DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.11.041
第23卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 11
2001年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2001

文章编号:1000-5404(2001)11-1337-03

论著

结核杆菌快速诊断方法的临床应用评价

吴丽娟[1],鲁 卫平[1],胡安根[2],俞志海[1],黎 敏[1] (第三军医大学:[1]附属大坪医院野战外科研究所检验科,重庆 400042;[2]检验系95级,重庆 400038)

提 要:目的 探讨抗酸染色法、抗体测定法、PCR-杂交法在临床结核病快速诊断中的作用与地位。方法 采用单盲法,以临床诊断为黄金标准,以敏感性、特异性、阳性预测性、阴性预测性和准确性作为评价指标,对上述三种方法用于临床结核的快速诊断进行评价。结果 结核病组65例病人的临床样品,抗酸染色法阳性9例,抗体测定法阳性47例,PCR-杂交法阳性53例;非结核病组80例病人的临床样品,抗酸染色全部阴性,抗体测定法阴性73例,PCR-杂交法阴性71例。上述五项评价指标,抗酸染色法依次是13.85%、100%、100%、58.82%、61.38%,抗体测定法依次是72.31%、91.25%、87.04%、80.22%、82.76%;PCR-杂交法依次是81.54%、88.75%、85.48%、85.54%和85.52%。经χ^2检验,上述5项指标抗体测定法和PCR-杂交法均显著高于抗酸染色法($P<0.01$),但抗体测定法和PCR-杂法之间无显著性差异($P>0.05$)。结论 抗体测定法和PCR-杂交法方法先进,操作简便迅速,不需特殊设备,结果可靠,是值得推广的临床结核病快速诊断技术。文中对假阴性和假阳性结果也进行了分析讨论。

关键词:结核;实验诊断;抗酸染色;结核抗体、PCR、核酸杂交
中图法分类号:R446.5;R520.4 文献标识码:A

Evaluation of three rapid diagnosis methods for *Mycobacterium tuberculosis*

WU Li-juan, LU Wei-ping, HU An-geng, YU Zhi-hai, LI Min (Laboratory Department, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To explore the role and situation of three rapid diagnosis methods, i.e. acid-fast stain, serum antibody detection and PCR-hybridization, in rapid diagnosis of clinical tuberculosis. Methods The single-blind method was adopted and clinical diagnosis was made as standard. Five indexes, including sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and accuracy, were adopted as evaluating references. Results Among 65 tuberculosis cases, the positive results of acid-fast stain, serum antibody detection and PCR-hybridization were 9, 47 and 53 respectively. Among 80 non-tuberculosis cases (control), all were negative by acid-fast stain. 73 cases were negative by serum antibody examination and 71 cases were negative by PCR-hybridization as well. As far as the five evaluating indexes, acid-fast stain were 13.85%, 100%, 100%, 58.82% and 61.38% respectively; serum antibody detection were 72.31%, 91.25%, 87.04%, 80.22% and 82.76% respectively; PCR-hybridization were 81.54%, 88.75%, 85.48%, 85.54% and 85.52% respectively. By χ^2 test, the five indexes of antibody detection and PCR-hybridization were higher than that of acid-fast stain ($P<0.01$). However, there was no significant difference between serum antibody and PCR-hybridization ($P>0.05$). Conclusion Serum antibody detection and PCR-hybridization are two reliable, specific and sensitive procedures for the diagnosis of clinical tuberculosis. Results of false negative and false positive were also discussed in detail.

Key words: tuberculosis; laboratory diagnosis; acid-fast stain; antibody, PCR, nucletide hybridization

结核病是严重危害人类健康的主要疾病之一,其发病率不断上升,临床一经明确诊断即采取抗痨药物治疗,往往疗程漫长,给机体的肝肾等重要脏器带来严重损害。因此,该病的准确诊断举足轻重。近年来,我室与临床相关科室联系,对该病诊断实验室通常采用的三种相对简便快捷方法进行了应用性评价。

1 材料与方法

1.1 临床资料

全部病例为1996年12月至2000年5月我院及重庆市另两家医院的住院病人。结核病组65例,年龄10~81岁,男39例,女26例,临床依据症状、体征、X线摄片、CT及病理检查而明确诊断,包括肺结核37例、肾结核7例、泌尿系结核5例、结核性脑膜炎9例、淋巴结结核2例、骨结核3例、结核性胸膜炎2例。对照组80例,年龄19~68岁,男43例,女37例,为同期住院病人中排除结核病患者,其中包括肺癌24例、支气管扩张9例、急慢性支气管炎20例、泌尿系肿瘤7例、多囊肾3例、痛风2例、病毒性脑炎15例。

