

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2020.04.09

· 临床研究 ·

结核分枝杆菌固体培养结合不同分子生物学检测的应用分析

陈振华, 张小萍, 余艳艳, 刘昭国, 谭云洪 (湖南省胸科医院检验科, 长沙 410013)

摘要: **目的** 探讨分枝杆菌固体培养(L-J)结合实时荧光定量 PCR(FQ-PCR)、环介导等温扩增(LAMP)、线性探针杂交(LPA)和多色半巢式荧光定量 PCR(GeneXpert)检测痰液中结核分枝杆菌(MTB)及耐药性的临床应用价值。**方法** 连续收集湖南省胸科医院 2018 年 5 月至 2019 年 11 月初诊肺结核疑似患者(A 组)和活动性肺结核住院患者(B 组)痰标本。A 组进行 L-J、FQ-PCR 和 LAMP 3 种方法检测, 比较联合与单独检测的病原学阳性率, 计算 3 种方法病原学结果的一致率; B 组进行 L-J 及绝对浓度法固体药敏试验、LPA 和 GeneXpert 3 种方法检测, 比较联合与单独检测的病原学阳性率, 计算 3 种方法病原学和药敏结果的一致率。**结果** A 组共检测 347 例患者痰标本, L-J+FQ-PCR 和 L-J+LAMP 的阳性率分别为 33.1% 和 28.5%, 均显著高于 L-J(21.6%), 差异有统计学意义($\chi^2 = 11.59, P < 0.01$; $\chi^2 = 4.42, P < 0.01$); 3 种方法病原学结果总的一致率为 79.3% (275/352)。B 组共检测 172 例患者痰标本, L-J+LPA 的阳性率(57.6%)显著高于 LPA(42.4%), L-J+GeneXpert 的阳性率(62.2%)显著高于 L-J(45.4%), 差异有统计学意义($\chi^2 = 7.86, P < 0.01$; $\chi^2 = 9.84, P < 0.01$); 3 种方法病原学检测和利福平药敏结果总的一致率分别为 65.7% (113/172) 和 94.0% (47/50)。**结论** 固体培养联合一种分子生物学检测技术可以提高肺结核患者病原学阳性率, 适合在县、市级结核病定点医院推广。

关键词: 肺结核; 结核分枝杆菌; 痰; 固体培养; 分子生物

中图分类号: R446.5

文献标志码: A

提高结核病患者检出率是我国结核病防治重点关注的领域之一, 该病最直接有效的证据是从患者痰等标本检出结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)^[1-2]。MTB 培养法具有操作较简单、易推广的优点, 但是培养时间长、阳性率不高; 分子生物学检测方法克服了培养法的不足, 能够快速、敏感地检测出 MTB 和(或)其耐药性^[3], 为结核病的早诊断、早治疗提供新的途径。我国“十三五”全国结核病防治规划要求大部分县、市级定点医院除开展涂片镜检外, 还需开展分枝杆菌培养和分子生物学检测项目。本研究对我院分枝杆菌固体培养(Lowenstein-Jensen culture, L-J)、实时荧光定量 PCR(fluorescence quantitative PCR, FQ-PCR)、环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)、线性探针杂交(line probe assay, LPA)和 GeneXpert MTB/RIF(GeneXpert)检测 MTB 及其耐药性的临床结果进行对比分析, 探讨其临床应用价值。

1 材料和方法

1.1 研究对象 连续收集湖南省胸科医院 2018 年 5 月至 2019 年 11 月初诊肺结核疑似患者 347 例(A 组)和活动性肺结核患者 172 例(B 组)。A 组患者中位年龄 49 岁, 其中男性 230 例(占 66.3%); B 组患者中位年龄 58 岁, 其中男性 122 例(占 70.9%)。

肺结核的诊断按照《WS 288-2017 肺结核诊断》采用综合诊断的方法^[4]。A 组 347 名患者采集其痰标本分别进行 L-J、FQ-PCR 和 LAMP 检测; B 组 172 名患者采集其痰标本分别进行 L-J 及 MTB 绝对浓度法固体药敏试验、LPA 和 GeneXpert 检测。同一患者所有痰标本均为同一天留取, 每份痰标本体积约 3 mL, 盛于具有螺纹盖的广口痰杯中, 每份痰标本随机进行相应检测。不能立即检测的痰标本 4 ℃ 保存, 时间不超过 3 d。

