

荧光定量聚合酶链反应异常曲线产生原因及处理

毛源, 夏玲芝, 王晶(南京金城医学检验所 210042)

【关键词】 荧光定量聚合酶链反应; 异常曲线; 扩增曲线

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2013.10.083 文献标志码: B 文章编号: 1672-9455(2013)10-1340-01

荧光定量聚合酶链反应(PCR)技术是 1993 年美国 Applied Biosystems 公司推出,通过比较样本的循环数或称为循环阈值(Ct)与已知起始靶分子数的标准系列(如校准曲线),来得到未知样本的起始靶数量^[1]。荧光定量 PCR 技术对肿瘤学、遗传学、免疫学、微生物学、寄生虫学和基因治疗等进一步研究及临床应用起积极重要的作用^[2]。截止到 2011 年已有 23 种病原微生物的荧光定量 PCR 已得到美国食品药品监督管理局和中国食品药品监督管理局的认可,适合于临床检测的应用^[3]。荧光定量 PCR 技术能得到准确的定量结果的前提是正常扩增曲线得到正确的 Ct,在工作中如果出现了异常曲线其定量结果是可能受到影响的。作者结合工作中遇到的异常曲线对结果产生的影响、发生的原因及处理进行总结,现将结果报道如下。

1 扩增曲线先下降后上升

情况描述:扩增曲线在阈值下方基线后方呈下降曲线,也多为上升曲线,扩增曲线与阈值可能相交产生 Ct 值,也可能不相交而无 Ct 值。样本扩增曲线先下降后上升对结果产生的影响是其显示的 Ct 值比真实 Ct 值大,也意味着显示的定量结果低于样本的真实靶值。其发生的原因主要是因为基线的设置起止范围内该样本的基线荧光信号值变化较大,有可能是:

(1)上机前该样本在管壁上有液滴,随着扩增过程该液滴在某一循环处落入总反应体系中,使该样本的某一循环后总的荧光信号包括报告基因荧光信号和淬灭基因荧光信号同时增多并保持不变。(2)该样本反应管壁上有残液在循环过程中不断流入总反应体系导致反应体系中报告基因荧光信号和淬灭基因荧光信号均逐渐增多。导致该样本基线的信号变化较大,故扩增曲线先下降后上升。处理办法是:如果是情况(1)且发生在 10 个循环之前可以把基线的起始设置在荧光信号变化后的起始循环数;如果是情况(1)且发生在 10 个循环之后和情况(2)建议复查后发放结果。

2 扩增曲线某一循环处所有样本均出现抖动或在某几个循环处成锯齿样变化

产生这样的曲线如果发生在 15 个循环以前对结果基本没有影响,如果发生在 15 个循环以后对 Ct 值处于抖动附近的样本结果造成不准确的结果。其发生原因主要是仪器在某一时刻由于电压不稳造成信号收集不稳定或者数据传输在那几个循环造成了不顺畅(图 1)。处理的方案是如果发生在 15 个循环之前可以正常发放结果,如果发生在 15 个循环之后对 Ct 值处于抖动附近的样本进行复查后发放结果。

