

恒温扩增实时荧光检测技术在肺结核诊断中的临床价值

倪丽丽 罗柳林 景玲杰 张军 陈晋

【摘要】 目的 评估 RNA 恒温扩增实时荧光检测技术(SAT)在临床痰液标本结核分枝杆菌检测中的价值。方法 对 2011 年 9 至 12 月上海市肺科医院 230 例临床确诊肺结核患者和 78 例其他呼吸系统疾病患者的痰液分别用 SAT 法、BD960 培养法、罗氏培养法和集菌涂片法同时进行检测。SAT 法与 BD960 培养法结果不符标本,再用结核分枝杆菌核酸扩增荧光体外检测试剂盒(PCR-TB)进行检测,同时对 BD960 培养阳性菌株和 SAT 扩增产物进行扩增及测序,对菌种进行鉴定。采用 χ^2 检验比较 SAT 法与上述 3 种方法对结核患者的阳性检出率。结果 以 BD960 培养法作为金标准(剔除 BD960 培养法中有 7 份污染菌),则 SAT 方法的敏感度为 90.5% (95/105),特异度为 84.2% (165/196),阳性预测值为 75.4% (95/126),阴性预测值为 94.3% (165/175)。SAT 法与 BD960 培养法结果符合率为 86.4% (260/301)。223 份临床确诊的肺结核患者痰标本 SAT 法、BD960 培养法、罗氏培养法和涂片法的阳性检出率分别为 56.5% (126/223)、45.7% (102/223)、41.7% (93/223) 和 37.2% (83/223),SAT 法显著高于其他 3 种方法,差异有统计学意义($\chi^2 = 4.087, P < 0.05$)。结论 SAT 技术用于结核分枝杆菌实验室诊断具有特异度高、敏感度好,操作简便、快速,污染率低的特点,有望成为实验室诊断的新方法。(中华检验医学杂志, 2012, 35:702-705)

【关键词】 分枝杆菌,结核; 核酸扩增技术; 结核,肺

Evaluation of the simultaneous amplification and testing for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*
NI Li-li, LUO Liu-lin, JING Ling-jie, ZHANG Jun, CHEN Jin. Department of Clinical Laboratory, Shanghai Pulmonary Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 200433, China
Corresponding author: CHEN Jin, Email: chenjindor@gmail.com

【Abstract】 Objective To evaluate the clinical value of the isothermal RNA amplification assay (SAT) for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples. Methods Sputum specimens from 230 patients with diagnosed tuberculosis and 78 cases of other respiratory diseases during September to December 2011 were detected using SAT, BD960 culture, Lowenstein-Jensen (L-J) culture and concentrated smear simultaneously. The samples with different results between SAT and BD960 culture were tested by *Mycobacterium tuberculosis* PCR fluorescence diagnosis kits. Strains were identified by amplification and sequencing the BD960 culture-positive isolates and SAT amplification products. Positive detection rate of SAT and other three methods for patients with tuberculosis were compared by chi-square test. Results Using the results of BD960 culture as the golden standard (7 cases of pollution bacteria in BD960 culture was rejected), the sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value of SAT was 90.5% (95/105), 84.2% (165/196), 75.4% (95/126), 94.3% (165/175), respectively. The agreement rate of SAT and BD960 culture was 86.4% (260/301). For 223 tuberculosis patients, the positive detection rate of SAT, BD960 culture, L-J culture and concentrated smear was 56.5% (126/223), 45.7% (102/223), 41.7% (93/223) and 37.2% (83/223) respectively. The positive detection rate of SAT is significantly higher than the other three methods ($\chi^2 = 4.087, P < 0.05$). Conclusion SAT, as a new technology for laboratory diagnosis of TB, has high specificity and sensitivity. The operation is fast and simple, and the pollution rate is low. It is a promising laboratory diagnosis method. (Chin J Lab Med, 2012, 35:702-705)

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; Nucleic acid amplification techniques; Tuberculosis, pulmonary

