

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.16.016

两种方法在结核分枝杆菌培养中的比对研究

吴进凤,王路钦,张治国[△]

北京市昌平区结核病防治所检验科,北京 102200

摘要:**目的** 比较 MGIT960 系统液体培养法与改良罗氏(L-J)培养法在结核分枝杆菌培养中的效果。**方法** 选择 2015 年 1 月至 2017 年 12 月到该所就诊的活动性肺结核患者 3 685 例,对每份病例标本分别进行痰涂片抗酸染色(萼-尼法)镜检、改良罗氏(L-J)培养法和 MGIT960 系统液体培养法,并分别计算抗酸染色镜检与改良罗氏(L-J)培养法和 MGIT960 系统液体培养法的阳性符合率;统计改良罗氏(L-J)培养法和 MGIT960 系统液体培养法的阳性率、污染率及培养时间。**结果** 痰涂片镜检与改良罗氏(L-J)培养法和 MGIT960 系统液体培养法的阳性符合率分别为 94.21%(114/121)和 82.64%(100/121)。改良罗氏(L-J)培养法和 MGIT960 系统液体培养法结果符合率为 93.70%(3 197/3 412),所需的培养时间分别为 28.0(25.0~31.0)d 和 16.5(14.0~19.0)d。**结论** MGIT960 系统液体培养法阳性率与传统的改良罗氏(L-J)培养法基本一致,报告时间平均缩短至 16.5 d,比改良罗氏(L-J)培养法提前 10.0 d 以上,为临床早诊断、早治疗提供了可靠依据,而且为后续进行的药敏试验提供了菌株。

关键词: 结核分枝杆菌; 抗酸染色; 改良罗氏(L-J)培养法; 液体培养

中图法分类号: R378.91

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2019)16-2326-04

Comparative study of two methods in *Mycobacterium tuberculosis* culture

WU Jinfeng, WANG Luqin, ZHANG Zhiguo[△]

Department of Clinical Laboratory, Changping District Institute for Tuberculosis
Prevention and Control, Beijing 102200, China

Abstract: **Objective** To compare the effects of MGIT960 system liquid culture method and modified Roche's (L-J) culture method in the culture of *Mycobacterium tuberculosis*. **Methods** A total of 3 685 patients with active pulmonary tuberculosis in the outpatient department of this institute from January 2015 to December 2017 were selected. Each case sample was performed sputum smears, acid-fast staining (Ziehl-Neelsen) microscopic examination, improved Roche's (L-J) culture and MGIT960 system liquid culture respectively. The positive coincidence rates of acid-fast staining microscopic examination with improved Roche's (L-J) culture and MGIT960 system liquid culture were calculated. The positive rate, contamination rate and culture time of improved Roche (L-J) culture method and MGIT960 system liquid culture method were studied. **Results** The positive coincidence rates of sputum smear microscopy with improved Roche's (L-J) culture and MGIT960 culture were 94.21% (114/121) and 82.64% (100/121) respectively. The coincidence rate of improved Roche's (L-J) culture method and MGIT960 liquid culture method was 93.70% (3 197/3 412), and the required incubation time were 28.0 (25.0—31.0) d and 16.5 (14.0—19.0) d respectively. **Conclusion** The positive detection rate of MGIT960 system liquid culture method is basically consistent with that of traditional improved Roche's (L-J) culture method. The average reporting time is shortened to 16.5 d, which is 10.0 d earlier than improved Roche's (L-J) culture, provides a reliable basis for early clinical diagnosis and treatment. Moreover provides the strain for the subsequent drug susceptibility test.

Key words: *Mycobacteria tuberculosis*; acid-fast staining; improved Roche's (L-J) culture method; liquid culture

结核病是由结核分枝杆菌引起的、经呼吸道传播,严重危害人类健康的慢性传染病。我国结核病患病人数较多,是世界结核病高负担国家之一。有研究报道,肺结核患者以被动发现为主,比例高达 85.97%^[1]。患者常因不明原因低热、咳嗽、消瘦等症

状前来就诊,此时应尽快明确诊断,查明病因或进行快速鉴别诊断^[2]。结核病的检测方法中,痰涂片方法简单易操作,但阳性率较低;改良罗氏(L-J)培养法目前广泛应用于结核分枝杆菌培养,并作为结核病诊断的金标准,但由于结核分枝杆菌生长缓慢,一般情况