1.2 主要仪器及试剂 罗氏培养基和药敏培养基、对硝基苯甲酸(PNB)培养基和噻吩-2-羧酸肼(TCH)培养基(珠海贝索公司), MPB64 抗原检测试剂盒(杭州创新生物检控公司), FQ-PCR 检测试剂盒(中山达安公司), LPA 检测系统及配套试剂盒(德国 LPA Life Science 公司), ABI 7500 PCR 仪(美国 ABI 公司), LAMP 检测系统及配套试剂盒(广州迪澳生物科技公司), Life Touch 基因扩增仪(杭州博日公司), 全自动 GT-Blot 48 杂交仪(法国生物梅里埃公司), GeneXpert 检测系统及配套 Xpert MTB/RIF 试剂盒(美国 Cepheid 公司)。

1.3 L-J 及 MTB 绝对浓度法固体药敏试验 按照《结核病实验室检验规程》^[5], 将痰液用等体积 40 g/L NaOH 消化处理 15 min, 取 0.1 mL 接种至酸性罗氏培养基中。每周观察 1 次培养基, 发现菌落生长后挑取菌落进行涂片抗酸染色、MPB64 抗原检

作者简介: 陈振华, 1982 年生, 男, 副主任技师, 硕士, 研究方向为临床检验诊断学。

通信作者: 谭云洪, 主任技师, E-mail: tanyunhong@163.com。

测、PNB 生长试验和 TCH 生长试验,鉴定菌种,具体操作按照试剂盒说明书进行;2 个月未见菌落生长报告阴性。如果发现培养基液化或者长霉菌,则报告污染。MTB 绝对浓度法固体药敏试验:用接种环刮取 MTB 新鲜菌落于盛有生理盐水的磨菌瓶中,漩涡震荡 2 min,比浊制备成 1 mg/mL 菌悬液,生理盐水稀释成 10^{-2} mg/mL 菌液,吸取 100 μ L 分别接种至对照、含高浓度和低浓度利福平培养基表面,培养 4 周后判读结果:对照培养基上菌落生长良好的前提下,含药培养基上生长的菌落数多于 20 个,判定为耐药。

1.4 FQ-PCR 检测 视标本性状加入 1~2 倍体积 4% NaOH 溶液,震荡混匀后,静置液化 15 min,取液化后样本 1.0 mL 于 1.5 mL 离心管,12 000 r/min 5 min,弃上清液,加入 1.0 mL 无菌生理盐水重悬,12 000 r/min 5 min,弃上清液,向每支离心管中加入 50 μ L 核酸释放剂,金属浴 100 $^{\circ}$ C 10 min,12 000 r/min 5 min,上清液为待测样本 DNA。取模板 DNA 2 μ L 加入 PCR 反应管中,按照说明书中扩增程序在 ABI 7500 PCR 仪上扩增,按照试剂盒说明书判读结果:检测样品扩增曲线呈 S 形且循环阈值(Ct 值)<30,报告为“检出结核分枝杆菌 DNA”。

1.5 LAMP 检测 用一次性吸管吸取 200 μ L 痰液加入样品管中,金属浴 100 $^{\circ}$ C 10 min,然后将样品管旋入吸附过滤管中进行核酸提取、富集、纯化。取模板 DNA 2 μ L 加入对应的荧光 PCR 反应管中,在迪澳恒温荧光检测仪 Deaou-308C 上检测,按照试剂盒说明书判读结果:检测样本扩增曲线呈 S 型曲线且出峰时间 $\leq$ 45 min,报告为“检出结核分枝杆菌 DNA”。

1.6 GeneXpert 检测 视标本性状加入 1~2 倍体积标本处理液,震荡混匀,静置 15 min 后,吸取 2 mL 液化标本于 Cartridge 反应盒,将加好标本的 Cartridge 反应盒放入 GeneXpert 检测仪内,开始自动检测,反应结束后在检测系统窗口下直接观察测试结果。在检出 MTB DNA 的前提下报告利福平耐药结果。

