

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.23.009

显微镜观察药物敏感性技术在菌阴肺结核中的诊断价值

付佑辉, 张舒, 池峰, 李挺, 范艳红, 生淑红

(上海市第七人民医院呼吸内科 200137)

摘要:目的 评价显微镜观察药物敏感性技术(MODS)快速检测肺泡灌洗液中结核分枝杆菌对菌阴肺结核的临床诊断价值。方法 采集 2013 年 1 月 1 日至 2016 年 12 月 31 日该院就诊的菌阴肺结核和其他肺部疾病患者的肺泡灌洗液样本,应用 MODS 技术进行结核分枝杆菌检测,与传统罗氏培养法、抗酸染色涂片法结果进行比较。结果 MODS 法中位培养天数为[11.0(7.5,18.5)]d;如以罗氏培养法为判别标准,则 MODS 检测肺泡灌洗液中结核分枝杆菌的特异度为 65.0%、灵敏度为 83.3%、阳性预测值(PPV)为 54.3%、阴性预测值(NPV)为 88.6%、正确性为 71.1%。结论 MODS 技术检测肺泡灌洗液中结核分枝杆菌具有快速、灵敏、简便等优点,可作为菌阴肺结核细菌学快速检测的新方法之一。

关键词:结核分枝杆菌; 肺泡灌洗液; 显微镜观察药物敏感性技术

中图分类号:R563

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)23-3512-03

Evaluation of microscopic observation drug susceptibility assay in detection of Mycobacterium tuberculosis in diagnosis of pulmonary tuberculosis with negative sputum

FU Youhui, ZHANG Shu, CHI Feng, LI Ting, FAN Yanhong, SHENG Shuhong

(Department of Respiratory, Shanghai Seventh People's Hospital, Shanghai 200137, China)

Abstract: Objective To evaluate microscopic observation drug susceptibility (MODS) for testing of mycobacterium tuberculosis broncho-alveolar lavage fluid in diagnosis of pulmonary tuberculosis with negative sputum. **Methods** Mycobacterium tuberculosis in 150 broncho-alveolar lavage fluid samples collected from tuberculosis (TB) patients of the Shanghai Seventh People's Hospital in January 1, 2013 to December 31, 2016 were detected directly by MODS, comparing to the results with Lowenstein-Jensen (L-J) method and Ziehl-Neelsen (Z-N) method. **Results** By the MODS, median culture period were 11 days (7.5, 18.5). The test results of sputum sample by MODS were highly concordance rate with the results of L-J. If the results of L-J was the golden standard, the sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) and accuracy were 83.3%, 65.0%, 54.3%, 88.6% and 71.1%, respectively. **Conclusion** MODS assay could be used for rapid detection of pulmonary tuberculosis with negative sputum, which is a new method with rapid, simple, inexpensive and other advantages.

Key words: Mycobacterium tuberculosis; broncho-alveolar lavage fluid; microscopic observation drug susceptibility assay

结核病是危害人类健康重大传染病之一。在我国,菌阴肺结核患者数占活动性肺结核患者总数的 73.5%,如何提高这类患者的病原学检出率,并有效、快速地作出早期诊断,对肺结核的诊治、防控具有十分重要的作用^[1]。支气管肺泡灌洗液(BALF)是利用支气管镜对相应病变部位的肺段或亚段灌注一定量的无菌生理盐水后回吸采集的肺泡表面衬液。对不容易留取或干咳无痰的患者进行经支气管镜肺泡灌洗术,更接近病灶采集样本,可以有效提高病原体检出率。显微镜观察药物敏感性检测技术(MODS)是近年来报道的一种新的结核分枝杆菌检测技术,具备快速、简便、灵敏、价廉等优点^[2-3]。本研究将 MODS 应用于菌阴肺结核患者肺泡灌洗液中结核分枝杆菌