下采用该方法需要 4~8 周,给临床日常诊疗工作带来不便^[3]。MGIT960 系统液体培养法具有阳性率高、培养时间短等优点^[4]。本研究通过分析 2015—2017 年北京市昌平区结核病防治所门诊活动性肺结核患者痰培养资料,比较 MGIT960 系统液体培养法与改良罗氏(L-J)培养法在结核分枝杆菌培养中的效果,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 标本来源 选择 2015 年 1 月至 2017 年 12 月到北京市昌平区结核病防治所就诊的活动性肺结核患者 3 685 例,其中男 1 005 例,女 2 680 例;年龄 11~92 岁,平均(42.1±5.6)岁。对每份病例标本分别进行痰涂片抗酸染色(萆-尼法)镜检、改良罗氏(L-J)培养和 MGIT960 系统液体培养。活动性肺结核患者的诊断严格按照 WS288-2009《肺结核诊断标准》^[5]和《北京市结核病防治工作规范(2013 版)》^[6]进行,并经过国家级、市级临床诊疗专家会诊确定。痰标本要求为黏液痰、干酪痰或含有少量新鲜血液的痰。

1.2 仪器与试剂 抗酸染色液购于珠海贝索生物技术有限公司;固体培养基:改良罗氏(L-J)固体培养基购于珠海贝索生物技术有限公司;液体培养管:MGIT960 液体培养管、MGIT 生长添加剂和 MGIT PANTA 均购于美国 BD 公司;前处理液:NaOH 溶液、氢氧化钠-N-乙酰基-L 半胱氨酸溶液、磷酸盐缓冲液均按 BD 工作方案制备。相关仪器:全自动 Bactec MGIT 960 仪器购于美国 BD 公司;培养箱选用上海一恒科学仪器有限公司产品;离心机选用德国台式高速(冷冻)离心机;涡旋振荡器。生物安全柜:ESCO AirStream II 级 A2 型生物安全柜。其他耗材:无菌、有刻度的一次性移液管;50 mL 无菌离心管;2 mL 无菌吸管;竹签等。

1.3 方法

1.3.1 痰涂片 萆-尼染色镜检:参照《结核病实验室检验规程》抗酸杆菌显微镜检查标准化操作程序进行萆-尼染色显微镜镜检^[7]。蓝色背景下抗酸杆菌呈红色,连续观察 300 个不同视野,未发现抗酸杆菌为阴性;发现 1~8 个/300 个视野为阳性。

1.3.2 接种培养 固体培养[改良罗氏(L-J)培养法]:参照《结核病实验室检验规程》分枝杆菌分离培养标准化操作程序^[7],进行分枝杆菌固体培养。在生物安全柜内用 4%NaOH 对痰标本进行处理,接种到罗氏培养基上,将接种好的培养基放置在 37℃培养箱中培养。结果判读:培养基表面长出淡黄色不透明、粗糙、干燥、凸起呈菜花样菌落,为结核杆菌典型菌落形态。挑取少量菌落涂片,经抗酸染色,镜检确定为抗酸杆菌后,报告固体培养分枝杆菌阳性。

液体培养(MGIT960 系统液体培养法):参照《结核病实验室检验规程》分枝杆菌分离培养标准化操作程序^[7],进行分枝杆菌液体培养。在生物安全柜内用

氢氧化钠-N-乙酰基-L 半胱氨酸溶液对痰标本进行处理,加入磷酸盐缓冲液,高速(冷冻)离心机中离心 15 min。等待离心的同时,将 MGIT PANTAH 与 MGIT 生长添加剂混匀,用无菌有刻度移液管移取 0.8 mL 该混合液加入 MGIT 管中备用。离心完毕,弃上清液,加入 1 mL 磷酸盐缓冲液混匀,吸取 0.5 mL 加入 MGIT 管中,拧紧盖子。将接种完毕的 MGIT 管放入全自动 Bactec MGIT960 仪器内进行孵育,等待仪器自动报结果。仪器报告阳性的 MGIT 管,进行涂片抗酸染色,确认是否为抗酸杆菌阳性,若为阳性则报告液体培养分枝杆菌阳性。

1.4 统计学处理 采用 Microsoft Excel2010 建立数据库,SPSS18.0 软件对数据进行统计处理和分析。计量资料以中位数(最大值~最小值)表示,组间比较采用秩和检验;计数资料以率或例数表示,组间比较采用 χ^2 检验。分别计算痰涂片抗酸染色镜检与改良罗氏(L-J)培养法和 MGIT960 系统液体培养法的阳性符合率;计算改良罗氏(L-J)培养法和 MGIT960 系统液体培养法的阳性率、污染率及培养时间。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

1.5 质量控制 检测人员严格按照操作规程进行试验。每批次的培养基接种结核分枝杆菌 H37Rv 标准菌株进均进行敏感性测试。数据库的建立采用双人双录入,并按照预定方案进行原始资料和数据库复核。

