

- [8] 陈其荣,穆洪鑫,花元春,等.三钢板及双钢板内固定治疗涉及三柱的复杂胫骨平台骨折的疗效[J].江苏医药,2019,45(8):838-841.
- [9] 柯明.舒筋活血汤联合膝关节镜辅助复位内固定术对气滞血瘀型胫骨平台骨折患者术后膝关节功能的影响[J].医疗装备,2020,33(10):75-76.
- [10] 陆根华,李萍,吕正祥,等.化痰消肿贴对复杂性胫骨平台骨折患者的临床疗效[J].中成药,2020,42(7):1962-1964.
- [11] 白孟海,葛宝丰,高梅,等.老年股骨颈骨折患者骨代谢改变的观察[J].中国矫形外科杂志,2004,12(3):239-239.

- [12] 陈雪英,窦海霞,安玉美.骨源性碱性磷酸酶与骨折愈合的相关性分析[J].山东医药,2010,50(19):68-69.
- [13] 朱振标,张寿,金旭红,等.骨折延迟愈合患者 IGF-1、PDGF、ALP、PINP、 β -CTX 水平变化的研究[J].重庆医学,2015,44(21):2915-2917.
- [14] 刘颖赵,孙长根. TNF- α , IL-6, PLA2 在严重骨折合并创伤患者中的变化及损伤控制技术的影响[J].海南医学院学报,2015,21(4):501-503.

(收稿日期:2022-01-16 修回日期:2022-05-13)

• 临床探讨 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.17.030

溶解曲线法在痰涂阴肺结核患者中的应用

梁立锋

广东省云浮市慢性病防治中心检验科,广东云浮 527300

摘要:目的 探讨溶解曲线法在痰涂阴肺结核患者中的应用价值,为结核病防治提供依据。方法 收集 2020 年 1 月至 2021 年 9 月于该院结核门诊就诊的 1 040 例患者痰标本,行金胺 O 染色,对痰涂阴标本进行痰培养、表型药敏试验、实时荧光定量 PCR 检测和溶解曲线检测;比较痰培养与实时荧光定量 PCR 检测结果,比较表型药敏试验与溶解曲线法检测结果,分析溶解曲线法的应用价值。结果 1 040 份痰涂阴标本,痰培养检测为结核分枝杆菌复合群的有 74 例,阳性率为 7.1%;实时荧光定量 PCR 检测为结核分枝杆菌复合群的有 101 例,阳性率为 9.7%,表型药敏试验检测利福平耐药 8 例,耐药率为 10.8%,溶解曲线法检测利福平耐药 7 例,耐药率为 9.5%;实时荧光定量 PCR 检测与痰培养,表型药敏试验与溶解曲线法一致性分别为 0.83、0.79。结论 实时荧光定量 PCR 与痰培养、溶解曲线法检测与表型药敏试验具有较好的一致性,在肺结核患者中的快速诊断及耐药突变检测中有很高的应用前景,特别是在痰涂阴肺结核患者中应用价值尤为突出。

关键词:溶解曲线法; 结核分枝杆菌复合群; 实时荧光定量 PCR; 药物敏感性

中图分类号:R-331

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2022)17-2417-03

结核病是由结核分枝杆菌复合群(MTB)引起的一种严重危害人类健康的呼吸道传染病,尤其以肺结核多见,严重影响人类的生命安全。实验室检测是确诊肺结核的重要依据,根据结核病防治要求,现行采用痰涂片找抗酸杆菌、痰培养等方法检测,但其不能满足快速诊治的临床要求,亟须寻找一种快速且经济的病原学检测方法,为临床快速诊断提供依据。本研究采用实时荧光定量 PCR、溶解曲线法检测痰涂阴患者中的结核分枝杆菌核酸和利福平耐药突变基因,与痰培养及表型药敏试验进行比对,探讨其应用价值,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2020 年 1 月至 2021 年 9 月于本院结核门诊就诊的 1 040 例患者的痰标本,患者经直接数字化 X 线摄影系统检查有异常,临床有咳嗽、咳痰两周以上等症状,且全部为痰涂阴肺结核可疑者,年龄 17~82 岁,平均(45±17)岁。

