

荧光定量聚合酶链反应检测在肺结核诊断中的应用价值

匡林芝 周峥珍 张丽琼 刘敏

作者单位: 410007 湖南长沙, 湖南省儿童医院病理科

通信作者: 匡林芝, Email: 1434800183@qq.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2020.01.009

【摘要】 目的 分析荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测支气管肺泡灌洗液(BALF)中结核分枝杆菌脱氧核糖核酸(TbDNA)在诊断肺结核中的应用价值。**方法** 选择2018年1月—2020年1月湖南省儿童医院收治的21例肺结核患儿作为肺结核组,另外选择同时期21例排除肺结核感染的肺部疾病患儿作为非肺结核组。全部患儿均行痰涂片抗酸染色镜检、纤维支气管镜(纤支镜)痰涂片抗酸染色镜检和BALF中TbDNA荧光定量PCR检测。比较3种检测方法对肺结核诊断的特异度、敏感度、阳性预测值(PPV)和阴性预测值(NPV)。**结果** 痰涂片抗酸染色镜检、纤支镜痰涂片抗酸染色镜检和荧光定量PCR的敏感度分别为19.05%、14.29%、76.19%,特异度分别为100.00%、100.00%、95.24%,PPV分别为100.00%、100.00%、94.12%,NPV分别为55.26%、53.85%、80.00%。荧光定量PCR检测BALF中TbDNA的敏感度明显高于痰涂片抗酸染色镜检和纤支镜痰涂片抗酸染色镜检(76.19%比19.05%、14.29%),差异有统计学意义($P < 0.05$);3种检测方法的特异度比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 通过荧光定量PCR检测BALF中的TbDNA,具有快速、敏感度高、特异度高的特点,利于早期诊断肺结核,尤其是对于痰涂片检测呈阴性及无典型影像学特征的患儿,可以明显提高确诊率,其结果能够作为诊断肺结核的主要指标。

【关键词】 荧光定量聚合酶链反应; 支气管肺泡灌洗液; 结核分枝杆菌脱氧核糖核酸; 肺结核

Application value of fluorescence quantitative polymerase chain reaction in diagnosis of pulmonary tuberculosis

Kuang Linzhi, Zhou Zhengzhen, Zhang Liqiong, Liu Min. Department of Pathology, Hunan Children's Hospital, Changsha 410007, Hunan, China

Corresponding author: Kuang Linzhi, Email: 1434800183@qq.com

【Abstract】 Objective To analyze the value of fluorescence quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR) in the detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA (TbDNA) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) in the diagnosis of pulmonary tuberculosis infection. **Methods** From January 2018 to January 2020, 21 children with pulmonary tuberculosis admitted in Hunan Children's Hospital were selected as tuberculosis group, and 21 children with pulmonary diseases excluded from tuberculosis infection in the same period were selected as non-tuberculosis group. All patients were examined by sputum smear acid fast staining microscopy, bronchoscopy sputum smear acid fast staining microscopy and FQ-PCR detection of TbDNA in BALF. The specificity, sensitivity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of three methods were compared. **Results** Using sputum smear acid fast staining microscopy, bronchoscopy sputum smear acid fast staining microscopy and FQ-PCR detection, the sensitivity was 19.05%, 14.29%, 76.19%, specificity was 100.00%, 100.00%, 95.24%, PPV was 100.00%, 100.00%, 94.12%, and NPV was 55.26%, 53.85%, 80.00%. The sensitivity of FQ-PCR detection was significantly higher than those of sputum smear acid fast staining microscopy and bronchoscopy sputum smear acid fast staining microscopy (76.19% vs. 19.05%, 14.29%), with significant difference ($P < 0.05$), while the specificity of three methods had no significant difference ($P > 0.05$). **Conclusions** The detection of TbDNA in BALF by FQ-PCR is fast, sensitive and specific, which is helpful for the early diagnosis of pulmonary tuberculosis, especially for the children with negative sputum smear result and without typical imaging features. It can significantly improve the diagnosis rate, and the results can be used as the main basis for the diagnosis of pulmonary tuberculosis.