1.2 实验设计

采用单盲法,即临床医生掌握病例资料,检验具体操作人员在无临床任何提示及交流情况下,按卫生部颁布的《全国临床检验操作规程》进行检验和出报告。应用评价以临床诊断为黄金标准,以敏感性、特异性、阳性预测性、阴性预测性和准确性为评价指标。以TP表示真阳性,TN表示真阴性、FP表示假阳性和FN表示假阴性,计算公式是:敏感性=TP/(TP+FN);特异性=TN/(TN+FP);阳性预测性=TP/(TP+FP);阴性预测性=TN/(TN+FN);准确性=(TP+TN)/(TP+TN+FP+FN)。

1.3 实验方法

1.3.1 抗酸染色法 临床以清洁瓶或试管收集病人相应的痰液(5 ml)、尿液(10 ml)、脑脊液(1.0 ml)、穿刺液(5 ml)送检。

作者简介:吴丽娟(1965-),女,四川省成都市人,硕士,副主任医师,副教授,主要从事临床微生物及基因诊断方面的研究,发表论文30余篇。电话:(023)68757272

收稿日期:2000-02-25;修回日期:2001-07-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

痰液经消化与其它样品一样离心后，用沉渣涂片，经抗酸染色后镜检。

1.3.2 抗体快速检测法 结核快速胶体金检测试纸条为加拿大QUORUM DIAGNOSTICS INC 产品。实验时，取患者静脉血1 ml，分离血清。取100 μl 血清于1.5 ml 管中，插入纸条，待血清浸润全部纸条后，反应15 min。阳性，纸条上将出现两条色带；阴性，纸条上仅出现一条色带；若无色带出现，须重新换纸条复查。

1.3.3 PCR-分子杂交检测法 向样品的沉淀物（同抗酸染色法）加入50 μl DNA 提取液，混匀后煮沸15 min，12 000 r/min 离心5 min 备用。PCR 试剂盒购于上海复星生物工程公司，靶基因为IS6110序列，操作按说明书进行。杂交探针为试剂盒随赠，采用光敏生物素标记，AP-BCIP/NBT 显色。

1.4 统计学处理

实验所得阳性检出率、符合率采用 χ^2 检验进行统计学处理。

2 结果

2.1 145例患者三种结核病原体快速检测方法的结果及检出率比较

实验结果见表1。

表1 145例患者三种结核病原体快速诊断方法的检测结果

Tab 1 Results of 145 cases diagnosed for *Mycobacterium tuberculosis* by 3 methods

Group	*n*	Numbers of positive results by acid-fast stain (%)	Numbers of positive results by serum antibody detection (%)	Numbers of positive results by PCR-hybridization (%)
Tuberculosis	65	9(14%)	47(72%)	53(82%)
Pulmonary tuberculosis	37	7(19%)	29(78%)	53(82%)
Meningeal tuberculosis	9	0	7(78%)	32(87%)
Renal tuberculosis	7	1(14%)	4(57%)	6(86%)
Urogenital tuberculosis	5	1(20%)	3(60%)	3(77%)
Osteoarticular tuberculosis	3	0	2(67%)	3(100%)
Lymph node tuberculosis	2	0	1(50%)	2(100%)
Pleural tuberculosis	2	0	1(50%)	1(50%)
Control	80	0	7(9%)	9(11%)
Pulmonary cancer	24	0	2(8%)	4(17%)
Acute &chronic bronchitis	20	0	3(15%)	4(17%)
Viral meningitis	15	0	0	0
Bronchiectasis	9	0	1(11%)	1(11%)
Urogenital neoplasms	7	0	1(11%)	0
Polycystic kidney	3	0	0	0
Gout	2	0	0	0

65例结核病患者，抗酸染色法阳性9例，检出率14%；抗体测定法阳性47例，检出率72%；PCR-杂交法阳性53例，检出率82%。经 χ^2 检验，抗体测定法和PCR-杂交法的检出率明显高于抗酸染色法（$P<0.01$），抗体测定法和PCR-杂交法的检出率无显著性差异（$P>0.05$）。

2.2 三种结核病原体快速检测方法与临床诊断的关系

实验数据见表2，可见抗酸染色法与临床诊断的符合率达61%，抗体测定法达83%，PCR-杂交法达86%。经 χ^2 检验，抗体测定法和PCR-杂交法与临床诊断的符合率明显高于抗酸染色法（$P<0.01$），但抗体测定法和PCR-杂交法与临床诊断的符合率无明显差异（$P>0.05$）。

表2 三种结核病原体快速诊断方法与临床诊断的关系

Tab 2 Relationship between clinical diagnosis and the 3 rapid diagnostic methods for tuberculosis

Clinical diagnosis	*n*	Acid-fast stain		Serum antibody detection		PCR-hybricization	
		+	−	+	−	+	−
Tuberculosis	65	9	56	47	18	53	12
Control	80	0	80	7	73	9	71