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2012.08.011

作者单位:200433 同济大学附属上海肺科医院检验科

通信作者:陈晋,电子邮箱:chenjindor@gmail.com

结核病在全球的广泛流行,严重危害着人类的健康,成为全球重大的公共卫生问题和社会问题。中国是全球结核病高发的国家之一,2010年全国第5次结核病流行病学调查显示,我国活动性肺结核患病率为459/100 000,其中传染性肺结核患病率为66/100 000^[1]。目前临床上常用方法为结核菌集菌涂片法、BD培养法、罗氏培养法,但是上述3种方法各有其自身的优缺点。直接涂片法适合于各类标本,操作简便、快速,价格低廉,适合于在各级实验室开展,但其敏感度低,通常每毫升含5000~10 000条以上抗酸染色才可得到阳性结果;特异度也较差,不能区分结核和非结核分枝杆菌,且镜下只能观察菌体形态,不能辨别是否活菌。培养法是结核病诊断的金标准,但由于检测时间需1~2个月,快速培养法虽然比传统的罗氏培养法缩短了很多^[2],仍需平均18 d,远远不能达到结核病早期诊断的要求。阴性确认仍需6周,且只能诊断分枝杆菌病,菌种无法确定。本研究采用RNA恒温扩增实时检测(simultaneous amplification and testing, SAT)新技术检测临床痰液中的结核分枝杆菌,并对结果进行统计学分析,探讨SAT对结核病的临床诊断价值。

对象与方法

一、对象

1. 肺结核组:上海市肺科医院2011年9月至12月住院的临床肺结核患者230例,其中男108例,女122例;年龄20~78岁,平均(45±12)岁;结核病的诊断标准参照文献[3]。

2. 对照组:上海市肺科医院2011年9月住院的肺部其他疾病患者78例,其中男42例,女36例;年龄28~71岁,平均(41±15)岁;37例为肺部肿瘤患者,41例为其他呼吸系统疾病,包括肺部炎症、支气管扩张、慢性阻塞性肺疾病以及结节病等。本研究经上海市肺科医院伦理委员会批准,所有患者均签署知情同意书。

二、方法

1. 试剂与仪器:改良罗氏培养基为上海市肺科医院检验科自制,制备方法参照文献[2];300 W水浴超声仪,罗氏Lightcycler 480仪,SAT试剂盒(批号为:20110901)购自中国上海仁度生物科技有限公司;Bactec MGIT 960分析仪,Bactec MGIT试剂盒(批号为:20110623)购自碧迪医疗器械上海有限公司;结核分枝杆菌核酸扩增PCR荧光体外试剂盒(以下简称:PCR-TB,批号为:20110802)购自凯杰生

物工程有限公司。

2. 测序验证:所有BD960培养法和SAT法检测结果不一致的标本均进行PCR-TB检测,同时培养阳性菌株根据参考文献[4]的方法进行16sRNA扩增及测序,进行菌种鉴定;对SAT法阳性标本,将SAT-TB扩增产物纯化后以5'-AATTTAATACGACTC ACTAT-3'和5'-CTGGGAAACTGGGTCTAATAG-3'为引物扩增后测序。

3. 操作过程:将10 ml痰标本加入到50 ml无菌塑料离心管内,加入等体积的NALC-NaOH溶液消化处理20 min,607 × g离心15 min,保留沉淀,10 ml生理盐水洗涤1次,以2 ml生理盐水重悬沉淀。然后分为5等分,分别用于荧光镜检、SAT法、BD960培养法、罗氏培养法和备用。如同一份标本发现BD培养法与SAT法结果不一致时,则用PCR-TB法对备份样品进行检测。

4. 标本处理:将待测标本11 400 × g离心5 min,弃上清,加入50 μl结核分枝杆菌核酸提取液重悬后,超声处理15 min,11 400 × g离心10 min备用。阳性对照为活的H₃₇Ra,阴性对照为无菌水,同标本处理方法一致。

5. 扩增检测:取2 μl处理物加入30 μl扩增检测液,引物浓度和探针浓度0.5 mmol/L。引物序列为5'-AATTTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTAGG CCGTCACCCACCAACAAGCTG-3'和5'-CTGGGAAA CTGGGTCTAATAC-3',探针序列为5'-CCAGCCACGG GAUGCAUGCUGG-3'。置Roche 480荧光检测仪立即检测。

6. 结果判断:样本曲线与阈值曲线交叉点的横坐标读数(检测时间)为dt,若dt≤35 min为阳性;dt>40 min为阴性;在35~40 min之间的样本建议重新检测,以复测值为准。

7. 统计学方法:采用SPSS 13.0统计软件进行统计学分析。以BD960培养法结果作为金标准,计算SAT法的敏感度、特异度、阳性预测值、阴性预测值。SAT法和BD960培养法、罗氏培养法和集菌涂片法的阳性检出率比较采用为 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、SAT法的敏感度与特异度

