

荧光 PCR 熔解曲线法快速鉴定痰标本中 分枝杆菌菌种的临床应用价值

陈新朝 陈晓红 许榕青 黄明翔*

(福州肺科医院, 福建 福州 350008)

〔摘要〕 目的: 研究荧光聚合酶链式反应 (PCR) 熔解曲线法快速鉴定痰标本中分枝杆菌菌种的临床应用价值。方法: 采集福州肺科医院 2018 年 1 月至 2019 年 12 月经 BACTEC MGIT 960 系统液体培养阳性的 558 株疑似非结核分枝杆菌 (NTM) 临床分离菌株。对所有菌株均开展荧光 PCR 熔解曲线及 16S 核糖体核糖核酸 (rRNA) 基因测序法鉴定。将 16S rRNA 基因测序结果作为标准, 采用荧光 PCR 熔解曲线法鉴定 NTM 的效能, 分析主要 NTM 的耐药性情况。结果: 16S rRNA 基因测序法鉴定结果显示, 疑似 NTM 菌种以胞内分枝杆菌 (M. 胞内)、龟/脓肿分枝杆菌 (M. 龟/脓肿)、鸟分枝杆菌 (M. 鸟)、堪萨斯分枝杆菌 (M. 堪萨斯) 及戈登分枝杆菌 (M. 戈登) 为主; 荧光 PCR 熔解曲线法鉴定结果显示, 疑似 NTM 菌种亦以上述 5 种为主。荧光 PCR 熔解曲线法鉴定 M. 龟/脓肿的灵敏度、特异度及准确度为 95.7%、100.0%、99.1%; M. 胞内的灵敏度、特异度及准确度为 100.0%、97.3%、98.7%; M. 鸟灵敏度、特异度及准确度为 88.7%、100.0%、98.6%; 其他 NTM 菌种的灵敏度、特异度及准确度均为 100.0%。一致性分析结果显示: 荧光 PCR 熔解曲线法与基因测序法鉴定各种 NTM 菌种的一致性在 0.81~1.00 之间。16S rRNA 基因测序法与荧光 PCR 熔解曲线法鉴定结果不一致菌株共 13 株, 包括 5 株 M. 龟/脓肿及 8 株 M. 鸟。结论: 荧光 PCR 熔解曲线法快速鉴定痰标本中 NTM 菌种的效能较佳, 与基因测序法存在较高的一致性。

〔关键词〕 非结核分枝杆菌; 聚合酶链式反应; 熔解曲线法

〔中图分类号〕 R 521; R 378.91⁺¹ 〔文献标识码〕 B

非结核分枝杆菌 (non-tuberculous mycobacterium, NTM) 主要是指结核分枝杆菌复合群及麻风分枝杆菌以外的分枝杆菌。目前, 人类已发现的 NTM 亚种达 13 个, 共 188 种。作为典型环境分枝杆菌, NTM 普遍存在于水、土壤及灰尘等环境之中, 部分 NTM 可直接侵袭人体的肺脏、骨骼、关节及软组织等, 进而导致全身播散性疾病的发生, 即 NTM 病^[1]。由于 NTM 与其他分枝杆菌引发的肺部疾病症状高度相似, 从而增加了临床诊断的难度, 极易出现误诊, 可能导致患者病情被延误^[2]。故如何快速、准确地鉴定 NTM 菌种对临床治疗方案制定、流行病学监测均有重要的意义。既往传统的 NTM 鉴定方式以生化检验为主, 但该鉴定方式受分枝杆菌生长速度的影响, 特别是对于生长速度较慢的分枝杆菌, 往往需要 1~2 个月方可获得鉴定结果, 临床应用存在局限性, 难以满足临床需求^[3]。随着近年来分子生物学及基因测序技术的飞速发展, 基因测序逐渐取代了生化实验法, 其可通过比对同源基因/序列的差异实现对菌种的鉴定, 是目前国内

外公认的分辨率最高、结果最可靠的分枝杆菌菌种鉴定手段^[4]。然而, 开展基因测序往往需要专门器械, 难以在基层医疗机构开展。荧光聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 熔解曲线法的“荧光-熔点”二维标签技术可实现同时对多种分枝杆菌的鉴定, 具有操作简便以及检测通量高等优势^[5]。本研究通过研究荧光 PCR 熔解曲线法快速鉴定痰标本中分枝杆菌菌种的临床应用价值, 以期 NTM 菌种的鉴定提供一种行之有效的手段, 现将研究结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

