

• 论 著 •

实时荧光核酸恒温扩增检测技术在胸腔积液结核分枝杆菌检测中的应用

成松, 刘成永[△], 周冬青, 侯远沛

(江苏省徐州市传染病医院检验科, 江苏徐州 200433)

摘要:目的 评估采用实时荧光核酸恒温扩增检测技术(SAT)快速检测结核性胸膜炎患者胸腔积液中的结核分枝杆菌(MTB)的临床应用价值。方法 收集 90 例确诊结核性胸膜炎患者胸腔积液标本和 52 例非结核性胸膜炎患者胸腔积液标本,分别采用罗氏培养法、SAT 和 DNA 荧光定量扩增法检测 MTB,并通过与罗氏培养法比较,分析 SAT 的灵敏度、特异度及临床应用价值。结果 以罗氏培养法为标准,则 SAT 的灵敏度、特异度和约登指数分别为 90.9%、72.1%、0.630。在临床确诊的结核性胸膜炎患者中,罗氏培养法和 SAT 检测胸腔积液标本的阳性检出率分别为 24.4%、43.3%,差异有统计学意义($\chi^2=7.1663, P=0.0014$)。结论 SAT 检测胸腔积液标本中的 MTB,具有快速、灵敏度和特异度较高的优点,可提高胸腔积液标本中 MTB 的检出率并减少误诊和漏诊的发生。

关键词:胸膜炎; 结核分枝杆菌; 核酸扩增技术

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.18.033

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)18-2697-03

Application of real-time fluorescence isothermal RNA amplification assay in the determination of
Mycobacterium tuberculosis in pleural effusion

Cheng Song, Liu Chengyong[△], Zhou Dongqing, Hou Yuanpei

(Department of Clinical Laboratory, Xuzhou Infectious Diseases Hospital, Xuzhou, Jiangsu 200433, China)

Abstract: Objective To evaluate clinical value of utilization of real-time fluorescence isothermal RNA amplification assay (SAT) for detecting Mycobacterium tuberculosis (MTB) in pleural effusion samples of patients with tuberculous pleurisy. Methods 90 hydrothorax specimens of patients with tuberculous pleurisy and 52 hydrothorax specimens of patients with non-tuberculous pleurisy were selected, and MTB was detected by using Roche culturing method, SAT and TB DNA fluorescence quantitative expansion method respectively. The sensitivity, specificity and clinical value of SAT for detecting MTB were analysed. Results Taking Roche culturing method as the standard, the sensitivity, specificity and Youden index of SAT for detecting MTB were 90.9%, 72.1% and 0.630 respectively. In patients clinically diagnosed with tuberculous pleurisy, the positive detection rate of hydrothorax specimens detected by using Roche culturing method and SAT were 24.4% and 43.3% respectively, and had statistically significant differences ($\chi^2=7.1663, P=0.0014$). Conclusion SAT is a rapid, sensitive and specific method for the detection of MTB in pleural effusion samples, which could improve the detection rate of MTB and decrease incidence of missed diagnosis and misdiagnosis.

Key words: pleurisy; Mycobacterium tuberculosis; nucleic acid amplification techniques

结核性胸膜炎是常见的肺外结核病之一,是结核分枝杆菌(MTB)由近胸膜的原发病灶直接侵入胸膜,或经淋巴管血行播散至胸膜而引起的渗出性炎症,其诊断和鉴别诊断较为困难。目前结核性胸膜炎的诊断主要是通过临床表现、病史、影像学 and 胸腔积液常规检查及疗效观察,但诊断的准确度较差。然而,由于胸腔积液中 MTB 少,使用传统的涂片或培养方法,其阳性率低^[1]。此外,目前临床检测 MTB 所采用的涂片法和培养法存在特异度低或检测时间较长等缺点^[2],即使采用快速培养仪也需要 1~6 周^[3];胸膜病理学检测虽然特异度较高,但具有创伤性;而胸腔积液分子生物学检测的准确度也较低^[4-5];结核感染 T 淋巴细胞斑点试验(T-SPOT)只对检测阴性的患者有诊断价值;荧光定量聚合酶链反应(PCR)检出结果快速,但无法分辨死菌与活菌。以上方法都无法满足结核性胸膜炎快速检测的需求,而实时荧光核酸恒温扩增检测技术(SAT)具有与荧光定量 PCR 法相同的快速性,同时又能分辨死菌与活菌,其以 MTB 特异的 16S rRNA 为检测靶标,通过恒温 RNA 扩增技术扩增产物杂交后释放出荧光信号,对荧光信号进行实时检测,从而快速准确地判断待检标本中是否有 MTB

