

FQ-PCR 检查痰中结核杆菌对肺结核诊断的临床价值

黄泽亮, 桂 福

(怀化市第二人民医院检验科, 湖南 怀化 418000)

摘要: **目的** 探讨荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)检测痰中结核分枝杆菌对诊断肺结核的临床价值。**方法** 选择2007年4月~2010年1月在我院感染科治疗的100例确诊肺结核患者和100例非结核性呼吸道疾病患者,所有患者均分别用FQ-PCR、痰涂片和Bactec MGIT 960结核杆菌快速培养法进行痰结核杆菌检测,比较分析检测结果。**结果** 检测100例确诊肺结核患者的痰标本,FQ-PCR检出率最高(55%),高于快速培养法(43%)($P < 0.05$)和痰涂片法(29%)($P < 0.01$)。以痰培养为标准,FQ-PCR对痰菌检测的敏感性、特异性、阳性预期值、阴性预期值分别为97.8%、93.5%、80.0%和99.3%;FQ-PCR与痰培养法的一致性为94.0%(188/200)。**结论** FQ-PCR是检查痰中结核杆菌快速、敏感、特异、可定量、简便的方法,值得临床推广用于肺结核诊断,可作为结核杆菌培养法的有效补充。

关键词: 荧光定量聚合酶链反应; 结核分枝杆菌; 肺结核; 痰液

中图分类号:R446.5 文献标识码:A

Clinical Value of FQ-PCR in the Examination of Sputum Mycobacterium Tuberculosis in the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis

HUANG Zeliang, GUI Fu

(Clinical Laboratory, the Second People's Hospital of Huaihua, Huaihua, Hunan 418000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the clinical value of FQ-PCR in the examination of sputum mycobacterium tuberculosis in the diagnosis of pulmonary tuberculosis (PTB). **Methods** A total of 100 sputum samples from PTB patients and 100 sputum samples from non-pulmonary tuberculosis patients were obtained from the infectious department in our hospital from April 2007 to January 2010. All samples were detected by using FQ-PCR, sputum direct smear and Bactec MGIT 960 culture methods for the examination of sputum M. tuberculosis, the results were compared and analyzed.

Results In 100 confirmed PTB samples, FQ-PCR showed 55% of positive rate, higher than rapid culture method (43%, $P < 0.05$) and (29%, $P < 0.01$). With the results of culture method as standard, the sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of the FQ-PCR were 97.8%, 93.5%, 80.0% and 99.3%, respectively. The FQ-PCR results correlated with 94.0% (188/200) of the Bactec MGIT 960 culture assay results. **Conclusions** FQ-PCR method for examination of sputum M. tuberculosis in the diagnosis of PTB is fast, sensitive, specific and quantitative and easy, with value worthy of clinical application as an effective complement of the M. tuberculosis culture method.

Key words: FQ-PCR; mycobacterium tuberculosis; pulmonary tuberculosis; sputum

肺结核是一种由结核分枝杆菌(mycobacterium tuberculosis)(简称结核杆菌)感染引起的呼吸道传染病,是造成死亡人数最多的一种单一性传染病,中国是全球结核疫情最为严重的国家之一。及早诊断

和治疗是防治结核病的主要措施^[1]。传统的肺结核实验室病原学诊断方法主要有痰结核杆菌培养法与涂片法,其中培养法是金标准,但费时、操作繁琐、敏感性较低,涂片法敏感性和特异性较低。近年来,核酸检测在临床结核诊断和疗效判定中得以应用^[2-4]。本研究比较核酸检测技术荧光定量 PCR(FQ-PCR)与传统病原学方法,评价 FQ-PCR 在肺结

核实验室诊断中的意义,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择2007年4月至2010年1月期间在我院感染科治疗的100例确诊的肺结核患者,诊断标准参照《全国结核病防治工作手册》(修订本):痰培养与痰涂片同时阳性,或根据临床表现、影像学、病理学检查、抗结核治疗有效和X线随访。另选同期100例排除肺结核的非结核性呼吸系统疾病患者作为特异性对照,其中肺癌33例,非结核性肺炎56例,其它11例。

1.2 仪器和试剂

DA7600型实时荧光定量PCR仪、结核分枝杆菌(TB)核酸扩增荧光检测试剂盒(含阳性、阴性质控对照)均由中山大学达安基因股份有限公司提供。BACTEC MGIT 960分枝杆菌快速培养系统(快速培养法)及配套试剂由美国BD公司提供。

