

5 种结核杆菌检测方法的临床应用价值^{*}

王震¹, 龚玉华², 钱彩娣¹, 孙春红², 王雪梅², 施瑜¹, 周丽萍³, 傅行礼³, 邵启祥³ (1. 江苏省镇江市第二人民医院检验科 212000; 2. 江苏省镇江市第三人民医院检验科 212000; 3. 江苏大学医学技术学院, 江苏镇江 212002)

【摘要】目的 比较和分析免疫磁珠捕获联合双内标聚合酶链反应-酶联免疫吸附试验定量检测结核杆菌技术(IMC-PCR-ELISA)与其他几种结核杆菌检测法在结核病诊断中的临床应用价值。**方法** 以 102 例结核分枝杆菌培养阳性的患者作为阳性对照, 以 48 例结核分枝杆菌培养阴性的非结核普通住院患者作为阴性对照。比较抗酸染色涂片法(AFS)、免疫磁珠-抗酸染色涂片法(IMC-AFS)、金标抗结核抗体检测法(DICA)、普通 PCR 及 IMC-PCR-ELISA 的敏感性、特异性。**结果** IMC-PCR-ELISA 定量检测结核分枝杆菌全过程约 4.5 h, 最低检测限为 5 copy/ μ L, 本法的特异性和敏感性均为 100.00%, 其他 4 种(AFS、IMC-AFS、DICA、普通 PCR)检测方法的敏感性分别为 35.29%、43.14%、60.78%、93.14%, 特异性分别为 95.83%、95.83%、75.00%、91.67%。**结论** IMC-PCR-ELISA 与 AFS、IMC-AFS、DICA 及普通 PCR 相比, 具有快速、灵敏、特异、可定量的特点, 是临床快速诊断结核病的有效检测方法。

【关键词】 结核分枝杆菌; 免疫磁珠; 聚合酶链反应-酶联免疫吸附试验; 检测方法

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.03.019 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)03-0334-03

The clinical value of 5 kinds of mycobacterium tuberculosis detection method^{*} WANG Zhen¹, GONG Yu-hua², QIAN Cai-di¹, SUN Chun-hong², WANG Xue-mei², SHI Yu¹, ZHOU Li-ping³, FU Xing-li³, SHAO Qi-xiang³ (1. Department of Clinical Laboratory, Zhenjiang Second People's Hospital, Zhenjiang, Jiangsu 212000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Zhenjiang Third People's Hospital, Zhenjiang, Jiangsu 212000, China; 3. Medical Technology College of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212002, China)

【Abstract】Objective To analyze and compare the detection method for tuberculosis by immunomagnetic beads capture combined with PCR-ELISA with double internal standard (IMC-PCR-ELISA) and other testing methods, and discuss its clinic application. **Methods** To tally 102 patients with culture-positive tuberculosis from sputum were used as positive control, 48 nontuberculosis inpatients with culture-negative tuberculosis from sputum were used as negative control. And the sensitivity and specificity of smear acid-fast stain (AFS), immune magnetic beads smear acid-fast stain method (IMC-AFS), jinbiao anti-tuberculosis antibody assay (DICA), ordinary PCR and IMC-PCR-ELISA were compared. **Results** The results showed that the IMC-PCR-ELISA could yield quantitative results within about 4.5 h with a detection limit at 5 copy/ μ L, the specificity and sensitivity of this method were all 100.00%. The sensitivity of the AFS, IMC-AFS, DICA and ordinary PCR were 35.29%, 43.14%, 60.78% and 93.14%, while the specificity were 95.83%, 95.83%, 75.00% and 91.67%, respectively. **Conclusion** Compared with AFS, IMC-AFS, DICA and ordinary PCR, the IMC-PCR-ELISA is rapid, sensitive, specific and quantitative method for detecting tuberculosis, which can be taken as a helpful method for rapid detection of TB.

