

管炎、肺炎、肺心病、肺栓塞、肺癌患者血浆 DD 水平均有不同程度增高,肺栓塞和肺癌患者血浆 DD 水平高于其他肺部良性疾病患者,提示凝血及纤溶的异常在肺部炎症性疾病及肿瘤的发生发展中具有重要作用<sup>[24]</sup>。有研究表明,李三中<sup>[25]</sup>通过检测非妊娠妇女组 I、健康临产妇女组 II 和子痫前期组 III 的 DD 含量,健康临产妇女血浆 DD 水平高于非妊娠妇女( $P < 0.05$ ),子痫前期患者血浆 DD 水平高于健康临床妇女和非妊娠妇女( $P < 0.05$ ),表明产前动态监测血浆 DD 水平对预防、诊断和治疗妊娠高血压具有重要价值。此外,系统性红斑狼疮、糖尿病、肾病综合征等疾病患者,尤其在伴有微血栓形成时,血浆 DD 水平均增高。

#### 4 展 望

随着检测方法的不断发展,血浆 DD 检测将成为一种简便、快速、灵敏度高、特异性强的检测项目,临床应用势必更加广泛。血浆 DD 作为判断凝血与纤溶平衡失调的指标,将日益受到重视,快速、准确的血浆 DD 检测结果对血栓栓塞性疾病及继发性纤溶活性增强类疾病的诊断与治疗及进一步扩大研究领域都具有重要价值。

#### 参考文献

[1] 陈化禹. D-二聚体及其测定方法探讨[J]. 实用医技杂志, 2007, 14(12): 1567-1568.

[2] 王梅, 王金良. D-二聚体检测的临床应用进展[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(1): 82-84.

[3] 董怀平, 李庆敏. D-二聚体的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(12): 1134-1135.

[4] 吕程, 廖启洪, 刘怡伶, 等. 超敏 C-反应蛋白及 D-二聚体与冠心病的关系[J]. 血栓与止血学, 2008, 14(5): 216-217.

[5] 杜同信, 王自正, 傅雷, 等. 血清真胰岛素、脂联素、同型半胱氨酸、高敏 C 反应蛋白水平变化与发生冠心病的相关性分析[J]. 标记免疫分析与临床, 2008, 15(4): 82-85.

[6] 徐希国. 冠心病患者血浆超敏 C-反应蛋白、D-二聚体水平测定及分析[J]. 山东医药, 2009, 49(23): 42-43.

[7] 胡云建, 陶凤荣, 王厚东, 等. D-二聚体测定在肺栓塞诊断中的应用价值[J]. 中华检验医学杂志, 2002, 25(2): 95-97.

[8] 郭雪梅. 快速 D-二聚体在诊断静脉血栓形成中应用进展[J]. 中国实验诊断学, 2000, 4(1): 41-43.

[9] 毛善英, 张佩莉, 卢兴国. 血栓性脑梗死患者血浆组织因子和组织

因子途径抑制物水平的变化[J]. 浙江医学, 2001, 23(9): 515-516.

[10] 郭泽兴. 脑梗死患者凝血和纤溶指标检测的临床意义[J]. 血栓与止血学, 2009, 15(4): 182-183.

[11] 杨栋梁, 杨晋荣. 血浆 D-二聚体水平检测对临床血栓性疾病阴性预测值的意义评价[J]. 实用医技杂志, 2011, 18(3): 274-275.

[12] 杨雄, 刘凤彬, 田宝详. 血清 D-二聚体水平对烧伤病人病情程度判断的临床意义[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(7): 1130-1131.

[13] 雷树红, 于勇, 蔺静, 等. D-二聚体检测在烧伤患者患者静脉血栓筛查中的意义[J]. 感染、炎症、修复, 2009, 10(4): 246-247.

[14] 李家增. 止血异常与恶性肿瘤[J]. 血栓与止血学, 2006, 12(2): 88-89.

[15] 李萍, 欧阳建, 周荣富, 等. 恶性血液病患者血浆纤维蛋白原、D-二聚体、抗凝血酶的变化[J]. 血栓与止血学, 2010, 16(1): 24-25.