1.7 LPA 检测 视标本性状加入 1~2 倍体积 40 g/L NaOH 溶液,震荡混匀后,静置液化 15 min,将消化好的液体转移至 50 mL 离心管中,加无菌生理盐水至 45 mL;4 000 r/min 20 min,弃上清液,每管加 2 mL 无菌生理盐水混匀沉淀,取 1 mL 混悬液转移到 1.5 mL 离心管中,12 000 r/min 5 min,弃上清液,加入 100 μ L 裂解液(A-LYS),金属浴 95 $^{\circ}$ C 5 min,

瞬间离心;加入 100 μ L 中和缓冲液(ANB),混匀,12 000 r/min 5 min,上清液即为提取的核酸 DNA。按照说明书,取模板 DNA 5 μ L 加入 PCR 反应管中,在 Life Touch 基因扩增仪上扩增,扩增完成后取 20 μ L 扩增产物用全自动 GT-Blot 48 杂交仪杂交。按照试剂盒说明书判读 MTB 及利福平检测结果。

1.8 统计学分析 用 SPSS 20.0 进行。组间率的比较采用卡方检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。2 个方法检测结果的一致率以 Kappa 值表示, $Kappa \geq 0.75$ 为一致性较好, $0.75>Kappa \geq 0.4$ 为一致性一般, $Kappa<0.4$ 为一致性较差。

2 结果

2.1 患者痰标本检测阳性率 各方法单独检测和将 L-J 联合分子生物学检测的病原学阳性率结果见表 1。可疑肺结核患者 3 种方法检测阳性率间差异无统计学意义($\chi^2=4.75, P=0.093$),与单独采用 L-J 相比,L-J+FQ-PCR 或者 L-J+LAMP 阳性率均明显提高,差异有统计学意义(χ^2 分别为 11.59 和 4.42, $P<0.01$);活动肺结核患者 3 种方法检测阳性率间差异无统计学意义($\chi^2=5.05, P=0.080$),L-J+LPA 病原学阳性率高于单独采用 LPA 的阳性率($\chi^2=7.86, P<0.01$),L-J+GeneXpert 病原学阳性率高于单独采用 L-J 的阳性率($\chi^2=9.84, P<0.01$)。

表 1 两组患者痰标本病原学阳性率

患者分组	检测方法	阳性数(n)	阳性率(%)
A 组(347 例)	L-J	75	21.6
	FQ-PCR	100	28.8
	LAMP	80	23.1
	L-J+FQ-PCR	115	33.1
	L-J+LAMP	99	28.5
B 组(172 例)	L-J	78	45.4
	LPA	73	42.4
	GeneXpert	93	54.1
	L-J+LPA	99	57.6
	L-J+GeneXpert	107	62.2

注:联合检测中,两种方法检测结果均阳性或者任一方法检测结果阳性,均认为病原学检出阳性。

2.2 A 组各方法间检测结果的一致率 A 组 347 例患者痰标本进行 3 种方法单独检测,均为阴性 224 例,均为阳性 51 例,总一致率为 79.3%(275/347)。其中,L-J 与 FQ-PCR 的一致率为 84.1%(292/347),L-J 与 LAMP 的一致率为 87.6%(304/347),FQ-PCR 与 LAMP 的一致率为 86.7%(301/347),Kappa 值分别为 0.583、0.643 和 0.656,见表 2。

表 2 A 组 3 种方法间病原学检测结果的一致率

检测技术	FQ-PCR				符合率 (%)	Kappa 值	检测技术	LAMP				符合率 (%)	Kappa 值	检测技术	LAMP				符合率 (%)	Kappa 值	
	阴性	阳性	合计	合计				阴性	阳性	合计	合计				阴性	阳性	合计	合计			
L-J	阴性	232	40	272	84.1	0.583	L-J	阴性	248	24	272	87.6	0.643	FQ-PCR	阴性	234	13	247	86.7	0.656	
	阳性	15	60	75				阳性	19	56	75				阳性	33	67	100			
合计		247	100	347			合计		267	80	347				合计		267	80	347		

2.3 B 组各方法间检测结果的一致率 B 组 172 例患者痰标本进行 3 种方法单独检测,病原学均为阴性 63 例,均为阳性 50 例,总一致率为 65.7% (113/172)。其中,L-J 与 LPA 的一致率为 72.7% (125/172),L-J 与 GeneXpert 的一致率为 75.0% (129/172),LPA 和 GeneXpert 的一致率为 83.7%

