

荧光定量 PCR 测定支气管肺泡灌洗液中 TbDNA 诊断肺结核的临床价值

李志惠 张红漫 刘建强 刘朋冲 赵杰 李毅 崔丹 冯秀莉

(河北省胸科医院 石家庄 050041)

摘要: **目的** 探讨纤支镜肺泡灌洗液中结核分枝杆菌 DNA 在肺结核诊断中的价值。**方法** 对 187 例初治肺结核患者及 41 例肺炎患者分别应用荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)技术检测结核分枝杆菌 DNA、肺泡灌洗液结核菌培养、纤维支气管镜刷片抗酸染色。**结果** 肺结核患者肺泡灌洗液结核分枝杆菌 DNA 阳性率为:78.6%、肺泡灌洗液结核菌培养阳性率为 28.8%、刷片抗酸染色阳性率为 21.9%。肺炎患者肺泡灌洗液结核分枝杆菌 DNA、肺泡灌洗液结核菌培养、刷片抗酸染色均阴性。**结论** 荧光定量聚合酶链反应检测肺泡灌洗液结核分枝杆菌 DNA, 特异性高, 用于肺结核诊断可提高肺结核诊断的敏感性和准确性, 明显优于纤维支气管镜刷片抗酸染色, 亦较肺泡灌洗液结核菌培养诊断灵敏、快速, 可作为肺结核诊断较可靠指标。

关键词: 结核, 肺/诊断; 支气管肺泡灌洗液; DNA, 细菌; 聚合酶链反应

通讯作者: 张红漫(pdxzhm@163.com)

The Clinical Value of Detecting Tb DNA in BALF by FQ-PCR in Diagnosing Pulmonary Tuberculosis

Li Zhihui, Zhang Hongman, Liu Jianqiang, Liu Pengchong, Zhao Jie, Li Yi, Cui Dan, Feng Xiuli
Chest Hospital in Hebei Province, Shijiazhuang 050041, China

Abstract: **Objective** To study the value of detecting *M. tuberculosis* DNA in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) by fluorescent quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR) in diagnosing pulmonary tuberculosis. **Methods** The BALF from the 187 patients with pulmonary tuberculosis treated first and 41 patients with pneumonia were detected the *M. tuberculosis* DNA (Tb-DNA) by FQ-PCR, and performed mycobacterial culture. The bronchoscopic brushing smears were detected by acid-fast staining. **Results** The positive rates of detecting BALF from the patients with pulmonary tuberculosis treated first were 78.6% by FQ-PCR, 28.8% by mycobacterial culture and 21.9% by acid-fast staining. The results from the patients with pneumonia were all negative by these three methods. **Conclusion** FQ-PCR is a rapid, sensitive, specific method for detecting *M. tuberculosis* DNA in BALF.

Key words: tuberculosis, pulmonary/ diagnosis; bronchoalveolar lavage fluid; DNA, bacterial; polymerase chain reaction

Correspondence to: Zhang Hongman(pdxzhm@163.com)

肺结核是呼吸科常见疾病,近年来结核病的发病率呈现上升的趋势。由结核杆菌所致死的人数占单一传染病致死的人数首位。目前肺结核诊断方法主要是临床表现、X线或CT、细菌涂片及培养、聚

合酶链反应(PCR)等。但由于肺结核临床表现及胸部影像学表现复杂多变、涂片阳性率低、培养存在时间长、聚合酶链反应(PCR)假阳性率高等原因,因此寻找有效的肺结核的确诊方法仍是目前一个重要的

课题。

因此为提高肺结核诊断率,我们对荧光定量 PCR 测定肺泡灌洗液中结核分枝杆菌 DNA 在肺结核的诊断价值进行了临床观察。

1 对象与方法

1.1 研究对象 随机选择(按入院前后顺序选择)2008 年 1 月—2009 年 1 月在我科住院的 187 例具有典型症状及 X 线表现,通过治疗动态观察证实的肺结核患者,年龄 14~70 岁,其中男性 103 例,女性 84 例。平均年龄 33.7 岁。选择同期住院的 41 例肺炎患者(均经纤支镜检查或病原体、病理学检查确诊,其中支原体肺炎 11 例、细菌性肺炎 14 例、机化性肺炎 6 例、肺化脓症 8 例),年龄 24~65 岁,其中男 23 例,女 18 例,平均年龄 32.9 岁,全部肺结核病例均未合并其他细菌或真菌感染。所有肺炎患者均抗炎治疗 2 周,病变吸收不理想,院外怀疑“肺结核”来院。

