

# 结核分枝杆菌恒温荧光检测技术临床应用评价研究

欧喜超 夏辉 逢宇 李强 赵冰 董海燕 张治英 赵雁林

**摘要** **目的** 评估恒温荧光(RealAmp)检测技术在结核病临床诊断中的应用价值。**方法** 2013年5~8月,在上海市肺科医院、山东省胸科医院和广州市胸科医院,门诊医生连续纳入初诊肺结核可疑症状者,每例患者留取1份合格痰标本。实验室人员对痰标本同时进行涂片染色荧光显微镜镜检、液体培养和 RealAmp 检测,培养阳性菌株进行 16S-23S 间隔区测序菌群鉴定。以临床诊断结果为金标准,比较涂片镜检、液体培养和 RealAmp 检测结核分枝杆菌的敏感度和特异性。**结果** 与临床诊断结果比较,涂片镜检、液体培养和 RealAmp 检测结核分枝杆菌的敏感度分别为 17.16%、39.45% 和 39.72%,RealAmp 检测特异性为 91.61%。RealAmp 检测敏感度高于涂片镜检( $\chi^2 = 134.42, P < 0.05$ ),与液体培养试验相当。**结论** RealAmp 检测操作简单,敏感度较高,能够提高涂阴肺结核患者的检出。

**关键词** 结核分枝杆菌 恒温荧光 扩增诊断

**中图分类号** R378.91

**文献标识码** A

**DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.06.016

**Clinical Evaluation Study of Isothermal Fluorescence Detection Method for Mycobacterium Tuberculosis Detection.** *Ou Xichao, Xia Hui, Pang Yu, et al. Tuberculosis Reference Laboratory, National Center for Tuberculosis Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China*

**Abstract Objective** To evaluate the clinical application value of isothermal fluorescence detection method in the diagnosis of TB suspects. **Methods** From May 2013 to August 2013, clinician continuously recruited patients with suspected tuberculosis from three chest hospitals in Shanghai, Shandong and Guangzhou. Each patient provided one qualified sputum specimen. Laboratory staff performed microscopic examination by fluorescence microscope, liquid culture and RealAmp for this specimen. All positive cultures underwent 16S-23S rDNA ITS sequencing for species confirmation. Using the clinical diagnosis as reference standard, we evaluate the performance of RealAmp test for *Mycobacterium tuberculosis* detection. **Results** Compared with clinical diagnosis, the sensitivity of smear microscopy, solid culture and RealAmp were 17.16%, 39.45% and 39.72%, respectively, the specificity of RealAmp was 91.61%. The sensitivity of RealAmp was higher than smear ( $\chi^2 = 134.42, P < 0.05$ ) and approximate with the liquid culture. **Conclusion** The operation of RealAmp test is simple and the sensitivity is higher. It can increase the detection rate of smear negative TB patients.

**Key words** Mycobacterium tuberculosis; RealAmp; Diagnosis

随着分子生物学的发展,近年来涌现出很多检测方法可用于结核分枝杆菌的快速诊断及鉴定<sup>[1-4]</sup>。环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是由 Notomi<sup>[5]</sup>于2000年首先提出的一种新的核酸扩增技术,不需要常规核酸扩增所需的热循环及昂贵的仪器设备,在等温条件下可高效、快速、高特异地扩增靶序列<sup>[5-9]</sup>。

本研究使用的恒温荧光检测试剂盒(RealAmp),

针对结核分枝杆菌 IS6110 基因设计引物,通过 Bst DNA 聚合酶及特异性引物在恒温条件下对样本中结核分枝杆菌核酸片段进行特异性扩增,扩增产物与核酸染料结合后发出荧光信号,通过使用自主研发的恒温荧光检测仪(ESEQuant tube scanner)实时读取荧光信号,根据扩增曲线判断结果,不需要实验人员人工判读检测结果,避免了人工肉眼判读带来的主观误差,操作简单方便。本研究通过选取3家省级专科医院实验室,以临床诊断结果为金标准,比较涂片镜检、液体培养和 RealAmp 检测结核分枝杆菌的效能,对 RealAmp 检测技术在结核病临床诊断中的应用价值进行评价。

