

综述

结核分枝杆菌快速培养的研究进展及其临床意义

马俊,王自立

(宁夏医学院附属医院骨科 750004 银川市)

中图分类号:R446.5,R529.2

文献标识码:A

文章编号:1004-406X(2007)-05-0388-03

结核病是由结核分枝杆菌感染引起的一种传染性疾病,是单一病因传染病中病死率最高的疾病。防治结核病的关键是早期诊断和早期治疗。目前结核病的实验室诊断主要有细菌学检验、免疫学检验及分子生物学诊断方法,后两种因为方法学还未完善,假阳性和假阴性率较高。结核分枝杆菌的培养分离仍然是诊断结核病的“金标准”,是药物敏感性检测的基础。传统罗氏培养法灵敏度低,耗时、耗力,无法满足临床需要。结核分枝杆菌快速培养分离的研究是结核病领域中迫切需要解决的重要课题。现就近年来结核分枝杆菌快速培养方法的研究现状综述如下。

1 结核分枝杆菌的快速培养基

1.1 以新鲜椰子汁和马血清为基础成分的液体培养基

Vasanthor 等^[1]采用以新鲜椰子汁加马血清为基础成分合成的培养基培养结核分枝杆菌,6d 后培养出结核分枝杆菌。金法祥等^[2]用新鲜人血浆代替马血清制成的液体培养基培养,最快 5d 培养出结核分枝杆菌,分离阳性率为 35.4%,而罗氏培养基为 36%。该培养基能明显缩短培养时间,可能是培养基含较丰富的氨基酸、矿物质和维生素,可作为促细菌生长的有利因素。对于涂片阳性的痰液标本,经前处理后可直接加入已知浓度的抗结核药物^[3],可以获得这些药物的结核杆菌敏感性资料。该培养基操作简便,成本低廉,不需特殊设备,能用于快速培养结核分枝杆菌并行耐药性检测。

1.2 结核杆菌快速分离液体培养基

结核杆菌快速分离液体培养基是珠海银科生物技术应用研究所推出的一种新产品。基本原理是采用细胞线粒体呼吸指示剂指示结果,第 I 代培养基在滴加指示剂的次日观察结果,如培养液变蓝则示阳性结果;第 II 代的指示剂已预先加入了培养基,培养基由蓝紫色变为粉红色即示为阳性结果。欧阳范献等^[4]研究表明,快速液体培养基出现阳性结果的时间为 6~24d,平均为 11d,该液体培养基与罗氏培养基初代分离阳性率分别为 31.58%和 10.53%。该培养基的缺点为根据指示剂的颜色变化判定的结果与取沉淀物抗酸染色镜检偏差极大,且该培养基不能进行快速鉴定和快速药敏试验,有待于进一步的开发和改进。

1.3 变色液体培养基

变色液体培养基是一种营养丰富的选择培养基,通过多种抗生素抑制其他微生物的生长,当有活分枝杆菌存在,则分解色素底物为紫红色。熊礼宽等^[5]研究表明,变色液体培养基总阳性率(53.2%)高于改良酸性罗-琼氏(Lowenstein-Jensen, L-J)培养基(38.3%)。赵锦等^[6]研究表明,从细菌生长周期看,变色液体培养基平均生长天数为 10d,明显短于 L-J 培养基(平均为 25d)。但变色液体培养基污染率(6.9%)略高于 L-J 培养基(4%),差异无显著性($0.25 < P < 0.5$)。其原因可能与标本前处理及洗涤沉淀中操作程序有关。此外,变色液体培养基结果判断尚有主观性,且变色时间持续较短,仅 2~3d 紫色即消失,需及时观察结果。因此,该培养基在如何选择稳定性强的指示剂方面尚待进一步探索和改进。但该培养基培养阳性率高,检出时间快,污染率低,操作简便、经济、实用、不需特殊仪器设备,具有广泛的临床应用前景。

1.4 平菇双相培养基

平菇属菌藻类植物,别名侧耳,又名糙皮侧耳。平菇浸出液有刺激结核杆菌生长的作用。申建维等^[7]用平菇浸出液为基础,研制了结核杆菌双相培养基。在双相培养基平均生长时间比在罗氏培养基快 8.2d 左右,生长结束时间为 30d,而传统罗氏培养基规定为 8 周,所以使用双相培养基可使结核杆菌培养缩短 1 个月。平菇双相培养基培养阳性率为 47.3%,罗氏培养基为 41.03%。阳性标本生长时间为 12.3d,与王海英^[8]报告 BACTEC 法的 11.29d 基本一致。菌型鉴定采用对硝基苯甲酸(PNB)平菇液体培养基,在 10d 内可达到初步筛选结核分枝杆菌的目的。平菇双相培养基的成分来源丰富,价格低廉,制作方便,操作简单,适合于基层医院和结核病院应用。

