

[文章编号] 1007-0893(2023)16-0062-03

DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2023.16.019

# 荧光定量 PCR 检测结核分枝杆菌 DNA 与涂片抗酸染色在肺结核诊断中应用比较

孙天文<sup>1</sup> 王晓艳<sup>2</sup>

(1. 周口市中心医院, 河南 周口 466099; 2. 周口市传染病医院, 河南 周口 466001)

**[摘要]** 目的: 比较荧光定量聚合酶链式反应 (PCR) 检测结核杆菌脱氧核糖核酸 (DNA) 与涂片抗酸染色在肺结核诊断中的应用价值。方法: 选取 2019 年 1 月至 2022 年 1 月周口市中心医院和周口市传染病医院收治的 98 例疑似肺结核患者作为研究对象。所有患者均采集痰液标本, 进行荧光定量 PCR 检测结核杆菌 DNA、涂片抗酸染色及痰培养检查, 比较肺结核检出情况, 并以痰培养结果为标准, 比较荧光定量 PCR、抗酸染色诊断肺结核的诊断效能; 以  $Kappa$  检验分析荧光定量 PCR、抗酸染色诊断与痰培养一致性。结果: 98 例疑似患者经痰培养确诊 82 例, 荧光定量 PCR 检出 79 例, 抗酸染色检出 70 例; 荧光定量 PCR 与抗酸染色特异度、阳性预测值、阴性预测值比较, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 荧光定量 PCR 诊断肺结核灵敏度、准确度均高于抗酸染色, 差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ );  $Kappa$  检验显示, 荧光定量 PCR 与痰培养一致性高 ( $\kappa = 0.757, P < 0.001$ ); 抗酸染色与痰培养一致性尚可 ( $\kappa = 0.484, P < 0.001$ )。结论: 荧光定量 PCR 检测结核杆菌 DNA 诊断肺结核的效能较涂片抗酸染色更高, 能够提高检测的灵敏度、准确度, 降低漏诊、误诊的概率。

**[关键词]** 肺结核; 结核分枝杆菌; 荧光定量聚合酶链式反应; 抗酸染色

**[中图分类号]** R 521 **[文献标识码]** B

肺结核是由结核分枝杆菌感染所致的传染性疾病, 早期无明显症状, 当病菌大量繁殖并持续破坏肺组织时, 可引起咳嗽、咯血、胸痛等症状, 若不及时治疗, 可严重损伤患者肺功能<sup>[1-2]</sup>。现阶段临床在肺结核治疗方面已较为成熟, 通过规律、足疗程用药, 能够抑制结核分枝杆菌增殖, 加快患者转阴, 以阻止肺功能持续下降, 而及早明确诊断尤为重要。但肺结核症状不典型及影像学表现复杂多样, 使得临床诊断难度较大, 易出现漏诊、误诊, 延误患者治疗时机, 增加临床肺结核防控难度<sup>[3-4]</sup>。涂片抗酸染色为当前肺结核常用诊断方式, 具有简单易行特点, 通过一系列染色、加热等处理后, 可促使结核分枝杆菌被染成红色, 从而便于临床诊断, 但阳性率较低, 漏诊风险较高<sup>[5]</sup>。而荧光定量聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 检测则是一种分子诊断技术, 能够直接对结核分枝杆菌脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 进行定量检测, 具有检测迅速、易于标准化、可重复性强等特点<sup>[6]</sup>。基于此, 本研究比较了荧光定量 PCR 检测与涂片抗酸染色诊断肺结核的临床价值, 结果报道如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取 2019 年 1 月至 2022 年 1 月周口市中心医院和

周口市传染病医院收治的 98 例疑似肺结核患者作为研究对象, 其中男 55 例, 女 43 例; 年龄 29 ~ 72 岁, 平均年龄 ( $44.96 \pm 4.58$ ) 岁; 体质量指数  $18.9 \sim 28.7 \text{ kg} \cdot \text{m}^2$ , 平均体质量指数 ( $24.15 \pm 2.06$ )  $\text{kg} \cdot \text{m}^2$ 。

**1.1.1 纳入标准** (1) 均伴有发热、持续咳嗽或盗汗等症状超过 2 周; (2) 经胸部 X 线检查示肺部存在异常阴影; (3) 精神状态正常; (4) 均采集痰液标本开展痰培养、荧光定量 PCR 检测、涂片抗酸染色检测; (5) 患者及家属知情同意本研究。

