

· 论 著 ·

实时荧光核酸恒温扩增检测技术在继发性肺结核患者中的应用价值

侯艳杰 房宏霞 蔚鸣 闫朋 许雪薇 许鑫鑫 张宝庆 刘春涛 刘玉琴

【摘要】 目的 评价实时荧光核酸恒温扩增检测(simultaneous amplification and testing, SAT)技术在继发性肺结核患者中的临床应用价值。**方法** 收集2014年1月至2015年9月在黑龙江省传染病防治院结核内科住院的1036例临床诊断为继发性肺结核患者的晨痰样本,同时使用痰抗酸杆菌显微镜检查、分枝杆菌液体培养及SAT法3种技术进行检测。采用 χ^2 检验比较各方法间的阳性检出率,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义;用Kappa检验比较SAT与其他检测技术间的一致性。**结果** SAT、痰涂片、液体培养3种检测方法的阳性检出率分别为55.02%(570/1036)、47.30%(490/1036)和50.39%(522/1036),SAT法阳性检出率较涂片、液体培养分别高7.72%(80/1036)、4.63%(48/1036),差异有统计学意义(χ^2 值分别为32.505、13.470, P 值均 < 0.05)。SAT与涂片、培养方法比较K值分别为0.63、0.68。**结论** SAT法较痰涂片和液体培养的阳性检出率高,与痰涂片和液体培养比较具有较高一致性,有助于快速筛查及诊治继发性肺结核。

【关键词】 结核, 肺/继发性; 核酸扩增技术; 核酸探针; 实验室技术和方法; 对比研究

The application value of real time fluorescent nucleic acid amplification technology in patients with secondary pulmonary tuberculosis HOU Yan-jie*, FANG Hong-xia, WEI Ming, YAN Peng, XU Xue-wei, XU Xin-xin, ZHANG Bao-qing, LIU Chun-tao, LIU Yu-qin. * Heilongjiang Infectious Disease Prevention and Control Hospital, Harbin 150500, China

Corresponding author: LIU Yu-qin, Email: liuyuqin_ssy@163.com

【Abstract】 Objective To evaluate the application value of real time fluorescent nucleic acid amplification technology-simultaneous amplification and testing (SAT) in patients with secondary pulmonary tuberculosis. **Methods** One thousand and thirty six morning sputa were collected and detected with smear, culture and SAT technology from 1036 patients admitted in Heilongjiang Infectious Disease Prevention and Control Hospital during Jan. 2014 to Sep. 2015. The positive rate was tested with Chi-square and the consistency between SAT and other testing techniques were compared by Kappa test. $P < 0.05$ was considered significant difference. **Results** The positive rates were 55.02% (570/1036) in SAT, 47.30% (490/1036) in smear, and 50.39% (522/1036) in culture, respectively. The difference was significant statistically ($\chi^2 = 32.505, 13.470, P < 0.05$). The Kappa values were 0.63 and 0.68 when compared SAT with smear and culture. **Conclusion** The positive rate in SAT is higher than those of smear and culture. SAT has high consistency when compared with smear and culture. It is helpful to screen and diagnose secondary pulmonary tuberculosis.

【Key words】 Tuberculosis, pulmonary/secondary; Nucleic acid amplification techniques; Nucleic acid probes; Laboratory techniques and procedures; Comparative study

结核病的传染源主要是痰涂片阳性患者,传染性的大小取决于痰内菌量的多少。直接涂片法查出结核分枝杆菌者属于大量排菌,直接涂片法检查阴性而仅培养出结核分枝杆菌者属于微量排菌^[1]。目

前,我国菌阴肺结核患者占有肺结核患者的60%~70%^[2],具有潜在的传染风险,应用敏感度、特异度、准确度较高的检测方法,能提高其阳性检出率,在快速诊治及发现传染源方面起到辅助作用。

