

(文章编号) 1007-0893(2021)24-0074-03

DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2021.24.025

## 荧光定量 PCR 检测结核杆菌 DNA 与涂片 抗酸染色诊断肺结核的效果比较

路爱丽 廖 卫

(新乡市第一人民医院 新乡医学院第五临床学院, 河南 新乡 453000)

**〔摘要〕** **目的:** 比较荧光定量聚合酶链式反应 (PCR) 检测结核杆菌脱氧核糖核酸 (DNA) 与涂片抗酸染色诊断肺结核的效果。**方法:** 收集 2017 年 1 月至 2020 年 12 月在新乡市第一人民医院就诊的疑似肺结核患者 95 例的痰液标本 127 份, 对所有痰液标本均实施荧光定量 PCR 检测结核杆菌 DNA 及涂片抗酸染色检测, 以痰培养结果为金标准, 比较两种检测方法的诊断效能。**结果:** 痰培养结果显示, 95 例疑似肺结核患者中, 61 例患者确诊, 确诊率为 64.21%。荧光定量 PCR 检测的准确度、特异度、灵敏度及阳性预测值、阴性预测值均明显高于涂片抗酸染色检测, 差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。**结论:** 荧光定量 PCR 检测结核杆菌 DNA 对肺结核的诊断效能明显高于涂片抗酸染色检测。

**〔关键词〕** 肺结核; 结核杆菌脱氧核糖核酸; 荧光定量聚合酶链式反应; 涂片抗酸染色

**〔中图分类号〕** R 521 **〔文献标识码〕** B

### Comparison the Effect of Fluorescence Quantitative PCR Detection of Mycobacterium Tuberculosis DNA and Acid-fast Staining of Smears in Diagnosing Pulmonary Tuberculosis

LU Ai-li, LIAO Wei

(The First People's Hospital of Xinxiang City, The Fifth Clinical College of Xinxiang Medical College, Henan Xinxiang 453000)

**〔Abstract〕** **Objective** To compare the effects of fluorescent quantitative polymerase chain reaction (PCR) detection of Mycobacterium tuberculosis deoxyribonucleic acid (DNA) and acid-fast staining of smears in the diagnosis of tuberculosis. **Methods** 127 sputum samples from 95 suspected tuberculosis patients who were treated at the First People's Hospital of Xinxiang City from January 2017 to December 2020 were collected. All sputum samples were subjected to fluorescence quantitative PCR to detect Mycobacterium tuberculosis DNA and smears acid-fast staining test. The sputum culture result was used as the gold standard to compare the diagnostic efficacy of the two test methods. **Results** The results of sputum culture showed that among 95 suspected pulmonary tuberculosis patients, 61 patients were diagnosed with a diagnosis rate of 64.21%. The accuracy, specificity, sensitivity, positive predictive value, and negative predictive value of fluorescent quantitative PCR detection were significantly higher than those of smear acid-fast staining detection, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The diagnostic efficiency of fluorescent quantitative PCR for detecting Mycobacterium tuberculosis DNA is significantly higher than that of acid-fast staining of smears, and its clinical application value is higher.

**〔Key Words〕** Pulmonary tuberculosis; Mycobacterium tuberculosis DNA; Fluorescence quantitative polymerase chain reaction; Smear acid-fast staining

肺结核为临床常见呼吸系统疾病, 属于世界范围内传染性疾病, 若患者病情得不到及时有效的控制极易造成病菌扩散, 不但损害患者自身健康, 还会导致传染范围扩大, 危害公共健康。约 40% ~ 60% 肺结核痰涂片呈阴性, 由于临床症状不典型且影像学表现存在多样性, 因而临床漏诊率较高, 随着病情发展, 部分涂阴肺结核患者可向菌阳肺结核进展, 使得疾病传染性显著增加, 结核传染程度进一步增强, 传染范围进一步扩大, 导致结核病控制难度进一步增加, 因此,

