

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.11.008

文章编号: 1005-8982 (2020) 11-0039-04

实时荧光核酸恒温扩增检测技术对痰标本中 结核分枝杆菌的诊断价值*

柴国祥¹, 李兴芳¹, 韩斌孝², 王磊¹, 杨永红¹, 章国平³, 牛晨霞¹

(1. 兰州市肺科医院, 甘肃 兰州 730046; 2. 甘肃省医学情报研究所, 甘肃 兰州 730050;
3. 甘肃省妇幼保健院, 甘肃 兰州 730050)

摘要: **目的** 评估实时荧光核酸恒温扩增检测 (SAT) 技术对痰标本中结核分枝杆菌 (MTB) 的诊断价值。**方法** 收集确诊为活动性肺结核 (PTB) 的 115 例和无证据显示为活动性 PTB 的 67 例总计 182 例患者的痰液标本, 采用集菌涂片法、罗氏培养法、PCR 荧光探针法及 Xpert MTB/RIF 法及 SAT 法进行检测, 分析对比检测结果。**结果** SAT 法检测 PTB 患者 MTB 的检出率为 40.00%, 与罗氏培养法的检出率 (40.87%) 比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。以罗氏培养法为标准, SAT 法敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值、约登指数分别为 95.74% (95% CI: 0.8975, 0.10174), 98.53% (95% CI: 95.59%, 101.46%), 0.9783 (95% CI: 0.9345, 0.1022), 0.9710 (95% CI: 0.9304, 0.1012) 和 0.94。其中阳性预测值高于 Xpert MTB/RIF 法, 各指标均优于 PCR 荧光探针法。ROC 曲线结果显示 SAT 法 AUC 为 0.936。**结论** SAT 法检测 MTB 敏感性、特异性和准确度较高, 操作简单, 检测周期短, 其检测结果可以作为临床诊断参考。

关键词: 肺结核; 实时荧光核酸恒温扩增检测技术; 结核分枝杆菌; 痰标本

中图分类号: R521

文献标识码: A

Research of real-time fluorescence isothermal RNA amplification assay in detection of mycobacterium tuberculosis in sputum specimens*

Guo-xiang Chai¹, Xing-fang Li¹, Bin-xiao Han², Lei Wang¹,

Yong-hong Yang¹, Guo-ping Zhang³, Chen-xia Niu¹

(1. Lanzhou Pulmonary Hospital, Lanzhou, Gansu 730046, China; 2. Medical Information Research
Institute, Lanzhou, Gansu 730050, China; 3. Maternal and Child Care Service Centre,
Lanzhou, Gansu 730050, China)

Abstract: **Objective** To assess the clinical value of real-time fluorescence isothermal RNA amplification assay in the detection of mycobacterium tuberculosis in sputum specimens. **Methods** Sputum specimens have been collected from 182 patients including 115 PTB patients and 67 patients without evidence of PTB. MTB was detected by using Roche culturing method, PCR fluorescence quantitative expansion method, Xpert MTB/RIF method and SAT method respectively. The test rating for MTB detection was analyzed. **Results** The positive detection rate of Roche culturing method and SAT method were 40.00% and 40.87% respectively in patients clinically diagnosed as PTB. Two sets of data had no statistically significant differences ($P > 0.05$). The sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and Youden index of SAT method for MTB detection were 95.74%

收稿日期: 2019-12-11

* 基金项目: 兰州市人才创新创业科技计划经费项目 (No: 2016-RC-17)

[通信作者] 牛晨霞, E-mail: niuchenxia@163.com; Tel: 18152092228

(89.75, 101.74), 98.53% (95.59, 101.46), 97.83% (93.45, 102.20), 97.10% (93.04, 101.16) and 0.94 respectively. The positive predictive value of SAT method increased obviously compare with Xpert MTB/RIF method and all test rating were superior to PCR method. AUC of SAT method (0.936) in ROC curve indicated that the method has higher test value of MTB. **Conclusion** The sensitivity, specificity and accuracy of the SAT method for MTB detection are high, the operation is simple, and the detection cycle is short. It can be used as a reference for clinical diagnosis.

