

环介导等温扩增技术、痰涂片镜检法及固体培养法诊断肺结核病的临床价值

龙璠 张湘

(四川省南充市第五人民医院检验科 南充 637100)

摘要:目的:探讨环介导等温扩增技术、痰涂片镜检法及固体培养法诊断肺结核病的临床价值。方法:选择 2019 年 4 月~2020 年 4 月期间就诊的 182 例初诊有肺结核可疑症状患者作为研究对象,所有入选者均提供 1 份痰标本,分别采用痰涂片镜检法、固体培养法及环介导等温扩增技术检测。分析环介导等温扩增技术、痰涂片镜检法及固体培养法在肺结核病中的诊断效能,计算灵敏度、特异度、准确度、阳性预测值及阴性预测值。结果:环介导等温扩增技术灵敏度、特异度、准确度、阳性预测值、阴性预测值均高于痰涂片镜检法,其灵敏度、准确度、阴性预测值也均高于固体培养法,差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论:肺结核病诊断中环介导等温扩增技术诊断价值较高,利于临床提高肺结核病的诊断准确率,在结核病防治机构中具有较好的应用前景。

关键词:肺结核病;环介导等温扩增技术;痰涂片镜检法;固体培养法

The Clinical Value of Loop-mediated Isothermal Amplification Technique, Sputum Smear Microscopy and Solid Culture Method in Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis

LONG Fan, ZHANG Xiang

(Department of Laboratory, The Fifth People's Hospital of Nanchong City, Nanchong Sichuan 637100)

Abstract: Objective: To explore the clinical value of loop-mediated isothermal amplification technique, sputum smear microscopy and solid culture method in diagnosis of pulmonary tuberculosis. Methods: From April 2019 to April 2020, 182 newly diagnosed patients with suspected symptoms of pulmonary tuberculosis were selected as the research objects. All patients were provided with a sputum sample, which was detected by loop-mediated isothermal amplification technique, sputum smear microscopy and solid culture method. Analyzed the diagnostic efficacy of loop-mediated isothermal amplification technique, sputum smear microscopy and solid culture method in pulmonary tuberculosis, and calculated the sensitivity, specificity, accuracy, positive predictive value and negative predictive value of each method. Results: The sensitivity, specificity, accuracy, positive predictive value and negative predictive value of loop-mediated isothermal amplification technique were higher than those of sputum smear microscopy; and the sensitivity, accuracy and negative predictive value were also higher than those of solid culture method, the differences were statistically significant ($P<0.05$). Conclusion: In the diagnosis of tuberculosis, loop-mediated isothermal amplification technique has high diagnostic value, which is conducive to improve the accuracy of clinical diagnosis of pulmonary tuberculosis, and has a good application prospect in tuberculosis prevention and control institutions.

Key words: Pulmonary tuberculosis; Loop-mediated isothermal amplification technique; Sputum smear microscopy; Solid culture method

中图分类号:R521

文献标识码:B

doi:10.13638/j.issn.1671-4040.2021.06.004

结核病是一种慢性呼吸道传染性疾病,主要由结核分枝杆菌引起,对人类健康造成较大危害,为三大传染病之一。临床控制结核病传播的关键在于早诊断、早治疗,但临床缺乏快速、高效的诊断方法,既往常用的痰涂片染色镜检法诊断效能较低,对结核分枝杆菌与非结核分枝杆菌无法进行有效区分;培养法耗时长,不利于临床及时制定治疗方案^[1-2]。临床诊断方法多样,但均存在一定弊端,亟需寻找快速、简便、准确率高的诊断方法,使肺结核病患者能够尽早确诊、尽早治疗,控制病情传播。环介导等温扩增技术能够在恒温条件下扩增,初用于临床时优势突出,操作简单、特异性高,能够在短时间内获得诊断结果^[3]。鉴于此,本研究就环介导等温扩增技术、痰涂片镜检法及固体培养法诊断肺结核病的临床价值进行了分析。现报道如下:

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2019 年 4 月~2020 年 4 月期间于本院就诊的 182 例初诊有肺结核可疑症状患者,其中男 98 例,女 84 例;年龄 18~75 岁,平均 (46.31 ± 10.59) 岁。临床根据《肺结核诊断标准(WS288-2017)》^[4]将入选者分为肺结核病组($n=106$)与非肺结核病组($n=76$),所有入选者依从性均较好。

