文章编号:1000-5404(2013)03-0241-04

论著

噬菌体 Chy2 生物扩增法的建立及其检测效果的评价

敖 知,郭述良 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院呼吸与危重症医学科)

[摘要] **目的** 建立噬菌体 Chy2 生物扩增法,并评价其检测临床痰标本结核分枝杆菌的应用价值。**方法** 噬菌斑测试法观察噬菌体杀灭剂灭活 Chy2 的工作浓度和作用时间;噬菌斑计数法判断 Chy2 的最佳感染时间和感染滴度;分别用噬菌体 Chy2 和 D29 生物扩增法检测 58 份临床痰标本,以改良罗氏培养法作诊断标准,对比评价 Chy2 和 D29 的检测准确性。**结果** 6% 硫酸亚铁铵溶液作用 5 min 可彻底灭活游离 Chy2;Chy2 滴度为 2.2×10^{11} CFU/mL 时,与结核分枝杆菌孵育 4 h 的感染效率最高;噬菌体 Chy2 生物扩增法对痰标本的检测灵敏度、特异性、Youden 指数、阳性预测值和阴性预测值分别为 94.7%、85.0%、0.797、0.923、0.895,噬菌体 D29 生物扩增法的检测结果相应为 76.3%、95.0%、0.713、0.967、0.678,噬菌体 Chy2 生物扩增法的灵敏度、阴性预测值优于噬菌体 D29 生物扩增法($P<0.05$),两者特异性、Youden 指数、阳性预测值无统计学差异($P>0.05$)。**结论** 成功建立了噬菌体 Chy2 生物扩增法,Chy2 较 D29 检测特异性相当,灵敏度有所提高。

[关键词] 分枝杆菌噬菌体 Chy2;结核分枝杆菌;灵敏度;特异性
[中图法分类号] R373.9; R378.911; R446.5 [文献标志码] A

Establishment of phage amplified biologically assay using phage Chy2 and evaluation of its capacity of detecting *Mycobacterium Tuberculosis* in sputum samples

Ao Zhi, Guo Shuliang (Department of Respiratory and Critical Care Medicine, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] Objective To explore the methodology of the phage amplified biologically assay (PhaB assay) using a newly isolated and identified mycobacteriophage named Chy2, and to evaluate its clinical value for detecting *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) in sputum samples. Methods The optimal concentration and time of phage-inactivation agents were observed by spot tests. The optimal time and titer of phage to infect MTB were confirmed by plaque counts. Fifty-eight clinical sputum samples were collected from patients suspected with tuberculosis (TB) with no previous history of TB treatment, and were detected by PhaB assay using phage Chy2 and D29, respectively. Modified Lowenstein-Jensen (L-J) culture method was used as the diagnostic standard. Results Ferrous ammonium sulfate (FAS) solution (6%) mixed with Chy2 for 5 min was able to completely inactivate the extracellular phages. Chy2 of 2.2×10^{11} CFU/mL could infect MTB most effectively after incubating with MTB for 4 hours. PhaB assay using Chy2 to detect MTB in sputum samples only needed 48 hours, and had sensitivity, specificity, Youden index, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of 94.7%, 85.0%, 0.797, 0.923 and 0.895, respectively, while the counterparts of D29 PhaB assay were 76.3%, 95.0%, 0.713, 0.967 and 0.678, respectively. Chy2-PhaB assay had a higher sensitivity and NPV than D29-PhaB assay did ($P<0.05$). Conclusion PhaB assay using Chy2 has been successfully established with a similar specificity and a higher sensitivity for detecting MTB in sputum as compared with D29, and has the potential to be a valuable, rapid and economic screening approach for detecting pulmonary TB.

[**Key words**] mycobacteriophage Chy2; *Mycobacterium tuberculosis*; sensitivity; specificity

Supported by the Major Project of the "Eleventh Five-year Plan" of National Science and Technology (2008ZX10303). Corresponding author: Guo Shuliang, E-mail: GUOSL999@sina.com

[基金项目] 国家"十一五"科技重大专项(2008ZX10303)
[通信作者] 郭述良,E-mail: GUOSL999@sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121123.0942.007.html(2012-11-23)

