

**2.2 混合感染情况** 双重感染涉及 9 种病原体,共 1 193 例,主要为 MP 合并 IFB 722 例;三重感染除 CP 以外的 8 种病原体,共 138 例,主要为 MP、LP 合并 IFB 42 例;四重以上感染 11 例,为 MP、LP、IFB、LDV 合并 RSV 7 例,MP、RSV、ADV、IFB 合并 PIVs 4 例。

**2.3 性别、年龄分布** 女性 IgM 检出率为 45.20%(1 687/3 732),高于男性[40.98%(2 207/5 385)],但差异无统计学意义( $P>0.05$ )。<1 岁、1~<3 岁、3~6 岁、>6 岁组检出率分别为 19.11%(925/4 840)、67.34%(2 270/3 371)、77.19%(511/662)、77.05%(188/244),构成比分别为 23.75%(925/3 894)、58.29%(2 270/3 894)、13.12%(511/3 894)、4.83%(188/3 894)。

**2.4 季节分布** 春、夏、秋、冬季四季 IgM 检出率分别为 41.59%(1 031/2 479)、41.96%(864/2 059)、40.96%(909/2 219)、46.19%(1 090/2 360),各季节 IgM 检出率比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。

### 3 讨 论

本研究 9 117 例患儿中病原体 IgM 检出率为 42.71%,MP 检出率高达 36.09%,高于绍兴地区<sup>[1]</sup>报道的 15.47%,与深圳地区<sup>[5]</sup>报道的 33.3%相近;其次病毒检出率为 18.77%,LP 为 3.8%,COX 和 CP 仅为 0.39%、0.16%。其中单一病原体感染占 65.54%,以 MP 感染为主;合并感染占 34.46%,以 MP 合并 IFB 最为常见,这与 MP 等病原体感染使气道黏膜细胞损害导致病原体易感,也可能与患儿机体免疫力低下有关;三重或四重感染较少,与文献[3,6-9]研究结果相似。

婴幼儿是急性呼吸道感染高发人群<sup>[10]</sup>,本研究 3 894 例呼吸道感染病原体 IgM 阳性患儿中小于 1 岁占 23.75%,1~<3 岁占 58.29%,3~6 岁占 13.12%,>6 岁占 4.83%,表明大于 3 岁儿童是呼吸道病原体的易感人群,而感染多发生在 1~<3 岁儿童,这可能与小于 1 岁婴儿体内从母体获取的抗体有关;1~<3 岁婴幼儿多处于断奶期,失去从母体获取抗体的保护,而婴幼儿自身免疫系统尚未发育完全,免疫力较低,易发生感染。从性别来看,女性患儿感染率高于男性,但二者比较差异

• 临床研究 •

无统计学意义( $P>0.05$ ),与王晓阳等<sup>[11]</sup>研究结果一致;各季节呼吸道病原体检出率比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ ),可能与本地区属于湿润的亚热带季风气候,四季气候变化不大有关。

综上所述,本地区儿童急性呼吸道感染病原体以 MP 感染为主,合并感染率高,以 MP 合并 IFB 感染为主;3 岁以下婴幼儿普遍易感;发病无明显性别、季节差异,这对于儿童急性呼吸道感染的病原学诊断及抗菌药物的合理应用具有重要意义。

