

· 论著 ·

# 实时荧光核酸恒温放大检测(SAT)法 对肺结核诊断价值的研究

沙巍 何娅 蒋瑞华 方勇 景玲杰 韩敏 肖和平

**【摘要】** 目的 检测实时荧光核酸恒温放大检测(SAT)法对结核病诊断的作用。方法 收集 172 例疑似肺结核患者的痰液标本 2 份/例, 1 份进行涂片金-胺染色, 另一份进行罗氏培养基培养与菌种鉴定及 SAT 法检测结核分枝杆菌, 如 SAT 法和培养结果不符合则使用痰荧光定量 PCR 法(FQ-PCR)进行复核。结果 172 例入组患者中有 156 例根据临床及实验室结果确诊为肺结核病。如果以 Mtb 培养鉴定结果和荧光 PCR 结果作为判定金标准, SAT 检测的敏感度和特异度分别为 97.8%(89/91)和 97.5%(79/81)。如以临床诊断为标准, SAT 诊断结核的敏感度为 58.3%(91/156), 特异度为 100.0%(16/16)。对于痰菌阳性肺结核患者, SAT 阳性率为 84.9%(79/93); 对于痰菌阴性患者, SAT 的阳性率为 19.0%(12/63)。结论 SAT 法可以作为临床对结核病的辅助诊断方法。

**【关键词】** 结核, 肺/诊断; 核酸扩增技术; 分子诊断技术

**Diagnostic value of simultaneous amplification and testing in patients with pulmonary tuberculosis** SHA Wei, HE Ya, JIANG Rui-hua, FANG Yong, JING Ling-jie, HAN Min, XIAO He-ping. Department of Tuberculosis, Shanghai Key Laboratory of Tuberculosis, Shanghai Pulmonary Hospital, Tongji University, Shanghai 200433, China  
Corresponding author: XIAO He-ping, Email: xiaoheping\_sars@163.com

**【Abstract】 Objective** To evaluate the value of simultaneous amplification and testing(SAT) in diagnosis of patients with pulmonary tuberculosis. **Methods** Sputum smear, culture with species identification, and TB-SAT were studied in 172 patients with suspected pulmonary tuberculosis. The samples, which had inconsistent results between culture and SAT, should be rechecked with fluorescent quantitative PCR(FQ-PCR). **Results** 156 patients were clinically diagnosed with pulmonary tuberculosis. If taking the culture plus FQ-PCR as the gold standard, the sensitivity and specificity of TB-SAT were 97.8%(89/91) and 97.5%(79/81), respectively. However, the sensitivity and specificity of TB-SAT were 58.3%(91/156) and 100.0%(16/16) with the clinical diagnosis as standard. The positive rates of TB-SAT were 84.9%(79/93) for sputum positive patients and 19.0%(12/63) for sputum negative patients. **Conclusion** TB-SAT is an effective method for diagnosis of patients with pulmonary tuberculosis.

**【Key words】** Tuberculosis, pulmonary/diagnosis; Nucleic acid amplification techniques; Molecular diagnostic techniques

痰标本培养出 Mtb 是肺结核诊断的“金标准”, 但是固体培养与菌种鉴定需要 6~8 周的时间, 即便使用 BACTEC 960 技术, 也需要 3~6 周, 往往会延误诊治。分子生物学技术进行核酸检测以其高灵敏度、快速等优点而广泛应用于临床, 因而将其作为对结核病的辅助诊断手段之一。传统的分子生物学方法为扩增 Mtb 特异性的 DNA 片段并进行探针杂交或进行荧光定量检测, 目前以 Mtb 的 RNA 为靶进行恒温扩增的技术[如环介导恒温扩增法

(LAMP)<sup>[1]</sup>和实时荧光核酸恒温放大技术(simultaneous amplification and testing, SAT)]因简化了扩增和检测方法而受到关注。笔者采用 SAT 技术对疑似结核患者的痰标本进行检测, 并与传统分枝杆菌培养和鉴定法及 FQ-PCR 法作为对照。