1.3 方法

1.3.1 痰液标本采集与处理 所有患者在晨起漱口后,深咳出痰液3~5 mL置无菌密封瓶内。痰涂片法、离心浓集快速培养法的痰液标本处理参考《GB 15987-1995 传染性肺结核诊断标准及处理原则》。用于PCR的痰液标本处理参考试剂盒使用说明:根据痰标本的量,加入等量的1%胰蛋白酶悬液,混匀后静置消化25 min,吸取0.5 mL,经10 000 rpm离心5 min,留沉淀加入1 mL生理盐水混匀,重复离心洗涤2次,此消化痰液直接用于涂片和快速培养。DNA扩增模板获取:将上述洗涤后沉淀加50 μ L试剂盒DNA提取液混匀,煮沸10 min,静置6 h以充分裂解菌体。10 000 rpm离心5 min,取上清2 μ L作为模板,用于PCR扩增。

1.3.2 痰涂片法 直接涂片法参照《GB 15987-1995 传染性肺结核诊断标准及处理原则》,按标准化程序操作进行痰膜制作、抗酸染色和结果判定。

1.3.3 离心浓集快速培养法 将上述消化洗涤、离心处理的痰液,以灭菌刻度毛细管吸取0.5 mL接种于BACTEC MGIT 7H9培养管中,加入0.8 mL添加剂,置于BACTEC MGIT960培养仪内进行培养,用荧光强度记忆探测器每隔60 min连续测定培养管内荧光强度,判断管内结核杆菌的生长情况。

1.3.4 FQ-PCR检测 取上述提取的上清2 μ L作

为模板,参照试剂盒提供的反应条件进行DNA扩增,93 $^{\circ}$ C预变性2 min,93 $^{\circ}$ C 45 s,55 $^{\circ}$ C 60 s扩增10个循环,续以93 $^{\circ}$ C 45 s,55 $^{\circ}$ C 45 s扩增30个循环。同时设阳性和阴性质控品为对照,根据试剂盒说明书的判断标准分析结果。当PCR结果与涂片法或培养法不一致时,重复PCR1次。

1.4 统计学方法

数据采用SPSS 13.0软件分析,率的检验采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三种方法检测痰标本结核杆菌结果

分别用FQ-PCR、痰涂片法、快速培养法检测100例确诊的肺结核患者的痰标本。结果显示,FQ-PCR(55%,55/100)检测的阳性率显著高于痰菌培养法(43%,43/100)($P < 0.05$)和痰涂片法(29%,29/100)($P < 0.01$)。同样三种方法对100例非结核性呼吸道疾病患者检测作为对照,结果显示,FQ-PCR检出1例阳性,痰涂片法检出2例阳性,痰菌培养法未检测出阳性结果。

2.2 三种方法检测痰标本结核杆菌比较

以痰菌培养为标准,FQ-PCR与痰涂片法的敏感性、特异性、阳性预期值、阴性预期值分别为97.8%、93.5%、80.0%、99.3%(表1)。FQ-PCR与痰菌培养法的一致性为94.0%(188/200), $\kappa = 0.86$,两种方法具有良好的一致性。11例痰菌培养法阴性的标本符合临床诊断标准,经FQ-PCR扩增均为阳性。

表1 三种方法检测结果比较(例)

方法	痰菌培养法		敏感性	特异性	预期阳(阴)性率
	+	-			
FQ-PCR法	44	11	97.8%	93.5%	80.0%
	1	144			99.3%
痰涂片法	27	2	57.4%	98.7%	93.1%
	20	151			88.3%

3 讨论

结核杆菌人群感染率高,但大多为隐性感染,感染者大多在糖尿病、肿瘤、长期使用免疫抑制剂、艾滋病或营养不良等基础性疾病上发病。典型的肺结核临床表现为低热、乏力、消瘦、咳嗽和咯血等,但部

分患者常无明显症状或临床表现多样化,给肺结核的诊断带来困难。X 线胸片是诊断肺结核的常用方法和重要依据,但易于与其它肺部疾病混淆,造成误诊或漏诊。传统的病原学诊断常用痰直接涂片法和痰结核杆菌培养法。涂片法简单易行,但在含菌量低时或标本采集不正确时敏感性低,且在痰液中存在其它非结核性抗酸杆菌易致假阳性。培养法是检查结核杆菌的金标准,但因结核杆菌细胞壁脂质含量高影响其营养物质吸收导致生长速度缓慢,培养周期较长(一般需 2~8 周)。BACTEC MGIT 960 分枝杆菌快速培养系统是近年来美国 BD 公司研发的快速培养结核杆菌的培养系统,比改良罗氏培养基的培养速度快、检出率高,是目前公认的临床检测结核杆菌较好方法,但培养平均时间仍需 9 天左右^[5],不利于结核的早期快速诊断。