### 参考文献

- [1] 章建伟,王卓英,钟永兴. 3788 例 0—5 岁婴幼儿急性呼吸道感染支原体感染分析[J]. 中华全科医学,2015,13(2):175-177.
- [2] 袁明生,吴起武. 706 例 0—6 岁儿童呼吸道感染 4 种病原体 IgM 检测结果分析[J]. 中国妇幼保健,2015,30(27):4648-4649.
- [3] 成守金,冯光安,陈文洁. 间接免疫荧光法测定呼吸道 9 种病原体 IgM 结果分析[J]. 中国临床研究,2014,27(7):866-868.
- [4] 单咏梅,周宏,杨凡,等. 呼吸道非典型病原体抗体实验室检测及病原分析[J]. 国际检验医学杂志,2013,34(17):2297-2299.
- [5] 曹科,罗小娟,崔晓燕,等. 深圳地区急性呼吸道感染住院患儿病原检测结果分析[J]. 检验医学与临床,2015,12(3):380-382.
- [6] 罗宗初,唐群兰,陈丰,等. 某区小儿急性呼吸道感染九种病原体 IgM 抗体检测的意义[J]. 中国医药指南,2013,11(4):227-229.
- [7] 牛小斌,李永伟. 小儿 9 项呼吸道感染病原体 IgM 抗体检测结果分析[J]. 中国卫生检验杂志,2015,25(4):520-521.
- [8] 陈刚,韦欢,何永玲,等. 儿童非典型肺炎病原体免疫球蛋白检测及病原学分析[J]. 中华医院感染学杂志,2015,25(5):1172-1174.
- [9] 王琛,王莹,俞哲. 杭州市儿童急性下呼吸道感染非典型病原体分析[J]. 中国学校卫生,2012,33(12):1434-1436.
- [10] 郑虹,赵萍. 住院儿童常见呼吸道感染病原体 IgM 检测结果分析[J]. 河北医药,2013,35(15):2365-2366.
- [11] 王晓阳,胡艳东. 儿童急性呼吸道感染血清 IgM 测定与分析[J]. 中国实用医药,2015,10(5):111-112.

(收稿日期:2015-08-22)

## 实时荧光定量 PCR 在疑似肺外结核诊断中的应用价值

张 瑞

(延安大学附属医院,陕西延安 716000)

**摘 要:**目的 探讨实时荧光定量 PCR(FQ-PCR)检测在疑似肺外结核诊断中的价值。方法 将怀疑有结核分枝杆菌感染的患者 101 例分为关节炎组(17 例)、胸腹膜炎组(32 例)、浅表淋巴结结核组(20 例)、肾结核组(13 例)、其他结核组(19 例),分别取关节腔穿刺液、胸腹腔穿刺液、浅表淋巴结穿刺液、尿液等标本采用实时 FQ-PCR 进行结核分枝杆菌 DNA(TB-DNA)检测,同时进行抗酸杆菌涂片检测,对检测结果进行比较和统计分析。结果 101 例疑似肺外结核患者关节穿刺液、胸腹腔穿刺液、浅表淋巴结穿刺液、尿液、脑脊液等 TB-DNA 检测阳性率分别为 41.18%、37.50%、50.00%、46.15%、35.87%;抗酸杆菌涂片检测阳性率分别为 11.76%、9.38%、10.00%、7.69%、5.26%。抗酸杆菌涂片检测阴性标本采用实时 FQ-PCR 检测阳性率为 35.87%,抗酸杆菌涂片检测阳性标本采用实时 FQ-PCR 检测全部为阳性。结论 实时 FQ-PCR 在疑似肺外结核诊断中具有重要价值。

**关键词:**聚合酶链反应; 荧光光度测定法; 肺外结核; 诊断价值

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.02.040

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)02-0239-03

我国人口众多,肺结核患者人数巨大<sup>[1]</sup>。与此同时肺外结核发病率也呈逐年上升趋势,结核性胸膜炎、结核性脑膜炎、结核性关节炎、淋巴结核、肾结核患者数量增多。肺外结核由于

较为隐匿而较难发现,因此,临床诊断难度较大,一直以来均是困扰临床医生的问题,传统方法检出率低,检测周期过长导致临床漏诊时有发生,严重影响患者预后<sup>[2]</sup>。近年来随着实时荧

光定量 PCR(FQ-PCR)技术的应用,肺外结核检出率较以前有了较大提高<sup>[3]</sup>。本研究对住院的 101 例肺外结核患者 TB-DNA 检验结果和抗酸杆菌涂片检测结果进行了分析,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2012~2014 在本院住院的疑似肺外结核患者 101 例,其中男 67 例,女 34 例;年龄 11~84 岁,中位年龄 49 岁。分为关节炎组(17 例)、胸腹膜炎组(32 例)、浅表淋巴结核组(20 例)、肾结核组(13 例)、其他结核组(19 例)。

