

全自动核酸提取仪 对三种性传播病原体检测的性能评价*

张睿, 叶阿里, 孔令君, 窦亚玲, 伊洁

(中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院检验科, 北京 100730)

摘要:目的 评价全自动核酸(RNA)提取仪(型号 MagX)对沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*, CT)、淋病奈瑟菌(*Neisseria gonorrhoeae*, NG)和解脲脲原体(*Ureaplasma urealyticum*, UU)检测结果应用于临床的可行性。方法 收集检测 CT 样本 159 例、NG 样本 128 例、UU 样本 144 例,应用荧光核酸恒温扩增检测技术(Simultaneous Amplification and Testing, SAT),同一样本分别采用手工提取分装加样和 MagX 提取分装加样两种检测方法,然后进行实时荧光 PCR。以手工检测结果为金标准,对 MagX 检测结果进行阳性符合率(灵敏度)、阴性符合率(特异度)、总符合率(准确度)的评价。同时,对该仪器进行防污染验证。全自动核酸(RNA)提取仪与手工检测结果进行 Kappa 一致性分析。结果 159 例 CT, 128 例 NG 和 144 例 UU 样本的阳性符合率、阴性符合率、总符合率依次为 CT:0.910 6, 92.59%, 98.48% 和 97.48%; NG:0.938 3, 100.00%, 98.18% 和 98.44%; UU:0.885 6, 93.33%, 95.24% 和 94.44%; 其 Kappa 系数均 > 0.8 (CT: Kappa = 0.910 6, NG: Kappa = 0.938 3, UU: Kappa = 0.885 6), CV 值均 < 5%; 没有携带污染现象存在。结论 上海仁度生物科技生产的 CT, NG 和 UU 核酸检测试剂盒(RNA 恒温扩增)在全自动核酸(RNA)提取仪(型号 MagX)的检测符合临床检测标准,可在临床使用。

关键词:沙眼衣原体;淋病奈瑟菌;解脲脲原体;全自动核酸(RNA)提取仪

中图分类号:R446 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2017)06-142-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2017.06.041

Feasibility of Detection Three Kinds of Sexually Transmitted Pathogen by MGX Automatic Nucleic Acid Extraction Workstation

ZHANG Rui, YE A-li, KONG Ling-jun, DOU Ya-ling, YI Jie

(Department of Clinical Laboratory, PUMC Hospital, CAMS and PUMC, Beijing 100730, China)

Abstract: Objective To verify the feasibility of *Chlamydia trachomatis* (CT), *Neisseria gonorrhoeae* (NG), *Ureaplasma urealyticum* (UU) detection by automatic nucleic acid extraction workstation (MagX). **Methods** The test samples of CT (159), NG (128) and UU (144) were collected. The samples were extracted of nucleic acid two methods: manual extraction, which entailed manually preparing PCR reaction system and MagX automatic nucleic acid extraction workstation, which automatically prepared the reaction system. The two parts of nucleic acids proceeded to the Simultaneous Amplification and Testing (SAT). The result of manual extraction was set as the golden standard and the Kappa consistency analysis was conducted. Meanwhile, the sensitivity, specificity, accuracy and carry pollution experiments of MagX were verified. **Results** The sensitivity of MagX automatic nucleic acids extraction workstation were 92.59% (CT), 100.00% (NG) and 93.33% (UU). The specificity were 98.48% (CT), 98.18% (NG) and 95.24% (UU). The accuracy were 97.48% (CT), 98.44% (NG) and 94.44% (UU). The results of kappa consistency analysis were greater than 0.8 (CT: Kappa = 0.910 6, NG: Kappa = 0.938 3, UU: Kappa = 0.885 6). MagX detected the precision of CT, NG and UU: Coefficient of Variation (CV) < 5%. There was no pollution phenomenon. **Conclusion** MagX automatic nucleic acids extraction workstation could be used to test three kinds of sexually transmitted pathogen in clinical settings.

