

4 种方法在检测痰内结核分枝杆菌结果的比较分析

吴科明,莫实德(广西壮族自治区防城港市疾病预防控制中心检验科 538021)

【摘要】 目的 对结核病临床诊断方法的应用价值进行比较分析。**方法** 对别采用涂片法、免疫磁珠技术分离涂片法(IMS-涂片)、痰培养法、荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)对病例组 112 例和对照组 53 例痰标本进行检测。**结果** 普通涂片法灵敏度最低为 25.00%,其次是 IMS-涂片和痰培养分别是 39.29%和 37.50%,FQ-PCR 法的灵敏度为 67.86%,明显高于其他方法。**结论** FQ-PCR 法和 IMS-涂片可作为普通抗酸染色法和培养法的重要补充或是互补的方法,对提高检出率,早发现、早治疗极具临床意义。

【关键词】 结核分枝杆菌; 结核; 抗酸染色; 免疫磁珠技术; 结核培养; 荧光定量聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.20.024 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2012)20-2577-02

Comparative analysis on results of 4 different methods for detecting Mycobacterium tuberculosis in sputum WU Ke-ming, MO Shi-de (Fangcheng Municipal Center for Disease Control and Prevention, Fangcheng, Guangxi 538021, China)

【Abstract】 Objective To perform the comparative analysis on the application value of the clinical diagnostic methods of tuberculosis. **Methods** The smear, immune magnetic beads technology separation smear (IMS-smear), sputum culture and FQ-PCR methods were adopted to detect the sputum specimens in 112 cases of tuberculosis and 53 control cases. **Results** The sensitivity of the common smear method was lowest (25.00%), which of the IMS-smear and the sputum culture were 39.29% and 37.50% respectively. The sensitivity of FQ-PCR was 67.86%, which was significantly higher than that of other methods. **Conclusion** FQ-PCR and IMS-smear can be used as an important supplement of common acid-fast staining and culture methods or complementary approach, which has great clinical significance to increase the detection rate, early discover and early treat tuberculosis.

【Key words】 Mycobacterium tuberculosis; tuberculosis; acid-fast staining; immunomagnetic beads technique; tuberculosis culture; FQ-PCR

据世界卫生组织报道,目前全球有近 1/3 的人已感染结核杆菌,也就是 20 亿人口感染了结核菌,全球有活动性肺结核患者约 2 000 万,每年新发结核病患者约(800~1 000)万,每年约有 300 万人死于结核病。结核病已成为全世界成人因传染病而死亡的主要疾病之一。我国是全球 22 个结核病高负担国家之一,活动性肺结核患者数居世界第 2 位。检出痰中含有结核杆菌是临床诊断肺结核或与其他肺病鉴别的重要依据。痰中肺结核杆菌的检测方法常规采用痰涂片和痰培养。涂片虽然简单易行,但阳性率低,培养虽然是金标准,但是周期太长,均难以满足临床需要^[1]。因此,准确、快捷、简便的实验室检测方法对于结核病的早期诊断和及时治疗具有十分重要的意义。本文应用涂片法、免疫磁珠技术分离涂片法(IMS-涂片)、痰培养及荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)4 种实验室方法对结核病临床诊断的应用价值进行了比较分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料 病例组为 2011 年 1~12 月肺结核患者痰标本 112 例,均经临床症状、X 线胸部摄片、痰抗酸染色涂片、痰改良罗氏培养和(或)临床抗结核治疗有效而确诊肺结核,其中抗结核治疗用药时间不超过 1 个月。其中男 68 例(60.71%),女 44 例(39.29%),年龄 19~74 岁,平均 37.8 岁。选择同期收治的 53 例肺炎等非结核呼吸系统疾病患者作为对照组,男 31 例(58.49%),女 22 例(41.51%),年龄 10~68 岁,平均 32 岁。