Keywords: tuberculosis; RNA constant temperature amplification technology; mycobacterium tuberculosis; sputum specimen

肺结核 (pulmonary tuberculosis, PTB) 是由结核分枝杆菌 (mycobacterium tuberculosis, MTB) 引起的经由呼吸道传播的传染病, 目前仍然是全球危害最为严重的慢性传染病, 尤其是对发展中国家。我国一直以来都是 PTB 的高负担国, 2018 年世界卫生组织发布的报告显示, 中国结核病新发患者约为 88.9 万例^[1]。因此建立快速准确检测结核病的方法尤为重要。传统的罗氏培养法是目前检验结核病的金标准, 虽然有一定程度的改良, 但是检验周期过长, 操作复杂^[2]。噬菌体扩增技术和液体培养技术, 虽然都能够快速检测, 但操作要求高, 技术复杂, 推广仍有困难^[3-4]。随着分子生物学技术的发展, 基于 MTB DNA 或 RNA 的快速检测技术越来越得到重视, 先后出现了以传统 PCR 技术为基础的 TB-DNA 检测及以半巢式荧光定量 PCR 技术为基础的自动化核酸扩增检测技术 (Xpert MTB/RIF)。但是两者的缺陷也很明显, TB-DNA 技术假阳性高, 临床诊断不准确^[5-6]; Xpert MTB/RIF 价格昂贵, 不适用于基层医院推广^[7]。

实时荧光核酸恒温扩增检测 (simultaneous amplification and testing, SAT) 技术具有以下几个特点: ①专有的核酸恒温放大实时荧光检测体系; ②更高的扩增效率 (30 min 内扩增 10 亿倍), 确保更高的检测敏感性; ③活菌检测技术。由于 RNA 在自然环境中快速降解, 在死亡的病原体中几乎检测不到 RNA, 该方法有效地解决 PCR 技术检测 MTB DNA 时导致的假阳性问题^[8]。

本研究采用 SAT 法对疑似结核病患者痰液进行检测, 并与其他检测方法比较, 评价 SAT 法对 MTB 的诊断价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2018 年 1 月—2018 年 12 月兰州市肺科医院收治的 PTB 患者和同期接受检查的无证据显示为 PTB 患者 182 例为研究对象。经临床确诊为活动性

PTB 115 例作为观察组。其中, 男性 63 例, 女性 52 例; 男:女=1.2:1.0, 平均年龄 (41.6±11.7) 岁。非活动性 PTB 67 例作为对照组。其中, 男性 42 例, 女性 25 例; 男:女=1.7:1.0, 平均年龄 (44.1±15.3) 岁。两组性别构成比、年龄比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。本研究经医院医学伦理委员会批准, 患者家属签署知情同意书。

1.2 仪器与设备

MTB 核酸检测试剂盒 (RNA 恒温扩增) (上海仁度生物技术有限公司), MTB *rpoB* 基因和突变检测试剂盒 (实时荧光 PCR 法) (美国 Cepheid 公司), MTB 核酸检测试剂盒 (PCR 荧光探针法) (湖南圣湘生物科技有限公司), 7300 Real-time PCR System (美国 ABI 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 痰标本碱处理 将收集的痰标本加入等体积的 N-乙酰-L-半胱氨酸-氢氧化钠 (NALC-NaOH) 溶液进行处理, 标本离心后, 用 PBS 洗涤 1 次, 分为 5 份, 分别用于集菌涂片法、罗氏培养法、PCR 荧光探针法、Xpert MTB/RIF 法及 SAT 法检测。

1.3.2 MTB 检测 根据《结核病诊断细菌学检验规程》^[2] 进行罗氏培养, 以及抗酸染色。集菌涂片法、罗氏培养法、PCR 荧光探针法及 Xpert MTB/RIF 法参考相应的试剂盒使用说明书进行操作。SAT 法: 将待检标本置于离心机中 13 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 50 ml 裂解缓冲液后重悬, 放入超声清洗器超声处理 15 min, 超声功率为 300 W。设置阳性对照为活的 H37Ra 菌株, 阴性对照为无菌水并与待检标本同步检测。其他步骤参考试剂盒说明书进行操作。

1.4 统计学方法

数据分析采用 PEMS 3.0 统计软件, 以罗氏培养法为金标准, 计算 SAT 法敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值和约登指数。计数资料以例 (%) 表示, 比较用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。以

受试者工作特征 (receiver operator characteristic, ROC) 曲线评价 Xpert MTB/RIF 法和 SAT 法检测对 MTB 的诊断价值。

2 结果

2.1 不同检测方法检出 MTB 结果比较

不同方法检测 MTB 的结果见表 1。集菌涂片法

与罗氏培养法比较, 检出率低, 差异有统计学意义 ($\chi^2=4.966, P=0.026$); PCR 荧光探针法与罗氏培养法比较, 差异无统计学意义 ($\chi^2=0.285, P=0.594$); Xpert MTB/RIF 法与罗氏培养法比较, 差异无统计学意义 ($\chi^2=0.072, P=0.789$); SAT 法与罗氏培养法比较, 差异无统计学意义 ($\chi^2=0.018, P=0.893$)。

表 1 两组 PTB 患者经不同检测方法检出痰液中 MTB 情况 例 (%)