Keywords: CT; NG; UU; automatic nucleic acid (RNA) extraction workstation

性传播微生物,沙眼衣原体(*chlamydia trachomatis*, CT)、淋病奈瑟菌(*neisseria gonorrhoeae*, NG)、解脲脲原体(*ureaplasma urealyticum*, UU)^[1]可导致淋病、非淋球菌性尿道炎、宫颈炎、宫颈糜烂、女性不孕和男性免疫性不育^[2,3]等,是人类泌尿生殖道的常见病原体,也是性传播疾病(sexually transmitted diseases, STD)的主要病

原^[4,5]。目前检测其方法基本都以手工法为主。

本研究旨在验证全自动核酸(RNA)提取仪(型号 MagX)对 CT, NG 和 UU 检测的适用性和准确度以及临床应用的可行性。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集 2015 年 9~10 月北京协和医院就诊的 CT, NG 和 UU 疑似感染者和正常体

* 作者简介:张睿(1983-),女,硕士研究生,助理研究员,研究方向:感染与肿瘤相关分子生物学诊断及机制的研究;E-mail: zhangrui_pumc@163.com。
通讯作者:窦亚玲, E-mail: douyiling@163.com。

检者的检测样本,CT样本159例、NG样本128例、UU样本144例。样本类型为尿液和拭子, -20℃保存。

1.2 试剂和仪器 CT,NG,UU核酸检测试剂盒(RNA恒温扩增)(上海仁度生物科技有限公司),磁珠、扩增检测液、磁力架、吸引器、全自动核酸(RNA)提取仪(型号MagX);采用RocheLightCycler480II(美国)主机扩增以及LightCycler[®]480 Software release 1.5.0 SP4软件进行数据分析。

1.3 操作步骤 严格按照试剂说明书,采用手工磁珠提取法对样本进行核酸提取,并手工加入PCR反应试剂和提取的核酸模板于96孔板上;同一样本同步在MagX上进行,具体操作步骤如下:先将样本放入样本架上,放好提取试剂,PCR扩增试剂,按相应位置放置吸头、六连排反应管和PCR扩增反应管,按仪器指令在电脑屏幕确认后开始进行实验。仪器通过条形码识别每份样本,采用磁珠法自动提取核酸、配制PCR反应体系并加样到PCR反应管孔中。最后,将手工和MagX加好的PCR反应管放入RocheLightCycler480II,用相同的PCR程序进行扩增反应。MagX可以将记忆的样本信息,如样本架位置、条形码信息(患者姓名、条码号、检测项目)等传送给PCR仪,确保样本放置的顺序和PCR仪顺序一致,避免人为操作失误。手工检测需将信息手工录入。最后,将手工和MagX检测的数据输入到Excel表中,分别统计两种方法的阴性、阳性个数。

1.4 MagX精密度评估 将同一批次三种阳性质控品在10天内重复进行20次实验,通过循环阈值(Cycle threshold, Ct)计算CV%。

1.5 评估MagX携带污染 在样本架上,将高浓度阳性质控品与阴性样本(0.9g/dl生理盐水)以相邻的放置方式循环放置,测试其携带污染情况,验证仪器的防污染能力。5次防污染验证标准:阳性均需检出,阴性不得检出阳性。

1.6 质量控制 测定过程中所有操作均严格按照实验室室内质量控制文件进行。试验过程中,同时测定试剂盒自带的阴性、阳性质控。如果当天质控在控,则纳入当天测定数据,若质控失控,需重新测试。同时原始记录保持完整,以确保实验数据准确性和可溯源性。

1.7 统计学分析 采用Excel2007及SPSS17.0统计软件,进行Kappa一致性分析和四格表分析。Kappa系数≥0.8,为高度一致,认为两种方法检测结果等效;0.4≤Kappa系数<0.8认为一致,需进行阳性符合率和阴性符合率比较;Kappa系数<0.4则认为两种方法检测结果不一致,两系统不等