1.2 研究方法 于住院 3~5d 时采用电子支气管镜检查并行经支气管镜防污染刷检(PSB)、防污染支气管肺泡灌洗术(PBAL),并对所取标本行涂片染色查抗酸杆菌,同时留取灌洗液做 FQ-PCR 检测及结核菌培养。

标本收集 利用 OLYMPUS CV240 型电子支气管镜,检查方法按常规进行,纤支镜检查时于镜下见异常者或于 X 线胸片/CT 异常的相应叶段内行经支气管镜防污染毛刷刷检,涂片送检抗酸染色;并行支气管肺泡灌洗,收集支气管肺泡灌洗液(BALF)5 ml,行荧光定量 PCR 检测及结核菌培养。

1.3 方法 用无菌灌洗瓶取受检者 5 ml 支气管肺泡灌洗液,密闭,立即送检,行荧光定量 PCR 检测标本中加入 4 倍体积的 4% NaOH,摇匀,室温下放置 30 min 液化,液化过程中振荡 2~3 次,取 1 ml 标本加入离心管中,12 000 转/min 离心 5 min,弃上清液留沉淀,加无菌生理盐水 1 ml 洗涤,10 000 rpm 离心 5 min,再重复洗涤 1 次,留沉淀加入 50 μ l

DNA 提取液充分混匀,沸水浴 10 min,10 000 转/min 离心 5 min 取上清液 2 μ l 点样上机。本研究应用中山大学达安基因股份有限公司生产的结核分枝杆菌(TB)荧光定量聚合酶链反应检测试剂盒,利用检验仪 Light Cycler 操作。

该系统是一密闭的 DNA 扩增检测系统,在将扩增体系所需各物质加样完毕后,即可进行扩增和检测,扩增产物的检测是通过系统对荧光探针 5' 端游离的 R 基团荧光强弱的分析来判断扩增产物的量,当 PCR 反应体系中有目的基因存在,就会扩增出特异核酸片段,荧光探针即会根据碱基配对的原理与之杂交。

PCR 反应每复制一个特异核酸片段,就有一个探针被切断,伴随一个荧光信号的释放。由于被释放的荧光基团数目和 PCR 产物是一对一的关系,因此用荧光检测技术检测出的荧光信号有无或强弱,即代表扩增产物有无或多少^[1]。

1.4 统计学分析 采用 SPSS for windows 11.0 统计分析软件,实验组与对照组之间比较采用 *t* 检验。

2 结果

经支气管镜防污染刷检抗酸染色、支气管肺泡灌洗液荧光定量 PCR 及肺泡灌洗液结核菌培养对照(表 1)

肺结核患者支气管肺泡灌洗液荧光定量 PCR 阳性率显著高于肺泡灌洗液结核菌培养及经支气管镜防污染刷检抗酸染色;肺炎患者支气管肺泡灌洗液荧光定量 PCR、支气管镜防污染刷检抗酸染色及肺泡灌洗液结核菌培养均为阴性。

肺结核患者肺泡灌洗液荧光定量 PCR 阳性检出率与肺泡灌洗液结核菌培养及经支气管镜防污染刷检抗酸染色阳性检出率差异有统计学意义 $P < 0.05$;肺结核患者与肺炎患者肺泡灌洗液荧光定量 PCR 阳性检出率差异有统计学意义 $P < 0.05$ 。