结核病的诊断方法目前主要包括痰涂片镜检、培养法、免疫学、分子诊断技术^[3-4]。传统的结核病实验室诊断方法中,涂片显微镜检查敏感度较低,虽然固体培养具有较高的敏感度,但是获得实验结果至少需要3~8周,耗时较长。随着分子生物学技术的发展,近年来涌现出许多可用于MTB快速诊断

doi:10.3969/j.issn.1000-6621.2016.09.008

作者单位:150500 哈尔滨,黑龙江省传染病防治院(侯艳杰、蔚鸣、闫朋、许雪薇、许鑫鑫、张宝庆、刘春涛、刘玉琴);深圳市龙华新区慢性病防治中心(房宏霞)

通信作者:刘玉琴,Email:liuyuqin_ssy@163.com

及鉴定的方法^[5]。在国外已将转录介导的扩增技术(transcription mediated amplification, TMA)作为结核病临床诊断的常规检查方法。实时荧光核酸恒温扩增检测(simultaneous amplification and testing, SAT)技术是 TMA 的同类技术,已有研究人员将其应用于结核分枝杆菌的检测^[6-7],但其检测效果尚无定论,有必要对其在临床应用中做进一步的研究与验证。本研究对同一患者标本采用痰抗酸杆菌显微镜检查、分枝杆菌液体培养及 SAT 法 3 种技术同时进行检测,分别以痰涂片和液体培养为金标准,评价 SAT 技术在继发性肺结核快速诊断中的临床应用价值。

资料和方法

一、患者来源

本研究为对黑龙江省传染病防治院临床检查实验室现有检查结果的回顾性分析。以 2014 年 1 月至 2015 年 9 月在黑龙江省传染病防治院结核内科住院且依据《肺结核诊断标准(WS288-2008)》^[8]确诊、依据《2004 年中华人民共和国结核病分类标准》^[9]分类的继发性肺结核患者的晨痰样本为研究对象。对收集到的晨痰样本同时采用痰抗酸杆菌显微镜检查、分枝杆菌液体培养及 SAT 法 3 种技术进行检测。研究期间结核内科共确诊继发性肺结核患者 1036 例,其中男 668 例(64.48%),女 368 例(35.52%),年龄为 10~85 岁,年龄中位数为 42(36,52)岁。所有患者均采集到合格痰样本并纳入研究。因本研究对象为去患者标识的痰样本,不涉及伦理学要求范畴。

二、主要试剂与仪器

痰抗酸杆菌显微镜检查采用荧光染色显微镜检查法,金胺“O”染色液购自珠海贝索生物技术有限公司;分枝杆菌液体培养采用 BACTEC™ MGIT™ 960 操作系统,由美国 BD 公司提供;SAT 技术采用结核分枝杆菌(TB)核酸检测试剂盒(RNA 恒温扩增),由上海仁度生物科技有限公司提供;全自动实时荧光定量核酸扩增仪(Mx3005P)为美国安捷伦科技公司生产。

三、方法

(一)痰抗酸杆菌显微镜检查、分枝杆菌液体培养

遵照《结核病实验室检验规程》^[10]中的标准化操作程序执行,并且该两项检测方法室间质量评价和室内质量控制合格。

(二) SAT 技术方法

1. SAT 技术原理: SAT 使用莫洛尼鼠白血病病毒逆转录酶(M-MLV-RT)、T7 RNA 多聚酶和优化探针技术来同时实现。反转录酶用于产生靶标核酸(RNA)的一个 DNA 拷贝, T7 RNA 多聚酶从 DNA 拷贝上产生多个 RNA 拷贝,带有荧光标记的优化探针和这些 RNA 拷贝特异结合,从而产生荧光,该荧光信号可由检测仪器捕获。

2. SAT 检测方法:严格按照试剂盒说明书标准操作程序操作。取 1.5 ml 痰液加入至 1~2 倍体积的 NaOH(4%),充分液化后,离心用 TB 稀释液重悬,与阳性对照、阴性对照、临界弱阳性对照分别取 50 μ l 进行超声处理。取 2 μ l 处理物加入 30 μ l 扩增检测液(按照 30 μ l 反应液和 2 μ l 检测液配制), 60 $^{\circ}$ C 10 min, 42 $^{\circ}$ C 5 min, 随后加入 10 μ l SAT 酶液,转置荧光检测仪,进行 42 $^{\circ}$ C 恒温扩增检测操作。结果判定检测时间(detection time, dt)值 \leq 35 min 为阳性

