

核酸检测实验室研究 · 论著 DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2020.15.003

## TB-CPA 法、液体培养法及传统 PCR 法诊断 结核性胸膜炎的临床价值探讨

王超, 徐东芳, 彭远远, 王庆<sup>△</sup>

安徽省胸科医院检验科, 安徽合肥 230022

**摘要:**目的 探讨交叉引物恒温扩增(TB-CPA)法、液体培养法及传统聚合酶链反应(PCR)法在结核性胸膜炎临床诊断中的应用价值。方法 选取该院 2017 年 6 月至 2019 年 6 月接收的 119 例胸腔积液患者为研究对象, 其中经生化、超声波检查及胸膜活检等确诊为结核性胸膜炎患者 101 例, 分别采用 TB-CPA 法、液体培养法及传统 PCR 法进行诊断, 以受试者工作特征曲线(ROC 曲线)为依据, 对 3 种方法结核性胸膜炎阳性检出率、诊断准确性、灵敏度、特异度等情况进行分析。结果 TB-CPA 法的结核性胸膜炎阳性检出率较液体培养法、传统 PCR 法均更高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。TB-CPA 法诊断准确性、灵敏度、特异度较液体培养法及传统 PCR 法均更高, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。TB-CPA 法、液体培养法、传统 PCR 法诊断 ROC 曲线下面积分别为 0.837、0.715、0.809, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 TB-CPA 法诊断结核性胸膜炎更具优势, 可准确、快速检出疾病。

**关键词:** 结核性胸膜炎; 交叉引物恒温扩增; 液体培养法; 聚合酶链反应; 结核分枝杆菌  
中图分类号: R521 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2020)15-2119-03

### Clinical value of TB-CPA, liquid culture and traditional PCR method in the diagnosis of tuberculous pleurisy

WANG Chao, XU Dongfang, PENG Yuanyuan, WANG Qing<sup>△</sup>

Department of Clinical Laboratory, Anhui Chest Hospital, Hefei, Anhui 230022, China

**Abstract: Objective** To explore the value of cross primer isothermal amplification (TB-CPA), liquid culture and traditional PCR in the clinical diagnosis of tuberculous pleurisy. **Methods** Totally 119 patients with pleural effusion received by the hospital from June 2017 to June 2019 were selected as the research objects, among which 101 patients with tuberculous pleurisy were confirmed by biochemical examination, ultrasonic examination and pleural biopsy. TB-CPA, liquid culture and traditional PCR method were used for diagnosis respectively. Based on receiver operating characteristic curve (ROC curve), the positive detection rate, diagnostic accuracy, sensitivity and specificity of the three methods were analyzed. **Results** The positive detection rate of tuberculous pleurisy by TB-CPA method was higher than that by liquid culture method and traditional PCR method ( $P < 0.05$ ). The diagnostic accuracy, sensitivity and specificity of TB-CPA method were higher than those of liquid culture method and traditional PCR method ( $P < 0.05$ ). The area under the ROC curve of TB-CPA method, liquid culture method and traditional PCR method were 0.837, 0.715 and 0.809 respectively, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** TB-CPA method has more advantages in the diagnosis of tuberculous pleurisy, which can accurately and quickly detect the disease.

**Key words:** tuberculous pleurisy; cross primer isothermal amplification; liquid culture; polymerase chain reaction; Mycobacterium tuberculosis

结核性胸膜炎是肺外结核中常见的一种疾病, 该病隐匿性较强, 病程长, 若不及时进行临床诊断, 可能导致患者错过最佳治疗时机, 因此, 结核性胸膜炎快速、准确的诊断具有重要意义。但目前临床诊断仍存在很多问题, 如诊治能力不足、诊断技术落后, 防控系统“防治分离”、传播途径难控制、宿主免疫功能降低等<sup>[1]</sup>, 最终导致漏诊、误诊现象频发。刺激性干咳、患侧胸痛、积液增多是发现结核性胸膜炎的重要线索, 单纯的临床体征并不能准确诊断疾病, 常结合胸部影

