

• 检验技术与方法 •

DNA 与结核抗体联合检测对结核性胸膜炎的诊断意义

李玉明, 郭明日, 张 立

(天津市海河医院检验科, 天津 300350)

摘要:目的 探讨 DNA 和结核抗体(TB-Ab)联合检测在结核性胸膜炎的临床诊断意义。方法 分别采用斑点金免疫渗滤法和实时荧光定量 PCR 法对 95 例结核性胸腔积液患者及 45 例非结核性胸腔积液患者进行 TB-Ab 和结核分枝杆菌 DNA 检测, 并对结果进行分析比较。结果 结核性胸膜炎组结核分枝杆菌 DNA 检测阳性率为 56.8%, 显著高于非结核性胸膜炎组(4.4%), 差异具有统计学意义($P<0.05$)。结核性胸膜炎组 TB-Ab 检测阳性率为 58.9%, 显著高于非结核性胸膜炎组(6.6%), 差异具有统计学意义($P<0.05$)。两项指标应用结核性胸膜炎组阳性率可提高为 78.9%, 显著高于涂片镜检以及结核菌培养单项检测阳性率, 差异具有统计学意义($P<0.01$)。结论 结核分枝杆菌 DNA 与 TB-Ab 联合检测可明显提高结核性胸膜炎的阳性检出率, 而且快速、简便、易操作。

关键词:结核分枝杆菌; 聚合酶链反应; 抗酸染色; DNA; 结核抗体

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.12.038

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)12-1612-03

Significance of combined detection of DNA and tuberculosis antibody in the diagnosis of tuberculous pleurisy

Li Yuming, Guo Mingri, Zhang Li

(Department of Clinical Laboratory, Haihe Hospital of Tianjin, Tianjin 300050, China)

Abstract: **Objective** To discuss the significance of combined detection of DNA and tuberculosis antibody(TB-Ab) in the diagnosis of tuberculous pleurisy. **Methods** Dot immunogold filtration assay and real-time fluorescence PCR method were respectively used to detect TB-Ab and DNA of 95 cases of tuberculous pleural effusion patients(tuberculosis pleurisy group) and 45 cases of patients without tuberculous pleural effusion(non-tuberculous pleurisy group). Results were analyzed and compared. **Results** The positive rate of Mycobacterium tuberculosis DNA in tuberculosis pleurisy group was 56.8%, which was higher than that of non-tuberculous pleurisy group(4.4%), with significant difference between them($P<0.05$). The positive rate of TB-Ab in tuberculosis pleurisy group was 58.9%, higher than that of non tuberculous pleurisy group (6.6%), and the difference was statistically significant ($P<0.05$). Combined application of DNA and TB-Ab, the positive rate of tuberculosis pleurisy group could be increased to 78.9%, significantly higher than the positive rates of individual test of smear or bacterial culture($P<0.01$). **Conclusion** Combined detection of Mycobacterium tuberculosis DNA and TB-Ab can significantly improve the positive detection rate of tuberculous pleurisy, and the method is fast, simple and easy to operate.

Key words: Mycobacterium tuberculosis; polymerase chain reaction; acid fast staining; DNA; tuberculosis antibody

近年来,我国结核病发病率逐年上升,大约 30%的人口感染结核分枝杆菌,其中约 10%发展为活动性结核病^[1],导致结核性胸膜炎的发病率也呈逐年增高趋势。在我国,因胸腔积液住院的患者中,结核性胸腔积液的比例占到 49.5%~54.5%^[2]。结核性胸膜炎是临床上一种常见的胸部疾病,其临床体征及症状缺乏特异性表现,故确诊此疾病的难度较大^[3]。结核性胸膜炎的诊断主要依据临床结核中毒症状、胸部 X 线提示胸腔积液、抗酸染色涂片及结核菌培养。痰涂片抗酸染色阳性、细菌学培养阳性是结核病诊断的“金标准”,但痰涂片抗酸染色阳性率较低(33.7%),细菌培养的检出率相对略高,但也不足 50%(45.7%),而且需要 6~8 周才能报告结果,延误临床治疗,使结核病很难早期确诊。为了加快结核性胸膜炎的早期诊断和提高诊断率,本文探讨了结核分枝杆菌 DNA 与结核抗体(TB-Ab)联合检测对结核性胸膜炎的诊断意义,将 95 例已确诊的结核性胸膜炎患者和 45 例非结核性胸膜炎患者的胸腔积液标本进行 TB-Ab 检测,同时对痰标本进行实时荧光定量 PCR 检测,将各项结果对比研究,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 回顾性分析本院 2012 年 5 月至 2013 年 4 月

