

• 论著 •

痰标本 RNA 恒温扩增技术对活动性肺结核的临床诊断价值

葛燕萍 张青

【摘要】 目的 评价结核分枝杆菌 RNA 恒温扩增实时检测法(SAT-TB)对活动性肺结核的临床诊断价值。**方法** 收集 2014 年 1 月至 2014 年 12 月上海市肺科医院收治的活动性肺结核患者 321 例[结核组,包括确诊肺结核(275 例)及临床诊断肺结核(46 例)]及肺部其他疾病患者 49 例(对照组)的痰标本,分别采用 SAT-TB 法、涂片镜检法及结核分枝杆菌快速培养法(采用“BACTEC™ MGIT™ 960 全自动分枝杆菌检测系统”,简称“BACTEC 960”)进行检测,根据检测结果分别计算敏感度、特异度、阳性预测值和阴性预测值。应用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,样本“率”的比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。**结果** 321 例结核组患者及 49 例对照组患者的痰标本,分别用 SAT-TB 法、涂片镜检法及 BACTEC 960 培养法检测,敏感度分别为 74.77%(240/321)、28.04%(90/321)、85.05%(273/321)。SAT-TB 法敏感度显著高于涂片镜检法,差异有统计学意义($\chi^2 = 140.297$, $P < 0.01$);SAT-TB 法敏感度低于 BACTEC 960 培养法,差异有统计学意义($\chi^2 = 10.565$, $P < 0.01$)。涂片镜检法与 SAT-TB 法的特异度均为 100.00%(49/49),而 BACTEC 960 培养法的特异度为 95.92%(47/49);3 种检测方法特异度比较,差异无统计学意义($\chi^2 = 4.055$, $P > 0.05$)。273 例 BACTEC 960 培养法检测阳性的肺结核患者中,SAT-TB 法检测阳性 230 例,敏感度为 84.25%(230/273);涂片镜检法阳性 88 例,敏感度为 32.23%(88/273),两者敏感度比较差异有统计学意义($\chi^2 = 151.847$, $P < 0.01$)。SAT-TB 法检测 275 例确诊肺结核患者的敏感度为 84.36%(232/275),阳性预测值为 100.00%(232/232),阴性预测值为 53.26%(49/92)。**结论** SAT-TB 法敏感度高于涂片镜检法,特异度与 BACTEC 960 培养法相近,对于涂阴活动性肺结核有一定临床诊断价值。

【关键词】 结核,肺/诊断; 核酸扩增技术; 敏感度与特异度

Clinical value of simultaneous amplification and testing method of sputum specimen for the diagnosis of active pulmonary tuberculosis GE Yan-ping, ZHANG Qing. Shanghai Key Laboratory of Tuberculosis, Tuberculosis Diagnosis Center, Shanghai Pulmonary Hospital affiliated to Tongji University School of Medicine, Shanghai 200433, China
Corresponding author: ZHANG Qing, Email: zhqi709851@sohu.com

【Abstract】 Objective To evaluate the clinical value of the simultaneous amplification and testing method for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* (SAT-TB) for the diagnosis of active pulmonary tuberculosis (TB). **Methods** Sputum specimens from 321 active pulmonary TB (including confirmed tuberculosis (275 cases) and clinical diagnosis tuberculosis (46 cases)) and 49 patients with other lung diseases admitted in Shanghai Pulmonary Hospital were tested with SAT-TB, smears and BACTEC 960 cultures. Sensitivity, specificity, positive and negative predictive values were calculated according to test results. Using SPSS 19.0, data were compared with χ^2 test, $P < 0.05$ was considered statistically significant. **Results** The sensitivities of SAT-TB, smears and cultures were 74.77% (240/321), 28.04% (90/321) and 85.05% (273/321), respectively. The sensitivity of SAT-TB was significantly higher than that of smear ($\chi^2 = 140.297$, $P < 0.01$), but significantly lower than that of cultures ($\chi^2 = 10.565$, $P < 0.01$). The specificities of SAT-TB, smear and cultures were 100.00% (49/49), 100.00% (49/49) and 95.92% (47/49), respectively, no statistical significance can be drawn ($\chi^2 = 4.055$, $P > 0.01$). In 273 cases of pulmonary TB with culture positive, 230 cases were SAT-TB positive, the sensitivity of SAT-TB was 84.25% (230/273), whereas only 88 cases were smear positive, the sensitivity of smear was 32.23% (88/273), significantly lower than that of SAT-TB ($\chi^2 = 151.847$, $P < 0.01$). The positive and negative predictive values for SAT-TB were 100.00% (232/232) and 53.26% (49/92), respectively. **Conclusion** The sensitivity of SAT-TB was significantly higher than that of smear, the specificity of SAT-TB was closely equal to that of culture. SAT-TB has clinical value

