

分枝杆菌双相罗氏培养基在结核病诊断中的应用研究

宋媛媛 刘二勇 陶波山 黄费湘 肖亚利 蓝如束 谭云洪 李辉 叶磊 成诗明 赵雁林

【摘要】 目的 评价分枝杆菌双相罗氏培养基在结核病诊断中的价值,探讨其在我国基层实验室应用的可行性。方法 采取多中心试验方法,在我国 3 个省的 3 个地市级结核病诊疗机构连续纳入 2014 年 10 月至 2015 年 10 月期间的初诊肺结核可疑症状者 2320 例,其中 15 例因分枝杆菌改良罗氏培养基(简称“罗氏培养基”)和分枝杆菌双相罗氏培养基(简称“双相培养基”)中的 1 种或 2 种培养污染或结果缺失,对两种培养基培养结果进行比较时不计入分析。每例患者留取 3 份痰标本(即时痰、夜间痰、晨痰)进行萋-尼染色法涂片镜检(简称“涂片”),并选取 2 份性状好的痰标本同时进行罗氏培养基培养、双相培养基培养。使用 SPSS 24.0 软件,采用配对 χ^2 检验比较两种培养基的阳性检出率,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义;分别以罗氏培养基培养结果、临床诊断为标准对双相培养基的检测效能进行评价;采用 Wilcoxon 秩和检验对罗氏培养基与双相培养基检出时间的差异进行统计学分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。结果 罗氏培养基和双相培养基两种培养方法阳性检出率分别为 19.65% (453/2305)和 22.00% (507/2305),差异有统计学意义($\chi^2 = 22.091, P = 0.000$);以罗氏培养基培养结果为标准,双相培养基的敏感度为 91.39% (414/453),特异度为 94.98% (1759/1852),一致率为 94.27% (2173/2305);以临床诊断为标准,罗氏培养基和双相培养基的 ROC 曲线下面积分别为 0.694(95%CI:0.672~0.715)、0.707(95%CI:0.685~0.728);罗氏培养基报阳时间中位数(四分位数)[$M(Q_1, Q_3)$]为 28(21, 34) d,双相培养基报阳时间 $M(Q_1, Q_3)$ 为 18(14, 24) d,差异有统计学意义($Z = 15.114, P = 0.000$)。结论 双相培养基较罗氏培养基具有更高的阳性检出率,诊断价值较高,报阳时间明显缩短,是一种可以作为结核病临床诊断的参考方法,在我国基层实验室有一定推广应用价值。

【关键词】 分枝杆菌; 结核; 培养基; 细菌学技术; 诊断; 对比研究

Evaluation the application of mycobacterial biphasic L-J medium in the diagnosis of tuberculosis SONG Yuan-yuan*, LIU Er-yong, TAO Bo-shan, HUANG Fei-xiang, XIAO Ya-li, LAN Ru-shu, TAN Yun-hong, LI Hui, YE Lei, CHENG Shi-ming, ZHAO Yan-lin. * National Tuberculosis Reference Laboratory, National Center for Tuberculosis Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China
Corresponding author: ZHAO Yan-lin, Email: zhaoyl@chinaacdc.cn

【Abstract】 **Objective** To evaluate the value of mycobacterial biphasic L-J medium in the diagnosis of tuberculosis, and to explore its feasibility in China. **Methods** We conducted a multicenter trial to consecutively enroll all patients with suspected TB at 3 prefecture-level TB clinics in 3 provinces of China from October 2014 to October 2015. Of the 2320 suspicious patients enrolled, 15 cases had either one or two of the two cultures (mycobacterial modified L-J medium and mycobacterial biphasic L-J medium) with contamination or missing results, and their comparison of the culture results of the two media is not included in the analysis. 3 sputum specimens collected per patient (immediate sputum, night sputum, morning sputum) for Ziehl-Neelson stain smear microscopy (“smear”), and 2 sputum specimens with good traits were selected simultaneously for modified L-J medium and biphasic L-J medium culture. The positive detection rate of the two media was compared by paired χ^2 test using SPSS 24.0

doi:10.3969/j.issn.1000-6621.2018.12.016

基金项目:中国防痨协会分枝杆菌双相罗氏培养基(培养法)在结核病诊断中的现场应用性评估项目(ZGFL-2014-002)。

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心结核病预防控制中心 国家结核病参比实验室(宋媛媛、赵雁林),患者关怀部(刘二勇);广西壮族自治区北海市结核病防治院检验科(陶波山);湖南省邵阳市结核病防治医院检验科(黄费湘);河南省南阳市第六人民医院检验科(肖亚利);广西壮族自治区疾病预防控制中心结核病防治所(蓝如束);湖南省结核病防治所检验科(谭云洪);河南省疾病预防控制中心结核病参比实验室(李辉);北京联合大学师范学院基础教学部(叶磊);中国防痨协会(成诗明)