1.2 仪器与试剂 金胺 O 染色液、罗氏固体培养基、罗氏含药培养基采用珠海贝索生物技术有限公司产品;核酸提取仪、结核分枝杆菌核酸提取试剂、MTB 基因和利福平耐药突变检测试剂采用厦门致善生物

科技股份有限公司产品,扩增分析仪由上海宏石医疗科技有限公司提供。

1.3 方法

1.3.1 染色镜检 采用金胺 O 染色法,操作及结果报告按《痰涂片镜检标准化操作及质量保证手册》^[1] 执行。

1.3.2 痰培养 采用中性离心法,操作及结果报告按《分枝杆菌分离培养标准化操作程序及质量保证手册》^[2] 执行。

1.3.3 药敏试验 采用比例法,操作及结果报告按《结核分枝杆菌药物敏感性试验操作程序及质量保证手册》^[3] 执行。

1.3.4 DNA 提取 取 1.5 mL 经 4% 氢氧化钠液化后的痰标本,以 13 000×g 离心 5 min,去掉上清液,加入 500 μ L 结核的 DNA 提取液,涡旋振荡混匀。99 $^{\circ}$ C 加热 10 min,取出冷却至室温,把所有标本加至提取条中并加 20 μ L 增强液放入提取仪提取,提取液作 DNA 模板。

1.3.5 MTB 核酸检测、利福平耐药突变检测 采用实时荧光定量 PCR 法检测 MTB 核酸:把 15 μ L DNA

模板和 15 μL 裂解液加入检测体系,振荡 5 s,瞬时离心,去除大的气泡,转到 PCR 扩增仪扩增。利福平耐药突变检测:采用熔解曲线法检测。每个标本使用 A 和 B 两个反应体系,每个体系采用 FAM 和 TET 两个通道,共 4 个通道检测,通过比较标本与阳性对照之间熔解曲线熔点(TM 值)的差异判断样品是否发生突变。A、B 反应体系的配制为:取 $n \times 19.6 \mu\text{L}$ Mix A 或 Mix B 和 $n \times 0.4 \mu\text{L}$ TB 酶混合液加入 1.5 mL 离心管内,振荡 5 s,分别向 PCR 反应管内分装 20 μL 即为反应体系。向反应体系再加入 5 μL 相应提取样品或阳/阴对照,振荡 5 s,瞬时离心,去除大的气泡,转到 PCR 扩增仪进行扩增和熔解曲线分析,以 4 个通道任一通道中样品的熔点低于阳性对照 2 °C 时判定为突变型,样品对利福平耐药。操作及结果判读严格按照试剂说明书进行。

1.3.6 质量控制 (1)人员培训:操作人员全部经省级结核病防治机构培训和省临床检验中心核酸扩增培训,具有省级认可的结核病实验室操作能力和 PCR 上岗证。(2)罗氏固体培养基、含药罗氏培养基,每批次均有厂家提供的敏感性测试和无菌试验合格报告。(3)每年均通过国家和省级组织的 PCR 质评及药敏质评考核。

1.4 统计学处理 使用 SPSS21.0 统计软件进行数据分析,计数资料以例数或百分率表示,一致性检验采用 Kappa 检验。

2 结 果

2.1 MTB 核酸检测和痰培养结果 把金胺 O 染色镜检结果为阴性的 1 040 份痰标本分别进行痰培养和实时荧光定量 PCR 检测,痰培养检测为 MTB 的有 74 份,阳性率为 7.1%;实时荧光定量 PCR 检测为 MTB 的有 101 份,阳性率为 9.7%,两者经一致性检验,有较高的一致性($Kappa = 0.83$)。见表 1。

表 1 实时荧光定量 PCR 检测与痰培养结果(n)

实时荧光定量 PCR 检测	痰培养		合计
	阳性	阴性	
阳性	74	27	101
阴性	0	939	939
合计	74	966	1 040

2.2 利福平耐药突变和表型药敏结果 实时荧光定量 PCR 检测为阳性的 101 份痰标本中,剔除 Ct 值 > 20 和实时荧光定量 PCR 检测为阳性而痰培养检测为阴性的标本,最终有 74 例患者的标本纳入研究,利福平耐药突变检测全部有效。熔解曲线法检测利福平耐药 7 例, rpoB 基因 513~520 区域共 8 个氨基酸密码子,突变 4 例, rpoB 基因 529~533 区域共 5 个氨基酸密码子,突变 3 例,耐药率为 9.5%;表型药敏试验检测利福平耐药 8 例,耐药率为 10.8%;两者经一致

