

· 论 著 ·

恒温微流控系统检测及鉴定结核分枝杆菌复合群
与非结核分枝杆菌的应用价值

王泉 马瑞瑛 杨婷 张亚丽 许苗 撒玉玲 陈清波

【摘要】 目的 评价恒温微流控系统检测分枝杆菌并鉴定结核分枝杆菌复合群(*Mycobacterium tuberculosis* complex, MTBC)与非结核分枝杆菌(nontuberculous mycobacteria, NTM)的应用价值。**方法** 收集新疆医科大学第八附属医院 2018 年 9 月至 2019 年 12 月间经抗酸染色镜检阳性的痰液标本,共 624 份。分别应用罗氏固体培养,对硝基苯甲酸(PNB)和噻吩-2-羧酸肼(TCH)生长试验,以及恒温微流控系统进行检测和菌种鉴定;以罗氏固体培养和 PNB/TCH 生长试验菌种鉴定结果为参照,评价恒温微流控系统检测分枝杆菌和鉴定菌种的效能。**结果** 624 份痰标本中,经罗氏固体培养法检测阳性 612 份(98.1%),恒温微流控系统检测阳性 607 份(97.3%),差异无统计学意义($\chi^2=0.021, P=0.950$)。以罗氏固体培养法检测结果作为参照标准,恒温微流控系统检测抗酸染色镜检阳性的痰液标本中分枝杆菌的敏感度和特异度分别为 99.2%(607/612)和 100.0%(12/12), *Kappa* 值为 0.82。以 PNB/TCH 生长试验结果作为参照标准,恒温微流控系统检测痰液标本中 MTBC 的敏感度和特异度分别为 99.6%(513/515)和 100.0%(97/97), *Kappa* 值为 0.99;恒温微流控系统检测痰液标本中 NTM 的敏感度和特异度分别为 96.9%(94/97)和 100.0%(515/515), *Kappa* 值为 0.98。**结论** 恒温微流控系统在以抗酸染色镜检阳性为诊断基础时,鉴定痰液标本中 MTBC 与 NTM 具有较好的性能。

【关键词】 分枝杆菌, 结核; 分枝杆菌, 非典型性; 核酸扩增技术; 诊断, 鉴别; 评价研究

Application value of thermostatic microfluidic system in detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex and nontuberculous mycobacteria WANG Quan, MA Rui-ying, YANG Ting, ZHANG Ya-li, XU Miao, SA Yu-ling, CHEN Qing-bo. Department of Laboratory Medicine, the Eighth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830049, China
Corresponding author: WANG Quan, Email: wangquan12666@163.com

【Abstract】 Objective To evaluate the application value of thermostatic microfluidic system in detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) and nontuberculous mycobacteria (NTM). **Methods** A total of 624 sputum specimens positive in acid-fast staining were collected from the Eighth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University from September 2018 to December 2019. Roche solid culture, p-nitrobenzoic acid (PNB) and thiophene-2-carboxylic acid hydrazine (TCH) growth test, and constant temperature microfluidic system were used for mycobacterial detection and strain identification; bacterial species identification results of Roche solid culture and PNB/TCH growth test were used as reference to evaluate the efficiency of the thermostatic microfluidic system in detecting mycobacteria and identifying bacterial species. **Results** Among 624 sputum samples, 612 (98.1%) were positive using Roche solid culture, and 607 (97.3%) were positive by thermostatic microfluidic system. The difference was not statistically significant ($\chi^2=0.021, P=0.950$). Using the results of Roche solid culture method as the standard, the sensitivity and specificity of the thermostatic microfluidic system for detecting mycobacteria in sputum samples with positive acid-fast staining were 99.2% (607/612) and 100.0% (12/12), respectively, the *Kappa* value was 0.82. Using the results of the PNB/TCH growth test as the standard, the sensitivity and specificity of the thermostatic microfluidic system for detecting MTBC in sputum samples were 99.6% (513/515) and 100.0% (97/97), respectively, and the *Kappa* value was 0.99; the sensitivity and specificity of the thermostatic microfluidic system for detecting NTM in sputum samples were 96.9% (94/97) and 100.0% (515/515), respectively, and the *Kappa* value was 0.98. **Conclusion** The