通信作者:赵雁林,Email: zhaoyl@chinaacdc.cn

software, and $P < 0.05$ was considered statistically significant; The detection efficiency of the biphasic L-J medium was evaluated by the culture results of modified L-J medium and the clinical diagnosis as the standard; The difference between the detection time of modified L-J medium and biphasic L-J medium was statistically analyzed by Wilcoxon rank sum test. $P < 0.05$ was considered statistically significant. **Results** The positive detection rates of modified L-J medium and biphasic L-J medium were 19.65% (453/2305) and 22.00% (507/2305), respectively, and the difference was statistically significant ($\chi^2 = 22.091, P = 0.000$); Based on the culture results of modified L-J medium, the sensitivity of biphasic L-J medium was 91.39% (414/453), and the specificity was 94.98% (1759/1852), and the agreement rate was 94.27% (2173/2305); Based on clinical diagnosis, the area under the ROC curve of modified L-J medium and biphasic L-J medium were 0.694 (95%CI: 0.672–0.715), 0.707 (95%CI: 0.685–0.728), respectively; The median (quartile) ($M(Q_1, Q_3)$) of days when modified L-J medium reported a positive result was 28 (21, 34) d, while the $M(Q_1, Q_3)$ of days when biphasic L-J medium reported a positive result was 18 (14, 24) d. The difference was statistically significant ($Z = 15.114, P = 0.000$). **Conclusion** Biphasic L-J medium has a higher positive detection rate than modified L-J medium. This method has a high diagnostic value, and the time for reporting positive results is significantly shortened. It is a reference method that can be used as a clinical diagnosis for tuberculosis, and has certain application value in grassroots laboratories in China.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; Culture media; Bacteriological techniques; Diagnosis; Comparative study

结核病细菌学诊断的“金标准”是培养法,其既是结核病最可靠的检测方法,也是获得阳性培养物进行菌种鉴定、药物敏感性试验(简称“药敏试验”)及分子生物学检测研究的基础。目前,公认的分枝杆菌培养方法有 2 种,即快速液体培养法和固体罗氏培养法。快速液体培养法检测结果报告的时间快,阳性结果报告时间一般为 10~20 d,阴性结果报告时间为 42 d,但其价格昂贵,需要特殊仪器,在基层医疗卫生机构使用受到一定的限制。固体罗氏培养法是传统的培养方法,也是我国普遍应用的分枝杆菌培养方法,报告结果的时间较长,一般阳性结果报告时间为 20~30 d,阴性结果报告时间为 56 d。其价格低廉,能在县(区)级基层医疗卫生机构使用。

分枝杆菌双相罗氏培养基(简称“双相培养基”)是一种能促进分枝杆菌快速生长的新型培养基,阴性结果报告时间为 42 d。其结合了改良罗氏培养基和液体培养基的优点,分枝杆菌可在培养基的固体斜面上形成典型的菌落,同时又因为含有显色剂,在液体培养基中呈现粉红色或红色颗粒状生长。为探讨该培养基在基层实验室推广应用的可行性,笔者选取我国 3 个省的 3 个地市级结核病诊疗机构,采用多中心试验方法评价该培养基在结核病诊断中的价值。

材料和方法

1. 研究对象:连续纳入 2014 年 10 月至 2015 年 10 月在广西壮族自治区北海市结核病防治院、湖南省邵阳市结核病防治医院、河南省南阳市第六人民医院就诊的初诊肺结核可疑症状者作为研究对象,

