

实时荧光 PCR 方法检测结核杆菌的价值分析

唐毓凡

(广西都安县人民医院, 广西 都安 530700 E-mail: liqiuings@163.com)

摘要: **目的** 探讨实时荧光聚合酶链反应(FQ-PCR)方法检测结核杆菌的应用价值。**方法** 收集我院 2014 年 1 月~12 月间收住院的 152 例肺结核确诊患者, 分别采用 FQ-PCR、痰涂片和痰培养法检测患者痰标本, 比较各方法诊断监测结果。**结果** 痰培养法、FQ-PCR、痰涂片法对结核杆菌的检出率分别为 53.95%(82/152)、47.37%(72/152)、30.26%(46/152), FQ-PCR 检出率与痰培养法比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 而 FQ-PCR、痰培养法检出率均明显高于痰涂片法($P < 0.01$)。以痰培养为金标准, FQ-PCR 的敏感性、特异性、阳性预测值和阴性预测值分别为 82.93%、94.29%、94.44%、82.50%, 痰涂片法分别为 86.96%、69.81%、55.56%、92.50%。FQ-PCR 与痰培养一致性良好($Kappa$ 值=0.764), 痰涂片法与痰培养一致性较差($Kappa$ 值=0.489)。**结论** FQ-PCR 具有较高检出率和敏感度, 且操作简便、快捷, 可作为结核杆菌培养法较为理想的补充检测方法。

关键词: 实时荧光定量聚合酶链反应; 结核杆菌; 肺结核; 痰液

中图分类号: R446.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2016)02-0205-03

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2016.02.028

我国是结核病疫情最为严重的国家之一, 其中活动性肺结核发病率更是位居全球第 2 位^[1], 早期诊断、及时治疗是有效防治结核病的关键。痰中结核杆菌的检测是诊断与鉴别肺结核的重要依据^[2], 传统上主要采用痰培养法和涂片法进行检测, 其中痰培养法是金标准, 但其缺点是检测周期长、操作繁琐、敏感性低, 而涂片法虽然操作简单易行, 但阳性率偏低。实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescence quantitative PCR, FQ-PCR)作为一种基因检测手段具有操作简便、快速、灵敏度和特异度高等优点, 近年来在临床上各种病原体的检测中逐渐得到推广^[3]。本研究采用 FQ-PCR 和传统方法(痰培养法和涂片法)分别检测结核杆菌, 对检测结果进行对比分析, 旨在探讨 FQ-PCR 在结核杆菌的实验室诊断中的价值。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选择 2014 年 1 月~12 月间我院收住院的 152 例肺结核确诊患者, 男性 82 例, 女性 70 例, 年龄 32~66 岁, 平均年龄(45.8±9.4)岁。入选患者均符合卫生部 WS288-2008《肺结核诊断标准》中的相关标准^[4], 结合临床症状、X 线胸部摄片、痰抗酸染色涂片、痰培养和(或)临床抗结核治疗有效等来确诊。

1.2 方法

1.2.1 FQ-PCR 根据 Mtb 标准株 H37Rv(Genbank: ALI23456)16S rRNA 基因序列(NC-000962)来设计引物, 正向和反向引物 Pf 序列分别为 5' AAG-GCGACGACGGGTAGC 和 5' GAACGCCGTCATC-CCCCA, 扩增片段 150 bp, 靶向 Mtb 16S rRNA 基因

的 232-381 碱基。反应体系组成为: 10×Taq 缓冲液 2.5 μl, 4×dNTP 1 μl, Pf 和 Pr 引物各 0.3 μl, Taq 酶 0.5 μl, Mtb 基因组 DNA 1 μl, 加去离子水至 25 μl。PCR 检测仪器为上海宏石医疗科技有限公司的 SLAN-96P 全自动 PCR 分析仪, 检测试剂盒由中山大学达安基因诊断中心提供。反应条件为: 93℃ 2 min 预变性, 93℃ 45 s, 55℃ 60 s, 10 个循环; 93℃ 45 s, 55℃ 45 s, 30 个循环。检测结果根据试剂盒说明书上判断标准进行判定。

1.2.2 痰涂片与痰培养 痰涂片染色镜检的痰标本处理、涂片及镜检结果判断均严格参照中国结核病防治规划《痰涂片镜检标准化操作及质量保证手册》^[5]及试剂盒说明书中要求进行操作和判读。痰培养参照《结核病诊断细菌学检验规程》^[6]中的规定进行操作, 无菌操作将处理后的痰标本接种于罗氏培养基上, 菌落进行抗酸染色鉴定, 如培养至第 8 周仍未见有菌落生长即可判定为阴性。

1.2.3 观察指标 分别比较 3 种方法对结核杆菌的检出率以及 FQ-PCR 法和痰涂片法的敏感度、特异性、阳性预测值和阴性预测值。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 16.0 软件进行数据分析, 计数资料采用百分比表示, 行 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。以痰培养为金标准, 计算 FQ-PCR 和痰涂片法的敏感性、特异性、阳性预测值和阴性预测值, 采用 $Kappa$ 一致性检验来判断两种方法与痰培养的一致性, $Kappa$ 值越接近 1 表示一致性越好, 以 $Kappa$ 值 ≥ 0.75 为一致性较好。