开放科学(资源服务)标识码(OSID)的开放科学计划以二维码为入口,提供丰富的线上扩展功能,包括作者对论文背景的语音介绍、该研究的附加说明、与读者的交互问答、拓展学术圈等。读者“扫一扫”此二维码即可获得上述增值服务。

doi:10.3969/j.issn.1000-6621.2021.08.012

作者单位:830049 乌鲁木齐,新疆医科大学第八附属医院检验科

通信作者:王泉,Email: wangquan12666@163.com

thermostatic microfluidic system has good performance in identifying MTBC and NTM in sputum specimens when based on acid-fast staining.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; Mycobacteria, atypical; Nucleic acid amplification techniques; Diagnosis, differential; Evaluation studies

结核分枝杆菌复合群(*Mycobacterium tuberculosis* complex, MTBC)与非结核分枝杆菌(nontuberculous mycobacteria, NTM)临床上引起的疾病难以区别,在无菌种鉴定情况下 NTM 病经常被误诊为结核病,而两者治疗方案明显不同^[1-2]。因此,快速准确地鉴定 MTBC 与 NTM 对结核病的早期诊断、早期治疗,以及对疾病防控均具有重要意义。传统的区分 MTBC 与 NTM 方法主要依靠培养法结合对硝基苯甲酸(PNB)和噻吩-2-羧酸肼(TCH)生长试验,但培养法耗时较长。恒温微流控芯片检测系统集等温扩增与产物检测一体化,具有操作简单、耗时短等优势;且其多样本和多重检测等功能可极大简化操作流程,降低了对实验人员要求,适于基层地区开展^[3-4]。笔者利用恒温微流控芯片技术检测痰液标本中 MTBC 与 NTM,并与分枝杆菌传统培养法和 PNB/TCH 生长试验进行对比,以评价其应用价值。

材料和方法

一、菌株来源

采用前瞻性研究方法,收集新疆医科大学第八附属医院 2018 年 9 月至 2019 年 12 月间经抗酸染色镜检阳性的痰液标本,共 624 份。

二、仪器和试剂

1. 仪器:恒温扩增微流控芯片核酸分析仪、MTB-NTM 微流控芯片由广州迪澳生物科技有限公司提供,设备可进行 4 块芯片反应,每块芯片可同时进行 4 份样本的 MTB 与 NTM 区分鉴定。

2. 试剂:萋-尼染色液、酸性改良罗氏培养基(珠海贝索生物技术有限公司);DNA 提取液(广州迪澳生物技术有限公司)。

三、实验方法

1. 罗氏固体培养和 PNB/TCH 生长试验菌种鉴定:将收集合格的 3 ml 痰液标本中加入 2 倍体积 4% 的氢氧化钠溶液后涡旋振荡混匀,静置 15 min。以无菌吸管吸取处理后的痰标本(约 1 ml)均匀接种至酸性改良罗氏培养基斜面上,每支培养基接种 2 滴(0.1~0.15 ml)。将接种后的培养基连同斜面培养架置于恒温培养箱内,(36±1)℃ 孵育。24 h 后再拧紧培养管螺旋盖放置于直立的培养架上,

(36±1)℃ 继续孵育。将 PNB 用二甲基甲酰胺溶解稀释后加入未凝固的改良罗氏培养基中,最终浓度控制在 0.5 mg/ml;TCH 用灭菌蒸馏水溶解,培养基中最终浓度为 5 μg/ml。PNB/TCH 生长试验按照《结核病实验室检验规程》进行。

2. 核酸模板提取:另取 1 ml 液化后痰标本加入离心管,10 000×g 离心 5 min,弃上清液,加入 100 μl 的 DNA 提取液,100℃ 加热 10 min 冷却至室温,10 000×g 离心 2 min,将上清液转移至新的离心管中备用。