共计 2320 例。其中,肺结核患者 1176 例,非肺结核患者 1144 例;其中,男 1536 例(66.21%),女 784 例(33.79%);最小年龄 10 岁,最大年龄 104 岁,年龄中位数(四分位数) [$M(Q_1, Q_3)$] 为 50(33, 63)岁;其中 15 例因分枝杆菌改良罗氏培养基(简称“罗氏培养基”)和双相培养基中的 1 种或 2 种培养污染或结果缺失,故在两种培养基检测结果进行比较时不计入分析。由接受过培训的临床医生询问研究对象的基本信息、本次就诊症状及病史,并结合细菌学检查和 X 线胸部摄影(简称“胸片”)结果,参考《WS 288—2008 肺结核诊断标准》^[1] 诊断肺结核患者。每例患者均有胸片,并均留取 3 份痰标本(即时痰、夜间痰、晨痰)进行萋-尼染色法涂片镜检(简称“涂片”),并选取 2 份性状好的痰标本同时进行罗氏培养基培养、双相培养基培养。

2. 试剂及培养基:萋-尼染色液购自珠海贝索生物技术有限公司。罗氏培养基购自河南省赛诺特生物技术有限公司,由 7 ml 改良罗氏培养基组成,阴性结果观察至第 8 周报告。双相培养基购自珠海市银科医学工程股份有限公司,由固体和液体两部分组成;固体部分含有 7 ml 国内外通用的改良罗氏培养基成分,液体部分由 3 ml 基础培养基、促生长剂、抑菌剂和显色剂组成;阴性结果观察至第 6 周报告。

3. 涂片镜检:萋-尼染色法涂片镜检遵照《痰涂片显微镜检查标准化操作及质量保证手册》^[2] 中的标准化操作程序执行。

4. 痰标本前处理方法及培养:采用中和离心法对同一份痰标本进行去污染处理,分别接种 0.1~0.15 ml 在罗氏培养基和双相培养基上进行培养,遵照《分枝杆菌分离培养标准化操作程序及质量保

证手册》^[3]中的标准化操作程序执行。

5. 质量保证:(1)制定项目实验室标准化操作程序手册及质量保证手册。(2)研究人员统一经过培训合格。(3)国家级和省级疾控中心(结核病防治所)对项目点每 3 个月进行 1 次督导。(4)每月进行数据统计分析,包括标本量、阳性率、涂阳培阳率、涂阳培阴率、污染率。

6. 统计学处理:使用 SPSS 24.0 软件,采用配对 χ^2 检验比较两种培养基的阳性检出率,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义;分别以罗氏培养基培养结果、临床诊断为标准对双相培养基的检测效能进行评价;采用 Wilcoxon 秩和检验对罗氏培养基与双相培养基检出时间的差异进行统计学分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 阳性检出率:在初诊肺结核可疑症状者中,涂片阳性率为 15.30%(355/2320);罗氏培养基和双相培养基两种培养方法阳性检出率分别为 19.65%(453/2305)和 22.00%(507/2305),后者较前者高 2.34%,差异有统计学意义($\chi^2 = 22.091, P = 0.000$)。在临床诊断的肺结核患者中,涂片阳性率为 30.19%(355/1176);涂片加罗氏培养基培养阳性率为 43.11%(507/1176);涂片加双相培养基培养阳性率为 46.34%(545/1176)。

2. 以罗氏培养基培养结果为标准对双相培养基检测效能的评价:双相培养基的敏感度为 91.39%(414/453),特异度为 94.98%(1759/1852),一致率为 94.27%(2173/2305)(表 1)。假阴性率为 8.61%(39/453),假阳性率为 5.02%(93/1852)。在双相培养基检测出现假阴性的 39 例患者中,有 24 例涂片结果为阴性,8 例涂片结果为 1~8 条/300 个视野或+;有 15 例罗氏培养基培养结果为实际菌落数,13 例罗氏培养基培养结果为+;在双相培养

基检测出现假阳性的 93 例患者中,双相培养基培养结果均为实际菌落数。

3. 以临床诊断为标准评价罗氏培养基和双相培养基的诊断价值:罗氏培养基诊断肺结核患者时 ROC 曲线下面积为 0.694(95% CI: 0.672 ~ 0.715),与完全无价值的诊断试验曲线下面积 0.5 相比较差异有统计学意义($Z = 17.636, P = 0.000$),诊断价值较低。双相培养基诊断肺结核患者时 ROC 曲线下面积为 0.707(95% CI: 0.685 ~ 0.728),与完全无价值的诊断试验曲线下面积 0.5 相比较差异有统计学意义($Z = 18.818, P = 0.000$),诊断价值中等。对两种培养基的曲线下面积进行比较,差异无统计学意义($Z = 0.836, P = 0.403$)(图 1)。