【Key words】 Fluorescence quantitative polymerase chain reaction; Bronchoalveolar lavage fluid; *Mycobacterium tuberculosis* DNA; Pulmonary tuberculosis

结核病作为世界范围内的重大传染性疾病,是全球性的公共卫生问题,近年来呈现出发病率升高的趋势^[1]。据估计全球约有 1/3 人口感染了结核分枝杆菌,每年约有 150~200 万患者因结核病死亡^[2]。结核病会累及全身多个器官,其中累及肺部导致肺结核的情况最为常见^[3]。结核病的防治重点是早发现、早隔离和及早治疗活动性的肺结核^[4]。目前,肺结核的病原学检查主要包括涂片和培养,但涂片检测阳性率低,而培养耗时较长,加之临床上肺结核的症状大多表现不典型,且影像学表现特征性不足,因而肺结核患儿中仍有部分较难获得早期确诊,甚至发生误诊和漏诊^[5]。与常规检查方法相比,荧光定量聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 检测的特异度和敏感度更高,能够检测到 1~100 fg 的纯化结核分枝杆菌脱氧核糖核酸 (*Mycobacterium tuberculosis* DNA, TbDNA)^[6]。支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 从远端气道及肺泡腔取材,该部位细菌含量较高,通过荧光定量 PCR 检测 BALF 中的 TbDNA,可以辅助传统方法对肺结核进行早期诊断^[7]。本研究对本院收治的 21 例肺结核患儿及同期 21 例排除肺结核感染的肺部疾病患儿行痰涂片抗酸染色镜检、纤维支气管镜 (纤支镜) 痰涂片抗酸染色镜检和 BALF 中 TbDNA 荧光定量 PCR 检测,旨在评估荧光定量 PCR 检测在肺结核诊断中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 研究对象及分组 选择 2018 年 1 月—2020 年 1 月本院收治的 21 例肺结核患儿作为肺结核组,患儿均符合《肺结核诊断和治疗指南》公布的诊断标准^[8],其中男性 15 例,女性 6 例;年龄 4 个月~16 岁,平均 (7.67±3.59) 岁。另选同时期接受相关检查和治疗且排除肺结核感染的 21 例肺部疾病患儿为非肺结核组,其中男性 15 例,女性 6 例;年龄 4 个月~16 岁,平均 (9.01±3.05) 岁;细菌性肺炎 12 例,真菌性肺炎 6 例,支气管扩张症 2 例,脓胸 1 例。两组患儿的性别、年龄等一般资料比较差异均无统计学意义 (均 $P>0.05$),有可比性。

1.2 检测方法 全部患儿均行痰涂片镜检、纤支镜痰涂片镜检和 TbDNA 荧光定量 PCR 检测。

1.2.1 痰涂片抗酸染色镜检 全部患儿均于漱口后留取晨痰为痰标本,行抗酸染色后镜检,镜下观察到结核分枝杆菌代表阳性,未观察到代表阴性。

1.2.2 纤支镜痰涂片抗酸染色镜检 全部患儿行支气管镜依次观察大气道和左右各叶、段支气管,同时吸取分泌物,涂片行抗酸染色。

1.2.3 荧光定量 PCR 检测 收集 BALF,对常规气管镜下见异常或胸片及胸部 CT 提示相关病灶对应的叶段支气管进行灌洗,并使用无菌灌洗液瓶收集约 20 mL BALF,密封并立即送检,取 5 mL 进行荧光定量 PCR 检测 TbDNA,如检测值 ≥ 500 拷贝 /mL 为阳性,反之检测值 < 500 拷贝 /mL 为阴性。荧光定量 PCR 检测使用 TbDNA 试剂盒 (中山大学达安基因股份有限公司),严格按照试剂盒规程操作。

1.3 分析方法 以 a 表示真阳性例数, b 表示假阳性例数, c 表示真阴性例数, d 表示假阴性例数;按以下公式计算:敏感度 = $a/(a+d) \times 100\%$;特异度 = $c/(c+b) \times 100\%$;阳性预测值 (positive predictive value, PPV) = $a/(a+b) \times 100\%$;阴性预测值 (negative predictive value, NPV) = $c/(c+d) \times 100\%$ 。

1.4 伦理学 本研究符合医学伦理学标准,经本院伦理委员会批准 (审批号: HCHLL-2020-15),所有对患儿的检测均获得过患儿家属的知情同意。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件处理数据,计数资料以例 (百分比) 表示,组间比较采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同检测方法结果比较 荧光定量 PCR 的阳性率明显高于痰涂片抗酸染色镜检和纤支镜痰涂片抗酸染色镜检 ($P<0.05$)。见表 1。