for the diagnosis of active pulmonary TB with smear negative.

【Key words】 Tuberculosis, pulmonary/diagnosis; Nucleic acid amplification techniques; Sensitivity and specificity

世界卫生组织的统计结果表明,目前全球约有 20 亿例结核分枝杆菌感染者,并且以每年 800~1000 万例的速度递增,约 200 万例患者死于结核病^[1-2]。2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查(简称“流调”)报告显示结核病疫情较 2000 年流调结果有所下降,但活动性肺结核患病率下降较慢,因此,我国的结核病负担仍很严重^[3]。预防和控制结核病传播的重要手段是早期、快速诊断。目前,临床确诊肺结核的传统方法仍是痰涂片镜检法及分枝杆菌培养法,但涂片法阳性率低,而培养法耗时长。因此,临床上亟需一种新的诊断技术。结核分枝杆菌 RNA 恒温扩增实时检测法(simultaneous amplification and testing for *Mycobacterium tuberculosis*, SAT-TB)是基于 RNA 恒温扩增技术发展起来的一项最新的核酸检测技术。它是以结核分枝杆菌特异的 16S rRNA 作为检测靶标,通过恒温 RNA 扩增技术扩增靶标片段,荧光标记的探针与靶标片段的扩增产物杂交后释放出荧光信号,对荧光信号进行实时检测,从而快速准确地判断待检样本中是否有结核分枝杆菌的存在。

笔者通过回顾性研究,对上海市肺科医院 2014 年 1 月至 2014 年 12 月收治的活动性肺结核及其他肺部疾病患者的痰液标本分别进行 SAT-TB、涂片镜检及结核分枝杆菌快速培养(采用“BACTEC™ MGIT™ 960 全自动分枝杆菌检测系统”,简称“BACTEC 960”),比较 3 种检测方法的差异,以评价 SAT-TB 法对活动性肺结核的临床诊断价值。

材料与方法

一、研究对象

1. 结核组:收集 2014 年 1 月至 2014 年 12 月上海市肺科医院收治的活动性肺结核患者 321 例,其中男 211 例,女 110 例,年龄 18~70 岁,平均(47.5±11.6)岁。活动性肺结核的诊断依据《肺结核诊断和治疗指南》^[4]进行。根据细菌学及病理学检测结果,本研究将活动性肺结核分为确诊肺结核(275 例)及临床诊断肺结核(46 例)。(1)确诊肺结核:指有肺结核临床症状和胸部影像学表现,且痰涂片或分枝杆菌培养阳性,菌型鉴定为结核分枝杆菌;或支气管或肺部组织病理证实结核病变。(2)临床诊断肺结

核:是指不具备细菌学及病理学诊断依据,但临床症状及胸部影像学表现符合活动性肺结核表现,且能排除其他肺部疾病,并经诊断性抗结核治疗有效。活动性肺结核依据痰细菌学结果分为涂片阳性培养阳性(简称“涂阳培阳”)、涂片阳性培养阴性(简称“涂阳培阴”)、涂片阴性培养阳性(简称“涂阴培阳”)及涂片阴性培养阴性(简称“涂阴培阴”)肺结核。涂阳培阳、涂阳培阴、涂阴培阳属于确诊肺结核;涂阴培阴属于临床诊断肺结核。

