

噬菌体生物扩增技术在结核分枝杆菌利福平耐药性检测中的应用

李晓非, 梁桂亮, 汪亚玲, 苏俊华, 李利国
(昆明市第三人民医院, 云南 昆明 650041)

[摘要] **目的** 评价噬菌体生物扩增技术 (PhaB 法) 在结核分枝杆菌 (MTB) 利福平 (RFP) 耐药性检测中的应用价值. **方法** 采用 PhaB 法检测临床 78 例肺结核患者痰标本中 MTB 对利福平的耐药性, 并与比例法比较. **结果** 以比例法为评价标准, PhaB 法利福平耐药性检测的灵敏度、特异性、准确度分别为 84.0%、94.33%、91.03%. **结论** PhaB 法检测痰标本中结核分枝杆菌对利福平的耐药性具有较高的敏感性和特异性, 与比例法符合率高, 且简便快速, 不需要特殊仪器设备, 可作为 MTB 耐药性检测的快速筛选方法.

[关键词] 噬菌体扩增法; 比例法; 利福平; 灵敏度

[中图分类号] R521 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706 (2013) 04-0103-02

Application of the Phage Amplified Biologically Assay in Drug Resistance Testing of Rifampicin of Mycobacterium Tuberculosis

LI Xiao-fei, LIANG Gui-liang, WANG Ya-ling, SU Jun-hua, LI Li-guo
(The Third People's Hospital of Kunming, Kunming Yunnan 650041, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the clinic application value of Phage amplified biologically assay (PhaB) in drug resistance testing of Rifampicin of Mycobacterium tuberculosis. **Method** The sputum samples of Mycobacterium tuberculosis in 78 cases was detected by PhaB method about the drug resistance of Rifampicin and compared with the results of concentration ratio (CR) method's. **Result** CR method as a standard of criterion, the sensitivity, specificity and accuracy of PhaB method in testing Rifampicin resistance was 84.0%, 94.33% and 91.03%, respectively. **Conclusion** Compared with CR methods, PhaB method has higher sensitivity and specificity, so it should be as a better choice for detecting drug resistance of Mycobacterium tuberculosis as it is not only simple but also rapid and without requiring sophisticated facilities.

[Key words] PhaB; Concentration ratio method; Rifampicin; Sensitivity

近年来, 伴随 HIV 感染的流行、MTB 耐药菌株的出现以及人口流动的增加, 结核病在全球范围呈现死灰复燃的态势, 结核疫情严. 在我国, 2009 年度中国疾病预防控制中心报告肺结核发病 107 万例, 死亡率较 2008 年增加 34.32%, 结核病疫情的防控形势十分严峻. 其中耐药结核菌增加是其感染增加和病死率高的原因之一, 因此快速检测 MTB 的耐药是指导成功治疗结核病的重要手段. 由于结核分枝杆菌生长缓慢, 常规药敏试验需 6~8 周或更长时间, 新近发展起来并广泛使用的快培检测技术虽大大缩短了检测周期, 但确诊

仍需 2~3 周, 无法实现结核病快速诊疗. 有文献报道^[1,2], 噬菌体生物扩增技术利用噬菌体生长快, 只能在活的结核分枝杆菌中增殖的特性, 可以快速诊断结核病和检测结核分枝杆菌的药物敏感性, 是一种敏感性和特异性较高的检测方法. 为进一步了解该方法在利福平药物敏感性方面的检测情况, 本试验以比例法为参考标准, 应用噬菌体生物扩增技术检测 MTB 对利福平的耐药性, 现报告如下.

1 材料与方法

[作者简介] 李晓非 (1971~), 女, 云南昆明市人, 医学学士, 副主任检验师, 主要从事免疫和微生物检验工作.
[通讯作者] 汪亚玲. E-mail: docwang@126.com

1.1 材料

1.1.1 研究对象 标本来源于 2011 年 1 月至 7 月间于昆明市第三人民医院就诊的肺结核患者送检痰标本, 筛选抗酸染色从 (+) ~ (++++) 样本共 78 例.

1.1.2 仪器与试剂 FASTPlaque TB TM 结核分枝杆菌快速诊断试剂盒和利福平干粉购自重庆华腾医疗设备有限公司, 由英国 BIOTEC Laboratories Ltd 公司生产, 批号 L-0049.

1.2 方法

噬菌体裂解法按照 FASTPlaque TB TM 试剂盒说明书操作, 所有操作均在无菌条件下进行.