组别	n	集菌涂片法阳性	罗氏培养法阳性	PCR 荧光探针法阳性	Xpert MTB/RIF 法阳性	SAT 法阳性
观察组	115	31 (26.96)	47 (40.87)	51 (44.35)	49 (42.61)	46 (40.00)
对照组	67	0 (0.0)	1 (1.5)	5 (7.5)	2 (3.0)	1 (1.5)

2.2 PCR 荧光探针法、Xpert MTB/RIF 法和 SAT 法的敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值及约登指数比较

以罗氏培养法为标准, PCR 荧光探针法的敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值、约登指数分别为: 65.96% (95% CI : 51.89%, 80.02%), 70.59% (95% CI : 59.48%, 81.70%), 60.78% (95% CI : 46.92%, 74.65%), 75.00% (95% CI : 64.10%, 85.90%) 和 0.37 ; Xpert MTB/RIF 法以上指标为: 91.49% (95% CI : 83.21%, 99.77%), 91.18% (95% CI : 84.26%, 98.09%), 87.76% (95% CI : 78.24%, 97.27%), 93.94% (95% CI : 88.03%, 99.85%)

和 0.83 ; SAT 法 以上 指 标 为 : 95.74% (95% CI : 89.75%, 101.74%), 98.53% (95% CI : 95.59%, 101.46%), 97.83% (95% CI : 93.45%, 102.20%), 97.10% (95% CI : 93.04%, 101.16%) 和 0.94。见表 2。

2.3 Xpert MTB/RIF 法和 SAT 法检测 MTB 的可靠性评价

以罗氏培养法为参照, Xpert MTB/RIF 法和 SAT 法的 AUC 分别为 0.925 (95% CI : 0.869, 0.981) 和 0.936 (95% CI : 0.883, 0.990)。SAT 法的 AUC 略高于 Xpert MTB/RIF 法。见图 1。

表 2 3 种检测方法对 115 例 PTB 患者筛检结果 例

罗氏培养法	PCR 荧光探针法			Xpert MTB/RIF 法			SAT 法		
	阳性	阴性	合计	阳性	阴性	合计	阳性	阴性	合计
阳性	31	16	47	43	4	47	45	2	47
阴性	20	48	68	6	62	68	1	67	68
合计	51	64	115	49	66	115	46	69	115