1.5 酸性罗氏培养基加大豆汁快速培养基

贾震等^[9]用大豆汁代替蒸馏水配制罗氏培养基以加强培养基的营养物质。同一标本抗酸染色镜检、酸性罗氏培养基及罗氏加豆汁培养基培养阳性率分别为 29.3%、39%和 40.8%。在罗氏加豆汁培养基培养阳性的标本中,最短生长时间为 8d,最长为 20d,平均生长时间 14.6d,比酸性罗氏培养基的 23d 缩短 8.4d($P < 0.01$)。人型结核分枝杆菌(H37Rv)标准对照菌株在罗氏加豆汁培养基上的平均生长时间为 11d,比酸性罗氏培养基上提前 5d,且斜面上的菌落量大大增加。经抗酸染色发现在罗氏加豆汁培养基

上生长的细菌形态较粗、较长,说明抗酸菌生长代谢旺盛。用豆汁代替蒸馏水配制罗氏培养基操作步骤简单,成本低廉,又可明显缩短培养时间,有一定的实用价值。

2 结核分枝杆菌快速培养系统

2.1 BACTEC-460 系统

由 Johnston 实验室研制的 BACTEC-460 仪,其基本原理为检测培养瓶中结核分枝杆菌所产生的 CO₂ 的浓度。标本中含菌量越多,阳性报告时间越短,涂阴标本报告时间平均为 16.2d,而涂阳标本平均仅 11.6d,涂片(+++)和(++++)标本分别仅 10.4d 和 6.6d。用 BACTEC-460 系统初代分离率较 L-J 法高 18%^[10]。选择性抑制剂 ρ -硝基- α -乙酰氨基- β -羟基丙酮(NAP)可抑制结核分枝杆菌的生长。据此可用 BACTEC-460 系统鉴别结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌。BACTEC-460 法和 L-J 法总符合率高达 99.9%^[11]。该系统可用于临床标本结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌分离培养、菌型鉴定和药敏试验,具有快速、敏感、准确、污染率低等优点,曾是结核病诊断的一种可靠方法,但因其存在放射性同位素污染问题,目前逐渐被临床实验室所淘汰。

2.2 BACTEC MGIT 960 系统

BACTEC MGIT 960 系统基本原理为通过氧熄灭荧光感受器检测分枝杆菌的有无。BACTEC-960 全自动分枝杆菌检测技术初代分离阳性时间平均为 9.8d,短于改良罗氏培养 28.5d,与 BACTEC-460 的 8.8d 结果接近。486 份各类标本总阳性率为 46.50%,其中痰标本为 54.02%^[12]。BACTEC MGIT 960 系统的污染率为 8.1%~9.97%,较 BACTEC-460 系统(3.7%~4.9%)高,可能与其培养基营养丰富有关^[13]。BACTEC MGIT 960 系统高效、自动化全封闭、非侵袭性、维修费用很低。但仪器设备及试验试剂均需进口,成本较高,限制了其在基层医院推广。

2.3 BACTEC 9000 MB 系统(BACTEC 9000)

BACTEC 9000 MB 系统应用氧特异性感受器结合计算机软件系统检测分枝杆菌的生长。其初代分离率(75%)低于 BACTEC-460(86.5%)而高于固体培养基(67.6%);BACTEC 9000、BACTEC-460 和固体培养基检测涂阳标本阳性率分别为 93.6%、92.6%和 91.5%;对涂阴标本分离率分别为 70%、80%和 61.3%;平均报告时间分别为 12.2d、9.3d 和 21.2d;但污染率(4.1%~6.8%)较 BACTEC-460 高^[14]。该系统无放射性污染、不存在培养瓶之间的交叉污染、计算机数据处理系统准确、假阳性率低。总的来说,该系统是快速分离培养分枝杆菌的一种简便、有效方法。

2.4 分枝杆菌生长指示管 (mycobacterium growth indicator tube, MGIT) 系统

MGIT 系统是 Becton Dickinson 实验室研制的。原理为溶解于培养基中的氧可使荧光熄灭,随着分枝杆菌生长代谢逐渐消耗氧而产生了荧光^[15]。MGIT 系统的初代分离