采集福州肺科医院 2018 年 1 月至 2019 年 12 月经 BACTEC MGIT 960 系统液体培养阳性的 558 株疑似 NTM 临床分离菌株。对所有菌株均开展荧光 PCR 熔解曲线及 16S 核糖体核糖核酸 (ribosomal ribonucleic acid, rRNA) 基因测序法鉴定。

〔收稿日期〕 2023-02-16

〔基金项目〕 福建省福州市科技计划项目 (2021-S-194)

〔作者简介〕 陈新朝, 男, 主管技师, 主要研究方向是医学检验方面。

〔*通信作者〕 黄明翔 (E-mail: hmg119@163.com; Tel: 13375002610)

1.2 方法

1.2.1 荧光 PCR 熔解曲线法菌种鉴定 (1) 样本提取与处理: 首先采用 Lab-Aid 824 分枝杆菌核酸提取 Maxi 试剂(厦门致善生物科技股份有限公司)完成样本的提取。之后借助微量加液器滴加 25 μL 相关的提取样本或对照品至分枝杆菌 PCR 薄壁反应管内。置于涡旋振荡器中震荡 20 s, 促使其充分混匀, 瞬间离心处理后清除起泡, 移送至 PCR 扩增区。(2) PCR 扩增与熔解曲线分析: 具体操作以 SLAN-96S 型全自动医用 PCR 分析系统(上海宏石医疗科技有限公司)实现。(3) 结果判定: ①实验有效判定标准如下, 阳性对照参考值范围为 FAM 通道 (61.4 ± 1.5) °C (结核分枝杆菌复合群特异熔点); ROX 通道 (71.8 ± 1.6) °C (分枝杆菌属特异熔点); ROX 通道 (78.4 ± 1.7) °C (内控熔点)。②阴性对照参考值范围为 ROX 通道 (78.4 ± 1.7) °C (内控熔点), 其他通道应无熔解峰。③分析及判读: 遵循分枝杆菌鉴定试剂盒有关产品说明书完成。本研究所用分枝杆菌鉴定该试剂盒适用于常见 19 种分枝杆菌的定性鉴定, 如胞内分枝杆菌 (M. 胞内)、龟/脓肿分枝杆菌 (M. 龟/脓肿)、鸟分枝杆菌 (M. 鸟)、堪萨斯分枝杆菌 (M. 堪萨斯)、戈登分枝杆菌 (M. 戈登)、蟾蜍分枝杆菌 (M. 蟾蜍)、偶然分枝杆菌 (M. 偶然)、不产色分枝杆菌 (M. 不产色)、缓黄分枝杆菌 (M. 缓黄)、瘰癧分枝杆菌 (M. 瘰癧)、土地分枝杆菌 (M. 土地)、海/溃疡分枝杆菌 (M. 海/溃疡)、苏加分枝杆菌 (M. 苏加) 等。

1.2.2 基因测序法菌种鉴定 所有样本的验证均选择 16S rRNA 引物扩增, 并送上海生工生物工程公司完成脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 测序。将上述基因测序结果导入 NCBI 数据库, 完成 BLAST 比对, 同源性最高的菌种视作最终结果。

1.3 统计学方法

以 SPSS 24.0 软件分析数据。将 16S rRNA 基因测序法作为参考标准, 计算荧光 PCR 熔解曲线法菌种鉴定的灵敏度、特异度及准确度, 并实施一致性分析 (Kappa 检验), $\kappa < 0.2$ 即一致性较差, κ 在 0.2 ~ 0.4 即一致性尚可, κ 在 0.41 ~ 0.60 即一致性中等, κ 在 0.61 ~ 0.80 即基本一致, κ 在 0.81 ~ 1.00 即几乎完全一致; $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两种方法鉴定菌株的结果

16S rRNA 基因测序法鉴定结果显示, 疑似 NTM 菌种以 M. 胞内、M. 龟/脓肿、M. 鸟、M. 堪萨斯及 M. 戈登为主; 荧光 PCR 熔解曲线法鉴定结果显示, 疑似 NTM 菌种亦以上述 5 种为主, 见表 1。

表 1 两种方法鉴定菌株的结果 (n = 558, n (%))

菌种	16S rRNA 基因测序法	荧光 PCR 熔解曲线法
M. 龟/脓肿	117(21.0)	112(20.1)
M. 胞内	294(52.7)	301(53.9)
M. 鸟	71(12.7)	63(11.3)
M. 堪萨斯	11(2.0)	11(2.0)
M. 戈登	10(1.8)	10(1.8)
M. 蟾蜍	7(1.3)	7(1.3)
M. 偶然	5(0.9)	5(0.9)
M. 不产色	2(0.4)	2(0.4)
M. 缓黄	2(0.4)	2(0.4)
M. 瘰癧	2(0.4)	2(0.4)
M. 土地	2(0.4)	2(0.4)
M. 海/溃疡	2(0.4)	2(0.4)
M. 苏加	1(0.2)	1(0.2)
其他	32(5.7)	38(6.8)