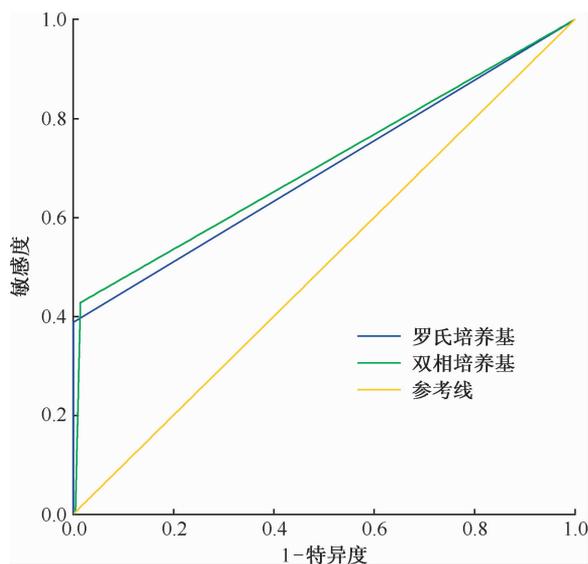


图 1 以临床诊断为标准,罗氏培养基和双相培养基诊断肺结核患者的 ROC 曲线

4. 罗氏培养基与双相培养基报阳时间分析:罗氏培养基报阳时间中位数(四分位数) $[M(Q_1, Q_3)]$ 为 28(21,34) d,双相培养基报阳时间 $M(Q_1, Q_3)$ 为

表 1 以罗氏培养基培养结果为标准对双相培养基检测效能的评价

罗氏培养基	双相培养基(例)		合计(例)	敏感度(%)	特异度(%)	阳性预测值(%)	阴性预测值(%)	一致率(%)
	阳性	阴性						
阳性	414	39	453	91.39	94.98	81.66	97.83	94.27
阴性	93	1759	1852					
合计	507	1798	2305					

注 敏感度=真阳性例数/(真阳性例数+假阴性例数) $\times 100\%$;特异度=真阴性例数/(真阴性例数+假阳性例数) $\times 100\%$;阳性预测值=真阳性例数/(真阳性例数+假阳性例数) $\times 100\%$;阴性预测值=真阴性例数/(真阴性例数+假阴性例数) $\times 100\%$;一致率=(真阳性例数+真阴性例数)/总例数 $\times 100\%$

表 2 不同涂片结果使用罗氏培养基和双相培养基报阳时间比较

涂片结果	标本量(例)		报阳时间 [d, M(Q ₁ , Q ₃)]		Wilcoxon 秩和检验	
	罗氏培养基	双相培养基	罗氏培养基	双相培养基	Z 值	P 值
阴性	152	190	31(22, 35)	19.5(15.75, 22.50)	9.451	0.000
1~8 条/300 个视野 ^a	19	22	29.79±8.22	19.27±5.63	4.835 ^b	0.000
+	80	87	28(21, 33.75)	16(12, 21)	6.903	0.000
++	92	100	26(21, 28)	15(14, 21)	7.933	0.000
+++	74	72	23(19, 28)	16(14, 21)	-5.811	0.000
++++	38	37	21(18.75, 28)	17(14, 21)	-3.765	0.000
合计	455	508	28(21, 34)	18(14, 24)	15.114	0.000

注 ^a: 报阳时间符合正态分布, 故采用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示, 统计学检验采用“*t* 检验”; ^b: *t* 值

18(14, 24) d, 双相培养基比罗氏培养基报阳时间明显缩短, 差异有统计学意义 ($Z = 15.114, P = 0.000$)。不同涂片结果使用双相培养基较罗氏培养基报阳时间均明显缩短, 差异均有统计学意义 (表 2)。

