

基因芯片技术在快速诊断肺结核中的应用价值

何 珍, 王 璞

摘要:目的 评价基因芯片技术在快速诊断肺结核中的应用价值。方法 收集 648 例疑似肺结核患者的体液标本, 同时使用基因芯片法、改良罗氏培养法、液基夹层杯涂片法进行结核分枝杆菌检测, 并对结果进行比较分析。结果 3 种方法检测阳性率依次为芯片法(58.30%)、培养法(51.40%)、夹层杯法(36.70%)。用不同方法检测胸水 MTB 的阳性率由高到低依次为芯片法 31.1%、培养法 27%、夹层杯法 13.5%。芯片法高于夹层杯法, 差异具有统计学意义($\chi^2 = 6.591, P < 0.05$); 芯片法阳性率高于培养法, 但差异不具有统计学意义($\chi^2 = 0.295, P > 0.05$)。结论 基因芯片法检测结核分枝杆菌阳性率高, 与改良罗氏培养法一致性好, 可作为快速诊断肺结核的有效手段; 采用基因芯片法检测胸水标本, 阳性率较高, 且耗时短、准确性高, 可为快速诊断结核性胸膜炎提供依据。

关键词: 基因芯片技术; 肺结核; 诊断; 支气管肺泡灌洗液; 胸水

中图分类号: R521

文献标识码: A

文章编号: 1002-2694(2019)06-0498-04

Clinical application value of gene chip in the diagnosis of tuberculosis

HE Zhen, WANG Pu

(The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: To evaluate the value of gene chip technology in the rapid diagnosis of tuberculosis. We collected 648 samples of patients with suspected pulmonary tuberculosis, and used the gene chip method, modified Roche culture method, liquid-based sandwich cup smear method for *Mycobacterium tuberculosis* detection, and the results were compared and analyzed. The results show that the positive rate of gene chip detection is high, and it has good consistency with modified Roche culture, and can be used as an effective means for rapid diagnosis of tuberculosis. The gene chip method is used to detect pleural effusion specimens with high positive rate, short time-consuming and high accuracy, can provide a basis for rapid diagnosis of tuberculous pleurisy.

Keywords: gene chip technique; tuberculosis; diagnosis; bronchoalveolar lavage fluid; pleural effusion

Corresponding author: Wang pu, Email: miss miao@163.com

2016 年, 全球估计有 170 万患者死于结核病, 约有新发结核病例 1 040 万, 其中半数集中在中国、印度等 5 个国家^[1]。早期、快速、准确诊断结核, 是结核防治的关键。

结核病的确诊主要依靠病原学, 传统病原学检测以抗酸染色及培养为主。抗酸染色简便、价廉, 是目前使用最广的结核诊断方法, 但阳性率不高, 多在 9.8%~35.5%^[2-3], 且无法鉴别结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 与非结核分枝杆菌。本研究采用液基夹层杯涂片法检测 MTB, 与直接抗酸染色相比, 标本经消化、离心、浓缩等处理后,

阳性率可提高至 23.5%~66.67%^[3-7]。MTB 培养是诊断活动性肺结核的“金标准”, 但周期长, 罗氏培养至少需 4~8 周^[8], 液体培养如 BACTEC-MGIT 960 系统虽耗时更短, 仍需 1~2 周^[9-10], 均难以满足临床需求, 新的诊断技术亦应运而生。近年来, 基因芯片技术逐渐广泛应用于结核诊断, 有研究报道基因芯片法诊断 MTB 的敏感性为 82.3%~99.5%, 特异度可达 100%^[11-13]。

本研究对 648 例疑似肺结核患者的临床标本同时采用基因芯片法、改良罗氏培养法、液基夹层杯涂片法(以下分别简称“芯片法”、“培养法”、“夹层杯法”)进行 MTB 检测, 通过对 3 种方法的阳性率、敏感性、特异度等指标进行比较, 评价基因芯片技术在快速诊断肺结核中的应用价值。

通讯作者: 王 璞, Email: miss miao@163.com;

ORCID: 0000-0001-7113-9745

作者单位: 重庆医科大学附属第一医院, 重庆 400016

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 研究对象 2016 年 2 月—2017 年 9 月重庆医科大学附属第一医院呼吸科住院的疑似肺结核患者 648 例,其中男性 409 例,女 239 例,年龄 14~95 岁,平均 50±18.5 岁。所有患者均进行胸部影像学检查,同时留取体液标本,包括痰 331 例、支气管肺泡灌洗液(Bronchoalveolar lavage fluid, BALF)243 例、胸水 74 例,同时送检芯片法、培养法及夹层杯法检测 MTB。