结核科住院患者 95 例(结核组),年龄 21~86 岁,平均 41 岁,其中男 61 例,女 34 例,胸腔积液由临床医师按照标准操作规程留取,置于无菌标本盒中送检。结核性胸腔积液的留取标准如下^[4]:临床表现有结核中毒症状以及胸腔积液体征;影像学胸部 X 线或 CT 检查发现胸腔积液, B 超检查提示肺部有液性暗区;实验室检查为胸腔积液常规提示为细菌性渗出液。同期选取非结核性胸腔积液组患者共 45 例(非结核组),男 30 例,女 15 例,年龄 28~81 岁,平均 51 岁,其中 29 例肺癌患者均经病理学检查确诊,其他原因 16 例(含支气管扩张 11 例、不明原因性肺炎 5 例),均不存在既往以及现在活动性肺结核体征,影像学未提示陈旧结核,无免疫增强剂治疗史,无放疗、化疗和手术病史。

1.2 仪器与试剂 结核抗体(TB-Ab)试剂盒来自上海奥普生物医药有限公司;痰标本结核分枝杆菌 DNA 的检测采用 ABI 7500 型实时荧光定量 PCR 仪,试剂盒为广州达安基因股份有限公司产品。

1.3 方法 TB-Ab 检测采用斑点金免疫渗滤试验(DIGFA),利用纯化结核分枝杆菌细胞壁 38Kda 蛋白抗原来检测胸腔积液中相应的 IgG 抗体。痰标本结核分枝杆菌 DNA 的检测采

用 ABI 7500 型实时荧光定量 PCR 仪, 荧光 PCR 扩增程序按照试剂盒说明书进行。结核分枝杆菌荧光 PCR 检测参数: 93 ℃ 2 min; 93 ℃ 45 s, 55 ℃ 60 s, 10 个循环; 93 ℃ 30 s, 55 ℃ 45 s, 30 个循环。荧光检测点在 55 ℃ 45 s。荧光 PCR 检测结果判定: 若 Ct=30, 则实验结果为阴性; 如果 Ct<30, 则实验结果为阳性, 具体数值由仪器自带软件计算得出。涂片镜检采用萋-尼氏抗酸染色法, 为减少假阴性, 所有患者均重复 3 次留痰检查。胸腔积液标本取离心后沉渣涂片镜检。结核分枝杆菌培养是采用快速培养法, 在全自动快速结核菌培养系统进行, 培养结果按照《结核病诊断实验室检验规程》^[5]进行判定。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计, 组间差异比较采用 *t* 检验, 以 *P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

痰标本和胸腔积液标本的涂片镜检和细菌培养检测结果分别见表 1~2。TB-Ab 和结核分枝杆菌 DNA 检测结果比较, 见表 3。相关性分析显示, 结核组患者痰标本结核分枝杆菌 DNA 检测阳性率 (56.8%) 和胸腔积液 TB-Ab 阳性率 (58.9%) 与涂片镜检阳性率 (33.7%)、细菌培养检测结果的阳性率 (45.3%) 比较, 差异有统计学意义 (*P*<0.05)。TB-Ab 与结核分枝杆菌 DNA 联合检测的阳性率 (78.9%) 显著高于涂片镜检、细菌培养单项检测阳性率, 差异有统计学意义 (*P*<0.01)。

表 1 痰标本涂片镜检和细菌培养检测结果[n(%)]

组别	<i>n</i>	涂片阳性	细菌培养阳性
结核组	95	32(33.7)	43(45.3)
非结核组	45	0(0.0)	0(0.0)

表 2 胸腔积液标本涂片镜检和结核菌培养检测结果[n(%)]

组别	<i>n</i>	涂片阳性	细菌培养阳性
结核组	95	8(8.4)	18(18.9)
非结核组	45	0(0.0)	0(0.0)

表 3 TB-Ab 和结核分枝杆菌 DNA 检测结果比较[n(%)]

组别	<i>n</i>	TB-Ab 阳性	TB-DNA 阳性	联合检测阳性*
结核组	95	58.9(56)	56.8(54)	78.9(75)
非结核组	45	6.6(3)	4.4(2)	11.1(5)