1.2 标本来源 临床医生在无菌条件下分别抽取关节腔穿刺液、胸腹腔穿刺液、浅表淋巴穿刺液及留取中段尿液 5 mL 并将标本置于无菌瓶中立即送检。

1.3 试剂 抗酸杆菌涂片检测染色液为珠海贝索生物技术有限公司提供,结核分枝杆菌 DNA 检测试剂、质控品、标液均为中山大学达安基因公司提供。

1.4 检测方法 对采集的标本分别采用实时 FQ-PCR 检测 TB-DNA 和抗酸杆菌涂片检测抗酸杆菌。

1.4.1 实时 FQ-PCR 分别取无菌留取的穿刺液和尿液各 1

mL,加入 1.5 mL 离心管中 12 000 r/min 离心 5 min,留取沉淀,加入 1 mL 无菌生理盐水洗涤 2 次,离心留取沉淀并加入 50  $\mu$ L DNA 提取液充分混匀,在 100  $^{\circ}$ C 恒温干浴 10 min 后冷却并 12 000 r/min 离心 5 min 待用。阴、阳性质控品按操作规程进行处理。将处理过的标本,标准品,阴、阳性质控品分别吸取上清液脑脊液、2  $\mu$ L 加入反应管中,瞬时离心 5 s,按预设程序进行扩增和分析。

1.4.2 抗酸杆菌涂片 分别取无菌留取的穿刺液和尿液各 1 mL,3 000 r/min 离心 15 min,弃上清液,留沉渣涂片,固定,抗酸染色,镜检。

1.5 统计学处理 应用 SPASS13.0 统计软件进行数据分析,计数资料以率或构成比表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组患者抗酸杆菌涂片和实时 FQ-PCR 检测结果比较 各组抗酸杆菌涂片检测阳性率均明显低于实时 FQ-PCR,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。见表 1、2。

表 1 各组患者抗酸杆菌涂片和实时 FQ-PCR 检测结果比较

| 组别      | n  | 抗酸杆菌涂片 |       |        | 实时 FQ-PCR |       |        |
|---------|----|--------|-------|--------|-----------|-------|--------|
|         |    | 阳性(n)  | 阴性(n) | 阳性率(%) | 阳性(n)     | 阴性(n) | 阳性率(%) |
| 关节炎组    | 17 | 2      | 15    | 11.76  | 7         | 10    | 41.18* |
| 胸腹膜炎组   | 32 | 3      | 29    | 9.38   | 12        | 20    | 37.50* |
| 浅表淋巴结核组 | 20 | 2      | 18    | 10.00  | 10        | 10    | 50.00* |
| 肾结核组    | 13 | 1      | 12    | 7.69   | 6         | 7     | 46.15* |
| 其他结核组   | 19 | 1      | 18    | 5.26   | 7         | 12    | 36.84* |

\*: $P<0.05$ ,与同组抗酸杆菌涂片比较。

表 2 抗酸杆菌涂片与实时 FQ-PCR 阳性率比较

| 检测方法      | 阳性(n) | 阴性(n) | 合计(n) | 阳性率(%) |
|-----------|-------|-------|-------|--------|
| 抗酸杆菌涂片    | 9     | 92    | 101   | 8.91   |
| 实时 FQ-PCR | 42    | 59    | 101   | 41.58* |

\*: $P<0.01$ ,与抗酸杆菌涂片比较。

2.2 2 种方法检测阳性率评价 抗酸杆菌涂片检测阳性标本采用实时 FQ-PCR 检测全部为阳性,而抗酸杆菌涂片检测阴性的 92 例标本采用实时 FQ-PCR 检测阳性 33 例,阳性率为 35.87%。

3 讨论

随着社会的发展,人们的的生活方式发生了多样化改变,作息时间的不规律,环境污染等外加因素的存在导致肺结核感染的发生越来越多。与此同时肺外结核发生率也呈逐年上升趋势,由于肺外结核较为隐匿而难发现,一直以来均是困扰临床医生的问题,传统检测方法虽然简便、快速、价廉,但灵敏度低,特异性差,且不能区分结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌感染,尤其是不能检出 L 型和颗粒型结核分枝杆菌<sup>[4-5]</sup>。培养法是诊断结核病的“金标准”,精确可靠,特异性高。但其所需时间达 4~8 周,严重影响了结核病的早期诊断和及时治疗。近年来随着实时 FQ-PCR 技术的发展和在临床的广泛应用,肺外结核检测阳性率明显提高<sup>[6]</sup>。实时 FQ-PCR 由于是在常规 PCR 的基础上加了荧光标记的探针,将核酸扩增、杂交及光谱技术结

