

• 论 著 •

显微镜观察药物敏感性技术快速检测痰标本中结核分枝杆菌的研究^{*}

付佑辉¹, 张舒¹, 王海涛¹, 蔡峰¹, 范艳红¹, 胡忠义²

(1. 上海市第七人民医院呼吸内科, 上海 200137; 2. 同济大学附属上海市肺科医院, 上海市结核病[肺]重点实验室, 上海 200433)

摘要:目的 探讨显微镜观察药物敏感性技术(MODS)在痰液标本中结核分枝杆菌(MTB)的检测效果,以评价其临床应用价值。方法 收集 150 份患者临床痰标本,应用 MODS 技术、罗氏培养法进行 MTB 的检测,将两法的结果进行对比分析。结果 MODS 技术与罗氏培养法结果符合率为 77.8%,MODS 技术检测痰标本中 MTB 的敏感性为 93.3%,特异性为 70.0%,阳性预测值(PPV)为 60.8%,阴性预测值(NPV)为 95.4%,正确性为 77.8%。结论 MODS 技术检测痰标本中 MTB 具有快速、灵敏、简便等优点,可作为结核病细菌学快速检测的新方法之一。

关键词:痰液; 结核分枝杆菌; 显微镜观察药物敏感性技术

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.06.004 文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2016)06-0728-03

Evaluation microscopic observation drug susceptibility assay in detecting mycobacterium tuberculosis in sputum^{*}

Fu Youhui¹, Zhang Shu¹, Wang Haitao¹, Cai Feng¹, Fan Yanhong¹, Hu Zhongyi²

(1. Department of Respiratory Medicine, the Seventh People's Hospital of Shanghai, Shanghai 200137, China; 2. TB Key Laboratory of Shanghai, Shanghai Pulmonary Disease Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 200433, China)

Abstract:Objective To study the effect of microscopic observation drug susceptibility assay(MODS)for testing Mycobacterium tuberculosis in sputum, and to evaluate its clinical value. **Methods** A total of 150 sputum samples were collected from patients with pulmonary tuberculosis, and Mycobacterium tuberculosis were detected by Lowenstein-Jensen (L-J) method and MODS, and compared the results of the two methods. **Results** The concordance rates of the test results of sputum sample between MODS and L-J was 77.8%. The sensitivity and specificity of MODS were 93.3% and 70.0%, positive predictive value (PPV) was 60.8%, negative predictive value (NPV) was 95.4%, as well as accuracy by MODS was 77.8%. **Conclusion** MODS assay could be used as a rapid tuberculosis detection method, with rapid, sensitive, simple, and other advantages.

Key words: sputum; Mycobacterium tuberculosis; microscopic observation drug susceptibility assay

结核病仍然是严重威胁人类健康的重大传染病之一^[1]。目前结核病实验室检测技术仍不能满足临床需要,因此开展结核病实验室诊断新技术对结核病诊治具有重要意义。近年来 Caviedes 等建立了一种结核病快速诊断新技术——显微镜观察药物敏感度检测技术(MODS),据报道它具有简便、快速、灵敏、价廉的优点^[2-4]。笔者在 MODS 技术快速检测结核分枝杆菌(MTB)临床分离株方法学的基础上,进一步将其应用于患者痰液标本的结核分枝杆菌(MTB)的直接检测,并与传统的痰涂片抗酸染色法、罗氏培养法的结果进行分析比较,对结果不符的标本,采用 Gene-Probe 方法进行鉴定,以评价其检测效果及价值。

1 材料与方法

1.1 材料 90 例临床诊断肺结核患者痰液标本取自上海市第七人民医院呼吸内科住院患者及结核科门诊患者。60 例非肺结核的肺部疾病患者痰液标本取自本院呼吸科住院患者,包括肺炎、肺癌、慢性支气管炎、支气管扩张等疾病的患者。MTB 标准菌株(H37Rv)购自国家菌种保藏中心。