2.3 三种结核病原体快速检测方法的临床应用价值

数据见表3，提示：抗酸染色法虽敏感性低，但其特异性和阳性预测性最高，其阳性结果可作为临床确认结核病的可靠指标；抗体测定法和PCR-杂交法的优越性在于它们的高敏感性，其阳性结果是抗酸染色法阴性样品诊断结核杆菌阳性的有力补充，且其阳性预测性（指预测临床结核感染的可能性）分别达87.04%和85.48%。

表3 三种结核病原体快速诊断方法的临床应用评价（%）

Tab 3 Evaluation of the 3 rapid diagnostic methods for *Mycobacterium tuberculosis* in clinical application (%)

Mehod	Sensitivity	Specificity	Positive predictive value	Negative predictive value	Accuracy
Acid-fast stain	13.85	100	100	58.82	61.38
Serum antibody detection	72.31	91.25	87.04	80.22	82.76
PCR-hybridization	81.54	88.75	85.48	85.54	85.52

2.4 抗体测定法和PCR-杂交法用于临床结核病诊断的假阴性和假阳性

结核病组65例患者的临床样品经抗体测定和PCR-杂交法分析，都存在假阴性问题，其中抗体测定法假阴性18例，PCR-杂交法假阴性12例（在这些假阴性中都包括1例抗酸染色法阳性病例），其漏诊率分别达28%和19%，远远低于抗酸染色法的漏诊率（86%）。

非结核病组80例患者，其血清中检出抗结核杆菌相对分子质量为38 000蛋白抗体7例，误诊率9%；相应临床样品经PCR-杂交分析，仍有9例阳性，误诊率11%。

3 讨论

Koch 发现结核杆菌至今118周年，在这漫长遥远的岁月中，人们为了诊断、治疗和控制结核病，前赴后继，付出艰苦努力。但是，为国情所限制，迄今为止百余年前发明的涂片抗酸染色镜检法、细菌分离培养法和OT试验仍是国内许多医院开设的常规检验法。落后的现实，严重制约着国内该病的诊治与预防。近年来，基因的克隆、表达及单克隆抗体技术的发展，给结核菌免疫学快速诊断带来了生机。同时，基因扩增技术和核酸杂交技术进入临床检验领域，使直接分析检侦病原菌基因成为现实。新一代结核菌免疫分析技术和基因检测技术，相对于结核菌的分离培养，有相对简便、快速、成本低廉、不需特殊设备等优点。为了验证这些新技术的临床应用价值，明确它们在帮助临床医生诊断结核病方面的作用与地位，我们有目的地精选了加拿大QUORUM DLAGNOSTICS 公司生产的“结核快速胶体金检测试纸条”和上海复星生物工程公司生产

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

的"PCR-杂交法结核菌 DNA 检测药盒",与传统抗酸染色法一道,采用单盲设计并以临床诊断为金标准,进行了方法学应用价值研讨。

结核快速胶体金检测试纸条为一种血清抗体检测方法,它采用具有高度特异性、分子量为相对分子质量为 38 000 的人型结核杆菌基因重组抗原,并将其固定在固相支持膜上,然后将该膜浸泡在血清中,如果血清中存在有抗结核菌相对分子质量为 38 000 蛋白抗体(包括 IgM 和 IgG),则会与膜上的重组抗原结合,再用胶体金颗粒同抗原抗体复合物结合,就会在膜上显现出红色的条带。相对分子质量为 38 000 蛋白仅存在于人型结核杆菌、牛型结核杆菌(包括 BCG)和 Mnonchromogenicum 中,人型结核杆菌相对分子质量为 38 000蛋白抗原决定簇的抗原性比牛型卡介苗高 10 倍,M. nonchramogenicum 为一种罕见的非典型分枝杆菌[1]。因此,该种分析相对分子质量为 38 000 蛋白抗体的免疫学方法,具有很高的特异性。QUORUM DIAGNOSTICS 公司对部分卡介苗接种者的研究显示,接种后体内抗体水平并不升高,证实该方法用于临床诊断是可行的。本项研究证实,该抗体测定法在临床诊断中具有 82.76%的可靠性,在敏感性方面是抗酸染色法所不能及的,可用于临床辅助诊断。胡忠义等[2]的初步观察也赞成我们的结论。

