

结核分枝杆菌 DNA 实时定量 PCR 技术在临床病理诊断中的应用

林瀛 陈小岩 俞训彬

作者单位: 350001 福州市, 福建医科大学省立临床医学院 福建省立医院病理科

【摘要】 目的 探讨实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, FQ-PCR) 检测结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 在临床组织病理学诊断中的应用价值。方法 收集我院 2013 年 5 月-2015 年 2 月临床确诊的 144 例结核病 (tuberculosis, TB) 患者, 对其石蜡包埋组织标本行组织病理学检查, 并同时采用组织切片抗酸染色及 FQ-PCR 技术检测 MTB-DNA, 并对这三种方法的阳性检出率进行比较。结果 在 144 例临床诊断 TB 患者的石蜡包埋组织中, FQ-PCR 法检测 MTB 阳性 68 例, 阳性率为 47.22%, 抗酸染色法检测阳性 22 例, 阳性率为 15.28%, 组织病理学法检测阳性 74 例, 阳性率为 51.39%, 三者阳性率比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。FQ-PCR 法对肺活检标本、肺叶切除标本和胸膜活检标本 MTB 的阳性检出率均高于组织病理学法和抗酸染色法; 对淋巴结活检标本和其他组织标本的阳性检出率高于抗酸染色法, 但低于组织病理学法。结论 FQ-PCR 技术简便、快捷, 敏感性明显好于传统抗酸染色法, 可作为 TB 分子病理诊断的重要检测方法, 为组织病理学诊断提供可靠的依据, 具有较高的临床应用价值。

【关键词】 结核分枝杆菌; 结核病; 实时荧光定量 PCR; 抗酸染色; 组织病理学

doi: 10.3969/j.issn.1674-7151.2015.03.004

Clinical application of real-time fluorescence quantitative PCR detection in *Mycobacterium tuberculosis* pathological diagnosis

LIN Ying, CHEN Xiao-yan, YU Xun-bin. Department of Pathology, Fujian Provincial Clinical Medical University School of Medicine, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou 350001, China

【Abstract】 Objective To study clinical application of real-time fluorescence quantitative PCR detection in *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) pathological diagnosis. **Methods** 144 patients with tuberculosis (TB) were collected in our hospital from May 2013 to February 2015. Paraffin-embedded human tissues of TB patients were detected by histopathological examination, acid-fast staining and FQ-PCR method. And positive rates of all methods were analyzed statistically. **Results** In 144 patients with the clinical diagnosis of TB, 68 cases (47.22%) were positive for MTB by FQ-PCR, 22 cases (15.28%) were positive for acid-fast staining and of which 74 cases (51.39%) for histopathological examination. The differences had statistical significance ($P < 0.01$). The positive rates of MTB by FQ-PCR method in lung biopsy samples, lobectomy specimens and pleural resection specimens were all higher than those of histopathological examination and acid-fast staining. The positive rates of MTB by FQ-PCR method in lymph node biopsy and other tissue samples were higher than that of acid-fast staining, and lower than that of histopathological examination. **Conclusion** FQ-PCR assay can be effective in the classification of TB, and it is more sensitive than other special staining methods (acid-fast), which provides liable basis for the pathological diagnosis.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; Tuberculosis; Real-time fluorescence quantitative PCR; Acid-fast staining; Histopathology

结核病 (tuberculosis, TB) 是由感染结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 引起的传染性疾病, 为世界三大传染病之一。近年来, 我国的 TB 发病率持续上升, 其中肺结核患病人数居全球第二位, TB 的发病率和病死率在我国 27 种法定传染病

中均居首位^[1]。传统的活体组织 MTB 检测方法如细菌培养法、抗酸染色法等检测周期较长, 且阳性率低, 漏检率较高。近年来, 随着分子生物学技术的成熟发展, 实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, FQ-PCR) 技术已被广泛应用于各

种病原体的检测。本文采用 FQ-PCR 法对 TB 患者石蜡包埋病理组织中的 MTB-DNA 进行检测, 同时与抗酸染色和组织病理形态学检查进行比较, 评价其在临床活体组织病理诊断中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选择我院 2013 年 5 月至 2015 年 2 月间临床确诊的 TB 患者 144 例, 其中男性 75 例, 女性 69 例, 平均年龄(45.0±18.4)岁。取上述患者的病理组织石蜡包埋组织标本, 其中肺活检组织标本 29 份, 肺叶切除组织标本 19 份, 胸膜活检组织标本 16 份, 淋巴结活检组织标本 37 份, 其他活检组织包括肠、声带、肾、舌、网膜、宫腔、脑、腮腺、附睾、乳腺和皮肤等标本 43 份。