【Key words】 mycobacterium tuberculosis; immunomagnetic beads; PCR-ELISA; detection methods

结核病是由结核分枝杆菌感染引起的慢性传染病, 是全球最具威胁的传染病之一。据世界卫生组织统计, 我国患结核病人人数居世界第 2 位, 是全世界 22 个结核病流行严重的国家之一^[1]。当前, 我国在结核病控制方面所面临的问题是结核病的早期诊断, 尤其是痰菌阴性肺结核的诊断^[2]。目前, 临床实验室常用的结核杆菌检测方法有抗酸染色镜检法、细菌培养法、抗结核抗体检测法及分子生物学检测法等^[3]。其中, 痰涂片抗酸染色镜检法方法简单、快速, 但敏感性较差, 每毫升标本中需 5 000~10 000 条菌才呈阳性结果^[4]。培养法耗时较长, 且不适合一般实验室开展(P2 级以下实验室不允许做)。血清抗结核抗体检测在临床应用中也存在假阳性和假阴性的问题^[5]。近年来, 分子生物学技术检测结核分枝杆菌, 克服了传统方法

的诸多不足, 能更快速、敏感、特异地鉴定结核杆菌感染。本文通过对比分析本室建立的免疫磁珠捕获联合双内标聚合酶链反应-酶联免疫吸附试验定量检测法(IMC-PCR-ELISA)与抗酸染色涂片法(AFS)、免疫磁珠-抗酸染色涂片法(IMC-AFS)、金标抗结核抗体检测法(DICA)、普通 PCR 在结核病诊断中的临床应用价值, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 选取 2010 年 10 月至 2013 年 11 月镇江市第三人民医院(镇江市传染病医院)的 102 例临床诊断为肺结核且结核分枝杆菌培养阳性的患者痰标本和血清标本作为阳性对照; 选取镇江市第二人民医院的 48 例结核分枝杆菌培养阴性的非结核普通住院患者的痰标本和血清标本作为阴性对照。

^{*} 基金项目: 江苏省镇江市社会发展基金资助项目(SH2010019)。

作者简介: 王震, 男, 本科, 副主任技师, 主要从事临床微生物检验工作。

质控菌株;结核分枝杆菌标准菌株 H37Ra、非结核分枝杆菌来自镇江市第三人民医院(镇江市传染病医院);大肠埃希菌(ATCC 25922)、金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)、绿脓假单胞菌(ATCC 27853)菌株为本室保存。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 酸性罗氏培养基、对硝基苯甲酸(PNB)和噻吩-2-羟酸肼(TCH)鉴别培养基、抗酸杆菌染色液均由珠海贝索生物技术有限公司提供。

1.2.2 免疫磁珠 Dynal 公司生产的 rabbit-IgG Dynabeads 磁珠表面结合结核分枝杆菌抗体(Abcam 公司产品)。

1.2.3 结核分枝杆菌 IgG 抗体检测试剂盒由南京大渊生物技术工程有限责任公司提供。

1.2.4 PCR 试剂盒为日本 Takara 生物技术有限公司产品;引物、高/低内标模板(内标模板与 PCR 扩增目的片段等长且与目的模板在引物区的序列相同)、杂交探针(3'端用地高辛标记)由宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.2.5 主要仪器 Hettich-UNIVERSAL16R 型低温高速离心机(德国 Hettich 公司产品);Mastercycler Personal 5332 型 PCR 扩增仪(德国 Eppendorf 公司产品);国产 BS-423 型电泳仪(北京生化仪器厂产品);国产 MD-300 型紫外多功能分析仪(镇江美达生物仪器有限公司产品)。

1.3 方法

1.3.1 标本处理 患者晨痰标本加入等量消化剂,涡旋振荡 30 s,室温静置 15 min,其间摇动数次,使痰液完全液化无痰丝。取液化痰液 1 mL 5 000 转离心 10 min,沉淀加入 0.5 mL pH 值 7.2 的磷酸盐缓冲液(PBS)混匀;清晨空腹抽取患者外周静脉血 5 mL,分离血清。

1.3.2 分枝杆菌培养及鉴定按照《结核诊断实验室检验规程》执行。

1.3.3 AFS 操作步骤 取处理后的痰标本 0.1 mL 在玻片右侧 2/3 处,均匀涂抹成 2.0 cm×2.5 cm 的卵圆形痰膜,自然干燥后火焰固定,加石碳酸复红溶液,徐徐加热至有蒸汽出现,染 5 min,水洗。加脱色剂,不时摇动玻片至无色脱落为止,水洗。加复染液,染 0.5~1.0 min,水洗,待玻片干燥后镜检。

