

## • 临床检验研究 •

## 结核病 3 种实验诊断方法比较与分枝杆菌耐药性分析

陈建波<sup>1</sup>, 黄同花<sup>1</sup>, 陈郁筠<sup>2</sup>, 吴 驰<sup>1</sup>, 肖颜玉<sup>1</sup>, 罗 凯<sup>1</sup>, 叶飞娣<sup>1</sup>

(1. 深圳市第三人民医院检验科 518112; 2. 深圳市职业病防治院检验科 518020)

**摘要:**目的 比较结核病 3 种实验诊断方法, 分析目前深圳市分枝杆菌耐药情况。方法 统计 2009~2010 年深圳市第三人民医院临床确诊结核病患者痰标本涂片镜检、培养和 PCR 检测结果, 并对分枝杆菌菌种及对治疗药物耐药情况进行统计分析。结果 共有 640 例资料齐全的结核病确诊病例入选, 其中肺结核 537 例、结核性胸膜炎 82 例、结核性脑膜炎 21 例, 分枝杆菌涂片镜检阳性率分别为 44.1%、5.3% 和 13.3%, 分枝杆菌培养法阳性率分别为 59.9%、12.9% 和 30.0%, PCR 检测阳性率分别为 52.2%、16.7% 和 26.3%。经分枝杆菌菌种鉴定, 人型结核分枝杆菌占 67.0%、牛型结核分枝杆菌占 16.8%、非结核分枝杆菌占 16.2%, 人型结核分枝杆菌对利福平、异烟肼、乙胺丁醇、链霉素的耐药率分别为 16.4%、14.8%、4.7% 和 15.6%。结论 目前结核病实验诊断方法主要有涂片镜检、培养和 PCR 检测, 病原菌以人型结核分枝杆菌为主, 对 3 种主要抗结核药物的耐药率较高。另外, 菌阴结核约占 40%, 目前对菌阴结核、活动性结核与陈旧性结核的诊断和鉴别诊断困难, 期待新的方法。

**关键词:** 结核; 分枝杆菌属; 诊断; 聚合酶链反应; 耐药性

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.04.017

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)04-0420-02

### Comparison of three methods in the detection of tuberculosis and analysis of drug resistance in clinical isolates of Mycobacterium

Chen Jianbo<sup>1</sup>, Huang Tonghua<sup>1</sup>, Chen Yujun<sup>2</sup>, Wu Chi<sup>1</sup>, Xiao Yanyu<sup>1</sup>, Luo Kai<sup>1</sup>, Ye Feidi<sup>1</sup>

(1. Department of Clinical Laboratory, Shenzhen Third People's Hospital, Shenzhen Guangdong 518112, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Shenzhen Occupational Disease Prevention Hospital, Shenzhen Guangdong 518020, China)

**Abstract:** **Objective** To compare of three methods in tuberculosis detection and analyze the drug resistance of Mycobacterium isolats. **Methods** The results of smear-microscopy, Mycobacterium culture, and PCR detection of patients with definite diagnosis of tuberculosis in Shenzhen Third People's Hospital between 2009 and 2010 were analyzed, including the species of Mycobacterium and drug resistance. **Results** Total 640 hospitalized patients with well medical records were enrolled in this study, including 537 cases of pulmonary tuberculosis, 82 of tuberculosis pleurisy and 21 of tuberculosis meningitis, the positive rates of smear-microscopy of whom were 44.1%, 5.3% and 13.3%, of Mycobacterium-culture were 59.9%, 12.9% and 30.0%, and of PCR detection were 52.2%, 16.7% and 26.3% respectively. Species of Mycobacterium were made up with 67.0% of Mycobacterium tuberculosis, 16.8% of Mycobacterium bovis and 16.2% of Mycobacterium other than tuberculosis, which were confirmed by Mycobacterium isolates identification. The drug resistance of Mycobacterium tuberculosis to Rifampin, Isoniazid, Ethambutol and Streptomycin were 16.7%, 15.1%, 4.8% and 15.9% respectively. **Conclusion** The main laboratory diagnostic methods of tuberculosis were smear-microscopy, Mycobacterium-culture and PCR detection at present in Shenzhen, and most common pathogens that cause tuberculosis were Mycobacterium tuberculosis with high level drug resistance to three mainly used anti-tuberculosis drugs presently. In addition, about 40% tuberculosis patients were negative with Mycobacterium, bringing difficulties to identify active tuberculosis and old inactive tuberculosis, indicating that new and advanced diagnostic methods should be further researched.