1.2 仪器与试剂 石蜡包埋组织提取基因组 DNA 试剂盒及 MTB 核酸扩增(PCR)荧光检测试剂盒购自凯杰生物工程(深圳)有限公司, 组织切片抗酸菌染色试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司。Rotor gene-Q FQ-PCR 分析仪购自凯杰生物工程(深圳)有限公司, TZL-32 干式恒温器购自苏州珀西瓦尔实验设备有限公司, 5424R 小型台式高速冷冻离心机购自 Eppendorf(中国)有限公司。

1.3 石蜡包埋组织提取基因组 DNA 将蜡块样本与检测单核对患者病例号、姓名、住院号、检查项目, 保证样本正确无误。所有试剂放在室温平衡, 调节金属浴至 56℃。确保石蜡包埋组织中含有病变细胞, 所取部分尽量在蜡块中部, 大活检组织标本连续切 5 张厚度 5 μm 组织片, 小活检组织标本连续切 10 张厚度 5 μm 组织片。每次更换蜡块同时更换切片刀片, 防止污染。转运标本至 PCR 实验室 II 区开始 DNA 提取。每个样本 EP 管加入 1 ml 二甲苯, 置漩涡振荡器剧烈漩涡震荡 10 s, 高速离心机在室温下以离心半径 8.4 cm, 14 000 r/min 离心 2 min, 弃去上清。必要时可重复一次脱蜡。每个样本 EP 管加入 1 ml 无水乙醇, 置漩涡振荡器剧烈漩涡震荡 10 s, 高速离心机在室温下以离心半径 8.4 cm, 14 000 r/min 离心 2 min, 弃去上清。开盖, 置于 56℃的金属浴中蒸干 5 min, 直至所有残留酒精挥发, 期间观察底部沉淀是否发白, 有干裂的迹象。向沉淀加入 180 μl Buffer ATL 和 20 μl 蛋白酶 K, 用枪头搅拌, 使沉淀尽量散开, 转移至已预先设好 56℃的金属浴。56℃孵育 1 h 或者过夜孵育。置瞬时离心机以离心半径 4.0 cm, 7200 r/min 离心 10 s, 90℃金属浴孵育 1 h。置瞬时离心机以离心半径 4.0 cm, 7200 r/min 离心 10 s, 上机自动提取核酸。采用微量紫外分光光度计

测定提取的 DNA 质量和浓度, 所提样本 DNA 的 OD_{260/280} 一般应在 1.8~2.0 之间, OD_{260/230} 一般应大于 2.0。提取出的 DNA 立即进行检测。

1.4 FQ-PCR 检测方法

1.4.1 试剂配制 取出 TB 的 PCR 反应液、Taq 酶和 UNG 酶, 室温融化后, 置瞬时离心机以离心半径 4.0 cm, 7200 r/min 离心 10 s, 设所需要的管数为 N {N= 标本数+1(强阳性对照)+1(临界阳性对照)+1(阴性对照)}, 按每管 PCR 反应液 37.8 μl, Taq 酶 0.2 μl, UNG 0.06 μl, 计算好各试剂的使用量, 加入一适当体积试管中, 充分混合混匀。向设定的 PCR 反应管中加入 38 μl 反应混合液, 盖上盖子。

1.4.2 加样 在设定的反应管中分别加入样本 DNA 2 μl, 阴性对照 2 μl (ATE 缓冲液), 强阳性对照 2 μl, 临界阳性对照 2 μl, 盖紧盖子。

1.4.3 PCR 扩增 将 PCR 反应管置于瞬时离心机, 以离心半径 4.0 cm, 7200 r/min 离心 10 s, 使加入反应管中的液体溶于管底, 将 PCR 反应管放入 FQ-PCR 仪器。打开仪器窗口, 直接从模板中调取已经预先设置好反应条件的模板文件(TB 反应条件), 反应体系为 40 μl: PCR 反应液 37.8 μl, Taq 酶 0.2 μl, UNG 0.06 μl, 混匀后取 38 μl 反应混合液, 再加入样本 2.0 μl。反应条件: 第一阶段 37℃, 5 min; 94℃, 1 min; 第二阶段 95℃, 5 s; 60℃, 30 s, 40 个循环。

1.4.4 结果判断

1.4.4.1 基线的确定 取 6~10 或 6~15 个循环的荧光信号, 阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照扩增曲线(无规则的噪音线)的最高点, 且 Ct 值=40.0 为准。

