

• 检验技术与方法 •

回顾性分析噬菌体生物扩增技术在肺结核诊断中的应用

胡永芳

(重庆市公共卫生医疗救治中心检验科, 重庆 400036)

摘要:目的 评价噬菌体生物扩增技术(PhaB)在肺结核诊断中的应用。方法 回顾性分析采用 PhaB 法、3D 培养法、直接涂片法检测 373 份痰标本的抗酸杆菌结果。结果 PhaB 法、3D 培养法、直接涂片法检测抗酸杆菌的阳性率分别为 53.6%、56.6% 及 20.1%。以 3D 培养法结果为标准,直接涂片法的敏感性、特异度、准确性分别为 33.2%、95.7% 及 60.3%;PhaB 法的敏感性、特异度、准确性分别为 89.1%、93.6% 及 90.6%。直接涂片法与 PhaB 法检测结果比较,差异有统计学意义($\chi^2=94.7, P<0.01$);PhaB 法与 3D 培养法检测结果比较,差异无统计学意义($\chi^2=3.46, P>0.05$)。结论 PhaB 法检测结核分枝杆菌具有较高的敏感性、特异度、准确性,值得在临床推广。

关键词:分枝杆菌; 结核,肺; 诊断; 噬菌体生物扩增技术

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.10.036

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)10-1316-02

A retrospective analysis on phage amplified biologically assay in diagnosis of pulmonary tuberculosis

Hu Yongfang

(Department of Clinical Laboratory, Chongqing Municipal Public Health Medical Treatment Center, Chongqing 400036, China)

Abstract: Objective To evaluate application of phage amplified biologically assay(PhaB) in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. **Methods** The results of acid-fast bacillus in 373 sputum specimens obtained by PhaB method, 3D culture and direct smear assay were retrospectively analyzed. **Results** The positive rates of acid-fast bacillus detected by PhaB method, 3D culture and the direct smear assay were 53.6%, 56.6% and 20.1%, respectively. Set the 3D culture result as the standard, the sensitivity, specificity and accuracy of the direct smear assay were 33.2%, 95.7% and 60.3%, respectively, and those of PhaB method were 89.1%, 93.6% and 90.6%, respectively. Compared the direct smear assay with PhaB method, the difference showed statistical significance ($\chi^2=94.7, P<0.01$). Compared PhaB method with 3D culture, the difference showed no statistical significance ($\chi^2=3.46, P>0.05$). **Conclusion** PhaB method has high sensitivity, specificity and accuracy in *Mycobacterium tuberculosis* detection and is worthy of promotion.

Key words: *Mycobacterium*; tuberculosis, pulmonary; diagnosis; phage amplified biologically assay

肺结核病是各种结核中最常见的,中国结核病的发病率和病死率较高,痰结核菌检查是诊治肺结核的主要依据,也是考核疗效、随访病情的重要指标。目前人们广泛关注寻找快速、可靠、特异性及敏感性高的检测方法。本中心承担着本市及周边地区结核患者的收治任务,为满足临床诊治的需要,采用多种方法检测结核杆菌。本研究回顾性分析噬菌体生物扩增技术(phage amplified biologically assay, PhaB)、直接涂片法及 3D 培养法检测 373 份痰标本中抗酸杆菌的结果及其优、缺点,评价 PhaB 对肺结核诊断的应用价值,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2011 年 5~12 月被本中心确诊的肺结核患者 373 例,其中,男 245 例,女 128 例;年龄 13~88 岁,平均(41.2±14.1)岁。

1.2 主要试剂与仪器 PhaB 法试剂盒为英国 BIOTEC 生物技术实验室有限公司产品,抗酸染液为珠海贝索生物技术有限公司产品,复溶液、抗菌药干粉添加剂均为美国 BD 公司产品,重庆市结核基因诊断中心赠送的结核分枝杆菌 H37Rv (ATCC27294)标准菌株为质控菌株;主要仪器为 BacT/Alert 3D 全自动分枝杆菌培养系统。