2 结果

2.1 3 种方法培养结果及培养时间比较 痰涂片镜检、改良罗氏(L-J)培养法和 MGIT960 系统液体培养法阳性率分别为 3.28%(121/3 685)、10.33%(367/3 554)和 10.30%(364/3 534);改良罗氏(L-J)培养法和 MGIT960 系统液体培养法的阳性率差异无统计学意义($\chi^2=0.001, P=0.970$)。痰涂片镜检与改良罗氏(L-J)培养法和 MGIT960 系统液体培养法的阳性符合率分别为 94.21%(114/121)和 82.64%(100/121)。改良罗氏(L-J)培养法和 MGIT960 系统液体培养法所需的培养时间分别为 28.0(25.0~31.0)d 和 16.5(14.0~19.0)d,差异有统计学意义($Z=-2.85, P=0.002$)。见表 1。

表 1 痰涂片抗酸染色与 MGIT960 系统液体培养法和改良罗氏(L-J)培养法结果比较(n)

痰涂片	n	MGIT960 系统液体培养法			改良罗氏(L-J)培养法		
		阳性	阴性	污染	阳性	阴性	污染
阳性	121	100	16	5	114	7	0
阴性	3 564	264	3 154	146	253	3 180	131
合计	3 685	364	3 170	151	367	3 187	131

2.2 MGIT960 系统液体培养法和改良罗氏(L-J)培养法相关结果 改良罗氏(L-J)培养法和 MGIT960

系统液体培养法结果符合率为 93.70% (3 197/3 412)。两种培养方法检测痰涂片阳性和阴性标本的符合率分别为 86.21% (100/116) 和 93.96% (3 097/3 296), 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 11.42, P = 0.001$)。改良罗氏 (L-J) 培养法和 MGIT960 系统液体培养法的污染率分别为 3.55% (131/3 685) 和 4.10% (151/3 685), 差异无统计学意义 ($\chi^2 = 1.47, P = 0.225$)。见表 2~4。

表 2 MGIT960 系统液体培养法和改良罗氏 (L-J) 培养法结果符合情况 (n)				
改良罗氏 (L-J) 培养法	MGIT960 系统液体培养法			
	阳性	阴性	污染	合计
阳性	248	106	13	367
阴性	109	2 949	129	3 187
污染	7	115	9	131
合计	364	3 170	151	3 685

表 3 痰涂片阳性标本 MGIT960 系统液体培养法和改良罗氏 (L-J) 培养法结果符合情况 (n)				
改良罗氏 (L-J) 培养法	MGIT960 系统液体培养法			
	阳性	阴性	污染	合计
阳性	97	13	4	114
阴性	3	3	1	7
污染	0	0	0	0
合计	100	16	5	121

表 4 痰涂片阴性标本 MGIT960 系统液体培养法和改良罗氏 (L-J) 培养法结果符合情况 (n)				
改良罗氏 (L-J) 培养法	MGIT960 系统液体培养法			
	阳性	阴性	污染	合计
阳性	151	93	9	253
阴性	106	2 946	128	3 180
污染	7	115	9	131
合计	264	3 154	146	3 564

3 讨 论

分枝杆菌培养是结核病诊断的金标准, 改良罗氏 (L-J) 培养法耗时过长, 一般培养需要 4~8 周, 且阳性率不超过 50%, 不利于早期发现肺结核患者和早期诊断耐多药结核病患者^[3,8]。1996 年美国 BD 公司研制出 Bactec MGIT960 分枝杆菌全自动快速培养系统, 广泛应用于结核病诊断和临床鉴别诊断。本研究通过分析 2015—2017 年北京市昌平区结核病防治所门诊活动性肺结核患者痰培养资料, 比较 MGIT960 系统液体培养法与改良罗氏 (L-J) 培养法在结核分枝杆菌培养中的效果。

本研究显示, 痰涂片镜检、改良罗氏 (L-J) 培养法

和 MGIT960 系统液体培养法阳性率分别为 3.28%、10.33% 和 10.30%, 改良罗氏 (L-J) 培养法和 MGIT960 系统液体培养法的阳性率差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.001, P = 0.970$); 痰涂片镜检与改良罗氏 (L-J) 培养法和 MGIT960 系统液体培养法的阳性符合率均超过 80.00%, MGIT960 系统液体培养法和罗氏 (L-J) 培养法结果符合率为 93.70%, 这与张娟等^[9]和王训霞^[10]的研究结果类似, 说明 MGIT960 系统液体培养法同样拥有较高的灵敏度。改良罗氏 (L-J) 培养法和 MGIT960 系统液体培养法所需的培养时间分别为 28.0 (25.0~31.0) d 和 16.5 (14.0~19.0) d, 说明在结果报告速度上, MGIT960 系统液体培养法更具优势。本研究还发现, MGIT960 系统液体培养法的污染率高于罗氏 (L-J) 培养法, 但差异无统计学意义 ($\chi^2 = 1.47, P = 0.225$), 可能是 MGIT960 系统液体培养法对操作要求更严格, 操作过程中易造成污染等原因引起的。