## 材料和方法

1. 主要试剂: Mtb 核酸检测试剂盒(RNA 恒温扩增)(批号: 20100501, 商品名 TB-SAT)由上海仁度生物科技有限公司生产; Mtb 荧光 PCR 诊断试剂盒由深圳凯杰生物工程有限公司生产[称为“结核分枝杆菌核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法)"]。

2. 标本来源: 2010 年 4 月至 6 月在上海市肺科医院结核科住院治疗的疑似肺结核患者的痰液标本

作者单位: 200433 同济大学附属上海市肺科医院结核科 上海市结核病重点实验室

通讯作者: 肖和平, Email: xiaoheping\_sars@163.com

共 172 例, 每例患者在同一天晨起后留痰液 2 份。其中男 123 例, 女 49 例; 年龄最小 13 岁, 最大 91 岁, 平均年龄(43.1+18.8)岁。

3. 标本采集: 患者晨起立即用清水漱口后, 咯出痰液, 量约 5 ml。根据我国《结核病诊断细菌学检验规程》<sup>[2]</sup> 进行处理, 并将标本分为 3 份, 一份在改良罗氏培养基上培养, 一份进行 TB-SAT 检测, 一份作为 FQ-PCR 待测标本在 -20℃ 进行保存。然后患者另留痰进行金-胺荧光染色。所有患者标本均进行荧光染色、固体培养基培养和 SAT 检测, 固体培养结果为阳性者进行菌种鉴定。如 TB-SAT 和培养结果不符合则使用 FQ-PCR 检测进行复核。

4. 肺结核病诊断: 根据《肺结核诊断和治疗指南》<sup>[3]</sup> 对被检查者进行是否患肺结核进行诊断。

5. TB-SAT 法: 根据试剂盒说明书进行操作, 将预处理的样本按 1:100 的比例用 TB 稀释液进行稀释, 放入超声波清洗器中进行超声处理 15 min, 超声功率为 300 W。超声结束后, 取 2 μl 处理物加入 30 μl 扩增检测液中, 开启恒温荧光检测仪器, 按仪器操作手册设定反应程序, 荧光素通道设定为 FAM (6-羧基荧光素) 42℃ 1 min, 40 个循环; 荧光信号收集每分钟进行一次, 共检测 40 次。反应结束后置于恒温混匀仪上 42℃ 保温 5 min; 同时将 SAT 酶液也预热到 42℃ 加入反应管, 快速转至恒温荧光检测仪上进行检测。

6. FQ-PCR: 根据试剂盒说明书进行操作, 将预处理标本离心处理后, 弃上清, 加入 DNA 提取液提取样本 DNA, 加入 TB-PCR 反应液、Taq 酶及尿嘧啶-N-糖基化酶(UNG), 置于荧光 PCR 检测仪上进行扩增。扩增条件为: 37℃, 5 min; 94℃, 1 min; 95℃, 5 s; 60℃, 30 s; 40 个循环。

7. 统计学方法: 计算 SAT 检测痰样本的灵敏度及特异度。统计学分析采用 SPSS 13.0 软件, 采用  $\chi^2$  检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

### 一、入组患者情况

共入组患者 172 例, 其中 156 例最终诊断为肺结核, 其中痰涂片金-胺染色阳性 74 例, 培养阳性并鉴定为 Mtb 感染者 71 例。其余 16 例中有 2 例为非结核分枝杆菌病, 1 例隐球菌肺病, 3 例支气管扩张, 1 例肺癌, 其余 9 例为支气管肺炎。

二、172 例患者 TB-SAT 检测与 Mtb 培养鉴定结果的比较

见表 1。

表 1 TB-SAT 检测与 Mtb 培养鉴定结果的比较(例)