[16] 华佳叶, 冯莹, 庞静, 等. 血液肿瘤患者中血管性血友病因子、D-二聚体、抗凝血酶检测的意义[J]. 血栓与止血学, 2006, 12(3): 123-1124.

[17] 李效敏, 孙慧, 阎玲. 川芎嗪治疗脑梗死的临床机制研究[J]. 中国药房, 2005, 16(8): 610-612.

[18] 陈汝兴. 应加强脑血管疾病活血化瘀治疗的研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2007, 7(3): 131-132.

[19] 冯晋兴. 丹参抗缺氧缺血性脑损伤的实验药理学研究进展[J]. 陕西医学杂志, 2007, 36(1): 45-47.

[20] 楼正家, 诸葛丽敏, 郑文龙, 等. 川芎嗪对心肺复苏后脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15(5): 299-301.

[21] 苏艳平, 赵艳, 顾伟英, 等. 血浆 D-二聚体水平与急性白血病的预后分析[J]. 临床和实验医学杂志, 2010, 9(32): 1773-1775.

[22] 张美云, 李晓凤, 姚宝平, 等. 消化系统恶性肿瘤的放、化疗、手术前后血浆 D-二聚体的变化及临床意义[J]. 现代预防医学, 2010, 37(1): 177-178.

[23] 李宏波, 徐爱芳. D-D 二聚体检测在肝病诊治中的意义[J]. 浙江预防医学, 2007, 19(6): 85-86.

[24] 陈渝宁, 孟冬娅, 方秀菊. D 二聚体定量检测在肺部疾病的意义[J]. 实用诊断与治疗杂志, 2008, 22(1): 4-5.

[25] 李三中. 妊娠高血压疾病妇女 D-二聚体及凝血指标检测的意义[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(4): 386-387.

(收稿日期: 2011-02-11)

#### • 综 述 •

## 结核分枝杆菌快速药敏实验的研究进展

曹德明<sup>1</sup>, 石 华<sup>2</sup>综述, 郭微媛<sup>2△</sup>审校

(1. 黑龙江护理高等专科学校, 哈尔滨 150036; 2. 哈尔滨医科大学附属二院检验科, 哈尔滨 150086)

关键词: 分枝杆菌, 结核; 微生物敏感性试验; 研究

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 11. 028

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)11-1204-03

结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)引起的结核病是常见的人类传染病之一。约三分之一的世界人口曾

经感染 MTB, 亚洲地区感染者占全世界的三分之二。中国是全球 22 个结核病高发国之一, 发病人数居世界第 2 位, 仅次于

△ 通讯作者, E-mail: guoweiyuan2006@sohu. com.

印度<sup>[1]</sup>。全国第 4 次结核病流行病学抽样调查显示,中国结核病疫情有高患病率、高耐药率、低递减率和低病例发现率等特点<sup>[2-3]</sup>。多重耐药结核分枝杆菌(multi-drug resistant MTB, MDR-MTB)的流行扩散使结核病的治愈率大幅下降,在初治患者中仅为 40%左右,复治患者只有约 20%,严重影响了世界卫生组织结核病控制策略的实施及千年发展目标的实现<sup>[4-5]</sup>。控制 MDR-MTB 的关键在于早期诊断耐药株,及时制定针对性治疗方案,传统 MTB 药物敏感实验有生长依赖性,且耗时长(需要 6~8 周才能报告结果),不能及时指导临床用药。因此,快速、敏感的药敏实验的研究成为全球关注的焦点。本文主要从快速的表型药敏实验和分子药敏实验两个方面进行综述。

## 1 表型药敏实验

**1.1 氧化还原指示剂法** 该法又称比色法。检测原理为在液体培养基中加入各种不同浓度抗结核药物及氧化还原指示剂,加入标本后孵育一定时间,根据指示剂颜色改变判断标本中是否存在耐药 MTB,指示剂发生还原反应时提示有 MTB 生长,说明该菌株在此药物浓度下对此种药物耐药。常用指示剂有 XTT、MTT、刃天青和阿拉马蓝等。此法不需特殊仪器,成本低廉,平均 10 d 即可回报结果,灵敏度和特异度分别为 91%和 71%,特异性稍弱,容易因杂菌污染而呈假阳性<sup>[6-8]</sup>。