1.3 标本采集 由护士指导患者晨起清洁口腔,深咳脓样、干酪样及脓性黏液合格痰 4~6 mL,置于密闭无菌标本杯中送检。

1.4 直接涂片法 检验人员在生物安全柜中将标本混匀后按《结核病诊断实验室检验规程》^[1]涂片、染色及进行质量控制,显微镜油镜下观察 100~300 个视野中浅蓝色背景下红色略弯曲、细长的抗酸杆菌,每 300 个视野下抗酸杆菌不低于 3 条为阳性。

1.5 3D 培养法 涂片后标本按《结核病诊断实验室检验规程》消化、离心处理,取 0.5 mL 接种于 BacT/Alert 3D 培养管作全自动系统培养,操作和结果判断均按仪器说明书要求进行。仪器提示阳性后,抽取培养液进行涂片检测,经干燥、固定、染色、显微镜检查证实后报告阳性结果。培养 42 d 未生长者,则仪器自动报告阴性结果。

1.6 噬菌体法 无菌操作吸取上述处理后标本 1.0 mL,按 PhaB 法试剂盒说明书进行操作,以培养皿中出现大小不等的噬菌斑,且不低于 20 个,或许多噬菌斑互相融合呈透明状者,为阳性;反之,为阴性。

1.7 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,计

数资料用率表示,率的比较采用 χ^2 检验,以 $\alpha=0.05$ 为检验水准,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

PhaB 法、3D 培养法、直接涂片法检测抗酸杆菌的阳性率分别为 53.6%、56.6% 及 20.1%。以 3D 培养法结果为标准,直接涂片法的敏感性、特异度、准确性分别为 33.2%、95.7% 及 60.3%;PhaB 法的敏感性、特异度、准确性分别为 89.1%、93.6% 及 90.6%。直接涂片法与 PhaB 法同为阳性者 55 例,同为阴性者 153 例,二者比较,差异有统计学意义 ($\chi^2=94.7$, $P<0.01$);PhaB 法与 3D 培养法同为阳性者 188 例,同为阴性者 150 例,二者比较,差异无统计学意义 ($\chi^2=3.46$, $P>0.05$)。

3 讨 论

结核细菌学检查是诊断和制订治疗方案的重要依据,对于发现传染源、考核疗效、评价防治效果具有重要意义。在结核病控制工作中,寻求快速而准确的诊断方法是人们非常关注的问题。

痰直接涂片找抗酸杆菌是临床诊断肺结核的古老、廉价、快速、简便,且特异性高,很适合基层医疗机构开展的一种诊断方法,被 WHO 及国际防痨和肺病联合会推荐为诊断结核病的首选方法^[2],但与本科室采用的其他检查方法比较,此法检出率低,只有 20.10%。此外,还有许多不足:标本含菌量通常要大于 5 000 条/mL 才能检出阳性结果^[3];不同性状标本检测结果有明显差异,如标本含新鲜血液,红细胞被染色,易干扰镜检结果。制片质量对显微镜检查结果影响很大;加温染色过程稍有不慎,易造成染液溅起或边缘出现染液干涸,影响检出率;操作过程产生的气溶胶对人体有害;工作经验不足易漏检或误检;显微镜检查时,阳性标本可造成别的标本假阳性,不易标准化,也不能辨别死、活菌。

培养法是目前检测结核杆菌的“金标准”,检出率较高,为诊治结核病提供了依据。本室 3D 培养检出率(56.6%)显著高于直接涂片法,检测周期也较罗氏培养(8 周)有所缩短,但仍然耗时太长(6 周),难以满足临床对快速检测的需要,且仪器和试剂价格昂贵,患者经济负担重,对临床早期诊治帮助不大。

近年来分枝杆菌噬菌体在结核病实验室研究中取得了很大进展,其中最引人注目的是 PhaB 法在结核病实验室快速诊断及耐药性测定中的应用。其基本原理是分枝杆菌噬菌体能感染活的结核分枝杆菌,并在此菌内得到保护,不会被杀毒剂杀死而大量繁殖,并将菌体裂解,释放出子代噬菌体,立即感染指示细胞,使指示细胞裂解,在培养皿上出现肉眼可见的噬菌斑。因此,根据噬菌斑的有无即可判断标本中是否存在活的结核分枝杆菌或其他少数几种非结核分枝杆菌^[4]。所用指示细胞生长繁殖速度快,18~24 h 即可观察结果,从而快速、可靠地检测结核分枝杆菌,因此,对早诊治具有重要的参考价值。本室 PhaB 法检出率为 53.6%,与张周云等^[5]报道的 52.91% 基本一致,以 3D 培养结果为标准,其敏感性、准确性分别为 89.1%、90.6%,远远优于直接涂片法,弥补了直接涂片法漏检的缺憾,与培养法无显著性差异;能初步确定患者是活动性结

