

呼吸道样本NaOH液化处理对核酸检测的影响及方法优化选择

赵伟凯^{1,2}, 王子怡¹, 刘文静¹, 孙玉杰¹, 刘仪威¹, 徐英春¹, 陈雨¹, 杨启文¹, 伊洁¹ (1. 中国医学科学院北京协和医院检验科, 北京 100730; 2. 北京怀柔医院检验科, 北京 101400)

摘要: **目的** 探讨呼吸道样本NaOH处理对核酸检测效率的影响及优化方法选择, 为呼吸道样本核酸提取前处理流程提供科学依据。 **方法** 从北京协和医院检验科收集16份鼻咽拭子(NPS)样本和24份痰液样本。将浓度为 1×10^6 copies/ml的肺炎支原体(MP)DNA国家标准品分别用病毒保存液和痰液稀释, 制备成模拟阳性鼻咽拭子样本和模拟阳性痰液样本。临床鼻咽拭子样本和模拟鼻咽拭子样本分别按照1:1比例使用生理盐水、1mol/L NaOH, 胰酶进行液化处理。模拟痰液样本按照1:1比例分别用胰酶和1mol/L NaOH液化处理。模拟痰液样本用1mol/L NaOH液化后, 加不同浓度三羟甲基氨基甲烷盐酸盐[Tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride, Tris-HCl]优化处理。所有样本均使用普通磁珠法核酸提取和聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增。运用 t 检验比较不同液化试剂处理样本后核酸 C_t 值的组间差异。 **结果** 与生理盐水相比, 1mol/L NaOH处理显著抑制鼻咽拭子中甲型流感病毒(IFVA)和呼吸道合胞病毒(RSV)RNA的检测, 结果由阳性转为阴性; 而处理前后MP和腺病毒(ADV)DNA的 C_t 值差异无统计学意义($t=2.644, 2.862$, 均 $P>0.05$)。在模拟鼻咽拭子样本中, 1mol/L NaOH液化处理对2 000和1 000 copies/ml MP DNA无影响($t=0.946, 1.925$, 均 $P>0.05$), 但对低载量(200和500 copies/ml)的检测具有显著抑制作用($t=3.085, 2.566$, 均 $P<0.05$)。胰酶处理对DNA和RNA病原体核酸检测均无显著影响(均 $P>0.05$)。模拟痰液样本经1mol/L NaOH液化后, MP DNA C_t 值相比胰酶组显著升高($t=3.935, P<0.05$), 使用不同浓度(1、0.5和0.25 mol/L)Tris-HCl(pH=7)中和后 C_t 值差异无统计学意义($t=0.333, 1.984, 0.182$, 均 $P>0.05$)。 **结论** 1mol/L NaOH液化痰液对PCR检测具有抑制作用, 可能导致假阴性结果。通过添加Tris-HCl可以一定程度缓冲NaOH的抑制, 提高PCR检测的准确性。

关键词: 氢氧化钠; 液化; 核酸; 聚合酶链反应; 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐

中图分类号: R730.53; R979.1 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2026)01-175-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2026.01.034

Impact of NaOH Liquefaction Treatment on Nucleic Acid Testing of Respiratory Samples and the Optimization of Method Selection

ZHAO Weikai^{1,2}, WANG Ziyi¹, LIU Wenjing¹, SUN Yujie¹, LIU Yiwei¹, XU Yingchun¹, CHEN Yu¹, YANG Qiwen¹, YI Jie¹ (1. Department of Laboratory Medicine, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China; 2. Department of Laboratory Medicine, Beijing Huairou Hospital, Beijing 101400, China)