注: rRNA — 核糖体核糖核酸; PCR — 聚合酶链式反应。

2.2 荧光 PCR 熔曲线法对 NTM 菌种的鉴定效能分析

将 16S rRNA 基因测序法结果作为标准, 荧光 PCR 熔解曲线法鉴定 M. 龟/脓肿的灵敏度、特异度及准确度为 95.7%、100.0%、99.1%; M. 胞内的灵敏度、特异度及准确度为 100.0%、97.3%、98.7%; M. 鸟灵敏度、特异度及准确度为 88.7%、100.0%、98.6%; 其他 NTM 菌种的灵敏度、特异度及准确度均为 100.0%。一致性分析结果显示: 荧光 PCR 熔解曲线法与基因测序法鉴定各种 NTM 菌种的一致性在 0.81 ~ 1.00 之间, 见表 2。

表 2 荧光 PCR 熔解曲线法对 NTM 菌种的鉴定效能分析 (%)

熔解曲线	灵敏度 /%	特异度 /%	准确度 /%	κ
M. 龟/脓肿	95.7	100.0	99.1	0.973
M. 胞内	100.0	97.3	98.7	0.975
M. 鸟	88.7	100.0	98.6	0.932
M. 堪萨斯	100.0	100.0	100.0	1.000
M. 戈登	100.0	100.0	100.0	1.000
M. 蟾蜍	100.0	100.0	100.0	1.000
M. 偶然	100.0	100.0	100.0	1.000
M. 不产色	100.0	100.0	100.0	1.000
M. 缓黄	100.0	100.0	100.0	1.000
M. 瘰癧	100.0	100.0	100.0	1.000
M. 土地	100.0	100.0	100.0	1.000
M. 海/溃疡	100.0	100.0	100.0	1.000
M. 苏加	100.0	100.0	100.0	1.000

注: PCR — 聚合酶链式反应; NTM — 非结核分枝杆菌。

2.3 不一致结果分析

16S rRNA 基因测序法与荧光 PCR 熔解曲线法鉴定结果不一致菌株共 13 株, 包括 5 株 M. 龟/脓肿及 8 株 M. 鸟。

3 讨论

NTM 感染会导致一系列肺部疾病的发生, 且 NTM 相关肺部疾病与结核分枝杆菌相关肺部疾病患者临床表

现相似,从而可能引起误诊,导致患者治疗时机被延误,影响预后^[6]。此外,绝大多数NTM对抗结核药物的敏感性各不相同。由此可见,快速鉴定NTM菌种具有重要的意义。16S rRNA基因测序法是目前公认的最可靠鉴定NTM菌种的方式,但其对操作者专业水平及仪器要求均较高,检查费用昂贵,不适宜实验室常规开展^[7]。基因芯片法虽可实现对17种常见分枝杆菌的鉴定,但鉴定结果受样本核酸浓度的影响,从而易出现误诊、漏诊,且该鉴定方式耗时较长,临床应用存在局限性^[8]。荧光PCR熔解曲线法则可实现对19种常见分枝杆菌的迅速鉴定,操作相对上述鉴定方式更为简便,尤其适合基层医疗机构^[9]。

本研究中,16S rRNA基因测序法与荧光PCR熔解曲线法鉴定结果均显示:疑似NTM菌种以M.胞内、M.龟/脓肿、M.鸟、M.堪萨斯及M.戈登为主,这与张娴等人^[10]的研究报道高度吻合,但与吴慧娜等人^[11]的研究存在一定差异。究其原因,可能与NTM菌种的分布有明显的地域差异有关。此外本研究结果还显示,荧光PCR熔解曲线法鉴定M.龟/脓肿的灵敏度、特异度及准确度为95.7%、100.0%、99.1%;M.胞内的灵敏度、特异度及准确度为100.0%、97.3%、98.7%;M.鸟灵敏度、特异度及准确度为88.7%、100.0%、98.6%;其他NTM菌种的灵敏度、特异度及准确度均为100.0%。且一致性分析结果显示:荧光PCR熔解曲线法与基因测序法鉴定各种NTM菌种的一致性在0.81~1.00之间。这与李爱芳等人^[12]的研究结果相近,均提示了荧光PCR熔解曲线法快速鉴定痰标本中NTM菌种的效能较佳,与基因测序结果高度符合。荧光PCR熔解曲线法主要是按照差异性分枝杆菌基因ITS片段的特异性序列进行探针的设计,之后以特定荧光通道及熔点开展分枝杆菌菌种的鉴定,可实现对临床与自然环境中常见的19种分枝杆菌的同时检测^[13]。此外,该鉴定技术主要是在PCR扩增反应结束后,通过逐步提升温度并观察相关荧光信号获取熔解曲线,伴随着反应中DNA的变形,荧光染料可重新恢复至游离状态,进而引起荧光信号的改变,之后通过温度和荧光信号变化值明确熔解温度值(T_m)^[14]。而差异性分枝杆菌菌种的扩增所产生的熔解曲线 T_m 值不一致,故而可通过荧光PCR熔解曲线法实现对NTM菌种的迅速鉴定,具有极高的特异性。另外,16S rRNA基因测序法与荧光PCR熔解曲线法鉴定结果不一致菌株共13株,包括5株M.龟/脓肿及8株M.鸟。证实了荧光PCR熔解曲线法鉴定NTM菌种存在一定的假阴性,笔者认为可能和下述几点有关:(1)检测过程中温控效果欠佳,导致扩增效率的异常降低,进而导致假阴性结果。(2)离心机存在质量和使用不正确等问题,从而导致离心标本模板无法

