

• 临床研究 •

荧光定量聚合酶链反应快速检测胸腹水抗酸杆菌的临床应用

孙 庆

(江苏省徐州市传染病医院检验科 221004)

摘 要:目的 探讨荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)检测胸腹水抗酸杆菌的实用价值及其临床应用。方法 比较 FQ-PCR 法、涂片染色法及罗氏培养法检测 80 例结核性胸腹水标本的阳性检出率。结果 涂片染色法阳性率为 11.25%, FQ-PCR 法为 45.0%, 两者比较差异有统计学意义($\chi^2=22.5391, P<0.05$); 以罗氏培养法为金标准, FQ-PCR 法的敏感度、特异度、阳性预测值、阴性预测值及准确度分别为 96.43%、82.69%、75.00%、97.73% 和 87.5%。结论 FQ-PCR 法检测胸腹水抗酸杆菌优于涂片染色法, 与罗氏培养法的符合率较高, 可明显提高检验水平, 能够满足临床诊疗的需要。

关键词:聚合酶链反应; 胸水; 腹水; 抗酸杆菌

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.13.035

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)13-1479-02

Clinical application of fluorescent quantitation polymerase chain reaction in the
detection of acid-fast bacillus in hydrothorax and ascites

Sun Qing

(the Municipal Hospital for Infectious Diseases, Xuzhou Jiangsu 221004, China)

Abstract: Objective To explore the clinical value and application of fluorescent quantitation polymerase chain reaction(FQ-PCR) in the detection of acid-fast bacillus in hydrothorax and ascites. **Methods** The positive rates of FQ-PCR, smear and staining method, and L-J medium culture in the detection of acid-fast bacillus in tubercular hydrothorax and ascites were compared. **Results** The positive rates of FQ-PCR and smear and staining method were 11.25% and 45.0%, and there was statistical difference them ($P<0.05, \chi^2=22.5391$). Taking L-J medium culture as standard method, the sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and veracity were 96.43%, 82.69%, 75.00%, 97.73% and 87.5% respectively. **Conclusion** For the detection of acid-fast bacillus in tubercular hydrothorax and ascites, FQ-PCR could be better than smear and staining method. There was fine coincidence between the detection results of FQ-PCR and L-J medium culture. FQ-PCR could improve the detection efficiency, and meet the needs of clinical diagnosis and therapy.

Key words: polymerase chain reaction; hydrothorax; ascites; acid-fast bacillus

结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)是兼性细胞内致病菌,能够导致进行性疾病和无症状潜伏感染,其中潜伏感染者占世界人口的 1/3,并且每年有 900 万新增结核病病例,200 万人死于结核病;中国仍是全球结核病流行严重的国家之一^[1-2]。结核病的临床诊断主要根据病史、微生物培养、痰标本涂片抗酸染色以及胸部 X 片等结果,多种原因可造成漏诊或误诊^[3]。结核性胸膜炎是由于 MTB 及其代谢产物进入胸膜腔而机体正处于超敏状态,引起大量炎性细胞、蛋白质及纤维素渗出的炎性疾病。胸腹水抗酸杆菌检测对于结核病的诊断与疗效判断有着重要的意义,但目前常用的直接涂片法检出率较低,罗氏培养法则耗时较长^[4];结核抗体检测虽然操作简便,但仍存在假阴性或假阳性结果^[5]。因此,胸膜活检和胸液病原学检查仍为诊断结核性胸膜炎的“金标准”,提高其检出率的探讨已有报道^[6]。笔者以荧光定量聚合酶链反应(fluorescent quantitative polymerase chain reaction, FQ-PCR)对结核病及肝炎患者胸腹水进行了 MTB 检测,结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本院 2009 年 7 月至 2010 年 6 月有胸腹水症状的确诊结核病患者 80 例(结核组),本院同期有胸腹水症状、确诊排除结核病的肝炎患者 20 例(对照组)。