合在一起,实现了对目的基因的准确定量。该法特异性也较传统检测方法高,已得到临床的一致认可<sup>[7-9]</sup>。

本研究通过对 101 例疑似肺外结核患者关节腔穿刺液、胸腹腔穿刺液、浅表淋巴穿刺液及尿液等标本进行 TB-DNA 检测结果显示,关节炎组、胸腹膜炎组、浅表淋巴结核组、肾结核组、其他结核组 TB-DNA 阳性率分别为 41.18%、37.50%、50.00%、46.15%、36.84%;而抗酸杆菌涂片检测阳性率分别为 11.76%、9.38%、10.00%、7.69%、5.26%;实时 FQ-PCR 检测阳性率明显高于抗酸杆菌涂片,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。抗酸杆菌涂片检测 101 例标本阳性率为 8.91%,而实时 FQ-PCR 检测 TB-DNA 阳性率达 41.58%。二者比较差异有统计学意义( $P<0.01$ )。

本研究对抗酸杆菌涂片检测阴性的标本采用实时 FQ-PCR 检测 TB-DNA 阳性率为 35.87%,由此发现,抗酸杆菌涂片检测的漏检率较高,对患者临床诊断影响很大,而抗酸杆菌涂片检测阳性标本采用实时 FQ-PCR 检测均为阳性。

本研究结果表明,采用实时 FQ-PCR 检测患者关节腔穿刺液、胸腹腔穿刺液、浅表淋巴穿刺液及尿液诊断肺外结核具有灵敏度高、特异性强等特点,可作为临床诊断肺外结核可靠的实验方法,可广泛应用于临床检测。

参考文献

[1] 中华医学会. 临床诊治指南:结核病分册[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:64-86.

[2] 李艳, 邝浩斌, 刘宝瑛, 等. 糖尿病合并结核感染诊断中结核分枝杆菌检测方法的比较[J]. 现代医院, 2010, 10(1): 76-78.

[3] 石榴, 黄文杰. 结核病实验室诊断技术新进展[J]. 广东医学, 2008, 29(11): 1770-1771.

[4] Shankar P, Manjunath N, Mohan KK, et al. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by polymerase chain reaction[J]. Lancet, 1991, 237(8732): 5-7.

[5] 张红, 郑秀云, 姜行云. 痰结核菌两种不同检测方法分析[J]. 中国误诊学杂志, 2010, 10(15): 3557.

[6] 柳红梅. 一种新型结核杆菌感染快速检测方法的应用[J]. 中国卫

生检验杂志, 2010, 20(3): 572-573.

[7] 李秀武, 刘建强, 郑荣坤, 等. FQ-PCR 技术在肺外结核中的诊断价值[J]. 中国防痨杂志, 2010, 32(12): 818-821.

[8] 张为民, 龚文波. 荧光定量 PCR 检测结核杆菌 DNA 与涂片抗酸染色结果的比较[J]. 实用医学杂志, 2010, 26(23): 4272-4274.

[9] 张建武, 魏存乐, 吉焕英, 等. 结核 PCR 定量测定在结核病诊断中的应用[J]. 北方医学, 2013, 10(10): 58-60.

(收稿日期: 2014-11-17)

• 临床研究 •

结核分枝杆菌耐多药基因检测临床应用研究

高 漫, 李 蒙, 焦向阳  
(陕西省结核病防治院, 陕西西安 710100)

**摘要:**目的 评价耐多药基因检测利福平、异烟肼药物敏感性的可行性。方法 收集该院 2014 年 6~12 月 94 例结核病患者标本采用耐多药基因检测仪检测利福平、异烟肼药物敏感性并与 BACTEC MGIT 960 培养仪检测结果进行比较分析。结果 2 种方法同时检测利福平、异烟肼药物敏感性符合率为 91.5%(86/94), 符合率较高。结论 耐多药基因检测结核分枝杆菌药物敏感性灵敏度高, 特异性强, 对结核病患者早期及菌阴患者的及时、有效治疗具有重要意义。

**关键词:**分枝杆菌, 结核; 微生物敏感性试验; 基因, MDR; 实验室技术和方法

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2016.02.041 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2016)02-0241-02