1.1.2 诊断标准及筛选结果 肺结核诊断标准参照《肺结核诊断标准 WS288-2008》^[14],非结核的其他肺部疾病诊断参照《临床诊疗指南-呼吸病学分册》^[15]。648 例患者,最终有 435 例诊断为肺结核,213 例为非结核病(肺癌 106 例,社区获得性肺炎 48 例,肺脓肿 32 例,支气管扩张伴感染 27 例)。

1.1.3 主要实验仪器及试剂 夹层杯 II,载玻片、自动离心涂片机、快速干片机、染色液,均购买于湖南天气医学新技术有限公司;改良罗氏培养基(中性)由贝索公司提供;普通 PCR 扩增仪,高速离心机,核酸提取仪,SlideWasherTM 芯片洗干仪,BioMixerTMII 芯片杂交仪。LuxScanTM10K/B 微阵列芯片扫描仪、晶芯分枝杆菌菌种鉴定试剂盒以及试剂购于博奥生物有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 液基夹层杯涂片 取痰标本 3~5 mL、胸水和 BALF 标本 10~20 mL 于夹层杯 II,进行消化、震荡、离心、烘干;加入染色剂,以 60 ℃左右染色 5 min,冲洗、沥干;脱色;再次加入染色剂染色 1~3 min,洗净、沥干。取出封片、镜检。读片参照《肺结核诊断标准 WS288-2008》^[14]。

1.2.2 改良罗氏培养 痰标本 3~5 mL 进行消化、离心、浓缩;胸水和 BALF 标本 10~20 mL 以 3 000 g 离心、浓缩,均匀接种于培养基。将培养基水平置于 37 ℃培养箱 24 h 后改竖立放置;于第 3 d、7 d 观察细菌生长情况,以后每周观察 1 次,连续 8 周。报告标准参照《肺结核诊断标准 WS288-2008》^[14]。

1.2.3 基因芯片检测 标本内加入消化液,涡旋震荡 2 min,室温液化 60 min 后离心。取 1 mL 液化后标本于 1.5 mL EP 离心管内,于沉淀内加入 50~80 μL 核酸提取液,并转移到核酸提取管内震荡 5 min,后 95 ℃金属浴 5 min,10 000 r/min 离心 1 min,提取核酸备用。将模板 DNA 和对照品 2 μL 分别加入 PCR 管行 PCR 扩增;将 PCR 产物在 95

℃下变性 5 min、骤冷冰浴。以 9 μL 杂交缓冲液、6 μL PCR 产物的比例制备杂交混合物。取混合物 13.5 μL 加入芯片并密封杂交盒;放入芯片杂交仪以 50 ℃、5 r/min 杂交 2 h。洗涤、甩干,于芯片扫描仪判读结果。

结果判读:在质控探针信号正常的情况下,若某一探针信噪比 ≥ 3 ,且其信号值 \geq 其对应的临界值,则该探针结果为阳性;否则为阴性。菌种鉴定结果根据探针阴阳性结果判断,若只有 1 条探针为阳性结果,则表示待测样品为该探针所对应的分枝杆菌种或群;若有 1 条以上探针为阳性结果,则通过组合来确定待测样品所对应的分枝杆菌种或群。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,用 *Kappa* 检验对不同方法检测结果的一致性进行评价,即 $Kappa \geq 0.75$,两者一致性好; $0.75 > Kappa \geq 0.4$,两者一致性中等; $Kappa < 0.4$,两者一致性较低。所有结果均采用 χ^2 检验进行差异性分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 3 种方法的阳性率 芯片法最高(58.30%),其次为培养法(51.40%),夹层杯法最低(36.70%)(见表 1)。

表 1 3 种检测方法的阳性检出来

Tab.1 Positive rates of the 3 detection method

方法	总 数 (例)	阳性数 (例)	阳性率 (%)	χ^2	<i>P</i> 值
芯片法	648	378	58.30	6.31	0.012 ^a
培养法	648	333	51.40	28.25	<0.05 ^b
夹层杯法	648	238	36.70	60.64	<0.05 ^c

注:a 对比芯片法、培养法; b 对比培养法与夹层杯法; c 对比芯片法与夹层杯法。

2.2 3 种方法的敏感度和特异度 以培养法为金标准,芯片法的敏感度、阳性预测值以及与培养法结果的一致性均高于夹层杯法,特异度较夹层杯法稍低(见表 2)。

2.3 与临床诊断的比较 以临床诊断为金标准,在非结核患者中,3 种方法均无阳性结果,故特异度为 100%,误诊率为 0;芯片法与临床诊断一致性较好;培养法一致性一般;夹层杯法一致性较低。芯片法敏感度高,漏诊率低,特异度好,结果具有较高的准确性,见表 3。