Abstract: Objective To investigate the impact of NaOH treatment on respiratory samples for nucleic acid testing efficiency and the selection of optimization methods, providing a scientific basis for the pre-treatment process of nucleic acid extraction from respiratory samples. **Methods** 16 nasopharyngeal swabs(NPS) and 24 sputum samples were collected from the Department of Clinical Laboratory of Peking Union Medical College Hospital. The national standard of *Mycoplasma pneumoniae* (MP) DNA with a concentration of 1×10^6 copies/ml was diluted with viral transport medium and sputum respectively to prepare simulated positive NPS samples and simulated positive sputum samples. Clinical NPS samples and simulated NPS samples were liquefied with normal saline(NS), 1mol/L NaOH, and trypsin at a 1:1 ratio respectively. The simulated sputum samples were liquefied with trypsin and 1 mol/L NaOH at a 1:1 ratio, respectively. After liquefaction with 1 mol/L NaOH, the simulated sputum samples were treated with varying concentrations of Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride (Tris-HCl) for optimization. All samples underwent nucleic acid extraction using the conventional magnetic bead method followed by polymerase chain reaction (PCR) amplification. A t -test was employed to compare the intergroup differences in nucleic acid C_t values among samples treated with different liquefaction reagents. **Results** Compared with NS, treatment with 1 mol/L NaOH significantly inhibited the detection of *influenza A virus* (IFVA) and *respiratory syncytial virus* (RSV) RNA, converting the results from positive to negative, whereas the differences in C_t values of MP and *adenovirus*(ADV) DNA before and after treatment showed no statistical significance ($t=2.644, 2.862$, all $P>0.05$). In simulated NPS samples, 1 mol/L NaOH liquefaction treatment

基金项目: 中央高水平医院临床科研业务费资助(2022-PUMCH-B-028)。

作者简介: 赵伟凯(1990-), 男, 本科, 主管检验技师, 研究方向: 临床分子检验, E-mail: zhaoweikai719@126.com。

通讯作者: 伊洁(1983-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 临床微生物分子诊断, E-mail: yijie0908@126.com。

showed no effect on MP DNA at 2 000 and 1 000 copies/ml ($P>0.05$), but exhibited significant inhibitory effects on detection at low viral loads (200 and 500 copies/ml) ($t=3.085, 2.566$, all $P<0.05$). Trypsin treatment had no significant impact on nucleic acid detection of either DNA or RNA pathogens ($P>0.05$). After liquefaction of simulated sputum samples with 1mol/L NaOH, the MP DNA Ct value significantly increased compared to the trypsin group ($t=3.935$, $P<0.05$). No differences in Ct values were observed after neutralization with different concentrations (1, 0.5, and 0.25mol/L) of Tris-HCl (pH=7) (all $P>0.05$). **Conclusions** Liquefaction of sputum with 1mol/L NaOH has an inhibitory effect on PCR detection, which may lead to false-negative results. The inhibition can be eliminated to some extent by using Tris-HCl, to improve the accuracy and sensitivity of PCR.

Keywords: NaOH; liquefaction; nucleic acid; polymerase chain reaction; Tris-HCl

聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术因其高灵敏度和准确度,在病原体检测和分子诊断中具有重要价值^[1-2]。样本的前处理是影响核酸提取效率和检测准确度的关键因素^[3-5],尤其对于黏稠的痰液样本,液化方法的选择至关重要^[6]。目前,1mol/L NaOH和胰酶是临床实验室中应用比较广泛的两种液化试剂。本研究对比两种液化方法,对于不同种类、浓度和类型呼吸道样本中病原体核酸检测影响进行评估,并通过优化液化方法,旨在建立适用于基层医院检验科的差异化样本处理方案,为临床分子诊断提供优化策略。

1 材料与方法

1.1 样本

1.1.1 标准品:肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*, MP)DNA 国家标准品由中国食品药品检定研究院提供(编号:370090-202001),浓度为 1×10^6 copies/ml。

1.1.2 临床样本:收集2025年2月北京协和医院检验科经呼吸道病原核酸检测后剩余鼻咽拭子16份,痰液24份。其中鼻咽拭子中MP DNA、腺病毒(*adenovirus*, ADV) DNA、甲型流感病毒(*influenza A virus*, IFVA) RNA和呼吸道合胞病毒(*respiratory syncytial virus*, RSV) RNA阳性样本各4份,痰液为MP DNA阴性样本。所有剩余样本均保存于 -80°C 冰箱,待研究开始时复融检测。

