

· 论 著 ·

3 种结核分枝杆菌检测方法的比较研究*

顾丽萍¹, 陆炜方¹, 姜伟², 朱晓珏¹

(1. 江苏省张家港市第一人民医院检验科, 江苏张家港 215600; 2. 江苏省张家港市疾病预防控制中心, 江苏张家港 215600)

摘要:目的 比较沉淀集菌法、罗氏培养法和聚合酶链反应(PCR)方法检测结核分枝杆菌的临床价值。方法 收集 2012 年 6 月至 2013 年 5 月张家港市第一人民医院临床确诊且经抗结核治疗两月后结核患者的痰标本 102 份, 用以上 3 种方法进行平行检查。结果 102 份标本中, 沉淀集菌法检测结果阳性标本 92 份, 阳性率 90.19%, 罗氏培养法阳性 48 份, 阳性率 47.06%, PCR 法阳性 77 份, 阳性率 75.49%。沉淀集菌法与罗氏培养法的符合率为 56.86%, 而 PCR 法与沉淀集菌法符合率为 81.37%, 与罗氏培养法符合率为 61.76%。结论 3 种方法联合运用, 可弥补单独采用一种方法阳性率低的缺点, 从而提高检测的准确度。

关键词: 结核杆菌; 沉淀集菌法; 罗氏培养法; 聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.02.002

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)02-0148-02

Evaluation on the three methods of Mycobacterium tuberculosis detection*

Gu Liping¹, Lu Weifang¹, Jiang Wei², Zhao Xiaojue¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Zhangjiagang First People's Hospital, Zhangjiagang, Jiangsu 215600, China; 2. Center for Disease Control and Prevention in Zhangjiagang, Zhangjiagang, Jiangsu 215600, China)

Abstract: Objective To evaluate the clinical value of centrifugal precipitation, Roche culture method and polymerase chain reaction (PCR) for the detection of Mycobacterium tuberculosis. **Methods** One hundred and two sputum specimens were collected from patients with tuberculosis who had been treated for two months from June 2012 to May 2013. Those specimens were used to detected for Mycobacterium tuberculosis by three methods, and the results from three methods were compared. **Results** In the 102 samples, the numbers of positive result for Mycobacterium tuberculosis detection were 92(90.19%), 48 (47.06%) and 77(75.49%) with centrifugal precipitation, Roche culture method and PCR respectively. The coincidence rate of results by precipitation and culture method was 56.86%, 81.37% by precipitation method and PCR, and 61.76% by PCR and culture method. **Conclusion** Combination of the three methods could improve the accurate rate.

Key words: Mycobacterium tuberculosis; centrifugal precipitation; roche culture method; polymerase chain reaction

目前结核病已成为全球性的健康问题。2007 年世界卫生组织统计, 全球有 1/3 的人感染结核菌, 每年有 900 万新发病例, 300 万患者死于该病^[1]。对于结核菌的感染, 实验室检测起着举足轻重的作用。结核病的实验诊断方法主要有涂片镜检, 分枝杆菌培养, 聚合酶链反应(PCR)基因检测等^[2]。本研究以 2012 年 6 月至 2013 年 5 月张家港市第一人民医院临床确诊且经抗结核药治疗两月后的结核患者痰标本 102 份为研究对象, 用以上 3 种方法进行检查, 并对结果进行比较。现将研究结果报道如下。

1 材料与与方法

1.1 标本来源 2012 年 6 月至 2013 年 5 月张家港市第一人民医院结核病定点门诊就诊, 临床确诊为活动性肺结核且经抗结核药治疗两月后的结核患者痰液标本 102 份。

1.2 仪器和试剂 (1) XW-80A 旋涡混合器由上海医大仪器厂生产。(2) 抗酸染液和罗氏培养基由珠海贝索生物技术有限公司生产。(3) LDZX-75KBS 立式压力蒸汽灭菌器由上海申安医疗器械厂生产。(4) HC-3018 高速离心机由安徽中科中佳科学仪器有限公司生产。(5) 日本尼康 CX21 型奥林巴斯显微镜。(6) 美国 SHELLAB 培养箱由广州南方生化医学仪器有限公司生产。(7) 结核分枝杆菌(TB)核酸检测试剂盒(恒温扩增-试纸条法)为杭州优思达生物技术有限公司产品。