2. 对照组:收集 2014 年 1 月至 2014 年 12 月上海市肺科医院收治的肺部其他疾病患者 49 例,其中男 28 例,女 21 例,年龄 28~68 岁,平均(43.3±10.1)岁。肺部其他疾病包括慢性支气管炎 27 例(55.10%),肺炎 8 例(16.33%),肺癌 5 例(10.20%),支气管扩张 4 例(8.16%),非结核分枝杆菌肺病 2 例(4.08%),结节病 2 例(4.08%),尘肺 1 例(2.04%)。上述患者诊断均依据相关诊断标准^[5]。所有患者均无 HIV 感染及严重的全身疾病。两组患者均知情同意并签署知情同意书。

二、研究方法

留取患者晨起漱口后的痰液标本,根据我国《结核病诊断细菌学检验规程》^[6]进行预处理,并将标本分为 3 份,分别进行 SAT-TB 法、涂片镜检法及 BACTEC 960 培养法检测。

1. SAT-TB 法:检测试剂盒采用上海仁度生物科技有限公司生产的 SAT-TB 试剂盒,根据说明书进行操作。将预处理的标本按 1:100 的比例用 TB 稀释液(一种裂解缓冲液,采用焦碳酸二乙酯处理过的无菌水配制 10 mmol/L 柠檬酸钠)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 300 W;超声处理结束后,取出 2 μl 处理物,在其中加入 30 μl 扩增检测液(一种混合液,含 40 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液, pH=8.1),开启恒温荧光检测仪器(上海精宏实验设备有限公司),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,共检测 40 次;反应结束后置于恒温混匀仪(上海精宏实验设备有限公司)上 42℃ 保温 5 min,同时将 SAT 酶液(含 M-MLV 逆转录酶和 T7 RNA 转录酶各 2000 U)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。

2. 涂片镜检法:采用萋-尼抗酸染色镜检,操作按《结核病诊断细菌学检验规程》^[6]进行。

3. BACTEC 960 培养法:试剂盒及仪器来源于碧迪医疗器械(上海)有限公司。对于培养阳性标本进一步行菌种鉴定,以明确是哪种分枝杆菌。

4. 各指标计算方法:敏感度=真阳性例数/(真阳性例数+假阴性例数)×100%;特异度=真阴性例数/(真阴性例数+假阳性例数)×100%;阳性预测值=真阳性例数/(真阳性例数+假阳性例数)×100%;阴性预测值=真阴性例数/(真阴性例数+假阴性例数)×100%。

三、统计学分析

应用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,样本“率”的比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、两组患者 3 种检测方法的检出结果

结核组 321 例患者痰涂片镜检阳性 90 例(28.04%),BACTEC 960 培养法检测结核分枝杆菌阳性 273 例(85.05%),SAT-TB 法检测阳性 240 例(74.77%)。3 种方法敏感度比较,差异有统计学意义($\chi^2=253.207, P<0.01$)。进一步对 3 种方法进行两两比较,SAT-TB 法的敏感度高于涂片镜检法,差异有统计学意义($\chi^2=140.297, P<0.01$);

SAT-TB 法的敏感度低于 BACTEC 960 培养法,差异有统计学意义($\chi^2=10.565, P<0.01$)。对照组 49 例患者痰标本涂片镜检法及 SAT-TB 法的检出结果均为阴性,特异度均为 100.00%(49/49),而 BACTEC 960 培养检出 2 例阳性,但最终菌型鉴定结果为非结核分枝杆菌,特异度为 95.92%(47/49)。3 种方法特异度比较,差异无统计学意义($\chi^2=4.055, P>0.05$)(表 1)。

二、SAT-TB 法与涂片镜检法在 BACTEC 960 培养法阳性患者中的检测结果

在 273 例 BACTEC 960 培养法阳性的结核组患者中,SAT-TB 法的敏感度为 84.25%(230/273),涂片镜检法的敏感度为 32.23%(88/273),差异有统计学意义($\chi^2=151.847, P<0.01$)(表 2)。

三、SAT-TB 法检测结果与不同细菌学检测结果的比较

SAT-TB 法检测 275 例确诊肺结核患者的敏感度为 84.36%(232/275),阳性预测值为 100.00%(232/232),阴性预测值为 53.26%(49/92),具体见表 3;90 例痰涂片镜检阳性的患者,其 SAT-TB 法检测结果均为阳性,诊断敏感度达 100.00%(90/90)。

