Journal of Clinical Personalized Medicine 临床个性化医学, 2025, 4(1), 788-793
Published Online February 2025 in Hans. https://www.hanspub.org/journal/jcpm
https://doi.org/10.12677/jcpm.2025.41111

Hans汉斯

荧光定量PCR法与涂片抗酸染色法在活动性肺结核早期诊断中的应用价值

钱　阳[1]，相龙全[2*]

[1]济宁医学院临床医学院，山东　济宁
[2]济宁市第一人民医院病理科，山东　济宁

收稿日期：2025年1月26日；录用日期：2025年2月18日；发布日期：2025年2月28日

摘　要

目的：探讨荧光定量PCR法与涂片抗酸染色法在活动性肺结核早期诊断中的应用价值，评估两种方法在敏感性、特异性及准确性方面的表现，为临床诊断提供科学依据。方法：研究选取2021年1月至2022年1月期间我院收治的100名疑似活动性肺结核患者作为研究对象，根据检测方法分为实验组和对照组，实验组采用荧光定量PCR法进行检测，对照组则采用涂片抗酸染色法进行诊断。检测前均采集患者的痰液样本并进行标准化处理。记录两组的阳性检出率、敏感性、特异性及结果一致性。结果：荧光定量PCR法的敏感性为90.48%，特异性为93.75%；涂片抗酸染色法的敏感性为66.67%，特异性为87.50%。荧光定量PCR法在检出真实阳性病例方面表现更优，假阴性率更低，同时在排除非病原体感染的能力上表现更高，假阳性率较低。两种方法对比表明，荧光定量PCR法在敏感性和特异性方面均优于涂片抗酸染色法，具有更高的诊断准确性和临床应用价值($P < 0.05$)。结论：涂片抗酸染色法虽操作简便，但敏感性和准确性有限，不适合早期筛查应用。建议将荧光定量PCR法作为活动性肺结核早期诊断的首选检测手段，以提高诊断效率并为患者的早期治疗提供精准依据。

关键词

荧光定量PCR法，涂片抗酸染色法，活动性肺结核，早期诊断

The Value of Fluorescence Quantitative PCR and Acid-Fast Smear Staining in the Early Diagnosis of Active Pulmonary Tuberculosis

Yang Qian[1], Longquan Xiang[2*]

[1]School of Clinical Medicine, Jining Medical University, Jining Shandong
[2]Department of Pathology, Jining No. 1 People's Hospital, Jining Shandong

*通讯作者。

文章引用: 钱阳, 相龙全. 荧光定量 PCR 法与涂片抗酸染色法在活动性肺结核早期诊断中的应用价值[J]. 临床个性化医学, 2025, 4(1): 788-793. DOI: 10.12677/jcpm.2025.41111

Received: Jan. 26th, 2025; accepted: Feb. 18th, 2025; published: Feb. 28th, 2025

Abstract

Objective: To explore the application value of fluorescence quantitative polymerase chain reaction (PCR) and Acid-Fast Smear Staining in the early diagnosis of active pulmonary tuberculosis, to assess the performance of the two methods in terms of sensitivity, specificity and accuracy, and to provide scientific basis for clinical diagnosis. Methods: 100 patients with suspected active tuberculosis admitted to our hospital between January 2021 and January 2022 were selected as the study subjects, and were divided into experimental and control groups according to the detection methods, with the experimental group using the fluorescence quantitative PCR for the detection, and the control group using the smear antacid staining method for the diagnosis. Sputum samples were collected and standardized before testing. The positive detection rate, sensitivity, specificity and consistency of the results of the two groups were recorded. Results: The sensitivity of the fluorescence quantitative PCR was 90.48% and the specificity was 93.75%; the sensitivity of the Acid-Fast Smear Staining was 66.67% and the specificity was 87.50%. The fluorescence quantitative PCR performed better in detecting true-positive cases with a lower false-negative rate, as well as higher in the ability to exclude non-pathogenic infections with a lower false-positive rate. Comparison of the two methods showed that the fluorescent quantitative PCR was superior to the Acid-Fast Smear Staining in terms of sensitivity and specificity, with higher diagnostic accuracy and clinical application value (P < 0.05). Conclusion: Although the Acid-Fast Smear Staining is easy to operate, it has limited sensitivity and accuracy and is not suitable for early screening application. It is recommended that the fluorescence quantitative PCR be used as the first choice for the early diagnosis of active pulmonary tuberculosis to improve the diagnostic efficiency and provide a precise basis for the early treatment of patients.