分离,从而造成假阴性结果。(3)开壳剂及操作问题促使标本DNA无法有效暴露,进一步使得扩增无法顺利进行,引发假阴性。由此可见,临床工作中应针对上述原因予以有效处理,进而达到提高鉴定准确性的目的。

综上所述,荧光PCR熔解曲线法应用于痰标本NTM菌种的鉴定价值较高,可实现对NTM菌种的迅速鉴定。相较于基因测序法而言,该检测手段费用较低、更能满足实验室条件较差或人员不足情况。然而,荧光PCR熔解曲线法仅可识别19种分枝杆菌,对于其他菌种的鉴定仍需基因测序法验证。此外,本研究仍存在不足,如研究采集的菌株均源自福州肺科医院,标本来源局限。故此,为了获取更为客观可靠的数据,今后的研究中应开展多中心对照试验或积累大量NTM临床分离株实施鉴定,为NTM肺部疾病的早期诊治提供指导依据。

〔参考文献〕

- (1) Singh K, Kumari R, Tripathi R, et al. Detection of clinically important non tuberculous mycobacteria (NTM) from pulmonary samples through one-step multiplex PCR assay (J). BMC Microbiol, 2020, 20(1): 267.
- (2) Ledesma Y, Echeverría G, Claro-Almea FE, et al. The Re-Identification of Previously Unidentifiable Clinical Non-Tuberculous Mycobacterial Isolates Shows Great Species Diversity and the Presence of Other Acid-Fast Genera (J). Pathogens, 2022, 11(10): 1159.
- (3) 钟业腾,林明冠,林翀,等.海南地区疑似肺结核患者非结核分枝杆菌感染特征(J).中国感染控制杂志,2019,18(8): 701-707.
- (4) 张汇征,李桓,张珍,等.荧光PCR熔解曲线法在检测临床标本结核分枝杆菌及其耐药性中的应用(J).中国实验诊断学,2021,25(3): 354-356.
- (5) 刘春平,谭耀驹,苏碧仪,等.荧光PCR探针熔解曲线法检测结核分枝杆菌对利福平、异烟肼、喏诺酮及卡那霉素耐药性的评价(J).广东医学,2021,42(4): 377-381.
- (6) 李文彬,胡培磊,陈忠南,等.湖南省525株非结核分枝杆菌临床分离株的菌种鉴定与流行特征(J).中国人兽共患病学报,2022,38(5): 417-422.
- (7) 韦旭.2018-2020年平顶山地区非结核分枝杆菌菌种鉴定及耐药性分析(J).微生物与感染,2022,17(2): 65-70.
- (8) 穆晶,刘子臣,张晨,等.非结核分枝杆菌肺病的病理学特征及分子病理在其诊断中的价值(J).中华病理学杂志,2020,49(6): 562-567.
- (9) 唐柳生,蒙志好,张明,等.基于熔解曲线法对肺部感染分枝杆菌菌种的研究(J).临床肺科杂志,2021,26(11): 1639-1643.
- (10) 张娴,陈春宇,何纲,等.基于PCR的分子生物学技术在检测非结核分枝杆菌中的进展(J).生物医学工程与临床,2022,26(4): 519-523.
- (11) 吴慧娜,马金平.2017-2021年菏泽地区非结核分枝杆菌菌