**Key words:** tuberculosis; mycobacterium; diagnostic; polymerase chain reaction; drug resistance

结核病是目前严重威胁人类健康的重大传染性疾病之一, 近年发病率有上升的趋势, 我国是世界上 22 个结核病高负担国家之一, 发病率居世界第二位。据 WHO 调查数据显示全球结核病新增人数为 916 万, 死亡 166 万<sup>[1]</sup>。结核病的实验诊断手段主要有涂片镜检、分枝杆菌培养、PCR 基因检测等。其中分枝杆菌涂片镜检和分枝杆菌培养这两种细菌学检测方法是结核病临床诊断与鉴别的“金标准”<sup>[2]</sup>。提高结核病分枝杆菌的检测速度和检出阳性率, 加快报告分枝杆菌药物敏感试验速度, 对于结核病的早期诊断、合理用药具有重要意义。本文对 2009~2010 年深圳市结核病实验检测结果及分枝杆菌耐药情况进行评价与分析。

#### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 深圳市第三人民医院 2009~2010 年 640 例资料齐全的临床确诊结核病患者。其中 537 例肺结核、82 例结核性胸膜炎、21 例结核性脑膜炎。

**1.2 仪器与试剂** Nikon 50i 荧光显微镜(日本)、梅里埃 MB/

BacT/AM240 全自动分枝杆菌培养仪(法国)、ABI 7500 荧光定量 PCR 仪(美国)。结核分枝杆菌荧光定量 PCR 检测试剂盒购自广州达安生物技术公司。

#### 1.3 方法

**1.3.1 涂片镜检法** 金胺“O”荧光染色: 将标本涂片自然干燥, 平放染色架上, 加荧光染色剂盖满痰膜, 染色 10~15 min, 水洗, 加 3% 盐酸酒精脱色剂盖满痰膜, 脱色 3~5 min, 至无黄色, 水洗, 加 0.5% 高锰酸钾盖满痰膜, 染色 1~2 min, 水洗, 待干后荧光显微镜检查。结果报告标准以全国结核病细菌学检验规程为准。

**1.3.2 分枝杆菌培养法** 痰标本经半胱氨酸 4% 氢氧化钠法去污染处理, 胸水标本经 4% 氢氧化钠处理, 脑脊液标本直接接种培养基。加入约 4 倍于标本体积的处理液于痰杯中, 将标本连同处理液移入 50 mL 离心管, 振荡均匀使痰液充分液化; 15 min 后加入 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液(PBS)至 50 mL, 经离心半径 8 cm, 4 000 r/min 离心 15 min, 弃上清液, 加 1 mL PBS

于离心管中混匀,当天接种分枝杆菌培养基,取 0.5 mL 接种至 BacT/LAERT 培养瓶,取 0.3 mL 接种罗氏培养管<sup>[3]</sup>。

**1.3.3 荧光定量 PCR** 取痰标本,加入约标本 4 倍量体积的 4% 氢氧化钠溶液,摇匀,室温液化 30 min,胸水、脑脊液标本无需液化;以离心半径 8 cm,2 500 r/min 离心 15 min 后,去上清液,沉淀用无菌生理盐水 1 mL 混匀;取 1 mL 混匀液于 EP 管中,15 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加生理盐水 1 mL,重复洗涤 1 次,弃上清液;沉淀加入 50 μL DNA 提取液,充分混匀后沸水浴 10 min;10 000 r/min 离心 5 min,取上清液 2 μL 作为 PCR 反应模板,设置反应体系,反应完成后计算机自动分析,建立标准曲线,计算出标本中扩增片段的拷贝数。

