

结核菌快速检测技术进展

徐 荒 朱 红

结核病发病率近年呈上升趋势。据 WHO 统计,全世界目前约有 20 亿人感染结核,每年新发病例 890 万,死亡 160 万^[1]。我国是世界上 22 个结核病高负担国家之一,疫情仅次于印度居世界第 2 位,每年新发病人 145 万人,死亡 20 余万人,是其他传染病死亡人数总和 2 倍^[2]。不典型结核和耐药菌增多。由于涂片镜检平均检出率只有 25% ~ 35%,2008 年我国出入境人员痰涂片阳性率 17.86%^[3],传统培养方法需 2 ~ 3 个月,给结核病诊断、治疗药物选择和防控带来一定困难。结核病快速诊断方法研究成为世界重点关注课题。近年来快速诊断方法出现给不典型和耐药结核诊断和治疗提供了很大帮助。下面就结核菌及耐药性快速检测技术作简单介绍。

一、结核杆菌培养

1. 液体培养方法:结核杆菌在液体培养基中生长较快,方法、设备简单。WHO 鼓励中低收入国家使用此方法。

分枝杆菌快速手工培养(分枝杆菌生长指示管, the mycobacteria growth indicate tube, MGIT):原理是在米德尔布鲁克(Middlebrook)7H9 肉汤培养基试管底部嵌有荧光指示器,有氧存在时指示器熄灭,结核菌生长时消耗培养基中溶解氧,指示器发出橙色荧光。采用生长对照管和含抗结核药管 37℃ 同时培养,比较两管荧光即可得到细菌生长和药敏情况。无论对一线或二线药敏测试都简单、精确、有效^[1]。针对利福平和异烟肼敏感性检测精确性 > 90%。7 ~ 14 天得到结果。The BACTEC MGIT960 自动培养系统(the BACTEC MGIT960 automated system):原理同 MGIT,但培养和荧光信号读取按事先设计程序由仪器自动控制^[1]。荟萃分析此系统测定结果有较高精确性和预测值,用于二线药敏实验能与 BACTEC TB - 460 放射测量法(radiometric method)媲美。检测氧氟沙星此法敏感性和特异性均为 100%。本系统优点同 MGIT,但设备需要一定资金,样品量受仪器最大

工作负荷限制^[4,5]。适合于高负担低资源国家中小规模实验室应用。

The BacT/Alert 3D 系统(The BacT/Alert 3D system):采用改良 7H9 Middlebrook 肉汤培养基,试管底部装有一比色传感器,能感受细菌代谢产生的 CO₂,由绿色变成黄色,仪器自动持续监测颜色变化。该系统用于结核菌快速培养,药敏检测灵敏度和特异度都较好^[1]。但对二线药敏试验报道不足。

The Versa TREK 系统(The Versa TREK system):采用富含 7H9 Middlebrook 肉汤培养基,细菌代谢使培养容器内压力变化,通过监测压力变化了解细菌生长情况。培养和检测过程在同一装置内完成。有关其应用报道不多,实用性有待进一步评估^[1]。

显微镜观察肉汤 - 药敏测试[the microscopic observation broth - drug susceptibility assay (MODS)]:结核杆菌生长过程中形成特征性“绳带”(cord)。采用含或不含抗生素 7H9 液体培养基在 24 孔板中培养细菌,利用倒置显微镜,40 倍镜头观察结核菌特征性 cord 形成情况。荟萃分析 MODS 测试利福平和异烟肼敏感性,直接用于临床涂阳痰标本敏感性 96% 和 92%,特异性 96%。平均 21 天 100% 得到结果,便宜,但安全性较差^[4,6,7]。

比色氧化还原指示剂法(the colorimetric redox indicator methods):将氧化还原指示剂放入含或不含抗结核药培养基中,细菌生长时培养基颜色发生改变,比较两管培养物颜色能判断结核菌是否耐药。方法简单、快捷,培养 7 ~ 8 天肉眼能观察结果。荟萃分析表明耐药性监测有较高敏感度和特异度^[1]。氧化还原指示剂有多种,可根据不同药物选择相对敏感指示剂。

载玻片培养技术(slide - culture technique):在载玻片培养基础上改进而来一种快速培养技术^[1]。将 10 个样品涂片到灭菌载玻片一端,将玻片纵切成两半,放入装有 7ml 液体培养基培养瓶里,3 瓶不含抗结核药作为对照,其他瓶含抗结核药做药敏试验,置冰箱过夜,次日将培养瓶移入培养箱 37℃,培养 10