存在。本研究采用 SAT 法对结核性胸膜炎患者胸腔积液进行检测,并结合夹层杯离心集菌法、罗氏培养法及 DNA 荧光定量扩增法,评价该检测方法对胸腔积液 MTB 的检测效果,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2011 年 1 月至 2013 年 10 月徐州市传染病医院呼吸科、消化科、肿瘤科和中医科收治的胸腔积液患者 142 例,将其中 90 例结核性胸膜炎患者纳入观察组,男 54 例,女 36 例,男女比例 1.5:1.0,平均(44.7±16.7)岁,所有患者经改良罗氏培养结果均为阳性或病理学检查可见干酪肉芽肿伴抗酸杆菌阳性;将 52 例非结核性胸膜炎患者纳入对照组,男 32 例,女 20 例,男女比例 1.6:1.0,平均(46.9±15.1)岁,其中胸膜转移癌 15 例、淋巴瘤 10 例、恶性间皮瘤 2 例、肝硬化 15 例、诊断不明确和无病理学证据的胸腔积液 10 例,肿瘤和肝硬化患者均经病理学和细胞学证实。两组性别、年龄等一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究通过本院伦理委员会批准(批件号:2011 年 XC 审第 16 号),并取得患者的知情同意。

1.2 仪器与试剂 夹层杯离心集菌试剂和仪器购自湖南天驰公司;改良罗氏培养基购自贝索公司;9800 型实时荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司,试剂盒购自中山大学达安基因股份有限公司;rRNA 恒温扩增实时荧光检测试剂盒购自中国上海仁度生物科技有限公司(批号 20110901)。

1.3 方法 将 50 mL 胸腔积液标本分为 5 等分,分别用于夹层杯离心集菌法、罗氏培养法、DNA 荧光定量扩增法、SAT 法检测及复检备用。夹层杯离心集菌法、罗氏培养法及 DNA 荧光定量扩增法分别按照操作说明进行。MTB rRNA 恒温扩增实时荧光检测使用 SAT-TB 试剂盒。将待检标本 13 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 50 mL 裂解缓冲液,重悬后放入超声清洗器经超声处理 15 min,超声功率为 300 W。阳性对照和阴性对照与待检标本同步进行,阳性对照为活的 H37Ra 菌株,阴性对照为无菌水。其他步骤按照操作说明进行,使用仪器为金属浴和 9800 型实时荧光定量 PCR 仪。引物序列:5'-AAT TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA GTA GGC CGT CAC CCC ACC AAC AAG CTG-3'和 5'-CTG GGA AAC TGG GTC TAA TAC-3'。探针序列:5'-CCA GCC ACG GGA UGC AUG CUG G-3'。

1.4 统计学处理 采用 PEMS3.0 统计软件进行统计学分析,计数资料以例数或百分率表示,SAT 法与罗氏培养法等检测方法的阳性检出率比较采用 χ^2 检验;以罗氏培养法检测结果作为金标准,计算 SAT 法的灵敏度、特异度和约登指数; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组不同检测方法胸腔积液 MTB 阳性检出率 罗氏培养法与 SAT 法检测观察组患者胸腔积液的 MTB 阳性检出率比较差异有统计学意义($\chi^2 = 7.166 3, P = 0.001 4$),而 DNA 荧光定量扩增法与 SAT 法 MTB 阳性检出率比较差异无统计学意义($\chi^2 = 1.496 1, P = 0.221 3$)。见表 1。

表 1 两组不同检测方法胸腔积液 MTB 阳性检出率[n(%)]