1.1.3 模拟样本:在病毒保存液和临床痰液标本中加入不同浓度MP DNA国家标准品,制备成鼻咽拭子和痰液模拟样本。本研究获得北京协和医院伦理委员会批准(伦理号:I-22PJ860)。

1.2 仪器与试剂 生理盐水,1mol/L NaOH和三羟甲基氨基甲烷盐酸盐[Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride, Tris-HCl](pH=7.0)溶液自制,病毒保存液(友康生物科技股份有限公司),胰酶消化液(广州微远基因科技有限公司),病毒DNA/RNA核酸提取试剂盒(西安天隆科技有限公司),六项呼吸道病原体核酸检测试剂盒(圣湘生物科技股份有限公司),MP引物和探针^[7]由北京睿博兴科生物技术有限公司合成,GoTaq® Probe qPCR Master Mix(美国Promega公司),GeneRotex96全自动核酸提取仪(西安天隆科技有限公司),ABI7500荧光定量

PCR仪(美国赛默飞世尔科技公司)。

1.3 方法

1.3.1 标本液化:临床样本或者模拟样本中加入等量胰酶或1mol/L NaOH,胰酶液化 37°C 孵育10~15min,1mol/L NaOH液化常温静置15~20min。

1.3.2 核酸提取:液化后样本震荡混匀30s,瞬时离心后取200 μl 上清加入病毒DNA/RNA核酸提取试剂盒进行核酸提取。

1.3.3 核酸检测:ADV、IFVA和RSV核酸检测采用六项呼吸道病原体核酸检测试剂盒,MP DNA检测采用合成引物探针及GoTaq® Probe qPCR Master Mix检测。具体操作严格按照操作说明进行, Ct 值 <40 判断为阳性, Ct 值 ≥ 40 判断为阴性。

1.3.4 优化方案:痰液模拟标本经1mol/L NaOH液化后分别加入等体积1、0.5和0.25mol/L Tris-HCl (pH=7.0)试剂作为优化方案。后续操作按1.3.2和1.3.3进行。

1.4 统计学分析 采用GraphPad Prism统计软件和Excel进行数据处理,数据以均值 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 t 检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同液化试剂对病原体DNA和RNA的影响 四种病原体标本,每个标本检测一次,采用配对 t 检验。与生理盐水相比,对于病原体DNA组,无论是MP还是ADV,1mol/L NaOH液化后,虽然病原体DNA的 Ct 均值有所升高,但是差异无统计学意义($t=2.644, 2.862$, 均 $P>0.05$),见图1A。对于病原体RNA组,无论是RSV还是IFVA,1mol/L NaOH液化后阳性均转为阴性,见图1B。而胰酶液化与生理盐水液化组差异均无统计学意义($t=0.455, 1.830$, 均 $P>0.05$)。

2.2 1mol/L NaOH液化对不同浓度MP模拟样本DNA的影响 在不同浓度的MP鼻咽拭子模拟样本中加入1mol/L NaOH后,通过核酸提取和PCR检测,每组实验均重复进行20次。实验结果表明,与对照组相比,浓度为2 000 copies/ml和1 000 copies/ml的样本检测结果并未受到1mol/L NaOH的影响(均 $P>0.05$),然而浓度为500 copies/ml和200 copies/ml的样本在经过1mol/L NaOH处理后,其 Ct 值显著上升,差异具有统计学意义

(均 $P<0.05$),见表1。以上结果显示,1mol/L NaOH液化对弱阳性DNA样本PCR抑制明显。

2.3 不同液化方式对MP模拟痰液样本DNA的影响 选取浓度为500copies/ml的模拟痰液样本,分别采用胰酶和1mol/L NaOH进行液化处理,经过核酸提取和PCR检测,实验重复20次。结果表明,使用1mol/L NaOH液化后,MP DNA的Ct均值