核患者,还是潜伏感染者。当标本中含菌 100~300 条/mL 时,即可被检出^[6]。检测结核杆菌的耐药性是先将涂片阳性的标本与抗结核药物作用一段时间后,耐药菌继续生长,敏感菌被药物杀死,随后加入的分枝杆菌噬菌体能够感染相应的活的分枝杆菌,其方法与快速检测结核杆菌相同,2~3 d 即可获得准确的微生物敏感性试验结果,能及时指导临床正确用药。噬菌体只能在活菌内繁殖,避免了由死菌导致的假阳性结果。此法无需昂贵仪器,试剂价格便宜,技术水平要求低,具有快速、简便、安全等特点,但其检测抗酸杆菌阳性率与留取标本送检时间、留取量、送检过程是否存在影响结核分枝杆菌活细胞数目的因素、是否用药、病变部位、标本采集的可靠性、采集瓶的无菌性、噬菌体浓度、感染时间、杀毒剂灭活条件以及标本的预处理情况等有关^[7-12]。

综上所述,PhaB 法具有较高的敏感性、特异性,漏检率低,具有快速、简便、特异、准确、技术要求低、不需特殊仪器设备等特点,因 PhaB 法检测的为活菌,为临床结核病提供了快速诊断依据,便于在基层医疗机构推广应用。PhaB 法也存在诸多影响因素,检测结果并非绝对准确,可作为诊断结核病和用药指导的初筛实验。如何消除影响因素,有待于进一步探讨。

参考文献

- [1] 中国防痨协会基础专业委员会. 结核病诊断实验室检验规程 [M]. 北京:中国教育文化出版社,2006.
- [2] 张立,王永其. 涂片镜检肺部疾病诊断中的应用[J]. 医学综述, 2008,14(24):3778-3781.
- [3] 谢清波,陈忠秀,黄土敏. 夹层杯集菌法与直接涂片法检测抗酸杆菌的应用比较[J]. 当代医学,2012,18(25):61.
- [4] 李志媛,冯爽,张立,等. 噬菌体法快速检测痰中结核分枝杆菌的临床应用[J]. 天津医药,2010,38(1):68-69.
- [5] 张周云,熊国亮. 噬菌体生物扩增法对结核病临床诊断的意义[J]. 实验与检验医学,2010,28(1):34-35.
- [6] 刘百歌,刘鹏,郑岚,等. 噬菌体裂解法快速检测胸水中结核分枝杆菌的研究[J]. 中国实验诊断学,2009,13(4):533-534.
- [7] 吴俐健,张含玉,王笑歌,等. 噬菌体生物扩增法检测结核性液体标本的临床应用价值[J]. 山西医药杂志,2011,40(4):336-338.
- [8] 夏洪娇,刘剑荣,彭可君,等. 噬菌体生物扩增法结合荧光染色法快速检测结核分枝杆菌[J]. 临床和实验医学杂志,2008,7(11):80-81.
- [9] 于霞,黄海荣,朱利娜. 噬菌体生物扩增法检测临床标本中结核分枝杆菌的系统评价[J]. 中国实验诊断学,2011,15(4):582-586.
- [10] 靳安佳,王洁,胡忠义,等. 噬菌体生物扩增法检测肺结核患者痰标本临床应用研究[J]. 中华检验医学杂志,2005,28(8):807-808.
- [11] 辛茶香,诸纪芬,方育霞. 噬菌体生物扩增法检测肺结核患者痰标本的临床应用价值[J]. 现代预防医学,2012,39(8):1990-1991.
- [12] 曹青山,王改,王金绳,等. 噬菌体生物扩增法痰液检查对肺结核诊断价值的临床观察[J]. 中国误诊学杂志,2007,7(27):6502-6503.