1.3.4 IMC 操作步骤 在处理后的痰标本中加入结合有结核杆菌抗体的免疫磁珠 20 μL,置混匀仪上反应 30 min,经清洗后收集磁珠,加入 0.2 mL ddH₂O 混匀后备用。

1.3.5 IMC-AFS 操作步骤 取捕获处理后的免疫磁珠 0.1 mL,加 10 μL 小牛血清,混匀后同 AFS 制片染色,干燥后镜检。

1.3.6 DICA 操作步骤 按试剂盒说明书操作。

1.3.7 普通 PCR 操作步骤 取捕获处理后的免疫磁珠 0.1 mL,煮沸 10 min,取上清为模板^[6];在 PCR 反应管中加入 10×PCR buffer(Mg²⁺ Plus)5 μL,2.5 mmol/L 的 dNTP 4 μL,上、下游引物各 15 pmol(根据结核分枝杆菌复合体群 IS6110 序列设计的特异性引物),Taq 酶 2 U,模板液 2.5 μL。PCR 反应参数为:预变性 94 ℃ 4 min,变性 94 ℃ 35 s,退火 62 ℃ 35 s,延伸 72 ℃ 40 s,共 35 个循环,72 ℃ 再延伸 5 min;1%琼脂糖凝胶,1~5 V/cm,电泳溴酚蓝前沿距离凝胶前端 1 cm 时,切断电源。置于 0.5 μg/mL 溴化乙啶水溶液中,室温下染色 20~30 min,自来水冲洗凝胶后,于紫外灯下观察。

1.3.8 IMC-PCR-ELISA 操作步骤 (1)样本模板制备同上。(2)在 PCR 反应管中加入 10×PCR buffer(Mg²⁺ Plus)5 μL,2.5 mmol/L 的 dNTP 4 μL,上、下游引物各 15 pmol(根据结核分枝杆菌复合体群 IS6110 序列设计的特异性引物,上游引

物的 5'端用生物素修饰),Taq 酶 2 U,再加入 50 拷贝数的低标内参模板和 10 000 拷贝数的高标内参模板及样本模板 2.5 μL,最后加 ddH₂O 至 50 μL;PCR 反应参数为:预变性 94 ℃ 4 min,变性 94 ℃ 35 s,退火 62 ℃ 35 s,延伸 72 ℃ 40 s,共 20 个循环,72 ℃ 再延伸 3 min。(3)从反应后的 PCR 管中分别取 10 μL 到 3 孔加有 100 μL 稀释液(0.01 mol pH7.2 PBS)的链霉素和素预包被微孔板中,混匀,放置 45 ℃ 水浴 40 min,水洗;(4)加 100 μL 碱变性液(1.5 mol 氯化钠,0.15 mol 氢氧化钠),37 ℃ 水浴 15 min,加 1 mol HEPES 35 μL,混匀后,水洗。(5)在 3 孔中分别加入 100 μL 与 3 种模板对应的探针杂交液(探针浓度为 0.05 pmol/μL),放置 45 ℃ 水浴 40 min,水洗。(6)加 50 μL 抗 DIG 酶标记抗体,放置 37 ℃ 30 min,水洗,加入底物 37 ℃ 15 min,加 50 μL 2 mol/L 硫酸终止反应,5 min 内酶标仪 450 nm 测吸光度值,参考波长为 630 nm。(7)计算公式为:Y=10^X,其中 X=lg(低标拷贝数)+(lg(高标拷贝数)-lg(低标拷贝数)×(目的模板吸光度值-低标吸光度值)/(高标吸光度值-低标吸光度值))。