(37.11 ± 2.08)显著高于胰酶组Ct均值(34.94 ± 1.72),差异具有统计学意义($t=3.935, P<0.05$),且有5次实验1mol/L NaOH液化后结果为阴性。进一步采用1, 0.5和0.25mol/L Tris-HCl(pH=7.0)进行提取优化,结果显示,与胰酶对照组相比,三种优化试剂加入后MP DNA Ct值变化差异无统计学意义($t=0.333, 1.984, 0.182$,均 $P>0.05$),见图2。

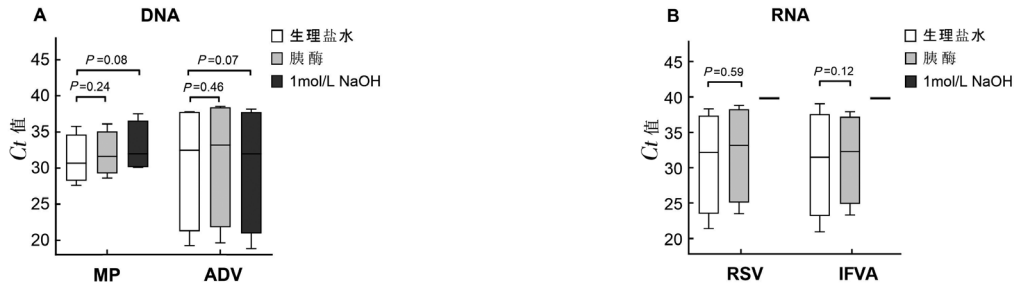


图1 不同液化试剂对病原体DNA和RNA检测的影响
1mol/L NaOH对不同浓度MP模拟鼻咽拭子样本影响

表1

浓度 (copies/ml)	对照组 Ct 值	实验组 Ct 值	t 值	P 值
2 000	33.57 ± 1.29	33.89 ± 0.79	0.946	0.35
1 000	34.25 ± 1.71	35.07 ± 0.8	1.925	0.062
500	36.04 ± 1.11	37.01 ± 0.86	3.085	0.026
200	38.61 ± 1.80	39.66 ± 0.36	2.966	0.018

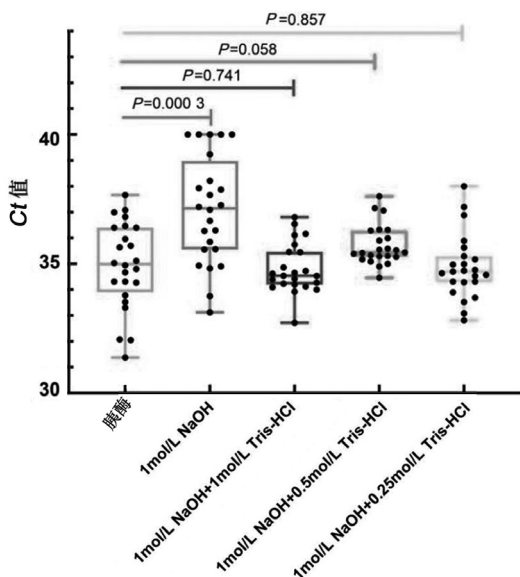


图2 不同液化及优化方式对痰液中MP DNA检测的影响
3 讨论

PCR技术在病原体检测中具有重要作用,不仅可以用于定性诊断^[7-8],还可以通过定量检测来评估病原体载量,从而为疾病的诊疗提供重要依据^[9-10]。自新型冠状病毒(COVID-19)疫情暴发以来,针对呼吸道病原体的PCR检测试剂盒已在临床检验科广泛使用,而痰液是呼吸道样本中最常见的样本类型之一,其阳性检出率显著高于其他上呼吸道样本,如鼻咽拭子和口咽拭子^[11-12]。此外,痰液标本直接来源于下呼吸道,能够