**1.1.2 排除标准:** (1) 存在酗酒史; (2) 存在严重躯体疾病; (3) 伴有恶性肿瘤; (4) 存在肝肾功能障碍。

### 1.2 方法

所有疑似肺结核患者均开展痰培养、荧光定量 PCR 检测结核杆菌 DNA、涂片抗酸染色检测, 均于清晨漱口后用力咳出气管深处痰液作为标本, 置于无菌标本盒内加盖送检。

**1.2.1 痰培养** 严格参照《分枝杆菌分离培养标准化操作程序及质量保证手册》<sup>[7]</sup> 进行痰培养操作, 阳性质控菌株为卡介苗株 D2BP302S11, 将大肠埃希菌 ATCC25922 作为阴性质控, 质控有效前提下, 长期观察可见菌落生长, 且经抗菌染色法验证为阳性。

[收稿日期] 2023-06-27

[作者简介] 孙天文, 男, 主管技师, 主要从事检验科工作。

1.2.2 荧光定量 PCR 均严格按照实验室标准开展结核分枝杆菌 DNA 检测, 根据 Xpert MTB/RIF 试剂盒要求进行样本痰沉淀处理, 把处理好的样本加入一次性的 Xpert 检测匣; 仪器选用全自动医用 PCR 分析系统 GX-IV R2 (瑞典赛沛公司); 检测结果通过 GeneXpert System 测量荧光信号和内设的计算算法来判定, 由系统直接报告结果。

1.2.3 抗酸染色 先取 1 滴无菌蒸馏水置于载玻片上, 挑取待染色菌置于无菌蒸馏水内, 涂布均匀后, 自然风干涂片并加热固定; 将玻片滤纸置于涂片上, 加入 1 滴石碳酸复红染液, 之后置于酒精灯上加热, 冒蒸汽后移开火焰静置 5 min, 去除滤纸以自来水冲洗, 摇动的同时进行脱色处理, 至无染色液浮出, 确保完全脱色; 再进行自来水冲洗, 加入复染液进行 20 ~ 30 s 复染, 清洗后风干, 油镜下观察, 分枝杆菌颜色为红色, 并以大肠埃希菌为对照组, 大肠埃希菌为蓝色。

1.3 观察指标

(1) 肺结核检出情况: 比较荧光定量 PCR、抗酸染色肺结核检出情况。(2) 诊断效能: 以痰培养结果为标准, 分析荧光定量 PCR、抗酸染色诊断肺结核的灵敏度、特异度、准确度、阳性预测值、阴性预测值等; 特异度 = 真阴性 / (假阳性 + 真阴性) × 100 %, 灵敏度 = 真阳性 / (真阳性 + 假阴性) × 100 %, 准确度 = (真阳性 + 真阴性) / (真阳性 + 真阴性 + 假阳性 + 假阴性) × 100 %, 阳性预测值 = 真阳性 / (真阳性 + 假阳性) × 100 %, 阴性预测值 = 真阴性 / (真阴性 + 假阴性) × 100 %。

(3) 一致性分析: 采用 Kappa 检验验证荧光定量 PCR、抗酸染色诊断肺结核与痰培养的一致性。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行数据处理, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 *t* 检验, 计数资料用百分比表示, 采用  $\chi^2$  检验, 一致性采用 Kappa 检验 ( $\kappa > 0.75$  表明一致性高,  $\kappa$  在 0.40 ~ 0.75 之间表明一致性尚可,  $\kappa < 0.40$  表明一致性低),  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 患者的肺结核检出情况

98 例疑似患者经痰培养确诊 82 例, 荧光定量 PCR 检出 79 例, 抗酸染色检出 70 例。

2.2 荧光定量 PCR 与抗酸染色诊断效能比较

以痰培养结果为标准, 荧光定量 PCR、抗酸染色的检测结果见表 1。荧光定量 PCR 与抗酸染色特异度、阳性预测值、阴性预测值比较, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 荧光定量 PCR 诊断肺结核灵敏度、准确度均高于抗酸染色, 差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 2; Kappa 检验显示, 荧光定量 PCR 与痰培养一致性高 ( $\kappa = 0.757, P < 0.001$ ); 抗酸染色与痰培养一致性尚可 ( $\kappa = 0.484, P < 0.001$ )。