FQ-PCR 是近十几年来发展的检测新技术,能在数小时内将特异性目的基因片段扩增数百万倍,整个反应在单一管内进行,较常规 PCR 方法抗污染、结果判断客观且自动化^[6],因此具有快速、高度灵敏、特异、重复性好、自动化程度高、结果判断客观、可定量用于疗效判断等优点,在生命科学研究领域得到广泛应用,尤其适应于难以培养或不能培养的病原体检测和感染性疾病的判断疗效^[7,8],在结核杆菌的检测和结核病的疗效判定中也显示出其独特的优势^[9-10]。本研究显示,检测疑似肺结核的 100 例痰标本,FQ-PCR 检出率(55%)最高,与国内报道检出率基本一致^[11-12],快速培养法次之,痰直接涂片法最低。以培养法为标准,FQ-PCR 敏感性达 97.8%,FQ-PCR 1 例未能检出可能系标本中存在 Taq 酶活性抑制物或标本提取不佳所致;而 11 例快速培养法未能检出的标本经 FQ-PCR 重复扩增均为阳性,这些病例均符合影像学、免疫学和抗结核治疗有效的临床诊断标准,而且 FQ-PCR 与培养法的一致性达 94.0%,以上提示 FQ-PCR 具有良好的特异性和敏感性,可以作为快速培养法的有效补充,用于结核病的诊断。11 例 FQ-PCR 阳性而培养法阴性,可能系痰液中结核杆菌含量太低或被杂菌污染所致。47 例培养法阳性的标本,涂片法有 20 例未能检出,可能系标本含菌量低或与标本采集不正确有关,提示痰培养敏感性低,容易造成肺结核漏诊;2 例痰涂片阳性的结果经 FQ-PCR 与培养法检测均为阴性,可能痰涂片检出的是非结核性抗酸杆菌,提示涂片法特异性较低。

综上所述,本研究显示 FQ-PCR 方法诊断肺结核具有快速、灵敏、特异、简便、自动化程度高、结果判断客观、可定量等优点,但该方法不能进行药敏试验,不可替代培养法,可作为培养法的有效补充,用于结核病的早期快速诊断。

参考文献:

- [1] Dye C, Williams BG. The population dynamics and control of tuberculosis [J]. *Science*, 2010,328(5980):856-861.
- [2] Balasingham SV, Davidsen T, Szpinda I, et al. Molecular diagnostics in tuberculosis: basis and implications for therapy [J]. *Mol Diagn Ther*, 2009,13(3):137-151.
- [3] Laraque F, Griggs A, Slopen M, et al. Performance of nucleic acid amplification tests for diagnosis of tuberculosis in a large urban setting [J]. *Clin Infect Dis*, 2009,49(1):46-54.
- [4] 曹晓慧,张媛媛,万康林. PCR 技术在结核病诊断中的应用[J]. *中国人畜共患病杂志*,2005,21(12):1110-1121.
- [5] Zabaleta-Vanegas AP, Llerena-Polo C, Orjuela-Gamboa DL, et al. Evaluation of BACTEC™ MGIT™ 960 and the nitrate reductase assay in the National Laboratory Network of Colombia [J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2013,17(1):125-128.
- [6] Tortoli E, Urbano P, Marcelli F, et al. Is real-time PCR better than conventional PCR for Mycobacterium tuberculosis complex detection in clinical samples [J]. *J Clin Microbiol*,2012,50(8):2810-2813.
- [7] Maurin M. Real-time PCR as a diagnostic tool for bacterial diseases [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2012,12(7):731-754.
- [8] Fenollar F, Raoult D. Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganisms [J]. *APMIS*, 2004, 112(11-12):785-807.
- [9] Kim JH, Kim YJ, Ki CS, et al. Evaluation of Cobas TaqMan MTB PCR for Detection of Mycobacterium tuberculosis [J]. *J Clin Microbiol*, 2011,49(1):173-176.
- [10] Yang YC, Lu PL, Huang SC, et al. Evaluation of the Cobas Taq Man MTB test for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex in respiratory specimens [J]. *J Clin Microbiol*, 2011,49(3):797-801.
- [11] 陈红兵,周志红,贺润年,等. 荧光定量 PCR 技术在结核杆菌检测中的应用[J]. *实用医学杂志*,2008,24(21):3765-3767.
- [12] 方梅,陆巧荣,洪志强. 分子信标荧光定量 PCR 技术检测结核分枝杆菌方法建立及其临床应用[J]. *四川大学学报:医学版*,2010,41(1):162-165.