

结核分枝杆菌胶体金法快速鉴别试剂盒的临床应用观察

王易伟

(重庆市肺科医院 重庆 400020)

目前,传统的分枝杆菌菌种鉴定方法需在改良罗氏 L-J 培养基、硝基苯甲酸 PNB 和 2-噻吩羧酸肼 (TCH) 鉴别培养基上初步鉴定结核分枝杆菌 (MTb) 和非结核分枝杆菌 (MOTT) 后,再观察细菌菌落形态、生长速度、生长温度和色素,并进行一系列生化试验,操作繁琐、费时,影响因素多;其他,如 BACTEC-TB 系统的 NAP 试验和 Gen-Probe 系统的结核分枝杆菌直接检测 (MTD) 试验等也可快速鉴别结核分枝杆菌复合群 (MTC) 和 MOTT,但试剂仪器价格昂贵,难以在普通实验室广泛开展。^[1]而我们引进的日本旨在检测抗原为结核分枝杆菌分泌的特异性蛋白 MPB64 的结核分枝杆菌胶体金快速鉴别试剂盒对此进行比较试验,观察其优劣。

材料和方法

一、材料

1. 标本来源:收集 2006 年 10 月—2007 年 6 月来自本院住院和门诊痰初代分离分枝杆菌阳性标本

100 份。

2. 试剂盒:由杭州创新生物检控技术有限公司提供。

二、方法

1. 分枝杆菌涂片和培养检测:按照中国防痨协会制定的《结核病诊断细菌学检验规程》^[2]的方法进行。

2. 传统菌种鉴定实验:分枝杆菌菌株经对硝基苯甲酸 (PNB, 500 ug/ml) 培养生长、28℃ 生长、耐热触酶实验,区分结核分枝杆菌群 (MTBC) 和非结核分枝杆菌群 (NTM);经 2-噻吩羧酸肼 (TCH) 生长试验、硝酸还原试验和烟酸试验,区分结核分枝杆菌和牛分枝杆菌。

3. 结核分枝杆菌直接检测 (MTD) 实验:参照美国 Gen-Probe 公司 rRNA 扩增结核分枝杆菌直接检测 (MTD) 试剂盒操作说明书进行。^[3]

4. 分枝杆菌胶体金快速鉴别诊断实验:参照杭州创新生物检控技术有限公司提供的试剂盒操作说

说明书进行。

三、检测原理

根据免疫层析法原理,利用胶体金标记抗体被溶解后与样本中的抗原(结核分枝杆菌分泌的特异性蛋白 MPB64)形成免疫复合体,再通过毛细管现象展开移动,至判定部位被固化抗体捕捉,形成肉眼可观察可确定的紫红色条带而判定样本中结核分枝杆菌的存在。

四、操作方法

1. 菌液制备:固体培养基(比如:改良罗氏培养基)取菌落 1 μ l,按常规磨菌制成菌悬液,待测;液体培养基确认菌落生长后,摇匀待测。

2. 检测:用加样器吸取上述待测菌液 100 μ l,滴加到检测板的样本孔下部,60 min 内判定结果。

3. 结果判定:检测板的判定部(T)和(C)均出现紫红色条带为阳性(+);仅判定部(C)出现紫红色条带为阴性(-)。

结 果

对临床分离的 100 株初代分枝杆菌,用结核分枝杆菌胶体金快速鉴别试剂盒检测的实验结果如下。

表 1 100 份培养标本胶体金法与传统方法和 MTD 法检验结果^{a)}

		传统法		合计	MTD 法	
		MTb	MOTT		MTb	MOTT
胶 体 金	阳性	77(A)	1(B)	78	77(A)	1(B)
	阴性	1(C)	21(D)	22	1(C)	21(D)
	总数	78(A+C)	22(B+D)	100	78(A+C)	22(B+D)

a) 诊断灵敏度:98.72(77/78);诊断特异性:95.45(21/22);阳性预测值:98.72(77/78);阴性预测值:95.45(21/22)。

从上表 1 可见,1 例被误判为阳性的非结核分枝杆菌,在改良罗氏培养基中呈结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌混合生长,该试剂盒能够检出所有 77 例结核分枝杆菌,并且能够从结核与非结核分枝杆菌混合生长的培养基中检出结核分枝杆菌的存在。1 例被误判为阴性的结核分枝杆菌,可能与特异性

分泌蛋白基因变异有关,有待进一步研究。同时,该试剂盒与结核分枝杆菌直接检测法(MTD)之间有良好的相关性。

讨 论

结核分枝杆菌胶体金快速鉴别试剂盒与传统菌种鉴定实验和结核分枝杆菌直接检测法(MTD)有良好的符合性,能够检出 98% 结核分枝杆菌;并且,能够从结核与非结核分枝杆菌混合生长的培养基中检出结核分枝杆菌的存在。对于,结核与非结核菌重复感染情况,用以往试验方法鉴定,一般都较困难,而分枝杆菌胶体金快速鉴别试剂盒能有效判别,从而可避免漏诊,提高阳性检出率。

同时,该试剂盒对临床直接分离的初代培养结核菌,都显示非常强的阳性反应,对非结核分枝杆菌不显示交叉反应;该试剂盒在分离培养后,不需进行增菌培养即可直接进行检测;该试剂盒以结核分枝杆菌外分泌特异性蛋白 MPB64 为检测对象,以免胶体金法测定该蛋白,操作简便、快速,15 min 可获结果;该试剂盒在生物安全柜内向检测板滴下样本就能检测,可将菌体气溶胶控制在最小程度,减轻医务工作者的感染机会。同时不需特殊设备,适用于各级实验室使用。而近年来建立的许多分子菌种鉴定新技术,比如:PCR 扩增、PCR-直接测序、PCR-DNA 探针、PCR-芯片等鉴定法,以及色谱技术等,尽管各有不同的优缺点,但就某一种方法来说,都很不完善,有些敏感性较低、影响因素多、重复性较差;有些虽然灵敏、快速,但鉴定菌种不多,技术要求高,仪器设备昂贵,难以广泛应用。

参考文献:

- 1 熊礼宽,主编.结核病实验诊断学[M].北京:人民卫生出版社,2003:2-3
- 2 中国防痨协会.结核病诊断细菌学检验规程[J].中国防痨杂志,1996,18(1):18-31
- 3 王易伟,钟敏,胡频频. rRNA 扩增直接检测结核分枝杆菌的临床应用价值探讨[J].中华检验医学杂志,2005,28(5):543-544

(收稿日期:2007-09-26)