3. 恒温微流控系统检测:分别针对分枝杆菌复合群(16S rRNA)及 MTBC(IS6110)特异性核酸片段设计恒温引物,并采用引物预包埋技术将其固定至微流控芯片。将提取上清液及恒温反应液 5 μl (按照每个反应腔室 0.2 μl 上清液及 2.3 μl 恒温反应液混合)均分至各反应腔,芯片置于核酸恒温分析仪中,63℃ 反应 45 min。采用实时荧光曲线对结果进行判读,当呈现“S”型扩增曲线时该反应腔室核酸检测结果为阳性,无“S”型扩增曲线则结果为阴性。若 16S rRNA 和 IS6110 检测结果均为阳性,则鉴定结果为 MTB;若 16S rRNA 检测结果为阳性,IS6110 检测结果为阴性,则鉴定为 NTM;若 16S rRNA 和 IS6110 检测结果均为阴性,则鉴定结果为非分枝杆菌。

4. 二代测序技术:对于微流控检测系统和 PNB 及 TCH 实验检测结果不一致的标本,将样本核酸交给深圳华大基因公司进行 DNA 序列测定,使用华大基因研制的专利产品试剂盒中的引物作为测序上下游引物,测序仪器型号为 BGISEQ-500。

四、统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。计数资料以“百分率(%)”表示,组间差异的比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。以罗氏固体培养和 PNB/TCH 生长试验菌种鉴定结果为参照,评价恒温微流控系统检测分枝杆菌和鉴定菌种的效能,各指标计算公式如下:敏感度=真阳性例数/(真阳性例数+假阴性例数)×100%;特异度=真阴性例数/(真阴性例数+假阳性例数)×100%;阳性预测值=真阳性例数/(真阳性例数+假阳性例数)×100%;阴性预测值=真阴性例数/(真阴性例数+假阴性例数)×100%;一致率=(真阳

性例数+真阴性例数)/总例数 $\times 100\%$ 。各方法间的一致性检验采用 *Kappa* 检验, *Kappa* 值 ≥ 0.75 , 说明一致性较好; $0.4 \leq Kappa$ 值 < 0.75 , 说明一致性一般; *Kappa* 值 < 0.4 , 说明一致性较差。

结 果

一、分枝杆菌检测结果

624 份痰标本中, 经罗氏固体培养法检测阳性 612 份(98.1%), 其中, 515 份(82.5%, 515/624)经 PNB/TCH 生长试验菌种鉴定为 MTB, 97 份(15.5%, 97/624)鉴定为 NTM。恒温微流控系统检测阳性 607 份(97.3%), 其中, 513 份(82.2%, 513/624)鉴定为 MTB, 94 份(15.1%)鉴定为 NTM。恒温微流控系统和传统培养法分枝杆菌阳

性检出率比较, 差异无统计学意义($\chi^2=0.021, P=0.950$)。

二、检测效能分析

以罗氏固体培养法检测结果作为参照标准, 恒温微流控系统检测抗酸染色镜检阳性的痰液标本中分枝杆菌的敏感度和特异度分别为 99.2% (607/612) 和 100.0% (12/12), *Kappa* 值为 0.82, 见表 1。

以 PNB/TCH 生长试验结果作为参照标准, 恒温微流控系统检测痰液标本中 MTBC 的敏感度和特异度分别为 99.6% 和 100.0%, *Kappa* 值为 0.99, 见表 2。恒温微流控系统检测痰液标本中 NTM 的敏感度和特异度分别为 96.9% 和 100.0%, *Kappa* 值为 0.98, 见表 3。

表 1 恒温微流控系统以痰培养结果为参照标准检测痰液标本分枝杆菌的效能

恒温微流控系统	罗氏固体培养(份)		敏感度 (%)	特异度 (%)	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)	一致率 (%)	<i>Kappa</i> 值
	阳性	阴性						
阳性	607	0	99.2	100.0	100.0	70.6	99.2	0.82
阴性	5	12						
合计	612	12						

注 敏感度=真阳性例数/(真阳性例数+假阴性例数) $\times 100\%$; 特异度=真阴性例数/(真阴性例数+假阳性例数) $\times 100\%$; 阳性预测值=真阳性例数/(真阳性例数+假阳性例数) $\times 100\%$; 阴性预测值=真阴性例数/(真阴性例数+假阴性例数) $\times 100\%$; 一致率=(真阳性例数+真阴性例数)/总例数 $\times 100\%$