本单位进行的 3 种结核菌检测方法: 痰涂片是早期诊断肺结核的重要手段, 操作简单, 用时短, 但阳性率最低^[11]; 改良罗氏 (L-J) 培养法阳性率高于痰涂片, 但用时最长; MGIT960 系统液体培养法阳性率与改良罗氏 (L-J) 培养法基本一致, 这与王晓艳等^[12]的研究结果稍有不同, 但该方法阳性培养时间明显比改良罗氏 (L-J) 培养法提前 10.0 d 以上, 这为临床及早诊断、制订个人用药方案提供了更加及时、准确的临床依据。早期诊断不仅有利于结核患者的快速康复, 对于控制结核病合并的其他疾病也有重要的意义^[13]。虽然痰涂片镜检操作简单, 但无法得到菌株, 而培养法能为后续进行耐药性监测的药敏试验提供菌株。随着临床诊疗需求的不断增加, 近几年医疗市场陆续推出 GeneXpert、基因芯片等多种新型的结核病检测技术, 然而除了考虑检测方法的诊断效能, 还应考虑检测机构的条件、成本效益等, 非免费项目还应该考虑患者的经济承受力^[14]。

综上所述, MGIT960 系统液体培养法收费较低, 不需要使用特殊仪器, 操作简单, 是一种比较理想的分枝杆菌快速培养方法。与传统的抗酸染色和改良罗氏 (L-J) 培养法相比, MGIT960 系统液体培养法具有符合率高、特异性强、灵敏度高的特点。这种经济、实用、及时、有效的检测方法更加适宜在基层结核病防治机构推广应用^[15]。

参考文献

[1] World Health Organization. Guidelines on the management of latent tuberculosis infection[S]. Geneva: World Health Organization, 2015:13-20.

[2] 纪丽微, 林健雄, 彭东东, 等. Xpert MTB/RIF 技术用于结核分枝杆菌联合检测的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(10):1391-1394. (下转第 2331 页)

不一,多为甲状腺滤泡组织的炎症所造成,常见于桥本氏甲状腺炎,急性、亚急性甲状腺炎等,并非某类疾病的特异性表现^[4-6]。

当甲状腺滤泡细胞结构被破坏时,位于甲状腺滤泡上皮细胞膜顶端的甲状腺过氧化物酶和甲状腺滤泡内的甲状腺球蛋白溢出到外周血,作为一种自身免疫性抗原,刺激机体产生大量 TPOAb 和 TGAb,使血清中 TPOAb 和 TGAb 水平升高。二者作为自身抗体,能够对甲状腺上皮细胞造成不同程度的损伤。TPOAb 通过参与辅助性 T 淋巴细胞的活化,激活补体和抗体介导的细胞毒作用破坏甲状腺细胞,最终导致甲减^[7]。TGAb 能够与甲状腺球蛋白结合形成复合物,对甲状腺滤泡上皮细胞产生破坏,从而影响甲状腺功能^[8-9]。因此,TPOAb 和(或)TGAb 水平升高对判断甲状腺滤泡细胞损伤有着高度敏感性。

本院每年对教职工进行健康体检,本研究所涉及人群为高校社区体检人群。本研究发现,选取的样本中甲状腺回声改变者的比例相对较高,为 39.0%。本研究结果显示,甲状腺回声改变时甲状腺自身抗体异常检出率为 74.9%(194/259),甲状腺功能异常检出率为 23.2%(60/259)。临床中常见甲状腺自身抗体水平升高,但甲状腺功能正常的患者;亦有甲状腺超声显示甲状腺回声改变,但未进行相关血清学指标检测的患者。赵秋剑^[10]认为,TPOAb 和 TGAb 异常是甲状腺功能正常人群患甲状腺疾病的潜在风险因子,当两项指标水平升高时,无论甲状腺功能是否正常,都应给予足够重视,定期复查随访。本研究通过相关性分析发现,甲状腺回声改变与 TPOAb、TGAb、TSH 呈正相关,与 FT4 呈负相关。