Keywords

Fluorescence Quantitative PCR, Acid-Fast Smear Staining, Active Pulmonary Tuberculosis, Early Diagnosis

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.
This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).
http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Open Access

1. 引言

肺结核是一种由结核分枝杆菌引起的慢性传染性疾病，发病率较高，严重威胁公众健康。活动性肺结核的早期诊断对疾病控制、降低传播率具有关键作用。涂片抗酸染色法作为结核病检测的传统方法，对样本菌量要求较高，低菌量样本易出现假阴性结果，难以满足早期诊断的需求[1]。近年来，分子生物学技术的快速发展为结核病的诊断带来新的突破，其中荧光定量 PCR 法凭借其高敏感性、高特异性及快速检测的优势，逐渐应用于临床检测领域。荧光定量 PCR 法借助荧光信号检测，可在较短时间内识别目标病原体，即使在低菌量样本中仍具有良好的检测能力，为早期诊断提供技术支持。

2. 一般资料与方法

2.1. 一般资料

研究选取 2021 年 1 月至 2022 年 1 月期间我院收治的 100 例疑似活动性肺结核患者作为研究对象，均为首次就诊患者，未接受抗结核治疗。所有患者经胸部影像学检查提示肺部病灶，结合临床表现包括

咳嗽、咳痰、咯血、盗汗、发热或体重减轻等症状，并有肺结核流行病学接触史或感染高危因素。研究根据检测方法分为两组，实验组 50 例，采用荧光定量 PCR 法检测；对照组 50 例，采用涂片抗酸染色法检测。实验组男 27 例，女 23 例，年龄 19~72 岁，平均年龄(42.8 ± 15.3)岁，病程 0.5~18 个月，平均病程(6.7 ± 3.4)个月；对照组男性 26 例，女性 24 例，年龄范围：21~70 岁，平均 41.6 ± 14.8 岁，病程范围 1~16 个月，平均 6.5 ± 3.1 个月。两组患者临床表现中咳嗽 85 例、咯血 27 例、发热 58 例、盗汗 33 例、体重减轻 49 例。基本资料比较，差异无统计学意义($P > 0.05$)，具有可比性。

2.2. 纳入标准与排除标准

2.2.1. 纳入标准

1) 年龄在 18 岁及以上的成年人；2) 临床表现符合活动性肺结核诊断依据，伴有典型影像学表现；3) 痰液样本采集充分且符合检测要求；4) 自愿参与研究并签署知情同意书。

2.2.2. 排除标准

1) 曾接受抗结核治疗或正在服用抗结核药物者；2) 合并其他呼吸道感染性疾病或肺部肿瘤者；3) 合并严重心、肝、肾功能损害或免疫缺陷疾病者；4) 检测样本不符合质量标准或样本量不足者；5) 存在严重精神疾病或依从性差者。