(MTB)的检测,将其与肺泡灌洗液罗氏培养法、抗酸染色涂片法的结果进行对比,并对其在菌阴肺结核中的临床诊断价值初步进行评价。现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2013 年 1 月 1 日至 2016 年 12 月 31 日本院结核科门诊就诊的 90 例菌阴肺结核患者的肺泡灌洗液标本,以及 60 例呼吸科住院的非肺结核肺部疾病(包括慢性支气管炎、肺炎、支气管扩张、肺癌等)患者的肺泡灌洗液标本。其中菌阴肺结核诊断标准参照《肺结核诊断和治疗指南》^[4]执行。

1.2 试剂与仪器 对硝基苯甲酸(PNB)购自 Sigma 公司。其储存液的制备方法:将 PNB 纯药粉溶解在 0.1 mol/L 氢氧化钠中,再取 0.1 mol/L 盐酸溶液调

pH 至 6.5;加无菌蒸馏水制成 5 mg/mL 储存液,然后将上述配置好的储存液用无菌滤膜过滤、分装, -20 °C 保存。应用时取出,常温下溶解,倍比稀释,配置成 2 倍于终浓度为 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (即浓度为 1 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的工作液。液体培养基的干粉为 Middlebrook 7H9(购自美国 Difco 公司),营养添加剂 OADC(购自 Becton Dickinson 公司)。配置含 10%营养添加剂的 Middlebrook 7H9 液体培养基为应用液。具体配置方法按文献[2]进行。罗氏培养基和鉴定培养基按《结核病诊断实验室检验规程》制备^[5]。MTB 标准菌株(H37Rv, ATCC 25177)购自国家菌种保藏中心。所用仪器包括倒置显微镜(XDS-1B 重庆光电仪器有限公司)和 24 孔细胞培养板(TPP, 瑞士进口)。

1.3 方法 患者的 BALF 标本采集方法如下:根据患者的胸部 CT 资料,选择支气管肺段病变部位作为灌洗的位置,然后将 10~25 mL 生理盐水通过支气管镜灌入支气管肺段的相应部位;然后通过负压(压力为 25~100 mm Hg)吸引 BALF 至瓶中。此操作可以重复灌洗 2~3 次,收集 BALF 为 15~20 mL 左右。

1.3.1 MODS 培养法 将 150 例患者肺泡灌洗液去污染处理(方法参见文献[5])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。操作如下:每块 24 孔细胞培养板做 11 份肺泡灌洗液样本,每块作为检测的 24 孔细胞培养板共设置 11 个检测孔、11 个鉴别孔及 2 个阴性对照孔。首先将 0.4 mL 无菌的液体培养基分别加入到 11 个检测孔、在 11 个鉴别孔内分别加入 0.4 mL 配制 PNB 工作液;在 2 个阴性对照孔中加入 0.4 mL 的无菌液体培养基和 0.4 mL 无菌生理盐水,然后将 0.4 mL 肺泡灌洗液样本沉淀悬浊液分别加入到检测孔和鉴别孔内,混匀用胶带密封,放置密封的塑料袋内,然后将密封好的细胞培养板置入 37 °C 孵箱内进行培养。从放入孵箱后的第 3 天起用倒置显微镜进行观察($\times 10$ 目镜, $\times 40$ 物镜),每天观察 1 次,第 15 天后每周观察 2 次,至第 40 天结束。若在检测孔内观察到呈索状结构生长的细菌,含 PNB 鉴别孔无细菌生长,则说明该样本中有 MTB 生长;若检测孔及含 PNB 鉴别孔内均观察到呈索状结构生长的细菌,则说明样本中有非 MTB 生长;若鉴别孔及检测孔内均未观察到呈索状结构生长的细菌,则分别从检测孔及鉴别孔中吸取少量标本液,进行抗酸染色涂片镜检,如抗酸染色涂片结果为阳性,可判断该样本为无索状结构的非 MTB;如抗酸染色涂片结果为阴性,则可判断该样本中无分枝杆菌生长;如阴性对照孔出现细菌生长,判断为污染。每批样本检测以 H37Rv 为质控株(具体方法参见文献[6])。

