

• 论 著 •

5 种结核分枝杆菌检测方法的临床应用价值研究

阳红梅¹, 苏丹虹², 管 婧²

(1. 深圳市龙岗区妇幼保健院检验科, 广东深圳 518172; 2. 广州医科大学附属第一医院检验科, 广东广州 510120)

摘要:目的 评价 5 种结核分枝杆菌检测方法对肺结核的辅助诊断价值。方法 统计 2018 年 1—10 月在广州医科大学附属第一医院住院的患者, 分为临床诊断肺结核患者和临床诊断非结核普通住院患者共 209 例, 用结核培养法、PCR-荧光探针法、结核感染 T 淋巴细胞酶联免疫斑点试验(T-SPOT. TB)法、抗酸染色法、利福平耐药实时荧光定量核酸扩增检测技术(Xpert MTB/RIF)法分别进行检测, 比较这 5 种方法在临床诊断中的价值。结果 结核培养法、抗酸染色法、PCR-荧光探针法、T-SPOT. TB 法、Xpert MTB/RIF 法阳性率分别为 16.8%、23.4%、39.2%、53.0%、52.2%。结核培养法灵敏度为 52.17%, 特异度为 100.00%; 抗酸染色法灵敏度为 42.45%, 特异度为 96.67%; PCR-荧光探针法灵敏度为 76.00%, 特异度为 97.98%; T-SPOT. TB 法灵敏度为 91.67%, 特异度为 79.80%; Xpert MTB/RIF 法灵敏度为 99.09%, 特异度为 100.00%。结论 Xpert MTB/RIF 法是最值得推荐的方法, 也是唯一可以作为诊断结核感染的分子生物学方法, 如果能够联合这几种方法, 可以快速、准确地对结核感染进行诊治。

关键词: 结核分枝杆菌; 肺结核; 检测方法**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2020.04.014**中图法分类号:** R378.91+1**文章编号:** 1673-4130(2020)04-0440-04**文献标识码:** AStudy on the clinical application value of five detection methods of *Mycobacterium tuberculosis*YANG Hongmei¹, SU Danhong², GUAN Jing²

(1. Department of Clinical Laboratory, Maternal and Child Health Hospital of Longgang District, Shenzhen, Guangdong 518172, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510120, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the diagnostic value of five *Mycobacterium tuberculosis* detection methods for tuberculosis. **Methods** A total of 209 patients who were hospitalized in the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University from January to October 2018 were divided into 209 clinically diagnosed patients with pulmonary tuberculosis and non-tuberculous patients with clinical diagnosis. The tuberculosis culture method, PCR-fluorescent probe method, tuberculosis infection T lymphocyte enzyme-linked immunospot test(T-SPOT. TB) method, antacid staining method, rifampicin-resistant real-time fluorescent quantitative nucleic acid amplification detection technology(Xpert MTB/RIF) method were separately detected, the value of these 5 methods in clinical diagnosis were compared. **Results** The positive rates of tuberculosis culture method, antacid staining method, PCR-fluorescent probe method, T-SPOT. TB method, and Xpert MTB/RIF method were 16.8%, 23.4%, 39.2%, 53.0%, and 52.2%, respectively. The sensitivity of the tuberculosis culture method was 52.17%, the specificity was 100.00%; the sensitivity of the acid staining method was 42.45%, the specificity was 96.67%; the sensitivity of the PCR-fluorescent probe method was 76.00%, the specificity was 97.98%; and the sensitivity of the T-SPOT. TB method was 91.67%, the specificity was 79.80%; the sensitivity of the Xpert MTB/RIF method was 99.09%, and the specificity was 100.00%. **Conclusion** The Xpert MTB/RIF method is the most recommended method and the only molecular biological method that can be used to diagnose tuberculosis infection. If these methods can be combined, it can quickly and accurately diagnose and treat tuberculosis infection.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*; tuberculosis; detection method

作者简介: 阳红梅, 女, 副主任技师, 主要从事临床微生物检验方面的研究。

本文引用格式: 阳红梅, 苏丹虹, 管婧. 5 种结核分枝杆菌检测方法的临床应用价值研究[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(4): 440-442.

