; 美国 MJ 公司生产的 OPTICON®2 实时定量荧光 PCR 扩增仪; 淋病奈瑟球菌(NG)培养基自配^[2]。检测 NG 的 DIGFA 试剂由蓝波生物技术有限公司提供。

1.2.2 3 种方法测定 分别按说明书, 蓝波生物技术有限公司提供 DIGFA 法、上海申友生物工程有限公司提供 FQ-PCR 法测定 NG, 按说明书进行操作。

1.2.3 DIGFA 测定原理 标本窗的吸收垫有抗淋病奈瑟球菌抗体吸附其上, 加入患者分泌物再以胶体金标记的单克隆抗、淋病奈瑟球菌抗体, 三者形成免疫复合物。在结果窗中出

现一个条带表明试剂有效, 如在相应位置出现圆斑表示 NG 阳性。

2 结果

作者对 186 例尿道、生殖道分泌物同时运用 DIGFA、FQ-PCR 和培养法进行检测。结果 DIGFA 阳性 125 例(67.2%)、FQ-PCR 法阳性 151 例(81.2%)、培养法阳性 123 例(66.1%)。DIGFA 测得男性标本为阳性 58.0%、女性为 80.0%。DIGFA 与培养法相比($P>0.05$), 差异无统计学意义(见表 1)。FQ-PCR 法与培养法测定 NG 相比 $0.01<P<0.05$, 二者差异有统计学意义, 见表 2。

表 1 斑点金免疫渗滤法与培养法测定 NG

方法	阳性	阴性
DIGFA	125	61
培养法	123	63

注: 经卡方检验 $\chi^2=0.095$; $\chi_{0.05(1)}^2=3.84$; $P>0.05$ 。

表 2 FQ-PCR 法与培养法测定 NG

方法	阳性	阴性
培养法	123	63
FQ-PCR 法	151	35

注: 经卡方检验, $\chi^2=6.25$; $\chi_{0.05(1)}^2=3.84$, $\chi_{0.01(1)}^2=6.63$, 故 $0.05>P>0.01$; 二者有统计学差异。

所有标准菌株经 FQ-PCR 扩增后, 可以检测到一条明显的起跳曲线如图 1, 如用琼脂糖凝胶电泳, 淋病奈瑟球菌在 496 bp 处有一条 DNA 条带, 其余菌株均未见扩增带, 表明该试剂的引物有较好的属特异性。

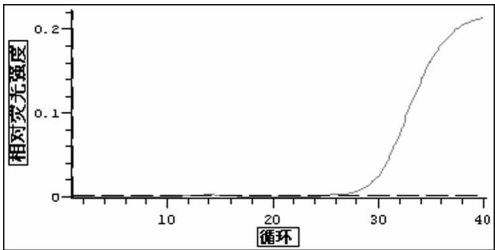


图 1 淋病奈瑟球菌标准菌株(3.7×10^4)在实时荧光 PCR 中的图形

△ 通讯作者。

3 讨 论

用 DIGFA 与培养法测定 NG 阳性率无明显差异,培养法操作耗时且有假阴性,而 DIGFA 无须特殊仪器仅需几十分钟即可出报告,另外 FQ-PCR 法阳性率远高于培养法,且操作也不太繁琐。淋病非显性感染者,其镜检和培养检查常为阴性,但却是淋病的重要传染源。运用 FQ-PCR 技术有效防止漏检的可能。故作者推荐先用 DIGFA 对本标进行筛选,有条件的单位,阴性患者取分泌物再用 FQ-PCR 法进行检测,这样不但可以节约成本,缩短检验时间,而且可以使 NG 检出率明显提高。因此 DIGFA 与 FQ-PCR 法联合检测泌尿生殖道中 NG 具有简便、快速、检出率高的优点,能够取代以前临床上常用的培养法。且对小型医院来说 DIGFA 不失为一个易推广、操作简便的方法。

参考文献

[1] 李国明,陈群,王胜春. 湛江地区淋球菌流行株质粒谱型

的研究[J]. 临床皮肤科杂志. 2000,29(2):195-196.

