

实时荧光定量聚合酶链反应在肺结核诊断中的应用

毛文捷, 邹盛华, 张丽水, 黄明翔, 戴腊梅(福建省福州市肺科医院 350008)

【摘要】 目的 探讨实时荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)在肺结核诊断中的应用价值。方法 应用 FQ-PCR 对临床诊断肺结核及其他肺部疾病患者的临床标本进行结核分枝杆菌 DNA 定量检测,同时与涂片抗酸染色、BACTEC 960 培养法作比对。结果 189 例临床诊断肺结核患者 FQ-PCR 检测 123 例阳性,提示敏感度为 65.1% (123/189),而涂片抗酸染色、BACTEC 960 培养法分别为 40.2% (76/189)、63.5% (120/189)。94 例其他肺部疾病患者及 20 例健康对照者 FQ-PCR 检测均为阴性,特异度为 100.0%。结论 FQ-PCR 敏感度和特异度均高,检测过程简单、易标准化、全过程仅需 4~5 h,可用于结核病的快速诊断。

【关键词】 实时荧光定量聚合酶链反应; 肺结核; 临床诊断

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.18.008 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)18-2273-02

Application of Real-time fluorescence quantitative PCR in diagnosis of mycobacterium tuberculosis MAO Wen-jie, ZOU Sheng-hua, ZHANG Li-shui, HUANG Ming-xiang, DAI La-mei (Fuzhou Pulmonary Hospital, Fujian 350008, China)

【Abstract】 **Objective** The aim of study was to evaluate the clinical value of diagnosis of mycobacterium tuberculosis by real-time fluorescence quantitative PCR. **Methods** Real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect the copies of TB DNA of the specimens from M. tuberculosis patients and other patients with non-tuberculosis respiratory system disease, and it was also compared with the two methods of smear acid-fast stain and culture with BACTEC MGIT 960 system. **Results** Of all the 189 M. tuberculosis patients, 123 cases were positive by real-time fluorescence quantitative PCR, the sensitivity was 65.1% (123/189). The sensitivities of smear acid-fast stain, culture with BACTEC MGIT 960 system were 40.2% (76/189), 63.5% (120/189). 94 cases of other pulmonary diseases and 20 cases of healthy subjects were negative, the specificity of the method was 100%. **Conclusion** Real-time fluorescence quantitative PCR showed high specificity and sensitivity for diagnosis tuberculosis. The process is simple and easy to standardize. The whole process only demanded 4-5 hours. It is very suitable for rapidly diagnosis of tuberculosis.

【Key words】 real-time fluorescence quantitative PCR; mycobacterium tuberculosis; clinical diagnosis

实时荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)技术于 1996 年由美国应用生物(Applied Biosystems)公司推出,较常规 PCR(end-point PCR)不同,可在 PCR 指数扩增期间通过连续监测荧光信号强弱的变化来即时测定特异性产物的量,并据此推断目的基因的初始量,不需要取出 PCR 产物进行分离。本院于 2007 年从美国 Applied Biosystems 公司引进该技术,应用于结核病的临床诊断。本研究对 189 例临床诊断肺结核患者的痰液进行 FQ-PCR 检测、BACTEC 960 培养和涂片抗酸染色,并对结果进行对比分析,探讨 FQ-PCR 在肺结核诊断中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取本院 2010 年 1 月至 2010 年 3 月住院的经细菌学确诊的肺结核患者 189 例,其中男 102 例,女 87 例,年龄 18~75 岁,平均 33.8 岁。其他肺部疾病患者 94 例,其中肺炎 19 例,非结核分枝杆菌肺病 20 例,支气管扩张 24 例,肺癌 31 例。另取门诊健康体检者 20 例作为对照组,其中男女各 10 例,年龄 20~55 岁。

1.2 仪器与试剂 美国应用生物(Applied Biosystems)公司生产的 ABI7300 荧光定量扩增仪,结核分枝杆菌核酸扩增 PCR 荧光检测试剂盒为中山大学达安基因股份有限公司生产,美国 BD 公司 BACTEC 960 全自动分枝杆菌检测仪及配套试剂,奥林巴斯显微镜,抗酸染色液(自制)。质控菌株:结核分

枝杆菌(ATCC27294)。

1.3 方法 189 例肺结核患者采集早晨痰液标本 3 份,分别进行 FQ-PCR 检测,涂片抗酸染色镜检及 BACTEC 960 培养。其他肺部疾病患者 94 例及健康体检者 20 例采集晨痰标本 1 份进行 A 组实验。