**1.4 统计学处理** 分枝杆菌菌种鉴定及药敏试验见文献<sup>[3]</sup>。

**2 结果**

**2.1 结核病 3 种实验诊断方法阳性率** 深圳市结核病 3 种实验诊断方法阳性率如表 1 所示,其中肺结核患者 537 例,涂片镜检阳性率为 44.1%,比方兰君<sup>[4]</sup>报道结果稍高;分枝杆菌培养阳性率为 59.9%;PCR 检测结核分枝杆菌阳性率为 52.2%。培养阳性率略高于 PCR 阳性率,主要原因是培养阳性菌包括结核分枝杆菌及非结核分枝杆菌,而本文 PCR 检测阳性菌只检测结核分枝杆菌;结核性胸膜炎培养阳性率为 12.9%,PCR 检测阳性率为 16.7%,阳性率都相对较低,可能是临床标本胸水中含菌量较少,或方法学不敏感;结核性脑膜炎脑脊液检测阳性率较结核性胸膜炎稍高,约三成能培养阳性。

表 1 结核病 3 种实验诊断方法阳性率 [% (n/n)]

方法	肺结核	结核性胸膜炎	结核性脑膜炎
涂片镜检	44.1 (224/508)*	5.3 (4/75)*	13.3 (2/15)*
分枝杆菌培养	59.9 (229/382)	12.9 (4/31)	30.0 (3/10)
PCR 检测	52.2 (210/402)	16.7 (10/70)*	26.3 (5/19)

\*:与分枝杆菌培养法阳性率比较,差异有统计学意义, P<0.05。

**2.2 结核病病原菌构成比及药敏结果** 从 640 例肺病区确诊为结核病住院患者标本中共分离培养出 236 株分枝杆菌,共 191 株进行了菌种鉴定及药敏试验,种类以人型结核分枝杆菌为主,占 67.0%;牛型结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌分别占 16.8% 及 16.2%,牛型与非结核分枝杆菌比例也有相对上升<sup>[5]</sup>。

根据 191 株分枝杆菌临床分离株抗结核药物的药敏试验结果,统计 4 种一线抗结核药物的耐药情况如表 2,人型结核分枝杆菌对利福平、异烟肼及链霉素的耐药率都在 15% 左右,仅对乙胺丁醇的耐药率为 4.7%,相对较低。牛型分枝杆菌耐药率相对较低,但非结核分枝杆菌对 4 种一线药的耐药情况较严重,耐药率在 85% 左右。

表 2 深圳市分枝杆菌对 4 种一线抗结核药物的耐药情况

菌种	RFP		INH		EMB		SM	
	S(%)	R(%)	S(%)	R(%)	S(%)	R(%)	S(%)	R(%)
MTB(128)	83.6	16.4	85.2	14.8	95.3	4.7	84.4	15.6
MB(32)	96.9	3.1	96.9	3.1	100	0	90.6	9.4
MOTT(31)	12.9	87.1	3.2	96.8	25.8	74.2	12.9	87.1