表 2 恒温微流控系统以 PNB/TCH 生长试验鉴定结果为参照标准检测 MTBC 的效能

恒温微流控系统	PNB/TCH 生长试验(份)		敏感度 (%)	特异度 (%)	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)	一致率 (%)	<i>Kappa</i> 值
	MTBC	非 MTBC						
MTBC	513	0	99.6	100.0	100.0	98.0	99.7	0.99
非 MTBC	2	97						
合计	515	97						

注 PNB: 对硝基苯甲酸; TCH: 噻吩-2-羧酸肼; MTBC: 结核分枝杆菌复合群; 敏感度=真阳性例数/(真阳性例数+假阴性例数) $\times 100\%$; 特异度=真阴性例数/(真阴性例数+假阳性例数) $\times 100\%$; 阳性预测值=真阳性例数/(真阳性例数+假阳性例数) $\times 100\%$; 阴性预测值=真阴性例数/(真阴性例数+假阴性例数) $\times 100\%$; 一致率=(真阳性例数+真阴性例数)/总例数 $\times 100\%$

表 3 恒温微流控系统以 PNB/TCH 生长试验鉴定结果为参照标准检测 NTM 的效能

恒温微流控系统	PNB/TCH 生长试验(份)		敏感度 (%)	特异度 (%)	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)	一致率 (%)	<i>Kappa</i> 值
	NTM	非 NTM						
NTM	94	0	96.9	100.0	100.0	99.4	99.5	0.98
非 NTM	3	515						
合计	97	515						

注 PNB: 对硝基苯甲酸; TCH: 噻吩-2-羧酸肼; NTM: 非结核分枝杆菌; 敏感度=真阳性例数/(真阳性例数+假阴性例数) $\times 100\%$; 特异度=真阴性例数/(真阴性例数+假阳性例数) $\times 100\%$; 阳性预测值=真阳性例数/(真阳性例数+假阳性例数) $\times 100\%$; 阴性预测值=真阴性例数/(真阴性例数+假阴性例数) $\times 100\%$; 一致率=(真阳性例数+真阴性例数)/总例数 $\times 100\%$

三、方法间差异性分析

5 份分枝杆菌培养阳性而恒温微流控系统检测为阴性的标本,经 PNB/TCH 生长试验鉴定,2 份为 MTBC,3 份为 NTM。经测序,2 份 MTBC 标本得到确证;3 份 NTM 标本中 1 份为偶发分枝杆菌,2 份为诺卡菌。

讨 论

传统的 MTBC 与 NTM 的区分采用培养法结合 PNB/TCH 生长试验,耗时较长(约 2~6 周)^[5]。恒温微流控系统可实现对 4 份标本多指标同时检测,从进样到结果判读仅需 1 h,同传统方法相比有效缩短了检测和鉴定时间。另外,反应在恒温条件下即可进行,对设备的要求相对较低;蝶式微流控芯片使用普通聚乙烯材料制作,采用离心进样方式可有效降低检测成本,进一步降低了患者的医疗负担,适合于现场和基层单位应用。

本研究利用基于核酸等温扩增技术开发的微流控芯片与设备对 624 份抗酸染色镜检阳性的痰液标本进行检测,同时采用罗氏固体培养法和 PNB/TCH 生长试验菌种鉴定进行对比,探讨该技术检测分枝杆菌和鉴定 MTBC 与 NTM 的应用价值。研究发现,培养法分枝杆菌阳性检出率为 98.1%,恒温微流控系统阳性检出率为 97.3%,差异无统计学意义。以改良罗氏固体培养法结果为参照,恒温微流控系统检测分枝杆菌具有较高的敏感度(99.2%)和特异度(100.0%),能直接区分分枝杆菌与其他呼吸道致病菌感染; $Kappa$ 值为 0.82,表明该方法与培养法检测结果一致性较好,具有较高的检测效能,适用于临床标本分枝杆菌感染初筛。王桂荣等^[6]利用多重 PCR 技术检测 MTB 和 NTM 临床分离株的敏感度分别为 99.36% 和 98.00%;特异度分别为 99.32% 和 98.00%。可见,该方法具有较高的检测敏感度和特异度,但其结果判读采用琼脂糖凝胶电泳,导致其临床应用价值较低。张洁等^[7]研究显示,与传统培养法和菌种鉴定方法相比,实时荧光 PCR 检测 MTBC 的敏感度为 99.0%,检测 NTM 的敏感度为 75.4%,总符合率为 99.0%。本研究显示,以 PNB/TCH 生长试验菌种鉴定结果为参照,恒温微流控系统鉴定 MTBC 与 NTM 的敏感度分别为 99.6% 和 96.9%, $Kappa$ 值分别为 0.99 与 0.98,说明以核酸扩增为基础的恒温微流控系统适用于痰