## 现场与方法

1. 研究现场:标本取自上海市肺科医院、广州市胸科医院和山东省胸科医院。

基金项目:中国国家卫生与计划生育委员会与比尔及梅琳达·盖茨基金会结核病防治项目(2009-04-01)

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心结核病预防控制中心国家结核病参比实验室(欧喜超、夏辉、逢宇、李强、赵冰、赵雁林);100600 北京,帕斯适宜卫生科技组织(董海燕、张治英)

通讯作者:赵雁林,电子信箱:zhaoyanlin@chinatb.org

2. 研究方法: (1) 荧光染色涂片镜检: 按照《中国结核病防治规划 - 痰涂片镜检标准化操作及质量保证手册》中的标准化操作程序进行操作。(2) MGIT - 960 液体培养: 使用 BACTEC™ MGIT™ 960 操作系统对纳入患者痰标本进行分枝杆菌液体培养<sup>[10]</sup>。(3) RealAmp 检测: ①样品处理和 DNA 提取: 使用无菌吸管吸取 2 ~ 3ml 痰液至 50ml 离心管中, 视标本性状加 1 ~ 2 倍体积 4% 的 NaOH 溶液, 旋紧管盖, 在涡旋振荡器上涡旋震荡 15 ~ 30s, 静置 15min, 直到痰标本充分液化, 吸取 1ml 加入带螺旋盖的离心管中, 12000r/min 离心 5min, 弃去上清液。加入生理盐水 1ml 并混匀, 12000r/min 离心 5min, 弃去上清液。加入 100μl 的 DNA 提取液, 涡旋混匀 15s, 100℃ 加热 10min。12000r/min 离心 5min, 上清液即为模板 DNA; ②试剂配制: 若有  $n$  个待检样品, 需取出  $n + 2$  个反应管, 分别加入 25μl 模板到反应管中 (加样顺序为阴性对照、待检样品、阳性对照), 然后在每管加入 20μl 密封液, 盖紧盖子, 震荡混匀, 3000r/min 离心 30s; ③扩增反应: 将上述反应管放入恒温荧光检测仪 (Deaou - 308C) 内, 点击“开始”按钮开始反应; ④结果判读: 若有“S”型扩增曲线, 则判断为阳性; 若无“S”型扩增曲线, 则判为阴性 (图 1)。(4) PCR 测序菌群鉴定: 通过对培养阳性分枝杆菌菌株进行 16S - 23S rDNA ITS 测序分析, 区分结核分枝杆菌复合群和非结核分枝杆菌<sup>[11]</sup>。上游引物: 5' - GGCCTAACCTCGGGAGGGAG - 3', 下游引物: 5' - CCCGAGGCATATCGCAGCCTC - 3'。测序引物均由上海生工生物工程有限公司合成。用 PCR 直接测序法, 以测序引物在 ABI IRISM 377DNA 自动测序仪上测序。测序结果在 NCBI 网站进行 blast 分析。

3. 患者临床信息采集和诊断: 门诊医生详细询问纳入患者就诊症状及病史, 开具胸片和实验室检查单。本研究采用 RealAmp 检测评估技术, 其检测结果不能用于患者诊断, 仅用于患者诊断分类。根据涂片、培养、RealAmp 检测和临床检查结果, 将纳入患者



图 1 RealAmp 检测操作流程

分为临床诊断肺结核和临床诊断排除肺结核, 其中临床诊断肺结核包括“涂阳肺结核”、“涂阴培阳肺结核”和“菌阴肺结核”, 临床诊断排除肺结核包括“RealAmp 阳性排除肺结核”和“RealAmp 阴性排除肺结核”。

4. 统计学方法: 使用 SPSS 17.50 软件, 采用  $\chi^2$  检验对不同检测方法的检测效能进行比较分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