1.3.9 DICA 结果判断 按试剂盒说明书判断结果。

1.3.10 IMC-PCR-ELISA 结果判断 用酶标仪测量高标内参、低标内参、目的模板 3 个检测孔分别在 450 nm 处的吸光度值(参考波长为 630 nm),再用上述公式计算目的模板的拷贝数;检测灵敏度:通过试验确定,在 PCR 反应体系中,最佳低标内参模板量为 50 拷贝数,高标内参模板量为 10 000 拷贝数。通过加入系列不同拷贝数的目的模板,检测出本试验的最低检测限为 5 copy/μL。阳性质控菌株:结核分枝杆菌标准菌株 H37Ra;阴性质控菌株:非结核分枝杆菌、大肠埃希菌(ATCC 25922)、金黄色葡萄球菌(ATCC 25923)、绿脓假单胞菌(ATCC 27853)。

2 结 果

2.1 普通 PCR 245 bp 处扩增出目的条带为阳性结果,见图 1。

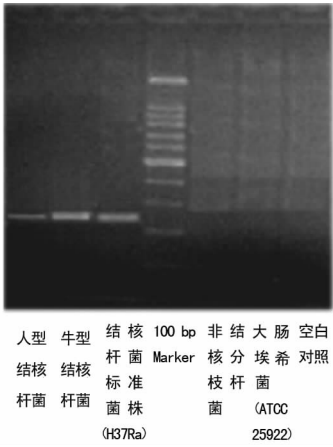


图 1 PCR 扩增结核分枝杆菌 IS6110 检测结果

2.2 5 种结核分枝杆菌检测方法结果比较 见表 1。

表 1 5 种方法对 150 例临床标本的检测结果

方法	阳性 (n)	阴性 (n)	假阳性 (n)	假阴性 (n)	特异性 (%)	敏感性 (%)
AFS	38	112	2	66	95.83	35.29
IMC-AFS	46	104	2	58	95.83	43.14
DICA	74	76	12	40	75.00	60.78
PCR	99	51	4	7	91.67	93.14
IMC-PCR-ELISA	102	48	0	0	100.00	100.00

2.3 AFS 及 IMC-AFS 结果判断 涂片中结核分枝杆菌及非结核分枝杆菌被染成红色,其他细菌染成蓝色。阳性质控菌株:结核分枝杆菌标准菌株 H37Ra;阴性质控菌株:大肠埃希菌(ATCC 25922)。

3 讨 论

本室建立的采用 IMC 联合 IMC-PCR-ELISA,首先通过抗结核杆菌抗体包被的免疫磁珠,能特异地捕获结核分枝杆菌^[7]。这样既起到了浓缩收集结核分枝杆菌的作用,又减少了标本中其他细菌对试验的干扰。然后,在 PCR 反应体系中加入目的模板和另外 2 个已知不同溶度的双内标模板,反应后得到 3 类扩增产物。由于其中一条引物的 5'端用生物素进行了标记,生成的 3 类扩增产物均带有生物素标记。进一步用链霉亲和素包被的酶标板捕获 PCR 扩增产物,经变性解链后,用 3 套特异性探针(3'端用地高辛标记)与扩增产物分别进行杂交。再用抗地高辛酶标记抗体与杂交体上的地高辛结合,漂洗后加底物显色,测定吸光度值。最后根据 3 种模板起始拷贝数与检测的吸光度值呈正比的关系,通过公式计算得到目的模板的起始拷贝数。

本研究以结核分枝杆菌培养法为金标准,将培养结果为阳性的 102 例患者的痰标本和血清标本作为阳性对照,以 48 例培养结果为阴性的非结核患者痰标本和血清标本作为阴性对照。对 IMC-PCR-ELISA 与其他临床常用的几种结核杆菌检测方法进行了对比分析,结果显示,AFS 简单、快速,但敏感性(35.29%)较差,与文献^[8]报道结果一致;IMC-AFS 由于结合了免疫磁珠捕获技术,敏感性(43.14%)较 AFS 高。但上述两种方法,结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌均显示阳性,不能有效区分。DICA 检测的是血清中抗结核抗体,其敏感性较涂片法高,但由于非结核患者中因免疫接种等原因会有一定的假阳性结果出现,本次测试中该法的特异性(75.00%)为 5 种检测方法中最低的。普通 PCR 显示出较高的敏感性(91.67%)和特异性(93.14%),但仍出现 4 例假阳性和 7 例假阴性,经分析其中假阴性结果为目的模板的拷贝数较低而导致,假阳性结果则为非特异性扩增所致。本室建立的 IMC-PCR-ELISA 定量检测结核分枝杆菌方法,通过磁性微粒表面包被抗结核分枝杆菌抗体,可特异性捕获结核分枝杆菌,起到了浓缩收集目的菌和减少干扰的作用,再联合 PCR 检测技术能显著提高目的基因的检出率,其灵敏度要比单独 PCR 增加 8~2 000 倍^[9-11]。同时,分子杂交技术的应用,也大大提高了方法的特异性^[12]。此外,双内标 PCR 技术实现了定量检测目的模板起始拷贝数的目的。IMC-PCR-ELISA 检测全过程约 4.5 h,最低检测限为 5 copy/ μ L,特异性和敏感性均为 100.00%。结果显示,IMC-PCR-ELISA 具有快速、灵敏、特异、可定量检测的特点,