天。载玻片取出之前 85℃ 加热 30min 热固定干燥, 作萁 - 尼 (Ziehl - Neelsen) 染色, 显微镜 100 倍镜头观察抗酸菌落。当对照组有最少一个菌落, 药敏组只要有菌落出现即耐药。此法精确度利福平和异烟肼分别 96% 和 90%, 其他药物略低。原理简单, 结果明确, 但操作繁杂, 安全性较差。

2. 固体培养方法: (1) TK 培养基 (Medium) 结核菌快速培养系统: 生长中结核杆菌代谢活动使培养基颜色改变, 在细菌菌落形成前根据培养基颜色鉴定是否分枝杆菌生长。方法简单、经济, 比常规培养缩短 10 天出结果^[1]。能排除常见细菌污染, 鉴别结核与非结核分枝杆菌。规范应用条件和完善质量控制, 将是一种实用、有前途的方法。(2) 噬菌体法检测结核杆菌: 1) 噬菌体生物扩增法快速检测结核菌: 1997 年由 Wilson 等开发。基本原理是将特异性裂解分枝杆菌噬菌体引入含有结核分枝杆菌待测样品中, 噬菌体能感染活分枝杆菌, 未进入菌体多余噬菌体被随后加入的杀毒剂灭活, 已进入菌体内噬菌体不受影响。噬菌体在感染分枝杆菌内大量繁殖, 并将菌体裂解, 释放出大量子代噬菌体, 可感染随后加入的指示细胞, 并将其裂解, 在琼脂平板培养基上出现透明噬菌斑。根据噬菌斑有无和多少来判断标本中有无活结核分枝杆菌感染或其他几种为数不多的非结核分枝杆菌。FASTPlaqueTB (Biotec Laboratories Ltd, Ipswich, UK) 就是基于这种原理设计的商业试剂盒, 3 天能得到结果。用于诊断敏感性略高于涂片染色, 但不及传统培养。噬菌体 D29 宿主比较宽泛, 需要确认试验排除其他分枝杆菌感染。FASTPlaqueTBRif (Biotec Laboratories Ltd) 一种商业化测定利福平敏感性试剂盒。荟萃分析表明检测对利福平敏感性商业化试剂敏感度 81% ~ 100%, 特异度 73% ~ 100%。而实验室内试剂敏感度 88% ~ 100%, 特异度 84% ~ 100%^[8]。阳性预测值 92%, 阴性预测值 95%, 特异度为 99.0%, 灵敏度 70.3%。快捷, 2 天获得结果, 无需昂贵设备。但存在少数假阳性。2) 萤光素酶报告噬菌体 (Luciferase reporter phages, LRP): 将整合有萤光素酶基因的噬菌体感染结核分枝杆菌, 萤光素酶基因得到表达, 在菌内三磷酸腺苷 (ATP) 存在情况下, 催化培养基中萤光素底物, 细菌发出萤光。通过胶片感光或光度计检测结果。萤光素酶报告噬菌体能精确检测活分枝杆菌感染, 7 天得到结果, 但敏感性不如镜检。另外需要在测试中加入 p - 硝基 - a - 乙酰氨基 - b - 羟基苯丙酮 (p - nitro - a - acetyl amino - b

- hydroxy propiophenone, NAP) 做确认试验排除非结核分枝杆菌感染造成假阳性结果。据报道整合了萤光素酶报告基因的 Che12 和 TM4 噬菌体可用于检测活动期和休眠期结核杆菌^[9]。用于药敏检测得到结果时间利福平为数小时, 乙胺丁醇、异烟肼、环丙沙星为 2 ~ 3 天。LRP - NAP 实验证实 LRP 用于鉴定结核杆菌和 84 份临床标本药敏实验, 敏感性和特异性分别 97% 和 100%。结果一致率达到 98.65%。光度计检测仪器昂贵, 胶片感光便宜, 适合高负担设备条件不足的实验室用。