四、统计学分析

记录每例患者痰样本的涂片、液体培养与 SAT 法的结果。使用 SPSS 19.0 软件建立数据库并进行统计学处理和分析。采用 χ^2 检验比较痰涂片、液体培养与 SAT 法的阳性检出率,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义;采用秩和检验分析以液体培养为金标准时的 SAT 检验结果的敏感度、特异度的变化趋势是否具有统计学意义;SAT 与金标准(痰涂片或液体培养)检测方法进行一致性检验(Kappa 检验), $K \leq 0.40$ 时,表明一致性较差; $0.40 < K \leq 0.60$ 时,表明为中度一致; $0.60 < K \leq 0.80$ 时,表明有较高的一致性; $K > 0.80$ 认为两者一致性极好。

结 果

在 1036 例患者痰样本中,痰涂片阳性 490 例,培养阳性 522 例[培养阳性的时间为(28.37 \pm 9.58)d], SAT 阳性 570 例。涂片、培养及 SAT 的阳性检出率分别为 47.30%(490/1036)、50.39%(522/1036)、55.02%(570/1036)(表 1)。

SAT 与涂片总符合率为 81.47%(844/1036); SAT 与液体培养的总符合率为 84.17%(872/1036)。以液体培养为金标准 SAT 法的敏感度为 88.89%(464/522),其中涂片(+)培养(+),涂片(-)培养(+),涂片(+)培养(-),涂片(-)培养(-)患者中敏感度分别为 93.92%(386/411)、70.27%(78/111)、60.76(48/79)、13.33%(58/435);以液体培养为金

标准 SAT 法的特异度为 79.38%(408/514);其中在涂片(一)培养(一)、涂片(+)培养(一)、涂片(一)培养(+)、涂片(+)培养(+)的患者中特异度分别为 86.67%(377/435)、39.24%(31/79)、29.73%(33/111)、6.08%(25/411),敏感度随痰菌量增加而升高,特异度随痰菌量增加而降低($Z=-23.635$, $P<0.05$)。采用配对资料 χ^2 检验对 SAT 法与痰涂片、培养进行比较, χ^2 值分别为 32.505、13.470, P 值均 <0.05 ,差异有统计学意义。SAT 法与痰涂片、培养检测结果的结果进行一致性检验的 $Kappa$ 值分别为 0.63、0.68(表 2)。

讨 论

本研究结果显示 3 种方法中, SAT 法简单快速,具有较高的敏感度。以液体培养为金标准时, SAT 的敏感度为 88.89%(464/522),敏感度随痰菌量增加而升高,在涂片(+)培养(+)患者中敏感度达 93.92%(386/411),与文献[11]报道相似;在菌阴继发性肺结核中仍有 13.33%(58/435)的阳性检出率,与文献报道在初诊患者涂片阴性标本采用 SAT 法的阳性检出率为 10%左右的结果相符[12]。这说明 SAT 法可提高涂阴患者的阳性检出率,减少漏诊,对于临床诊断肺结核具有重要的意义。

以液体培养为金标准时, SAT 法的特异度为 79.38%(408/514),特异度随痰菌量的升高而降低。由于部分继发性肺结核患者间断排菌,使 SAT 法的特异度受到不同程度的影响,阴性结果排除结核感染的能力下降。

痰涂片、培养及 SAT 法的阳性检出率依次升高, SAT 法较痰涂片和培养的阳性检出率分别高 7.72%(80/1036)、4.63%(48/1036)。SAT 与痰涂

片、培养检测结果的结果进行一致性检验的 $Kappa$ 值分别为 0.63、0.68。说明 SAT 法与涂片、培养法比较具有较高的一致性,同时 SAT 法较传统金标准检测技术的阳性检出率高,有助于早期快速发现传染源、及时诊治继发性肺结核患者。