1.3.2 罗氏培养和鉴定 取经前处理后肺泡灌洗液标本 0.1 mL 无菌接种于罗氏培养基斜面上,将每份

标本同时接种在 2 支罗氏培养基、1 支含 PNB 罗氏培养基(PNB 药物浓度为 500 mg/mL)及 1 支含噻吩-2-羧酸胍(TCH)罗氏培养基(TCH 药物浓度为 5 mg/mL)上,放 37 °C 温箱孵育,具体方法操作参照《结核病诊断实验室检验规程》^[5]执行。

1.3.3 涂片抗酸染色 用接种环挑取肺泡灌洗液 0.1 mL,于玻片正面右侧 2/3 中央处均匀涂抹成 10 mm \times 20 mm 左右椭圆形灌洗液膜,将灌洗液膜静置自然干燥后进行抗酸染色,具体方法操作参照《结核病诊断实验室检验规程》^[5]执行。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件对数据进行处理。偏态分布的计量资料以中位数和四分位数间距 $[M(P_{25}, P_{75})]$ 表示,组间比较采用秩和检验。计数资料以百分数表示,组间比较采用 χ^2 检验或 Fisher's 确切概率法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MODS 与罗氏培养法所需时间比较 应用 MODS 对 150 例患者肺泡灌洗标本中 MTB 进行检测,阳性检出时间为 5~28 d,中位时间为 $[11.0(7.5, 18.5)]$ d,而罗氏培养法检测时间为 12~48 d,中位时间为 $[20.0(14.9\sim 34.9)]$ d,MODS 检测时间短于罗氏培养法,差异有统计学意义($P < 0.05$)。



图 1 MTB 特征性索状结构($\times 40$ 物镜)

2.2 3 种方法检测结果比较 在 90 例临床确诊为菌阴肺结核患者的肺泡灌洗液样本中,抗酸染色涂片法、罗氏培养法及 MODS 检测的 MTB 阳性分别为 20 例(22.2%)、30 例(33.3%)和 46 例(51.1%),阳性率比较差异有统计学意义($\chi^2 = 16.68, P < 0.001$)。60 例非结核的肺部疾病患者肺泡灌洗液样本检测的假阳性结果分别为 2 例(3.3%)、2 例(3.3%)和 1 例(1.7%),假阳性率比较差异无统计学意义($\chi^2 = 0.54, P > 0.05$)。90 例临床确诊为菌阴肺结核患者肺泡灌洗液样本的检测结果表明,MODS 与传统罗氏培养法结果符合率为 71.1%,如以罗氏培养法为判断标准,则 MODS 检测 MTB 的灵敏度为 83.3%(25/30)、特异性 65%(39/60)、阳性预测值(PPV)54.3%(25/46)、阴性预测值(NPV)88.6%(39/44)、正确性为 71.1%(64/90);MODS 与罗氏培养法结果进行比较,差异有统计学意义($\chi^2 = 6.52, P < 0.05$)。MTB

在液体培养基中生长所呈现的特征性索状结构见图 1。

3 讨 论

菌阴肺结核是指 3 次痰涂片和 1 次痰培养检查 MTB 均为阴性的肺结核患者。在我国肺结核患者中,有 50%~70% 的患者为菌阴肺结核。由于菌阴肺结核患者痰里面找不到 MTB,因此它的诊断缺乏“金标准”,给诊断带来困难,临床上很容易发生漏诊、误诊、漏治、误治、甚至过治,这样不仅给患者增加了经济、心理负担,也给社会带来一定负担和危害。因此,如何对菌阴肺结核进行快速、准确地诊断,一直是临床急需解决难题之一。实际上,结核病患者,甚至无临床表现的结核潜伏感染者体内都应存在 MTB。这是结核病发病首要及必须的条件。就细菌学而言,不存在所谓的“菌阴”肺结核,只是限于采用常规方法未能从痰标本检出分枝杆菌而已。因此,菌阴肺结核不是一个固定的概念,它受检测技术灵敏度、特异度的限定。为此,寻找快速、敏感、特异、准确的结核病细菌学诊断新技术,对菌阴肺结核的诊治将具有重要的意义。2000 年,有研究者建立了一种结核病细菌学诊断新技术——MODS,通过倒置显微镜对 MTB 的特征性索状结构进行观测,来确定是否有 MTB 生长^[3]。该技术具有快速、简便、价廉等特点。随后,有研究将其用于结核病的快速诊断,显示出良好的应用前景^[7-9]。