2 结果

2.1 3种方法检出率比较 3种方法检出率总的来说差异有统计学意义($\chi^2 = 18.454, P < 0.001$),两两比较结果显示:FQ-PCR检出率低于痰培养法,但比较差异无统计学意义($\chi^2 = 1.316, P = 0.251$);痰培养法、FQ-PCR检出率均明显高于痰涂片法,比较差异均有统计学意义($\chi^2 = 17.489, 9.363, P < 0.001, 0.002$),具体见表1。FQ-PCR、痰培养法、痰涂片法对于对照组病例检测结果均为阴性。

表1 3种方法检出率比较

方法	例数	检出	未检出	检出率(%)
痰培养法	152	82	70	53.95
FQ-PCR法	152	72	80	47.37
痰涂片法	152	46	106	30.26

2.2 2种方法灵敏度、特异度阳性预测值、阴性预测值比较 以痰培养为金标准,FQ-PCR的敏感度、特异度、阳性预测值和阴性预测值分别为82.93%(68/82)、94.29%(66/70)、94.44%(68/72)、82.50%(66/80),痰涂片法分别为86.96%(40/46)、69.81%(74/106)、55.56%(40/72)、92.50%(74/80),见表2。*Kappa*一致性分析结果显示FQ-PCR与痰培养的*Kappa*值为0.764,提示两种方法一致性良好;痰涂片法与痰培养的*Kappa*值为0.489,提示两种方法一致性较差。

表2 三种方法检测结果比较

痰培养	n	FQ-PCR		痰涂片	
		阳性	阴性	阳性	阴性
阳性	82	68	14	40	6
阴性	70	4	66	32	74

3 讨论

我国为结核杆菌感染的高发国家,且多为隐性感染^[7]。肺结核是结核杆菌引发的最常见传染性结核病,目前的肺结核诊断主要是结合临床症状、影像学及实验室检查来进行确诊,传统的实验室检查方法有痰涂片法和痰培养法。痰涂片抗酸染色镜检法操作简单、易行、价格低廉,但受到标本采集质量及检测人员主观因素影响较大,在菌种含量低或标本采集方法不准确时阳性率低,且标本存在其他非结核性抗酸杆菌时也能经抗酸染色后着色,造成假阳性。痰培养法是结核杆菌诊断的金标准,但结核杆菌特殊的细胞壁结

构使其吸收营养物质较慢,造成其生长速度缓慢,普通培养基的培养周期长达3~8周,虽然近年来快速培养系统的应用大大缩短了培养周期,但仍需7~10 d^[8],对早期诊断和及时治疗造成极大影响。

FQ-PCR是一项近十几年迅速发展起来的基因检测新技术,将荧光反应物加入常规PCR反应体系使其与PCR扩增产物相关联,通过监测PCR扩增反应中荧光强度变化来对本标本特定DNA序列进行定量分析,与常规PCR反应相比,FQ-PCR整个反应在单一管内完成,从而有效解决了常规PCR容易受污染的问题^[9],具有检测迅速、敏感度和特异度高、自动化程度高、可定量分析等优点,尤其对于培养困难或无法培养的病原微生物的检测具有更高应用价值^[10],在结核杆菌的检测和诊断方面也体现出显著优势。魏巍等^[11]利用FQ-PCR检测115例肺结核患者支气管肺泡灌洗液中结核分枝杆菌脱氧核糖核酸(TB-DNA),同时检测患者血清结核分枝杆菌特异性抗原(TB-SA)抗体和进行痰涂片抗酸染色镜检,结果显示TB-DNA、血清TB-SA抗体和痰涂片抗酸染色镜检诊断肺结核敏感度分别为65.2%、50.4%、20.9%,且通过支气管肺泡灌洗液检测TB-DNA来诊断肺结核的敏感度均明显高于血清TB-SA抗体和痰涂片。肖慧霞等^[12]采用FQ-PCR、抗酸染色、改良罗氏培养法检测156例,结果三种方法检测结核分枝杆菌阳性率分别为50%、25.64%、33.33%,FQ-PCR最高。本研究显示,检测152例肺结核患者痰标本的方法中,FQ-PCR检出率为47.37(72/152),痰培养法和痰涂片法分别为53.95%(82/152)和30.26%(46/152),痰涂片法最低;此外,以痰培养法作为金标准,一致性分析结果显示FQ-PCR的*Kappa*值为0.764,提示FQ-PCR与痰培养法一致性良好,痰涂片法*Kappa*值为0.489,提示两种方法一致性较差。

综上所述,FQ-PCR法检出率和敏感度高,且操作迅速、简便,可定量检测,与痰培养法一致性良好,可作为痰培养法检测结核杆菌的补充方法,在结核杆菌及结核病的快速诊断方面具有较高临床价值。

参考文献:

- [1] 蓝香逢,周泽文,李阳,等.广西百色市高效大学生结核病防治知识知晓率调查分析[J].右江民族医学院学报,2015,37(4):621-623.
- [2] 吴科明,莫实德.4种方法在检测痰内结核分枝杆菌结果的比较分析[J].检验医学与临床,2012,9(20):2577-2578.