结核病是严重危害人类健康的公共传染性疾病。早期发现、诊断结核病并及时给予有效的治疗是减少传播机会、控制疫情的关键环节[1]。近年来,探索噬菌体在结核病诊断和治疗中的应用潜能成为研究的热点。其中,基于分枝杆菌噬菌体建立的以快速检测结核分枝杆菌(*Mycobacterium Tuberculosis*,MTB)活菌为特点的噬菌体生物扩增法(phage amplified biologically assay,PhaB assay)备受关注,并取得了重大研究进展[2-3]。然而,汇总分析发现PhaB法灵敏度偏低,且在不同研究中表现各异,较痰涂片镜检的优势不明显,主要与噬菌体D29生物学特性上的缺陷、PhaB法技术上的不足、实验干扰因素、检测人员不规范操作等原因有关[4-5]。本实验室分离鉴定出1株新分枝杆菌噬菌体,命名为Chy2[6],本研究通过对其生物学特性以及与宿主菌间的作用规律进行研究,并比较其与D29的差异,评价Chy2检测临床痰液标本的应用价值,旨在为噬菌体Chy2的进一步开发、应用、人工改建奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 7H9肉汤培养基、7H10琼脂培养基、OADC增菌液(美国BD公司);酸性、中性改良罗氏培养基和罗氏药敏培养基(珠海贝索公司);麦氏比浊管(北京哲成科技有限公司);0.22 μm过滤器(美国Millipore);Tris-base(Sigma公司);硫酸亚铁铵(FAS,上海生工生物公司)。培养基与噬菌体缓冲液的配制参照文献[7]。

1.1.2 菌株和标本 结核分枝杆菌标准株H37Rv(CMCC93004)由重庆市肺科医院提供,接种于酸性罗氏培养基培养4~6周。噬菌体D29、耻垢分枝杆菌mc2155(CMCC93202)由中国药品生物制品检定所王国治教授馈赠,后者接种于7H9(含10% OADC增菌液)液体培养基中37 ℃摇床,160 r/min振荡培养18 h至生长对数期[$D(600)=1.0$]。58份痰液标本取自我院2012年3月至5月间尚未接受抗结核治疗的肺结核疑似病例。

1.2 方法

1.2.1 菌悬液的制备 参照《结核病诊断实验室检验规程》(2006年第1版),略作改动。用0.05% Tween-80生理盐水将H37Rv从培养基上洗脱,磨菌器研磨,漩涡振荡,用7H9液体培养基稀释,麦氏标准比浊管(MacFarland No. 1)比浊至3×10^8 CFU/mL。

1.2.2 噬菌体液的制备 用双层平板法(下层7H10培养基和上层7H9培养基)扩增噬菌体,37 ℃孵育18~24 h后加入5 mL噬菌体缓冲液,4 ℃条件下静置过夜后收集上清液,过滤除菌,测定滴度,Chy2为2.2×10^{11} PFU/mL,D29为1.9×10^{11} PFU/mL。

1.2.3 噬菌体杀灭剂的作用浓度和时间 将FAS配制成2%、4%、6%、8%、10%不同浓度(质量体积分数),过滤除菌。分别取100 μL FAS与100 μL Chy2液振荡混合,室温下作用5、10、15 min。取100 μL耻垢分枝杆菌悬液与含1.5%琼脂的5 mL 7H9培养基混合铺板,待凝固后在平板底面划格,标记浓度和时间。于不同时相点分别取5 μL FAS-Chy2混合液在相应区域中央悬空点样,37 ℃孵育18 h观察结果。

1.2.4 最佳感染时间和感染滴度 用7H9液体培养基将H37Rv菌悬液稀释至3×10^3 CFU/mL。取24支50 mL离心管,各加入1 mL H37Rv和100 μL Chy2,混合后37 ℃条件下孵育,设立0、30~330 min 12个时间点,同时设立Chy2+mc2155阳性对照组、7H9液体培养基+Chy2阴性对照组。每半小时取2支实验管分别加6%100 μL新鲜配制的FAS振荡混合,作用5 min后加5 mL 7H9液体培养基(含10% OADC,1 mmol/L $CaCl_2$)中和FAS,再加入1 mL新鲜培养的耻垢分枝杆菌悬液与5 mL含1.5%琼脂的7H9培养基(约55 ℃)混合后铺板,37 ℃孵育18 h后计算噬菌斑平均值。设立1.2×10^9~2.2×10^{11} PFU/mL 6个不同噬菌体滴度,各取100 μL分别与1 mL H37Rv悬液孵育4 h,经FAS灭活和混合铺板后,计算噬菌斑平均值,每个滴度设置3个检测样本。

1.2.5 痰液标本的检测

1.2.5.1 改良罗氏培养法 将收集的新鲜痰液标本挑取1~3 mL装于50 mL的无菌离心管密封,1 h内送检,行痰液前处理。处理方法和菌种鉴定参照《结核病诊断实验室检验规程》(2006年第1版)和罗氏培养管说明书。具体如下:根据痰液黏稠程度加1~2倍体积4% NaOH漩涡振荡,匀化标本,室温下30 min放置,其间振荡2~3次。取处理后的标本100 μL无菌操作接种于酸性培养基,每份检测样本同时接种在2个培养基上,37 ℃孵育。第1周每天观察,第2~8周则每周观察1次,阳性菌落经抗酸染色证实后报告分枝杆菌生长,观察分枝杆菌在对硝基苯甲酸(PNB)和噻吩-2-羧酸肼(TCH)培养基中的生长情况以初步鉴定菌种。