PCR 技术具有极高的敏感性,由于反应时间短、标本取材广泛、专业实验室投资低等特点,20 世纪 90 年代在国内检验界风靡一时,的确为难分离培养病原体的检测提供了一个快捷十分有效的通路。但在实际应用中,由于 PCR 后续扩增产物的分析手段(电泳法)落后,极易给实验室带来阳性污染以及不能鉴别 PCR 产物的特异性等问题,造成易产生非特异性产物,出现假阳性和重复性差等缺点[3~5]。为了克服上述不足,新一代 PCR-杂交法试剂盒采用了 UDG/DUTP 防污染系统。在反应液中以 dUTP 代替 dTTP,使前次扩增子污染带来的假阳性得到控制。试剂盒 PCR 产物变性后用生物素标记,与固定在纸条上的已知特异性探针杂交,再对探针捕获的生物素进行显色反应,严格地控制了 PCR 过程中生成的非特异性产物对结果造成的假阳性。本研究结果表明,PCR-杂交法的阳性检出率 82%,与临床诊断的符合率 86%,准确性 85.52%,各项指标居三种方法的榜首。

本研究也证实,抗体测定法和 PCR-杂交法也存在假阴性和假阳性,对此应用辩证法的观点加以看待。结核菌相对分子质量为 38 000 蛋白刺激机体可产生 IgM 和 IgG 型抗体,试剂盒选用的重组抗原其抗原决定簇可同时针对此两种抗体进行测定,单纯 IgG 阳性可是机体的回忆反应。另外,若结核菌相对分子质量为 38 000 蛋白发生变异,该法亦不能查出,且不同人群机体免疫水平存在差异也是假阴性产生的可能因素之一。PCR-杂交法扩增的 DNA 靶区为 IS6110 序列,该序列仅存在于人型结核杆菌、牛型结核杆菌(包括 BCG)和非洲结核杆菌[6]。由于 PCR 扩增和后续探针标记的生物素-AP-BCIP/NBT 级联放大作用,PCR-杂交法的灵敏度可达到 1 个拷贝的基因。加之,人群中大量隐性带菌者的存在,PCR-杂交法阳性而临床诊断阴性的结果并不矛盾。但是,该法仅能对前述三种结核分枝杆菌进行诊断,不能检出其它非典型抗酸杆菌感染。值得注意的是,少量临床样品不能代替整个机体或整个器官的情况,出现假阴性情况不可避免。

参考文献:

[1] Yoshitsugu M, Hironobu K, Shigeru K, *et al*. Nested polymeqrase chain reaction for detection of mycobacterium tuberculosis in clinical samples[J]. J Clin Microbial, 1993, 31(8): 2 228—2 232.
[2] 胡忠义, 郭春祥. 基因重组 38KDA 抗原检测结核杆菌抗体的应用评价[J]. 中国防痨杂志, 1998, 20(增刊): 169—170.
[3] Clarridge J E, Shawar R M, Shinnick T M, *et al*. Large-scale use of polymerase chain reaction for detection of Mycobacterium tuberculosis in a routine mycobacteriology laboratary[J]. J Clin Microbiol, 1993, 31(8): 2 049—2 056.
[4] 吴丽娟, 邓光贵, 江 军, 等. 聚合酶链反应技术快速诊断结核病[J]. 中华泌尿外科杂志, 1995, 16(1): 44—46.
[5] 吴丽娟, 邓光贵, 张文俊 等. 应用聚合酶链反应技术快速诊断结核病[J]. 中华内科学杂志, 1995, 34(7): 481.
[6] Caroline A K, Martha J A, Janis I C, *et al*. Detection and identification of mycobacterium tuberculosis directly from sputum sediments by amplification of mRNA[J]. J Clin Microbid, 1993, 31(9): 2 410—2 416.

(编辑 潘式文)

消息

《中医临床杂志》征订启事

《安徽中医临床杂志》创刊于 1988 年,是国家科委和新闻出版社署正式批准出版的中医综合性学术期刊,内容丰富,格调活泼,设有专家论坛、专题研究、专病证治、临床研究、名老中医之路、医学经验、临床报道、医案医话、病案讨论、病例报告、方药运用、学术探讨、歧黄论坛、新安医学研究、华佗学术研究、针灸推拿、中医护理、综述讲座、中医药研究进展、百家园等栏目。在 2000 年国家中医经管理局主办的第 2 届全国中医药优秀科技期刊评选中,荣获二等奖,为临床不可多得的良师益友,适宜各级中西医疗单位订阅,更适合广大中医、中西医结合临床医生 个人订阅。本刊为双月刊,80 页,国内统 一刊号 CN 34-1132/R,国际标准刊号 ISSN 1005-7331。国内订阅:全国各地邮局,邮发代号:26-131。国内定价:4.00 元/册,全年 24.00 元。国外发行:中国国际图书贸易总公司(北京 399 信箱),国外代号:BM6656,国外定价:4.00 美元/册,全年 24.00 美元。您可以到当地邮局办理订阅,错过订阅时间者,也可以直接与本刊联系订阅。

地址:合肥市大通路明光小区 5 幢 邮编:230011 电话:0551-4475775

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net