讨 论

活动性肺结核诊治流程中的关键环节是如何早期、及时、准确地诊断,而目前要做到这点主要依赖

表 1 3 种检测方法对两组患者检测的敏感度及特异度比较

检测方法	结核组(例)		对照组(例)		敏感度(%)	χ^2 值	P 值	特异度(%)	χ^2 值	P 值
	阳性	阴性	阳性	阴性						
涂片镜检法	90	231	0	49	28.04	253.207	0.000	100.00	4.055	0.132
SAT-TB 法	240	81	0	49	74.77			100.00		
BACTEC 960 培养	273	48	2	47	85.05			95.92		

注 敏感度=真阳性例数/(真阳性例数+假阴性例数)×100%;特异度=真阴性例数/(真阴性例数+假阳性例数)×100%

表 2 SAT-TB 法与涂片法在 BACTEC 960 阳性结核组患者中检测敏感度的比较

检测结果	BACTEC 960 培养(例)		敏感度(%)	χ^2 值	P 值
	阳性	阴性			
SAT-TB			84.25	151.847	0.000
阳性	230	10			
阴性	43	38			
涂片镜检			32.23		
阳性	88	2			
阴性	185	46			

注 敏感度=真阳性例数/(真阳性例数+假阴性例数)×100%

表 3 不同细菌学检测结果与 SAT-TB 法检测结果的比较

结核组类别 细菌学检测结果	总例数	SAT-TB 法(例)		敏感度 (%)	特异度 (%)	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)
		阳性	阴性				
确诊肺结核				84.36	100.00	100.00	53.26
涂阳培阳	88	88	0				
涂阳培阴	2	2	0				
涂阴培阳	185	142	43				
临床诊断肺结核				17.39	100.00	100.00	56.32
涂阴培阴	46	8	38				

注 敏感度=真阳性例数/(真阳性例数+假阴性例数)×100%;特异度=真阴性例数/(真阴性例数+假阳性例数)×100%;阳性预测值=真阳性例数/(真阳性例数+假阳性例数)×100%;阴性预测值=真阴性例数/(真阴性例数+假阴性例数)×100%

于实验室诊断技术。肺结核的实验室诊断主要包括痰涂片镜检法、培养法、分子生物学方法及免疫学方法等。近年来,分子生物学技术在活动性肺结核的诊断中发挥了越来越重要的价值。1996 年美国疾病预防控制中心推荐核酸扩增试验(nucleic acid amplification, NAA)用于涂阴肺结核的诊断,并于 2000 年对流程进行了更新^[7-8]。常用的 NAA 技术包括常规聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)、实时荧光定量 PCR、核酸恒温扩增检测技术等。其中恒温扩增技术包括 SAT-TB 和环介导等温扩增法(loop mediated isothermal amplification, LAMP)等。

本研究结果显示,对于 321 例活动性肺结核患者,SAT-TB 法检测敏感度为 74.77%(240/321),明显高于传统的涂片镜检法(28.04%,90/321),但低于 BACTEC 960 培养法(85.05%,273/321)。

结核分枝杆菌培养及菌型鉴定法长期以来被誉为结核分枝杆菌诊断的“金标准”^[9]。对 273 例 BACTEC 960 培养法阳性且菌型鉴定为结核分枝杆菌的结核组患者及 49 例对照组患者的痰标本进行检测,结果显示 SAT-TB 法的敏感度为 84.25%(230/273),特异度为 100.00%(49/49)。从检测时间上,SAT-TB 法仅需 1.5 h 就能得到结果,速度明显快于 BACTEC 960 培养法,而检测结果与培养法一致率达 84.25%(230/273),也就是说 SAT-TB 法能够在最短的时间内提供准确率为 84.25%的检测结果。应用 SAT-TB 检测技术,可以在较短的时间内得到相对敏感度较高的检测结果。49 例对照组患者中有 2 例为 NTM 肺病,其 BACTEC 960 培养结果均阳性,而 SAT-TB 法检测结果均为阴性,可见 SAT-TB 法可区分是否为结核分枝杆菌感染。因此,在一定条件下,SAT-TB 法能够替代 BACTEC 960 培养法,有望成为实验室诊断的新方