早期加强疾病诊断对于控制患者病情进展以及维护公共健康有重要意义。聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 技术具有操作简单、重复性好、检测迅速、能够实施定量检测以及全封闭扩增等特点, 荧光定量 PCR 技术在核酸分子检测中应用广泛, 为临床进行肺结核诊断的常用方法<sup>[1]</sup>。涂片抗酸染色镜检为临床常用结核杆菌检测方法, 具有简单易行等特点, 但是也具有阳性率低以及报告时间长等特点, 而实时荧光定量 PCR 具有检测特异度及灵敏度高等特点<sup>[2]</sup>,

**〔收稿日期〕** 2021 - 09 - 19

**〔作者简介〕** 路爱丽, 女, 副主任技师, 主要从事临床检验工作。

对此，本研究特就荧光定量 PCR 检测结核杆菌脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 及涂片抗酸染色检测的结果进行了比较，具体结果报道如下。

### 1 资料与方法

#### 1.1 一般资料

收集 2017 年 1 月至 2020 年 12 月在本院就诊的疑似肺结核患者 95 例的痰液标本 127 份，其中男性患者 51 例，女性患者 44 例，年龄 18~87 岁，平均年龄 (45.23 ± 5.09) 岁。

1.1.1 纳入标准 (1) 患者知晓本研究方案且自愿加入；(2) 患者能够积极配合临床各项检验。

1.1.2 排除标准 (1) 有酗酒史、药物滥用史或者精神障碍者；(2) 中途脱落或者拒绝配合完成本研究者。

#### 1.2 方法

1.2.1 痰液标本收集方法 叮嘱患者晨起后漱口并将气管深处痰用力咳出，并置于无菌带盖标本盒子并加盖，尽快送检。

1.2.2 荧光定量 PCR 检测法 严格按照试剂说明书进行检测，包括样本液化、DNA 提取、扩增试剂准备、加样及 PCR 扩增等。结核杆菌 PCR 检测反应条件如下：37 °C 2 min→94 °C 2 min→93 °C 15 s→60 °C 60 s，共计 40 个循环。反应体系：40 μL (TB PCR 反应混合液 36 μL，处理好的样本 4 μL)。检测结果参考值 < 500 IU · mL<sup>-1</sup>。

1.2.3 涂片抗酸染色法 严格按照抗酸染色液试剂说明书及《结核病诊断实验室检验规程》<sup>[1]</sup> 进行涂片抗酸染色。取无菌蒸馏水或者无菌 0.9% 氯化钠注射液 1 滴并置于载玻片上，将烧灼并冷却后的接种环分别挑取少量待染色菌于无菌蒸馏水或者 0.9% 氯化钠注射液，并确保涂布均匀，待涂片自然风干后于火焰上固定。将一小玻片滤纸覆于其上。向玻片上加满石碳酸复红染液 (R1 液) 1 滴并于酒精灯上加热至冒蒸汽，避免干烧或者加热至沸腾。将火移开并静置 (时间为 5 min)，然后将滤纸拿掉并以自来水进行冲洗。摇动的同时以脱色液 (R2 液) 进行脱色 (时间为 1 min)，直至无染色液浮出，确保脱色完全以免检测结果呈假阳性。应用自来水进行冲洗后，加入复染液 (R3 液) 复染 (时间为 20~30 s)，水洗后待干并于油镜下观察。以分枝杆菌实施阳性质控，以大肠埃希菌实施阴性质控。应用上述染色方法进行染色后，分枝杆菌菌体颜色为红色，大肠埃希菌菌体颜色为蓝色。取培养菌进行涂片染色时有以下表现：同一菌体上红色深浅存在差异；视野中部分细菌呈阳性，部分细菌呈阴性。若由于脱色不够而造成假阳性或者对染色结果存在怀疑需要再次进行确认试验。此外，为了避免发生实验室感染现象，应该对待检结核分枝杆菌标本实施高压灭菌，然后再实施涂片染色。

1.2.4 痰培养 痰液标本处理及培养、鉴定等需严格参考《分枝杆菌分离培养标准化操作程序及质量保证手

册》<sup>[4]</sup> 中相关标准进行，阳性质控为结核分枝杆菌质控菌株 H37Ra，阴性质控为大肠埃希菌 (ATCC 25922)，在确保质控有效的前提下观察 8 周，可见菌落生长且经抗菌染色法验证即为结核分枝杆菌培养阳性。