2.2 不同检测方法诊断肺结核的敏感度、特异度和预测值比较 荧光定量 PCR 的敏感度明显高于痰涂片抗酸染色镜检和纤支镜痰涂片抗酸染色镜检 ($P<0.05$), 3 种方法的特异度比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 2。

表 1 两组患儿痰涂片抗酸染色镜检、纤支镜痰涂片抗酸染色镜检与荧光定量 PCR 检测结果比较

组别	例数 (例)	痰涂片抗酸染色镜检 [例 (%)]		纤支镜痰涂片抗酸染色镜检 [例 (%)]		荧光定量 PCR [例 (%)]	
		阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
肺结核组	21	4 (19.05) ^a	17 (80.95)	3 (14.29) ^a	18 (85.71)	16 (76.19)	5 (23.81)
非肺结核组	21	0 (0)	21 (100.00)	0 (0)	21 (100.00)	1 (4.76)	20 (95.24)

注:与本组荧光定量 PCR 比较, ^a $P<0.05$

表 2 不同方法诊断肺结核的敏感度、特异度及预测值比较

检测方法	敏感度 (%)	特异度 (%)	PPV (%)	NPV (%)
痰涂片镜检	19.05 ^a	100.00	100.00	55.26
纤支镜痰涂片镜检	14.29 ^a	100.00	100.00	53.85
荧光定量 PCR	76.19	95.24	94.12	80.00

注:与荧光定量 PCR 比较, ^a $P < 0.05$

3 讨论

目前,肺结核是临床上常见的慢性传染性疾病,找到一种可以在疾病早期快速、准确诊断肺结核的方法是治疗结核病的关键^[9]。在肺结核的诊断中,检测痰液、BALF 和浆膜腔积液中的结核杆菌是最为有效的方法;这是由于结核分枝杆菌的细胞壁中脂类含量丰富,较难着色,而延长染色时间并加温处理后,使用酸性脱色剂就会较难被脱色。根据这一原理,在临床上对于疑似肺结核的患儿通过痰涂片行抗酸染色镜检,操作简便、快速,是一种应用广泛的肺结核诊断方法^[10]。本研究结果显示,通过痰涂片抗酸染色镜检诊断肺结核的敏感性仅有 19.05%,而纤支镜痰涂片抗酸染色镜检诊断肺结核的敏感性仅有 14.29%,与吴淑红等^[10]的研究结果相似,这可能与痰标本收集不当、排菌量少等因素有关,因此,痰涂片及纤支镜痰涂片抗酸染色镜检均无法满足临床早期诊断的要求。

在全国肺结核流行病学调查及实际临床中,肺结核患者中痰涂片镜检结果为阴性者占全部结核患者的 50%~70%^[11]。随着分子生物学的日益发展,荧光定量 PCR 开始在肺结核诊断中应用。荧光定量 PCR 优势显著,其敏感度和准确度高,操作简便,安全快速且定量范围广,可以广泛应用于外周血、痰标本及 BALF 检测,尤其是针对含菌量低的待测标本。BALF 直接从远端气道及肺泡腔取材,其接触病灶的范围较广,细菌的含量较高,污染概率较低,而灌洗会刺激患儿发生咳嗽,促进局部支气管中的分泌物引流。本研究显示,荧光定量 PCR 检测 BALF 中 TbDNA 的敏感度、特异度、PPV、NPV 分别为 76.19%、95.24%、94.12%、80.00%,其敏感度明显高于痰涂片镜检、纤支镜痰涂片镜检方法。荧光定量 PCR 检测 BALF 中的 TbDNA 通常可在 1 d 内得到结果,具有敏感、快速、特异的优点,值得在临床上推广。出现假阴性的原因可能有:①个体免疫差异较大,取材标本内 Taq 酶抑制因子含量较高而影响 PCR 扩增进程;②部分患儿感染的结核分枝杆菌中缺失 IS6110 序列;③患儿病程较短;④用药影响等。本研究非肺结核组中有 1 例患儿发生假阳