比较项目及结果	培养鉴定阳性	培养鉴定阴性	合计
TB-SAT 检测阳性	67	24	91
TB-SAT 检测阴性	4	77	81
合计	71	101	172

### 三、TB-SAT 与培养+荧光 PCR 检测结果的比较

TB-SAT 检测的结果如果与培养鉴定的结果不一致, 即行荧光 PCR 复检。如果以 Mtb 培养鉴定结果和 PCR 检测结果作为判定金标准(培养阴性而 SAT 检测阳性的差异样本以 PCR 检测结果为准)(表 2), TB-SAT 检测的敏感度和特异度分别为 97.8% 和 97.5%。

表 2 TB-SAT 检测与 Mtb 培养与荧光 PCR 检测结果的比较(例)

比较项目及结果	培养+PCR 阳性	培养+PCR 阴性	合计
TB-SAT 阳性	89	2	91
TB-SAT 阴性	2	79	81
合计	91	81	172

### 四、TB-SAT 检测对肺结核患者的诊断价值

1. SAT 检测 172 例患者的结果: 见表 3。

表 3 TB-SAT 检测与 Mtb 培养的结果比较(例)

比较项目及结果	Mtb 培养结果		合计
	结核病	非结核病	
TB-SAT 阳性	91	0	91
TB-SAT 阴性	65	16	81
合计	156	16	172

从表 3 可见, TB-SAT 检测诊断结核病的敏感度为 58.3%。在非结核患者中, TB-SAT 检测无一例为阳性, 因此其特异度为 100.0%。

2. TB-SAT 检测结果与痰涂片与培养结果的对比: 在 156 例结核病患者中, TB-SAT 检测的阳性率为 58.3% (91/156), 高于痰涂片阳性率 (47.4%, 74/156), 但差异没有统计学意义 ( $\chi^2 = 3.72, P = 0.054$ )。但与痰培养阳性率 (45.5%, 71/156) 比较, 差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 5.14, P = 0.023$ )。

3. TB-SAT 检测在不同肺结核病患者中的检测结果: 见表 4 所示。

表 4 不同类型肺结核病患者 TB-SAT 检测阳性率

患者类型	例数	TB-SAT 检测阳性例数	阳性率 (%)
痰涂片阳性	74	63	85.1
痰涂片阴性	82	28	34.1
痰培养阳性	71	67	94.4
痰培养阴性	85	24	28.2
痰菌阳性	93	79	84.9
痰菌阴性	63	12	19.0

## 讨 论

SAT 方法是基于 TMA (transcription mediated amplification)<sup>[4-5]</sup> 恒温扩增技术发展起来的一项新的核酸检测技术。其原理是通过设计特异性的 Mtb 核糖体 RNA 扩增引物及优化探针 (optimal probe, patent pending) 技术, 使用 M-MLV 反转录酶及极高转录活性的 T7 RNA 多聚酶来同时实现核酸恒温扩增和仪器实时荧光检测, 能够快速、直观地反映样本中 Mtb 的感染情况。与传统的基于 DNA 为模板的核酸扩增技术相比, 其优点在于: (1) 恒温扩增一方面可以降低对仪器的要求, 另一方面亦使得操作简便化, 提高检测稳定性和结果准确性。(2) 起始靶标为 RNA, 由于 RNA 在环境中极易降解, 可有效避免污染。(3) 由于 Mtb 死亡后 RNA 便降解, 因此 RNA 只在活菌中存在, SAT 法尚可作为疾病活动性及用药之后疗效的监测, 以及判断治愈与否的辅助诊断方法<sup>[6]</sup>。(4) 在扩增的过程中采用了荧光标记的 RNA 探针, 可同步检测扩增信号。