结 果

1. 纳入病例一般情况: 自 2013 年 5 ~ 8 月, 3 个实验室共纳入 1583 例初诊肺结核可疑症状者, 491 例患者痰标本液体培养试验阳性, 经 16S ~ 23S 基因测序菌群鉴定, 430 例患者鉴定为结核分枝杆菌感染, 50 例鉴定为非结核分枝杆菌感染, 11 例无测序结果。排除培养污染 (3 例)、传代失败 (11 例) 和非结核分枝杆菌感染患者 (50 例), 共 1519 例肺结核可疑症状者可用于 RealAmp 检测临床应用评价研究。1519 例初诊肺结核可疑者中, 涂阳肺结核占 12.31% (187/1519), 涂阴培阳肺结核占 16.98% (258/1519), 菌阴肺结核占 42.46% (645/1519), RealAmp 阳性排除肺结核占 2.37% (36/1519), RealAmp 阴性排除结核占 25.87% (393/1519) (表 1)。

表 1 纳入患者临床诊断结果 [n (%)]

诊断结果	山东省 (n = 519)	上海市 (n = 477)	广州市 (n = 523)	总计 (n = 1519)
I 涂阳肺结核	55 (10.60)	68 (16.31)	64 (12.24)	187 (12.31)
II 涂阴培阳肺结核	87 (16.76)	52 (10.90)	119 (22.75)	258 (16.98)
III 菌阴肺结核	211 (40.66)	262 (54.93)	172 (32.89)	645 (42.46)
IV RealAmp 阳性排除肺结核	26 (5.01)	6 (1.26)	4 (0.76)	36 (2.37)
V RealAmp 阴性排除肺结核	140 (26.97)	89 (18.66)	164 (31.36)	393 (25.87)

2. 液体培养和 RealAmp 检测室内质量控制:3 家医院共对 1583 份痰标本进行了液体培养,在 205 例涂片阳性病例中,培养阴性 15 例,涂阳培阴率为 7.32%,山东省和广州市两个项目点涂阳培阴率满足 <10% 的要求,而上海市涂阳培阴率 >10%。在培养的 1583 管培养基中,污染 65 管,总污染率 4.11%。

山东省和广州市的污染率满足液体培养试验室内质控(污染率 <5%)要求,而上海市的污染率 >10% (表 2)。3 家医院共完成 RealAmp 检测 277 批,山东省有 2 批发生阴参污染(2.1%,2/97),广州市阴参污染和阳参失败各 1 批(2.2%,2/92),RealAmp 检测的失败率为 1.44%(4/277),上海市未发生污染。

表 2 液体培养室内质量控制

地区	纳入患者数(n)	涂阳病例 (A)	涂阳培阳病例 (B)	涂阳培阴率(%) (A-B)/A	总管数	污染管数	污染率(%)
山东省	530	57	55	3.51	530	11	2.08
上海市	503	80	69	13.75	503	51	10.14
广州市	550	68	66	2.94	550	3	0.55
总计	1583	205	190	7.32	1583	65	4.11

3. RealAmp 检测在肺结核可疑症状者中检测结核分枝杆菌的效能:在肺结核可疑患者中,与临床诊断结果比较,涂片镜检、液体培养和 RealAmp 检测结核分枝

杆菌的敏感度分别为 17.16%、39.45% 和 39.72% (表 3)。RealAmp 检测敏感度显著高于涂片镜检( $\chi^2 = 134.42, P < 0.05$ ),RealAmp 检测特异性为 91.61%。

表 3 与临床诊断结果比较,涂片、培养及 RealAmp 检测结核分枝杆菌的效能

检测方法	临床确诊		总计	敏感度 (95% CI)	特异性 (95% CI)
	结核	非结核			
涂片	阳性	187	0	17.16% (15.03% ~ 19.51%)	100.00% (99.11% ~ 100.00%)
	阴性	903	429		
	小计	1090	429		
培养	阳性	430	0	39.45% (36.59% ~ 42.38%)	100.00% (99.11% ~ 100.00%)
	阴性	660	429		
	小计	1090	429		
RealAmp	阳性	433	36	39.72% (36.86% ~ 42.66%)	91.61% (88.60% ~ 93.88%)
	阴性	657	393		
	小计	1090	429		