本研究通过应用 MODS 检测肺泡灌洗液中 MTB,探讨其对菌阴肺结核的诊断价值,国内外相关文献较少。本研究选择肺泡灌洗液样本主要原因有:(1)BALF 是通过支气管镜将无菌生理盐水灌注至病变部位直接获取,这样不但能获取较大数量细菌,而且一定程度上避免了口咽部细菌对标本的污染;(2)对于支气管镜不能到达的远端病灶,BALF 可根据影像学提示的病灶位置,通过支气管镜灌注生理盐水后的冲洗作用,在一定程度上引出远端病灶结核杆菌,这样增加样本 MTB 的获得概率;(3)通过支气管镜检查的激发、冲洗作用,可疏通、引流病灶的支气管,从而提高样本 MTB 的获得概率。本研究纳入的所有菌阴肺结核组患者的诊断标准均严格参照 2001 年中华医学会结核病学分会制定的菌阴肺结核的诊断标准执行,具有较高的可信度和可比性^[4]。笔者将两组患者肺泡灌洗液进行 MODS 检测的同时,还将其与传统的抗酸染色涂片法和罗氏培养法的检测结果进行了比较,研究结果表明 MODS 检测肺泡灌洗液中 MTB 的阳性检出率显著高于涂片法和罗氏培养法 ($P < 0.05$),罗氏培养法是目前公认简便的结核病诊断的“金标准”,如以它为判断标准,MODS 法具有较

高的灵敏度(83.3%),但总体的阳性检出率、检测时间中位数、特异度与 WALUSIMBI 等^[9]报道的数据相比偏低,可能与选用的肺泡灌洗液样本多数来自治疗后的菌阴肺结核患者有关,其服药后肺泡灌洗液中可能有大量死菌存在,或者细菌活力较低。

综上所述,将 MODS 用于肺泡灌洗液样本中 MTB 的检测,只需支气管镜、孵箱及显微镜就能进行检测,操作简便、检测成本低廉^[10],可以满足临床对 MTB 快速检测的需求,加上本法检测的是活菌,因此可作为菌阴肺结核细菌学快速检测的新方法之一,具有良好应用前景。

参考文献

- [1] 王黎霞,成诗明,陈明亭,等. 2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告[J]. 中国防痨杂志, 2012, 34(8): 485-508.
- [2] MOORE D A, EVANS C A, GILMAN R H, et al. Microscopic-observation drug-susceptibility assay for the diagnosis of TB[J]. N Engl J Med, 2006, 355(15): 1539-1550.
- [3] 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(2): 134-136.
- [4] 中华医学会结核病学分会. 肺结核诊断和治疗指南[J]. 中国实用乡村医生杂志, 2013, 20(2): 7-11.
- [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] 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, 19(23): 3178-3181.
- [7] MAKAMURE B, MHAK J, MAKUMBIROFA S, et al. Microscopic-observation drug-susceptibility assay for the diagnosis of drug-resistant tuberculosis in Harare, Zimbabwe[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e55872.
- [8] CHAIYASIRINROJ B, AUNG M N, MOOLPHATE S, et al. Prospective evaluation of simply modified MODS assay: an effective tool for TB diagnosis and detection of MDR-TB[J]. Infect Drug Resist, 2012, 5: 79-86.
- [9] WALUSIMBI S, BWANGA F, DE COSTA A, et al. Meta-analysis to compare the accuracy of GeneXpert, MODS and the WHO 2007 algorithm for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis[J]. BMC Infect Dis, 2013, 13(13): 507-520.
- [10] WANG L, MOHAMMAD S H, CHAIYASIRINROJE B, et al. Evaluating the Auto-MODS assay, a novel tool for tuberculosis diagnosis for use in resource-limited settings [J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(1): 172-178.