

[文章编号] 1000-2200(2004)02-0118-03

·基础医学·

## 耐药肺结核患者痰标本中结核分枝杆菌 L 型四种检测方法比较

叶松, 王晓秋

[摘要] 目的: 比较耐药肺结核患者痰标本中结核分枝杆菌 L 型的四种实验室检查方法及其临床意义。方法: 对 103 例耐药肺结核患者的痰标本分别采用萋-尼(Ziehl-Neelsen) 抗酸染色法、改良罗氏培养法、聚合酶链反应(PCR) 和结核分枝杆菌 L 型培养法进行检测。结果: 结核分枝杆菌 L 型培养阳性率高于抗酸染色涂片、改良罗氏培养和 PCR 检测( $P < 0.05 \sim P < 0.005$ )。结论: 结核分枝杆菌 L 型培养可提高结核分枝杆菌的阳性检出率, 对结核病的早期、快速诊断具有重要价值; 耐药肺结核患者有较高的结核分枝杆菌 L 型感染率, 这也是结核病程缓慢变化、复发、难治的重要原因。

[关键词] 结核, 肺; 结核分枝杆菌; 细菌 L 型

[中国图书资料分类法分类号] R 521 [文献标识码] A

## Comparison of 4 methods for detection of L-form of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum of patients with multidrug resistant pulmonary tuberculosis

YE Song, WANG Xiao-qiu

(Department of Aetiology and Immunology, Medical College, Anhui University of Science and Technology, Anhui 232001, China)

[Abstract] **Objective:** To make comparison among 4 methods for detecting L-form of *Mycobacterium tuberculosis* and to study its clinical significance in patients with multidrug resistant pulmonary tuberculosis.

**Methods:** Acid-fast sputum smear, modified L-J culture, L-form culture and PCR technique were conducted in 103 cases of multidrug resistant pulmonary tuberculosis(MDR-PTB). **Results:** The positive rate of L-form culture was higher than that of acid-fast sputum smear, modified L-J culture, and PCR( $P < 0.01$  to  $P < 0.005$ ).

**Conclusions:** Sputum culture for L-form of *Mycobacterium tuberculosis* can raise the detected positive rate and facilitate early rapid diagnosis. The infectious rate among patients with MDR-PTB is much high, which simultaneously is an important cause of recurrence and aggravation of tuberculosis.

[Key words] tuberculosis, pulmonary; *Mycobacterium tuberculosis*; bacteria L-form

结核分枝杆菌 L 型实质上是结核分枝杆菌的细胞壁缺陷型(cell-wall-deficiency, CWD), 由于细胞壁不同程度的缺损, 常表现为形态的多形性、染色的多变性, 生化反应大多阴转, 抗原性也有明显改变; 同时由于缺壁而对渗透压敏感, 在普通培养基中不能生长, 因此造成临床上严重漏诊和误诊<sup>[1]</sup>。本文应用萋-尼(Ziehl-Neelsen) 抗酸染色法、改良罗氏培养法、聚合酶链反应(PCR) 和结核分枝杆菌 L 型培养法对 103 例多耐药肺结核患者的痰标本进行结核分枝杆菌 L 型检测。现作报道。

### 1 材料与方法

1.1 检测对象 103 例均为我院 2000 年 3 月~2003 年 5 月附属医院确诊为肺结核病的住院患者, 并经多种抗结核药物治疗半年以上无明显效果, 药物敏感试验显示同时耐利福平、异烟肼等多种药物。男 73 例, 女 30 例; 年龄 23~64 岁。病程 6 个月~15 年。

1.2 试剂 (1) 萋-尼抗酸染色液(自行配制), (2) 改良罗氏培养基(自行配制), (3) 92-3TBL 液体培养基(结核分枝杆菌 L 型培养基, 蚌埠医学院病原生物学教研室提供), (4) 结核分枝杆菌 PCR 诊断试剂盒(以结核分枝杆菌染色体 DNA 的重复保守序列 IS 6110 为引物, 扩增片段为 245 bp, 华美生物工程