(144/172),Kappa 值分别为 0.446、0.504 和 0.678,见表 3。3 种方法病原学检测全为阳性结果的 50 份痰标本,利福平耐药性结果显示,3 种方法检测结果全为敏感的 25 例,全为耐药的 22 例,总的一致率为 94.0% (47/50)。

表 3 B 组 3 种方法间检测结果的一致率

检测技术	LPA		合计	符合率 (%)	Kappa 值	检测技术	GeneXpert		合计	符合率 (%)	Kappa 值	检测技术	GeneXpert		合计	符合率 (%)	Kappa 值			
	阴性	阳性					阴性	阳性					阴性	阳性						
L-J	阴性	73	21	94	72.7	0.446	L-J	阴性	65	29	94	75	0.504	LPA	阴性	75	24	99	83.7	0.678
	阳性	26	52	78				阳性	14	64	78				阳性	4	69	73		
合计	99	73	172			合计	79	93	172			合计	79	93	172					

3 讨论

目前,我国较多的结核病定点医疗机构采用的方法是联合直接涂片、L-J 和分子生物学技术筛查 MTB。本文结果显示,A 和 B 两组患者用 L-J 和分子生物学技术检查痰标本,各组内 3 种方法总的病原学阳性率差异均无统计学意义。本研究中 L-J、LAMP、LPA 和 GeneXpert 检测的病原学阳性率均低于杨健等^[6]报道结果,FQ-PCR 的病原学阳性率与张帆等^[7]报道结果接近。可能的原因:本研究纳入的研究对象与其他文献选取的研究对象不完全一致;各方法使用的仪器、试剂盒厂家与其他文献报道也存在差异;本研究各方法检测的痰不是同一份标本,而是患者留取 3 份痰标本分别进行 L-J 和分子生物学检测,符合临床工作实际。

A 组 3 种方法检测结果两两之间总的一致率均在 84% 以上,B 组 3 种方法检测结果两两之间总的一致率均在 72% 以上。与 A 组相比,B 组病原学检出结果的一致性低,差异产生的原因可能由于 B 组患者中复治患者占 44.8%,在此类患者标本中可能存在死亡的 MTB 导致培养阴性而 MTB DNA 检测阳性。各方法检测结果不一致的主要原因有:痰标本中 MTB 含量低于 L-J 的检出限,分子生物学技术灵敏度更高;不同分子生物学检测方法针对基因靶点不同,当标本中 MTB 载量较低时,易出现不一致结果;不同的检测系统受外界因素影响大小不同。

LPA 和 GeneXpert 在临床应用较多^[6-9],2 种方法既能快速检测标本是否存在 MTB-DNA,还能检测

利福平耐药性。本研究对 L-J 与 LPA、GeneXpert 病原学检查均阳性的 50 份痰标本,进行 MTB 利福平耐药性检测,仅 3 例药敏结果不一致,LPA、GeneXpert 均表现耐药,L-J 均表现敏感,其中 2 例为复治患者,1 例初治患者。查阅 3 例患者 GeneXpert 的原始资料,MTB 核酸检测结果均是中或者高量级。可能是标本中同时存在敏感和耐药菌株,培养过程中敏感菌株优势生长导致耐药菌株比例降低,出现表型药敏假阴性结果^[10]。

综上所述,临床采用多份痰标本进行 MTB 病原学多个项目检测,各项目之间均具有可接受的一致性,分枝杆菌 L-J 联合分子生物学技术检出病原学阳性率比采用单一技术(培养或者分子生物学)阳性率高。L-J 与 LPA、GeneXpert 利福平药敏结果一致性好。各县、市级定点医疗机构应根据实际情况,开展适宜的联合检测技术以达到《“十三五”全国结核病防治规划》的目标。

4 参考文献

[1] Yuen CM, Amanullah F, Dharmadhikari A, et al. Turning off the tap: stopping tuberculosis transmission through active case-finding and prompt effective treatment [J]. Lancet, 2015, 386 (10010): 2334-2343.

[2] Gao L, Li X, Liu J, et al. Incidence of active tuberculosis in individuals with latent tuberculosis infection in rural China: follow-up results of a population-based, multicentre, prospective cohort study [J]. Lancet Infect Dis, 2017, 17(10): 1053-1061.