1.2 研究方法 所有入选者均提供 1 份痰标本,进行痰涂片镜检法、固体培养法及环介导等温扩增技术检测。痰涂片镜检法采用直接涂片抗酸染色显微镜检测痰标本^[5]。固体培养法:在痰标本中加入 4 倍体积的 4%氢氧化钠溶液,摇匀后静置,当痰标本液化充分后,采用无菌吸管取 3 滴分布于罗氏培养基斜面的上、中、下部,将培养基放入培养箱中,设置温度 37℃,之后每周观察 1 次,并记录观察结果^[6]。环

介导等温扩增技术：在痰标本中加入 2 倍体积的 4%氢氧化钠溶液，摇匀后静置，当痰标本液化充分后，取 1 ml 放入 1.5 ml 离心管，离心 10 min，速度为 1 300 r/min，去除上清液，沉淀加入 1 ml 生理盐水悬浮，采用 1 300 r/min 的速度离心 10 min，洗涤 2 次，仅保留沉淀物。之后将 40 μl 核酸提取液加入离心管中，摇匀，用超过 95℃的沸水浸泡 10 min，冷却至室温后离心 5 min，速度 1 300 r/min。取 20 μl 密封液与 23 μl 聚合酶放入 0.2 ml 反应管，反应体系数目根据检测样本数据进行准备，并设置阳性、阴性对照，再在恒温扩增荧光检测仪上放置反应管，仪器将自动判断结果。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成，在 ABI PRISM 377DNA 自动测序仪上对扩增产物进行测序，使用直接测序法，测序结果在 NCBI 网站进行比对分析。

1.3 观察指标 以临床诊断结果为参考，分析环介导等温扩增技术、痰涂片镜检法及固体培养法在肺结核病中的诊断效能，计算灵敏度、特异度、准确度、阳性预测值及阴性预测值。临床诊断结果为肺结核，痰涂片镜检法、固体培养法及环介导等温扩增技术也检出阳性的即为真阳性；若临床诊断结果为非肺结核，各方法检出的阳性即为假阳性。以 n 表示总例数，a 表示真阳性，b 表示假阳性，c 表示假阴性，d 表示真阴性。准确度 = (a+d)/n× 100%；灵敏度 = a/(a+c)× 100%；特异度 = d/(b+d)× 100%；阳性预测值 = a/(a+b)× 100%，阴性预测值 = d/(d+c)× 100%。

1.4 统计学处理 数据处理采用 SPSS22.0 统计学软件，计数资料以%表示，采用 χ² 检验，计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，采用 t 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

环介导等温扩增技术灵敏度、准确度、特异度、阳性预测值、阴性预测值均高于痰涂片镜检法，环介导等温扩增技术灵敏度、准确度、阴性预测值均高于固体培养法，差异均有统计学意义(P<0.05)。见表 1~ 表 4。

表 1 痰涂片镜检法诊断结果(例)

痰涂片镜检法	阳性	阴性	合计
阳性	49	34	83
阴性	57	42	99
合计	106	76	182

表 2 固体培养法诊断结果(例)

固体培养法	阳性	阴性	合计
阳性	62	10	72
阴性	44	66	110
合计	106	76	182

表 3 环介导等温扩增技术诊断结果(例)

环介导等温扩增技术	阳性	阴性	合计
阳性	87	10	97
阴性	19	66	85
合计	106	76	182

表 4 痰涂片镜检法、固体培养法及环介导等温扩增技术诊断效能对比[例(%)]

诊断方法	灵敏度	特异度	准确度	阳性预测值	阴性预测值
痰涂片镜检法	49(46.23)	42(55.26)	91(50.00)	49(59.04)	42(42.42)
固体培养法	62(58.49)	66(86.84)	128(70.33)	62(86.11)	66(60.00)
环介导等温扩增技术	87(82.08)	66(86.84)	153(84.07)	87(89.69)	66(77.65)

3 讨论

当前临床诊断肺结核病主要还是依赖结核杆菌培养与涂片抗酸染色，结核杆菌涂片法检出率通常为 40%左右，诊断效能较差，结核杆菌培养检出率虽较涂片法更高，但其耗时较长，在早期诊断中效果较差^[7]。传统的诊断方法均存在一定弊端，已无法满足临床对于诊断肺结核病的时效需求，需寻找其他更为理想的诊断方法^[8]。