表 1 荧光定量 PCR 与抗酸染色诊断效能 (例)

方法	结果	痰培养		合计
		阳性	阴性	
抗酸染色	阳性	67	3	70
	阴性	15	13	28
荧光定量 PCR	阳性	77	2	79
	阴性	5	14	19
合计		82	16	98

注: PCR — 聚合酶链式反应。

表 2 荧光定量 PCR 与抗酸染色诊断效能 (%)

方法	灵敏度	特异度	准确度	阳性预测值	阴性预测值
抗酸染色	81.71(67/82)	81.25(13/16)	81.63(80/98)	95.71(67/70)	46.43(13/28)
荧光定量 PCR	93.90(77/82) <sup>a</sup>	87.50(14/16)	92.86(91/98) <sup>a</sup>	97.47(77/79)	73.68(14/19)

注: PCR — 聚合酶链式反应。与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

3 讨论

结核分枝杆菌是诱发结核病的重要病原菌, 属于专性需氧菌, 由于细胞壁内脂质含量高, 会对营养物质的吸收造成阻碍, 使得该病菌生长较为缓慢, 但具有较强耐干燥、酸、冷等能力, 即使处于阳光直射下, 痰液内该病菌也需 2 ~ 7 h 才会被杀死, 故存在较强传染性<sup>[8]</sup>。而肺结核患者为重要传染源, 病菌可随着飞沫传播, 一旦被机体抵抗力差、年龄大等易感者吸入, 则易侵袭进入肺组织, 持续复制并引起肺部炎症病变, 随着肺结核的不断进展, 可破坏肺组织结构, 促使肺功能明显减退、

运动耐力降低, 严重影响工作及生活。肺结核若不及时治疗可逐渐扩散至脑、肝等组织, 引起相应部位并发症, 危及患者生命, 早发现、早确诊、早治疗尤为重要。

痰培养为当前诊断肺结核的金标准, 通过采集痰液进行病原菌培养, 能够准确鉴别疾病, 但其培养周期过长, 不适用于早期疾病诊断<sup>[9-10]</sup>。抗酸染色则为早期诊断常用方法, 通过对痰涂片内病原菌进行染色, 能够通过染色结果进行鉴别诊断, 且操作简单、出结果快, 故临床应用广泛。其原理在于结核分枝杆菌细胞壁内脂质含量较高, 充分包裹于肽聚糖外围, 使得该病菌着色困难,

常需经过较长时间的加热、染色方可使其着色，且病菌内分枝菌酸结合染料后难以被酸性脱色剂脱色，故经处理后结核分枝杆菌可呈红色，与其他细菌及背景的蓝色可良好区别，以便于早期诊断<sup>[11-12]</sup>。但抗酸染色易受染色、涂片过程中误差及操作者主观性等因素影响，易出现漏诊、误诊风险，延误肺结核早期治疗。

本研究结果显示，98例疑似患者经痰培养确诊82例，荧光定量PCR检出79例，抗酸染色检出70例；荧光定量PCR与抗酸染色特异度、阳性预测值、阴性预测值比较，差异均无统计学意义（ $P > 0.05$ ）；荧光定量PCR诊断肺结核灵敏度、准确度均高于抗酸染色，差异均具有统计学意义（ $P < 0.05$ ）；*Kappa*检验显示，荧光定量PCR与痰培养一致性高（ $\kappa = 0.757, P < 0.001$ ）；抗酸染色与痰培养一致性尚可（ $\kappa = 0.484, P < 0.001$ ）。提示荧光定量PCR诊断肺结核价值优于抗酸染色，能提高诊断灵敏度、准确度，便于早期治疗功能开展。其因为荧光定量PCR属于新一代分子诊断技术，可借助一对结核分枝杆菌特异性引物及特异性荧光探针，辅以耐热DNA聚合酶、PCR反应液等物质，并在体外扩增法下能够直接检测到病菌基因保守段，从而实现动态检测标本内结核分枝杆菌DNA含量，且该方法不受细胞表型影响，故诊断灵敏度、特异度更高<sup>[13-14]</sup>。同时，该技术检测过程中实现全封闭式DNA检测，能够一定程度上减少外界因素对结果准确性的干扰，诊断准确性更高，并能够定量测定DNA，有利于临床了解患者感染程度及结核分枝杆菌复制水平，为治疗效果监测及疾病转归评估提供参考<sup>[15]</sup>。但临床实际检测过程中在样本液化、DNA提取等操作过程中也存在一定污染风险，还需加强规范化操作，降低污染对结果准确性的影响。