性检验,有较高的一致性($Kappa = 0.79$)。见表 2。

表 2 熔解曲线法与表型药敏试验结果(n)

熔解曲线法	表型药敏试验		合计
	耐药	敏感	
耐药	6	1	7
敏感	2	65	67
合计	8	66	74

3 讨 论

目前使用的结核分枝杆菌检测方法包括痰涂片染色镜检、痰培养和分子生物学检查。痰涂片染色找到抗酸杆菌和痰培养阳性被认为是肺结核诊断的“金标准”。痰涂片染色找到抗酸杆菌可快速诊断,但其受痰标本质量、观察视野等诸多因素影响,其敏感性较低;而痰培养耗时较长^[4],易造成延迟诊断,不能快速切断传染源。有研究表明实时荧光定量 PCR 技术可用于结核的快速诊断和利福平耐药性检测^[5],但试剂成本高、仪器维护费用高。熔解曲线法是 PCR 和熔解曲线分析方法的结合,由于野生型序列具有自身特定的熔点,当基因突变时探针结合力下降导致熔点下降,通过监测荧光杂交信号区分出野生型与突变型。本研究将痰涂阴疑似肺结核患者的标本采用实时荧光定量 PCR、熔解曲线法检测痰标本中的结核分枝杆菌核酸基因、利福平耐药突变,与痰培养、表型药敏试验结果比较,一致性较高($K > 0.75$)。

本研究痰培养检测出阳性 74 例,阳性率为 7.1%,实时荧光定量 PCR 检测出阳性 101 例,阳性率为 9.7%,实时荧光定量 PCR 阳性率比痰培养阳性率略高,与核酸检测的敏感性高有关,比刘兰瑞等^[5]报道的低,原因可能与本研究纳入对象为痰涂阴患者有关。表型药敏试验检测利福平耐药 8 例,熔解曲线法检测利福平耐药 7 例,氨基酸密码子区域集中在 513~520 区域和 529~533 区域,其中的差异值得进一步探索,但熔解曲线法与曾松芳等^[6]、陈榕等^[7]报道的结果一致,说明此方法具有可接受的一致性和很好的替代性。

熔解曲线法是国内产品,检测时间在 3 h 左右,比类似的国外产品检测时间略长^[8],利福平检测覆盖 rpoB 基因 507~533 共 27 个氨基酸密码子,但国内试剂成本低、仪器维护费用少、可扩展的药物种类比国外的丰富^[9],还能选择性地检测利福平、异烟肼、卡那霉素、喹诺酮类药物的突变基因,使熔解曲线法具有选择优势。有报道对利福平耐药的患者 80% 是耐多药患者,这样一般只需检测利福平的耐药性,就可大致推断患者的耐多药性,可大幅降低患者的负担、提高患者的依从性和化疗的准确性^[10]。同时,实时荧光定量 PCR 结核分枝杆菌核酸检测试剂使用非常方便,试剂已制成干粉并在八联管中保存,检测时只需

加 DNA 模板和裂解液就可上 PCR 扩增仪扩增;而耐药突变检测覆盖了利福平、异烟肼、卡那霉素、喹诺酮类药物,更能符合临床诊断耐多药、多耐药和广泛耐药结核病的需求。

综上所述,实时荧光定量 PCR、熔解曲线法与痰培养、表型药敏试验检测具有较好的一致性($Kappa > 0.75$),熔解曲线法试剂成本低、仪器维护费用低,检测耐药突变的药物品种全面,生物安全性能好,且快速经济,使用方便,可以用于痰标本直接检测;因此该方法在快速诊断肺结核和耐药结核病上具有应用前景,对结核病防控具有重要意义。有条件的结核病防治机构可以同时采用痰涂片染色镜检和痰培养检测,对痰阴性患者再作核酸检测,对核酸阳性再行药物耐药突变检测,这样可及早发现肺结核和耐药肺结核患者。但此方法也有其不足之处:(1)有些标本会出现核酸抑制;(2)Ct 值 > 20 (浓度低)时测耐药突变出现不明确的结果;(3)耐药突变试剂配制麻烦;(4)利福平检测只覆盖 rpoB 基因 507~533 区域共 27 个氨基酸密码子。