组别	n	夹层杯离心集菌法	罗氏培养法	DNA 荧光定量扩增法	SAT 法
观察组	90	10(11.1)	22(24.4)	31(34.4)	39(43.3)*
对照组	52	0(0.0)	0(0.0)	1(1.9)	2(3.8)

*: $P < 0.05$ 与同组罗氏培养法比较。

2.2 SAT 法与 DNA 荧光定量扩增法的检验效能 以罗氏培养法为标准,SAT 法的灵敏度、特异度和约登指数分别为 90.9%、72.1%、0.630;DNA 荧光定量扩增法的灵敏度、特异度和约登指数分别为 77.3%、79.4%、0.567。见表 2。

表 2 SAT 法与 DNA 荧光定量扩增法的检验效能(n)

罗氏培养法	SAT 法			DNA 荧光定量扩增法		
	阳性	阴性	合计	阳性	阴性	合计
阳性	20	2	22	17	5	22
阴性	19	49	68	14	54	68
合计	39	51	90	31	59	90

2.3 3 种检测方法不相符标本分析 SAT 法检测阳性而罗氏培养法检测阴性的 19 例患者中,DNA 荧光定量扩增法检测阳

性 14 例;SAT 法检测阴性而罗氏培养法阳性的 2 例患者,经鉴定为非 MTB;SAT 法检测阳性而 DNA 荧光定量扩增法检测阴性的 8 例患者,其中 1 例夹层杯离心集菌法检测阳性,3 例罗氏培养法检测阳性;SAT 法检测阴性而 DNA 荧光定量扩增法检测阳性的 3 例患者,其中夹层杯离心集菌法检测阳性 1 例,罗氏培养法检测全为阴性。

3 讨论

结核病发病率在中国呈上升趋势,而结核性胸膜炎的发病率在肺外结核中仅次于淋巴结结核,涂片染色法和微生物培养法已不能满足结核病检查的临床需要。MTB 的 SAT 技术是以特异的 16S rRNA 为检测靶标,通过恒温 RNA 扩增术扩增靶标片段,荧光标记的探针与靶标片段的扩增产物杂交后释放出荧光信号,对荧光信号进行实时检测,由于 RNA 分子半衰期短,仅存在于有代谢活性的菌体中,实验证实 RNA 分子是 MTB 活菌的标志,从而快速准确地判断待检标本中是否有 MTB 存在。

胸腔积液中检测到 MTB 可作为诊断结核性胸腹膜炎的金标准,但长期以来胸腔积液中涂片抗酸染色阳性率极低,低于 10%^[6];而 MTB 培养所需时间较长,且阳性检出率小于 30%^[7],对临床早期诊断价值有限。防治结核病最重要的问题之一是早期发现,能够快速查出各类临床标本中的 MTB,以供临床医生及早做出正确诊断。

SAT 法是对胸腔积液标本进行 MTB 检测的一种敏感、特异、污染少、可动态定量的方法^[8],有利于临床对结核胸腹膜炎患者的动态观察和疗效观察,也有利于结核病的早日控制。与培养法相比,核酸扩增技术具有快速和灵敏度高的优势^[9]。MTB 核酸检测技术主要分为两类,一类是以 PCR 扩增为基础,检测靶标为 DNA 的核酸检测技术^[10];一类是以 RNA 扩增为基础,检测靶标为 RNA 的核酸检测技术^[11]。本研究通过采用 MTB 的 SAT 法,对胸腔积液及腹水标本进行检测,并对 SAT 法快速检测的效果进行评估。