2.3. 方法

2.3.1. 控制偏移

严格根据纳入标准与排除标准限制筛选研究对象，随机化分配至实验组和对照组中，从而有效控制选择偏移。

2.3.2. 实验组

实验组采用荧光定量 PCR 法检测结核分枝杆菌核酸：取患者清晨深咳痰液 2~5 mL，置于无菌容器内，送检前加入等体积 4% NaOH 溶液进行预处理，振荡均匀后 37℃孵育 15 分钟，随后加入中和液终止反应，经 3000 rpm 离心 10 分钟弃上清，沉淀重新悬浮于无菌 PBS 缓冲液中。医生使用核酸提取试剂盒提取 DNA 模板，并依据试剂盒说明书要求操作。实时荧光 PCR 反应体系总容积 20 μL，其中有 10 μL 荧光 PCR 反应混合液、5 μL 引物探针混合物、1 μL 酶液和 4 μL DNA 模板。荧光定量 PCR 仪(型号 ABI7500)反应条件设定为 95℃预变性 5 分钟，95℃变性 15 秒，60℃退火延伸 45 秒，共 45 个循环，荧光信号实时监测。扩增曲线出现 Ct 值 ≤39 判定为阳性，Ct 值 >39 或无扩增曲线为阴性。所有操作均设置阳性和阴性对照，以排除污染及非特异性扩增干扰。实验组患者确诊后口服异烟肼(300 mg/天)、利福平(450 mg/天)、乙胺丁醇(750 mg/天)、吡嗪酰胺(1500 mg/天)，联合治疗两个月后调整方案，继续使用异烟肼和利福平维持治疗四个月。

2.3.3. 对照组

对照组采用涂片抗酸染色法检测：取患者清晨痰液 2~5 mL，加入 4% NaOH 溶液预处理，振荡混匀后静置 10 分钟，取沉淀部分涂片，空气干燥后用甲醇固定。涂片置于加热菲林碱性复红液中染色 5 分钟，水洗后脱色至无色，再用亚甲蓝复染 30 秒，水洗、晾干并镜检。医生采用光学显微镜(放大倍率 1000 倍)观察染色结果，检测抗酸杆菌数量，镜下见棕红色的两端钝圆、稍弯曲的细丝状杆菌 1 条或以上则判定为阳性，否则为阴性。对照组患者确诊后使用相同的抗结核药物治疗方案，具体用药和实验组一致。

2.4. 实验指标

2.4.1. 阳性检出率

阳性检出率用于评价两种检测方法对活动性肺结核患者的检出能力。实验组和对照组分别采集患者

痰液样本，并按照各自检测流程进行实验。荧光定量 PCR 法通过 Ct 值判断样本是否呈阳性反应，而涂片抗酸染色法则依据显微镜下是否观察到抗酸杆菌进行判定。对比两组阳性病例数量占各组总检测人数的百分比，阳性检出率 = 阳性病例数/总检测数 × 100%。

2.4.2. 敏感性与特异性

敏感性和特异性共同衡量诊断方法的准确性，敏感性反映检出真实阳性的能力，而特异性反映排除非病原体感染的能力。计算公式为敏感性 = 真阳性数/(真阳性数 + 假阴性数) × 100%，特异性 = 真阴性数/(真阴性数 + 假阳性数) × 100%。

2.5. 统计学方法

研究利用 SPSS28.0 进行数据分析，计量资料以 x ± s 表示，计数资料以率表示，采用 χ^2 检验，若 P < 0.05 差异具有统计学意义。

3. 结果

3.1. 对比两组患者阳性检出率

荧光定量 PCR 法的阳性检出率显著高于涂片抗酸染色法，表明其在活动性肺结核患者早期诊断中的灵敏度更优(P < 0.05) (见表 1)。

Table 1. Comparison of positive detection rates in the two groups (n, %)
表 1. 对比两组患者阳性检出率(n, %)

组别	阳性病例数(例)	住院时间均值(天)
实验组	38	76.00
对照组	28	56.00
P		<0.05

3.2. 对比两组患者敏感性与特异性

荧光定量 PCR 法在敏感性和特异性方面均优于涂片抗酸染色法，进一步验证其在活动性肺结核诊断中的准确性(P < 0.05) (见表 2)。

Table 2. Comparing the sensitivity and specificity of the two groups of patients
表 2. 对比两组患者敏感性与特异性

组别	敏感性(%)	特异性(%)
实验组	90.48	93.75
对照组	66.67	87.50
P		<0.05

4. 讨论

4.1. 诊断敏感性与特异性比较

在活动性肺结核的早期诊断中，诊断方法的敏感性和特异性是衡量其准确性的重要指标。敏感性反映了检测方法识别真实阳性病例的能力，而特异性则反映其正确排除非结核病患者的能力。相比抗酸染