表 2 芯片法及夹层杯法检测结果与培养法的对比分析

Tab.2 Comparative analysis of results from the gene chip technique and Liquid-based interlayer vessel technique and Roche culture results

方法	培养法		敏感度/%	特异度/%	符合率/%	PPV/%	NPV/%	Kappa	P 值
	+	-							
芯片法	+	318	95.5	81	88.43	84.13	94.44	0.767	<0.05
	-	15							
夹层杯法	+	217	65.2	93.3	78.86	91.18	71.7	0.623	<0.05
	-	116							

注:PPV 是阳性预测值;NPV 是阴性预测值。

表 3 3 种方法检测结果与临床诊断的对比分析

Tab.3 Comparison of test results and clinical diagnosis of the 3 methods

方法	临床诊断		敏感度/%	特异度/%	误诊率/%	漏诊率/%	符合率/%	Kappa	P 值
	+	-							
芯片法	+	378	86.90	100	0	13.10	91.20	0.813	<0.01
	-	57							
培养法	+	333	76.60	100	0	23.40	84.30	0.682	<0.01
	-	102							
夹层杯法	+	238	54.70	100	0	45.30	69.60	0.443	<0.01
	-	197							

2.4 不同标本的阳性率 3 种标本使用芯片法检测,阳性率最高为 BALF 72.0%(175/243),其次为痰 54.4%(180/331),胸水最低 31.1%(23/74);使用培养法阳性率由高到低依次为 BALF 62.6%(152/243),痰 48.6%(161/331),胸水 27%(20/74);夹层杯法阳性率为 BALF 51.8%(126/243),痰 30.8%(102/331),胸水 13.5%(10/74)。差异均具有统计学意义(见图 4)。

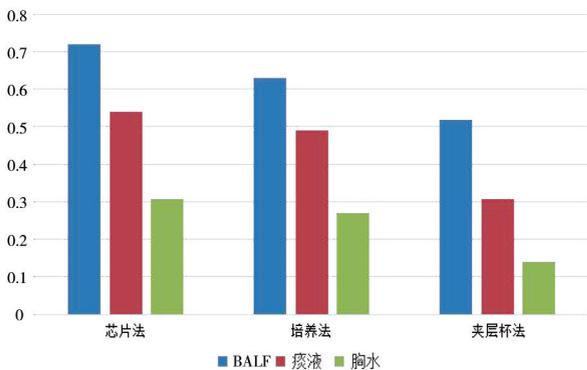


图 4 不同标本的阳性率对比分析

Fig.4 Comparison of positive rates of different specimens

2.5 胸水用不同方法检测 MTB 的阳性率 使用芯片法、培养法、夹层杯法检测胸水 MTB,阳性率依

次为 31.1%(23/74)、27%(20/74)、13.5%(10/74)。芯片法高于夹层杯法,差异具有统计学意义($\chi^2 = 6.591, P < 0.05$);芯片法阳性率高于培养法,但差异不具有统计学意义($\chi^2 = 0.295, P > 0.05$)(见表 5)。

表 5 胸水使用不同检测方法阳性检出率比较

Tab.5 Comparison of positive rates of pleural effusion using different detection methods

	阳性率/%	χ^2 值	P 值
芯片法	31.10(23/74)	0.295	0.587 ^a
培养法	27(20/74)	4.181	<0.05 ^b
夹层杯法	13.51(10/74)	6.591	<0.05 ^c

注:a 对比芯片法与培养法; b 对比培养法与夹层杯法; c 对比芯片法与夹层杯法。

3 讨论

基因芯片通过检测固定于特殊载体上的多种探针与待测样本核酸的杂交信号强度而获取样本信息^[16]。由于 MTB 的 16S rRNA 和 *rpoB* 基因是具有种属特异性的高度保守序列,故可直接将分枝杆菌鉴定到种^[17]。该方法具有高通量、高效快捷(6

h)、灵敏度高、自动化等优势^[18]。2017 年 11 月新发布的肺结核诊断标准^[19]已增加分子生物学结果作为确诊依据。本研究所使用的基因芯片能够检测出结核分枝杆菌(MTB)及包括鸟分枝杆菌、戈登分枝杆菌、胞内分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌等在内的常见的 16 个种、群的 NTM,快速进行分枝杆菌菌种鉴定,为迅速诊断肺结核提供依据。

3 种方法检测 MTB,以芯片法的阳性率最高(58.3%),其次为培养法(51.4%),夹层杯法最低(36.7%);其中,芯片法阳性而培养阴性的患者共 60 例,这些患者均符合肺结核诊断标准^[14],且抗结核治疗后随访症状好转和(或)病灶吸收。其芯片法阳性而培养阴性的原因,可能与标本类型有关。该 60 例标本中,以 BALF 和痰为主(31 例 BALF、21 例痰、8 例胸水),且芯片法灵敏度高(1×10^3 个菌/反应),故芯片法阳性而罗氏培养阴性。