像学、流行病学和临床表现等进行诊断, 但以上均不能作为诊断的“金标准”, 进一步加大了临床诊断的难度。随着医学技术的不断进步, 结核性胸膜炎的诊断以细菌学实验室检查为主, 交叉引物恒温扩增(TB-CPA)法、液体培养法、传统聚合酶链反应(PCR)法是临床上常见的几种诊断结核性胸膜炎的方法, 但液体培养法耗时较长, 而传统 PCR 法对仪器、设备等要求较高, 并且操作难度相对较大。近年来, TB-CPA 法得以广泛使用, 具备快速、简便、灵敏度高等优点。本

研究主要探讨 TB-CPA 法、液体培养法及传统 PCR 法在结核性胸膜炎临床诊断中的应用价值。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取本院 2017 年 6 月至 2019 年 6 月接收的 119 例胸腔积液患者作为研究对象,其中男 79 例,女 40 例,年龄 43~64 岁,平均(53.5±10.5)岁。参照《临床诊疗指南:结核病分册》2015 年修订版<sup>[2]</sup>确诊为结核性胸膜炎的患者共 101 例,患者表现出中度发热,且经生化、超声波检查及胸膜活检等做出诊断。纳入标准:(1)患者均有胸腔积液体征且经影像学检查显示胸腔积液征象,伴随干咳、发热、胸痛、呼吸困难等症状;(2)患者及家属均对本研究知情;(3)患者自愿参加本研究;(4)患者签署知情同意书。排除标准:(1)接受抗结核治疗时间大于 2 周;(2)严重脏器或心脑血管疾病;(3)慢性病史;(4)精神意识障碍,无法配合本研究;(5)不能明确诊断。本研究已获本院伦理委员会审核批准。

**1.2 方法** 本研究所选 119 例患者的胸腔积液均由临床医生抽取,分别采用 TB-CPA 法、液体培养法及传统 PCR 法进行诊断,具体操作如下。TB-CPA 法:选择 EasyNAT<sup>®</sup>-Pure20B 全自动核酸提取仪提取结核分枝杆菌 DNA,取适量标本并加入等倍体积的 4% NaOH 溶液进行消化处理,吸入 1.5 mL 离心管,12 000 r/min 离心 10 min 后提取 DNA 作为模板并对其进行核酸恒温扩增,完成扩增后取出反应管并将其置入一次性防污染检测装置扣紧,约 2 min 读取结果<sup>[3]</sup>。结果判定:(1)若仅检测线 T 出现,或检测线 T、质控线 C 同时出现,则说明标本中含有结核分枝杆菌,其水平达到或超过试剂盒最低检测限,判定为阳性;(2)若仅质控线 C 出现,则说明标本中不含有结核分枝杆菌,其水平低于试剂盒最低检测限,判定为阴性;(3)若检测线 T、质控线 C 均未出现,则说明结果无效。出现无效结果的原因可能是由于扩增过程中有扩增抑制物出现,也可能是由于操作误差或试剂盒损坏<sup>[4]</sup>。若结果显示无效,首先应查找导致无效结果的原因,排除人为操作因素后检查是否存在扩增抑制物。液体培养法:使用美国 BD 公司的 BACTEC MGIT 960 分枝杆菌培养仪,按实验操作程序前处理标本,将其接种于液体培养基中并放入仪器,待仪器出现阳性报警,取出培养基,经涂片抗酸染色显示为阳性,结核胶体金检测为阳性,显示革兰染色无杂菌生长,则确定为结核分枝杆菌生长<sup>[5]</sup>。传统 PCR 法:选择广州达安基因工程有限公司的结核分枝杆菌检测试剂盒,按相关操作程序前处理标本,提取结核分枝杆菌 DNA,并使用 ABI 7500 荧光 PCR 扩增检测仪进行检测,仪器由美国 ABI 公司提供。注意严格遵循标准操作要求<sup>[6]</sup>。

**1.3 观察指标** (1)对比 3 种方法结核性胸膜炎阳性检出率情况。(2)对比 3 种方法诊断结核性胸膜炎

的准确性、灵敏度、特异度情况<sup>[7]</sup>。(3)根据 3 种方法的灵敏度和特异度绘制成受试者工作特征曲线(ROC 曲线),以诊断阳性为状态变量拟合 ROC 曲线,计算 ROC 曲线下面积(AUC)。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS21.0 软件对患者基线资料、研究数据进行分析。计数资料以率表示,采用  $\chi^2$  检验;计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用  $t$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 3 种方法结核性胸膜炎阳性检出率比较** 119 例患者中,确诊为结核性胸膜炎患者共 101 例。TB-CPA 法的结核性胸膜炎阳性检出率为 74.26%(75/101),较液体培养法(40.60%,41/101)、传统 PCR 法(61.39%,62/101)更高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