对230份临床肺结核患者痰液标本用4种方法同步检测,以BD960培养法作为金标准。剔除BD960培养法中有7份污染菌,则SAT法的敏感度

为 90.5% (95/105), 特异度为 84.2% (165/196), 阳性预测值为 75.4% (95/126), 阴性预测值为 94.3% (165/175); 以临床诊断作为金标准, 则 SAT 法的敏感度为 56.5% (126/223), 特异度为 100% (78/78), 阳性预测值为 100% (126/126), 阴性预测值为 44.6% (78/175), 见表 1。

表 1 SAT 法与 BD960 培养法和临床诊断结果对比(例)

组别	SAT 法	BD960 培养法		临床诊断	
		+	-	+	-
结核组	+	95	31	126	0
	-	7	90	0	97
对照组	+	0	0	0	0
	-	3	75	0	78

二、4 种检测方法的比较

在临床确诊肺结核患者痰标本中 SAT 法、BD960 培养法、罗氏培养法和集菌涂片法的阳性检出率分别为 56.5% (126/223)、45.7% (102/223)、41.7% (93/223) 和 37.2% (83/223), SAT 法显著高于其他 3 种方法, 差异具有统计学意义 ($\chi^2 = 4.087, P < 0.05$), 见表 2。

表 2 4 种检测方法对 223 例肺结核患者的阳性检出率及检测时间的比较

检测方法	例数	阳性例数	患者百分比	检测时间	能否判断活菌	能否区分结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌
SAT 法	223	126	56.5	40 min	能	能
BD960 培养法	223	102	45.7	2~6 周	能	不能
罗氏培养法	223	93	41.7	2~8 周	能	不能
集菌涂片法	223	83	37.2	2 h	不能	不能

三、PCR-TB 法检验结果

BD960 培养法与 SAT 法结果不符有 43 份, 用 PCR-TB 法进行结核分枝杆菌 DNA 检测, 同时采用 16sRNA 扩增测序进行菌种鉴定, 鉴别结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌, 见表 3。

讨 论

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结核分枝杆菌, 以供临床医生及早做出正确诊断, 一直是结核病研究领域需要持续改进的重要课题。与培养法相比, 核酸

表 3 BD960 培养法与 SAT 法不符的标本检测结果

组别	例数	SAT 法	BD 960 法	PCR-TB 法	测序结果	
					BD960 法	SAT 法
结核组	2	-	+	+	MTB	未测
	7	-	+	-	NTM	未测
	26	+	-	+	未测	MTB
	1	-	-	+	未测	未测
	2	-	-	-	未测	未测
	2	+	-	-	未测	MTB
对照组	3	-	+	-	NTM	未测

注: NTM: 非结核分枝杆菌; MTB 结核分枝杆菌; SAT 法: RNA 恒温扩增实时荧光检测技术; PCR-TB: 核酸扩增 PCR 荧光体外检测法; +: 检测结果阳性; -: 检测结果阴性; 测序结果中, BD960 法采用菌株测序, SAT 法采用扩增产物测序

扩增技术具有快速和敏感度高的优势^[5-11]。目前国内已商品化的结核分枝杆菌核酸检测试剂盒多为依靠 PCR 扩增的实时荧光检测试剂盒, 其靶标为 DNA^[6-8], 但有其局限性, 如污染造成假阳性、检测步骤繁琐, 需专门实验仪器设备等。van der Vliet 等^[12]在 1994 年通过体外扩增 16s rRNA 进行分枝杆菌活性检测和药敏试验。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 分子是结核分枝杆菌活菌的标志, 为结核病的早期诊断提供了新思路。

本研究采用 SAT 技术, 并与临床上常规检验法进行比较, 对结核病早期诊断的临床价值进行了探讨。结果显示, 以 BD960 培养法作为金标准, SAT 法与 BD960 培养法结果符合率为 86.4% (260/301)。尽管长期以来培养法检测结核分枝杆菌作为诊断结核分枝杆菌的金标准, 但罗氏培养基的营养条件有限, 检测临床标本中的结核分枝杆菌敏感度偏低, 需 1~2 个月; 现今 BD960 培养法已能大大缩短检测时间, 但仍需 2~4 周左右, 同时由于培养阳性菌株中包括结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌, 存在着特异度低的缺点, 且 2 种方法易受标本留取不当等因素影响而导致出现污染菌, 301 份临床标本中, BD960 培养法和罗氏培养法分别出现了 7 份 (2.3%) 和 6 份 (2.0%) 污染菌, 故在计算敏感度和特异度时将这 7 份标本剔除, 发生此种情况易造成病情诊断和治疗时间上的延误。上述缺点导致许多研究出现评价方法与培养法结果符合率较低的问题^[8-12], 因此本研究选用已经商品化的 PCR-TB 试剂盒, 对 BD960 培养法与 SAT 法结果不符合的 43 份标本用 PCR-TB 法进行检测评价, 并通过测序验证进行菌种鉴定。