1.4.4.2 质控标准 阴性对照的 Ct 值均应等于 40.0 或无数值, 强阳性对照的 Ct 值应<25.0, 临界阳性对照的 Ct 值应<35.0, 且临界阳性对照的 Ct 值应大于强阳性对照的 Ct 值。否则, 此次实验视为无效。

1.4.4.3 检验结果的解释 检测样本 Ct 值为 40.0 或者无数值, 报告为阴性; 检测样本 Ct 值≤37.0 为阳性; 检测样本 Ct 值>37.0 重新检测, 若样本 Ct 值<40 则为阳性, 否则报告为阴性。

1.5 抗酸染色检测方法 按抗酸菌染色试剂盒说明书操作, 显微镜下观察到红色杆菌为阳性结果, 否则报告为阴性。

1.6 组织病理学检测方法 通过观察组织石蜡切片, 结核结节常表现为由上皮样细胞、朗格汉斯细胞及外周局部集聚的淋巴细胞和少量反应性增生的成纤维细胞构成, 结节中央常有干酪样坏死。以病理最

终诊断报告中出现“符合结核病变”作为阳性结果判定标准,否则判定为阴性结果。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件对数据进行统计分析,计数资料采用百分率表示,组间比较采用双向无序 RC 表卡方检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 三种检测方法诊断 MTB 的阳性率比较 在 144 份临床诊断 TB 的病理组织标本中,应用 FQ-PCR 法、抗酸染色法和组织病理学法检测 MTB 的阳性率分别为 47.22%、15.28% 和 51.39%,三者阳性率比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。其中 FQ-PCR 法和组织病理学法的阳性率均显著高于抗酸染色法,且差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05),而 FQ-PCR 法与组织病理学法的阳性率差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 1。

表 1 三种方法对 144 份临床活检组织标本的检测情况

检测方法	阳性例数	阳性率 (%)	χ^2 值	P 值
FQ-PCR 法	68	47.22		
抗酸染色法	22	15.28	68.98	0.000
组织病理学法	74	51.39		

注:抗酸染色法与 FQ-PCR 法比较 $\chi^2 = 34.20, P = 0.000$;组织病理学法与 FQ-PCR 法比较 $\chi^2 = 0.50, P = 0.480$;抗酸染色法与组织病理学法比较 $\chi^2 = 42.25, P = 0.000$

2.2 三种方法对不同组织类型的结核病理组织标本诊断阳性率的比较 除肺叶切除标本外,三种方法检测其他组织类型标本的 MTB 阳性检出率差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。除肺叶切除标本外,FQ-PCR 法及组织病理学法对其他组织类型标本的

MTB 阳性检出率均高于抗酸染色法,且差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05);FQ-PCR 法与组织病理学法的 MTB 阳性检出率差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05),见表 2。

3 讨论

TB 是由 MTB 引起的呼吸道传染性疾病,可经淋巴管、血液及消化道等途径传播至肺外脏器而致病。TB 病原学检测是发现 MTB 的主要途径和手段。抗酸染色涂片检查 MTB 的优点是简便、快速、廉价和定位准确,缺点是特异性差、敏感性低,通常标本的细菌浓度需达 10 000 个/mL 以上才能得到阳性结果,而且不能区分 MTB 和非 MTB,并受观察者主观因素影响,容易造成漏诊和误诊。分枝杆菌分离培养检查法是目前 TB 确诊最可靠的方法,被认为是“金标准”^[2],其灵敏度高,理论上来说细菌浓度低至数个/mL 都可培养出来,并可鉴定死菌与活菌,缺点是检测周期长,通常需 4-8 w 才能获得结果,而且 MTB 与非 MTB 的鉴别需进一步行菌种鉴定,已无法满足临床诊治需求。血清学方法检测存在抗原交叉反应以及体液免疫与 TB 相关性不明确的缺陷。对于肺外结核病变,临床工作中通常需要活体组织病理诊断来确定病变是否为 MTB 感染,从而确定治疗方案。组织病理学检查是诊断 TB 非常重要的手段,通过观察组织石蜡切片典型的病理学镜下特征来确诊。典型的结核结节常表现为由上皮样细胞、朗格汉斯细胞及外周局部聚集的淋巴细胞和少量反应性增生的成纤维细胞构成,结节中央常有干酪样坏死^[3]。以增殖为主的病变中,结核结节较多,易于观察,但是对于以渗出为主的病变或缺乏典型的组织形态特点时,典型的结核结节少见,难以确诊,只能做出可能性病理诊断,不能及时有效地为临床治疗