效。

2 结果

2.1 MagX与手工检测结果比较 见表1~3。CT检测样本159例,Kappa系数为0.9106;NG检测样本128例,Kappa系数为0.9383、UU检测样本144例,Kappa系数为0.8856,三种项目Kappa系数均>0.8。阳性符合率、阴性符合率、总符合率见表4。

表1 全自动核酸提取仪与手工检测结果比较(CT)

检测方法	手工(金标准)		总计
	阳性	阴性	
MagX	阳性	25	27
	阴性	2	130
总计		27	132

表2 全自动核酸提取仪与手工检测结果比较(NG)

检测方法	手工(金标准)		总计
	阳性	阴性	
MagX	阳性	18	20
	阴性	0	108
总计		18	110

表3 全自动核酸提取仪与手工检测结果比较(UU)

检测方法	手工(金标准)		总计
	阳性	阴性	
MagX	阳性	26	30
	阴性	4	80
总计		30	84

表4 三种项目全自动核酸提取仪符合率(%)

项目	CT	NG	UU
阳性符合率(灵敏度)	92.59	100.00	93.33
阴性符合率(特异度)	98.48	98.18	95.24
总符合率(准确度)	97.48	98.44	94.44

2.2 精密度 同一批次各阳性质控在10天内重复进行20次检测,结果显示:CT,NG,UU的变异系数(CV%)分别为3.63%,3.75%,3.92%,均<5%。

2.3 携带污染实验 共做5次携带污染验证,阳性质控结果正常,阴性(0.9g/dl生理盐水)检测结果全为阴性,符合实验要求。

3 讨论 全自动核酸提取仪MagX通过扫描条形码(如姓名、样本位置、检测项目)进行样本信息的传输,避免手工提取检测过程中人为可能造成的失误。手工操作还与每个操作者的熟练程度和细心程度密切相关,而仪器检测过程更加客观、一致,更易标准化。

本研究以手工操作结果为金标准,使用同一批次试剂,仪器操作的敏感度和特异度:CT检测样本159例,灵敏度为92.59%,特异度为98.48%,准确度为97.48%,Kappa系数为0.9106;NG检

测样本 128 例,灵敏度为 100.00%,特异度为 98.18%,准确度为 98.44%,Kappa 系数为 0.938 3;UU 检测样本 144 例,灵敏度为 93.33%,特异度为 95.24%,准确度为 94.44%,Kappa 系数为 0.885 6。这三个项目在全自动核酸提取仪上操作,Kappa 系数均 >0.8 ,说明这两种方法检测的结果具有高度一致性,是等效的。

仪器 MagX 精密度验证结果显示,CT,NG,UU 的 CV 值均 $<5\%$,说明全自动核酸提取仪的重复性较好;5 次防污染验证,每次的阳性结果均正常,阴性对照结果无污染发生。说明该仪器机械臂的精准度很高,能做到三维高精度定位,这点在日常检测中很重要。

综上所述,MagX 全自动核酸提取仪用于三种性传播病原体检测符合临床使用标准,可用于临床检测,同时也为今后临床应用全自动核酸(RNA)检测分析系统提供依据和参考。

参考文献:

[1] Li Z, Liu H, Tu W. A sexually transmitted infection

screening algorithm based on semiparametric regression models[J]. Stat Med, 2015, 34(20): 2844-2857.

[2] Seifoleslami M, Safari A, Khameneie MK, et al. Prevalence of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in high vaginal swab samples of infertile females[J]. Iran Red Crescent Med J, 2015, 17(12): e16823.

[3] Apari P, de Sousa JD, Müller V. Why sexually transmitted infections tend to cause infertility: an evolutionary hypothesis[J]. PLoS Pathog, 2014, 10(8): e1004111.

[4] Centers for Disease Control and Prevention. 2010 Sexually transmitted disease surveillance [Z]. Atlanta: Department of Health and Human Services, 2010.

[5] 张睿,叶阿里,孔令君,等. 临床患者三种性传播疾病分子生物学检测分析[J]. 现代检验医学杂志, 2015, 30(3): 107-110.