本研究结果显示，环介导等温扩增技术灵敏度、准确度、特异度、阳性预测值、阴性预测值均高于痰涂片镜检法，灵敏度、准确度、阴性预测值也均高于固体培养法，表明肺结核病诊断中环介导等温扩增技术诊断价值较高，利于患者早诊断、早治疗，在结核病防治机构中应用前景较佳。痰涂片镜检法主要是依赖检验人员的识别能力从形态学进行鉴别，但菌体在个体发育中以多种形态存在，极易出现误诊、漏诊，诊断敏感度较低；固体培养法在进行处理时会对标本中 50%~80%的结核菌活性造成损伤，以致阳性检出率较低^[9]。环介导等温扩增技术对仪器设备要求不高，不需要用复杂、昂贵的检测设备，能够快速检出结核杆菌，在 1 h 内即可获得结果^[10]。该项技术操作简单，在 1 个装置中就能完成所有反应，且反应装置为封闭状态可减少污染。环介导等温扩增技术针对结核分枝杆菌设置不同的引物，利用链置换反应，大量扩增目标 DNA，扩增效率较高^[11]。环介导等温扩增技术虽具有方便、快捷等突出优势，但在临床操作时仍需注意以下几点：因该项技术对设备要求不高，基层医院可进行相关检测，但需注意对工作人员的培训，以确保操作过程不要出现差错；该项技术实验过程中需进行阴性、阳性对照，为节约成本，应在每日痰标本>10 份的实验室中开展^[12]。

参考文献

[1]林永通,麦世康.GeneXpert Mtb/RIF 检测技术在结核病诊断中的应用评价[J].中国热带医学,2018,18(1):93-95.
[2]Tanniru S,Asha S,Jojula M.Spoligotyping for identification of pulmonary tuberculosis with type 2 diabetes mellitus profiles in warangal, T.S[J].Anti-Infective Agents,2018,16(下转第 99 页)

2.2 两组 FOGQ、MMSE 评分对比 治疗前两组 FOGQ、MMSE 评分比较无显著性差异 ($P>0.05$); 治疗后观察组 FOGQ 评分低于对照组, MMSE 评分高于对照组 ($P<0.05$)。见表 2。

表 2 两组 FOGQ、MMSE 评分对比(分, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	FOGQ		MMSE	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
观察组	42	16.49± 3.72	6.65± 3.26*	19.58± 2.87	25.03± 2.26*
对照组	42	16.81± 4.03	10.08± 3.51*	19.91± 3.12	22.71± 2.43*
t		0.378	4.640	0.505	4.531
P		0.706	<0.001	0.615	<0.001

注: 与同组治疗前相比, * $P<0.05$ 。

2.3 两组 HAMA、HAMD 评分对比 治疗前两组 HAMA、HAMD 评分比较无显著性差异 ($P>0.05$); 治疗后观察组 HAMA、HAMD 评分低于对照组 ($P<0.05$)。见表 3。

表 3 两组 HAMA、HAMD 评分对比(分, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	HAMA		HAMD	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
观察组	42	13.41± 3.76	4.32± 2.08*	8.86± 3.19	2.35± 1.26*
对照组	42	13.69± 3.94	7.04± 3.16*	9.25± 3.08	4.08± 1.72*
t		0.333	4.660	0.570	5.258
P		0.740	<0.001	0.570	<0.001

注: 与同组治疗前相比, * $P<0.05$ 。

2.4 两组不良反应情况对比 两组不良反应发生率比较无显著性差异 ($P>0.05$)。见表 4。

表 4 两组不良反应情况对比[例(%)]

组别	n	恶心呕吐	幻觉	失眠	总发生
观察组	42	1 (2.38)	2 (4.76)	1 (2.38)	4 (9.52)
对照组	42	1 (2.38)	1 (2.38)	0 (0.00)	2 (4.76)
χ^2					0.180
P					0.672

3 讨论

FOG 是 PD 常见症状, 以转身、开步或障碍物回避时突然出现短暂性步态受阻为主要表现。现阶段, FOG 发病机制尚未明确, 有学者认为, 与黑质纹状体多巴胺 (DA) 能神经系统功能损伤密切相关^[6]。研究认为, 脑干丘脑底核与脑桥核功能障碍也可能参与 FOG 发生^[7], 提示神经退变可能参与 FOG 发生。

(上接第 10 页)(2):129-135.

[3]Chang Ki Kim,Eun A Cho,Dong Mi Shin,et al.Comparative evaluation of the loop-mediated isothermal amplification assay for detecting pulmonary tuberculosis[J].Annals of Laboratory Medicine, 2018,38(2):119-124.

[4]中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会.肺结核诊断标准(WS288-2017)[J].新发传染病电子杂志,2018,3(1):59-61.