**1.2 噬菌体生物扩增法**(phage amplified biologically assay, PhaB) 分枝杆菌噬菌体 D29 能感染活的分枝杆菌,未进入感染菌体内的噬菌体被随后加入的杀毒剂灭活,已进入菌体内的噬菌体受菌体保护而大量增殖,最终将菌体裂解,在琼脂平板上出现透明的噬菌斑。加入抗结核药物的培养基内由于药物对结核菌的抑制,噬菌体不能进入菌体,导致噬菌斑不能形成,故而表现为敏感;反之,有噬菌斑形成的则为耐药菌株。该方法更为快速,48 h 内可回报结果<sup>[9-10]</sup>。但噬菌体 D29 既可感染缓慢生长的 MTB,也可感染少数几种快速生长的分枝杆菌,因此,该法特异性不强;而且受标本中 MTB 含量的影响,限制了在痰涂片标本中的直接应用。

**1.3 显微镜观察药物敏感度检测技术**(microscopic observation drug susceptibility, MODS) MODS 是一种对 MTB 进行显微镜形态学观察和耐药性检测的液态培养方法。在液体培养基中,MTB 能够分泌索状因子,使其呈现特征性索状结构,通过倒置显微镜观察该结构可确定是否有 MTB 生长,以及对药物是否敏感。以传统的吕氏培养法作为金标准,有学者以 MODS 检测了 66 株 MTB 对 4 种一线抗结核药物:链霉素、异烟肼、利福平及乙胺丁醇的耐药情况,其敏感性分别为 97.0%、90.9%、95.5%和 86.4%,说明 MODS 在 MDR-MTB 的检测中有良好的应用前景<sup>[11-12]</sup>。

## 2 分子药敏实验

随着分子生物学技术的发展,MTB 耐药的分子机制研究逐步深入,相关耐药基因的直接检测逐渐成为研究热点。编码 MTB RNA 聚合酶  $\beta$  亚基的 rpoB 突变使该酶活性改变,不能与利福平结合,因而表现为对利福平耐药。86%的临床分离 MTB 耐药株存在 rpoB 突变<sup>[7,13]</sup>。由于异烟肼和利福平是临床最常选用的抗结核药,约 90%的 MTB 耐利福平同时也对异烟肼耐药,因此 rpoB 突变检测可作为 MDR-MTB 的筛查实

验<sup>[8,14-15]</sup>。katG 及 inhA 调控区域的突变分别与异烟肼的高、低水平耐药密切相关,但各国报道的突变率为 50%~90%不等,说明存在种族及地区差异<sup>[16]</sup>。MTB 对其他药物的耐药机制出现频率相对较低,在分子药敏实验中的作用并不十分突出。以上述基础理论研究为基础,已建立了许多检测耐药 MTB 突变基因的分子药物敏感实验,无需培养,可直接检测各种标本,故又称为直接药敏实验。

**2.1 聚合酶链反应-限制性片段长度多态性**(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 分析 PCR-RFLP 通过检测 DNA 在限制性内切酶切割后形成的特定 DNA 片段的大小判断基因是否有突变。不足之处是只能根据已知突变位点选择限制性内切酶,因此目前常用于 katG315 和 embB306 突变检测<sup>[10,17]</sup>。PCR-RFLP 分析对样品纯度要求高,样品用量大,多态性水平几乎完全依赖于限制性内切酶的种类和数量,加之步骤繁琐、工作量大、成本较高,不适用于临床样本耐药性检测。