3. 硝酸盐还原酶测定 (the nitrate reductase assay, NRA): 结核杆菌能将硝酸盐转变成亚硝酸盐, 产生颜色变化。是一种快速药敏试验方法。可直接用于痰标本检测, 价廉。测试利福平、异烟肼、链霉素、乙胺丁醇敏感度分别为 94% ~ 100%、> 92%、100%、93%; 特异度为 94% ~ 100%、> 92%、100%、100%, 23 天 100% 得到结果^[6, 7, 10 - 13]。

E 实验 (the e - test): 采用一种浸有不同浓度梯度抗结核药塑料条放在接种有结核杆菌琼脂培养基表面直接阅读生长抑制区的一种快速药敏实验方法。目前除检测利福平结果稍好外, 其他药物结果不理想^[11]。可同时测试多种药物。但易污染, 假阳性和阴性率较高, 重复实验使费用增加, 技术有待改进^[14]。

二、核酸扩增技术 (nucleic acid amplification test, NAA)

1. 检测临床标本中结核杆菌: 7 种商业试剂盒: Amplicor MTB, Cobas Amplicor MTB, BDProbeTecET, E - MTD, LCx, Genotype Mycobacteria Direct Test, Gen - Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test (后两种获得美国 FDA 认证) 平均敏感度和特异度分别为痰涂阳标本 93% ~ 98%, 71% ~ 96%; 痰涂阴标本 57.0% ~ 79.3%, 97% ~ 99%^[15 - 17]。与标本菌含量、存放时间、处理过程、是否污染, 是否存在扩增抑制剂、扩增方法、检测方法有关。突出优点是快捷, 但仪器和试剂较贵。目前一种恒温多聚酶链反应 (PCR) 方法所需设备简单, 操作简便, 1 ~ 2h 得到结果, 如: 交叉引物扩增, 环介导等温扩增灵敏度高于常规 PCR, 肉眼观察结果^[18 - 19]。

2. 鉴定分枝杆菌种类: 传统鉴定菌种依靠生化方法, 繁琐、费时、不精确。高压液相 (HPLC) 法设备昂贵。Accuprobe 试剂盒利用 DNA 探针, 直接鉴定临床标本。可以辨别复合结核杆菌组 (*M. tuberculosis* complex), 鸟结核分枝杆菌 (*M. avium*), 胞内分枝杆

菌(*M. intracellulare*), 堪萨斯分枝杆菌(*M. Kansa-sii*), 戈登氏分枝杆菌(*M. gordonae*) 5 种分枝杆菌。酶切分析分枝杆菌 PCR 产物基因多态性位点或高变化区域可以鉴别 30 多种分枝杆菌。

3. 检测与耐药有关结核菌基因突变: 耐药产生绝大多数与结核菌基因突变有关。鉴定突变基因能确定结核菌是否耐药。市面上试剂盒测试利福平的效果高于其他抗结核药。如 Genotype MTBDR *plus* 试剂盒测试利福平、异烟肼、多种药物抵抗方法敏感度分别为 99% ~ 100%、88% ~ 96%、86%; 特异度 94% ~ 99%、100%、100%^[5,7]。荟萃分析商业探针敏感度为 95%, 特异度为 100%^[15]。单链构象多态性 PCR 对利福平抗药菌检测敏感度 79%, 特异度 96%。

三、展 望

综上所述, 结核菌快速培养方法简单, 便宜, 结果可靠。但仍需要 10 ~ 20 天获得结果。核酸扩增几小时或 1 ~ 2 天得到结果, 敏感度和特异度较高, 表现出强大的鉴别诊断能力。但仪器试剂价格较贵。实验室可根据本身条件选择不同的检测方法。

结核分枝杆菌快速检测技术出现对结核病诊断提供了很大的帮助。但各种技术仍然存在一定缺陷, 需要进一步完善。分枝杆菌快速手工培养和 The BACTEC MGIT960 自动培养系统直接用于临床痰标本的检测还需要大量试验评估效果。MODS 用于二线抗结核药敏感性检测还需大量实验证实其应用价值。另外此方法的安全性需要改进。噬菌体扩增技术用于利福平以外其他抗结核药敏感性检测还有待研究。载玻片培养、E 实验等其他快速培养技术和核酸扩增技术都存在需要进一步改进和完善的地方。改进完善已有的检测技术和寻找快速、可靠、经济的新检测方法和技术是一个长期的研究目标, 还有很多工作需要我们去做的。

