

• 论 著 •

3 种方法检测结核分枝杆菌的评价

刘俊峰, 苏丹, 冯素花, 邱耿娴

(广东省英德市人民医院检验科 513000)

摘要:目的 评价荧光定量基因扩增法(FQ-PCR 法)、胶体金法、痰涂片萋-纳氏抗酸染色法检测结核分枝杆菌情况,寻求结核分枝杆菌的快速、准确和特异性检测手段。**方法** 选择经临床确诊 96 例肺结核患者痰液,采用 3 种方法进行检测。以临床确诊结核组为“真阳性”,以对照组为“真阴性”,分别计算 3 种方法的灵敏度、特异度、符合率、正确诊断指数、阴性及阳性预测值。

结果 3 种方法检测结核分枝杆菌的阳性率分别为:FQ-PCR 法 42.7%, 胶体金法 48.9%, 痰涂片萋-纳氏抗酸染色法 12.5%, FQ-PCR 法联合胶体金法 66.7%。经 χ^2 检验, FQ-PCR 法、胶体金法对结核分枝杆菌的检出率优于痰涂片萋-纳氏抗酸染色法; FQ-PCR 法联合胶体金法对结核分枝杆菌的检出率优于单独采用 FQ-PCR 法、胶体金法的检出率; FQ-PCR 法具有高度灵敏性和特异性,结果的可信度优于其他两种方法,联合胶体金法诊断可在保持高灵敏性、高特异性的同时,进一步提高结核分枝杆菌检出率。**结论** 对早期诊断可获得较好治疗效果的肺结核患者应该选择灵敏度高的诊断方法, FQ-PCR 法联合胶体金法检测有一定优势。

关键词:分枝杆菌, 结核; 荧光定量基因扩增; 胶体金; 痰涂片萋-纳氏抗酸染色

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.10.017

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)10-1055-02

Evaluation of three detection methods of tubercle bacillus

Liu Junfeng, Su Dan, Feng Suhua, Qiu Gengxian

(Department of Clinical Laboratory, the People's Hospital of Yingde, Guangdong 513000, China)

Abstract: Objective To evaluate the clinical value of fluorescent quantitative PCR(FQ-PCR), colloidal gold, ziehl-neelsen acid-fast staining for the detection of tubercle bacillus(TB), to explore rapid, accurate and specific detection methods. **Methods** Sputum specimens from 96 patients with clinical definite pulmonary tuberculosis were enrolled and detected for TB by the three methods. χ^2 test was performed to compare the sensitivity, specificity, coincidence, correct diagnosis index, positive and negative predictive value of the three methods were calculated, taking the group of patients with clinical definite pulmonary tuberculosis as true positive group and the control group as true negative group. **Results** The positive rates of FQ-PCR, colloidal gold, ziehl-neelsen acid-fast staining and FQ-PCR combined with colloidal gold for the detection of TB were of 42.7%, 48.9%, 12.5% and 66.7%. Confirmed by χ^2 test, the TB detection rates of FQ-PCR and colloidal gold were higher than that of ziehl-neelsen acid-fast staining, that of FQ-PCR combined with colloidal gold was higher than that of FQ-PCR and colloidal gold. FQ-PCR was with higher sensitivity, specificity and reliability than the other two methods. The TB detection rate of FQ-PCR could be increased, maintaining high sensitivity and specificity, when being combined with colloidal gold. **Conclusion** Diagnostic method with high sensitivity should be performed for the patients with pulmonary tuberculosis to get effective therapy by acquiring early diagnosis. The combined detection of FQ-PCR and colloidal gold has certain advantages.

Key words: mycobacterium tuberculosis; fluorescent quantitative PCR; colloidal gold; sputum smear luxuriant-Nessler acid-fast staining

结核病是由结核分枝杆菌引起的慢性传染性疾病,可累及全身各个器官,其中尤以肺结核最为多见。近年来,全球结核发病率有回升趋势^[1]。痰中排菌的肺结核患者属传染性肺结核,是造成结核病传播和流行的传染源,为首要控制对象。对早期诊断可获得较好治疗效果的肺结核,荧光定量基因扩增法(FQ-PCR 法)联合胶体金法检测有一定优势,现将有关情况报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2007 年 6 月至 2010 年 12 月本院住院患者 96 例为结核组,全部患者根据临床症状、体征、影像学、细胞学、生化指标或抗结核治疗有效,确诊为肺结核患者。其中男 57 例,女 39 例;年龄 16~62 岁。选择同期呼吸道感染患者 85 例为对照组,其中男 49 例,女 36 例;年龄 14~63 岁。