讨 论

在结核病防治工作中快速诊断结核病至关重要, 诊断结核病的金标准是培养法。据文献报道双相培养基, 加入不同营养物的固体培养基、各类液体培养基与罗氏培养基培养结果相比, 阳性检出率提高分别在 0.8%~7.2%^[4-6]、1.6%~7.1%^[7-9]、0.4%~7.5%^[10-14] 之间。本研究双相培养基较罗氏培养基阳性检出率提高 2.34%, 与文献报道相符。双相培养基液体部分可达到快速培养的目的, 固体部分可提供分枝杆菌典型菌落, 体现了双相培养基的优点^[15]; 一般的液体培养基阳性菌落呈白色颗粒状, 难以鉴别菌落特性^[5], 本研究的双相培养基在液体培养基中加入了显色剂, 实验员可通过肉眼观察双相培养基变色情况判断是否有分枝杆菌生长。

本研究显示双相培养基的敏感度为 91.39%, 特异度为 94.98%。据文献报道^[16-20], 双相培养基、加入不同营养物的固体培养基、各类液体培养基的敏感度在 67.3%~98.3%、特异度在 84.4%~100%, 本研究结果在文献报道范围内, 且敏感度、特异度较高。双相培养基与罗氏培养基培养结果的一致率为 94.27%, 假阴性率为 8.61%, 假阳性率为 5.02%。在双相培养基检测出现假阴性的 39 例患者中, 有 24 例涂片结果为阴性, 8 例涂片结果为 1~8 条/300 个视野或+; 有 15 例罗氏培养基培养结果

为实际菌落数, 13 例罗氏培养基培养结果为+, 由此得出尽管罗氏培养基检出阳性, 但阳性级别较低, 而且多数是仅为其中 1 份痰标本检出阳性, 且涂片结果大多为阴性, 因此双相培养基没能检出也存在较大可能。出现假阳性的原因主要是双相培养基诊断价值较高, 检出了罗氏培养基没有检出的一部分患者。出现假阳性的 93 例患者中, 双相培养基培养结果均为实际菌落数, 这说明双相培养基在培养含菌量极低的痰标本时具有更高的阳性检出率。尽管两种培养基的 ROC 曲线下面积不是太高, 主要因为比较对象是临床诊断。结核病的临床诊断主要依据临床症状和体征, 结核分枝杆菌病原学、病理学、影像学等检查的证据^[21]。虽然细菌学诊断是结核病诊断的“金标准”, 但痰涂片的阳性检出率较低, 痰培养虽可提高阳性检出率, 但也不足 50%^[22]。根据 2018 年全球结核病报告, 我国 2017 年活动性肺结核患者病原学阳性率为 32%^[23]。《“十三五”全国结核病防治规划》^[24] 中提出肺结核患者病原学阳性率需达到 50% 以上。本研究在活动性肺结核患者中, 涂片阳性率为 30.19%, 涂片加罗氏培养基培养阳性率为 43.11%, 涂片加双相培养基培养阳性率为 46.34%, 使用双相培养基培养阳性率已经更接近 50% 的目标, 也提示需要采取结核分枝杆菌核酸检测来进一步提高病原学阳性率。

双相培养基较罗氏培养基报阳时间缩短 10 d, 略高于文献报道的缩短 6~9.3 d^[10, 25-27]。而且在不同阳性级别的痰标本中也表现出更短的报阳时间, 差异均有统计学意义。随着涂片阳性级别升高, 双相培养基报阳时间随之更短, 报阳时间与标本中的活菌量有关, 活菌量越大, 平均报阳时间越短^[28]。本研究证实了这一结论。

双相培养基较罗氏培养基具有更高的阳性检出率,诊断价值较高,报阳时间明显缩短,是一种可以作为结核病临床诊断的参考方法,在我国基层实验室有一定推广应用价值。

志谢 湖南省邵阳市结核病防治医院、广西壮族自治区北海市结核病防治院、河南省南阳市第六人民医院工作人员在研究现场所付出的努力与辛勤工作!