是临床快速诊断结核病的有效检测方法。

参考文献

[1] 廖丽.我国结核病流行现状及防治工作形势分析[J].中外医疗,2014,33(3):129-130.

[2] 杨江华,王文杰,何自芳,等.免疫磁珠捕获法分离抗酸杆菌的实验研究[J].中国病原生物学杂志,2011,6(3):168-169.

[3] 代旭磊,柳爱华,宝福凯,等.结核分支杆菌的分子检测技术研究进展[J].现代预防医学,2012,39(8):2032-2034.

[4] 李春林,孙峰.结核分枝杆菌检测方法临床应用的对比研究[J].检验医学与临床,2012,9(17):2164.

[5] 颜京瑞.检测结核抗体对结核病的临床诊断价值[J].检验医学与临床,2010,7(2):113-115.

[6] 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):14-17.

[7] Wilson S, Lane A, Rosedale R, et al. Concentration of mycobacterium tuberculosis from sputum using ligand-coated magnetic beads[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2010, 14(9): 1164-1168.

[8] 王华钧,孙小军,金法祥,等.4 种结核分枝杆菌检测方法的比较[J].中华医院感染学杂志,2012,22(11):2472-2474.

[9] Barletta J, Bartolome A, Constantine NT. Immunomagnetic quantitative immuno-PCR for detection of less than one HIV-1 virion[J]. J Virol Methods, 2009, 157(2): 122-132.

[10] Thompson DE, Rajal VB, Batz SD, et al. Delection of salmonellaspp in water using magnetic capture hybridization combined with PCR or real-time PCR[J]. J Water Heath, 2006, 4(1): 67-75.

[11] Hwang YC, Leong OM, Chen W, et al. Comparison of a reporter assay and immunomagnetic separation real-time reverse transcription-PCR for the detection of enteroviruses in seeded environmental water samples[J]. Appl Environ Microbiol, 2007, 73(7): 2338-2340.

[12] 高媛,郑文岭,马文丽.基因诊断技术的临床应用进展[J].基础医学与临床,2013,33(1):15-18.

(收稿日期:2014-08-24 修回日期:2014-10-18)

(上接第 333 页)

操作规程[M].3 版.南京:东南大学出版社,2006:178-180.

[3] Clinical and Laboratory Sandards Institute (CLSI). Performance stan -dards for antimicrobial susceptibility tes-ting[S]. PA, USA; CLSI, 2006.

[4] Menichetti F. Current and emerging serious gram-positive infections[J]. Clin Microbiol Infect, 2005, 11 (Suppl 3): 22-28.

[5] 黎村艳,曹友德,蔡瑞云,等.1 296 株革兰阳性球菌的分布和耐药性分析[J].中国病原生物学杂志,2013,8(1):

76-79.

[6] 郭燕,朱德妹,胡付品,等.2010 年中国 CHINET 葡萄球菌属细菌耐药性监测和分析[J].中国感染与化疗杂志,2013,13(2):86-92.

[7] 胥萍瑶.2012 年四川省肿瘤医院细菌耐药性监测[J].国际检验医学杂志,2013,34(16):2117-2118.

[8] 李家泰,齐慧敏,李耘,等.2002~2003 年中国医院和社区获得性感染革兰阳性细菌耐药监测研究[J].中华检验医学杂志,2005,28(3):34-45.

(收稿日期:2014-08-07 修回日期:2014-10-16)