1.3.1 PCR 检测 (1)痰液中加入 4 倍体积的 4% NaOH,摇匀,室温下放置 30 min 左右液化,取 1.0 mL 至离心管中,再加入 0.5 mL 4% NaOH,室温放置 10 min 后 15 000 r/min 离心 5 min。去上清液,沉淀加无菌生理盐水 1 mL 打匀,15 000 r/min 离心 5 min,再重复一次,沉淀加 50 μ L DNA 提取液,置沸水浴 10 min。10 000 r/min 离心 5 min,取上清液 2 μ L 做 PCR。取单管单人份 PCR 反应管若干,加入处理后样品 2 μ L,8 000 r/min 离心 5 s。将各反应管放入 PCR 仪,按下列条件扩增:93 $^{\circ}$ C 2 min;93 $^{\circ}$ C 45 s,55 $^{\circ}$ C 120 s,10 个循环;置 33 $^{\circ}$ C 保温,迅速逐个将反应管放入荧光检测仪,读取并记录读数 A_0 。荧光激发波长为 487 nm,检测波长为 525 nm。最后按 93 $^{\circ}$ C 45 s,55 $^{\circ}$ C 120 s,30 个循环;置 33 $^{\circ}$ C 保温。(2)反应结束后保存检测数据文件。根据分析后图像调节 baseline 的 start 值(2~4)、stop 值(7~9)以及 Threshold 值,最后到 reporter 窗口下记录仪器自动分析计算出的 Ct 值。(3)结果判定。在实验有效的前提下根据 Ct 值判定阴阳性,Ct 值大于或等于 30 为阴性,Ct 值小于 30 为阳性。

1.3.2 涂片抗酸染色 所有送检的痰标本严格按照《结核病诊断细菌学检验规程》操作^[1],每份标本涂片 3 张,其中只要有 1 片为阳性即统计为阳性。

1.3.2 BACTEC 960 培养 所有送检的痰标本严格按照 BACTEC 960 操作规程,阴性报告时间设定为 42 d。

1.4 统计学处理 使用 SPSS13.0 进行统计计算,采用 χ^2 检验方法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

189 例肺结核患者的痰液 FQ-PCR 检测阳性者 123 例, BACTEC 960 培养阳性者 120 例,两者同时阳性的为 107 例, FQ-PCR 检测阳性而 BACTEC 960 培养阴性为 16 例, PCR 检测阴性而 BACTEC 960 培养阳性为 13 例。涂片抗酸染色阳性 76 例, FQ-PCR 和 BACTEC 960 培养均为阳性(表 1)。94 例其他肺部疾病患者及 20 例健康对照 FQ-PCR 检测均为阴性,特异度为 100.0%。

表 1 3 种方法检测结果对比

方法	总例数	阳性数	阳性率(%)
FQ-PCR	189	123	65.1
涂片抗酸染色	189	76	40.2 ^a
BACTEC 960 培养	189	120	63.5 ^b

注:与 FQ-PCR 比较, ^a $\chi^2 = 23.44, P < 0.01$, ^b $\chi^2 = 0.10, P > 0.05$ 。

3 讨 论

PCR 技术是一种先进的基因诊断方法,在肺结核的临床诊断中也得到了广泛应用。但是因为 PCR 污染问题而导致假阳性率高,一度引起人们的怀疑。自从 1996 年美国应用生物(Applied Biosystems)公司推出 FQ-PCR 技术,该技术不仅实现了 PCR 从定性到定量的飞跃,而且与常规 PCR(end-point PCR)相比,它具有特异性更强、有效解决 PCR 污染问题、自动化程度高等特点^[2]。

本研究采用 FQ-PCR 技术,利用一对结核分枝杆菌特异性引物和一条结核分枝杆菌特异性荧光探针,配以 PCR 反应液、耐热 DNA 聚合酶(Taq 酶)、4 种核苷酸单体(dNTPs)等成分,用 PCR 体外扩增法检测结核分枝杆菌 DNA,做定量检测,定性报告,使结果更准确。肺结核患者 FQ-PCR 检测敏感度为 65.1%(123/189),94 例其他肺部疾病患者及 20 例健康对照 FQ-PCR 检测均为阴性,提示特异度为 100.0%。