性,可能是因为标本间污染,患儿存在其他病灶,而此法无法区分死菌和活菌,扩增了潜伏感染的结核分枝杆菌^[12-15]。因此对病情的判断仍应结合其他检查结果综合判断。

综上所述,通过荧光定量 PCR 检测 BALF 中的 TbDNA,具有快速、敏感度高、特异度高的特点,利于早期诊断肺结核,尤其对于痰涂片检测呈阴性及无典型影像学特征的患儿,可以明显提高确诊率,其结果能够作为诊断肺结核的主要依据指标。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- 蔡侃儒,彭巧丽,汪文斐,等.支气管肺泡灌洗液 XpertMTB/RIF 检测在 HIV 感染者肺结核诊断中的应用价值[J].中国艾滋病性病,2018,24(6):544-547. DOI: 10.13419/j.cnki.aids.2018.06.04.
- 潘晓鸿,毛敏杰,徐节坤,等.免疫肠内营养对重症结核患者细胞免疫水平及临床疗效的影响[J].中国中西医结合急救杂志,2018,25(1):66-69. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2018.01.016.
- Pai M, Kik SV, Banaei N. Occupational screening for tuberculosis. A testing time for interferon- γ release assays [J]. Ann Am Thorac Soc, 2014, 11(3): 399-401. DOI: 10.1513/AnnalsATS.201401-019ED.
- 余欢成,陈玲,祝国强,等.支气管肺泡灌洗液结核杆菌检测在菌阴肺结核中的诊断价值[J].中国现代医生,2018,56(12):73-75,79.
- 梁丽丽,刘新,苑星,等.新一代结核分枝杆菌/利福平耐药实时荧光定量核酸扩增技术的临床应用研究[J].中华传染病杂志,2019,37(2):77-81. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1000-6680.2019.02.003.
- Breen RA, Hardy GA, Perrin FM, et al. Rapid diagnosis of smear-negative tuberculosis using immunology and microbiology with induced sputum in HIV-infected and uninfected individuals [J]. PLoS One, 2007, 2(12): e1335. DOI: 10.1371/journal.pone.0001335.
- Lee HM, Shin JW, Kim JY, et al. HRCT and whole-blood interferon- γ assay for the rapid diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis [J]. Respiration, 2010, 79(6): 454-460. DOI: 10.1159/000277926.
- 中华医学会结核病学分会.肺结核诊断和治疗指南[J].中国实用乡村医生杂志,2013,20(2):7-11. DOI: 10.3969/j.issn.1672-7185.2013.02.005.
- Ko JM, Park HJ, Kim CH. Pulmonary changes of pleural TB: up-to-date CT imaging [J]. Chest, 2014, 146(6): 1604-1611. DOI: 10.1378/chest.14-0196.
- 吴淑红,荣福,欧阳雁弟.荧光定量聚合酶链反应检测支气管肺泡灌洗液中结核分枝杆菌脱氧核糖核酸诊断肺结核的价值[J].中国实用医药,2018,13(10):16-18. DOI: 10.14163/j.cnki.11-5547/r.2018.10.007.
- 马巧.菌阴肺结核的治疗[J].中华结核和呼吸杂志,2005,28(10):678-679. DOI: 10.3760/j.issn:1001-0939.2005.10.007.
- 柏明见,何美琳,冯璟,等.化学发光免疫分析法与酶联免疫斑点试验诊断结核病的相关性研究[J].实用检验医师杂志,2018,10(2):71-73. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2018.02.002.
- Jacomelli M, Silva PR, Rodrigues AJ, et al. Bronchoscopy for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in patients with negative sputum smear microscopy results [J]. J Bras Pneumol, 2012, 38(2): 167-173. DOI: 10.1590/s1806-37132012000200004.
- 马丽,吕嘉林,李琨,等.微滴数字聚合酶链反应法检测晚期肺腺癌患者血浆循环肿瘤 DNA 表皮生长因子受体基因突变的临床价值研究[J].中华医学杂志,2018,98(29):2336-2340. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2018.29.012.
- 王淑琦,孙晴,姜广路,等.第二次实时荧光定量核酸扩增检测在结核病诊断中的增值成本效益分析[J].中华结核和呼吸杂志,2019,42(6):432-437. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-0939.2019.06.006.

(收稿日期:2020-03-02)

(本文编辑:邵文 张耘菲)