综上所述,甲状腺彩超和甲状腺血清学指标检测对早期甲状腺疾病的发现具有重大意义。两种检查都应作为常规项目在体检人群中检测,这更有利于临

床对甲状腺疾病的早期防治。

参考文献

- [1] 袁帅,江璐,朱力,等.上海地区 6 112 例健康体检者血清甲状腺激素和甲状腺自身抗体检测结果分析[J]. 检验医学,2015,30(3):219-223.
- [2] 中华医学会内分泌学会《中国甲状腺疾病诊治指南》编写组.甲状腺疾病诊治指南:甲状腺功能减退症[J]. 中华内科杂志,2007,46(11):967-971.
- [3] 中华医学会内分泌学会《中国甲状腺疾病诊治指南》编写组.中国甲状腺疾病诊治指南:甲状腺功能亢进症[J]. 中华内科杂志,2007,46(10):876-882.
- [4] 柯扬,杨冬梅,张颖,等.体检人群甲状腺非均质改变与甲状腺功能的相关性研究[J]. 中华保健医学杂志,2018,20(2):125-127.
- [5] 白人驹,徐克.医学影像学[M].7 版.北京:人民卫生出版社,2013:90-94.
- [6] 杨琛,韩春,王立平,等.超声评价甲状腺结节恶性度分级的初步探讨[J]. 中华肿瘤杂志,2013,35(10):758-763.
- [7] 范慧,王广.甲状腺过氧化物酶抗体在自身免疫性甲状腺疾病诊治中的价值及存在问题[J]. 中华检验医学杂志,2015,38(12):884-887.
- [8] 马倩倩,梁秋华,孙琳,等.桥本氏甲状腺炎患者外周血中 CD4⁺CD45RO⁺ 记忆性 T 细胞的表达及意义[J]. 中国免疫学杂志,2016,32(10):1527-1531.
- [9] GONG Q, LI X, GONG Q, et al. Hashimoto's thyroiditis could be secondary to vitiligo: the possibility of antigen crossover and oxidative stress between the two diseases [J]. Arch Dermatol Res, 2016, 308(4): 277-281.
- [10] 赵秋剑.血清抗甲状腺球蛋白抗体和抗甲状腺过氧化物酶抗体测定对甲状腺疾病的临床诊断意义[J]. 国际检验医学杂志,2017,38(14):1981-1982.

(收稿日期:2018-12-12 修回日期:2019-03-14)

(上接第 2328 页)

- [3] 吴雪琼,张宗德,乐军.分枝杆菌分子生物学[M].北京:人民军医出版社,2010:2-3.
- [4] ZHAO L L, XIA Q, LIN N, et al. Evaluation of BACTEC MGIT960 system for the second-line drugs susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis in China[J]. J Microbiol Methods, 2012, 91(1): 212-214.
- [5] 中华人民共和国卫生部.肺结核诊断标准:WS288-2009 [S].北京:中华人民共和国卫生部,2009.
- [6] 北京市卫生局.北京市结核病防治工作规范[A].北京:北京市卫生局办公室,2013.
- [7] 赵雁,林逢宇.结核病诊断实验室检验规程[M].北京:人民卫生出版社,2015.
- [8] KADIOGLU E E, UCAR E Y, ARAZ O, et al. A comparison of two different culture methods for use in the diagnosis of pulmonary tuberculosis [J]. Eurasian J Med, 2014, 46(2): 74-77.
- [9] 张娟,蒋俊,张红,等. MGIT960 与罗氏培养法在结核分枝杆菌培养及药敏试验中的比对分析[J]. 中国防痨杂

- 志, 2011, 33(6): 361-365.
- [10] 王训霞.三种检测结核分枝杆菌方法的应用评价[J]. 中国实用医药, 2017, 12(29): 196-198.
- [11] ESPOSITO S, BIANCHINI S, BLASI F. Bedaquiline and delamanid in tuberculosis[J]. Expert Opin Pharmacother, 2015, 16(15): 2319-2330.
- [12] 王晓艳,王珍,等. MGIT960 快速培养系统在结核病诊断中的应用价值[J]. 中国医学工程. 2015, 23(9): 199.
- [13] 孙开丽.痰结核分枝杆菌培养结果及影响因素分析[J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(36): 135-136.
- [14] 田斌,王孝君,文岚,等. Xpert MTB/RIF 检测系统对肺结核临床诊断病例的应用价值[J]. 中国人兽共患病学报, 2016, 32(9): 798-801.
- [15] 朱丽娜,雷永良,俞凯狄,等.液体快速培养在结核分枝杆菌分离培养中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(13): 2112-2114.

(收稿日期:2019-01-02 修回日期:2019-03-06)