[收稿日期] 2003-09-01

[作者单位] 安徽理工大学医学院 病原学和免疫学教研室, 安徽淮南 232001

[作者简介] 叶松(1958-), 男, 安徽桐城人, 副主任医师。

公司提供)、SX-240B PCR 仪(国产)。

1.3 方法 (1)标本的采集:嘱待检患者清晨用清水漱口数次后,用力自气管深部咳出痰液吐至无菌的广口瓶。(2)标本的处理:无菌条件下,取晨痰 2~3 ml,加入 0.25%酚红指示剂 0.1~0.2 ml,再加入 2~3 倍 1 mol/L 氢氧化钠,滴管吹吸混匀,37℃消化 15 min,加等量 1 mol/L 盐酸中和,3 000 r/min 离心 30 min,取沉淀物作涂片、结核分枝杆菌培养以及结核分枝杆菌 L 型培养。(3)PCR:按结核分枝杆菌特异性基因检测试剂盒说明书进行操作。

1.4 统计学方法 采用配对  $\chi^2$  检验。

## 2 结果

结核分枝杆菌 L 型培养阳性率均高于抗酸染色涂片改良、罗氏培养和 PCR 检测( $P < 0.01 \sim P < 0.005$ ) (见表 1)。

表 1 4 种方法检测痰液阳性结果比较( $n$ )

L 型培养	抗酸染色			改良罗氏培养			PCR		
	+	-	合计	+	-	合计	+	-	合计
+	39	20	59	32	27	59	44	15	59
-	2	42	44	0	44	44	3	41	44
合计	41	62	103	32	71	103	47	56	103
$\chi^2$	13.14			25.04			6.72		
$P$	$< 0.005$			$< 0.005$			$< 0.01$		

## 3 讨论

结核分枝杆菌在体内外受物理、化学(药物)以及机体免疫因素的作用,可发生变异,形成 L 型,这是结核分枝杆菌抵御外界不利环境和赖以生存的重要形式。由于 L 型菌细胞壁呈缺陷型,许多常规检测方法不能查出,造成临床标本检测结果假阴性。同时 L 型菌细胞壁中抗原成分如磷脂和蜡质的减少或丢失,不能刺激单核巨噬细胞转变为上皮样细胞和朗汉斯巨细胞,故无典型的结核结节形态,感染机体时常缺乏明显临床症状和体征,因而容易导致误诊和漏诊。L 型菌可在体内长期生存或生长繁殖,导致病情的缓慢进展。一旦机体抵抗力下降,L 型菌又可大量繁殖引起 L 型败血症或回复为结核分枝杆菌导致病情恶化进展,同时结核分枝杆菌 L 型也是重要传染源之一<sup>[2]</sup>。Ratnam 等<sup>[3]</sup>研究发现,无细胞壁的小球样结核分枝杆菌仍能保持活跃状态,将其接种于豚鼠,10~16 周后出现相当比例

的结核菌素反应,尸检显示结核或与结核相关;研究还发现,随着豚鼠的死亡,这种无细胞壁的小球样微生物可转化为结核分枝杆菌的常见形态。戴云海等<sup>[4]</sup>报道,将结核分枝杆菌 L 型经腹股沟皮下注射和经尾静脉注射感染 C<sub>57</sub>BL/6N 小鼠,可引起小鼠主要器官组织不同程度的间质性炎症;并发现结核分枝杆菌 L 型与肿瘤的发生有一定的关系。因此,开展 L 型菌的检测与研究,对于结核病,特别是慢性难治性患者的诊断、治疗、预后判定及流行病学调查都有重要的价值。