Zhang R, Ye AL, Kong LJ, et al. Clinical molecular biology analysis of three kinds of sexually transmitted diseases in Patients[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2015, 30(3): 107-110.

收稿日期: 2017-07-19

修回日期: 2017-09-27

(上接 141 页)降低早期带状疱疹诊断的漏诊率和误诊率。

参考文献:

[1] Varghese L, Standaert B, Olivieri A, et al. The temporal impact of aging on the burden of herpes zoster[J]. BMC Geriatrics, 2017, 17(1): 30.

[2] 罗志广,黄秀娟,杨国良,等. 154 例带状疱疹误诊原因分析[J]. 保健医学研究与实践, 2014, 11(3): 38-40.

Luo ZG, Huang XJ, Yang GL, et al. Analysis on the cause of misdiagnosis in 154 cases of patients with herpes zoster[J]. Health Medicine Research and Practice, 2014, 11(3): 38-40.

[3] Kapoor U, Juneja M. Case reports: misdiagnosed herpes zoster[J]. Br Dent J, 2015, 218(9): 507.

[4] 郭向阳,严晓华,王侠. 儿童感染性疾病中降钙素原、超敏 C-反应蛋白和白细胞联合检测的价值及相关性研究[J]. 现代检验医学杂志, 2014, 29(3): 56-59.

Guo XY, Yan XH, Wang X. Role and correlation of procalcitonin, hypersensitive C-reactive protein and white blood cell count in children infection diseases [J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2014, 29(3): 56-59.

[5] 郭志雄,彭政,陈聪. 白细胞 VCS 参数在细菌及病毒感染的鉴别临床应用研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(17): 4327-4329.

Guo ZX, Peng Z, Chen C. Study of leukocyte VCS parameters in differential diagnosis of bacterial or viral infections [J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2013, 23(17): 4327-4329.

[6] 胡道军,郁森,张洪磊,等. 基于 Logistic 回归和 ROC 曲线综合评价 IMA, NLR, hs-CRP 和 CK-MB 联合检测对早期急性心肌梗死的诊断价值[J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31(5): 76-80.

Hu DJ, Yu M, Zhang HL, et al. Comprehensive evaluation of the diagnostic value of the combined detection of IMA, NLR, hs-CRP and CK-MB for acute myocardial infarction based on ROC curve and Logistic regression analysis[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2016, 31(5): 76-80.

[7] Garcia-Gonzalez AI, Rosas-Carrasco O. Herpes zoster and post-herpetic neuralgia in the elderly: particularities in prevention, diagnosis, and treatment[J]. Gaceta Medica de Mexico, 2017, 153(1): 92-101.

[8] 宋郁河,李淑闽,林魁,等. 水痘患儿血浆 C 反应蛋白检测及意义[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(6): 1151-1152.

Song YH, Li SM, Lin S, et al. Determination and significance of serum CRP in children with varicella[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010, 10(6): 1151-1152.

[9] Muta Y, Odaka A, Inoue S, et al. Acute acalculous cholecystitis with eosinophilic infiltration[J]. Pediatr Int, 2015, 57(4): 788-791.

[10] 白宏宇,叶剑飞,夏洪刚,等. CRP 在炎症性急腹症与带状疱疹鉴别诊断中的应用价值[J]. 当代医学, 2013, 19(25): 21-22.

Bai HY, Ye JF, Xia HG, et al. The value of C-reactive protein(CRP) in differential diagnosis between in ammatory acute abdomen and herpes zoster[J]. Contemporary Medicine, 2013, 19(25): 21-22.

[11] 朱益佳,宁明哲,杨平,等. 血清炎症性肠病抗体谱的检测对 IBD 诊断及鉴别诊断的临床价值[J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(1): 141-143.

Zhu YJ, Ning MZ, Yang P, et al. Clinical value of diagnosis and differential diagnosis of detection of serum inflammatory bowel disease antibody spectrum in IBD[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2017, 32(1): 141-143.

收稿日期: 2017-04-13

修回日期: 2017-09-25