以培养法为标准,芯片法灵敏度(95.5%)、阴性预测值(94.44%)以及一致性均显著高于夹层杯法(65.2%、71.7%);但特异度(81%)较夹层杯法(93.3%)低,分析其原因,可能与基因芯片法能够进一步将分枝杆菌鉴定到种,区分 NTM 和 MTB 有关。

BALF、痰、胸水标本用同时使用 3 种方法检测 MTB,阳性率由高到低依次均为 BALF、痰、胸水。提示 MTB 检出率与标本类型有关。

BALF 直接取自病变支气管内或靠近病变区域,且检查等机械刺激后,标本获得 MTB 的机会增大,故阳性率高。常占平^[20]等发现 BALF 快速培养阳性率(83.6%)显著高于纤支镜术后痰培养(57.2%)。尤其对于痰少、病灶局限、引流支气管欠通畅、非活动性肺结核患者,使用 BALF 检测 MTB 优势明显^[21]。

痰 MTB 检测阳性率不高,且易受到多种因素的干扰,标本质量、涂片技术以及读片准确性等都可影响痰检结果。宋红焕^[5]报道,脓性痰的阳性率(47.5%)高于非脓性痰(13.5%)。而增加送检标本数可提高阳性检出率^[22]。

胸水是胸膜对 MTB 抗原的免疫反应所产生的,故 MTB 含量极少,加上胸水的稀释、取材、送检等影响,其涂片、培养阳性率均不高^[23],导致结核性胸膜炎确诊困难。其直接涂片阳性率在 10%左右^[24],培养阳性率也仅 15.9%~36.6%^[25-26]。本研究同时上述 3 种方法检测胸水 MTB,阳性率依次为芯片法(31.1%)、培养法(27%)、夹层杯法(13.51%)。

芯片法高于夹层杯法,差异有统计学意义;芯片法与培养法相比,虽然差异不具有统计学意义,但芯片法耗时(6 h)显著低于培养法(4~8 周),且具准确率高、污染率低、生物安全性高等优势,能够早期、快速、准确诊断结核性胸膜炎。因此,建议考虑诊断结核性胸膜炎,送检胸水行 MTB 检测时,可优先选择或同时送检基因芯片法检测,以辅助诊断。

综上所述,基因芯片技术诊断肺结核的敏感度高、特异度好,准确性高,其对于胸水 MTB 检测的阳性率并不低于培养法,且耗时显著缩短,并能将分枝杆菌鉴定到种。能够为早期、快速、准确诊断肺结核提供重要依据,具有良好的应用前景。此方法还可作为结核治疗效果评价的指标,但尚需进一步的临床试验证实。

利益冲突:无

引用本文格式:何 珍,王 璞. 基因芯片技术在快速诊断肺结核中的应用价值[J]. 中国人兽共患病学报, 2019, 35(6): 498-501, 508. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2019.00.073

参考文献:

- [1] World Health Organization. 2017 global Tuberculosis report: executive summary [R]. Geneva: World Health Organization, 2017:1
- [2] 顾小红,蒋汉茂,肖湘英,等.液基夹层杯检测结核杆菌的应用价值[J].实用预防医学,2013,1(20):92-93. DOI:10.3969/j.issn.1006-3110.2013.01.035
- [3] 王成勇,李益荣.3479 例肺结核病人痰标本抗酸杆菌检查结果分析[J].临床肺科杂志,2004,9(6):605-606. DOI:10.3969/j.issn.1009-6663.2004.06.012
- [4] 王淑侠,刘成永,回家微,等.夹层杯离心涂片集菌法快速检测抗酸杆菌临床应用的初步观察[J].中国防痨杂志,2011,31(9):353-359.
- [5] 宋红焕,季明,唐国锋,等.液基夹层杯技术用于基层实验室结核病诊断的可行性研究[J].中国防痨杂志,2012,34(7):441-444.
- [6] 谭玲玲,张秀峰,何振华,等.液基夹层杯法对支气管结核的诊断意义[J].社区医学杂志,2011,9(2):17-18.
- [7] 杨华林,谭云洪,白丽琼,等.液基夹层杯技术检测抗酸杆菌应用型研究[J].中国防痨杂志,2010,32(5):279-282.
- [8] 张娟,蒋俊,张红,等.MGIT960 与罗氏培养法在结核分枝杆菌培养及药敏试验中的比对分析[J].中国防痨杂志,2011,33(6):361-365.
- [9] Cruciani M, Scarparo C, Malena M, et al. Meta analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without solid media, for detection of *mycobacteria* [J]. J Clin Microbiol, 2004,42(5):2321-2325.