1.2 仪器与试剂 罗氏培养基(普朗,南京),9800 型 FQ-PCR 仪及配套试剂盒、SpanStar2416 型台式高速离心机、WitBuffalo 型真空泵(安普利,厦门),抗酸染色试剂(贝索,台湾),质控菌株 H37Rv ATCC27294(徐州市疾病预防控制中心提供)。

1.3 方法

1.3.1 标本采集及处理 每位受试对象均抽取胸腹水标本 12 mL,分别混匀后分为 3 等份,每份标本离心后留取沉淀分别进行涂片染色、罗氏培养和 FQ-PCR 检测。

1.3.2 涂片染色检测 沉淀物直接涂片后行抗酸染色(本科室该项目已参加徐州市疾病预防控制中心室间质量考评),方法参照文献^[7]。

1.3.3 罗氏培养检测 按照操作规程的步骤进行操作^[8],以 H37Rv 作为质控菌株。

1.3.4 FQ-PCR 检测 (1)标本处理:向沉淀中加入裂解液 100 μ L,振荡混匀,室温静置 10 min,10 000 g 离心 25 s 弃去上清液,加入 150 μ L 洗涤液 B 混悬沉淀,10 000 g 离心 25 s 后弃去上清液,加入 150 μ L 洗涤液 C 混悬沉淀,10 000 g 离心 25 s 后弃去上清,加入 30 μ L 反应缓冲液混悬沉淀,取 25 μ L 加入 PCR 反应管中,振荡混匀,低速短时离心后置 PCR 扩增仪内。(2)扩增检测:38 $^{\circ}$ C 5 min,95 $^{\circ}$ C 10 min;95 $^{\circ}$ C 15 s,58 $^{\circ}$ C 30 s (30s 后收集荧光信号),循环 40 次;38 $^{\circ}$ C 30 s。荧光素设定为 5(6)-羧基荧光素[5-(and-6)-carboxyfluorescein, 5(6)-FAM],荧光信号收集设在 58 $^{\circ}$ C。(3)结果判断:检测结果小于 5.0×10^2 IU/mL 时判断为阴性,自制质控品定量为 6.0×10^5 IU/mL。

1.4 统计学处理 采用 PEMS 3.0 医学统计软件进行数据分析。率的比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 时比较差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 对照组及结核组患者胸腹水标本检测结果 见表 1。

2.2 结核组患者胸腹水标本罗氏培养法、FQ-PCR 法检测结果比较 以罗氏培养法为参考方法,以 FQ-PCR 法为试验方

法,分析 FQ-PCR 诊断结核病的敏感度、特异度、阳性预测值、阴性预测值及准确度分别为 96.43%、82.69%、75.00%、97.73%和 87.5%,详见表 2。

表 1 对照组及结核组患者胸腹水标本检测结果[n 或 n(%)]

组别	n	涂片染色法		罗氏培养法		FQ-PCR 法	
		阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
对照组	20	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
结核病组	80	9(11.3)*	71(88.7)	28(35.0)*	52(65.0)	36(45.0)	44(55.0)

* :P<0.05,与同组别 FQ-PCR 法检测阳性率比较;# :P>0.05,与同组别 FQ-PCR 法比较。

表 2 结核病组患者胸腹水标本罗氏培养法与 FQ-PCR 法检测结果(n)

FQ-PCR 法	罗氏培养法		合计
	阳性	阴性	
阳性	27	9	36
阴性	1	43	44
合计	28	52	80

3 讨 论

结核病发病率在中国呈上升趋势,而结核性胸膜炎发病率在肺外结核中仅次于淋巴结结核。涂片染色法和微生物培养法已不能满足结核病检查的临床需要,FQ-PCR 则具有操作简便、检测速度快、阳性检出率高、有利于动态监测等优势。