讨 论

结核病的早期诊断对于很好地控制其传播具有十分重要的意义,更符合早期对患者(尤其涂阴肺结核患者)实施个体化诊断和治疗。本研究在省级结核病医院,采用临床肺结核可疑症状者痰标本,通过使用 RealAmp 试剂盒检测其是否感染结核分枝杆菌,检测结果报告时间比液体培养明显缩短,2h 内即可获得实验结果。但 RealAmp 检测与其他分子生物学检测一样都存在着一定的局限性,均不能得到活菌进行后续的药物敏感度试验。

除存在一定数量的涂阴标本液体培养假阴性。上海市液体培养污染率和涂阳培阴率均高于质控要求,可能是因为实验室工作量较大,在标本的前处理和接种等环节存在问题,也可能是患者就诊前服用氟喹诺酮类抗生素等具有一定抗结核作用的药物导致其痰标本涂片阳性培养阴性,因此,实验室定期统计涂阳培阴率和污染率对于监测培养试验的质量具有十分重要的意义。

通过比较不同项目点液体培养试验室内质控情况发现,山东省和广州市液体培养污染率较低(<3%),可能是由于痰标本前处理过度导致污染率降低,前处理过度同时会使液体培养阳性率降低,但研究发现两家医院涂阳培阴率均控制在正常范围以内(<4%),未影响涂阳标本的培养阳性率,但不能排

以临床诊断结果作为金标准,发现 RealAmp 检测结核分枝杆菌的敏感度显著高于涂片镜检且与液体培养试验相当,提示 RealAmp 检测的临床应用价值高于传统涂片镜检和液体培养试验,可更好地辅助临床医生对初诊肺结核可疑患者进行早期诊断和治疗,但其检测特异性仅为 91.61%<sup>[12]</sup>。由于在患病率稳定的情况下,检测的特异性越低,则阳性预测值越低,导致其检测结核分枝杆菌的假阳性率增高。36

例 RealAmp 阳性排除肺结核患者, 26 例来自山东省胸科医院, 山东省 97 批 RealAmp 检测中有 2 批发生阴参污染(2.1%), 这种假阳性可能是由于 RealAmp 检测效率高发生非特异性扩增所致, 也可能是因为温度、湿度等环境因素对试剂盒产生影响所致, 还需要进一步的研究确定。由于实验室检测的准确性对于患者的治疗结果具有十分重要的影响, 特别是对于患者假阳性的鉴别对于减少患者个体损伤具有十分重要的意义, 因此, 在分子生物学诊断技术的推广应用过程中, 临床医生在对就诊患者进行诊断时, 需要综合实验室、胸片和临床检查结果, 对患者进行最终诊断, 避免出现结核病漏诊或过诊。

由于 RealAmp 检测试剂盒需要冷链运输, 限制了该产品的广泛推广, 目前该试剂盒正在进行优化设计, 包括增加引物条数提高特异性以及采用冷冻干燥试剂确保试剂盒能够常温运输等, 因此, 该检测试剂盒在肺结核患者快速筛查方面具有一定的应用前景。本研究选择 3 家高级实验室作为评估现场, 可在短期内完成病例纳入, 但由于到省级医院就诊的患者多为重症患者、耐药患者或复发患者, 新发患者较少, 就诊患者类型与区县级结防机构存在一定的差异, 然而 RealAmp 检测主要是用于初诊肺结核可疑患者中结核病的快速筛查, 因此, 后期仍有必要在区县级结核病实验室进行多中心验证评估, 评价其在区县级结核病防治机构推广应用的可行性。