率为 76.1%~96.1%,检测分枝杆菌报告时间为 11~14d,污染率为 2%~13.8%^[15-17]。MGIT 系统还可进行分枝杆菌的药敏试验^[18]。该系统具有快速、与传统方法符合性好、不需外源性气体和放射性元素、方法简便等优点,适合于发展中国家临床实验室应用。

2.5 MB Redox 系统

MB Redox 系统为 Heipha/Biateat 公司生产的一种简便液体培养基。MB Redox 系统和 BACTEC-460 系统检测临床标本分枝杆菌阳性率相仿,优于 L-J 培养基^[18];阳性结果报告时间与 BACTEC-460 相近,较 L-J 培养基提前 5~10d;污染率为 3.1%~12.06%^[18,19]。MB Redox 系统具有操作简便、通过肉眼便可观察到细菌生长、无需特殊仪器、无放射性污染问题等优点。但该系统不能进行分枝杆菌菌型鉴定,不能做药敏试验。

2.6 Difco ESP 培养系统 II (ESP II)

ESP II 由 Difco 实验室开发,是一种全自动的微生物生长和鉴定检测系统。原理为测定分枝杆菌代谢所致培养瓶中压力变化来了解细菌生长情况。ESP II、BACTEC-460 和 Middlebrook 琼脂对所有分枝杆菌初代分离率为 87%、81%和 65%,结核分枝杆菌复合群分离率分别为 89%、92%和 88%,鸟分枝杆菌复合群分离率分别为 90%、74%和 51%。ESP II、BACTEC-460、Middlebrook 琼脂检测分枝杆菌平均报告时间分别为 13.1d、14.4d、17.8d^[20]。该系统具有快速、敏感、操作简便、无需 CO₂ 瓶、无放射性污染以及快速数码处理系统等优点,是替代 BACTEC-460 分离培养分枝杆菌的一种可靠方法。

2.7 MB/BacT 系统

MB/BacT 系统由 Organon Teknika 首先建立,原理为持续 CO₂ 比色检测装置显示封闭培养系统中分枝杆菌生长。MB/BacT、BACTEC-460 和 L-J 培养基对所有分枝杆菌初代分离率分别为 96.5%、99.4%和 95.9%,结核分枝杆菌分离率分别为 99.1%、100%和 98.2%,非结核分枝杆菌分离率为 91.5%、98.3%和 91.5%;平均报告时间为 11.7d、11.2d 和 26.8d。检测结核分枝杆菌报告时间为 11.8d、8d 和 28.5d(涂阳标本)及 21d、18d 和 36.2d(涂阴标本),检测非结核分枝杆菌报告时间分别为 12.7d、17.1d 和 29.3d^[21]。该系统快速分离培养肺和肺外标本中 MTB 和 NTM 均是一种快速、敏感、有效的方法。但该系统价格昂贵,且污染率较高,限制了其临床应用。

3 临床意义及展望

新的结核分枝杆菌快速培养基及快速培养方法的探索为分枝杆菌的培养分离提供了新的思路,但大多数方法尚未得到大样本标本的检验,没有得到公认,不能取代传统方法。手工操作 MGIT 系统和 MB Redox 系统初代分离率和报告时间均优于传统培养法,其操作简单、无需昂贵仪器设备。BACTEC MGIT 960 系统、BACTEC 9000 MB 系统、ESP II、MB/BacT 等全自动分离培养技术系统具有

快速、敏感、高效、无放射性污染等优点,可望成为替代 BACTEC-460 系统较为可靠的方法。但费用昂贵,污染率较高,尚需进一步改进和完善。

脊柱结核约占骨结核的 60%,其诊断主要靠患者的临床表现、影像学检查、实验室检查。脊柱结核的细菌学检查存在取材困难,结核分枝杆菌分离培养阳性率低,培养及药物敏感性检测所需时间长,结果与临床符合率低等问题,严重影响了脊柱结核患者的整体疗效。选择或探讨脊柱结核病灶中结核分枝杆菌的快速分离培养,药物敏感性检测及个体化疗是摆在骨科医务工作者面前不容回避和亟待解决的问题。肺结核痰标本中结核分枝杆菌的快速培养的研究为脊柱结核病灶中结核分枝杆菌快速分离开阔了思路,为今后的研究提供了理论依据。周劲松等^[2]用 BACTEC MGIT 960 系统对脊柱结核病灶中结核分枝杆菌进行了快速培养,取得了良好的效果。但是,该系统仍然存在污染率较高,检验费用高的缺点,需要探讨一种快速、简便、成本低廉、培养阳性率高、能够满足临床需要的方法。