更准确地反映病原体的存在情况^[13]。然而,痰液样本中黏液的大量存在为核酸提取过程带来了不便。因此液化处理是大多数痰液标本核酸提取前的必需步骤。胰酶和1mol/L NaOH均是临床上应用较多的液化试剂。胰酶的液化速度较慢,受温度影响大,在临床应用中受到一定限制。1mol/L NaOH具有强碱性,可以破坏黏蛋白结构,降低痰液黏弹性,因而液化痰液速度快,效果好,一直是临床上应用比较广泛的液化试剂。

本研究首先对比了两种液化试剂对病原体DNA和RNA的影响,结果显示鼻咽拭子样本中加入1mol/L NaOH后对RNA的抑制作用尤为显著,可使RSV和IFVA阳性核酸变为阴性,这与之前的研究结果一致^[14]。胰酶作为一种蛋白质水解酶,能够选择性地水解蛋白质中由赖氨酸或精氨酸的羧基所构成的肽链,消化溶解变性蛋白质,使脓、痰液、血凝块等分解、变稀^[15],并且不会对核酸产生抑制^[16]。NaOH对RNA的抑制作用可能归因于RNA中核糖C2位置的额外羟基,在碱性条件下可以去质子化,抑制RNA的PCR扩增。本研究中,临床样本中的ADV和MP DNA对1mol/L NaOH的耐受性相对较强,影响较小,与胰酶消化结果无统计学差异。但是有研究显示1mol/L NaOH溶液在处理痰液标本时尽管展现出最佳的释放效果^[17],但是会对PCR产生抑制^[18]。此外,pH值为7.4时,DNA提取率最高;pH值偏离7.4越远,提取率越低,pH值的升高也会导致DNA的变性和降解。因而在进一步研究中,不同浓度MP DNA模

拟鼻咽拭子中加入1mol/L NaOH后, 2 000copies/ml和1 000copies/ml MP DNA Ct值不受影响, 而500copies/ml和200copies/ml模拟样本Ct值均有显著升高($P < 0.05$), 提示1mol/L NaOH对弱阳性样本DNA影响较大。这可能是由于弱阳性样本中DNA含量相对较少, 对碱液更为敏感, 从而导致DNA的降解更为显著。

Tris-HCl作为PCR缓冲体系的核心成分, 通过调节pH维持离子平衡及保护酶活性, 对扩增效率和产物质量具有多方面影响^[9]。为了消除这种抑制作用, 本研究使用不同浓度Tris-HCl(pH=7.0)中和1mol/L NaOH, 以期减少其对后续PCR扩增的抑制作用。使用三种浓度Tris-HCl中和后, 均能够有效减轻1mol/L NaOH对DNA扩增的抑制作用, 特别是在弱阳性样本中, DNA扩增的成功率得到了显著提高, 对DNA的损伤较小, 且不会引入新的抑制因素。因此, Tris-HCl是一种有效的中和试剂, 可用于减轻1mol/L NaOH在呼吸道样本液化过程中对核酸检测的抑制作用。此外, 从临床推广可行性角度分析, 配置后在-20℃可保存6个月。该技术具有理想的“低成本-易操作-强适配”特征, 适合在基层检验科中推广。但是该方法也存在一定的局限性, 过量引入Tris-HCl缓冲液可能引发样本稀释效应, 其最小添加量及最低有效浓度仍需通过后续系统的实验研究加以验证。

综上所述, 使用1mol/L NaOH可以实现快速液化, 但其会对病原体RNA产生降解, 对弱阳性DNA产生抑制作用。通过引入Tris-HCl对核酸提取步骤进行优化, 可以有效抵消1mol/L NaOH的抑制效应, 从而显著提高病原体DNA的提取效率和检测的准确性。这种经过优化的痰液液化及核酸提取方法成本低廉, 性能优良, 非常适合在基层医院检验科中推广使用。

参考文献:

- [1] 杨晓慧, 许蕾, 晏耀明, 等. 多重PCR高分辨溶解分析同时检测骨髓增殖性肿瘤JAK2, MPL及CALR基因突变的初步研究[J]. 现代检验医学杂志, 2023, 38(4): 63-66, 71.
YANG X H, XU L, YAN Y M, et al. Preliminary study on simultaneous detection of JAK2, MPL and calreticulin mutations in patients with myeloproliferative neoplasms by multiplex PCR high resolution melting analysis[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2023, 38(4): 63-66, 71.
- [2] 李团团, 叶成果, 李振, 等. 两种RT-PCR检测SARS-CoV-2核酸试剂盒实验室应用评价[J]. 现代检验医学杂志, 2020, 35(3): 90-93.
LI T T, YE C G, LI Z, et al. Evaluation of laboratory application of two RT-PCR detection kits for SARS-CoV-2 nucleic acid[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2020, 35(3): 90-93.
- [3] 马涛. 哈密拉·玉素甫. 检验科微生物检验质量的影响因素及病原菌耐药性调查[J]. 中文科技期刊数据库:(全文版)医药卫生, 2024(3): 0020-0023.
MA T, HAMILA Y. Investigation on the influencing factors of microbiological testing quality in laboratory and pathogen resistance[J]. Chinese Science and Technology Journal Database (Full Text Edition) Medical and Health, 2024(3): 0020-0023.
- [4] 张海邻, 李昌崇. 《儿童呼吸道感染微生物检验标本采集转运与检测建议(病毒篇)》解读[J]. 中国实用儿科杂志, 2019, 34(2): 89-93.
ZHANG H L, LI C C. Interpretation of advice on the collection, transfer and detection of microbiological testing specimen in children with respiratory infection (focusing on virus)[J]. Chinese Journal of Practical Pediatrics, 2019, 34(2): 89-93.
- [5] 赵淑凤, 樊玉凤. 临床微生物标本规范采集和送检在临床中的重要作用[J]. 世界最新医学信息文摘(连续型电子期刊), 2020, 20(73): 357-358.
ZHAO S F, FAN Y F. The important role of standardized collection and submission of clinical microbiological specimens in clinical practice[J]. World's Latest Medical Information (Continuous Electronic Journal), 2020, 20(73): 357-358.
- [6] 何慧, 陈懿, 潘平, 等. 不同液化处理及核酸共提取方法对痰样本中病毒核酸的提取效果比较[J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2016, 43(2): 81-85.
HE H, CHEN Y, PAN P, et al. Effects of different homogenization and nucleic acid co-extraction methods on viral RNA and DNA extraction from sputum[J]. International Journal of Epidemiology and Infectious Disease, 2016, 43(2): 81-85.
- [7] ZHAO M C, JIANG Y, LI G X, et al. Simultaneous detection of 9 respiratory pathogens using a newly developed multiplex real-time PCR panel based on an automatic molecular detection and analysis system[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2022, 104(4): 115801.
- [8] RADER T S 4, STEVENS M P, BEARMAN G. Syndromic multiplex polymerase chain reaction (mPCR) testing and antimicrobial stewardship: current practice and future directions[J]. Current Infectious Disease Reports, 2021, 23(4): 5.
- [9] GIRÓN PÉREZ D A, FONSECA-AGÜERO A, TOLEDO-IBARRA G A, et al. Post-COVID-19 syndrome in outpatients and its association with viral load[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2022, 19(22): 15145.
- [10] 唐月明, 伊洁. 数字聚合酶链反应(dPCR)技术在病原体基因检测应用中的研究进展[J]. 现代检验医学杂志, 2021, 36(5): 174-179.
TANG Y M, YI J. Recent advances in research on digital polymerase chain reaction(dPCR) in pathogen gene detection[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2021, 36(5): 174-179.
- [11] 陈晴晴, 何军, 俞俊岭, 等. 安徽省COVID-19病例临床标本检测分析[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2020, 34(4): 382-384.
CHEN Q Q, HE J, YU J L, et al. Detection and analysis of clinical specimens of COVID-19 in Anhui province[J]. Chinese Journal of Experimental and Clinical Virology, 2020, 34(4): 382-384.
- [12] 牛卫东, 段江洋, 蒋诗苑, 等. 咽拭子、鼻拭子、痰液中SARS-CoV-2核酸检测结果一致性及其检出率分析[J]. 传染病信息, 2020, 33(4): 307-311.
NIU W D, DUAN J Y, JIANG S Y, et al. Analysis of consistency and positive rate of SARS-CoV-2 nucleic acid test results in oropharyngeal swabs, nasal swabs and sputum[J]. Infectious Disease Information, 2020, 33(4): 307-311.