RFP:利福平;INH:异烟肼;EMB:乙胺丁醇;SM:链霉素;S:敏感;R:耐药;MTB:人型结核分枝杆菌;MB:牛型结核分枝杆菌;MOTT:非结核分枝杆菌。

**3 讨论**

结核病是一种由分枝杆菌感染引起的慢性传染性疾病,人与人之间呼吸道传播是结核病传染的主要方式。提高分枝杆菌的检测速度和检出阳性率,尽快报告其药敏结果对预防及诊

治结核病有重要意义。结核病临床常用的实验诊断方法有涂片镜检、分枝杆菌培养与 PCR 检测,其中分枝杆菌的涂片镜检与培养是结核病诊断的“金标准”。

涂片镜检法,方法快速、简单、成本低廉,但敏感性较低,痰标本含菌量达 10<sup>4</sup>/mL 方能检出<sup>[3]</sup>。涂片染色包括普通抗酸染色和金胺“O”染色,普通抗酸染色分枝杆菌被染成红色,背景为蓝色,可直接观察到细菌的大小、形状与背景情况,如痰标本是否合格,染色是否适当,对纯培养的样本,能看到标本中是否有其他杂菌的生长等,但镜检时间长,要求每张阴性涂片至少看 300 个油镜视野。金胺“O”染色后用荧光显微镜检测,暗视野背景中分枝杆菌呈现明亮的黄色,视觉效果好,但存在非特异性荧光,要求检验人员具备一定的经验。另外,荧光染色的涂片可用 25 倍物镜观察,方便对涂片标本大面积扫描,速度快。涂片镜检的阳性率与标本质量和涂片质量密切相关,一般要求痰标本应连续送检 3 次,以提高分枝杆菌涂片镜检的检出率。另外,涂片镜检不方便开展分枝杆菌的药物敏感试验和细菌的进一步分型。

分枝杆菌培养由于分枝杆菌生长缓慢,平均约 18 h 分裂一次,故检测时间相对较长。分枝杆菌培养基有改良罗氏固体培养基和液体培养基。改良罗氏培养基含有对普通细菌的抑制成分,分枝杆菌在培养基表面长出菌落,经涂片染色镜检后,可报告阳性,阳性报告时间平均为 21.7 d<sup>[6]</sup>。改良罗氏培养法不能自动化,需人工定期观察,但成本低,可直观看到菌落形态与颜色。分枝杆菌液体培养法目前已实现自动化,仪器通过检测培养基内细菌的代谢产物来判断细菌的生长情况,阳性瓶必须经涂片镜检确认后方可报告分枝杆菌培养阳性。该方法报告时间相对改良罗氏培养基快,但与接种菌量有关,标本含菌量越多,接种菌量就越大,仪器报告阳性的时间越短,约需 10~15 d<sup>[6]</sup>。本文肺结核患者标本的培养阳性率为 59.9%,比涂片镜检阳性率高。

PCR 检测方法速度快、灵敏度高、特异性强,配合 DNA 测序还可进行种型鉴定。荧光定量 PCR 法线性范围宽,无需凝胶电泳分析。但 PCR 检测法易污染,故对实验室环境要求较高而增加了实验成本,另外,对不同种型的分枝杆菌需用不同的特异性引物,不同的引物一般需要不同的循环条件,而临床常见致病分枝杆菌种类繁多,故临床 PCR 方法检测诊断结核病多只检测结核分枝杆菌。本文肺结核 PCR 检测阳性率为 52.2%,比培养阳性率低,主要原因是本实验室 PCR 检测所用引物是结核分枝杆菌特异性引物,不包括非结核分枝杆菌。

目前,除结核分枝杆菌复合群外,非结核分枝杆菌感染率呈上升趋势<sup>[5]</sup>,分枝杆菌耐药情况也越来越严重<sup>[7]</sup>。深圳市结核病以人型结核分枝杆菌为主,占 67.0%。耐药情况也很严重,其中人型结核分枝杆菌对异烟肼、利福平及链霉素的耐药率都在 15% 左右,仅对乙胺丁醇的耐药率较低。非结核分枝杆菌的耐药率较高,而牛型结核分枝杆菌对一线药较敏感,敏感率均在 90% 以上;深圳地区患者流动性大,患者经济实力差距大,使部分患者依从性差,在临床结核病治疗中,如何合理用药,提高结核病的治疗效果,控制分枝杆菌耐药性的发生有重要的意义。

以上 3 种建立在检测分枝杆菌基础上的实验诊断方法在结核病防治中发挥了重要作用,但仍有近 40% 的结核病患者不能检测到病原菌,称菌阴结核。如何诊断菌阴结核,如何鉴别活动性结核与陈旧性结核,免疫学检测方法最有希望。目前结核病免疫检测方法有血清抗结核抗体检测、酶联免疫斑点试验(ELISPOT)和四聚体技术检测分枝杆菌致(下转第 423 页)