在涂片(+)培养(一)的 79 例患者中, SAT(+) 48 例,占 60.76%(48/79)。有数据表明痰标本中菌量少的情况下,痰涂片较培养的阳性检出率略高,原因是痰涂片是浓集法且可反复多次检查,而痰培养的前处理会对菌体的活力及数量有减损,从而导致涂片(+)培养(一)现象的发生。

有资料表明非结核分枝杆菌(NTM)和结核分枝杆菌复合群(MTC)在形态、临床表现及 X 线特征具有极高的相似性,但由于二者的临床治疗方案有很大差别,大部分 NTM 对抗结核药物具有耐药性,因此错误的诊断往往会延误治疗[13-14]。本研究中痰涂片(+)痰培养(一)SAT(一)的 31 例患者中,证实 NTM 病 4 例,提示多次涂片(+)而且阳性级别“+”以上但 SAT(一)的结果,高度可疑 NTM 感染,建议采用分子生物学方法进行分枝杆菌菌种鉴定,以正确区分 NTM 与 MTB,避免误诊;对于早期诊断与精准治疗具有重要意义。

本研究中涂片(+)培养(+)SAT(一)的患者 25 例,占 6.08%(25/411),而且本组患者的培养阳性时间为(28.37±9.58)d,普遍较长。多数为经过反复治疗,菌体活力下降,培养时复苏时间长。在进行 SAT 法检测时,初始模板少,扩增效率低,扩增曲线不规则易判为阴性;另外也不排除存在未知核酸扩增抑制物的可能。以上两种情况与文献报道一致[15],因此建议临床发现此类情况应及时与实验室人员联系复检,如果是由于核酸扩增抑制物的原因,

表 1 1036 例继发性肺结核患者痰涂片、液体培养和 SAT 技术检测结果(例数)

SAT	培养阳性			培养阴性			合计
	涂片阳性	涂片阴性	小计	涂片阳性	涂片阴性	小计	
阳性	386	78	464	48	58	106	570
阴性	25	33	58	31	377	408	466
合计	411	111	522	79	435	514	1036

表 2 SAT 法分别以痰涂片、液体培养为金标准比较所得出的敏感度和特异度等统计学指标结果

金标准	敏感度	特异度	准确度	阳性预测值	阴性预测值	$Kappa$ 值
痰涂片	88.57(434/490)	75.09(410/546)	81.47(844/1036)	76.14(434/570)	87.98(410/466)	0.63
液体培养	88.89(464/522)	79.38(408/514)	84.17(872/1036)	81.40(464/570)	87.55(408/466)	0.68

注 表中括号外数值为百分率(%),括号内分子与分母数值依据表 1 数据按照各指标公式计算后得出

经标本 10 倍稀释后检测,去除干扰后会得到标准的扩增曲线,对避免漏检意义重大。

为了最大程度地降低误差,提高各检查方法结果的一致率,本研究统一采用阳性检出率最高的晨痰样本作为检测标本。但在日常临床工作中难以做到一份痰样同时进行多个项目的检测(包括传统细菌学及快速分子生物学检查),由于每个痰杯中的痰样并不均一,出现有的结核检测项目阳性,有的项目未检出(除外每种检测方法敏感度的差异),导致产生同一患者同一时间横向对比结果不相符现象。笔者了解到,中国医科大学附属盛京医院借助医院信息系统(HIS)和实验室信息系统(LIS),对患者血标本进行全程条码管理,同时建立自动化患者标本运送和分配通道,实现一份标本可同时检测相同条件的多个检测项目。同理,能否借助信息自动化平台来将一个痰杯内的痰样混匀后,自动传输分配给不同的检测平台,来达到用一份痰液做几项结核检测项目,以此去除由于痰样不均一(分析前质量控制不达标)而产生的分析误差?笔者期盼结核界也有类似的方法和策略解决工作中这个难题。