1.3 方法

1.3.1 沉淀集菌 取深咳痰液约 10 mL 于消毒处理过的广口瓶中, 加 5 倍量无菌蒸馏水, 经 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min, 待冷却后取上述处理后的痰液 10 mL 放入离心管内, 3 000 r/min 离心 30 min, 吸去上清液, 取沉淀物涂片, 经抗酸染色后镜检^[3]。

1.3.2 培养检测以及结果观察 在生物安全柜内, 将 1~2 mL 标本转移至相应前处理管中, 视标本性状, 将 1~2 倍的 4% 氢氧化钠(NaOH)溶液加入前处理管中, 在涡旋振荡器上涡旋振荡, 直至痰液标本充分液化, 室温静置 15 min 后, 以无菌吸管吸取前处理的痰液标本约 2~3 滴于培养基斜面上, (36±1)°C 孵育。接种后第 3 和 7 天观察培养情况, 此后每周观察 1 次, 直至第 8 周末^[4]。

1.3.3 TB-DNA 检测 采用恒温扩增试纸条法, 试剂盒为杭州优思达生物技术有限公司产品。痰液标本按照试剂盒要求进行处理后加入 DNA 提取液, 100 °C 恒温处理 10 min 后离心取上清液 4 μL 至 PCR 反应管内扩增(63 °C, 60 min), 扩增后放入固定盒(核酸检测装置内芯)中, 15~30 min 内通过阅读窗判读结果。试纸条出现质控区与检测区两条红色条带为阳性。符合率=(n 种方法均为阴性例数+n 种方法均为阳性例数)/参与检测例数×100%, n 为本研究中任意的 2 种或 3 种

检测方法。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行数据处理及统计学分析。计数资料以 n 或率表示,组间比较采用 χ^2 检验;以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 种方法检测结核杆菌结果比较 沉淀集菌法检测 TB 阳性率为 90.19% (92/102), 罗氏培养法阳性率为 47.06% (48/102), PCR 法阳性率为 75.49% (77/102), 3 组阳性率比较差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。

2.2 3 种检测方法符合率比较 102 份标本中, 沉淀集菌法与培养法检出均为阳性 48 例, 均为阴性 10 例, 符合率为 56.86%。PCR 法与沉淀集菌法检出均为阳性 75 例、均为阴性 8 例, 符合率为 81.37%。PCR 法与培养法检出均为阳性 43 例, 均为阴性 20 例, 符合率为 61.76%。

3 讨论

快速检查临床标本中的 TB, 以供临床医生及早做出正确诊断, 一直是结核病研究领域的重要课题^[5]。沉淀集菌法经高压灭菌, 可以杀灭痰液中 TB, 防止再次传染, 保护操作人员的自身安全^[6]。其次经高压灭菌, 痰液得到液化, 离心沉淀后浓缩, 故抗酸杆菌的数量增多, 检出率明显提高^[7]。沉淀集菌法操作较简单、快速、经济、安全, 无需高精设备仪器, 是基层医院进行 TB 检测较为理想的方法。本文结果显示沉淀集菌法 TB 阳性检出率明显高于其他两种方法, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。且本文中沉淀集菌法的阳性率高于闫文婧^[8]的报道, 原因在于本研究选取的标本皆是活动性肺结核患者, 经两个月抗结核治疗后痰液涂片转阴仅 10 例。但沉淀集菌法不能区分是否为 TB^[9], 是否是具有活力的 TB。

虽然沉淀集菌法有诸多优点, 但只能反映病灶的排菌情况^[10], 而罗氏培养法培养周期长但可反映 TB 的存活能力^[11-12], 且可在培养的基础上进一步做菌种鉴定和药敏试验, 因此两者不可互相替代。本研究结果显示, 沉淀集菌法检测 TB 阳性率为 90.19%, 罗氏培养法阳性率为 47.06%, 罗氏培养法阳性率低于沉淀集菌法, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。本文中罗氏培养法阳性率较低, 可能与排菌量较少的患者, 经过两月抗结核治疗后 TB 存活能力降低有关。