本研究结果显示,观察组胸腔积液检测中罗氏培养法的 MTB 阳性率明显低于 SAT 法($P < 0.05$);而 DNA 荧光定量扩增法与 SAT 法检出阳性率比较差异无统计学意义($P > 0.05$),这也说明两种分子生物学法检测有良好的一致性^[12]。对照组中两种分子生物学法均检出患者胸腔积液中存在 MTB,后经临床证实此患者也同时感染了结核性胸膜炎,这也说明应用分子生物学的方法可以大大提高灵敏度,避免漏诊。以罗氏培养法为标准,SAT 法的灵敏度、特异度和约登指数分别为 90.9%、72.1%、0.630。通过对 SAT 法、罗氏培养法、DNA 荧光定量扩增法检测结果不相符情况的分析,也发现 SAT 法的灵敏度高于罗氏法,且非 MTB 不呈阳性反应;2 例罗氏培养阳性而 SAT 检测阴性,其罗氏培养物经其他方法检测结果证明为非 MTB,显示 SAT 检测较罗氏培养具有更高的 MTB 特异度。SAT 检测阴性而 DNA 荧光定量扩增法阳性 3 例,其中夹层杯离心集菌法阳性 1 例,罗氏培养法全为阴性,此 3 例患者均在入院前接受过正规抗结核药物治疗。由于 RNA 分子半衰期短,仅存在于有代谢活性的菌体中,实验证实 RNA 分子是 MTB 活菌的标志,经治疗有效后死亡的 MTB 不能排出 RNA,而 DNA 仍会阳性,这也为结核病的早期诊断和疗效观察提供了新思路。SAT 法阳性而 DNA 荧光定量扩增法阴性 8 例,显示 SAT 法反应过程有着更高的效(下转第 2701 页)

差异均有统计学意义($P < 0.05$),表明 SAA 对小儿 HFMD 的诊断效能更高。当 SAA 取最佳截断值 10.70 mg/L 时, SAA 的灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值分别为 86%、94%、91%、92%, 阳性似然比、阴性似然比分别为 15.43、0.16, 约登指数为 0.81, 表明 SAA 可作为较好的辅助诊断指标。但是, SAA 并非 HFMD 的特异性诊断指标, 不能够确认疾病病因, 只提示感染。

CRP 检测在很多医院已作为与血常规同时进行的检测指标, 而对病毒感染诊断更有价值的 SAA 目前尚未广泛开展。本研究用于检测 SAA 的快速定量试剂盒快速简便、成本较低, 能满足门诊实验室的需要, 对感染性疾病快速、高效的筛查起十分重要的作用。

综上所述, SAA 是与细菌和病毒感染密切相关的标志物, 其在判断 HFMD 上明显优于 CRP 和 WBC 计数等传统指标, 对小儿 HFMD 的早期诊断能提供较高的辅助诊断价值, 值得临床推广应用。

参考文献

[1] dos Anjos BL, Grotto HZ. Evaluation of C-reactive protein and serum amyloid A in the detection of inflammatory and infectious diseases in children[J]. Clin Chem Lab Med, 2010, 48(4): 493-499.
 [2] 陈长强, 顾志东, 樊绮诗. 血清淀粉样蛋白 A 在疾病应用中的研究进展[J]. 检验医学, 2012, 27(9): 776-779.
 [3] Hogarth MB, Gallimore R, Savage P. Acute phase proteins, C-reactive protein and serum amyloid A protein, as prognostic markers

in the elderly inpatient[J]. Age Ageing, 1997, 26(2): 153-158.
 [4] Fu Y, Chen J, Cai B, et al. The use of PCT, CRP, IL-6 and SAA in critically ill patients for an early distinction between candidemia and Gram positive/negative bacteremia[J]. J Infect, 2012, 64(4): 438-440.
 [5] Arnon S, Litmanovitz I, Regev RH, et al. Serum amyloid A: an early and accurate marker of neonatal early-onset sepsis[J]. J Perinatol, 2007, 27(5): 297-302.
 [6] Lannergård A, Larsson A, Kraggsbjerg P, et al. Correlations between serum amyloid A protein and C-reactive protein in infectious diseases[J]. Scand J Clin Lab Invest, 2003, 63(4): 267-272.
 [7] 杨红玲, 郑磊, 周才, 等. 胶体金渗滤法检测血清淀粉样蛋白 A 方法评价及其在儿童感染性疾病诊断中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2014, 37(11): 836-841.
 [8] 杨兰辉, 苏艳丹, 丁恒, 等. C-反应蛋白和淀粉样蛋白 A 在手足口病诊疗中的应用研究[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(22): 2838-2839.
 [9] Nakayama T, Sonoda S, Urano T, et al. Monitoring both serum amyloid Protein A and C-Reactive protein as inflammatory markers in infectious diseases[J]. Clin Chem, 1993, 39(2): 293-297.
 [10] Huttunen T, Teppo AM, Lupisan S, et al. Correlation between the severity of infectious diseases in children and the ratio of serum amyloid A protein and C-reactive protein[J]. Scand J Infect Dis, 2003, 35(8): 488-490.