1.2 主要仪器 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 7500 型)、

生物安全柜(美国 Thermo 1278 型)、生化培养箱(上海博迅 SPX-250B-Z 型)、生物显微镜(麦克奥迪 E220LED)。

1.3 方法

1.3.1 涂片法 常规处理后,在生物安全柜中涂片,待干后,直接抗酸染色,镜下观察。结果以《肺结核诊断标准》(WS288-2008)进行判定。

1.3.2 IMS-涂片 用免抗 H37Rv 血清包被表面活化磁珠(上海普飞生物),然后对标本进行液化处理,磁性分离,收集磁珠,分离菌体,抗酸染色后镜检。

1.3.3 痰培养 痰标本按《结核病诊断细菌学检查规程》进行结核菌培养,从罗氏培养基上取菌落进行抗酸染色鉴定。第 8 周无菌落生长方可报告为阴性。

1.3.4 FQ-PCR 采用 PCR 荧光定量检测试剂盒(中山大学达安基因),按试剂盒操作说明书提取、检测菌体基因和结果判定。

1.4 统计学处理 本组对 4 种方法检查阳性率比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。统计软件为简统统计 14.0。

2 结果

病例组 112 例痰标本,涂片法、IMS-涂片法、痰培养法、FQ-PCR 法的灵敏度(阳性率)分别为 25.00%、39.29%、37.50%、67.86%,4 种方法检测对照组的 53 例痰标本均为阴性,特异度均为 100%,见表 1。病例组 4 种方检测结果经 χ^2 检验, $\chi^2 = 45.15$, $\nu = 3$, $P = 0.00$,按 $\alpha = 0.05$ 水准,可以认为 4

种方法灵敏度不等或不全相等。

表 1 4 种方法检测结果比较

检测方法	病例组			对照组		
	阳性	阴性	灵敏度(%)	阳性	阴性	灵敏度(%)
涂片法	28	84	25.00	0	53	100
IMS 涂片	44	68	39.29	0	53	100
痰培养	42	70	37.50	0	53	100
FQ-PCR	76	36	67.86	0	53	100

3 讨 论

从表 1 中可以看出,除 IMS-涂片和痰培养间灵敏度基本一样外,其他的检出方法之间灵敏度是有差异的,普通涂片法最低,其次是 IMS-涂片和痰培养,FQ-PCR 法的灵敏度明显高于其他的方法。

痰涂片抗酸染色法是全球结核病实验室都在使用的最基本的细菌学检查方法,其优点是简便、快速和价廉,当日即可回报结果,缺点是敏感度低。本次实验检测出的阳性率为 25.00%,和万朝敏^[2]、王成勇等^[3]的报道基本一致。而结核杆菌培养法是诊断结核病的较佳方法,灵敏度也提高不少,但其缺点是需时太久,通常 4~8 周才能获得结果,早期感染者不易得到阳性结果,而且各种抗酸菌均可着色,需进一步检查才可确定是否为结核杆菌,失去了早发现、早治疗的良机,不利于及时诊断^[4]。免疫磁珠能特异性地分离出结核杆菌,从而有效避免了杂质、杂菌的影响,且提高了模板浓度,其具有分离速度快、操作简单、无需昂贵仪器设备、且不影响被分离物生物学性状和功能的优点,目前已经广泛用于各种细胞的分离、核酸及蛋白质的纯化,也被应用于环境和食品中大肠杆菌 O157:H7 和沙门菌等的检测^[5]。FQ-PCR 法作为一种实验诊断技术,在特异性、敏感性方面都优于传统的涂片法和培养法,自动化程度高。PCR 及其后的结果分析均由计算机来完成且耗时短,1~2 d 内即可有检验报告,快速易行,是结核病早诊断、早发现的重要方法,在结核病的诊断方面显现出巨大的潜力和价值,有利于结核病患者的早期发现和管理。

FQ-PCR 技术对结核分枝杆菌的诊断具有快速、特异、敏感的特点,成为结核病分子诊断的最有力工具。虽然在对照组中没检出假阳性,但在大批量临床应用中,PCR 作为一种诊断手段仍然存在一定的假阳性和假阴性,特别是假阳性的产生^[6]。虽然大多数实验室均设阴阳性对照来检测敏感性和特异性,但由于标本预处理和 DNA 纯化过程操作不当,可造成