采用 PCR 技术原理和 TB 特异性引物, 建立 TB 特异的 PCR 检测方法, 可在 1 d 内完成临床标本处理、核酸提取和 PCR 检测全过程, 具有快速、高效、特异度强、灵敏度高的优点^[13-15]。本文检测结果显示, PCR 法有较高的阳性率, 但比沉淀集菌法低, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 主要原因是本实验室 PCR 检测所用引物是 TB 特异性引物, 不包括非 TB。同时与沉淀集菌法以及罗氏培养法比较都有较好的一致性。该方法为恒温扩增-试纸条法, 是一种新型的核酸扩增方法^[16-18], 无需特殊的扩增仪就可实现恒温下一次性完成 TB-DNA 的扩增和杂交过程。而该试剂盒的局限性在于只能定性检测, 无法提示标本中 TB 的具体水平且不能进行药物敏感试验。

综上所述, 联合运用 3 种方法, 可弥补单一方法阳性率低的缺点, 从而提高准确度。在实际工作中应根据不同病情及不同治疗阶段选用适当的方法, 这样才能保证结果的可靠性, 提高 TB 检测阳性率, 以便为临床诊疗提供更科学的依据。

参考文献

- [1] 陈英杰, 孟玲宇. 结核病及其防治[J]. 中国当代医药, 2010, 17(13): 164-165.
- [2] 吴冰. 痰标本质量和结核杆菌阳性检出率的关系[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(5): 636.
- [3] 刘剑君, 中国疾病预防控制中心. 中国结核病防治规划痰涂片镜检质量保证手册[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2004: 5-19.
- [4] 中国防痨协会基础专业委员会. 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: 30-37.
- [5] 倪丽丽, 罗柳林, 景玲杰, 等. 恒温扩增实时荧光检测技术在肺结核诊断中的临床价值[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(8): 702-705.
- [6] 王国平, 刘化平, 张希东. 直接涂片与快速离心沉淀集菌涂片法检测痰内抗酸杆菌比较[J]. 中国误诊学杂志, 2010, 10(10): 2312-2313.
- [7] 陈敬捷, 唐柳生, 杨小兵, 等. 两种结核杆菌培养基培养抗酸杆菌的应用评价[J]. 柳州医学, 2014, 27(2): 99-101.
- [8] 闫文婧. 两种不同方法检测痰抗酸杆菌的比较[J]. 临床合理用药, 2014, 7(3): 154-155.
- [9] 刘毅, 黄曙海, 谭慧娟, 等. 环介导等温扩增技术检测肺结核患者痰标本中结核分枝杆菌[J]. 临床检验杂志, 2012, 30(1): 24-26.
- [10] Martin G, Stefan HE. Mycobacterium tuberculosis: success through dormancy[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2012, 36(3): 514-532.
- [11] Pulliainen AT, Christoph D. Persistence of Bartonella spp. stealth pathogens: from subclinical infections to vasoproliferative tumor formation[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2012, 36(3): 563-599.
- [12] Aggarwal VK, Nair D, hanna G, et al. Use of amplified Mycobacterium tuberculosis direct test (Gen-probe Inc., San Diego, CA, USA) in the diagnosis of tubercular synovitis and early arthritis of knee joint[J]. Indian J Orthop, 2012, 46(5): 531.
- [13] 魏建华, 薛晓红, 熊建军, 等. 结核分枝杆菌 DNA 分子生物学检测[J]. 预防医学情报杂志, 2012, 28(1): 76-78.
- [14] Guerra RL, Hooper NM, Baker JF, et al. Use of the amplified Mycobacterium tuberculosis direct test in a public health laboratory-Test performance and impact on clinical care[J]. Chest, 2007, 132(3): 946-951.
- [15] Guerra RL, Baker JF, Alborz R, et al. Specimen dilution improves sensitivity of the amplified Mycobacterium tuberculosis direct test for smear microscopy-positive respiratory specimens[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(1): 314-316.
- [16] Iwamoto T, Sonobe T, Hayashi K. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex, M. avium, and M. intracellulare in sputum samples[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(6): 2616-2622.
- [17] 张建立, 李国刚, 董彬, 等. 恒温扩增试纸条法快速检测痰标本中结核分枝杆菌[J]. 医学动物防制, 2013, 27(10): 1093-1094.
- [18] 厉小玉, 张永乐, 潘熠健, 等. 恒温扩增试纸条法检测解脲支原体方法的构建及临床应用[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2012, 32(3): 232-233.

(收稿日期: 2014-07-26)