(收稿日期: 2015-07-22)

(上接第 2698 页)

率, DNA 荧光定量扩增法可能由于提取 DNA 过程会造成假阴性, 也会由于抑制物的存在造成假阴性^[13]。

SAT 法检测胸腔积液的前处理过程与罗氏培养法基本相似, 菌体裂解过程仅需 15 min, 超声裂解过程仅需 1 h, 操作简便、快速, 采用 42 °C 扩增, 起始靶标和扩增产物都是 RNA, 可直接检测活菌, 突出了活菌的价值和临床意义。而且由于自然条件下, RNA 很容易降解, 能方便地解决污染问题。

综上所述, SAT 法检测胸腔积液标本中 MTB 的特异度、灵敏度高, 污染率低, 检测时间较短, 且在一般实验室用常规配备的实时定量 PCR 仪即可进行检测, 该方法是一种较有前景的实验室诊断方法^[14]。

参考文献

[1] 中国防痨协会. 结核病诊断细菌学检验规程[J]. 中国防痨杂志, 1996, 18(1): 28-31.
 [2] 中国防痨协会基础专业委员会. 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: 36.
 [3] Rishi S, Sinha P, Malhotra B, et al. A comparative study for the detection of Mycobacteria by BACTEC MGIT 960, Lowenstein Jensen media and direct AFB smear examination[J]. Indian J Med Microbiol, 2007, 25(4): 383-386.
 [4] Escudero Bueno C, Garcia Clemente M, Cuesta Castro B, et al. Cytologic and bacteriologic analysis of fluid and pleural biopsy specimens with Cope's needle. Study of 414 patients[J]. Arch Intern Med, 1900, 150(6): 1190-1194.
 [5] Valdés L, Alvarez D, San José E, et al. Tuberculous pleurisy: a study of 254 patients[J]. Arch Intern Med, 1998, 158(18): 2017-

2021.
 [6] Kim HJ, Lee HJ, Kwon SY, et al. The prevalence of pulmonary parenchymal tuberculosis in patients with tuberculous pleuritis[J]. Chest, 2006, 129(5): 1253-1258.
 [7] Liang QL, Shi HZ, Wang K, et al. Diagnostic accuracy of adenosine deaminase in tuberculous pleurisy: a meta-analysis[J]. Respir Med, 2008, 102(5): 744-754.
 [8] 徐宁. 痰中结核杆菌的检测方法及临床意义[J]. 临床肺科杂志, 2009, 14(4): 536.
 [9] Greco S, Girardi E, Navarra A, et al. Current evidence on diagnostic accuracy of commercially based nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis[J]. Thorax, 2006, 61(9): 783-790.
 [10] Yang YC, Lu PL, Huang SC, et al. Evaluation of the Cobas TaqMan MTB test for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex in respiratory specimens[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(3): 797-801.
 [11] 夏辉, 尚美, 刘冠, 等. rRNA 扩增方法对结核分枝杆菌临床诊断作用的评估[J]. 中国防痨杂志, 2010, 32(9): 576-580.
 [12] 王永忠, 张宏宇, 刘小琴, 等. 痰液标本结核分支杆菌 RNA 恒温扩增检测及临床应用[J]. 山东医药, 2011, 51(41): 83-84.
 [13] 付晓燕, 王学军, 刘石泉, 等. 结核分枝杆菌诊断技术研究进展[J]. 生物技术通讯, 2009, 20(2): 249-252.
 [14] 倪丽丽, 罗柳林, 景玲杰, 等. 恒温扩增实时荧光检测技术在肺结核诊断中的临床价值[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(8): 702-705.

(收稿日期: 2015-07-08)