参考文献

- [1] 卫生部疾病预防控制局,中国疾病预防控制中心.痰涂片镜检标准化操作及质量保证手册[M].北京:中国协和医科大学出版社,2009.
- [2] 王黎霞.分枝杆菌分离培养标准化操作程序及质量保证·临床探讨· DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.17.031

- 手册[M].北京:人民卫生出版社,2013.
- [3] 王黎霞.结核分枝杆菌药物敏感性试验操作程序及质量保证手册[M].北京:人民卫生出版社,2013.
- [4] 杨健,张天华,鲜小萍,等.Xpert MTB/RIF 与传统方法在肺结核病诊断中的对比[J].中国热带医学,2019,19(3):254-257.
- [5] 刘兰瑞,张永强,张原,等.3种分子新诊断技术与传统培养技术检测结核分枝杆菌阳性率比较[J].中国实验诊断学,2020,24(11):1854-1855.
- [6] 曾松芳,郭美丽,赵珊珊,等.结核分枝杆菌/利福平耐药实时荧光定量核酸扩增检测技术在肺结核快速诊断中的应用价值[J].中国卫生检验杂志,2016,26(5):683-685.
- [7] 陈榕,黄慧玲,欧阳燕芬,等.结核分枝杆菌/利福平耐药实时荧光定量核酸扩增检测系统在肺结核诊断中的应用[J].实用医技杂志,2021,28(4):471-473.
- [8] 陈丹霞,曹东林,林茂锐,等.3种检测方法对不同年龄组肺结核疑似患者诊断价值的对比分析[J].国际检验医学杂志,2020,41(22):2792-2796.
- [9] 刘春平,谭耀驹,苏碧仪,等.荧光 PCR 探针熔解曲线法检测结核分枝杆菌对利福平、异烟肼、喹诺酮及卡那霉素耐药性的评价[J].广东医学,2021,42(4):377-381.
- [10] 吴祥兵,李娜,蔡明明,等.应用 Xpert MTB/RIF 技术快速筛查耐多药肺结核[J].预防医学,2017,29(7):754-756.

(收稿日期:2022-01-16 修回日期:2022-05-18)

探讨低离子凝聚胺技术与卡式微柱凝胶试验在临床输血检验中的应用效果

何振江

辽宁省丹东市中心医院输血科,辽宁丹东 118000

摘要:目的 探讨低离子凝聚胺技术与卡式微柱凝胶试验在临床输血检验中的应用效果。方法 选取 2020 年 5—12 月于该院进行输血检验的 2 235 例患者为研究对象,随机分为观察组和对照组,观察组 1 120 例,对照组 1 115 例。对照组采用低离子凝聚胺技术,观察组 1 120 例采用卡式微柱凝胶试验,比较两组一次性正反定型检验正确率、相关情况、检验后不良反应发生率。结果 检验后,观察组的正定型检验正确率为 99.11%,高于对照组的正定型检验正确率(99.10%),观察组的反定型检验正确率为 98.39%,低于对照组的反定型检验正确率(98.48%),但两组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);检验后,观察组的检测时间为(16.32±1.21)min,长于对照组的检测时间(16.29±1.08)min,观察组的检验满意率为(92.51±6.04)%,高于对照组的检验满意率[(92.18±6.01)%],但两组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);检验后,观察组的不良反应发生率为 1.34%,低于对照组的不良反应发生率(1.52%),但两组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 两种检验方式虽略有差异,但都能确保输血检验质量,临床工作中应根据实际情况选择检验方式。

关键词:低离子凝聚胺技术;卡式微柱凝胶试验;眩晕;乏力;胸闷;输血

中图分类号:R-331

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2022)17-2419-03

输血对临床并不陌生,虽然每次均严格检查血液质量,但也避免不了患者眩晕、乏力、胸闷等不良情况的发生^[1]。为确保输血检验质量,本研究将低离子凝

聚胺技术和卡式微柱凝胶试验进行对比,发现两种检验方式均能提高输血检验效果。尤其在正反定型检验、相关情况、不良反应等中表现突出,可展现出两种检