*: TB-Ab、结核分枝杆菌 DNA 其中 1 项或 2 项均阳性即视为联合检测阳性标本。

3 讨 论

结核性胸膜炎是临床中结核病的常见症状, 在机体抵抗结核分枝杆菌的过程中, 各种免疫细胞及其分泌的细胞因子错综复杂的相互作用决定了感染的结局^[6]。相关文献报道, 体内 B 淋巴细胞产生的 IgG 类抗结核抗体是人体内最主要的特异性抗体, 其特点是浓度较高, 体内持续时间较长, 作为结核病血清学诊断首选的测定抗体^[7], 对诊断肺结核病尤其是肺外结核例如骨结核、结核性脑膜炎、淋巴结核等疾病具有重要意义, 肺外结核涂片阳性率低, 不易进行细菌培养, 所以对于这类结核病, TB-Ab 检测具有不可比拟的优越性。但是, 本研究中, 在诊断非结核性胸腔积液的患者中出现部分病例 (3 例) 假阳性, 考虑可能是由结核分枝杆菌存在交叉抗原的细菌所致。卡介苗预防接种以及 PPD 试验, 均可能诱导机体对结核抗原产生自身

免疫应答而出现 TB-Ab 的假阳性情况。同时笔者也注意到, 部分结核性胸膜炎病例初期 TB-Ab 检测为假阴性, 在诊断性抗结核治疗大约 2 周后, 随着症状缓解, TB-Ab 出现由阴转阳现象, 其原因可能是因为抗结核药物的使用, 诱导结核分枝杆菌菌体破碎, 进入淋巴-血液循环, 强化了对患者免疫系统的刺激, 同时机体免疫机能增强, 所以在血清与积液中出现 TB-Ab^[8-9]。本文中结核组 TB-Ab 的阳性率仅为 58.9%, 虽然 TB-Ab 的阳性率较低, 但显著高于传统方法痰涂片镜检 (33.7%) 与细菌培养 (45.3%) 的阳性率, 血清 TB-Ab 阳性对防止涂阴肺结核和肺外结核的漏诊还是很有意义的。2006 年卫生部制定的《初治涂阴活动性肺结核患者免费治疗管理指南 (试行)》也明确将血清 TB-Ab 阳性作为涂阴活动性肺结核病以及肺外结核的主要辅助诊断指标之一^[9]。

如今, 实时荧光定量 PCR 技术已实现了对结核分枝杆菌 DNA 的自动化检测, 该技术已经很完善。实时荧光定量 PCR 对排量量少的结核病例的早期诊断及减少漏诊两方面有不可逾越的优越性, 郭明日等^[10]报道了对于不同类型结核病抗酸染色阳性率为 32.6%, 而实时荧光定量 PCR 检测的阳性率为 46.5%。实时荧光定量 PCR 在常规 PCR 基础上进行了改进, 首先使模板 DNA 变性, 然后寡核苷酸引物退火到模板单链 DNA 的相应互补序列上, 延伸采用 DNA 聚合酶介导的引物, 可以使结核分枝杆菌特异性片段在很短时间内扩增到指数级, 因此实时荧光定量 PCR 的灵敏度很高。该技术属于分子和基因水平上的一种诊断结核分枝杆菌的方法, 具有特异、灵敏、不需长时间培养等优势, 已经在临床得到大范围使用, 是目前结核病诊断的重要辅助检验方法。本文表 3 结果显示, 结核组患者中, 实时荧光定量 PCR 检测痰标本结核分枝杆菌 DNA 的阳性率达 56.8%, 而在非结核组的阳性率为 4.4%。非结核组患者出现 2 例假阳性, 可能与结核杆菌 DNA 提取纯化方法复杂而影响其敏感性有关, 也可能与实验室污染有关。痰标本结核分枝杆菌 DNA 检测在活动性肺结核中的敏感性略低于 TB-Ab, 但仍有一部分菌阴肺结核患者通过实时荧光定量 PCR 获得可能的阳性率诊断, 可能原因如下: (1) 患者排菌量低、间断排菌、患者属于非开放性结核; (2) 反应体系的原因, 模板 DNA 裂解不彻底导致 DNA 模板不足、结核分枝杆菌碎片抑制 PCR 反应体系; (3) 患者感染的可能不是结核分枝杆菌^[11]。由表 1~3 中的数据可见, 结核组患者与非结核组患者相比, 痰标本结核分枝杆菌 DNA 阳性检出率显著高于涂片法 (33.7%) 和细菌培养法 (45.3%), 差异具有统计学意义 (*P*<0.05), 说明对于结核的诊断, 实时荧光定量 PCR 技术阳性率虽然不高 (仅 56.8%), 但与传统方法涂片以及细菌培养相比, 阳性检出率还是有显著提高。