仍高于健康组,但各指标差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

**表 1 观察组与健康组血清胆红素和心肌损伤标志物之间的比较**

项目	观察组		正常组	F 值	T 值
	治疗前	治疗后			
TBIL	290.65±99.04*	70.61±11.23#	10.68±3.55	65.58	14.771
DBIL	15.30±3.91	8.21±4.36#	4.46±3.61	0.355	7.535
IBIL	270.81±98.47*	50.62±12.42#	6.053±3.6	64.484	14.579
CK-MB	45.85±31.12*	33.61±10.23#	24.42±9.16	12.701	3.653
MYO	35.62±18.14	28.13±10.24#	31.24±8.48	5.192	1.636
CTNI	4.50±15.82*	2.01±1.16#	1.39±1.20	2.323	1.075
LDH	321.14±108.49	243.05±118.41#	211.52±36.45	0.758	4.751

\*:  $P<0.05$ ,与健康组比较; #:  $P<0.05$ ,与观察组治疗前比较。

### 3 讨 论

本研究通过对 42 例高间接胆红素血症新生儿心肌损伤标志物检查,观察其治疗前后的变化以评价高间接胆红素是否对新生儿心肌造成损害。本组新生儿心肌损伤标志物活性均有不同程度增高,尤以 CK-MB、CTNI 活性升高明显,与对照组比较差异有统计学意义( $P<0.05$ ),由此表明高间接胆红素血症患儿的确存在一定的心肌损伤。经过临床综合治疗后,随胆红素下降,心肌损伤标志物活性也逐渐降低,说明高间接胆红素血症引起心肌损害为可逆性。因此,在治疗新生儿高间接胆红素血症时大部分患者无需对心肌损害进行过多的临床干预<sup>[4-5]</sup>。

本实验研究还发现,观察组 LDH 与对照组比较也无显著差异,与李伟中等<sup>[6]</sup>报道不一致。这可能是由于人组织中的乳酸脱氢酶(LDH)用电泳法可以分离出 5 种同工酶区带,而本实验测定的为乳酸脱氢酶的总活性,并未分别测定其各种同工酶,又因该酶分布广泛而缺乏特异性因此造成本实验结果 LDH 并未随心肌的损伤而特异性的活性升高<sup>[7]</sup>。

综上所述,高间接胆红素血症的确会引起一定的心肌损

伤,提示临床医生这种心肌损伤是可逆的,经过临床治疗可好转,对于黄疸过重、间接胆红素过高的部分患儿应当进行心肌损伤标志物监控<sup>[8-12]</sup>,在积极退黄治疗的同时注意对心肌的保护与治疗。

### 参考文献

- [1] 程友琴,尹秋生,崔吉君. 对胆红素的再认识[J]. 中华内科杂志, 2001,40(5):350-351.
- [2] 杨晓梅,高传化,陆洋. 新生儿高胆红素血症与多脏器损害的关系探讨[J]. 中国小儿急救医学,2006,13(3):268-269.
- [3] 宫心鹏,蔡悦意,孙熠峰,等. 高胆红素血症新生儿肝功能及心肌损伤标志物动态学研究[J]. 河北医科大学学报,2007,28(5):344.
- [4] Stevenson DK. Commentary on the bilirubin supplement[J]. Perinatology,2009,1(29):2-3.
- [5] 王焱,心肌酶谱在新生儿窒息心肌损害上的临床意义分析及治疗体会[J]. 中外医疗,2011,7(19):14-15.
- [6] 李伟中,林伟青,马廉,等. 新生儿高未结合胆红素血症心肌损伤标志物检测的临床意义[J]. 河北医学,2004,10(5):395.
- [7] 黄华英. 新生儿高胆红素血症对心肌酶谱的影响[J]. 中外医疗,2011,4(12):62.
- [8] 金翠青. 新生儿高胆红素血症肌酸激酶同工酶变化与感染分析[J]. 中华医院感染学杂志,2011,21(7):623-624.
- [9] 黄建军,徐莉芬. 新生儿病理性黄疸心肌损伤标志物变化极其意义[J]. 实用儿科临床杂志,2007,12(3):163-164.
- [10] Walsh SA, Marphy JF. Neonatal jaundice-are we over-treating [J]. Ir Med,2010,103(1):28-29.
- [11] 张贞玲,张英萍,张旭宏. 38 例新生儿病理性黄疸心肌酶检测的临床意义[J]. 中国民康医学,2011,2(23):315.
- [12] 胡治丽,潘碧云,邓宝琴. 新生儿高胆红素血症对心肌酶影响的分析[J]. 中国当代医药,2011,2(18):73-74.