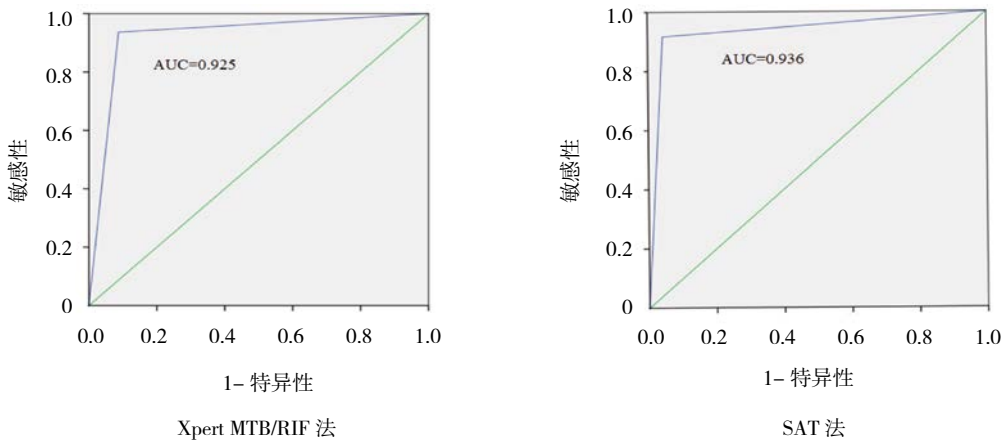


图 1 Xpert MTB/RIF 法和 SAT 法检测 MTB 的 ROC 曲线

3 讨论

本研究以罗氏培养法为标准,对几种不同的检测 MTB 方法进行比较。与罗氏培养法的检出率比较,集菌涂片法检出率较低,该结果与成松等^[9]的研究结果基本一致。PCR 荧光探针法是建立在 PCR 技术上的一种快速检测 MTB 技术,是以 DNA 为检测靶标,由于 DNA 在自然环境中半衰期较长,不容易降解,容易产生污染,导致假阳性的出现。本研究中,PCR 荧光探针法检出率高于罗氏培养法,但是阳性预测值较低,仅为 60.78%,假阳性率较高。Xpert MTB/RIF 法是由美国 Cepheid 公司开发一种结核病诊断技术,由于靶点是利福平突变序列,因此可以检测耐药性,并且实现诊断过程的自动化,操作简便,检验周期短。本研究中,Xpert MTB/RIF 法检出率与罗氏培养法比较无差异,检验效能指标敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值、约登指数略低于张灿强等^[10]的报道,但趋势基本一致,可能受到样本数量,实验操作等因素的影响。Xpert MTB/RIF 法各项检验效能指标均优于 PCR 荧光探针法。SAT 法是一种新型核酸检测技术,该技术采用 M-MLV 逆转录酶和 T7RNA 多聚酶进行核酸扩增,相对于其他核酸扩增技术,反应抑制物更少,有效减少假阴性结果;采用实时荧光闭环检测,使污染得到有效控制,即使污染产生,由于扩增产物为 RNA,环境中极易降解,从而大幅度提高检测结果的可靠性。其最大的优点在于直接以 MTB 特异性 RNA 为扩增靶标,以扩增产物 RNA 为检测靶标,由于 RNA 仅在活菌中存在,MTB 死亡后 RNA 降解,所以该方法可以作为活动性 PTB 及治疗效果的监测^[11]。本研究中,SAT 法的检出率略低于罗氏培养法,该结果与 FAN 等^[12]在 2018 年的报道基本一致。其阳性预测值高于 Xpert MTB/RIF 法,提示以 RNA 为模板的 Set-TB 法有效降低假阳性率,其他检验效能指标与 Xpert MTB/RIF 法接近。SAT 法各项检验效能指标均优于 PCR 荧光探针法。ROC 曲线结果显示,2 种检测方法的 AUC 较大,均 >0.9,表明两者对 MTB 的检测准确性较高,具有较高的诊断价值,并且 SAT 法的 AUC 大于 Xpert MTB/RIF 法。

综上所述,SAT 法对痰标本中 MTB 的敏感性、特异性和准确度较高,具有较高的诊断价值,并能有

效降低假阳性率,提高检测效率,操作简单,检测周期短,可以作为临床诊断参考。

参考文献:

- [1] ATMAKURI K, PENN-NICHOLSON A, TANNER R, et al. Meeting report: 5th Global Forum on TB Vaccines, 20-23 February 2018, New Delhi India[J]. Tuberculosis, 2018, 113(8): 55-64.
- [2] 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, 18(1): 28-31.
- [3] 晏江丽,徐静,雷敏. 噬菌体生物扩增技术在结核病诊断中的临床价值探讨 [J]. 华西医学, 2016, 31(2): 274-277.
- [4] 韩琴. 变色液体培养基快速检测结核分枝杆菌及其耐药性 [J]. 医学理论与实践, 2010, 23(12): 1500-1501.
- [5] 刘权贤,王鸿,陈玲,等. TB-LAMP、Xpert MTB/RIF 及罗氏固体培养在肺结核诊断中的比较 [J]. 中国临床研究, 2018, 31(12): 1611-1613.
- [6] TIAN P W, SHEN Y C, WANG Y, et al. Diagnostic value of nucleic acid amplification tests on bronchoalveolar lavage fluid for smear-negative pulmonary tuberculosis: a meta-analysis[J]. Bioscience Reports, 2015, 35(4): e00232.
- [7] KAREN R S, IAN S, DAVID J H, et al. Xpert[®] MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults[J]. Cochrane Database Systematic Reviews, 2014(1): CD009593.
- [8] CUI Z L, WANG Y Z, FANG L, et al. Novel real-time simultaneous amplification and testing method to accurately and rapidly detect Mycobacterium tuberculosis complex[J]. Journal Clinical Microbiology, 2012, 50(3): 646-650.
- [9] 成松,刘成永,周冬青,等. 实时荧光核酸恒温扩增检测技术在胸腔积液结核分枝杆菌检测中的应用 [J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(18): 2697-2698.
- [10] 张灿强,赖晓宇,郭劫琳,等. Xpert MTB/RIF 技术在肺结核诊断中的应用价值 [J]. 现代医院, 2016, 16(12): 1783-1785.
- [11] YAN L P, ZHANG Q, XIAO H P, et al. Clinical diagnostic value of simultaneous amplification and testing for the diagnosis of sputum-scarce pulmonary tuberculosis[J]. BMC Infectious Diseases, 2017, 17(1): 1-6.
- [12] FAN L, LI D F, ZHANG S J, et al. Parallel tests using culture, Xpert MTB/RIF, and SAT-TB in sputum plus bronchial alveolar lavage fluid significantly increase diagnostic performance of smear-negative pulmonary tuberculosis[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 1170(9): 1-7.

(王荣兵 编辑)

本文引用格式: 柴国祥,李兴芳,韩斌孝,等. 实时荧光核酸恒温扩增检测技术对痰标本中结核分枝杆菌的诊断价值 [J]. 中国现代医学杂志, 2020, 30(11): 39-42.