1.2 标本收集与处理 取 2 份痰液标本,分别经 FQ-PCR 法、痰涂片萋-纳氏抗酸染色法检测,收集方法依据《结核病诊断实验室检验规程》,灭菌处理封闭样本盒留取痰标本^[2]。要求患

者晨起漱口,深咳出 1~2 口痰入样本盒,加盖送检;干酪性痰及脓性黏液痰为合格痰,唾液为不合格痰,样本应避免混入唾沫。血清标本 1 份,要求患者空腹抽取 2 mL 血液,离心取清胶体金法检测结核抗体。

1.3 仪器及试剂 荧光定量 PCR 扩增试剂由中山大学达安基因股份有限公司提供,国药准字为 S20063011,扩增仪为美国 ABI-7300 型定量 PCR 仪;痰涂片抗酸染色试剂由珠海贝索生物技术有限公司提供;胶体金法所采用试剂由上海奥普生物医药有限公司提供。

1.4 方法

1.4.1 FQ-PCR 法扩增 取患者晨痰,加入 4 倍体积的 4% NaOH,反复振摇,置室温 30 min,使之充分液化,按试剂说明预处理,扩增序列位于 IS6110 中 245 bp,扩增引物上游 5'-CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC-3';下游 5'-GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA-3',TB 探针 TGC TAC CCA CAG CCG GT-TAGG。循环条件:93 °C 2 min 预变性,然后按 93 °C

45 s, 55 °C 60 s, 先作 10 个循环, 最后按 93 °C 30 s, 55 °C 45 s, 作 30 个循环, 判定以 $C_t < 30$ 则实验结果为阳性。

1.4.2 痰涂片萋-纳氏抗酸染色法 挑选干酪性痰及脓性黏液痰, 于玻片均匀涂抹, 为提高检出率, 适当增加样本涂片厚度, 自然风干, 火焰固定, 萋-纳氏抗酸染色法按照《全国结核病诊断细菌学检验规程》染色镜检, 3 张涂片任意 2 张找到抗酸杆菌为阳性。

1.4.3 胶体金法 将结核分枝杆菌特异性膜蛋白抗原分离纯化, 点样固化在硝酸纤维素膜上, 捕获样本中结核分枝杆菌抗体, 检测为结核 IgG 抗体, 要求新鲜血清, 按试剂说明操作, 结果判断出现红色斑点为阳性。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 13.0 软件, 采用 χ^2 检验。

2 结 果

2.1 不同方法检测结核组与对照组阳性情况, 见表 1。

表 1 不同方法检查结核组与对照组阳性情况 [n(%)]

组别	FQ-PCR 法	萋-纳氏 抗酸染色法	胶体金法	FQ-PCR 法 联合胶体金法
结核组	41(42.7)	12(12.5)	47(48.9)	64(66.7)
对照组	0(0.0)	0(0.0)	9(10.6)	9(10.6)

结果显示, 在结核组中, FQ-PCR 法、胶体金法分别与痰涂片萋-纳氏抗酸染色法的 χ^2 分别为 21.9、29.9, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$), FQ-PCR 法、胶体金法检出率优于痰涂片萋-纳氏抗酸染色法; FQ-PCR 法联合胶体金法分别与 FQ-PCR 法、胶体金法比较, χ^2 分别为 11.1、6.17 ($P < 0.05$), FQ-PCR 法联合胶体金法检测能提高结核分枝杆菌的检出率; FQ-PCR 法与胶体金法比较, χ^2 为 0.76, ($P = 0.38$), 差异无统计学意义。

2.2 结核组、对照组各项指标检测情况, 见表 2。

表 2 结核组、对照组各项指标检测情况

指标	FQ-PCR	萋-纳氏 抗酸染色法	胶体金法	FQ-PCR 法 联合胶体金法
灵敏度	42.70	12.50	48.90	66.70
特异度	100.00	100.00	90.40	90.40
符合率	69.60	53.6	67.90	77.30
正确诊断指数	0.43	0.13	0.39	0.57
阳性预测值	100.00	100.00	83.90	87.60
阴性预测值	60.70	50.20	60.80	70.30

3 讨 论

结核病的实验室检查常见的有直接涂片找抗酸杆菌、培养、血清抗体检查及 PCR 法, 确诊需结合接触史、临床症状、影像学检查^[3]。传统方法痰涂片虽然简单、费用低, 但因其灵敏度低、阴性预测值低、漏诊率高。有研究报道, 痰涂片假阴性率可达 50%, 有很大的局限性, 经典的确诊肺结核的痰涂片法痰液内结核分枝杆菌 (5 000~10 000) 个/毫升才能检出, 肺结核的痰液含菌量一般约 10^6 ~ 10^7 个/毫升, PCR 法检测的数量级达 1~20 个/毫升结核分枝杆菌 A, FQ-PCR 法灵敏度高于抗酸染色^[4-5]。实验数据提示, 两者阳性率差异有统计学意义。临床一些经过治疗的患者, 结核分枝杆菌染色多变, 在感染标本中常能见到, 青霉素、环丝氨酸或溶菌酶诱导可影响细胞壁中肽聚糖的合成, 异烟肼影响结核分枝杆菌的合成, 其完全或