#### 1.3 观察指标

以痰培养结果为金标准，根据肺结核诊断标准 (WS288-2008)，能够培养出结核分枝杆菌则可确诊肺结核，比较荧光定量 PCR 检测及涂片抗酸染色的诊断效能，计算指标主要包括准确度、特异度、灵敏度以及阳性预测值、阴性预测值。灵敏度 = 真阳性 / (真阳性 + 假阴性) × 100%；特异度 = 真阴性 / (真阴性 + 假阳性) × 100%；准确度 = (真阳性 + 真阴性) / 总例数 × 100%；阳性预测值 = 真阳性 / (真阳性 + 假阳性) × 100%；阴性预测值 = 真阴性 / (真阴性 + 假阴性) × 100%。

#### 1.4 统计学分析

采用 SPSS 23.0 软件进行数据处理，计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示，采用 *t* 检验，计数资料用百分比表示，采用  $\chi^2$  检验，*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

痰培养结果显示，95 例疑似肺结核患者中，61 例患者确诊，确诊率为 64.21%。荧光定量 PCR 检测、涂片抗酸染色检测与痰培养结果的比较分别见表 1、表 2；荧光定量 PCR 检测的准确度、特异度、灵敏度及阳性预测值、阴性预测值均明显高于涂片抗酸染色检测，差异均具有统计学意义 (*P* < 0.05)，见表 3。

表 1 荧光定量 PCR 检测的结果与痰培养比较 (例)

荧光定量 PCR 检测	痰培养		合计
	阳性	阴性	
阳性	54	2	56
阴性	7	32	39
合计	61	34	95

注：PCR — 聚合酶链式反应

表 2 涂片抗酸染色检测的结果与痰培养比较 (例)

涂片抗酸染色检测	痰培养		合计
	阳性	阴性	
阳性	43	7	50
阴性	18	27	45
合计	61	34	95

表 3 两种方法的诊断效能比较 (%)

方法	准确度	灵敏度	特异度	阳性预测值	阴性预测值
涂片抗酸染色检测	70.49	73.68	79.41	86.00	60.00
荧光定量 PCR 检测	90.53 <sup>a</sup>	88.52 <sup>a</sup>	94.12 <sup>a</sup>	96.43 <sup>a</sup>	82.05 <sup>a</sup>

与涂片抗酸染色检测比较，<sup>a</sup>*P* < 0.05

注：PCR — 聚合酶链式反应

### 3 讨论

作为慢性传染性疾病，肺结核主要由于结核杆菌引发，病菌可经呼吸道传播，以发热、咳嗽、咳痰、盗汗等为主要临床表现，临床以早期、规律及全程治疗为治疗原则，因此，加强早期检测并予以患者针对性治疗对控制病情进展及患者预后改善有重要意义<sup>[5-6]</sup>。

当前，结核杆菌感染最初阶段检测结果不甚理想。痰涂片检测具有操作简单等特点，但是受操作者主观性以及染色、涂片过程中误差等因素的影响，检测灵敏度较差。痰培养主要通过合适的外界环境下通过专门的培养皿进行菌群培养的方式进行检测，但是该检测方式具有培养周期长以及假阳性率和假阴性率高等缺点<sup>[7-8]</sup>。结核菌素试验在临床上有着广泛的应用，通过致病菌造成机体生成致敏淋巴细胞，再次与致病菌接触时可出现相关反应并在皮肤表面上表达，具有操作快捷等特点，但是特异度及灵敏度较差，仅适宜作为临床诊断辅助检测手段<sup>[9-10]</sup>。