表 2 不同部位组织三种方法的 MTB 阳性检出率比较 [n(%)]

组织类型	例数	FQ-PCR 法	抗酸染色法	组织病理学法	χ^2 值	P 值
肺活检标本	29	12(41.37)	2(6.90)	11(37.93)	10.22	0.006
肺叶切除标本	19	10(52.63)	4(21.05)	9(47.37)	4.52	0.104
胸膜活检标本	16	10(62.50)	3(18.75)	9(56.25)	7.22	0.027
淋巴结活检标本	37	15(40.54)	5(13.51)	21(56.76)	15.16	0.001
其他组织标本	43	21(48.84)	8(18.60)	24(55.81)	13.90	0.001

注:①肺活检标本:FQ-PCR 法与抗酸染色法比较 $\chi^2 = 9.42, P = 0.002$;FQ-PCR 法与组织病理学法比较 $\chi^2 = 0.07, P = 0.79$;抗酸染色法与组织病理学法比较 $\chi^2 = 8.03, P = 0.005$;②胸膜活检标本:FQ-PCR 法与抗酸染色法比较 $\chi^2 = 6.35, P = 0.012$;FQ-PCR 法与组织病理学法比较 $\chi^2 = 0.13, P = 0.72$;抗酸染色法与组织病理学法比较 $\chi^2 = 4.80, P = 0.028$;③淋巴结活检标本:FQ-PCR 法与抗酸染色法比较 $\chi^2 = 6.85, P = 0.009$;FQ-PCR 法与组织病理学法比较 $\chi^2 = 1.95, P = 0.16$;抗酸染色法与组织病理学法比较 $\chi^2 = 15.18, P = 0.000$;④其他组织标本:FQ-PCR 法与抗酸染色法比较 $\chi^2 = 8.79, P = 0.003$;FQ-PCR 法与组织病理学法比较 $\chi^2 = 0.42, P = 0.52$;抗酸染色法与组织病理学法比较 $\chi^2 = 12.74, P = 0.000$

提供有利的诊断依据。近年来文献^[4]报道表明, FQ-PCR 技术具有准确性高、重复性好等特点, 已广泛用于基因表达、病原体检测等诸多研究领域, 并被成功用于微生物快速定量检测。

本文研究采用的试剂盒用一对 MTB 特异性引物和一条 MTB 特异性荧光探针, 利用 PCR 体外扩增法检测 MTB-DNA。当反应体系中有目的基因片段存在时, 随着 PCR 反应的进行, 释放出荧光, 通过实时监测不同通道的荧光信号, 可以进行 MTB 定量分析, 检测灵敏度为 10 个 TB 菌/mL。PCR 是非常敏感的技术, 只要在切完一个蜡块标本后未完全清洁刀片, 或者 DNA 抽提过程中, 由于气溶胶、加样枪、手套等污染, 均可导致假阳性的结果, 这些结果常表现为较低的定量值。而 FQ-PCR 实现了闭管检测, 已消除了产物污染的可能性, 但标本间的污染也可能产生假阳性, 因此必须严格按照标准操作规程进行操作, 防止污染的产生。在 144 份临床诊断 TB 患者的组织样本中, FQ-PCR 法的阳性率为 47.22%, 略低于组织病理学检测, 但显著高于抗酸染色法, 三者阳性率比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。李秀斌等^[5]的研究显示, 病理诊断为 TB 患者的石蜡包埋组织 MTB-DNA 阳性率为 93.14%。余琦等^[6]在 196 份临床诊断 TB 的石蜡包埋组织中, 利用 FQ-PCR 法检测到阳性 136 份, 阳性率为 69.39%。王旭洲等^[7]采用 FQ-PCR 技术对 200 例 (HE 染色病理诊断) 符合或疑为 TB 的石蜡包埋组织进行 MTB/非 MTB 检测, 结果显示, FQ-PCR 检测阳性率为 51.50%, 高于抗酸染色和金胺 O 染色, 证明该技术具有较高的敏感性和准确性, 可以用于 TB 和非 TB 的肉芽肿病理诊断。Seo 等^[8]比较了巢式 PCR 及 FQ-PCR 方法在福尔马林固定、石蜡包埋的各种组织标本的 MTB 阳性检出率, 四种不同商业用试剂盒 FQ-PCR 阳性检出率为 31.3%~80.0% 不等。本文研究中 FQ-PCR 法检测 MTB 的阳性率在 Seo 等^[8]研究结果的阳性率范围内, 而低于李秀斌、余琦、王旭洲等^[5-7]的研究结果, 原因可能是由于商业用试剂盒引物设计不同导致。PCR 法具有检测速度快, 灵敏度高, 准确度高的特性, 而与组织病理学检测相比, FQ-PCR 法可能受到组织标本类型、标本保存时间、DNA 抽提过程、引物浓度、探针序列等因素的影响, 因此本文研究中, FQ-PCR 阳性率低于组织病理学检查阳性率的可能原因是组织经石蜡包埋处理过程中, 福尔马林固定液引起蛋白交联导致 DNA 损伤。国外研究^[9,10]提示, 新鲜组织标本的 FQ-PCR 结果具有更高的敏感性