4 参考文献

1. Vasanthor R, Jagannath K. Brief communication: rapid culture of tubercle bacilli[J]. Bull World Health Organization, 1998, 76(3): 310-311.
2. 金法祥, 汤佳良, 祝桂琅, 等. 结核分枝杆菌快速培养[J]. 临床检验杂志, 2004, 22(1): 35-36.
3. 蔡文诚. 实用临床微生物诊断学[M]. 南京: 东南大学出版社, 1998. 406-407.
4. 欧阳范献, 陈允凤, 林羽中, 等. 液体培养基快速分离结核杆菌的效果评价[J]. 中国热带医学, 2003, 3(5): 661-662.
5. 熊礼宽. 一种新型快速检出分枝杆菌变色液体培养基的评价[J]. 中华检验医学杂志, 2001, 24(1): 49.
6. 赵锦, 徐萍, 王强, 等. 分枝杆菌快速变色液体培养基临床应用的评价[J]. 现代预防医学, 2003, 30(5): 638-639.
7. 申建维, 束珠, 李访, 等. 平菇双相培养基用于结核杆菌培养的研究[J]. 中国防痨杂志, 2001, 23(4): 241-244.
8. 王海英, 左芸, 邵建邦. BACTEC-460TB 仪器和罗氏培养基培养结核杆菌的比较[J]. 临床检验杂志, 1996, 14(3): 142.
9. 贾震, 王晓燕, 刘惠, 等. 酸性罗氏培养基加大豆汁快速培养结核分枝杆菌的研究[J]. 中国防痨杂志, 2004, 26(3): 184-185.
10. Anargyros P, Astill DS, Lin IS. Comparison of improved BACTEC and Lowenstein-Jensen media for culture of mycobacteria from clinical specimens [J]. J Clin Microbiol, 1990, 28(6): 1288-1291.
11. 张培元, 康丽君, 孔文琴, 等. BACTEC-460 TB 临床标本检测分析[J]. 中国防痨杂志, 1993, 15(4): 164-165.
12. 林健雄, 王冬敏, 陈秉熙, 等. BACTEC MGIT-960 快速检测分枝杆菌的临床应用研究[J]. 齐鲁医学检验, 2005, 16(3): 6-8.
13. Tortoli E, Cichero P, Pieisimoni C, et al. Use of BACTEC MGIT 960 for recovery of mycobacterial from clinical specimens: multicenter study [J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(11): 3578-3582.
14. Pfyffer GE, Cieslak C, Welscher HM, et al. Rapid detection of mycobacteria in clinical specimens by using the automated BACTEC 9000 MB system and comparison with radiometric and solid-culture systems [J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(9): 2229-2234.
15. Somoskovi A, Magyar P. Comparison of the MGIT with MB Redox, Lowenstein-Jensen, and Middlebrook 7H11 media for recovery of mycobacteria in clinical specimens [J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(5): 1366-1369.
16. Palaci M, Ueki SYM, Sato DN, et al. Evaluation of MGIT for recovery and drug susceptibility testing of mycobacterium tuberculosis isolates from respiratory specimens [J]. J Clin Microbiol, 1996, 34(3): 762-764.
17. Badak ZF, Kiska DL, Setterquist S, et al. Comparison of mycobacteria growth indicator tube with BACTEC 460 for detection and recovery of mycobacteria from clinical specimens [J]. J Clin Microbiol, 1996, 34(9): 2236-2239.
18. Somoskovi A, Magyar P. Comparison of the MGIT with MB Redox, Lowenstein-Jensen, and Middlebrook 7H11 media for recovery of mycobacteria in clinical specimens [J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(5): 1366-1369.
19. Camball E, Wichlacz C, Truffot-pernot C, et al. Evaluation of the new MB Redox system for detection of growth of mycobacteria [J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(6): 2013-2015.
20. Zanetti S, Ardito F, Sechi L, et al. Evaluation of a nonradio-metric system (BACTEC 9000 MB) for detection of mycobacteria in human clinical samples [J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(8): 2072-2075.
21. Brunello F, Favari F, Fontana R. Comparison of the MB/BacT and BACTEC 460 TB systems for recovery of mycobacteria from various clinical specimens [J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(4): 1206-1209.
22. 周劲松, 陈建庭, 吴雪琼, 等. BACTEC MGIT-960 培养及分子菌种鉴定技术在脊柱结核诊断中的应用[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(9): 830-833.

(收稿日期: 2006-09-25 修回日期: 2006-12-29)

(本文编辑 卢庆霞)