在肺结核组 223 份痰标本中, BD960 培养阳性

的 102 份中 SAT 阳性 95 份, 阴性 7 份; BD960 培养阴性的 121 份中 SAT 阳性 31 份, 阴性 90 份。对照组 78 份痰标本中, BD960 培养阳性 3 份, 阴性 75 份, SAT 均为阴性。如以 BD960 培养法作为金标准, 则 SAT 法的敏感度为 90.5% (95/105), 特异度为 84.2% (165/196), 阳性预测值为 75.4% (95/126), 阴性预测值为 94.3% (165/175)。如以临床诊断作为金标准, 则 SAT 法的敏感度为 56.5% (126/223), 特异度为 100% (78/78), 阳性预测值为 100% (126/126), 阴性预测值为 44.6% (78/175)。

BD960 培养法与 SAT 法结果不符有 43 份。在结核组中, 2 份培养法 (BD960 培养法 35 d 出现阳性和罗氏培养法 45 d 出现阳性) 和 PCR-TB 法均为阳性而 SAT 法却为阴性, 可能是由于标本中菌活力较差或存在扩增抑制因子, 或者核酸抽提效率不高造成, 经查病史资料显示患者为复治患者, 已用药近 3~5 周, 因此该结果提示应在 SAT 法检测体系中加入质量控制扩增体系, 以更加有效地判断 SAT 法阴性检测结果; 7 例培养法阳性 (BD960 培养法和罗氏培养法中至少 1 种方法阳性), 而 SAT 法和 PCR-TB 法均为阴性, 经菌型鉴定确认为非结核分枝杆菌, 其主要原因是培养法阳性只表明是分枝杆菌, 不能区分结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌, 而核酸检测技术是针对结核分枝杆菌特有的 16s RNA 或 DNA 进行扩增, 故特异度高, 不易出现假阳性; 26 例培养法均为阴性而 SAT 法和 PCR-TB 法均为阳性, 经 SAT 扩增产物纯化后测序均鉴定为结核分枝杆菌, 显示 SAT 扩增过程本身具有较高的敏感度。

3 例集菌涂片法为阳性, PCR-TB 法部分阳性 (1 例阳性、2 例阴性) 而培养法和 SAT 法均为阴性, 根据 van der Vliet 等^[12]的报道, 可能菌株均为没有代谢活性的死菌, 只是培养未能得出阳性结果, 因此临床上经药物化疗后仍为涂阳培阴的患者, 可以用 SAT 法来鉴定痰液中结核菌是否为活菌, 可以用于临床药物疗效的观察。2 例 BD960 培养法及 PCR-TB 法均为阴性而 SAT 法却为阳性, 其可能原因为标本中菌量较少或菌活力较差而导致在培养基中无法生长, 而 SAT 法检测是对标本中结核杆菌 16s RNA 进行扩增, 且活菌中 16s RNA 拷贝数比 DNA 的拷贝数高, 使得 SAT 的检测敏感度较以 DNA 为检测靶标的 PCR-TB 的检测敏感度高, 因此出现 SAT 法阳性而 PCR-TB 阴性。在 78 例对照组中, 3 例培养法均为阳性而 SAT 法和 PCR-TB 法均为阴性, 经基因测序鉴定确认为非结核分枝杆菌, 再次说

明了培养法不能区分结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌, 而 SAT 法不易出现假阳性, 特异度较高。

SAT 法检测标本的前处理过程与 BD960 培养法基本相同, 菌体裂解过程仅需 15 min 超声裂解, 检测时间仅需 1 h, 操作简便、快速, 并采用 42 °C 恒温扩增, 起始靶标和扩增产物都是 RNA, 可直接检测细菌活性, 突出了活菌的价值和临床意义^[6-7]; 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。

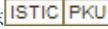
综上所述, SAT 技术检测痰液标本中结核分枝杆菌特异度高, 敏感度好, 污染率低, 检测时间较短, 且在一般实验室用常规配备的实时定量 PCR 仪即可进行检测, 该方法是一种较有前景的实验室诊断方法。