荧光定量 PCR 检测利用荧光共振能量转移原理选择合适的淬灭基团以及荧光基团对引物或者核酸探针进行标记，然后通过核酸水解及核酸杂交致淬灭基团及荧光基团分开或者结合原理建立，能够通过荧光化学物质进行 PCR 循环产物检测，通过外参或者内参定量分析样品特定 DNA 片段，操作快捷且具有较高的诊断效能<sup>[11-12]</sup>。本研究结果显示，荧光定量 PCR 检测的准确度、特异度、灵敏度及阳性预测值、阴性预测值均明显高于涂片抗酸染色检测，差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。涂片抗酸染色灵敏度较差原因在于痰液中结核分枝杆菌分布不均匀，使得观察数量受限<sup>[7]</sup>。而荧光定量 PCR 检测结核杆菌 DNA 实现了全封闭式操作，但是 DNA 提取及样本液化等操作过程中存在污染风险，对检测结果可能会造成一定程度的影响<sup>[14]</sup>。除此之外，该检测方法无法对活菌及死菌进行准确区分，因此，尚不能作为临床进行结核病确诊及结核病复发的依据，为了提高诊断结果的准确性，需要配合其他检测手段进行病情判断<sup>[15]</sup>。

综上所述，荧光定量 PCR 检测结核杆菌 DNA 在肺结核的早期检测及预防上均有着较高的指导价值，有助于临床对病情严重程度以及治疗效果进行评估，且诊断价值高于涂片抗酸染色检测，联合应用其他检测手段能够进一步降低疾病漏诊或者误诊风险。

### [参考文献]

- (1) 冯菊. 荧光定量 PCR 对痰涂片阴性肺结核的临床诊断价值 (J). 特别健康, 2020, 9(7): 72.
- (2) 寿娟, 谢青梅, 龙昭玲, 等. 胸水游离 DNA 的结核杆菌检测在结核病诊断中的价值 (J). 中华病理学杂志, 2018, 47(6): 465-467.
- (3) 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.
- (4) 赵雁林, 王黎霞, 成诗明, 等. 分支杆菌分离培养标准化操作程序及质量保证手册 (M). 北京: 人民卫生出版社, 2013.
- (5) 丁运生, 彭远远, 徐东芳, 等. 抗酸染色涂片法、Genexpert 法和 LAMP 法检测对结核性胸腔积液的诊断价值 (J). 医学临床研究, 2020, 37(5): 772-774.
- (6) 谭珂, 孙炳奇. 荧光定量 PCR 检测技术在结核诊断中的应用探讨 (J). 中国医疗器械信息, 2018, 24(4): 7-8.
- (7) 李苏梅, 包紫薇, 唐佩军, 等. 荧光定量 PCR 对痰涂片阴性肺结核的临床诊断价值 (J). 临床肺科杂志, 2018, 23(6): 977-979.
- (8) 张鸿娟, 宋宇, 郭肿, 等. 实时荧光 PCR 检测结核杆菌 DNA 的分析灵敏度验证及临床应用 (J). 检验医学与临床, 2017, 14(11): 1528-1530.
- (9) 李强, 饶常红, 黄渤.  $\gamma$ -干扰素释放试验、荧光定量 PCR、结核菌素皮肤试验联合检测对涂阴性肺结核的诊断价值 (J). 中国医学创新, 2017, 14(33): 4-8.
- (10) 袁瑛, 明湘虹, 郑宏, 等. SAT 技术与荧光定量 PCR 在痰涂片阴性肺结核诊断中的价值研究 (J). 临床肺科杂志, 2019, 24(3): 538-540.
- (11) 王丽娜. 荧光定量 PCR 检测技术在结核分枝杆菌耐药性检测中的应用价值 (J). 临床医学, 2021, 41(1): 54-55.
- (12) 夏良贤. 实时荧光定量聚合酶链反应检测对结核病的诊断价值 (J). 实用医技杂志, 2021, 28(5): 606-608.
- (13) 李观华, 方筱, 邓蕾, 等. 荧光定量 PCR 法联合传统方法在结核杆菌检测中的应用 (J). 当代医学, 2020, 26(21): 59-61.
- (14) 谢景齐, 周娇红. 荧光定量 PCR 法用于诊断肺结核患者痰液中结核分枝杆菌 DNA 的临床价值 (J). 中国当代医药, 2019, 26(12): 150-152, 155.
- (15) 李艳红, 李春艳, 陈天芳, 等. 实时荧光定量 PCR 与痰涂片抗酸染色法诊断结核病的灵敏度、特异度比较 (J). 临床医学研究与实践, 2019, 4(30): 128-130.