本研究结果显示,103 例耐多药肺结核患者的痰标本使用改良罗氏培养法检出结核分枝杆菌 L 型的阳性例数最低,只有 32 例(31.07%)。一般认为细菌 L 型由于缺乏细胞壁或细胞壁不完整而造成菌体内渗透压高,在等渗的普通培养基上容易溶解破坏,导致普通结核分枝杆菌培养常为阴性。抗酸染色法是临床检查结核分枝杆菌最常用的方法,具有简便、快速的特点,但涂片检查菌数需( $0.5 \times 5$ )  $\times 10^4$ /ml 之多,且结核分枝杆菌 L 型因细胞壁缺陷呈高度多形性和异质性,抗酸染色可表现为红色、紫色、淡红色甚至抗酸染色阴性(如 Much 颗粒)。王和<sup>[5]</sup>发现细胞壁部分缺失的 L 型仍然可保留革兰染色阳性和抗酸染色阳性的特征,但细胞壁完全缺失的稳定 L 型则通常成为革兰染色阴性和抗酸染色阴性。在本研究中,萘-尼抗酸染色法检测 L 型菌的阳性例数只有 41 例(39.81%),仅高于改良罗氏培养法,也说明了应用抗酸染色法检测结核分枝杆菌 L 型的阳性率较低这一事实。

本研究中,我们使用蚌埠医学院病原生物学教研室提供的 92-3TBL 液体培养基进行结核分枝杆菌 L 型培养,结果表明此方法检出率最高,在 103 份受检患者痰标本中,阳性例数达到 59 例(57.28%),高于 PCR 的检出率(47 例,45.63%),这说明结核分枝杆菌 L 型培养技术在提高肺结核的痰菌检出率方面具有重要的临床意义。而 PCR 与结核病的传统诊断方法相比,虽具有快速、特异、敏感等优点,但在检测结核分枝杆菌 L 型方面尚有不足之处<sup>[6]</sup>。结核分枝杆菌 L 型可分为非稳定型和稳定型两种,PCR 在检测非稳定结核分枝杆菌 L 型时有较高的敏感性和特异性,但用于诊断稳定 L 型感染时有不同的报道。王豫萍等<sup>[7]</sup>将非高渗培养的结核分枝

杆菌稳定 L 型纯培养物的染色体 DNA 按常规方法进行 PCR 扩增, 结果出现与亲代细菌型一致的阳性条带。而谢家政等<sup>[8]</sup>研究发现, PCR 对典型杆菌的检出率与培养法相比差异无显著性, 但对 L 型的检出率显著低于培养法。戴云海等<sup>[9]</sup>作微区图谱分析显示稳定结核分枝杆菌 L 型的细胞膜平均值远大于典型杆菌的细胞壁和细胞膜之和, 表明结核分枝杆菌变异为 L 型后, 细胞膜代偿性增厚, 用常规方法不能裂解细胞提取 DNA, 而使 PCR 结果出现假阴性。这说明常规 PCR 诊断结核分枝杆菌 L 型的意义尚有待于进一步探讨。

本研究结果显示, 耐多药肺结核患者有较高的结核分枝杆菌 L 型感染率, L 型培养阳性率达到 57.28%。在研究过程中同时发现, 治疗时间较长的患者的痰标本中结核分枝杆菌 L 型的检出率较高, 和抗结核药物使用的时间长短有一定关系。据此认为, 常用抗结核药物如: 利福平、异烟肼、乙胺丁醇及链霉素等虽对结核分枝杆菌的细菌型具有抑制或杀灭作用, 但同时也能诱导结核分枝杆菌形成 L 型, 且对其无抑制或杀灭作用; 结核分枝杆菌与抗结核药物接触的时间愈长, 发生 L 型变异的概率也就愈高。此外, 结核分枝杆菌 L 型阳性也应视为结核病变有活动性的一种表现。

结核分枝杆菌 L 型不仅与结核病程缓慢变化、复发、难治以及结核分枝杆菌的耐药性有一定联系, 而且有资料表明, 结核分枝杆菌 L 型还与多种肿瘤

尤其是肺癌的发生有密切关系<sup>[10]</sup>。因此在检查痰结核分枝杆菌细菌型的同时应加强其 L 型的检测, 以减少漏诊或误诊, 提高痰结核分枝杆菌的阳性检出率。