结核病是由结核分枝杆菌感染引起的一种慢性传染病,其传播性强,全球约 20 亿结核分枝杆菌感染者,每年约有 900 万人患活动性结核,导致 200 万人死亡^[1]。在发达国家,结核病已基本被消灭,但中国仍是世界范围内结核病的高发国家之一,中国的发病率居全球第 2^[2],结核病已造成严重的社会负担,因此,结核的早期诊断,对于预防疾病具有重要的意义。早期诊断依赖于有效的检测手段,本研究分别应用 5 种不同的检测方法进行比较,以期了解这 5 种方法在结核病诊断中的价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2018 年 1—8 月在广州医科大学附属第一医院住院的患者分为 2 组,研究组按照肺结核诊断标准(WS 288—2017)经临床确诊为肺结核,对照组为临床确诊为非结核普通住院患者。

1.2 仪器与试剂 酸性罗氏培养基购自法国梅里埃公司;抗酸染色液购自中国珠海贝索公司;PCR-荧光探针法试剂购自中国深圳凯杰生物工程有限公司;T 淋巴细胞酶联免疫斑点试验(T-SPOT. TB)试剂盒购自英国 Oxford Immunotec 公司;实时荧光定量核酸扩增检测技术(Xpert MTB/RIF)试剂盒和仪器购自美国 Cepheid 公司;荧光 PCR 检测仪型号为 ABI7000。

1.3 方法

1.3.1 结核培养法 按照《结核病诊断实验室检验规程》进行。

1.3.2 PCR-荧光探针法 严格按照试剂说明书进行处理、扩增试剂准备、加样、PCR 扩增,每次扩增设立阴性、临界阳性、强阳性对照,反应体系为 40 μ L,荧光信号采集通道为 Fam 荧光素,荧光信号收集在 60 $^{\circ}$ C。

1.3.3 T-SPOT. TB 检测 采集新鲜外周静脉血 5 mL,用肝素抗凝,按照试剂说明书进行操作,计数每个活化的结核特异效应 T 细胞。

1.3.4 抗酸染色涂片法 按照《全国临床检验操作规程》第 4 版及试剂说明书进行操作。

1.3.5 Xpert MTB/RIF 按照试剂说明书进行,主要操作步骤包括取患者痰液加入处理液,振荡器上涡旋振荡 15~30 s,常温静置液化,并将标本严格本加入反应试剂盒中,进行检测并输出分析结果。

1.3.6 试验流程 纳入对象:分别用结核杆菌培养法、抗酸染色法、Xpert MTB/RIF 法、PCR-荧光探针法和 T-SPOT. TB 法对可疑结核杆菌患者标本进行检测。209 例患者进入最终研究,其中 PCR-荧光探针法缺失 10 例患者,T-SPOT. TB 检测方法缺失 26 例,抗酸染色法缺失 4 例,结核杆菌培养法缺失 66 例。

1.4 统计学处理 采用 R project v3.4.1 进行分析,

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料以频数表示,描述数据的基本分布,计算百分比。计算灵敏度、特异度、阳性预测值和阴性预测值,并绘制韦恩图展示不同检测方法与金标准培养法之间真实值所占比例以评估不同检测方法的诊断效能。

2 结果

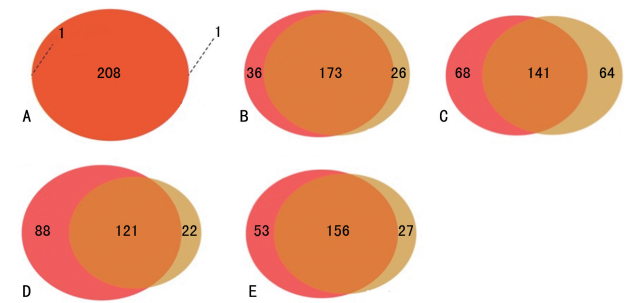
2.1 患者的基本临床信息 209 例患者中,男性 136 例,女性 73 例,平均年龄为(41.82 $\pm$ 21.74)岁,临床诊断为肺结核的患者有 110 例。其中,继发性肺结核有 78 例(37.3%),浸润性肺结核 6 例(2.9%),淋巴结核 5 例(2.4%),其他类型肺结核 21 例(10.0%)。临床诊断为除肺结核外其他呼吸系统疾病的患者有 99 例,其中肺炎、支气管扩张并感染和慢性阻塞性肺疾病患者占比最高,分别为 16.3%、11.0%和 9.1%。