1.2 仪器与试剂 XDS-1B 倒置显微镜(重庆光电仪器有限公司),瑞士 24 孔 TPP 细胞培养板。硝基苯甲酸(Sigma 公

司)储存液的制备:取硝基苯甲酸纯药粉溶于 0.1 mol/L 氢氧化钠(NaOH)中,再取 0.1 mol/L 氯化氢(HCl)溶液调 pH 值至 6.5,加无菌蒸馏水制成 5 mg/mL 储存液,然后将上述配制好的储存液用无菌滤膜过滤、分装, -20℃ 保存。应用时取出,常温下溶解,倍比稀释,配置成浓度为 1 600 μg/mL 的工作液。液体培养基 Middlebrook 7H9 培养基干粉(美国 Difco 公司)和营养添加剂 OADC(Becton Dickinson 公司)。应用液为含 10% 营养添加剂的 Middlebrook 7H9 液体培养基。罗氏培养基,鉴定培养基按《结核病诊断细菌学检查规程》(规程)制备^[5]。

1.3 方法

1.3.1 MODS 技术检测痰液标本中 MTB 将 150 份患者痰液标本液化去污染处理引后的沉淀,用液体培养基洗涤 2 遍,用 6 mL 液体培养基重悬。运用 MODS 技术进行检测并同步将其接种至罗氏培养基进行培养和鉴定,每块 24 孔细胞培养板做 11 份痰液标本,自孵育后第 3 天开始用倒置显微镜进行观察(×10 目镜与×40 物镜),每天观察 1 次,第 15 天后每周观察 2 次,至 40 d 结束,具体操作方法见文献^[9],每批标本检测以 MTB 标准菌株 H37Rv 为质控株。

^{*} 基金项目:上海市浦东新区卫生和计划生育委员会卫生科技项目(PW2012B-4)。 作者简介:付佑辉,男,主治医师,主要从事呼吸系统疾病诊断研究。

1.3.2 罗氏培养和鉴定法 药物浓度分别为对硝基苯甲酸 0.5 μg/mL、噻吩-2-羧酸胍 5 μg/mL,参照文献[5]方法操作。

1.3.3 痰涂片抗酸染色法 参照文献[5]方法操作。

1.3.4 Gene-Probe 检测 Gene-Probe 诊断试剂和检测仪为美国 Gene-Probe 公司产品,购自生物梅里埃公司。按照仪器使用说明和试剂盒要求进行操作^[6-7]。

1.4 统计学处理 计算其灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值和符合率。对患者痰液标本中 MTB 应用 MODS 技术检测的结果与罗氏培养法测定的结果进行比较分析,采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MODS 技术与罗氏培养法所需时间比较 应用 MODS 技术对 150 份患者痰液标本中 MTB 进行检测,阳性检出时间自 5~28 d 不等,检测时间中位数为 11 d,而罗氏培养法检测时间中位数为 20 d,MODS 技术检测时间中位数短于罗氏培养法。

2.2 痰液标本三种检测方法检测结果比较 90 份临床确诊为肺结核患者的痰液标本涂片抗酸染色法、罗氏培养法及 MODS 检测的阳性结果分别为 24 份(26.7%)、30 份(33.3%)和 46 份(51.1%);60 份非结核的肺部疾病患者痰液标本 3 种方法检测的假阳性结果分别为 2 份(3.3%)、2 份(3.3%)和 1 份(1.7%);比较 3 种检测方法的阳性率,差异有统计学意义($\chi^2=12.42, P<0.05$)。比较 3 种方法的假阳性率,差异无统计学意义($\chi^2=0.54, P>0.5$),见表 1、2。90 份临床确诊为肺结核患者痰液标本的检测结果表明,MODS 技术与传统罗氏培养法结果符合率为 77.8%,如以罗氏培养、鉴定法为判断标准,则 MODS 技术检测 MTB 的敏感性为 93.3%(28/30)、特异性为 70%(42/60)、阳性预测值(PPV)为 60.8%(28/46)、阴性预测值(NPV)为 95.5%(42/44),差异均有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 MODS 技术和罗氏培养法结果比较(n)			
罗氏培养法	MODS		合计
	阳性	阴性	
阳性	28	2	30
阴性	18	42	60
合计	46	44	90