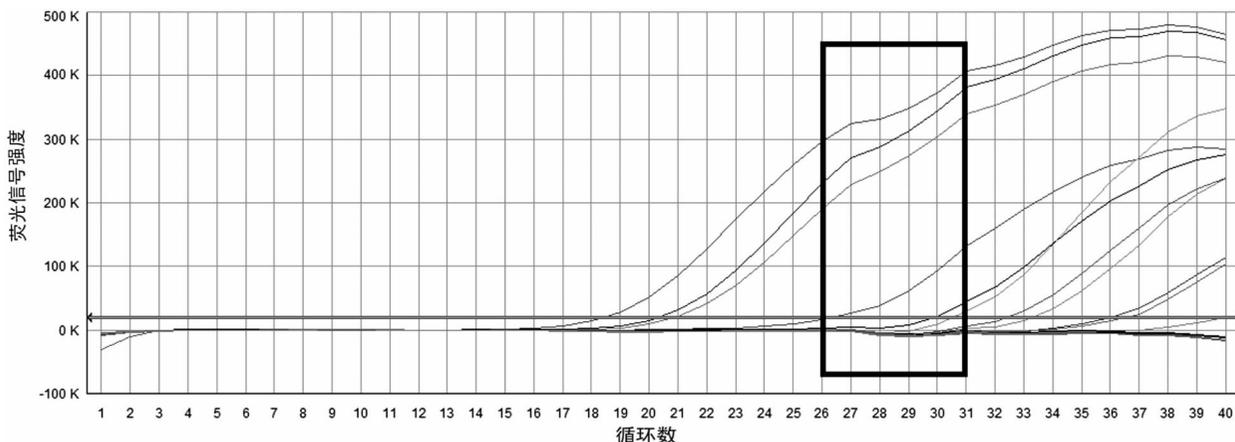


图 1 扩增曲线在 26~31 循环处所有样本均出现抖动

3 扩增曲线成斜直线上升并有 Ct 值

情况描述:扩增曲线呈 S 型的标准扩增曲线,呈现出斜直线样图形,并与阈值有相交并产生 Ct 值。产生这样的曲线会造成仪器报告出假阳性的定量结果。其发生原因是基线设置范围内样本的基础荧光信号有波形变化,其产生原因可能因样本中含有多个体积较大的气泡或者仪器缺乏维护导致的仪器噪音信号偏高和时间延长。处理方案是根据探针成分曲线可以直接判断阴性结果。

4 扩增曲线的斜率明显低于其他样本的扩增曲线(图 2)

产生这样的曲线的原因多是样本中可能存在抑制物或试剂的原因导致。这样的曲线会造成仪器报告出的定量结果偏

低。其处理办法是首先对样本进行稀释,如果存在抑制物,稀释后样本的扩增曲线会变为正常,按正常扩增曲线得出的结果乘以稀释倍数得出正确的样本浓度;如果稀释样本后扩增曲线仍然是这样的情况,可能是试剂原因导致的,这个时候最好的解决办法是有两种检测不同基因部位的试剂,可以互补^[4]。而且国内有学者研究不同厂家生产的乙型肝炎病毒(HBV)-DNA 荧光定量试剂对高病毒载量标本的检测结果无显著差别,但对病毒载量低的标本则存在显著差别,国产试剂检测 HBV-DNA 线性范围较窄,对低拷贝结果可靠性差^[5]。

(下转第 1344 页)

做到既能减少漏检,又不至于过多重复检查呢?世界卫生组织推荐先用非特异性方法对血清进行过筛试验,出现阳性再用特异性方法进行确认,这样会使一些过往感染者漏检,给医院在法律上带来不必要的麻烦。《全国临床检验操作规程》建议每次用两种以上的方法进行检测^[5],这是一种比较好的方法,既可提高检出率,又可对现症患者进行确认,但存在较大的重复检查,增加实验室的工作量,增加患者的经济负担,对医疗资源也造成一定的浪费。对如何合理选择梅毒血清学检测方法的问题,作者认为,应根据不同人群、不同临床需求来作出选择,而不应有固定的模式。

2.1 对于健康体检、手术前、孕产前、输血前等人群的梅毒血清学检查,应选用敏感度高且能发现既往感染的试验(如 ELISA、CMIA)进行筛查,阳性者再用 TRUST 进行现症鉴别。

2.2 初诊患者如果临床怀疑梅毒感染,建议用特异性和非特异性两种方法同时进行检测(如 TRUST+ELISA),这样不但对现症患者进行诊断,而且还能提高检出率。

2.3 梅毒确诊患者在治疗过程中应观察其非特异性抗体滴度变化情况,如是合理足量用药后,其滴度应该有明显下降(下降 1/4 以上);对于临床治愈的梅毒患者,也应该每过半年进行一次非特异性梅毒抗体检测,如其滴度明显升高时应考虑复发。

2.4 先天性梅毒患儿的诊断,除了用特异性和非特异性(TRUST+ELISA)两种方法同时进行检测外,还要连续 6 个月每个月进行一次非特异性抗体滴度检测,如果滴度不断下降,2~3 个月甚至消失,可排除诊断;如果滴度不断上升,甚至超出母体滴度的 4 倍,便可支持诊断。

2.5 急诊或是抢救的患者检测梅毒抗体可用 GICA 检测后发出初报,然后再用其他特异性(如 ELISA、CMIA)方法检测后发出最终结果。

2.6 老年人用 ELISA 进行血清梅毒抗体检测时会出现较高的假阳性^[6],建议采用其他特异性试验(如 TPPA)进行检测。

对于上述检测出现可疑结果时必须用 TPPA 或 FTA-S-ABS 进行联合复检;对于可疑病例也必须联合多种方法进行重复多次检测。梅毒不仅是个医学问题,而且也是个社会问题,况且梅毒血清学无论敏感性和特异性都不能达到 100%。不同方法,不同病期阳性率不同,所以对梅毒诊断必须依据流行病学资料、临床资料、实验室资料综合分析判断^[7]。