2.2 不同肺结核检测技术检测结果 结核培养法有 24 例(16.8%)患者检测为阳性,119 例(83.2%)患者为阴性;抗酸染色法有 48 例(23.4%)患者检测为阳性,157 例(76.6%)患者为阴性;PCR-荧光探针法有 78 例(39.2%)患者检测为阳性,121 例(60.8%)患者为阴性;T-SPOT. TB 法有 97 例(53.0%)患者检测为阳性,86 例(47.0%)患者为阴性;Xpert MTB/RIF 法有 109 例(52.2%)患者检测为阳性,100 例(47.8%)患者为阴性。

2.3 不同肺结核检测技术的检验效能评估 以临床确诊为结核作为标准,评估其他检测方法的效能。结果发现,灵敏度从高到低依次为 Xpert MTB/RIF、T-SPOT. TB、PCR-荧光探针法、结核培养法、抗酸染色法。特异度从高到低依次为 Xpert MTB/RIF 和结核培养法(并列)、PCR-荧光探针法、抗酸染色法、T-SPOT. TB。韦恩图结果显示,以临床确诊为结核作为标准,Xpert MTB/RIF 法中,209 例患者中有 208 例患者结果与临床诊断一致;PCR-荧光探针法中,199 例患者中有 173 例患者结果与临床诊断一致;抗酸染色法中,205 例患者中有 141 例患者结果与临床诊断一致;结核培养法中,143 例患者中有 121 例结果与临床诊断一致;T-SPOT. TB 法中,183 例患者中有 156 例患者结果与临床诊断一致。见表 1、图 1。

表 1 5 种检测方法灵敏度和特异度分析(%)

项目	Xpert MTB/ RIF	PCR-荧光 探针法	抗酸 染色法	结核 培养法	T-SPOT. TB
灵敏度	99.09	76.00	42.45	52.17	91.67
特异度	100.00	97.98	96.67	100.00	79.80
阳性预测值	100.00	97.44	93.75	100.00	79.38
阴性预测值	99.00	80.17	61.15	81.51	94.05



注:A 表示 Xpert MTB/RIF;B 表示 PCR-荧光探针;C 表示抗酸染色;D 表示结核培养;E 表示 T-SPOT. TB。

图 2 5 种检测方法韦恩图对比

3 讨 论

本文的研究结果显示,抗酸染色法虽然简单、快速,但阳性率差(23.4%)、灵敏度低(42.45%),与国内文献报道基本一致^[3-4];由于非结核分枝杆菌抗酸染色也阳性,所以此方法不能有效区分结核和非结核分枝杆菌;另外只有在结核病痰标本菌数量>5 000 条/mL 才能得到阳性结果^[5],所以对标本的要求比较高,这也是抗酸染色阳性率低的原因之一,另外取材和涂片的质量,人工镜检的经验 and 态度对结果都有影响,易造成误诊和漏诊^[6-7],传统的涂片抗酸染色法,阴性结果要求至少观察 300 个视野,耗时费力^[8]。结核培养法是诊断结核的金标准,可反映结核杆菌存活能力,并能做菌种鉴定和药敏试验,这是其他方法无法代替的,但是结核杆菌生长缓慢,培养周期长,一般需要 4~8 周,且对实验室的生物安全级别要求较高^[6]。本研究显示结核培养法的阳性率在 5 种方法中最低,灵敏度只比涂片法稍更高,且在研究中发现会有一部分快速生长的非结核分枝杆菌在培养过程中报阳,这时需要结合结核报阳时间和其他检测手段进行判断,否则极易造成临床的诊治延误^[7]。

PCR-荧光探针法具有快速、灵敏度较强、特异度高等优点,但该法的检测阳性率不高,操作繁琐,对设备和试验区的要求较高且易污染。而 Xpert MTB/RIF 法是一种由巢式 PCR 技术发展而来的基因扩增技术,能在 2 h 内针对 rpoB 基因 81 bp 利福平耐药核心区间设计引物、探针,检测其是否发生 c'cv 突变,进而用于诊断结核及检测利福平耐药(rpoB 序列存在突变)^[9-10]。Xpert MTB/RIF 法在本研究中灵敏度(99.09%)和特异度(100.00%)最好,只有 1 例与临床诊断不符。目前 Xpert MTB/RIF 法作为世界卫生组织唯一推荐的快速检测结核分枝杆菌及其利福平耐药性的手段,它具有快速、操作简单、污染小、灵敏度高、特异性强的特点^[11]。Xpert MTB/RIF 法实验过程中基本不产生气溶胶,减少了标本中结核分枝杆菌生物危害的风险,即使在高湿度的环境中也无影响,试剂盒放在独立的空间,减少了 DNA 的污染机