表 2 MODS 技术和涂片抗酸染色法结果比较(n)			
涂片抗酸染色法	MODS		合计
	阳性	阴性	
阳性	23	1	24
阴性	23	43	66
合计	46	44	90

2.3 Gene-Probe 检测结果 在 60 例临床诊断为非肺结核患者痰液标本中,有 1 份痰涂片抗酸染色和罗氏培养均为阴性而 MODS 技术检测为阳性,临床分离菌株经 Gene-Probe 鉴定为堪萨斯分枝杆菌。在临床诊断为肺结核的 90 例患者痰液标本中,有 2 份罗氏培养法阳性而 MODS 技术检测结果为阴性,其临床分离菌株 Gene-Probe 经鉴定,1 株为 MTB,1 株为鸟分枝杆菌,罗氏培养法与 MODS 技术检测结果不符有 20 例,痰涂

片抗酸染色法与 MODS 技术检测结果不符有 24 份。罗氏培养法为阴性而 MODS 技术检测为阳性的痰液标本有 18 份, Gene-Probe 检测结果为阳性的痰液标本有 16 份(88.9%),痰涂片抗酸染色法检测结果为阴性而 MODS 技术检测结果为阳性的痰液标本有 24 份, Gene-Probe 检测结果为阳性的痰液标本有 22 份(95.7%)。18 份痰涂片抗酸染色法和罗氏培养法结果均为阴性而 MODS 技术检测结果为阳性的痰液标本中, Gene-Probe 检测结果为阳性的痰液标本有 17 份(96%);另外有 1 份临床诊断为非肺结核患者痰液标本,痰涂片抗酸染色法和罗氏培养法结果均为阴性而 MODS 技术检测结果为阳性,经 Gene-Probe 检测结果为阳性。

3 讨 论

目前 MTB 细菌学检测技术由于存在一定缺陷,如价格昂贵、敏感性差、需时较长等,因此远不能满足临床诊治的需求。2000 年 Caviedes 等建立了一种新的结核病细菌学检测技术——显微镜观察药物敏感度检测技术,其原理为: MTB 在液体培养基中生长时会呈现特征性的索状结构,应用倒置显微镜对其特征性索状结构进行观测,可用来判断是否有 MTB 生长,据研究表明该技术具有快速、简便、价廉等特点。随后,有学者将其用于结核病的快速诊断,显示出良好的应用前景^[6-8]。

笔者在前期建立了 MODS 技术快速检测 MTB 临床分离株检测方法学的基础上,进一步将其应用于痰液标本中 MTB 的直接检测,并与痰涂片抗酸染色法、罗氏培养法结果进行对比分析后,可以得出 MODS 技术的阳性检出率显著高于涂片和罗氏培养,如以罗氏培养、鉴定法为判断标准,MODS 技术具有较高的灵敏度。本研究中痰液标本的阳性检出率、检测时间中位数、特异度与相关文献报道的数据相比偏低,可能与选用的痰液标本多数来自治疗患者有关,其服药后痰菌中有大量死菌存在,细菌活力较低^[2,3,8-10]。在应用 MODS 技术直接检测痰液标本时,因检测所需时间比检测临床分离株所需的时间长,检测过程中应采取适当措施,如本研究中用胶带密封 24 孔细胞培养板,并放置密封的塑料袋内等以防止检测板孔中水分蒸发。