参 考 文 献

- [1] 中华人民共和国卫生部. WS 288—2008 肺结核诊断标准. 2008-01-16.
- [2] 赵雁林,姜广路. 痰涂片显微镜检查标准化操作及质量保证手册. 北京:中国协和医科大学出版社,2009.
- [3] 赵雁林,王黎霞,成诗明,等. 分枝杆菌分离培养标准化操作程序及质量保证手册. 北京:人民卫生出版社,2013.
- [4] 周俊梅. 几种结核分枝杆菌培养方法的应用分析. 中国实用医药,2012,7(30):51-52.
- [5] 赵大力,韩中波,周亚丽. 结核分枝杆菌固液双相培养基的研究. 中国实验诊断学,2011,15(12):2088-2089.
- [6] 申建维,袁玮,李娉,等. 平菇双相培养基用于结核杆菌培养的研究. 中国防痨杂志,2001,23(4):241-244.
- [7] 汪芝满,焦贤春,王康. 结核分支杆菌生长因子培养基的临床应用. 安徽医药,2005,9(6):456.
- [8] 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. 中国防痨杂志,2004,26(3):184-185.
- [9] 马俊,王自立. 结核分枝杆菌快速培养的研究进展及其临床意义. 中国脊柱脊髓杂志,2007,17(5):388-390.
- [10] 温贵华,刘晋洪,刘婷,等. 结核分枝杆菌快速培养基临床应用研究. 国际检验医学杂志,2012,33(5):526-527.
- [11] 彭亦平,谭彩萍,熊国亮. BACTEC MGIT 960 快速培养及药敏在肺结核诊治中的应用评价. 江西医药,2016,51(1):21-22,30.
- [12] Diriba G, Kebede A, Yaregal Z, et al. Performance of Mycobacterium Growth Indicator Tube BACTEC 960 with Lowenstein-Jensen method for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* at Ethiopian National Tuberculosis Reference Laboratory, Addis Ababa, Ethiopia. BMC Res Notes, 2017, 10(1): 181-186.
- [13] 叶碧峰,雷永良,王晓光,等. BACTEC™ MGIT™ 320 液体快速培养在检测结核分枝杆菌及耐药性中的应用. 实用预防医学,2016,23(2):232-233.
- [14] Zhao P, Yu Q, Chen L, et al. Evaluation of a liquid culture system in the detection of mycobacteria at an antituberculosis institution in China; A retrospective study. J Int Med Res, 2016,44(5):1055-1060.
- [15] 匡铁吉,董梅,张青霞,等. 匡氏琼脂培养基用于痰结核菌直接药敏试验的效果研究. 中国检验医学与临床,2002,3(2):54-56.
- [16] Cui Z, Wang J, Zhu C, et al. Evaluation of a novel biphasic culture medium for recovery of mycobacteria; a multi-center study. PLoS One, 2012,7(4): e36331.
- [17] Ghatole M, Sable C, Kamale P, et al. Evaluation of biphasic culture system for mycobacterial isolation from the sputum of patients with pulmonary tuberculosis. Indian J Med Microbiol, 2005,23(2):111-113.
- [18] Shinu P, Nair A, Singh V, et al. Evaluation of rapid techniques for the detection of mycobacteria in sputum with scanty bacilli or clinically evident, smear negative cases of pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2011, 106(5): 620-624.
- [19] Çiftci İH, Karakeçe E. Comparative evaluation of TK SLC-L, a rapid liquid mycobacterial culture medium, with the MGIT system. BMC Infect Dis, 2014,14:130.
- [20] Asmar S, Drancourt M. Rapid culture-based diagnosis of pulmonary tuberculosis in developed and developing countries. Front Microbiol, 2015, 6: 1184.
- [21] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. WS 196—2017 结核病分类. 2017-11-09.
- [22] 闫国蕊,王勇鸣,杨萍,等. 结核抗体联合检测对结核病诊断价值分析. 中国防痨杂志,2013,35(4):286-287.
- [23] World Health Organization. Global tuberculosis report 2018. Geneva: World Health Organization, 2018.
- [24] 中华人民共和国国务院. “十三五”全国结核病防治规划. 2017-02-16.
- [25] 黄志强,张日东,吴智龙,等. 新型改良罗氏培养基与罗氏酸基检测结核分枝杆菌比较. 广东医学,2011,32(9):1152-1153.
- [26] 张传兴. 变色液体培养基用于结核分枝杆菌快速培养的研究. 西部医学,2010,22(9):1614-1615.
- [27] 王智存,白广红,施婕,等. 显色固液双相培养基快速检测结核分枝杆菌的临床应用评价. 国际检验医学杂志,2016,37(19):2756-2757.
- [28] 陈军,王飞,任易,等. BacT/Alert 3D 系统与罗氏培养基分离分枝杆菌的比较. 中国防痨杂志,2007,29(2):151-153.

(收稿日期:2018-09-11)

(本文编辑:薛爱华)