参考文献

[1] 乐杰. 妇产科学[M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社,2008:165-167.
 [2] 莫健民. 梅毒血清学 USR、RPR、TRUST 三种筛选试验与 TPHA 的比较观察[J]. 广东医学,1997,18(5):292-293.
 [3] 郑颖,丁文杰,单晓洁,等. 5 种梅毒血清学检测方法的临床应用评价[J]. 现代实用医学,2009,21(8):824-825.
 [4] 倪语星,尚红. 临床微生物学与检验[M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社,2010:296-301.
 [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,2006:647-650.
 [6] 邓红彦,赫兰辉. 老年患者血清梅毒抗体酶联免疫吸附试验假阳性结果分析 [J]. 检验医学与临床,2011,8(2):151-153.
 [7] 刘人伟. 检验与临床[M]. 北京:化学工业出版社,2009:460-463.

(收稿日期:2012-12-14)

(上接第 1340 页)

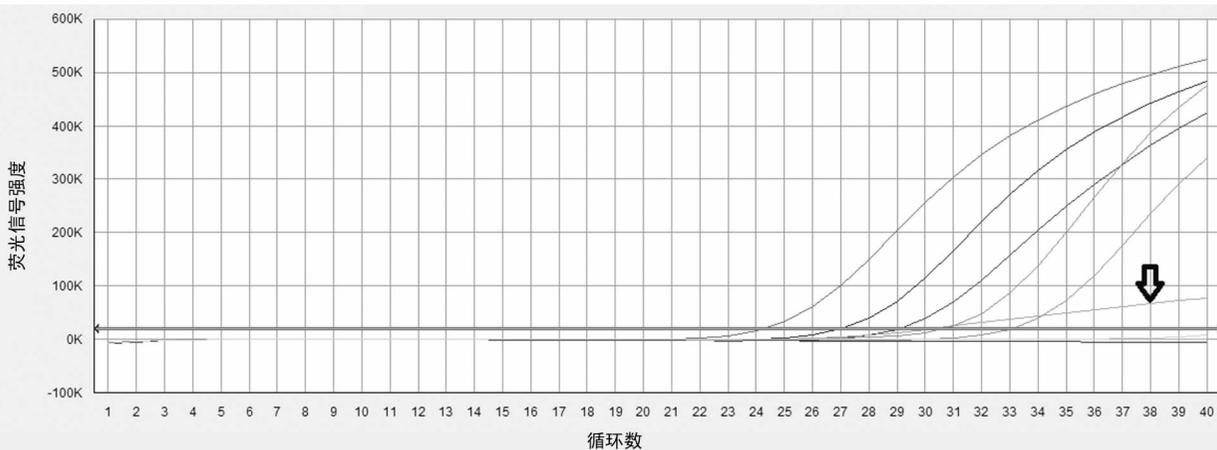


图 2 扩增曲线斜率明显低于其他样本

综上所述,荧光定量 PCR 技术是一种非常方便和实用的方法,但也会出现因为各种原因出现扩增曲线异常的情况,这会造成仪器显示的结果与真实结果不相符的情况。这个时候需要对扩增曲线进行识别,识别出异常曲线,然后对异常曲线进行认真分析,根据分析结果进行相应处理后可以得到准确的荧光定量 PCR 异常曲线的定量结果。

参考文献

[1] 李金明. 实时荧光 PCR 技术[M]. 北京:人民军医出版社,2007:14-15.

[2] 郝秀静. 荧光定量 PCR 在医学诊断中的应用[J]. 中国医疗前沿,2008,3(13):93,122.
 [3] 李春娟,张一兵,罗喜钢,等. 荧光定量 PCR 技术在临床微生物检测中的应用[J]. 生物技术通报,2011(2):66-69.
 [4] 郑晓群. 扩增曲线异常对荧光定量 PCR 检测乙肝病毒核酸的影响[J]. 江西医学检验,2006,24(3):257-258.
 [5] 李美忠,王敏,乐晓华,等. 四种 HBV-DNA 荧光定量 PCR 试剂比较及其结果分析[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版,2008,2(1):7-12.

(收稿日期:2012-10-26 修回日期:2012-12-22)