部分地失去抗酸性, 可变为抗酸染色阴性。巨噬细胞吞噬结核分枝杆菌后, 溶菌酶的作用也可破坏肽聚糖, 均可导致其变为 L 型。近年来, 国内外研究证明临床各种类型的肺结核患者中 40% 左右分离出 L 型, 结核分枝杆菌 L 型不引起结核的病理损害, 但可在体内长期存在, 并在一定条件下恢复成典型杆菌, 进而导致结核病的发生。结核分枝杆菌酸染色可呈假阴性结果, 由于 FQ-PCR 法检测结核分枝杆菌呈阳性, 也是 FQ-PCR 法各种评价指标优于抗酸染色的原因之一^[6]。

胶体金法检测为结核 IgG 抗体, 表示有既往感染史, 治疗一段时间后甚至 1~2 年, 血清结核抗体也呈阳性。其灵敏度与 FQ-PCR 法相比较, 经统计学处理, 不支持有差异。在对照组中, 有 9 例呼吸道感染患者出现阳性结果, 特异性较差, 只能作为诊断结核病的参考。另结核病患者免疫力低下或感染初期, 抗体水平低下也可呈假阴性结果, 对于结核抗体的检测, 有报道称不同试剂厂家采用的抗原及生产工艺不同, 检测结果也有较大的差别, 试剂之间符合率较差^[7-9]。

FQ-PCR 法是结核分枝杆菌灵敏度、特异度都比较高的方法, 由于荧光探针的应用, 还具有 DNA 杂交的高特异性和光谱技术的高精确性, 克服了常规 PCR 法的许多缺点。采用全封闭扩增, 也很大程度减少了原有 PCR 法易发生污染的问题, 检出率的影响因素在于痰标本的漏检率^[10]。口腔唾液是造成抗酸染色和 FQ-PCR 法检出率低的 1 个原因, 对于 FQ-PCR 法痰液的消化也是 1 个影响因素, 痰液中的黏蛋白是 FQ-PCR 法的关键酶 Taq 酶的抑制剂, 除去不充分, 可扩增失败呈假阴性^[11]。FQ-PCR 法联合胶体金法, 从实验数据可以看到阳性率从 42.7% 上升到 66.7%, 两者差异有统计学意义, 正确诊断指数、符合率也提高很多。对早期诊断可获得较好治疗效果的肺结核应该选择灵敏度高的诊断方法, FQ-PCR 法联合胶体金法检测有一定优势。

参 考 文 献

- [1] Yew WW, Leung CC. Update in tuberculosis 2007 [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2008, 177(5): 479.
- [2] 王更民, 赵德福, 王国治, 等. 结核病诊断实验室检验规程 [M]. 北京: 中国教育文化出版社, 2006: 9-16, 30-45.
- [3] 周为鸿. 结核诊断金标准探讨 [J]. 实验诊断与治疗杂志, 2006, 20(10): 741-742.
- [4] 韩敏, 乐军. 结核病诊断和耐药性检测新技术 [J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(3): 260.
- [5] 中国疾病预防控制中心. 痰涂片镜检质量保证手册 [M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2004: 5-18.
- [6] 马思蕊, 霍晓颖, 李云萍, 等. TB-DNA 扩增对结核菌 L 型感染临床和病理学对照研究 [J]. 陕西医学杂志, 2008, 37(9): 1229-1230.
- [7] 王国华, 陈坤, 宋晓国, 等. 基于结核分枝杆菌分泌抗原的新型结核诊断试剂研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2009, 24(4): 59-61.
- [8] 李琳芸. 血清结核分枝杆菌抗体检测对结核病的诊断价值探讨 [J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(12): 1217-1218.
- [9] 杨倩婷, 朱秀云, 单万水, 等. 结核酶联免疫斑点实验与抗结核抗体平行检测的比较 [J]. 国际检验医学杂志, 2009, 32(8): 895-899.
- [10] 黄克清, 黄文. 痰涂片检出结核杆菌的原因分析 [J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(9): 封 3.
- [11] 李金明. 实时荧光 PCR 技术 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2007: 70-72.