(收稿日期:2011-11-09)

(上接第 421 页)

敏 T 细胞数量与分布。菌阴结核患者血清中结核抗体阳性率达 66%<sup>[8-9]</sup>,有助于菌阴结核的诊断。但分枝杆菌种型繁多,包被抗原特异性不强,ELISA 方法的灵敏度较低等影响了该方法检测结果的临床意义。ELISPOT 是检测外周血中结核分枝杆菌特异性抗原刺激下产生  $\gamma$ -干扰素的 T 细胞水平,刺激抗原常用分枝杆菌特异蛋白 ESAT-6 和 CFP-10 特定肽段,通过直接检测菌阴患者外周血中,结核分枝杆菌特异性抗原刺激下产生  $\gamma$ -干扰素的 T 细胞水平,对判断活动性结核有诊断价值,其灵敏度与准确度显著高于传统的试验方法,不受接种卡介苗的影响,但技术要求高,操作影响因素多。四聚体技术能够直接定量血液以及组织中抗原特异性的 T 细胞<sup>[10-11]</sup>,并能在单细胞水平对抗原特异性 T 细胞进行表型分析及功能检测,灵敏度高、特异性强,在克服表达困难、产量低、生产成本高等缺点后,有望成为解决现有临床实验诊断方法的局限性,检测结核患者的全身和局部免疫反应的新型检测方法。

### 参考文献

- [1] World Health Organization. WHO Report 2008: Global Tuberculosis control-Surveillance, Planning, Financing[R]. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2008.
- [2] 张思潮,邱志红,陆惠勤. 不同痰液标本肺结核杆菌培养结果比较[J]. 浙江预防医学,2008,20(1):59.

- [3] 熊礼宽. 结核病实验诊断学[M]. 北京:人民卫生出版社,2003:92-135.
- [4] 方兰君,钟球. 广东省 2002~2007 年肺结核病控制现状分析[J]. 广东医学,2008,29(12):2082.
- [5] 朱翠云. 结核病流行及其耐药现状[J]. 上海医药,2009,30(1):11-13.
- [6] 谢爱蓉. 结核分枝杆菌快速培养法的进展[J]. 检验医学,2010,25(4):328.
- [7] 姜世闻,胡屹. 耐药结核病的流行简况[J]. 中国防痨杂志,2010,32(2):352.
- [8] 伍小英. 血清抗结核抗体对肺结核的诊断[J]. 实用预防医学,2004,11(6):1216-1217.
- [9] 颜京瑞. 检测结核抗体对结核病的临床诊断价值[J]. 检验医学与临床,2010,7(2):113-115.
- [10] Wei H, Wang R, Chen Y, et al. DR \* W201/P65 tetramer visualization of epitope-specific CD4 T cells during M. tb infection and their resting memory pool after BCG vaccination[J]. PLoS ONE, 2009,4(9):6905.
- [11] Wei H, Huang D, Lai X, et al. Definition of APC presentation of phosphoantigen (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate to Vgamma2Vdelta 2 TCR[J]. J Immunol, 2008,181(7):4798-4806.

(收稿日期:2011-11-08)