标本的污染和结核菌的丢失,以致出现假阳性和假阴性。此外,PCR 检测结核杆菌 DNA 假阴性主要是由于标本中结核杆菌 DNA 含量太少、标本处理和模板 DNA 中抑制物的存在、扩增仪孔间温度差异等所致;假阳性也可由于扩增循环过多或退火温度过低而引起非特异性扩增产物所致。故有研究者提出为确保 PCR 在结核病诊断中的可靠性需要寻求一个切实、可行的敏感性和特异性监测系统^[7]。同时,由于分枝杆菌 L 型生物学上的特性致使 FQ-PCR 在分枝杆菌 L 型的检出率上要较涂片和培养阳性率低^[8]。故临床上使用 FQ-PCR 法检测结核分枝杆菌,需要对 FQ-PCR 法的原理、操作细节及注意事项有充分的认识,制订相应的操作程序,尽量防止或减少假阳性和假阴性的发生。

综上所述,FQ-PCR 法还是不能完代替抗酸染色法和培养法,FQ-PCR 法和 IMS-涂片可作为普通抗酸染色法和培养法的重要补充或是互补的方法,对提高检出率、早发现、早治疗极具临床意义。

参考文献

[1] 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.

[2] 万朝敏. 结核病诊断与治疗[J]. 实用儿科临床杂志, 2007, 22(10): 725-728.

[3] 王成勇, 李益荣. 3479 例肺结核患者痰标本抗酸杆菌检查结果分析[J]. 临床肺科杂志, 2004, 9(6): 605-606.

[4] 马连学, 席云, 吴丽霞, 等. 荧光定量 PCR 诊断肺结核的临床应用研究[J]. 新医学, 2009, 40(3): 166-168.

[5] 郑玉群, 许卫国, 陆伟, 等. 免疫磁珠分离涂片和 PCR 检测痰内结核分枝杆菌的诊断价值研究[J]. 江苏预防医学, 2010, 21(2): 14-16.

[6] Sarker G, Sommer SS. Shedding light on PCR contamination[J]. Nature, 1990, 343(6253): 27-30.

[7] 杨伟洪, 陈罡, 罗殿, 等. PCR 检测结核杆菌的优越性及局限性分析[J]. 国际医药卫生导报, 2006, 12(10): 142-143.

[8] 张永乐, 朱明利, 张利诚, 等. 增菌荧光定量 PCR 检测痰及血液中结核杆菌的临床应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(9): 1834-1835.

(收稿日期: 2012-03-31)

(上接第 2576 页)

参考文献

[1] Koprowski H, Steplewski Z, Mitchell K, et al. Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies[J]. Somatic Cell Genet, 1979, 5: 957-972.

[2] 罗晓红, 段朝晖, 潘觅怡, 等. 血清 CA125、CA199 及 CEA 联合检测在卵巢肿瘤诊断中的价值[J]. 临床和实验医学杂志, 2006, 5(7): 878-879.

[3] 田满福, 韩波. 检测 CA199、CA125、CA153 及 CEA 在肿瘤诊断中的意义[J]. 临床和实验医学杂志, 2010, 9(4): 483-485.

[4] Mann DV, Edwards R, Ho S, et al. Elevated tumour marker CA19-9: clinical interpretation and influence of obstructive

jaundice[J]. Eur J Surg Oncol, 2000, 26: 474-479.

[5] 雷培森, 何芙蓉, 何明, 等. 肿瘤相关物质检测在恶性肿瘤临床中的意义[J]. 现代肿瘤医学, 2010, 18(9): 1830-1831.

[6] Kim HJ, Kim MH, Yuong SJ, et al. A new strategy for the application of CA19-9 in the differentiation of pancreaticobiliary cancer: analysis using a receiver operating characteristic curve[J]. Am J Gastroenterol, 1999, 94: 1941-1946.

[7] Kim BJ, Lee KT, Moon TG, et al. How do we interpret an elevated carbohydrate asymptomatic subjects[J]. Dig Liver Dis, 2009, 41: 364-369.

[8] 林云华. 1 128 例健康体检者 Ca199 结果分析报告[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(1): 221.

(收稿日期: 2012-03-26)