法,是一项很有市场前景的新技术^[10]。

根据痰细菌学结果将活动性肺结核患者分为确诊及临床诊断两组。结果发现,在 275 例确诊肺结核组中,90 例痰涂片镜检法阳性,其 SAT-TB 法检测结果均阳性,诊断敏感度达 100.00%(90/90),这一结果与崔振玲等^[11]报道的结果相仿。由此说明对于活动性肺结核患者,SAT-TB 法检测结果阳性可以确认结核病诊断,但 SAT-TB 法检测结果阴性却并不能完全排除结核病的诊断。

我国多次结核病流调结果均显示,涂阴肺结核占活动性肺结核患者的比例较高,从 1979 年的 73.9%上升到 2010 年的 85.6%,涂阴肺结核成为我国肺结核患病率下降缓慢的主要原因^[12]。由于涂阴肺结核患者缺乏痰涂片抗酸杆菌阳性结果,故对其进行痰培养或分子生物学检查,获得病原学检查阳性依据,能大大提高涂阴肺结核诊断的准确性,减少误诊。本研究结果显示,在 321 例活动性肺结核患者中,涂阴患者有 231 例(其中 185 例为 BACTEC 960 培养法阳性,46 例为 BACTEC 960 培养法阴性),SAT-TB 法检出阳性 150 例,阳性率为 64.94%(150/231)。因此,对于痰涂片阴性的活动性肺结核患者而言,SAT-TB 法不失为一种新的辅助诊断手段,具有一定临床价值。SAT-TB 法对于细菌学阴性的活动性肺结核患者(即涂阴培阴的 46 例患者)阳性率仅为 17.39%(8/46),但对于痰涂片阴性的活动性肺结核患者(包括涂阴培阴的 46 例患者及涂阴培阳的 185 例患者,共 231 例),阳性率达 64.94%(150/231),因此 SAT-TB 法对于痰涂片阴性的活动性肺结核患者,检测阳性率并不算低。范琳等^[13]利用 RNA 恒温扩增实时荧光检测技术检测支气管肺泡灌洗液来诊断涂阴肺结核,该方法的敏感度、特异度、阳性预测值、阴性预测值分别为 81.0%、96.9%、95.9%、84.9%,这一结果也证实了

上述观点。

综上所述, SAT-TB 法敏感度高于涂片镜检法, 特异度接近 BACTEC 960 培养法, 但耗时更短, 且对于涂阴活动性肺结核有一定临床诊断价值, 值得在有实验室相关能力的医院推广。

参 考 文 献

- [1] Stop TB Partnership. The Global Plan to Stop TB, 2006—2015. Actions for life: towards a world free of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2006, 10(3): 240-241.
- [2] Amicosante M, Ciccozzi M, Markova R. Rational use of immunodiagnostic tools for tuberculosis infection: guidelines and cost effectiveness studies. *New Microbiol*, 2010, 33(2): 93-107.
- [3] 全国第五次结核病流行病学抽样调查技术指导组, 全国第五次结核病流行病学抽样调查办公室. 2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告. *中国防痨杂志*, 2012, 34(8): 485-508.
- [4] 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.
- [5] 中华医学会. 临床诊疗指南: 呼吸病学分册. 北京: 人民卫生出版社, 2009.
- [6] 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.
- [7] Centers for Disease Control and Prevention(CDC). Nucleic acid amplification tests for tuberculosis. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 1996, 45(43): 950-952.
- [8] Centers for Disease Control and Prevention(CDC). Update: nucleic acid amplification tests for tuberculosis. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2000, 49(26): 593-594.
- [9] 姜美娟, 梁冰. 结核分枝杆菌感染实验室诊断新进展及其应用. *中国微生态学杂志*, 2013, 25(3): 368.
- [10] 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). *中国防痨杂志*, 2013, 35(6): 405-426.
- [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] 薛晓, 马艳, 刘二勇, 等. 涂阴肺结核患者的诊断与治疗研究进展. *中国防痨杂志*, 2015, 37(5): 526-530.
- [13] 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.

(收稿日期: 2016-05-31)

(本文编辑: 郭萌)