(下转第210页)

后选择住院医院级别的影响因素都是医疗水平。由此可见,一旦实行新农合同城化,住院病人有增加外流的风险。各地在提高统筹层次时,需要强化分级诊疗制度,调整补偿技术方案,通过经济杠杆控制不合理外流,避免基金发生透支。

对同城化后患重大疾病时选择的医疗机构,45.65%的人选择本县的县级医院,其次为本市的市级医院(35.71%),省级医院的比例为11.96%。说明广大的参合农民在选择医疗机构时还是比较理性的,主要根据病情来选择适合的医疗机构,与徐璇等^[5]的调查结果相似。在各种因素中,年龄、性别、婚姻状况对就医地点的选择差异无统计学意义($P > 0.05$)。健康状况和文化程度与选择医院的级别成正比,身体越健康、文化程度越高的人选择医院级别越高,这可能是身体健康和文化程度高的人,对医疗水平的期望更高的缘故。南北钦防四城市的参合农民选择医疗机构的等级之间有差别,北海市、防城港市选择省级医院的比例为20%以上,高于南宁市和钦州市,主要原因是这两个城市的医疗资源质量相对较低。北海市和防城港市均为沿海的旅游城市,人口基数较小,三级综合医院的数量少,防城港市为新设的地级市,目前缺乏三级综合医院,农民一旦患重大疾病自然就会选择到南宁的省级医院住院。另外由于历史的原因,防城港市的居民比较认可钦州市的医院医疗水平,每年外流至钦州市住院的病人比较多。因此,选择市外市级医院的比

例相对较高。

总之,对提高新农合统筹层次的改革,无论是多个城市间推行新农合同城化还是新农合市级统筹,广大的参合农民是欢迎的,多数病人就医也是理性的,虽然仍存在许多问题^[6],但只要配合出台相关的政策措施,不但能提高参合农民的受益程度,也是能够维持新农合制度平稳健康发展的。

参考文献:

- [1] 曾群华. 关于区域同城化的研究综述[J]. 城市观察, 2013(6): 85-95.
- [2] 张淼. 新型农村合作医疗制度省级统筹模式研究[D]. 长春: 吉林财经大学, 2012.
- [3] 袁红梅, 何克春, 陈亚伟. 宜昌市试行新型农村合作医疗市级统筹的可行性分析[J]. 中国卫生经济, 2014, 33(12): 41-43.
- [4] 曹爽. 江苏实施基本医疗保险市级统筹研究——以职工医保为例[D]. 南京: 南京大学, 2014.
- [5] 徐璇, 胡国威, 周磊. 实施城区新型农村合作医疗市级统筹制度后农民认知情况调查分析[J]. 中国初级卫生保健, 2011, 25(8): 24-25.
- [6] 裘长安, 田艳, 苏立坡. 市级统筹下的医保基金管理模式探讨——现状、难点、实现路径及未来发展[J]. 中国医疗保险, 2011(1): 30-32.

收稿日期: 2016-03-02

(上接第206页)

- [3] 何维凤. PCR技术在快速检测食源性致病菌中的应用[J]. 右江民族医学院学报, 2014, 36(1): 102-104.
- [4] 中华人民共和国卫生部. 肺结核诊断标准 WS288-2008[S]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 2-3.
- [5] 赵雁林, 刘宇红, 姜广路, 等. 中国结核病防治规划 痰涂片镜检标准化操作及质量保证手册[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2009: 5-13.
- [6] 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.
- [7] 黄泽亮, 桂福. FQ-PCR检查痰中结核杆菌对肺结核诊断的临床价值[J]. 中南医学科学杂志, 2013, 41(4): 389-391.
- [8] 刘小文, 欧阳冬英. 实时荧光定量PCR检测痰中结核分枝杆菌临床评价[J]. 中国现代医药杂志, 2014, 16(1): 24

-26.

- [9] 李向平, 胡森, 韩磊, 等. 实时荧光定量聚合酶链反应检测结核分枝杆菌在结核性脑膜炎诊断中的价值[J]. 新乡医学院学报, 2013, 30(7): 524-526.
- [10] Maurin M. Real-time PCR as a diagnostic tool for bacterial disease[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2012, 12(7): 731-754.
- [11] 魏巍, 覃林珍, 刘守江, 等. 实时荧光聚合酶链反应检测支气管肺泡灌洗液结核分枝杆菌DNA诊断肺结核价值[J]. 临床荟萃, 2014, 29(6): 611-613.
- [12] 肖慧霞, 王晓平, 王福锐, 等. 荧光定量PCR技术在结核分枝杆菌检测中的应用[J]. 宁夏医学杂志, 2011, 33(2): 173-174.

收稿日期: 2015-12-21; 修回日期: 2016-03-17