表 1 经支气管镜防污染刷检抗酸染色、支气管肺泡灌洗液荧光定量 PCR 及肺泡灌洗液结核菌培养对照

	抗酸染色		结核菌培养		TB DNA	
	肺结核(%)	肺炎(%)	肺结核(%)	肺炎(%)	肺结核(%)	肺炎(%)
阳性	41(21.9)	0	54(28.8)	0	147(78.6) ^a	0
阴性	146(78.1) ^a	41(100)	133(71.2) ^a	41(100)	40(21.4)	41(100)

a) $P < 0.05$

3 讨论

发现病原体是确定肺结核诊断和应用化疗方案的重要依据,常用的临床检查方法有涂片抗酸染色法和细菌培养法 2 种。涂片抗酸染色法方便简单但是敏感性低,特异性差,不能区分死菌和活菌,达到 5 000~10 000/ml 浓度才能得到阳性结果^[2]。且所有抗酸菌均着色,需进一步检查,细菌培养法敏感性高,准确性也高,但是需要时间长达 4~8 周。本研究利用对结核菌特异性引物和特异性荧光探针,配以 PCR 反应液耐热 DNA 聚合酶等成分,在体外扩增法检测结核分枝杆菌基因,避免因结核杆菌易受物理、化学、药物及免疫因素的影响而发生变异(细胞壁缺陷、耐药变异菌、持续休眠菌),用传统细菌学技术难以检出,或漏诊或假阴性。

荧光定量 PCR 技术将 PCR 扩增、荧光探针杂交及检测一体化,在单一管内完成,简化了操作步骤,消除了扩增引起污染的机会。其检测对象是结核杆菌基因保守区段,不受细胞表型和耐药性的影响,可提高阳性的检出率和工作效率,其灵敏度高,检测限度可达 10 个菌/ml,防污染、操作简便,只需 2~3 h 即可完成。具有敏感性高,准确性高。

从上述结果可知,荧光定量 PCR 法作为一种实验诊断技术,在特异性、敏感性方面都优于传统的涂片抗酸染色法、罗氏培养方法,具有更高的敏感性,该技术具有简便、快速、敏感性高、特异性强等优点,1~2 d 即可有检验报告,快速易行,是结核病早诊断、早发现的重要方法,尤其对涂片抗酸染色、结核

杆菌培养阴性的结核病更具有诊断价值^[3]。

荧光定量 PCR 检测肺泡灌洗液中结核杆菌 DNA 阳性率高可能与肺泡灌洗液进入远端气道及肺泡腔中,接触病灶范围广,收集量大,含菌量多,标本充分离心沉淀,灌洗刺激患者咳嗽,更有利于局部支气管分泌物的引流。结果表明,此方法诊断肺结核具有快速、特异、敏感的特点,是一种值得临床推广的方法^[4]。荧光定量 PCR 检出结核杆菌阳性率显著高于痰涂片抗酸染色和改良罗氏培养法,同时它还可反映抗结核治疗过程中痰标本中的结核杆菌的数量变化,对抗结核药物疗效有良好的监控效果^[5]。对肺部可疑结核病,而痰菌检查又是阴性的病人,可采用纤支镜肺泡灌洗液结核分枝杆菌 DNA 检测,以提高确诊率。

4 参考文献

- [1] 韩俊英,曾瑞萍. 荧光定量 PCR 技术及其应用[J]. 国外遗传学分册, 2000, 3(23): 117-120.
- [2] 张翊,卢建平. 四种结核分枝杆菌检测方法的临床应用评价[J]. 中国防痨杂志, 2006, 28(1): 16-17.
- [3] 辛茶香,刘珍琼,熊国亮. 荧光定量 PCR 技术检测结核分枝杆菌 DNA 的应用价值[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(3): 201.
- [4] 韩纪勤. 荧光定量聚合酶链反应诊断结核病临床应用研究[J]. 山西医科大学学报, 2006, 37(2): 180.
- [5] 邵俊斌,王占坤,郑智,倪卫琴. 实时荧光定量聚合酶链反应法检测痰结核杆菌 DNA 及其临床应用[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2003, 26(8): 490.

(收稿日期: 2010-07-27)

(本文编辑: 李树萍)

• 短篇论著 •

116 株结核分枝杆菌链霉素耐药菌株 *rspL* 和 *rrs* 基因突变特征研究

谢彤 李桂莲 巨韩芳 赵德福 赵慧 穆成 王擷秀

(天津市结核病控制中心 天津 300011)

链霉素为氨基糖苷类抗生素,主要作用于 16s RNA,干扰蛋白质的翻译,抑制蛋白质合成。已经