会^[12-13],该法还能检测标本中的死菌和活菌,不过价格昂贵。世界卫生组织建议将 Xpert MTB/RIF 技术应用于利福平耐药患病率较低的人群进行耐药诊断,而对于诊断为利福平耐药的患者则需要使用传统药敏试验或其他分子生物学检测进一步验证,以避免假阳性的发生^[14-15]。T-SPOT. TB 检测 ESAT-6 和 CFP-10 2 个抗原刺激 T 淋巴细胞释放 γ 干扰素来诊断是否由结核感染^[16],因为检测的是效应淋巴细胞,所以不易受人体免疫力状态的影响。本研究显示此法阳性率最高,灵敏度高(91.67%)仅次于 Xpert MTB/RIF 法。但此法主要用于潜在的结核杆菌感染检测,而不能区分是否为活动性结核杆菌。T-SPOT. TB 阴性排除结核感染的可能性大,阴性预测值(94.05%)也仅次于 Xpert MTB/RIF 法。

4 结 论

总之,此 5 种方法各有优缺点,但 Xpert MTB/RIF 法是最值得推荐的方法,也是唯一可以作为诊断结核感染的分子生物学方法,但是对于涂阴、培阴患者,还需结合临床进行综合诊断。但是,现代分子生物学方法仍然无法代替传统的结核诊断方法,临床医生需要联合运用,才能对结核感染进行快速、准确的诊治。

参考文献

[1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2018[R]. Geneva:WHO,2018.

[2] 廖丽.我国结核病流行现状及防治工作形势分析[J].中外医疗,2014,33(3):129-130.

[3] 王华钧,孙小军,金法祥,等.4 种结核分枝杆菌检测方法的比较[J].中华医院感染学杂志,2012,22(11):2472-2474.

[4] 王震,龚玉华,钱彩娣,等.5 种结核杆菌检测方法的临床应用价值[J].检验医学与临床,2015,12(3):334-336.

[5] 李妍,张天华,鲜小萍,等.XPert Mtb/RIF 检测技术诊断肺结核和肺外结核的价值[J].中国防痨杂志,2015,37(6):586-589.

[6] OU X C, LI H, LIU D X, et al. Comparison of Xpert MTB/RIF, real amp, and cpa tests in detecting mycobacterium tuberculosis[J]. Bio Environ Sci, 2019, 32(3): 215-219.

[7] 韩鹏,赵丽萍,李彦芳,等.3 种方法检测痰标本结果临床应用对比分析[J].医学动物防制,2018,34(1):94-96.

[8] 瞿向前,金建东.痰 GeneXpert MTB/RIF 临床应用探讨[J].中国继续医学教育,2017,9(34):40-42.

[9] 刘佳庆,张丽霞,孙海柏,等.XpertMTB/RIF 在结核病诊断中的研究进展[J].广东医学,2016,37(12):1894-1899.

[10] SOMILY A M, BARRY M A, FAWZIA H A, et al. Evaluation of GeneXpert MTB/RIF for detection of Mycobacterium tuberculosis complex and Rpo B (下转第 445 页)

微缺失综合征进行诊断,这 9 种微缺失综合征在活产婴儿中的综合发生率约为 1/1 600^[14],本研究中 BoBs 检测出的 4 例染色体微缺失/微重复综合征,染色体核型分析结果显示未见异常。

BoBs 技术较为简单,仪器成本低,通量高,每个反应可检测 92 份标本。BoBs 技术与核型分析比较,BoBs 技术比核型分析能更快速获得结果,是较为理想的产前诊断补充工具。对于新发展的产前诊断实验室,开展 BoBs 技术的成本效益较高。

4 结 论

BoBs 技术能够高效检出常见染色体非整倍体和微缺失综合征,因其快速、精确、操作简便、通量高等优势,满足临床的需求,值得推广。

参考文献

[1] 代文成,蒋宇林,古丽娜孜·米吉提,等. 染色体核型分析联合 BoBs 检测在产前诊断中的应用[J]. 中华医学遗传学杂志,2018,35(3):357-360.

