

· 论著 ·

不同呼吸道拭子保存液对核酸检测结果的影响比较*

郑州大学附属儿童医院(河南 郑州 450000)

李晓燕 靳秀红 杨俊梅

【摘要】目的 比较不同呼吸道拭子保存液对核酸检测结果的影响,期望找到一种常温条件下实现拭子样本中的核酸稳定保存的保存液。方法 采集427例呼吸道感染患儿咽拭子样本,同一患者采集两根,交替方式洗脱到两种不同保存液中。对两种样本保存液拭子进行QPCR检测,对比阳性检测率;结果 康健拭子保存液保存样本,检出甲型流感病毒105例,阳性率24.59%,检测出呼吸道合胞病毒47例,阳性检出率11.01%,新型保存液保存样本,检测出甲型流感病毒104例,阳性率24.36%,检测出呼吸道合胞病毒46例,阳性检出率10.77%,两种保存液检出率无显著性差异;结论 新型保存液可常温保存运输拭子病毒样本,在分子诊断中有较高应用价值。

【关键词】PCR; 呼吸道; 样品保存

【中图分类号】R373.1

【文献标识码】A

【基金项目】河南省医学科技攻关计划联合共建项目(2018020698)

DOI: 10.3969/j.issn.1009-3257.2020.04.008

Comparison of the Effects of Different Respiratory Tract Swab Preservation Solutions on Nucleic Acid Test Results*

LI Xiao-yan, JIN Xiu-hong, YANG Jun-mei. Children's hospital of zhengzhou university, zhengzhou 450000, Henan Province, China

【Abstract】Objective To compare the effects of different respiratory tract preservation solutions on the results of nucleic acid detection, and to find a kind of preservation solution for stable nucleic acid preservation in swab samples at room temperature. Methods 427 samples of throat swabs from children with respiratory tract infection were collected. Two swabs were collected from the same patient and eluted alternately into two different preservation solutions. Results 105 cases of influenza A virus and 47 cases of respiratory syncytial virus were detected, and the positive rate was 11.01%. 104 cases of influenza A virus were detected, the positive rate was 24.36%, and 46 cases of respiratory syncytial virus were detected. The positive detection rate was 10.77%. There was no significant difference between the two preservation solutions. Conclusion The new preservation solution can preserve the transport swab virus samples at room temperature and has high application value in molecular diagnosis.

【Key words】PCR; Respiratory Tract; Sample Preservation

呼吸道疾病在世界范围内都是危害人类健康的重要因素,能够引起患者多种症状且传染性强^[1-2]。目前针对呼吸道病原核酸的分子生物学检测如PCR、基因芯片等检测方法发展迅速,因其灵敏度高、特异性好的特点成为呼吸道病原检测的重要方法^[1, 3]。

目前呼吸道病原核酸检测主要的样本类型是咽拭子,常用的拭子样本采样保存液为病毒转运培养基,这种采样保存液采集后的标本都需要冷藏或冷冻运输储存;而核酸样本容易降解,样本的采集转运过程中很难保证全程低温,样本检测前质量控制较难保证^[4-8]。我们对一种新型可常温保存呼吸道拭子的保存液与常规的保存液进行了对比评估研究,以评价样本保存效果。

1 材料与方法

1.1 实验对象 临床样本为郑州儿童医院2018年6月~2018年12月呼吸道感染住院儿童患者427例,年龄为1个月到13岁,其中男性198例,女性229例,临床诊断主要为上呼吸道感染、扁桃体炎、支气管炎、肺炎等。

1.2 试剂和仪器 一次性使用样本保存液(以下简称康健拭子保存液)购自江苏康健医疗用品有限公司、新型的拭子样本常温保存液(以下简称新型拭子保存液)由郑州安图生物工程股份有限公司提供;呼吸道合胞病毒核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法)、甲型流感病毒核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法)购自中