结核病是一种由结核分枝杆菌感染引起的严重危害人类健康的主要传染病, 可累及全身各个脏器<sup>[1]</sup>。通过影像学检查与实验室涂片检查可快速诊断典型结核病, 但对不典型病例影像学无法与其他疾病区分、涂片阴性的病例就依赖于各脏器受结核分枝杆菌感染后产生的痰液、胸腹腔积液、脑脊液、灌洗液、脓液等标本的结核分枝杆菌培养结果, 这些标本成为检测结核分枝杆菌的主要对象, 培养阳性就可诊断为结核病, 结核分枝杆菌培养被视为诊断结核病的“金标准”<sup>[2]</sup>。但由于结核分枝杆菌生长周期长, 就是用目前较先进的 BACTEC MGIT 960 培养仪进行培养, 结核分枝杆菌培养阳性也需平均 12 d 时间<sup>[3]</sup>, 进一步药敏试验还需平均 9 d 时间<sup>[4]</sup>。临床医生对该类病例只能通过经验用药, 等待结核分枝杆菌药敏试验结果再调整用药, 对患者的治疗具有一定影响。所以, 一种快速、简便的药敏检测方法对于患者的早期及时治疗极为重要。耐多药基因检测操作简单、快速, 可以在 3 h 内得出利福平、异烟肼的耐药结果<sup>[5]</sup>。本研究对耐多药基因检测方法进行了临床应用研究, 旨在评价其临床应用价值, 现报道如下。

1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集本院 2014 年 6~12 月住院结核病患者痰液、胸腹腔积液、脑脊液、灌洗液、脓液等经培养为结核分枝杆菌阳性标本 94 例作为研究组, 以 H37Rv(野生型)为阴性对照(对照组), 同时进行耐多药基因检测并与 BACTEC MGIT 960 培养仪检测结果进行比较分析。

**1.2 仪器与试剂** 耐多药基因检测仪由上海宏石医疗科技有限公司生产, 试剂由厦门至善生物科技有限公司生产; BACTEC MGIT 960 培养仪及试剂由美国 BD 公司生产。

**1.3 耐多药基因检测方法** 采用荧光 PCR 溶解曲线法。该法是在 PCR 体系中加入两端分别标记有荧光基团与淬灭基团的探针, 在 PCR 过程中扩增出与探针序列互补的单链寡核苷酸序列, 在扩增完成后增加溶解曲线分析过程, 同时实时监测荧光值变化, 通过计算荧光值与温度的负导数获得探针与该序

列杂交产物的溶解曲线并得出熔点(T<sub>m</sub>值), 从而推测得到该序列突变信息。如靶序列与探针完全匹配则探针与该序列杂交的熔点最高; 如探针与序列不完全匹配如序列发生点突变、插入或缺失则探针与该序列杂交的熔点低于探针与完全匹配序列杂交的熔点。熔点降低程度与点突变类型、插入或缺失碱基数量及突变位点位置有关。耐多药基因检测及 BACTEC MGIT 960 培养仪检测均严格按照标准操作规程进行。

**1.4 统计学处理** 计数资料以率或构成比表示, 采用  $\chi^2$  检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

**2.1 对照组检测结果** 阴性对照 H37Rv(野生型)经耐多药基因检测与 BACTEC MGIT 960 培养仪检测异烟肼、利福平药物敏感性均为异烟肼、利福平敏感。

**2.2 研究组检测结果** 94 例标本中耐多药基因检测利福平阴性率为 80.9%(76/94), 阳性率为 19.1%(18/94); BACTEC MGIT 960 培养仪检测利福平阴性率为 84.0%(79/94), 阳性率为 16.0%(15/94)。94 例标本中耐多药基因检测异烟肼阴性率为 83.0%(78/94), 阳性率为 17.0%(16/94); BACTEC MGIT 960 培养仪检测异烟肼阴性率为 76.6%(72/94), 阳性率为 23.4%(22/94)。见表 1。

表 1 研究组检测结果(n=94)

| 检测方法               | 利福平 |     |      | 异烟肼 |     |      |
|--------------------|-----|-----|------|-----|-----|------|
|                    | 野生型 | 突变型 | 突变率  | 野生型 | 突变型 | 突变率  |
|                    | (n) | (n) | (%)  | (n) | (n) | (%)  |
| 耐多药基因              | 76  | 18  | 19.1 | 78  | 16  | 17.0 |
| BACTECMGIT 960 培养仪 | 79  | 15  | 16.0 | 72  | 22  | 23.4 |

**2.3 2 种方法符合率** 对照组耐多药基因检测与 BACTEC MGIT 960 培养仪特异性与灵敏度相当, 研究组 94 例标本中