色法，荧光定量 PCR 法凭借其高敏感性、高特异性成为早期诊断活动性肺结核的理想选择，这与以往的一些文献报道相印证[2]-[4]。

在敏感性方面，荧光定量 PCR 法高敏感性的原因在于高灵敏度，该方法借助靶向结核分枝杆菌的特定核酸序列进行扩增，能够检测到极低含量的结核分枝杆菌，即使在菌量较低的患者中也能实现准确的阳性检测[5]，由此有效降低假阴性率，对于早期筛查和确诊肺结核具有重要意义。因此，在敏感性方面，荧光定量 PCR 法适用于免疫功能低下的患者，这些患者表现为低菌量，而传统的涂片抗酸染色法无法有效检出；另外，qPCR 具有实时监测荧光信号变化的能力，并进行信号累积，能够在 PCR 反应过程中检测到低浓度的目标核酸分子，更早地识别出目标序列的存在。相较之下，涂片抗酸染色法的敏感性则受限于结核分枝杆菌的菌量要求[6]。涂片抗酸染色法通过显微镜下观察抗酸杆菌的存在来判断是否为阳性结果，但在低菌量的样本中，细菌数量不足以在显微镜下观察到，从而导致漏诊。研究显示，在活动性肺结核的早期阶段，尤其是在免疫功能受抑制的患者中，涂片抗酸染色法的漏诊率较高。而且不能区分非结核分枝杆菌、诺卡氏菌、棒状杆菌等[7]。所以，涂片抗酸染色法的敏感性相对较低，不能满足早期诊断的需求，容易错过最佳治疗时机。

在特异性方面，荧光定量 PCR 法特异性高[8]的原因在于对特异性靶基因的选择，针对结核分枝杆菌的特异性基因序列进行检测，如 IS6110 序列或 mpt40 序列。这些基因序列在结核分枝杆菌中高度保守，而在其他非结核分枝杆菌中不存在，从而避免了其他细菌或病原体的干扰，减少了假阳性结果的发生，确保了检测的特异性；另外，qPCR 的引物设计要求严格，确保了引物与目标序列的高度特异性结合，减少非特异性扩增。这使得荧光定量 PCR 法在排除非结核感染的能力上更为可靠，尤其在结核流行地区，能够更精确地诊断活动性肺结核。而涂片抗酸染色法的特异性相对较低，在处理复杂样本时，非特异性染色或操作误差还会出现假阳性结果，进而影响诊断的准确性。

4.2. 技术适用性与临床可行性

荧光定量 PCR 法作为一种分子生物学检测技术，其最大优势在于高灵敏度和高特异性，能够精确检测低菌量样本中的结核分枝杆菌核酸。然而，这种技术的临床应用也面临着一定的挑战。首先，荧光定量 PCR 法需要实时荧光 PCR 仪及相关的试剂，这对于一些资源有限的医院或基层医疗机构而言会成为技术应用的瓶颈[9]。该方法的试剂成本较高，且对实验室环境的要求较高，操作人员必须经过专业培训，才能保证实验结果的准确性。此外，荧光定量 PCR 法的检测时间相对较短，一般在几个小时内即可得出结果，但由于设备的高要求，初期投入较大，因此其在一些低资源地区的普及受到限制。在一些发展中国家或偏远地区，由于设备、资金及技术人员的短缺，荧光定量 PCR 法的临床应用会受到制约。在这种情况下，如何平衡技术准确性与资源投入，成为普及此项技术时需要考虑的重要问题。

与荧光定量 PCR 法相比，涂片抗酸染色法具有更加明显的技术可行性。该方法所需设备简单，仅需显微镜、染色试剂及基础的实验室条件即可完成，操作流程相对简便，且成本低廉。这使得涂片抗酸染色法在基层医院、乡村诊所及资源匮乏的地区具备广泛的应用前景。涂片抗酸染色法的临床可行性较强，且在资源有限、检测样本量较大的情况下，可以快速筛查疑似结核病例，尤其适用于结核高发区。然而，涂片抗酸染色法的技术适用性却受到一定限制。其敏感性较低，依赖菌量，因此对早期、低菌量的肺结核患者诊断效果不佳。此外，由于操作人员的经验对结果的准确性影响较大，涂片抗酸染色法存在一定的误差，容易发生假阴性或假阳性结果。特别是对于免疫功能低下患者或早期结核患者，涂片抗酸染色法的漏检率较高，会错失早期诊断的机会。