MTB 的比例法药物敏感性检测用 BACTEC

MGIT 960 进行 MTB 的分离培养和利福平耐药性的测定, 按照中国防痨协会制定的结核病细菌学检验规程进行.

2 结果

用 PhaB 法检测 78 例痰标本 RFP 耐药性, 与比例法检测结果比较, PhaB 法耐药 24 例, 敏感 54 例; 比例法检测耐药 25 例, 敏感 53 例. 以比例法检测结果为判断标准, PhaB 法的灵敏度、特异性、准确度分别为 84% (21/25)、94.33% (50/53)、91.03% (71/78). PhaB 法与比例法对利福平检测结果比较见表 1.

表 1 PhaB 法与比例法检测利福平耐药性比较

Tab. 1 Comparison in detecting Rifampicin resistance between PhaB method and concentration ratio method

药物	菌株数	PhaB 法	MGIT 960		敏感度 (%)	特异度 (%)	符合率 (%)
			耐药株	敏感株			
利福平	78	耐药	21	3	84.0	94.33	91.03
		敏感	4	50			

3 讨论

噬菌体是一类以原核生物 (包括细菌、真菌、放线菌或螺旋体等) 为宿主的病毒, 它最早于 1915 年被发现, 在 1917 年再次发现了这种能裂解细菌的生物类群. 自 1947 年第一个分枝杆菌噬菌体被分离到现在, 已发现 250 多种分枝杆菌噬菌体. 近年来分枝杆菌噬菌体在结核病实验研究中的应用取得了很大进展, 其中最引人注目的是噬菌体生物扩增法在结核病实验室快速诊断及耐药性测定中的应用. 其耐药检测原理为: 先将涂阳标本与抗结核药物作用一段时间后, 耐药菌能继续生长, 而敏感菌则被药物杀死. 随后加入的分枝杆菌噬菌体能够感染相应的活的分枝杆菌, 并在菌体内大量增殖, 裂解菌体, 释放子代噬菌体; 未感染细菌的噬菌体被加入的杀毒剂所灭活. 子代噬菌体可感染随后加入的指示细胞 (分枝杆菌), 并使指示细胞裂解, 在培养皿上出现肉眼可见的噬菌斑, 以不加药管为对照, 根据含药管和无药管的噬菌斑情况即可判断细菌的耐药性. 通过本次研究观察, 随着涂片中的菌量的增加, PhaB 法检测时噬菌斑的数量也随之增加, 所以可以认为噬菌斑的数量多少也代表着样本中活菌的数量, 是否通过观察噬菌斑的动态变化来了解抗结核治疗效果, 有待于以后增大观

察样本后继续研究.

以比例法为金标准, PhaB 法检测利福平药物敏感性, 特异性、准确度和符合率分别为 84.0%、94.33% 和 91.03%, 这与 85.0%、97.6%、93.4% 的试验结果相似^[3], 说明 PhaB 法有很好敏感性、特异性和符合率. 而且 PhaB 法可在 48 ~ 72 h 内得到结果, 大大缩短了检测时间, 对于及时指导临床正确用药具有重要价值. 利用噬菌体只能在活菌内繁殖的特性, 还避免了由死菌导致的假阳性结果^[4,5], 且操作简单, 无需特殊仪器, 经济实用, 可作为 MTB 耐药性检测的快速筛选方法

【参考文献】

- [1] 张周云, 熊国亮. 噬菌体生物扩增法对结核病临床诊断的意义[J]. 实验与检验医学, 2010, 28(1):33-34.
- [2] 辛茶香, 诸纪芬, 方育霞. 噬菌体生物扩增法检测肺结核患者痰标本的临床应用价值 [J]. 现代预防医学, 2012, 9(8):1990-1991.
- [3] 崔素琨, 田艳生, 李红光, 等. 噬菌体生物扩增法快速检测临床标本中结核分枝杆菌及其耐药性[J]. 检验医学, 2010, 25(1):75.
- [4] 彭丽, 沈小兵, 罗永艾, 等. 结核分枝杆菌噬菌体试剂盒的研制与初步评价 [J]. 重庆医科大学学报, 2010, 35(3):389-392.
- [5] KANNAN P, YONG H Y, REIMAN L, et al. Bacteriophage 2 based rapid and sensitive detection of Escherichia coli O157:H7 isolates from ground beef [J]. Foodborne Pathog Dis, 2010, 7(12):1551-1558.

(2013-01-19 收稿)