**2.2 DNA 测序** 该法是检测基因突变的金标准,常作为其他方法的验证实验,不适用于分析数量较大的临床标本。

**2.3 PCR-单链构象多态性**(PCR-single strand conformational polymorphism, PCR-SSCP) 分析 在低温条件下,单链 DNA 呈现一种由内部分子相互作用形成的二级结构,单个碱基突变即可引起 DNA 在非变性凝胶中迁移率的改变。在对 163 株耐吡嗪酰胺 MTB 的检测中,PCR-SSCP 的灵敏度和特异度分别为 85%和 96%<sup>[12,18-19]</sup>。PCR-SSCP 仅能检测基因是否存在突变,不能说明为何种突变,需通过 DNA 测序以证实。Negi 等<sup>[13]</sup>用 PCR-SSCP 发现与利福平耐药有关的 rpoB 突变位点最常见于第 516、526 和 531 位密码子,这为设计以检测耐药基因点突变为基础的分子药敏实验提供了线索。

**2.4 线性探针技术**(line probe assay, LiPA) LiPA 利用数个寡核苷酸探针,分别扩增与耐药有关的基因。Hain Lifescience 生产的 Genotype MTBDR 和 Genotype MTBDRplus 就是依据此原理而建立的,可检测 rpoB、katG 及 inhA 突变,从而预测菌株是否对利福平和异烟肼耐药。由于基因突变的复杂性,该方法需使用的寡核苷酸探针数目较多,操作复杂,且费用较高,不适用于在基层实验室开展。

**2.5 DNA 芯片技术** 该技术易于自动化,能快速、特异地同时检测多种 MTB 耐药基因,但费用昂贵。

## 3 结 语

随着分子生物学的飞速发展,人们对结核病的诊断、治疗有了新的认识,检测手段也有了新的发展,但分子药敏实验普遍存在操作繁琐、痰涂片阴性、培养阳性标本检测灵敏度低等不足<sup>[20-21]</sup>。因此,简化分子药敏实验操作步骤,提高灵敏度和特异度成为当务之急。与传统的 MTB 药敏实验相比,分子药敏实验不需对活菌进行培养,生物安全性高,且极为快速,1~2 d 即可回报结果,对指导合理制定治疗方案、预防耐药 MTB 的流行性扩散具有重要意义<sup>[22-23]</sup>。

## 参考文献

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis control: a short update to the 2009 report[R]. Geneva: WHO, 2009.