和特异性, 而本文为回顾性研究, 因此组织标本的存储时间对检测结果可能也有影响。

本文研究还对不同部位组织标本采用不同方法检测的阳性检出率进行比较, 结果显示, 在各类组织标本中 FQ-PCR 检测法的阳性检出率均较高, 相较于痰、体液等标本, 石蜡包埋组织直接取材于结核的病灶部位, 检测的阳性率相对更高, 特异性强。FQ-PCR 法在肺活检组织、肺叶切除标本及胸膜活检标本中的阳性检出率均高于其他检测方法, 而淋巴结及其他组织活检标本诊断结核阳性率低于组织病理学检查, 可能与不同组织处理过程中 MTB-DNA 丢失程度不同, 或者病变组织切片小所含的 TB 菌量少, 低于检测下限而被判为阴性有关。此外, 试剂和实验操作的差异也可影响低浓度标本的检出。

综上所述, FQ-PCR 检测石蜡切片组织标本的 MTB-DNA, 具有简便、灵敏、特异的优点, 对于组织病理学改变不典型的病例, 且无法进行细菌培养的组织, 结合组织标本的 MTB-DNA 检测结果, 可进一步提高活体组织中 MTB 感染诊断的准确度和特异性, 在 TB 的早期诊断上具有良好的临床实用价值。

4 参考文献

- 1 中国疾病预防控制中心结核病预防控制中心. 全国第五次结核病流行病学抽样调查结果简介. 中国结核病预防控制, 2011, 3: 14-16.
- 2 高会霞, 张志, 戴二黑. 五种结核病实验室检测方法对结核病诊断价值的效果评价. 实用检验医师杂志, 2012, 4: 157-160.
- 3 陈杰, 李甘地, 主编. 病理学. 北京: 人民卫生出版社, 第 2 版, 2010, 463-466.
- 4 Miller K, Harrington SM, Procop GW. Acid-fast Smear and Histopathology Results Provide Guidance for the Appropriate Use of Broad-Range Polymerase Chain Reaction and Sequencing for Mycobacteria. Arch Pathol Lab Med, 2015, 139: 1020-1023.
- 5 李秀斌, 李幸彬, 杜秀然, 等. 石蜡包埋组织实时荧光定量聚合酶链反应检测在结核病诊断中的价值. 中国防痨杂志, 2010, 32: 272-275.
- 6 余琦, 李宁, 宋业颖, 等. 荧光定量 PCR 检测病理组织中结核分枝杆菌的临床价值. 局解手术学杂志, 2012, 21: 590-592.
- 7 王旭洲, 谢飞来, 郑智勇. 荧光定量 PCR 检测结核/非结核分枝杆菌在肉芽肿病理诊断中的应用. 临床与实验病理学杂志, 2013, 29: 884-891.
- 8 Seo AN, Park HJ, Lee HS, et al. Performance Characteristics of Nested Polymerase Chain Reaction vs Real-Time Polymerase Chain Reaction Methods for Detecting Mycobacterium tuberculosis Complex in Paraffin-Embedded Human Tissues. Am J Clin Pathol, 2014, 142:

- 384-390.
- 9 Lee HS, Park KU, Park JO, et al. Rapid, Rapid, sensitive, and specific detection of Mycobacterium tuberculosis complex by real-time PCR on paraffin-embedded human tissues. *J Mol Diagn*, 2011, 13; 390-394.
- 10 Luo RF, Scahill MD, Banaei N. Comparison of single-copy and multicopy real-time PCR targets for detection of Mycobacterium tuberculosis in paraffin-embedded tissue. *J Clin Microbiol*, 2010, 48:2569-2570.

(收稿日期:2015-07-11)

(本文编辑:李霖)