**2.2 3 种方法诊断效能的准确性、灵敏度、特异度比较** TB-CPA 法诊断准确性为 74.26%,灵敏度为 71.26%,特异度为 63.52%,较液体培养法(40.60%、53.18%、32.74%)及传统 PCR 法(61.39%、64.09%、49.38%)更高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 3 种方法诊断效能的准确性、灵敏度、特异度比较(%)

方法	准确性	灵敏度	特异度
TB-CPA 法	74.26	71.26	63.52
液体培养法	40.60	53.18	32.74
传统 PCR 法	61.39	64.09	49.38
$\chi^2$	64.716	7.099	19.006
$P$	<0.001	0.029	<0.001

**2.3 3 种方法 ROC 曲线分析结果比较** TB-CPA 法、液体培养法、传统 PCR 法诊断 ROC 曲线下面积分别为 0.837、0.715、0.809,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

结核性胸膜炎属于呼吸系统疾病范畴,是肺外结核中常见的一种类型。结核性胸膜炎是形成胸膜腔积液的最主要原因,临床上结核性胸膜炎患者常以出汗、乏力、发热等为主要症状,且表现出不同程度的呼吸困难或胸痛症状,若不及时诊断和治疗,可损伤呼吸、循环系统,进而导致结核性脓气胸、包裹性积液等<sup>[8]</sup>。相关数据显示,2018 年中国肺结核发病数为 88.9 万例,居 22 个结核病高负担国家的第 2 位,占全球结核病总发病率的 9%<sup>[9]</sup>。结核具有较强传染性,常通过呼吸道进行传播,尤其当人体免疫力下降时,若受到结核分枝杆菌感染,发病的概率更高。对于已感染结核分枝杆菌的患者来说,可导致抵抗力进一步降低,间接增强细胞介导的变态反应,加重疾病的严重程度。对于结核性胸膜炎患者来说,若想改善预

后,提高生存质量,需要尽早诊断并采取治疗措施干预。

现有的几种结核性胸膜炎诊断技术中,液体培养法培养时间较长,无法满足早期临床诊断的需求,难以在临床中得到广泛使用,且液体培养法受多种因素的影响,诊断价值相对较低。传统 PCR 法也受多种因素影响,尤其是易受到假阴性及假阳性诊断结果的困扰。根据临床研究显示,传统 PCR 法出现假阴性结果的最主要原因是由于胸腔积液中存在细菌代谢产物或者标本中含有 TaqDNA 酶抑制剂、胸腔积液中菌量太少等,而出现假阳性结果的主要原因为实验室污染及操作不规范导致的交叉串孔现象,因此,一旦操作过程中出现污染情况,就会出现误诊、漏诊<sup>[10]</sup>。不可否认的是,以上 2 种方法都具备一定诊断价值,但无法满足简单、快速、准确诊断的要求,实际临床诊疗中需要寻求一种快速和灵敏的诊断方法。

近年来, TB-CPA 法在临床中得以广泛使用。TB-CPA 法灵敏度高,分析速度快,突变率低,不需要升降温过程,对仪器要求低、成本低,且方便、快速。TB-CPA 法 10 min 内可快速提取核酸,并在等温(63 ℃)下进行 DNA 扩增,耗时仅需 60 min 左右,且可直接目视判读结果。DIEL 等<sup>[11]</sup>研究提出, TB-CPA 法通过添加不同活性的酶、各种特异性的引物,达到快速进行核酸扩增的目的。TB-CPA 法具备独特的优势,反应过程始终维持在恒温下。从成本效益方面来看,与传统 PCR 法相比, TB-CPA 法对于仪器的要求大大简化,实验过程只需要一个温度,反应时间大大缩短,更能满足临床诊断的需求,并且 TB-CPA 法还可有效解决实验室污染的问题,预防核酸扩增物交叉污染现象的发生。分析其优势可以发现, TB-CPA 法价格相对便宜,不需要分子实验室及昂贵的仪器和设备,操作简单,检测试剂更易运输,无需冷链,室温即可,从标本检测到得出结果仅需 120 min。