**致谢** 感谢上海市肺科医院、广州市胸科医院和山东省胸科医院实验室工作人员在病例纳入、实验室检测和数据收集过程中给与的支持和配合。感谢美国帕斯适宜卫生科技组织在数据分析和撰写过程中给予的帮助。

(上接第 51 页)

- 7 Morbach S, Furchert H, Groblichhoff U, *et al.* Long-term prognosis of diabetic foot patients and their limbs: amputation and death over the course of a decade[J]. *Diabetes Care*, 2012, 35(10): 2021-2027
- 8 Shlipak MG, Matsushita K, Ärnlöv J, *et al.* Cystatin C versus creatinine in determining risk based on kidney function[J]. *New Engl J Med*, 2013, 369: 932-943
- 9 Filler G, Lepage N. Cystatin C adaptation in the first month of life[J]. *Pediatr Nephrol*, 2013, 28: 991-994
- 10 Hu Y, Liu F, Shen J, *et al.* Association between serum cystatin C and diabetic peripheral neuropathy: a cross-sectional study of a Chinese type 2 diabetic population[J]. *Eur J Endocrinol*, 2014, 171: 641-648
- 11 Liu F, Shen J, Zhao J, *et al.* Cystatin C: a strong marker for lower limb ischemia in Chinese type 2 diabetic patients? [J]. *PLoS One*,

## 参考文献

- 1 Small PM, Pai M. Tuberculosis diagnosis - time for a game change [J]. *New Eng J Med*, 2010, 363(11): 1070-1071
- 2 Pai M, Kalantri S, Dheda K. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: part II. Active tuberculosis and drug resistance [J]. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2006, 6(3): 423-432
- 3 Helb D, Jones M, Story E, *et al.* Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology [J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(1): 229-237
- 4 张贺秋, 赵雁林. 现代结核病诊断技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 15
- 5 Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Rese*, 2000, 28(12): 63
- 6 Iwamoto T, Sonobe T, Hayashi K. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex, M. avium, and M. intracellulare in sputum samples [J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(6): 2616-2622
- 7 Catharina C. Boehme, Pamela Nabeta, *et al.* Operational feasibility of using loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of pulmonary tuberculosis in microscopy centers of developing countries [J]. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(6): 1936-1940
- 8 Ou XC, Li Q, Xia H, *et al.* Diagnostic accuracy of PURE-LAMP test for pulmonary tuberculosis at the county level laboratory in China [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e94544
- 9 Pandey BD, Poudel A, Yoda T, *et al.* Development of an in-house loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for detection of Mycobacterium tuberculosis and evaluation in sputum samples of Nepalese patients [J]. *J Med Microbiol*, 2008, 57(Pt4): 439-443
- 10 赵雁林. 分枝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: 20
- 11 Guertler V, Stanisich VA. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region [J]. *Microbiology*, 1996, 142(Pt1): 3-16
- 12 Nhu NT, Ha DT, Anh ND, *et al.* Evaluation of Xpert MTB/RIF and MODS assay for the diagnosis of pediatric tuberculosis [J]. *BMC Infect Dis*, 2013, 13: 31 (收稿日期: 2015-12-29)  
(修回日期: 2016-01-04)
- 2013, 8: e66907
- 12 Lewis S, Raj D, Guzman NJ. Renal failure: implications of chronic kidney disease in the management of the diabetic foot [J]. *Semin Vasc Surg*, 2012, 25(2): 82-88
- 13 Luo J, Wang LP, Hu HF, *et al.* Cystatin C and cardiovascular or all-cause mortality risk in the general population: A Meta-analysis [J]. *Clin Chim Acta*, 2015, 450: 39-45
- 14 Bengtsson E, To F, Crubb A, *et al.* Absence of the protease inhibitor cystatin C in inflammatory cells results in larger plaque area in plaque regression of apoE-efficient mice [M]. *Atherosclerosis*, 2005, 180: 45-53
- 15 Sharfuddin AA, Molitoris BA. Pathophysiology of acute kidney injury [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2011, 7: 189-200  
(收稿日期: 2015-11-16)  
(修回日期: 2015-11-30)