- [13] 国家卫生计生委合理用药专家委员会儿童用药专业组. 中国儿童肺炎支原体感染实验室诊断规范和临床实践专家共识(2019年)[J]. 中华儿科杂志, 2020,58(5):366-373.
Expert Committee on Rational Use of Medicines for Children Pharmaceutical Group, National Health and Family Planning Commission. Expert consensus on laboratory diagnostics and clinical practice of *Mycoplasma pneumoniae* infection in children in China (2019)[J]. Chinese Journal of Pediatrics, 2020, 58(5): 366-373.
- [14] WILKINSON R C, MELDRUM K, MAGGS C J, et al. Determining the efficacy of disinfectants at nucleic acid degradation[J]. Journal of Applied Microbiology, 2023, 134(11): 1xad244.
- [15] 林敏, 农天雷, 刘大鹰. 胰酶化痰法检测五项肺肿瘤标志物探讨[J]. 标记免疫分析与临床, 2011,18(3): 143-145.
LIN M, NONG T L, LIU D Y. Detection of five tumor markers in lung cancer by trypsin digestion of sputum method[J]. Labeled Immunoassays and Clinical Medicine, 2011, 18(3): 143-145.
- [16] 周步全, 朱建峰, 王迎春, 等. 结核分枝杆菌标本的不同处理方法对PCR扩增敏感性的影响[J]. 现代检验医学杂志, 2005, 20(6): 60-63.
ZHOU B Q, ZHU J F, WANG Y C, et al. The influence of different processing methods for *Mycobacterium tuberculosis* specimens on PCR amplification sensitivity[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2005, 20(6): 60-63.
- [17] 刘金花, 李小玉, 罗一钧, 等. 不同浓度氢氧化钠对结核分枝杆菌罗氏培养检测结果的影响[J]. 基层医学论坛, 2020, 24(23): 3257-3259.
LIU J H, LI X Y, LUO Y J, et al. Effect of different concentrations of Sodium hydroxide on Roche culture test results of *mycobacterium tuberculosis*[J]. the Medical Forum, 2020, 24(23): 3257-3259.
- [18] 张军力, 托娅, 王育民. 不同的液化方法对痰液DNA提取效果比较[J]. 检验医学, 2009, 24(6): 456-458.
ZHANG J L, TUO Y, WANG Y M. Comparison of different liquefaction methods for extracting sputum DNA[J]. Laboratory Medicine, 2009, 24(6): 456-458.
- [19] INGR M, DOSTÁL J, MAJEROVÁ T. Enzymological description of multitemplate PCR-shrinking amplification bias by optimizing the polymerase-template ratio[J]. Journal of Theoretical Biology, 2015, 382: 178-186.