[5]赵雁林,姜广路.痰涂片镜检标准化操作及质量保证手册[M].北京:中国协和医科大学出版社,2009.

[6]赵雁林,王黎霞.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.

[7]陈华,陈品儒,苏锋华,等.IGRAs 在支气管扩张患者中非结核分枝杆菌肺炎与肺结核鉴别诊断的价值[J].广州医科大学学报,2015,43

左旋多巴属 DA 前体,可提高中枢 DA 浓度,改善黑质纹状体 DA 能神经系统功能。但由于 PD-FOG 患者普遍病程长,随着用药时间延长,左旋多巴药性逐渐降低。研究显示,PD 患者脑内 MAO-B 活性比正常人高 25%^[8]。司来吉兰可选择性抑制纹状体内 MAO-B,减少 DA 降解,提高 DA 浓度,同时抑制 DA 能神经元突触前膜对 DA 再摄取,延长内源性及外源性 DA 作用时间,改善 PD 患者 FOG 等症状。另有研究显示,司来吉兰具有抗炎、抗氧化应激、减少兴奋性毒性、保护线粒体功能等神经保护作用^[9]。本研究结果显示,治疗后观察组 UPDRS I、UPDRS III、FOGQ、HAMA、HAMD 评分低于对照组,MMSE 评分高于对照组 ($P<0.05$);两组不良反应发生率比较无显著性差异 ($P>0.05$)。这表明司来吉兰联合左旋多巴对 PD-FOG 患者,可改善 FOG 及心理状态,提高认知功能,且安全性高。

综上所述,司来吉兰联合左旋多巴对 PD-FOG 患者,可改善 FOG 及心理状态,提高认知功能,且安全性高。

参考文献

[1]王庆广,韩伯军,洪珊珊,等.α- 突触核蛋白基因 rs356219、rs356165 位点多态性与帕金森病认知功能障碍的关系[J].中华行为医学与脑科学杂志,2018,27(9):804-807.

[2]杨军,王璞,周佩洋.帕金森病冻结步态的临床特征及危险因素[J].中国临床保健杂志,2017,20(3):240-243.

[3]吕姣.普拉克索联合左旋多巴治疗帕金森病疗效及安全性研究[J].临床军医杂志,2017,45(1):53-55.

[4]韦君丽,李晓明.司来吉兰治疗帕金森病冻结步态病人的疗效观察[J].中西医结合心脑血管病杂志,2018,16(23):3540-3542.

[5]中国医师协会神经内科医师分会帕金森病及运动障碍专业委员会.中国帕金森病的诊断标准(2016 版)[J].中华神经科杂志,2016,49(4):268-271.

[6]秦灵芝,李玮,王晓娟,等.虚拟现实技术在帕金森病冻结步态康复中的应用[J].中华物理医学与康复杂志,2019,41(3):206-209.

[7]王慧敏,姜胤,加福民,等.丘脑底核变频电刺激治疗帕金森病冻结步态一例并文献复习[J].中华神经外科杂志,2017,33(8):857-858.

[8]刘丹,马强,冯奥.美多芭联合盐酸司来吉兰治疗帕金森病的临床疗效分析[J].中国现代药物应用,2018,12(3):78-79.

[9]李晨曦,张一帆,白如玉,等.卡巴拉汀联合司来吉兰治疗帕金森病的临床研究[J].现代药物与临床,2019,34(8):2356-2360.

(收稿日期: 2020-10-14)

(4):41-44.

[8]廖子龙,徐加誉,陈宝玉,等.抗酸染色联合金胺 O 荧光染色诊断肺结核的临床价值探究[J].黑龙江医学,2019,43(4):394-395,398.

[9]杨健,张天华,鲜小萍,等.5 种病原学检测方法在肺结核病诊断中的应用评价[J].中国人兽共患病学报,2019,35(7):672-676.

[10]彭章丽,张建勇,陈玲,等.TB-LAMP 法检测阳性痰标本再培养增加耐药肺结核发现率[J].现代预防医学,2019,46(21):3981-3984,3996.

[11]Nakiyingi L,Nakanwagi P,Briggs J,et al.Performance of loop-mediated isothermal amplification assay in the diagnosis of pulmonary tuberculosis in a high prevalence TB/HIV rural setting in Uganda[J].BMC Infectious Diseases,2018,18(1):87.

[12]春霞霞,陆伟宏,何国产,等.环介导等温扩增在检测肺炎支原体中的临床应用[J].中国医学科学院学报,2019,41(2):203-207.

(收稿日期: 2020-12-19)