申洁等<sup>[12]</sup>研究显示,2011 年我国 3 家三级甲等医院共收治 957 例结核患者,以 L-J 培养为“金标准”, TB-CPA 检出结核分枝杆菌的准确性高达 90.50%,较荧光定量 PCR 检测结果更优。本研究结果显示, TB-CPA 法的结核性胸膜炎阳性检出率高于液体培养法与传统 PCR 法,这一结果与李玉雪等<sup>[13]</sup>研究结果基本一致。王少华等<sup>[14]</sup>研究显示, TB-CPA 法诊断肺结核的灵敏度、特异度为 85.50%、96.80%,在与实时荧光定量核酸扩增法等 PCR 方法的比较中,其占比最高。本研究中 TB-CPA 法诊断结核性胸膜炎准确性、灵敏度、特异度较液体培养法、传统 PCR 法均更高,与王少华等<sup>[14]</sup>研究结果一致,证实 TB-CPA 法是一种可靠实用的诊断方法,可作为诊断结核性胸膜炎的首选方式。同时,由于本研究中标本数量选取存

在一定的局限性,可能导致研究结果存在一定偏差,后续临床研究可提高标本选取数量,使临床研究准确性进一步提高,从而为临床诊断和后期治疗提供更可靠的依据。

## 参考文献

- [1] 杨静,王东萍,柳叶.多种实验方法在诊断结核性胸膜炎的临床应用价值的比较[J].临床肺科杂志,2018,23(7):32-35.
- [2] 中华医学会.临床诊疗指南:结核病分册[M].北京:人民卫生出版社,2015:20-25.
- [3] YANG X, FENG M, SHEN Y, et al. Clinical characteristics and potential indicators for definite diagnosis of tuberculous pleural effusion[J]. Artif Cell Nanomed Biotechnol, 2019, 47(1):1924-1931.
- [4] 李虹泽,曹锋,樊毅.3种方法联合检测在诊断结核性胸膜炎中的应用价值[J].临床肺科杂志,2018,23(11):35-38.
- [5] 辛茶香,熊国亮,邱英梅. PCR-RDB 和 SAT 与改良罗氏培养法检测临床标本分枝杆菌研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2018, 28(24):51-54.
- [6] 袁瑛,明湘虹,郑宏. SAT 技术与荧光定量 PCR 在痰涂片阴性肺结核诊断中的价值研究[J]. 临床肺科杂志, 2019, 24(3):160-162.
- [7] KAWAGUCHI T, ODA K, KIDO T, et al. Bilateral tuberculous pleurisy with subsequent upper lobe predominant pulmonary fibrosis mimicking pleuroparenchymal fibroelastosis[J]. Intern Med, 2018, 57(1):85-89.
- [8] 李丹,陈丽茹,刘玉洁.4种方法检测对痰菌阴性肺结核的诊断价值研究[J].西南国防医药,2019,29(3):47-49.
- [9] 王震,牛腾腾,赵含信.结核感染 T 细胞斑点试验联合腺苷脱氨酶在结核性胸膜炎中的诊断价值[J].实用医学杂志,2019,35(7):148-152.
- [10] 孙海柏,张丽霞,刘佳庆. Xpert MTB/RIF 联合 T-SPOT. TB 对结核性胸膜炎及其耐药性的临床研究[J]. 中国现代医学杂志, 2018, 28(11):93-97.
- [11] DIEL R, RINGSHAUSEN F, RICHTER E, et al. Microbiological and clinical outcomes of treating non-Mycobacterium avium complex nontuberculous mycobacterial pulmonary disease: a systematic review and Meta-analysis [J]. Chest, 2017, 152(1):120-142.
- [12] 申洁,贾莉,董小帅.不同检测方法快速诊断结核性胸膜炎临床评价[J].检验医学,2019,34(3):41-44.
- [13] 李玉雪,万玲玲,梁芸.改良抗酸染色联合 CPA 在基层医院诊断肺结核的应用价值[J].河北医药,2018,40(10):78-80.
- [14] 王少华,郑丹薇,朱岩坤.两种恒温扩增分子检测法与实时荧光定量核酸扩增法对肺结核诊断价值的比较[J].中华结核和呼吸杂志,2018,41(2):105-110.