本研究对 MODS 技术检测的结果与罗氏培养法检查结果不符的痰液标本采用 Gene-Probe 检测分析,如以 Gene-Probe 结果作为判定依据,合计 Gene-Probe 检测 47 份 MODS 技术与涂片抗酸染色法或罗氏培养法检测结果不符的痰液标本,结果 40 份(85.1%)的 MODS 技术检测结果与 Gene-Probe 结果相同,说明 MODS 技术检测结果具有较高的准确性。笔者早期研究发现临床常见的 2 种非 MTB——耻垢分枝杆菌和堪萨斯分枝杆菌也具有索状生长特征^[11-13],因此,笔者在 MODS 技术检测 MTB 中进行了优化改良,在应用 MODS 技术检测时加入对硝基苯甲酸作为菌种鉴定试剂,使 MODS 技术对 MTB 的检测更加特异。本研究有 1 份非结核患者痰液标本涂片和培养均为阴性而 MODS 技术为阳性,菌株经 Gene-Probe 鉴定为堪萨斯分枝杆菌,进一步得到了证实。

综上所述,将 MODS 技术用于痰液标本中 MTB 的检测,具有快速、准确的优点,同时该技术在检测过程中无需昂贵仪器设备,只需孵箱以及显微镜就能进行检测,因此操作简便、检测成本低廉^[11-13],可以满足临床对 MTB 快速检测的需求,由于 MODS 技术检测的是活菌,因此可为肺结核活动性诊断提供较有力证据,其价廉的优势也易被大多数基层结核病检测机构所接受,具有良好应用前景。但是值得注意的是 MODS 技术检测是活菌,操作中一定要注意生物安全,操作过程中以下

几方面需注意:(1)进行实验操作时,采取相应的防护措施(如需穿戴好口罩、帽子、隔离服、手套等);(2)实验操作需在生物安全柜中进行;(3)应用倒置显微镜观察结果时,24 孔细胞培养板需密封后才能进行观察,观察时需小心谨慎,避免打翻;(4)实验结束后,24 孔细胞培养板及废弃物必须经高温高压灭菌后,方可按一般垃圾处理。

参考文献

[1] 全国结核病流行病学抽样调查技术指导组. 第四次全国结核病流行病学抽样调查报告[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2002, 25(1): 3-7.

[2] Caviedes L, Lee TS, Gilman RH, et al. Rapid, efficient detection and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by microscopic observation of broth cultures. The Tuberculosis Working Group in Peru[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(2): 1203-1208.

[3] Moore DA, Evans CA, Gilman RH, et al. Microscopic-observation drug susceptibility assay for the diagnosis of TB[J]. N Engl J Med, 2006, 35(5): 1539-1550.

[4] 金文国, 胡忠义. 显微镜观察药物敏感性检测技术及其在结核病诊断和耐药性检测中的应用[J]. 中华预防医学杂志, 2008, 42(3): 134-136.

[5] 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: 13-37.

[6] Kirschner P, Springer B, Vogel U, et al. Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination; report of a 2-year experience in a clinical laboratory[J]. J Clin Microbiol,

1993, 31(1): 2882-2889.

[7] Clarridge JE. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases[J]. Clin Microbiol Rev, 2004, 17(3): 840-862.

[8] Shiferaw G, Woldeamanuel Y, Gebeyehu M, et al. Evaluation of microscopic observation drug susceptibility assay for detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(2): 1093-1097.

[9] Moore DA, Mendoza D, Gilman RH, et al. Microscopic observation drug susceptibility assay, a rapid, reliable diagnostic test for multidrug-resistant tuberculosis suitable for use in resource-poor settings[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(10): 4432-4437.

[10] Caws M, Ha DT, Torok E, et al. Evaluation of the MODS culture technique for the diagnosis of tuberculous meningitis[J]. PLoS ONE, 2007, 11(1): 1173.

[11] 付佑辉, 郑瑞娟, 王洁, 等. 显微镜观察药物敏感性技术快速检测结核分枝杆菌研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2009, 23(2): 3178-3181.

[12] 付佑辉, 郑瑞娟, 王洁, 等. 显微镜观察药物敏感度检测技术在二线抗结核药耐药性检测应用[J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(2): 25-29.

[13] 陆俊梅, 王洁, 黄晓辰, 等. 显微镜观察药物敏感性检测技术在痰标本直接药敏试验中的应用[J]. 中华预防医学杂志, 2011, 45(1): 21-25.