本研究显示,对结核病患者胸腹水标本离心沉淀进行 MTB 检测,FQ-PCR 法阳性率(45.0%)高于涂片染色法阳性率(11.3%),且差异有统计学意义,与相关文献报道一致^[9]。涂片染色法受多种因素影响,如:只有当标本中 MTB 浓度大于 10⁶/mL 时,涂片染色法才可检出;MTB 在标本中可聚集成团,导致涂片分布不匀;染色过程中的冲洗操作很有可能导致载玻片上的 MTB 流失;检验人员的操作技术水平有限。以罗氏培养法作为参考方法,FQ-PCR 法的敏感度较高(96.43%),但有 9 例假阳性结果,排除污染的可能性之外,可能与标本中的 MTB 不能在培养基上生长或患者处于潜伏感染期有关,与国内现有报道相符^[10];有 1 例假阴性结果,可能是扩增中存在有 DNA 聚合酶的抑制物或者患者此时不排菌^[11],需对该患者进行间断性 FQ-PCR 定量动态观察。PCR 法是对核酸进行扩增,无法区别死菌和活菌,不能区别活动型和静止型结核病,应结合培养法以及 FQ-PCR 定量动态检测,综合检测结果进行诊疗效果的观察。在判断结核性胸膜炎治疗效果方面,PCR 检测最为有效,因为其不但可检出活菌,也可检测已死亡但 DNA 尚未降解的死菌。临床通过定期、定量检测残存菌的数

量,可以确切评价疗效。FQ-PCR 是在密闭系统中进行检测,减少了反应体系本身对实验室环境的污染,有利于实现检验人员的生物安全防护。

FQ-PCR 法是对胸腹水标本进行 MTB 检测的一种敏感、特异、污染少、可动态定量的方法^[12],有利于临床对结核病患者动态观察和疗效观察,也有利于结核病的早日控制。

参考文献

[1] World Health Organization. . Global tuberculosis control:surveillance,planning,financing[R]. Geneva:WHO,2006.

[2] 庄玉辉.加强结核病试验室新技术的临床应用研究[J].中华检验医学杂志,2001,24(1):70.

[3] 曹晓慧,张媛媛,万康林. PCR 技术在结核病诊断中的应用[J]. 中国人兽共患病杂志,2005,21(12):1110-1121.

[4] 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.

[5] 谭卫国,罗道泉,杨应周. 三种结核抗体快速测试的临床诊断价值探讨[J]. 临床肺科杂志,2001,6(2):46.

[6] 杨贵发,梁红文. 结核性胸膜炎实验室诊断技术进展[J]. 临沂医专学报,2001,23(2):128-130.

[7] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 2 版. 南京:东南大学出版社,1997.

[8] 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):80-85.

[9] 周辉,龚志平,钟白云. 胸腹水脑脊液中结核杆菌的检测[J]. 实用预防医学,2005,12(1):63-64.

[10] 李国利,赵络,王巍,等. 荧光探针杂交技术检测临床标本内结核杆菌的价值[J]. 中国防痨杂志,2003,25(2):65-67.

[11] 巢薇,盛慧琴,杨柳光. 荧光定量 PCR 技术在结核杆菌检测中的初步探讨[J]. 实用医技杂志,2006,13(1):55.

[12] 徐宁. 痰中结核杆菌的检测方法和临床意义[J]. 临床肺科杂志,2009,14(4):536.

(收稿日期:2011-01-11)

(上接第 1478 页)

进行合理控制和监测,防止脑梗死病情的进展,有利于脑梗死患者早日康复。

参考文献

[1] 温庆祥,古颖. 贺氏三通法对急性缺血性脑血管病患者的临床血清学影响[J]. 标记免疫分析与临床,2008,15(2):120-121.

[2] 李文慧. 各类脑血管疾病诊断要点[J]. 中华神经科杂志,1996,29(6):379.

[3] 王义刚,邢永前,郑华,等. 神经元特异性烯醇化酶与急性脑梗死[J]. 临床神经病学杂志,2001,14(2):74-75.

(收稿日期:2011-01-05)