综上所述，荧光定量 PCR 法凭借其高敏感性，可以在肺结核感染的早期阶段，尤其是低菌量感染者中及时发现结核分枝杆菌。这种早期检测可以让患者能够尽早接受针对性的抗结核治疗，从而避免病程

的延长[10]。特别是对于免疫功能低下或耐药性肺结核患者，早期诊断能够帮助医生选择合适的抗结核药物组合，减少药物耐药性的发展，提高治疗效果。涂片抗酸染色法虽然是一项传统且广泛应用的检测手段，但其敏感性受限于菌量，因此在肺结核的早期阶段无法有效检出病原菌，导致漏诊或误诊。对早期患者而言，延迟治疗可能会导致病情进一步恶化，甚至引发多脏器损害或耐药性结核的出现。若依赖涂片抗酸染色法作为主要筛查手段，可能错失最佳治疗时机。因此，早期诊断直接影响抗结核治疗的及时性和针对性，荧光定量 PCR 法因其高灵敏度，能够在疾病早期阶段就确定病原，为治疗方案的选择提供更可靠的依据。

在实际临床工作中，选择合适的诊断方法同时也要综合考虑技术的适用性和可行性。对于高资源地区，尤其是大型医院和传染病专科医院，荧光定量 PCR 法由于其较高的灵敏度，可以作为首选检测方法，特别是在疑难病例、免疫抑制患者或早期结核的诊断中发挥重要作用。而对于资源匮乏地区或基层医疗机构，涂片抗酸染色法则因其操作简便、成本低廉而具有较强的实用性。虽然其灵敏度较低，但依然是大规模筛查中的重要手段。

声　明

该研究已获得所有病人的知情同意。

参考文献

[1] 姚信飞. 结核杆菌检验中涂片抗酸染色法与荧光定量 PCR 法的价值对比[J]. 现代诊断与治疗, 2024, 35(13): 2004-2006.

[2] 李小燕, 吴丹, 姚梅宏, 等. 抗酸染色与即时荧光定量 PCR 法检测结核分枝杆菌在辅助诊断结核病中的作用比较[J]. 中华病理学杂志, 2018, 47(2): 132-134.

[3] 王霖, 王辉, 李才信, 瞿春燕, 马元肖. 荧光定量 PCR 技术在肺结核诊断中的应用研究[J]. 中国卫生标准管理, 2016, 7(11): 169-171.

[4] 喻容, 胡发莉, 石国民, 等. 4 种检测方法在结核病临床诊断中的应用价值[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(5): 580-582.

[5] 咸丽. 刍议活动性肺结核早期检验中半巢式全自动实时荧光定量 PCR 检测与涂片抗酸染色法的应用研究[J]. 系统医学, 2024, 9(2): 87-89+109.

[6] 王丽娜. 荧光定量 PCR 检测技术在结核分枝杆菌耐药性检测中的应用价值[J]. 临床医学, 2021, 41(1): 54-55.

[7] 赵红艳, 熊继永, 孙彦平, 杨金玉, 付振艳, 王薇雅. 抗酸染色阳性细菌的分布及其相关疾病分析[J]. 中国临床研究, 2013, 26(4): 399.

[8] 刘炜钊, 冼英杰, 李秀群. 荧光定量 PCR 法与涂片抗酸染色法在活动性肺结核早期诊断中的应用价值[J]. 中国社区医师, 2023, 40(34): 70-72.

[9] 袁桢, 张云杰. 活动性肺结核早期检验中荧光定量检验 PCR 与涂片抗酸染色法的价值分析[J]. 临床医学工程, 2023, 30(5): 655-656.

[10] 路爱丽, 廖卫. 荧光定量 PCR 检测结核杆菌 DNA 与涂片抗酸染色诊断肺结核的效果比较[J]. 深圳中西医结合杂志, 2021, 31(24): 74-76.