液标本中 MTBC 与 NTM 的鉴定。

此外,本研究中有 5 份分枝杆菌培养阳性而恒温微流控系统检测为阴性的标本,测序结果显示 2 份为 MTB,1 份为偶发分枝杆菌。恒温微流控系统检测为阴性的原因是当痰标本中分枝杆菌分布较为集中时,分配给待考评检测体系的标本可能不含菌或含菌量低于或接近待反应体系的最低检出限,导致其结果为阴性。2 份标本经 PNB/TCH 生长试验鉴定为 NTM,而测序结果为诺卡菌,可能是培养过程中污染所致。王建等^[5]对 2175 株分枝杆菌进行 PNB/TCH 生长试验,初步鉴定的 93 株 NTM 有 14 株为假阳性,与本研究的现象类似。这说明以培养法为参照标准在鉴定 NTM 时存在一定不足,以核酸检测为基础的筛查结果相对可靠。

综上所述,本研究结果证实,恒温微流控系统在以抗酸染色镜检阳性为诊断基础时,鉴定痰液标本中 MTBC 与 NTM 具有较好的性能。这为该方法的普及提供了有力的证据。当然,本研究也存在一定的不足:(1)无法对菌株耐药情况进行检测;(2)NTM 因菌种差异而导致临床用药也不相同,本检测系统无法对 NTM 临床分离株进行菌种鉴定。

参 考 文 献

- [1] 中华医学会结核病学分会,《中华结核和呼吸杂志》编辑委员会. 非结核分枝杆菌病诊断与治疗专家共识. 中华结核和呼吸杂志, 2012, 35(8): 572-580. doi: 10. 3760/cma. j. issn. 1001-0939. 2012. 08. 006.
- [2] 唐神结, 朱友生, 张青. 非结核分枝杆菌肺病治疗面临的难点与困惑. 中华结核和呼吸杂志, 2012, 35(8): 566-568. doi: 10. 3760/cma. j. issn. 1001-0939. 2012. 08. 004.
- [3] Zhang L, Tian F, Liu C, et al. Hand-powered centrifugal microfluidic platform inspired by the spinning top for sample-to-answer diagnostics of nucleic acids. Lab Chip, 2018, 18(4): 610-619. doi: 10. 1039/c7lc01234a.
- [4] 何祥鹏, 邹秉杰, 齐谢敏, 等. 基于核酸等温扩增的病原微生物微流控检测技术. 遗传, 2019, 41(7): 611-624. doi: 10. 16288/j. ycz. 19-051.
- [5] 王建, 胡立珍, 张国翠, 等. PNB/TCH 生长试验和 DNA 微阵列基因芯片鉴定非结核分枝杆菌的价值比较. 医学信息, 2019, 32(20): 170-171. doi: 10. 3969/j. issn. 1006-1959. 2019. 20. 054.
- [6] 王桂荣, 付育红, 梁倩, 等. 应用多重 PCR 方法快速鉴定结核分枝杆菌复合群与非结核分枝杆菌的研究. 中国防痨杂志, 2013, 35(9): 686-689.
- [7] 张洁, 邢青, 王魁民, 等. 传统培养法与 PCR-荧光探针法鉴定分枝杆菌的对比研究. 中国防痨杂志, 2015, 37(3): 291-294. doi: 10. 3969/j. issn. 1000-6621. 2015. 03. 014.

(收稿日期: 2021-05-07)

(本文编辑: 李敬文)