综上所述,进入分子诊断时代,结核病的早期诊断也进入了一个新的时代,以 16s RNA 为靶标的 SAT 技术在不同程度上提高了检测结果的敏感度和精确度,2~3 h 即可获得检测报告^[16-17]。而且 SAT 检测在耗时和检测成本上均低于另一种快速分子检测方法 Xpert MTB/RIF 法^[18],试验要求较荧光 PCR 扩增法低^[19],在肺结核的早期诊断中是一种快速、准确、敏感的方法^[20]。因此,联合应用细菌学检测及 SAT 分子生物学检测方法,对早期诊断继发性肺结核患者,尽早发现传染源、及早有效实施治疗管理、降低高危人群的感染风险、保护易感人群等均具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] 陆再英,钟南山. 内科学. 7 版. 北京:人民卫生出版社,2008: 46-50.
- [2] 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.

- [3] Anochie PI, Onyeneke EC, Ogu AC, et al. Recent advances in the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*. Germs, 2012, 2(3): 110-120.
- [4] Palomino JC. Current developments and future perspectives for TB diagnostics. Future Microbiol, 2012, 7(1): 59-71.
- [5] 欧喜超, 夏辉, 李强, 等. 快速核酸提取环介导等温扩增检测技术在肺结核诊断中的应用评价. 中国防痨杂志, 2016, 38(5): 393-397.
- [6] 蔡杏珊, 马品云, 张院良, 等. 实时荧光核酸恒温扩增检测技术在结核病诊断中的临床应用. 中国防痨杂志, 2014, 36(6): 458-461.
- [7] 杨景卉, 陈晋. 实时荧光核酸恒温扩增技术在肺结核诊断中的应用价值. 临床肺科杂志, 2015, 20(2): 199-201.
- [8] 中华人民共和国卫生部疾病预防控制局, 中华人民共和国卫生部医政司, 中国疾病预防控制中心. 中国结核病防治规划实施工作指南(2008 年版). 北京: 中国协和医科大学出版社, 2009: 25-27.
- [9] 中华人民共和国卫生部. 中华人民共和国结核病分类标准. 中华人民共和国卫生行业标准(WS196-2001).
- [10] 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.
- [11] 崔振玲, 沙巍, 黄晓辰, 等. RNA 恒温扩增技术快速检测痰标本中结核分枝杆菌的研究. 中华结核和呼吸杂志, 2011, 34(12): 894-897.
- [12] Cui Z, Wang Y, Fang L, et al. Novel real-time simultaneous amplification and testing method to accurately and rapidly detect *Mycobacterium tuberculosis* complex. J Clin Microbiol, 2012, 50(3): 646-650.
- [13] Reves R, Schluger NW. Update in tuberculosis and nontuberculous mycobacterial infections 2013. Am J Respir Crit Care Med, 2014, 189(8): 894-898.
- [14] Schlossberg D. Tuberculosis and nontuberculous mycobacterial infections. 6th ed. Washington DC: American Society for Microbiology Press, 2011.
- [15] 倪丽丽, 罗柳林, 陈晋, 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. 中华检验医学杂志, 2012, 35(8): 702.
- [16] Sharma N, Nautiyal SC, Kaur P, et al. Advent in technologies for molecular diagnosis of tuberculosis. Adv Appl Sci Res, 2013, 4(3): 146-149.
- [17] 范琳, 王鹏, 杨妍, 等. RNA 恒温扩增实时荧光检测技术检测支气管肺泡灌洗液对涂阴肺结核的快速诊断价值. 中国防痨杂志, 2015, 37(2): 140-144.
- [18] 宋世森. 恒温扩增荧光检测法检测痰标本结核分枝杆菌复合群核酸的应用分析. 结核病与肺部健康杂志, 2016, 5(1): 42-46.
- [19] 白广红, 朱蕾, 高漫. 7 种实验方法诊断结核病的临床应用价值. 临床荟萃, 2014, 29(6): 608-611.
- [20] 许光辉, 赵柳婵, 陈华, 等. 实时荧光核酸恒温扩增技术在肺结核诊断中的价值分析. 临床肺科杂志, 2015, 20(8): 1487-1489.

(收稿日期:2016-07-18)

(本文编辑:薛爱华)