综上所述, 结核性胸膜炎的诊断目前主要是基于胸膜组织学检查或胸腔积液抗酸染色涂片及细菌培养阳性, 而这些检查的灵敏度都有限, 从而为诊断带来了困难^[12]。本研究发现, TB-Ab 和结核分枝杆菌 DNA 检测对结核病均具有一定的辅助诊断价值, 但其单项检测阳性率偏低, 不能作为独立的诊断标准, 二者联合检测能明显提高结核性胸膜炎的阳性检出率, 对于提高结核病的早期诊断率具有重要意义。

参考文献

[1] World Health Organization. Global tuberculosis control: WHO report 2010[M]. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2010. (下转第 1615 页)

2.2 在所检标本中,有 1 例标本采用金标法检测为强阳性, LiCA 法检测为阳性,但 ELISA 法检测为阴性,用乙肝五项胶体金快速检测板复查显示 HBsAg 强阳性、HBeAg 阳性、HBcAb 阳性,为传染性强的“大三阳”标本,后采用 ELISA 法双孔复检,经 10 倍稀释血清的吸光度(A)值均超过 1.000,分析导致 ELISA 法初检假阴性的可能是因为标本血清中抗原量较大,远远超过抗原抗体反应的最适浓度范围,考虑为钩状(HOOK)效应所致。

2.3 有 1 例标本,经金标法、LiCA 法检测均为阴性,但 ELISA 法检测为弱阳性(A 值为 0.1~0.4),后经 ELISA 法双孔复检为阴性。分析导致 ELISA 法初检阳性的原因可能是操作过程中:(1)加样污染,将阳性标本溅到其周围微孔中造成假阳性;(2)加酶污染,将酶滴到微孔之间的板架上,洗板、扣板时未能完全去除,加显色剂时再将其带入微孔中形成阳性反应;(3)微孔中存在纤维蛋白块可能使洗板机吸针孔堵塞,致使无法将酶洗净,严重时污染周围微孔^[5]。

2.4 有 2 例标本经 ELISA 法检测为弱阳性(A 值为 0.1~0.4)、LiCA 法检测为弱阳性(检测值介于 0.5~1 ng/mL 之间),而金标法检测为阴性。分析导致金标法阴性的主要原因是由于金标法灵敏度低,当 HBsAg $\geq$ 1 ng/mL 时才可能检出,而 ELISA 试剂对于 HBsAg $\leq$ 1 ng/mL 的部分样本也可以检出^[6],博阳试剂商提供的 HBsAg 的检测下限为 0.2 ng/mL,两者的灵敏度都比金标法要高。

2.5 有 2 例标本经金标法和 ELISA 法检测均为阴性,而 LiCA 法检测为弱阳性,后经 LiCA 法双孔复检仍显示弱阳性,检出值均介于 0.2~0.5 ng/mL 之间。分析主要原因是由于 LiCA 法的灵敏度要比金标法、ELISA 法高。

3 讨 论

金标法具有简便、快速、特异性高、试剂稳定,无需检测仪器的特点,对抗原量过大的标本未出现“钩状效应”现象等优点,为了缩短患者的等待时间,减少术中交叉感染的概率,满足急诊、内窥镜检查、术前患者 HBsAg 的初步筛查,金标法快速筛查无疑是目前最好的选择,但其灵敏度低于 ELISA 法和 LiCA 法,易造成低浓度 HBsAg 标本的漏检,不适合大批量标本的检测^[7]。

ELISA 法是临床上传统的 HBV 感染诊断方法,由于其操作步骤多受人为因素的影响常有假阳性、假阴性出现,酶标仪检测的数值也不能客观反映 HBsAg 的真实浓度,不适合 HBsAg 的定量检测^[8],但该方法操作简单、灵敏度高且成本低廉,只要严格把控操作的每一个环节,还是非常适合大批量样本的

检测的^[9]。

LiCA 法为全自动系统,由于使用了全自动仪器及配套试剂,使人为影响因素减至最低,提高了方法的稳定性和结果的可重复性,使批内差异与批间差异都较小。LiCA 技术采用了纳米级颗粒,这不仅大大增加了生物分子的包被面积,同时借助于链霉亲和素-生物素分子连接放大系统,使单位体积反应体系中含有更高浓度的生物分子,为实现超高灵敏度、减少样本和试剂用量奠定了基础^[10],并且这种纳米颗粒在液相中保持稳定的悬浮状态,实现了均相、免清洗检测^[11]。LiCA 法具有高灵敏度、高通量、高稳定性等特点,重复性好、结果可靠,适合 HBsAg 的定量检测,能够较好地满足临床需求^[12]。