- [2] 全国结核病流行病学抽样调查技术指导组,全国结核病流行病学抽样调查办公室. 2000 年全国结核病流行病学抽样调查报告[J]. 中国防痨杂志, 2002, 24(2): 65-108.
- [3] Espinal MA, Kim SJ, Suarez PG, et al. Standard short-course chemotherapy for drug-resistant tuberculosis: treatment outcomes in 6 countries[J]. JAMA, 2000, 283(19): 2537-2545.
- [4] Martin A, Cubillos-Ruiz A, von Groll A, et al. Nitrate reductase assay for the rapid detection of pyrazinamide resistance in Mycobacterium tuberculosis using nicotinamide[J]. J Antimicrob Chemother, 2008, 61(1): 123-127.
- [5] Traore H, Ogwang S, Mallard K, et al. Low-cost rapid detection of rifampicin resistant tuberculosis using bacteriophage in Kampala, Uganda[J/OL]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2007[2010-12-05]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1779803/>.
- [6] Seagar AL, Prendergast C, Emmanuel FX, et al. Evaluation of the GenoType Mycobacteria Direct assay for the simultaneous detection of the Mycobacterium tuberculosis complex and four atypical mycobacterial species in smear-positive respiratory specimens[J]. J Med Microbiol, 2008, 57(5): 605-611.
- [7] Tracevska T, Jansone I, Broka L, et al. Mutations in the rpoB and katG genes leading to drug resistance in Mycobacterium tuberculosis in Latvia[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(10): 3789-3792.
- [8] 申阿东, 杨永弘, 江载芳. 结核分支杆菌耐药性的分子机制研究进展[J]. 国际儿科学杂志, 2006, 33(3): 153-155.
- [9] Vilch ze C, Wang F, Arai M, et al. Transfer of a point mutation in Mycobacterium tuberculosis inhA resolves the target of isoniazid[J]. Nat Med, 2006, 12(9): 1027-1029.
- [10] Ahmad S, Jaber AA, Mokaddas E. Frequency of embB codon 306 mutations in ethambutol-susceptible and-resistant clinical Mycobacterium tuberculosis isolates in Kuwait[J]. Tuberculosis, 2007, 87(2): 123-129.
- [11] Marttila HJ, Makinen J, Marjamaki M, et al. Prospective evaluation of pyrosequencing for the rapid detection of isoniazid and rifampin resistance in clinical Mycobacterium tuberculosis isolates[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2009, 28(1): 33-38.
- [12] El Kh chine A, Henry M, Raoult D, et al. Detection of Mycobacterium tuberculosis complex organisms in the stools of patients with pulmonary tuberculosis[J]. Microbiology, 2009, 155(7): 2384-2389.
- [13] Negi SS, Singh U, Gupta S, et al. Characterization of RPO B gene for detection of rifampicin drug resistance by SSCP and sequence analysis[J]. Indian J Med Microbiol, 2009, 27(3): 226-330.
- [14] 郭靛, 范红, 康梅, 等. 结核分支杆菌的实验室快速诊断技术[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(9): 807-808, 811.
- [15] Mba Medie F, Ben Salah I, Drancourt M, et al. Paradoxical conservation of a set of three cellulose-targeting genes in Mycobacterium tuberculosis complex organisms[J]. Microbiology, 2010, 156(5): 1468-1475.
- [16] Reddy S, Brown T, Drobniewski F. Detection of Mycobacterium tuberculosis from paraffin-embedded tissues by INNO-LiPA Rif. TB assay: retrospective analyses of health protection agency national mycobacterium reference laboratory data[J]. J Med Microbiol, 2010, 59(5): 563-566.
- [17] Pulimood AB, Peter S, Rook GW, et al. In situ PCR for Mycobacterium tuberculosis in endoscopic mucosal biopsy specimens of intestinal tuberculosis and crohn disease[J]. Am J Clin Pathol, 2008, 129(6): 846-851.
- [18] Grotzke JE, Siler AC, Lewinsohn DA, et al. Secreted immunodominant Mycobacterium tuberculosis antigens are processed by the cytosolic pathway[J]. J Immunol, 2010, 185(7): 4336-4343.
- [19] Leyten EM, Prins C, Bossink AW, et al. Effect of tuberculin skin testing on a Mycobacterium tuberculosis-specific interferon-gamma assay[J]. Eur Respir J, 2007, 29(6): 1212-1216.
- [20] Soborg B, Ruhwald M, Hetland ML, et al. Comparison of screening procedures for Mycobacterium tuberculosis infection among patients with inflammatory diseases[J]. J Rheumatol, 2009, 36(9): 1876-1884.
- [21] Torrelles JB, DesJardin LE, MacNeil J, et al. Inactivation of Mycobacterium tuberculosis mannosyltransferase pimB reduces the cell wall lipoarabinomannan and lipomannan content and increases the rate of bacterial-induced human macrophage cell death[J]. Glycobiology, 2009, 19(7): 743-755.
- [22] Jadaun GPS, Agarwal C, Sharma H, et al. Determination of ethambutol MICs for Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium isolates by resazurin microtitre assay[J]. J Antimicrob Chemother, 2007, 60(7): 152-155.
- [23] Gupta D, Sharma S, Singhal J, et al. Suppression of TLR2-induced IL-12, reactive oxygen species, and inducible nitric oxide synthase expression by mycobacterium tuberculosis antigens expressed inside macrophages during the course of infection[J]. J Immunol, 2010, 184(5): 5444-5455.

(收稿日期: 2011-02-01)

## 医学统计工作的基本内容

按工作性质及其先后顺序, 可将医学统计工作分为实验设计、收集资料、整理资料、分析资料。实验设计是开展某项医学研究工作的关键, 包括医学专业设计和统计学设计, 医学专业设计的内容包括研究对象纳入和排除标准、样本含量、获取样本的方法、分组原则、观察(检测)指标、统计方法等。收集资料的方法包括各种实验、检测或调查, 要求资料完整、准确、及时、有足够数量、具有代表性和可比性等。整理资料包括原始资料的检查与核对、对资料进行分组与汇总等。分析资料即对资料进行统计学分析, 包括进行统计描述和统计推断。