### [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] 唐神结, 肖和平, 梅 棋, 等. 肺结核患者痰标本中结核分枝杆菌 L 型的检测及其临床意义[ J ]. 上海医学, 2002, 25( 9 ): 535 ~ 538.
- [ 2 ] 朱春梅, 谢书明, 张家宏. 矽肺结核及矽肺患者结核分支杆菌 L 型致病情况研究[ J ]. 中华结核和呼吸杂志, 2001, 24( 4 ): 236 ~ 238.
- [ 3 ] Ratnam S, Chandrasekhar S. The pathogenicity of spheroplasts of mycobacterium tuberculosis[ J ]. *Am Rev Respir Dis*, 1976, 114( 3 ): 549 ~ 554.
- [ 4 ] 戴云海, 林特夫, 姚 敏, 等. 结核分枝杆菌 L 型感染 C<sub>57</sub>BL/6N 小鼠致病与致癌的实验研究[ J ]. 上海医学检验杂志, 2001, 16( Suppl ): 26 ~ 27.
- [ 5 ] 王 和. 结核分支杆菌 L 型[ J ]. 中华结核和呼吸杂志, 2002, 25( 10 ): 579 ~ 580.
- [ 6 ] 朱明利, 张元和, 林特夫, 等. 分支杆菌 L 型的检测与鉴定[ J ]. 中华结核和呼吸杂志, 2002, 25( 10 ): 581 ~ 583.
- [ 7 ] 王豫萍, 王 和. 聚合酶链反应检测稳定 L 型结核分枝杆菌[ J ]. 上海医学检验杂志, 2001, 16( Suppl ): 19 ~ 20.
- [ 8 ] 谢家政, 王安潮. 肺结核患者结核分支杆菌 L 型的检测及临床意义[ J ]. 中华结核和呼吸杂志, 1999, 22( 3 ): 190.
- [ 9 ] 戴云海, 林特夫, 黄谷良. 分枝杆菌 L 型的系列研究[ J ]. 中国防痨杂志, 1996, 18( Suppl ): 45 ~ 46.
- [ 10 ] 戴云海, 林特夫, 李明君, 等. 肺癌组织中结核分枝杆菌 L 型的检出与鉴定[ J ]. 上海医学检验杂志, 2001, 16( Suppl ): 42 ~ 44.

## 医学论文中有关符号的使用

统计学符号不论用哪种字母, 也不论大写或小写一律都用斜体, 要注意区分拉 宰母和希腊字母, 例如均数的符号是字母  $\bar{x}$ , 卡方的符号是希腊字母  $\chi^2$ , 自由度的符号是希腊文“ $\nu$ ”, 不是英文“V”。样本的相关系数是英文“ $r$ ”, 不能误为希腊文“ $\gamma$ ”。

化学元素及核素在医学写作时一般多采用符号, 都是拉 宰母正体大写。离子态是在右上角用数字加“—”或“+”表示。例如  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{P}^{3-}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$  等, 不采用  $\text{Ca}^{++}$ 、 $\text{P}^{---}$ 、 $\text{Fe}^{+3}$  表示。核素的核子素(质量数)应写在元素符号的左上角, 例如:  $^{131}\text{I}$ 、 $^{32}\text{P}$ 。表示激发状态的 m 写在右上角, 例如:  $^{99}\text{Tc}^m$ 、 $^{133}\text{In}^m$ 。在科技论文和专著中不应写核素的中文名称, 即不能写成  $^{131}$  碘、 $^{133m}$  钷、 $\text{P}^{32}$ 、 $\text{Tc}^{99m}$ 。

近几年分子生物学发展很快, 并已渗透到许多学科, 大多数分子生物学名词术语的符号已有统一的确定形式, 要对称号的来源及其内涵有深刻的了解, 使用时不致发生错误, 例如: RNA 有 rRNA(ribosomal RNA)、tRNA(transfer RNA)、mRNA(messenger RNA) 3 类。r、t、m 是表示类型的符号应小写, RNA 应大写。