参考文献

- 1 Palomino JC, Martin A, Groll AV, *et al.* Rapid culture - based methods for drug - resistance detection in mycobacterium tuberculosis[J]. J of Microbiol Methods, 2008, 75: 161 - 166
- 2 陈维广. BiPAP 呼吸机对 COPD 合并 II 型呼吸衰竭的治疗价值探讨[J]. 国际医药卫生导报, 2008, 14(3): 17 - 19
- 3 王健, 方筠, 张琳, 等. 上海出入境人员结核病实验室检测情况分析[J]. 中国国境检疫杂志, 2010, 33(1): 15 - 17
- 4 Devasia RA, Blackman A, May C, *et al.* Fluoroquinolone resistance in Mycobacterium tuberculosis: an assessment of MGIT 960, MODS and nitrate reductase assay and fluoroquinolone cross - resistance[J]. J of Antimicrobial Chemother, 2009, 63, 1173 - 1178

- 5 Bwanga F, Joloba ML, Haile M, *et al.* Evaluation of seven tests for the rapid detection of multidrug - resistant tuberculosis in Uganda [J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2010, 14(7): 890 - 895
- 6 Bwanga F, Haile M, Joloba ML, *et al.* Direct nitrate reductase assay versus microscopic observation drug susceptibility test for rapid detection of MDR - TB in Uganda[J]. PLoS ONE, 2011, 6(5): e19565
- 7 Bwanga F, Hoffner S, Haile M, *et al.* Direct susceptibility testing for multi drug resistant tuberculosis: a meta - analysis[J]. BMC Infectious Diseases, 2009, 9: 67 - 82
- 8 Minion J, Pai M. Bacteriophage assays for rifampicin resistance detection in mycobacterium tuberculosis: updated meta - analysis[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2010, 14(8): 941 - 951
- 9 Dusthacker A, Kumara V, Subbianb S, *et al.* Construction and evaluation of luciferase reporter phages for the detection of active and non - replicating tubercle bacilli[J]. J Microbiol Methods, 2008, 73(1): 18 - 25
- 10 Gupta A, Anupurba S. Direct drug susceptibility testing of mycobacterium tuberculosis against primary anti - TB drugs in northern India [J]. J Infect Dev Ctries, 2010, 4(11): 695 - 703
- 11 Shikama ML, Ferro e Silva R, Villela G, *et al.* Multicenter study of nitrate reductase assay for rapid detection of rifampin - resistant M. tuberculosis[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2009, 13(3): 377 - 380
- 12 Martin A, Panaiotov S, Portaels F, *et al.* The nitrate reductase assay for the rapid detection of isoniazid and rifampicin resistance in Mycobacterium tuberculosis: a systematic review and meta - analysis[J]. J of Antimicrobial Chemother, 2008, 62: 56 - 64
- 13 Gupta A, Anupurba S. Direct drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis against primary anti - TB drugs in northern India [J]. J Infect Dev Ctries, 2010, 4(11): 695 - 703
- 14 Verma JS, Rawat D, Hasan A, *et al.* The use of E - test for the drug susceptibility testing of mycobacterium tuberculosis - a solution or an illusion? [J]. Indian J of Med Microbiol, 2010, 28(1): 30 - 33
- 15 Cho SN. Current issue on molecular and immunological diagnosis of tuberculosis[J]. Yousi Medical Journal, 2007, 48(3): 347 - 359
- 16 Laraque F, Griggs A, Slopen M, *et al.* Performance of nucleic acid amplification tests for diagnosis of tuberculosis in a large Urban setting [J]. Clin Infect Dis, 2009, 49: 46 - 54
- 17 Syre H, Myneedu VP, Arora VA, *et al.* Direct detection of mycobacterial species in pulmonary specimens by two rapid Amplification tests, the Gen - probe Amplified mycobacterium tuberculosis direct test and the Genotype mycobacteria direct test[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(11): 3635 - 3639
- 18 Fang R, Li X, Hu L, *et al.* Cross - priming amplification for rapid detection of mycobacterium tuberculosis in sputum specimens [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(3): 845 - 847
- 19 Aryan E, Makvandi M, Farajzadeh A, *et al.* A novel and more sensitive loop - mediated isothermal amplification assay targeting IS6110 for detection of mycobacterium tuberculosis complex[J]. Microbiol Res, 2010, 165: 211 - 220

(收稿: 2011 - 06 - 04)

(修回: 2011 - 06 - 23)