参考文献

- [1] 施纪文,徐简华,温惠萍. ELISA 法和胶体金免疫层析法检测乙肝表面抗原的比较[J]. 现代检验医学杂志,2005,20(5):48-49.
- [2] 罗俊,廖德君. 全血金标法检测 HBsAg 52 例漏检原因分析[J]. 临床和实验医学杂志,2006,4(4):243-243.
- [3] 庄严,李绪黎. 胶体金免疫层析法与酶联免疫吸附法结合使用在乙型肝炎检测中的应用[J]. 中国实验诊断学,2004,8(2):197-198.
- [4] 涂少华,朱敏,沈江帆. 光激化学发光法检测乙型肝炎病毒感染血清学标志的性能评价[J]. 检验医学,2011,26(7):452-456.
- [5] 栾雪静. 金标法对 ELISA 法检测 HBsAg 弱阳性标本复查的意义[J]. 现代预防医学,2011,38(23):4951-4952.
- [6] 陈向阳. 胶体金免疫层析法与 ELISA 检测 HBsAg 的比较[J]. 上海医学检验杂志,2001,16(5):305.
- [7] 李永祥,顾大光,李和群. ELISA 一步法检测 HBsAg 的“前带效应”[J]. 江西医学检验,2004,22(6):581-585.
- [8] 杨侠宇. 金标法检测乙型肝炎表面抗原漏检原因分析[J]. 检验医学与临床,2011,8(10):1279-1280.
- [9] 葛高霞,张晓洁,邱胜丰,等. 金标法与 ELISA 在检测脐血 HBsAg 中的应用[J]. 实用医学杂志,2013,28(23):4003-4004.
- [10] Kricka LJ. Clinical applications of chemiluminescence[J]. Anal Chim Acta,2003,500(1):279-286.
- [11] Ullman EF, Kirakossian H, Switchenko AC, et al. Luminescent oxygen channeling assay (LOCI): sensitive, broadly applicable homogeneous immunoassay method[J]. Clin Chem,1996,42(9):1518-1526.
- [12] 张阳根,胡桂华,黄林江. Lica 光激化学发光免疫分析系统检测乙肝两对半的性能评价[J]. 2011,32(19):2250-2251.

(收稿日期:2014-02-05)

(上接第 1613 页)

- [2] 中华医学会结核病学分会. 中国结核病分类法[J]. 中华结核和呼吸杂志,1998,46(12):716-717.
- [3] 周正华,刘锦宏. 血清及胸水结核抗体联合检测对结核性胸膜炎的诊断价值[J]. 临床肺科杂志,2012,17(4):674-675.
- [4] 叶任高,陆再英. 内科学[M]. 6 版. 北京:人民卫生出版社,2004:104-110.
- [5] 王甦民,朱建华,张立兴. 结核病诊断实验室检验规程[M]. 北京:中国教育文化出版社,2006.
- [6] Sutherland JS, Garba D, Fombah AE, et al. Highly accurate diagnosis of pleural tuberculosis by immunological analysis of the pleural effusion[J]. PLoS One,2012,7(1):e30324.
- [7] 黄景彬,严舒俊,谢胜华,等. 123 例初治涂阳肺结核患者抗结核抗体阳性率分析[J]. 医学信息,2006,19(9):1599-1602.

- [8] 鲍丽娟. CEA 铁蛋白 ADA 及抗结核抗体联合检测在胸腔积液诊断中的意义[J]. 工企医刊,2012,25(1):1-3.
- [9] 蔡智群,邝小佳,林兆原. ATA、ADA 和 PCR 在结核性腹膜炎的应用探讨[J]. 临床肺科杂志,2010,15(2):265-265.
- [10] 郭明日,吴敏,张立,等. 实时荧光 PCR 技术在不同类型结核病诊断中的应用价值[J]. 临床肺科杂志,2012,17(1):82-83.
- [11] 李晓月,安军,李琦. 痰聚合酶链反应和血清结核抗体检测等指标在菌阴肺结核诊断中的临床意义[J]. 临床肺科杂志,2012,17(3):543-544.
- [12] 崔海燕,张青,栗波,等. 结核性胸膜炎患者 Th1/Th2 及前炎症细胞因子的变化[J]. 中华临床医师杂志,2012,14(6):4109-4109.

(收稿日期:2014-01-28)