[2] 于丽,付杰,马京梅,等. 1 809 份羊水细胞荧光原位杂交技术与核型检测结果分析[J]. 中华检验医学杂志,2014,37(5):342-346.

[3] 余珍,代文成,魏洁,等. BoBs 检测联合染色体核型分析在 1430 例高危孕妇产前诊断中的应用[J]. 国际检验医学杂志,2018,39(1):2220-2222.

[4] MILLER D T, ADAM M P, ARADHYA S, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies[J]. Am J Hum Genet, 2010,86(5):749-764.

[5] SHAFFER L G, COPPINGER J, ALLIMAN S, et al. Comparison of microarray-based detection rates for cytogenetic abnormalities in prenatal and neonatal specimens

[J]. Prenat Diagn, 2008,28(9):789-795.

[6] CHOY K W, SETLUR S R, LEE C, et al. The impact of human copy number variation on a new era of genetic testing[J]. BJOG, 2010,117(4):391-398.

[7] LEUNG T Y, POOH R K, WANG C C, et al. Classification of pathogenic or benign status of CNVs detected by microarray analysis[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2010,10(6):717-721.

[8] VIALARD F, SIMONI G, ABOURA A, et al. Prenatal BACs-on-BeadsTM: a new technology for rapid detection of aneuploidies and microdeletions in prenatal diagnosis [J]. Prenat Diagn, 2011,31(5):500-508.

[9] 贺建新,张坤,韩彤立,等. 不伴心脏缺陷的 22q11.2 经典微缺失所致的部分性 DiGeorge 综合征 2 例[J]. 中国当代儿科杂志,2014,16(5):541-543.

[10] 梁德杨,陈瑛,王辉林,等. BACs-on-Beads: 一种快速可靠的产前诊断技术[J]. 中华围产医学杂志,2014,17(12):840-844.

[11] WANG B B, RUBIN C H, Rd W J. Mosaicism in chorionic villus sampling: an analysis of incidence and chromosomes involved in 2612 consecutive cases. [J]. Prenat Diagn, 2010,13(3):179-190.

[12] CHENG Y K Y, WONG C, WONG H K, et al. The detection of mosaicism by prenatal BoBs? [J]. Prenat Diagn, 2013,33(1):42-49.

[13] 陈鹏龙,靳春雷,单群达,等. BACs-on-BeadsTM 技术联合染色体核型分析对 1371 例高危孕妇进行产前诊断[J]. 中华医学遗传学杂志,2017,34(4):542-545.

[14] 彭艳,豆媛媛,丁娟,等. BACs-on-Beads 检测联合染色体核型分析在 1 950 例孕妇产前诊断中的应用[J]. 中国优生与遗传杂志,2019,27(4):40-42.

(收稿日期:2019-05-10 修回日期:2019-09-05)

(上接第 442 页)

gene in respiratory and non-respiratory clinical specimens at a tertiary care teaching hospital in saudi arabia[J]. Saudi Med J, 2016,37(12):1404-1407.

[11] TANG T, LIU F, LU X, et al. Evaluation of Gene-Xpert MTB/RIF for detecting Mycobacterium tuberculosis in a hospital in china[J]. J Int Med Res, 2017,45(2):816-822.

[12] 李雪黎,温海平,桑俊,等. Xpert MTB/RIF 在肺结核及耐药结核检测中的应用价值分析[J]. 国际检验医学杂志,2018,39(1):100-102.

[13] 孙蕊,王志锐,穆成,等. Xpert Mtb/RIF、痰涂片和培养在

疑似肺结核诊断中的对比研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2018,28(1):10-12.

[14] 王辉,瞿春燕,隆维东,等. Xpert Mtb/RIF 检测与 BACTEC MGIT 960 结核培养药敏联合检测在结核病诊治中的应用分析[J]. 解剖科学进展,2019,25(2):210-212.

[15] 陈俊林,黄飞,徐费凡,等. Xpert MTB/RIF 与 BACTEC MGIT960 检测结核分枝杆菌及利福平耐药差异性[J]. 中国医药导报,2018,15(1):49-52.

[16] 刘思景,丁邦显,游婧,等. T-SPOT 在儿童结核病诊断中的价值[J]. 中国感染控制杂志,2017,16(11):1060-1064.

(收稿日期:2019-05-28 修回日期:2019-09-15)