结核病诊断的金标准是检出痰液中的结核分枝杆菌,传统的方法是痰培养发现结核分枝杆菌或痰涂片抗酸染色发现抗酸杆菌, FQ-PCR 技术则是检测痰液标本中结核分枝杆菌 DNA 的含量。FQ-PCR 敏感度最高为 65.1%(123/189), BACTEC 960 培养法、涂片抗酸染色分别为 63.5%(120/189)和 40.2%(76/189)。FQ-PCR 与抗酸染色比较差异有统计学意义($\chi^2 = 23.44, P < 0.01$),而与 BACTEC960 培养比较无统计学意义($\chi^2 = 0.10, P > 0.05$)。

FQ-PCR 直接检测痰液标本中结核分枝杆菌 DNA 的含量,敏感度和特异度均高,整个过程仅需 4~5 h,出报告时间短,可以送检当天出报告,在患者就诊的当天就能确诊,有利于患者的及时诊断和治疗。BACTEC 960 培养法敏感度高,但是培养周期较长,不利于结核病的早期发现和早期治疗。李洪敏

等^[3]报道 BACTEC 960 培养法初代分离标本阳性报告平均时间为 7.2 d,本实验室略长,为 8.9 d,阴性报告时间均设定为 42 d。痰涂片抗酸染色简单易行,出报告快,费用低廉,可以起到筛查的作用,缺点是阳性率低,易漏诊。

3 种方法均要求患者留取合格的痰液标本,以早晨痰液为最佳。操作者应取材恰当,挑取脓液或带血部分,以避免选择唾液部分。BACTEC 960 培养要求及时送检,不能及时处理的标本应低温保存。由于 BACTEC 960 培养前处理的设计缺陷,不可避免导致一定的污染率。穆成等^[4]报道 BACTEC 960 培养污染率为 4.95%,高于改良罗氏培养基培养的 2.12%。痰涂片抗酸染色也要求及时送检,以避免痰液液化,影响阳性检出率。而 FQ-PCR 直接检测痰液标本中结核分枝杆菌 DNA 的含量,关键是 DNA 的提取过程,尤其是痰液或病理组织样本均质化处理,对于标本送检时间要求不高,不存在污染重送的问题。在结核分枝杆菌 DNA 提取过程中,为提高阳性检出率,可在加入 DNA 提取液,置沸水浴 10 min 后,转至 4℃ 静置 6~8 h,以保证充分裂解。

FQ-PCR 技术因其极为有效可靠,而广泛应用于分子生物学研究各领域。目前已经广泛应用于结核病的临床诊断中。适用于各种临床标本中结核分枝杆菌 DNA 的直接检测,包含血液标本。而 BACTEC 960 培养和涂片抗酸染色则不适用于血液标本。黄玮和张永乐^[5]报道应用荧光定量 PCR 检测结核分枝杆菌在支气管灌洗液中检出率最高,其次为痰液,检出率最低为血液。有条件的医院最好在支气管镜下直接从病变的病灶部位取得标本,可以提高检出率。此外,还可用于分枝杆菌菌种快速鉴定及抗结核药耐药基因的快速检测等^[6]。

综上所述,作者认为 FQ-PCR 技术具有快速、准确、特异性强、阳性率高、需时短、缩短了结核菌的检测时间等独特的优点,为结核病的快速诊断提供了更有效的手段,为早期治疗提供有效支持。

参考文献

- [1] 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, 118(1-3): 30-33, 80-85, 127-134.
- [2] 李加平. 荧光定量聚合酶链反应在淋巴结核鉴别诊断中的应用[J]. 检验医学与临床, 2011, 8(1): 67-68.
- [3] 李洪敏, 吴雪琼, 王巍, 等. 新型 BACTEC MGIT 960 全自动快速分枝杆菌培养鉴定药敏仪及其应用[J]. 现代科学仪器, 2000, 16(2): 61-62.
- [4] 穆成, 赵德福, 赵慧, 等. 应用 BACTEC 960 系统与改良罗氏培养基从肺外标本分离培养分枝杆菌的效果比较[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(11): 2579-2580.
- [5] 黄玮, 张永乐. 肺结核分枝杆菌在不同标本类型中的分布[J]. 医学研究杂志, 2009, 38(3): 75-76.
- [6] 白广红, 梁雅萍, 朱蕾. BACTEC MGIT 960 system 快速分离结核杆菌的效果评价[J]. 实用医技杂志, 2006, 13(18): 3187-3188.

(收稿日期: 2012-02-08)