本研究中, TB-SAT 试剂盒对于结核病诊断的总灵敏度为 58.3%, 特异度为 100.0%。其灵敏度与既往文献中荧光定量 PCR 检测对结核病诊断的灵敏度相近<sup>[7-8]</sup>; 其特异度达到了 100.0%, 其特异度高的原因可能是由于该检测的是 RNA, 操作中污染的可能减少, 假阳性较少; 亦不排除是由于本研究的选例范围是在结核科住院治疗的疑似肺结核的患者, 而最终确诊为肺结核的患者占多数, 仅有 16 例为非肺结核, 研究中阴性病例样本量较少的原因所致。在非结核病中有 2 例是涂片和培养均为阳性但菌种鉴定为非结核分枝杆菌的患者, 其 SAT 结果为阴性, 故此方法在快速鉴别非结核分枝杆菌和 Mtb 时可能具有一定的辅助诊断作用, 但需扩大样本进一步进行研究。本研究还发现, TB-SAT 法对于痰菌阳性患者的阳性率为 85.1%, 亦与既往的荧光定量 PCR 结果相近<sup>[7-8]</sup>。但从痰菌阳性患者来看, 有 16 例患者是痰涂片阳性而培养阴性者, 即痰涂片阳性可能为死菌所致, 因此 TB-SAT 的阳性率并不是很高, 但在痰培养阳性患者中 TB-SAT 的阳性率就达到了 94.3%, 这亦部分证明了此方法可以排除样

本中由于死菌的存在而导致的假阳性。TB-SAT 法对于痰菌阴性患者阳性率为 19.0%, 说明对于痰菌阴性患者仍可使用此方法检测出样本中 Mtb-RNA 的存在, 但是总体来说 TB-SAT 法对痰菌阴性患者的敏感度仍较低, 这也是目前分子生物学检测试剂盒只能作为临床辅助诊断的原因之一, 亦是将来改进试剂盒的方向。

TB-SAT 试剂盒是我国自行研制的具有自主知识产权的试剂盒, 它的方法与 LAMP 类似, 只是所用于检测的化学基团不同。用于检测泌尿生殖道淋球菌感染的 SAT 试剂盒已上市, 其灵敏度和特异度都非常高<sup>[6]</sup>。

综上所述 TB-SAT 试剂盒对于结核病诊断的特异度较高, 灵敏度和既往以 DNA 为模板的荧光 PCR 相类似, 可以作为临床结核病诊断的辅助方法。基于其是以 RNA 为模板, 即检测是否存在活菌的特性, 此方法尚可用于结核活动性或疗效评价的指标, 但尚需进一步的临床试验证实。

## 参 考 文 献

- [1] Pandey BD, Poudel A, Yoda T, et al. Development of an in-house loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and evaluation in sputum samples of Nepalese patients. *J Med Microbiol*, 2008, 57(Pt 4): 439-443.
- [2] 中国防痨协会. 结核病诊断细菌学检验规程. *中国防痨杂志*, 1996, 18(1): 28-31.
- [3] 中华医学会结核病学分会. 肺结核诊断和治疗指南. *中华结核和呼吸杂志*, 2001, 24(2): 70-74.
- [4] Hill CS. Molecular diagnostic testing for infectious diseases using TMA technology. *Expert Rev Mol Diagn*, 2001, 1(4): 445-455.
- [5] Bradley SP, Reed SL, Catanzaro A. Clinical efficacy of the amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996, 153(5): 1606-1610.
- [6] 张津萍, 龚匡隆, 尤永燕, 等. 实时荧光核酸恒温扩增法检测泌尿生殖道淋球菌感染. *国际皮肤性病学期刊*, 2010, 36(3): 137-139.
- [7] 张青, 肖和平, 董伟贤. 荧光双标记定量结核杆菌在肺结核诊断中的应用价值. *临床肺科杂志*, 2004, 9(1): 16-17.
- [8] 郭小薇. 3 种方法检测结核分枝杆菌的比较. *重庆医学*, 2005, 34(10): 1506-1511.

(收稿日期: 2012-11-24)

(本文编辑: 薛爱华)