(收稿日期: 2015-12-11)

(上接第 727 页)

的一个重要原因,后者可造成精子膜的氧化损伤,导致相关功能的损害,例如精子活动力。有报道显示哺乳动物精子膜的脂质过氧化可导致膜结构的损伤和融合,引起精子活动力的丧失。活性氧通过攻击多不饱和脂肪酸(PUFA)来诱导脂质过氧化(LPO),进而引起膜流动性下降,造成精子结构和功能的损害。除了膜功能外,LPO 派生的醛类例如 MDA 可以通过氧化 DNA 碱基或与其共价结合导致 DNA 链的断裂或交联而引起 DNA 和蛋白质的损伤。Hsieh 等^[10]报道 MDA 水平与少弱精子患者的精子水平和活动力呈负相关,认为增加的 MDA 水平代表了 LPO 对精子膜的致病效能,对精子的活动力和生存力有抑制作用。SOD 在精浆和精子内都存在,培养过程中加入 SOD 可以保护精子免受活性氧的攻击。精子计数和总、前向运动力与精液 SOD 水平有显著相关性,研究发现 SOD 水平越高精子的数量越多,提示了 SOD 水平的下降与精液质量的异常有关^[11]。但本研究并未发现 T-SOD 在 WBC 异常增高组中有显著降低。

综上所述,精液中 WBC 异常增高可引起精子的质量下降,其机制可能与 WBC 增加释放过多的活性氧有关。

参考文献

[1] Agarwal A, Mulgund A, Alshahrani S, et al. Reactive oxygen species and sperm DNA damage in infertile men presenting with low level leukocytospermia[J]. Rep Biol Endoc, 2014, 19(2): 126-133.

[2] Tomlinson MJ, Barratt CL, Bolton AE, et al. Round cells and sperm fertilizing capacity: the presence of immature germ cells but not seminal leukocytes are associated with reduced success of in vitro fertilization[J]. Fertil Steril, 1992, 58(2): 1257-1259.

[3] Yanushpolsky EH, Politch JA, Hill JA, et al. Is leukocytospermia clinically relevant[J]. Fertil Steril, 1996, 66(3): 822-825.

[4] Fraczek M, Wiland E, Piasecka M, et al. Fertilizing potential of ejaculated human spermatozoa during in vitro semen bacterial infection[J]. Fertil Steril, 2014, 10(2): 711-719.

[5] Arata BG, Tortolero I, Villarroel V, et al. Nonsperm cells in human semen and their relationship with semen parameters[J]. Arch Androl, 2000, 45(7): 131-136.

[6] Wright C, Milne S, Leeson H. Sperm DNA damage caused by oxidative stress: modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility[J]. Reprod Biomed Online, 2014, 28(3): 684-703.

[7] Tomlinson MJ, Barratt CL, Cooke ID. Prospective study of leukocytes and leukocyte subpopulations in semen suggests they are not a cause of male infertility[J]. Fertil Steril, 1993, 60(5): 1069-1075.

[8] Kiessling AA, Lamparelli N, Yin HZ, et al. Semen leukocytes: friends or foes[J]. Fertil Steril, 1995, 64(4): 196-198.

[9] Partyka A, Lukaszewicz E, Nizanski W, et al. Detection of lipid peroxidation in frozen-thawed avian spermatozoa using C(11)-BODIPY(581/591)[J]. Theriogenology, 2011, 75(1): 1623-1629.

[10] Hsieh YY, Sun YL, Chang CC, et al. Superoxide dismutase activities of spermatozoa and seminal plasma are not correlated with male infertility[J]. J Clin Lab Anal, 2002, 16(3): 127-131.

[11] Walczak-Jedrzejowska R, Wolski JK, Slowikowska-Hilcz J. The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility[J]. Cent European J Urol, 2013, 66(5): 60-67.

(收稿日期: 2015-12-04)