收稿日期: 2025-03-09

修回日期: 2025-04-21

(上接第151页)

- [10] 中国防痨协会. 耐药结核病化学治疗指南(2019年简版)[J]. 中国防痨杂志, 2019,41(10):1025-1073.
Chinese Antituberculosis Association. Guidelines for chemotherapy of drug-resistant tuberculosis(2019 simplified edition)[J]. Chinese Journal of Antituberculosis, 2019, 41(10): 1025-1073.
- [11] 上海市感染性疾病(结核病)临床医学研究中心/同济大学附属上海市肺科医院, 首都医科大学附属北京胸科医院/北京市结核病胸部肿瘤研究所, 中国防痨协会, 等. 复治肺结核病诊断和治疗专家共识[J]. 中国防痨杂志, 2021,43(12):1226-1238.
Shanghai Clinical Research Center for Infectious Disease(Tuberculosis)/Shanghai Pulmonary Hospital, Tongji University School of Medicine, Beijing Chest Hospital, Capital Medical University/Beijing Tuberculosis and Thoracic Tumor Research Institute, Chinese Antituberculosis Association, et al. Consensus of experts on diagnosis and treatment of retreatment pulmonary tuberculosis[J]. Chinese Journal of Antituberculosis, 2021, 43(12): 1226-1238.
- [12] SOUNDARARAJAN D C R, RAJASEKARAN R B, RAJASEKARAN S, et al. Drug-resistant spinal tuberculosis - current concepts, challenges, and controversies[J]. Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma, 2020, 11(5): 863-870.
- [13] 陈耀龙, 杨引君, 柳永明, 等. 脊柱结核治疗研究进展[J]. 骨科临床与研究杂志, 2022,7(3):185-188.
CHEN Y L, YANG Y J, LIU Y M, et al. Progress in treatment of spinal tuberculosis[J]. Journal of Clinical Orthopaedics and Research, 2022, 7(3): 185-188.
- [14] 许子星, 许卫红, 张立群, 等. 脊柱结核手术失败的处理及危险因素分析[J]. 中华骨科杂志, 2022,42(2):93-102.
XU Z X, XU W H, ZHANG L Q, et al. Risk factors and interventions for surgical failure of spinal tuberculosis[J]. Chinese Journal of Orthopaedics, 2022, 42(2): 93-102.
- [15] WANG B, KONG L B, ZHU Z Q, et al. Recurrent complex spinal tuberculosis accompanied by sinus tract formation: causes of recurrence and clinical treatments[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 6933.
- [16] MACHADO D, PIRES D, PERDIGÃO J, et al. Ion channel blockers as antimicrobial agents, efflux inhibitors, and enhancers of macrophage killing activity against drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*[J]. PLoS One, 2016, 11(2): e0149326.
- [17] LEOWATTANA W, LEOWATTANA P, LEOWATTANA T. Tuberculosis of the spine[J]. World Journal of Orthopedics, 2023, 14(5): 275-293.
- [18] FAN J, AN J, SHU W, et al. Impact of xpert MTB/RIF on outcomes of adults hospitalized with spinal tuberculosis: findings from a comparative cohort in Beijing, China[J]. Frontiers in Public Health, 2022, 10: 901504.
- [19] 刘树仁, 李卓, 王连波, 等. 胸腰椎结核病灶清除植骨融合内固定术后内固定失败的危险因素分析[J]. 山东医药, 2024,64(21):78-82.
LIU S R, LI Z, WANG L B, et al. Analysis of risk factors for internal fixation failure after thoracolumbar tuberculosis lesion removal and bone graft fusion with internal fixation[J]. Shandong Medical Journal, 2024, 64(21): 78-82.
- [20] YANG H, LI A, DANG L, et al. A rapid, accurate, and low-cost method for detecting *Mycobacterium tuberculosis* and its drug-resistant genes in pulmonary tuberculosis: Applications of MassARRAY DNA mass spectrometry[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1093745.
- [21] 丁磊, 徐俊驰, 邱文娜, 等. 结核分枝杆菌耐药机制和治疗的最新研究进展[J]. 现代检验医学杂志, 2021, 36(2): 1-5, 48.
DING L, XU J C, QIU W N, et al. Latest research progress on the drug resistance mechanism and treatment of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2021, 36(2): 1-5, 48.

收稿日期: 2025-05-08

修回日期: 2025-06-20