综上所述，荧光定量PCR检测结核杆菌DNA诊断肺结核的效能较涂片抗酸染色更高，能够提高检测的灵敏度、准确度，降低漏诊、误诊的概率。

#### [参考文献]

- [1] 任欣欣, 冯秀莉, 崔丹, 等. 利奈唑胺联合环丝氨酸胶囊治疗肺结核对患者免疫细胞以及 X-pert MTB/RIF 以及肺 CT 的影响研究 [J]. 中国 CT 和 MRI 杂志, 2022, 20 (1): 63-66.
- [2] PHETSUKSIRI B, RUDEEANEK SIN J, SRISUNGNGAM S, et al. Comparison of Loop-Mediated Isothermal Amplification, Microscopy, Culture, and PCR for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis [J]. Japanese Journal of Infectious Diseases, 2019, 72 (2): 112-114.
- [3] 李点, 郑正, 江叶舟. 血清 GM-CSF、sTREM-1 联合 T-SPOT. TB 鉴别诊断肺结核的价值 [J]. 检验医学, 2021, 36 (8): 833-836.
- [4] 魏兰, 贾新转, 秦学博, 等. 血清 CXCL13 趋化因子受体 3 配体检测在活动性肺结核诊断中的价值 [J]. 中国防痨杂志, 2019, 41 (11): 1167-1172.
- [5] 欧维正, 刘海兰, 雷毅娜, 等. 支气管肺泡灌洗液涂片抗酸染色、L-J 培养、TB-LAMP、Xpert MTB/RIF 检测在肺结核诊断中的应用比较 [J]. 山东医药, 2020, 60 (23): 57-60.
- [6] 袁瑛, 明湘虹, 郑宏, 等. 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): 538-540.
- [7] 赵雁林, 王黎霞, 成诗明, 等. 分支杆菌分离培养标准化操作程序及质量保证手册 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013.
- [8] OLIVERIA J N, ODERO S A, NZINGA J, et al. Perspectives and practices of health workers around diagnosis of paediatric tuberculosis in hospitals in a resource-poor setting-modern diagnostics meet age-old challenges [J]. BMC Health Services Research, 2020, 20 (1): 708.
- [9] 林媛, 谭守勇, 彭德虎, 等. 结核感染 T 细胞斑点试验、Xpert Mtb/RIF 检测技术在老年肺结核中的诊断价值 [J]. 临床肺科杂志, 2019, 24 (2): 199-204.
- [10] 吴联朋. RNA 恒温扩增实时荧光检测痰标本结核分枝杆菌对肺结核诊断的应用价值 [J]. 中国卫生检验杂志, 2021, 31 (20): 2469-2472.
- [11] 陈泉, 郭碧波, 吴孟征, 等. 肺泡灌洗液结核杆菌 RNA 和 DNA 检测在痰菌阴性肺结核诊断中的临床应用 [J]. 传染病信息, 2019, 32 (4): 344-345.
- [12] 张波, 张涛, 张茜, 等. 痰液涂片、支气管刷片抗酸染色联合  $\gamma$ -干扰素释放试验对肺结核的诊断价值 [J]. 海南医学, 2021, 32 (21): 2759-2762.
- [13] BRONDER T S, JESSING M P, POGHOSSIAN A, et al. Detection of PCR-amplified tuberculosis DNA fragments with polyelectrolyte-modified field-effect sensors [J]. Analytical Chemistry, 2018, 90 (12): 7747-7753.
- [14] 吴联朋. RNA 恒温扩增实时荧光检测痰标本结核分枝杆菌对肺结核诊断的应用价值 [J]. 中国卫生检验杂志, 2021, 31 (20): 2469-2472.
- [15] 孙林雍, 严嘉琦, 陈昶, 等. 荧光定量 PCR 与抗酸特殊染色对疑似骨关节结核中结核分枝杆菌的检测对比 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2020, 36 (9): 1105-1107.