参 考 文 献

- [1] 中华人民共和国卫生部. 全国结核病耐药性基线调查报告 (2007-2008 年). 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [2] 中华医学会结核病分会. 中国结核病分类法. 中华结核和呼吸杂志, 1998, 21:716-717.
- [3] 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. 北京: 中国教育文化出版社, 2006:36.
- [4] Suffys P, Palomino JG, Cardoso Leao S, et al. Evaluation of the polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis, 2000, 4:179-183.
- [5] Noordhoek GT, van Embden JD, Kolk AH. Reliability of nucleic acid amplification for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: an international collaborative quality control study among 30 laboratories. J Clin Microbiol, 1996, 34:2522-2525.
- [6] Greco S, Girardi E, Navarra A, et al. Current evidence on diagnostic accuracy based nucleic acid amplification test for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. Thorax, 2006, 61:783-790.
- [7] Sandin RL. Polymerase chain reaction and other amplification techniques in mycobacteriology. Clin Lab Med, 1996, 16:617-639.
- [8] Kearns AM, Freeman R, Steward M, et al. A rapid polymerase chain reaction technique for detecting *M tuberculosis* in a variety of clinical specimens. J Clin Pathol, 1998, 51:922-924.
- [9] Guerra RL, Baker JF, Alborz R, et al. Specimen dilution improves sensitivity of the amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test for smear-microscopy-positive respiratory specimens. J Clin Microbiol, 2008, 46:314-316.
- [10] Guerra RL, Hooper NM, Baker JF, et al. Use of the amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test in a public health laboratory: test performance and impact on clinical care. Chest, 2007, 132:946-951.
- [11] Dowdy DW, Maters A, Parrish N, et al. Cost-effectiveness analysis of the gen-probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test as used routinely on smear-positive respiratory specimens. J Clin Microbiol, 2003, 41:948-953.
- [12] van der Vliet GM, Schepers P, Schukink RA, et al. Assessment of mycobacterial viability by RNA amplification. Antimicrob Agents Chemother, 1994, 38:1959-1965.

(收稿日期: 2012-03-06)

(本文编辑: 武昱)

作者: 倪丽丽, 罗柳林, 景玲杰, 张军, 陈晋, NI Li-li, LUO Liu-lin, JING Ling-jie, ZHANG Jun, CHEN Jin
作者单位: 200433, 同济大学附属上海肺科医院检验科
刊名: 中华检验医学杂志 
英文刊名: Chinese Journal of Laboratory Medicine
年, 卷(期): 2012, 35(8)
被引用次数: 1次

参考文献(12条)

1. 中华人民共和国卫生部 全国结核病耐药性基线调查报告(2007-2008年) 2010
2. 中华医学会结核病学分会 中国结核病分类法 1998
3. 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 2006
4. Suffys P;Palomino JG;Cardoso Leao S Evaluation of the polymerase chain reaction for the detection of Mycobacterium tuberculosis 2000
5. Noordhoek GT;van Embden JD;Kolk AH Reliability of nucleic acid amplification for detection of Mycobacterium tuberculosis:an international collaborative quality control study among 30 laboratories 1996
6. Greco S;Girardi E;Navarra A Current evidence on diagnostic accuracy based nucleic acid amplification test for the diagnosis of pulmonary tuberculosis 2006
7. Sandin RL Polymerase chain reaction and other amplification techniques in mycobacteriology 1996
8. Keams AM;Freeman R;Steward M A rapid polymerase chain reaction technique for detecting M tuberculosis in a variety of clinical specimens 1998
9. Guerra RL;Baker JF;Alborz R Specimen dilution improves sensitivity of the amplified Mycobacterium tuberculosis direct test for smear-microscopy-positive respiratory specimens 2008
10. Guerra RL;Hooper NM;Baker JF Use of the amplified Mycobacterium tuberculosis direct test in a public health laboratory:test performance and impact on clinical care 2007
11. Dowdy DW;Maters A;Parrish N Cost-effectiveness analysis of the gen-probe amplified Mycobacterium tuberculosis direct test as used routinely on smear-positive respiratory specimens 2003
12. van der Vliet GM;Scheepers P;Schukking RA Assessment of mycobacterial viability by RNA amplification 1994

引证文献(1条)

1. 中国防痨协会临床专业委员会 结核病临床诊治进展年度报告(2012年)(第一部分结核病临床诊断)[期刊论文]-中国防痨杂志 2013(6)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zhyxjy201208011.aspx