山大学达安基因股份有限公司, 病毒基因组DNA/RNA提取试剂盒购买自天根生化科技(北京)有限公司; 实时荧光定量PCR仪为ABI7500荧光定量PCR仪。

1.3 方法

1.3.1 样本采集和检测: 对同一患者, 用无菌的植绒性拭子采集两根咽部分泌物, 先后采集两根, 交替方式洗脱到两种不同保存液中。考虑临床检测实际需求, 标本运输到第三方实验室需要2~3天, 依照采样液说明书, 康健拭子保存液洗脱样本暂放置至4℃冰箱当天检测, 新型拭子保存液洗脱样本放置至室温3天后检测, 用呼吸道合胞病毒核酸检测试剂盒、甲型流感病毒核酸检测试剂盒对标本进行QPCR检测。

1.3.2 统计学分析: 应用SPSS11.0软件创建数据库, 并采取 $R \times C(\chi^2)$ 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两种拭子保存液样本检测结果 427例呼吸道临床患者中, 用康健拭子保存液洗脱样本保存当天检测, 检测出甲型流感病毒105例, 阳性率24.59%, 检测出呼吸道合胞病毒47例, 阳性检出率11.01%; 用新型拭子保存液洗脱样本室温保存3天后进行检测, 检测出甲型流感病毒104例, 阳性率24.36%, 检测出呼吸道合胞病毒46例, 阳性检出率10.77%。

2.2 对两种保存液保存的拭子检测结果 进行卡方检验, 甲型流感病毒检测率无显著性差异($\chi^2 = 0.20, P > 0.05$)呼吸道合胞病毒检出率无显著性差异($\chi^2 = 0.33, P > 0.05$)。对两种拭子保存液保存样本检测结果如表1和表2。

表1 427例呼吸道患者甲型流感病毒两种拭子保存液检测情况(n=427)

新型拭子保存液	康健拭子保存液			合计
	甲流	阳性	阴性	
阳性		102	2	104
阴性		3	320	323
合计		105	322	427

表2 427例呼吸道患者呼吸道合胞病毒2种拭子保存液检测情况(n=427)

新型拭子保存液	康健拭子保存液			合计
	甲流	阳性	阴性	
阳性		45	1	46
阴性		2	379	381
合计		47	380	427

3 讨论

儿童急性呼吸道感染病毒病原诊断通常采用呼吸道标本, 上呼吸道标本主要包括口咽拭子、鼻咽拭子(nasopharyngeal swab, NPS)、鼻咽吸取物(nasopharyngeal aspirates, NPA); 上呼吸道标本, 尤其易干燥的病毒样本(如咽拭子)必须采用病毒运输液(virus transport medium, VTM)或其他相应的缓冲液保存样本, 以维持病毒的稳定。送检标本中病毒活性会随时间延长而降低, 标本采集后应尽快送检。呼吸道标本应在室温下30min内送检, 4℃可在2~4h内送检, 来不及处理的标本4℃保存不应超过48h。随着国内第三方检验机构和区域检验中心的发展, 标本往往需要寄送到其它实验室进行检测。现有的VTM运输液, 要求标本运输过程中保持低温, 需要添加冰袋等制冷剂, 极大增加了运输成本。同时因运输距离远近不同, 运输时间长短不一, 很难保证运输过程中全程维持低温。

本研究中的新型保存液, 可实现核酸标本的常温运输, 经427例临床标本验证, 样本保存稳定性与VTM冷藏保存的效果一致, 极大提供了临床使用的便捷性。

本研究中, 甲型流感病毒有5例不一致, 合胞病毒有3例不一致, 经重复检测, 均属于试剂盒检测限附近样本, 结果变异较大, 后续需加大考核数量。

本研究中的新型保存液, 试剂主要组分为异硫氰酸胍等化学试剂, 异硫氰酸胍是一种蛋白裂解剂, 在分子诊断试剂中常作为裂解液主要组分, 新型保存液同时具备预裂解功能, 样本采集后就开始了病毒的裂解, 一定程度上减少了呼吸道标本在运输和检测过程中的生物安全性危害。同时新型保存液从原理上不适用于病毒的分离培养和抗原的检测, 只能专配分子诊断试剂检测应用。

参考文献

- [1] 杨梦婕, 李洁, 何小周, 等. 常见呼吸道病毒多重PCR检测法的质量控制分析[J]. 病毒学报, 2018(03):395-398.
- [2] 程琳琳. 应用多重实时荧光PCR检测儿童急性呼吸道感染常见病毒的研究[D]. 郑州大学, 2018.

(下转第 47 页)