[2] 叶应妩,王毓三. 全国临床检验操作规程[M]. 2 版. 南京:东南大学出版社,1997:487.
[3] 姜军平. 实用 PCR 基因诊断技术[M]. 世界图书出版西安公司,1996:122.
[4] 李桂琴,武焕玲. 淋病奈瑟菌耐药性监测[J]. 临床检验杂志,1999,17(3):271.
[5] 李丽,高良. 前列腺炎的支原体与细菌分离培养结果[J]. 临床检验杂志,2000,18(4):302-303.

(收稿日期:2010-07-28)

临床研究

UF-100 尿沉渣仪对健康体检者尿液有形成分结果分析*

李承芬¹,孟凡萍¹,郝 坡²(1. 重庆三峡中心医院临床检验科,重庆万州 404000;
2. 重庆三峡医药高等专科学校,404020)

【摘要】 目的 建立万州地区 UF-100 尿沉渣仪检测健康人群尿液有形成分的参考值范围。**方法** 用洁净一次性尿杯收集中段尿,充分混匀后取 10 mL。仪器开机后首先用 UF-CHECK 质控液对仪器进行监控,严格按照仪器操作说明书对每份标本进行测定,每份标本在 UF-100 上均平行测定 2 次并取平均值,所有实验均在取样后 2 h 内完成。**结果** 健康人群尿液红细胞(RBC)、白细胞(WBC)、上皮细胞检测结果在不同性别、儿童与成人之间差异有统计学意义($P<0.05$);管型在不同性别组及各年龄组之间的差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 在 UF-100 尿沉渣仪上测定的尿液有形成分结果可用作万州地区的健康人群的参考值范围。

【关键词】 尿液有形成分; UF-100 尿沉渣分析仪; 健康体检

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2010.23.025

中图分类号:R446.12

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2010)23-2614-02

尿液分析是临床最为常用且信息最为丰富的实验项目之一,尿沉渣是尿液的重要组成部分。对泌尿系统疾病的临床诊断、鉴别诊断、预后判断及群体普查具有重要意义。现今的多数实验室中,其分析多为试纸条呈阳性时结合尿沉渣显微镜检查,而试纸条呈阴性的样本则视为正常。然而由于试纸条的固有误差,如药物或碱性尿时对蛋白质的影响,高浓度蛋白尿对白细胞脂酶的抑制等,试纸条阳性样本镜检结果说明其尚不能完全“胜任”鉴别异常样本。尿沉渣显微镜检查虽然被认为是识别有形成分的“金标准”,但该方法需离心等需时间长,精确度差,计数域较小,技术人员水平差异加之日益增加的工作量,劳动强度大等缺陷,都将影响结果的准确性,无法满足临床的需要。目前国内外推广使用快速、不用离心、具有过筛功能的 UF-100 全自动尿沉渣分析仪进行定量分析,同时结合显微镜复判,使尿沉渣检测自动化、标准化和便捷化。并且极大地降低了工作人员潜在的生物危害暴露,精确计数及分类,具有快速、简便、精确度好,多参数等优点,为给临床提供可靠信息,建立适合本地区尿液有形成分的参考范围具有重要意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2007 年 6 月至 2009 年 6 月本院健康体检者。无心血管、肝、肾疾病,无过敏史,无遗传病家族史,无其他慢性疾病,女性非月经期的本市健康体检者 3 000 例,其中男性 1 800 例,女性 1 200 例;1~12 岁儿童 720 例,男性 420 例,女性 300 例,平均年龄 9 岁;13~70 岁成人 2 280 例,男性 1 380 例,女性 900 例,平均年龄 40.3 岁。

1.2 仪器与试剂 Sysmex UF-100 全自动尿沉渣分析仪(日本东亚电子医疗有限公司)及配套试剂。

1.3 方法 用洁净一次性尿杯收集中段尿,充分混匀后取 10 mL。仪器开机后首先用 UF-CHECK 质控液对仪器进行监控,严格按照仪器操作说明书对每份标本进行测定,每份标本在 UF-100 上均平行测定 2 次并取平均值。所有实验均在取样后 2 h 内完成。

1.4 统计学方法 所检测的尿液有形成分参数在被调查人群中呈偏态分布,以中位数和生物参考区间表示。以健康人群的 95% 为正常参考范围。所有检测结果采用 SPSS8.0 软件进行

* 基金项目:重庆市万州区科技项目(20084009)。