- 种分布及耐药性观察 (J). 航空航天医学杂志, 2022, 33(12): 1440-1442.
- (12) 李爱芳, 谈小文, 崔晓利, 等. 荧光 PCR 熔解曲线法在非结核分枝杆菌菌种鉴定中的应用价值 (J). 中国防痨杂志, 2021, 43(7): 664-669.
- (13) 宋克玉, 张琴, 王雯菁, 等. 2017-2019 年南京市 1719 株分枝杆菌耐药情况分析 (J). 中国防痨杂志, 2020, 42(11): 1214-1220.
- (14) 金龙, 田琦, 张宝庆, 等. 荧光 PCR 熔解曲线法检测耐药肺结核患者对左氧氟沙星和莫西沙星耐药性的效能研究 (J). 中国防痨杂志, 2022, 44(2): 159-163.
- (15) 秦中华, 景晔, 杜岩青, 等. 339 株非结核分枝杆菌临床分离株菌种鉴定及耐药性分析 (J). 中国防痨杂志, 2020, 42(6): 630-633.

〔文章编号〕 1007-0893(2023)08-0057-04

DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2023.08.018

磁共振成像在颅脑胶质瘤诊断中的应用价值

周伏庚

(湘潭市第二人民医院, 湖南 湘潭 411100)

〔摘要〕 目的: 分析颅脑胶质瘤诊断中应用磁共振成像的应用价值。方法: 选取 2021 年 1 月至 2023 年 1 月在湘潭市第二人民医院诊疗的 100 例疑似颅脑胶质瘤患者, 全部患者均接受磁共振成像和计算机断层扫描 (CT) 检查, 比较两种方法的诊断效能和应用价值。结果: 100 例疑似颅脑胶质瘤患者最终确诊 91 例, 磁共振检查诊断颅脑胶质瘤 89 例, 颅脑 CT 诊断颅脑胶质瘤 78 例; 磁共振成像准确度、灵敏度、特异度均高于颅脑 CT, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 磁共振成像检查对 I 级颅脑胶质瘤的检出率高于颅脑 CT, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 其余级别两种方式检出率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论: 磁共振成像诊断颅脑胶质瘤的效果较 CT 更好, 具备更高的诊断效能, 并能够明确胶质瘤的级别, 在低级别胶质瘤检查中优势显著。

〔关键词〕 颅脑胶质瘤; 磁共振成像; 计算机断层扫描

〔中图分类号〕 R 651.1 〔文献标识码〕 B

颅脑胶质瘤即发生在颅脑部的原发性颅脑恶性肿瘤, 是由大脑和脊髓胶质细胞癌变所产生的肿瘤, 在全部颅内肿瘤中的占比约为 35%~60%^[1]。一项流行病学调查结果显示, 颅脑胶质瘤发病率逐年升高, 每 10 万人中年均有 3~8 人新发, 虽然整体发病率不如其他系统恶性肿瘤高, 但其对人们身心健康、生命安全造成的严重影响不容忽视^[2]。颅脑胶质瘤可分为 I~IV 级, III、IV 级为高级别颅脑胶质瘤, 治疗难度更高、侵袭能力更强, I、II 级低级别的病变干预不及时也可能进展为高级别胶质瘤, 不同类型疾病治疗方式存在差异^[3]。因此, 尽早明确颅脑胶质瘤诊断, 鉴别其疾病类型具有重要意义。影像学检查是颅脑胶质瘤诊断的常用辅助方法, 磁共振成像检查相较于计算机断层扫描 (computer tomography, CT) 等传统方法具备分辨率高的特点, 结果更为准确, 且磁共振检查利用的是人体中氢原子在磁场中的作用成像, 无辐射、无创, 且能为诊断提供多方位、多参数、

多序列的影像, 备受临床推崇^[4]。基于此, 本研究探讨了磁共振成像诊断颅脑胶质瘤的价值, 详情报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2021 年 1 月至 2023 年 1 月在湘潭市第二人民医院诊疗的 100 例疑似颅脑胶质瘤患者, 其中男性 58 例, 女性 42 例; 年龄 23~83 岁, 平均 (58.43 ± 11.05) 岁; 病程 1~6 个月, 平均 (3.24 ± 0.48) 个月; 主要症状表现: 视力下降 54 例, 颅内压升高 43 例, 眼球震颤 32 例, 恶心呕吐 40 例, 头痛 39 例。

1.2 病例选择

1.2.1 纳入标准 (1) 临床症状疑似颅脑胶质瘤; (2) 临床资料完整; (3) 知晓本研究目的、过程、意义且能够配合研究; (4) 沟通能力、认知能力较好能够配合检查。

〔收稿日期〕 2023-02-18

〔作者简介〕 周伏庚, 男, 副主任医师, 主要研究方向是磁共振诊断。