1.2.5.2 噬菌体生物扩增法 处理后的剩余标本加PBS缓冲液至45 mL,3 000×*g*离心15 min,弃去上清液。加15 mL 7H9液体培养基重悬下层沉淀,3 000×*g*离心15 min,弃上清液。加2 mL 7H9液体培养基,重悬沉淀物,放置于37 ℃孵育24 h,富集痰液结核分枝杆菌。标本各取1 mL分别与100 μL Chy2(2.2×10^{11} PFU/mL)和100 μL D29(1.9×10^{11} PFU/mL)混合后37 ℃条件下孵育4 h,各加100 μL 6%新鲜配制的FAS振荡混合,作用5 min后加5 mL 7H9液体培养基(含10% OADC+1 mmol/L $CaCl_2$)中和FAS,再加入1 mL新鲜耻垢分枝杆菌悬液,与5 mL 1.5%琼脂的7H9培养基(约55 ℃)混合后铺板,37 ℃孵育18 h后观察结果,同时设立阳性对照和阴性对照。

1.2.6 结果评价 在各对照组结果正确的条件下,观察样品结果,阳性结果为独立噬菌斑或融合状噬菌斑形成,阴性结果见指示细菌均匀生长,无噬菌斑出现。

1.3 统计学方法

应用SPSS 13.0统计软件,噬菌体滴度和噬菌斑数量行Spearman秩相关分析,计数资料行χ^2检验。

2 结果

2.1 噬菌体杀灭剂的作用浓度和时间

2%、4%浓度FAS与Chy2混合后不能彻底杀灭Chy2,其中2% FAS作用5 min后可见较多散在噬菌斑,但数量低于无FAS阳性对照,作用10、15 min后仍有零星噬菌斑;4%浓度FAS作用5、10 min亦可见零星噬菌斑;6%、8%、10%浓度FAS作用5、10、15 min的效果相同,可将游离Chy2完全灭活。

2.2 最佳感染时间

Chy2与不同宿主菌孵育不同时间,产生的噬菌斑数量不同。由图1所示,Chy2与mc2155孵育的初始阶段,噬菌体斑数呈直线快速上升,近180 min时达到峰值,随后迅速下降。Chy2与H37Rv孵育之初,噬菌斑数增加幅度较平缓,在120~180 min出现短暂平台期,240~270 min达到峰值,后缓慢下降。结果显示,Chy2与H37Rv、mc2155的最佳感染时间分别为240、180 min。

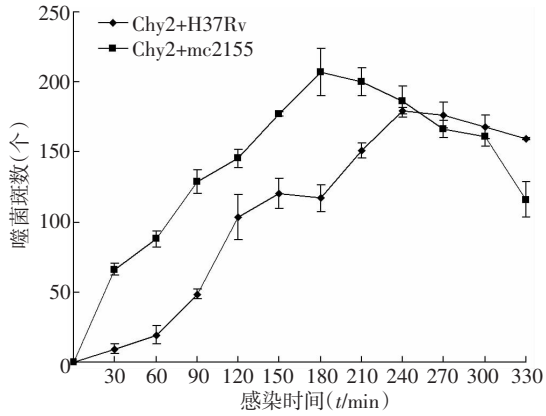


图1 噬菌体Chy2感染H37Rv和mc2155的时间与噬菌斑数的关系曲线

2.3 最佳感染滴度

噬菌斑数量随噬菌体滴度的上升而增加,表明噬菌体滴度越高,感染H37Rv的概率越大,噬菌体Chy2滴度与噬菌斑数呈正相关($r=0.579$, $P<0.05$)。见表1。

表1 不同滴度的噬菌体Chy2感染H37Rv产生的不同噬菌斑数

噬菌体滴度(PFU/mL)	噬菌斑数(个)
2.2×10^{11}	229.7±28.1
1.2×10^{11}	218.0±31.0
2.2×10^{10}	191.0±19.3
1.2×10^{10}	166.7±33.0
2.2×10^{9}	128.3±39.6
1.2×10^{9}	95.0±9.6

2.4 痰液检测实验结果比较

共检测58份痰液标本,改良罗氏培养法检出阳性结果38例,20例阴性,阳性率65.5%;Chy2-PhaB法检出39例阳性,19例阴性,阳性率67.2%;2种方法的阳性检出率无统计学差异($P>0.05$)。D29-PhaB法检出30例阳性,28例阴性,阳性率为51.7%,低于罗氏培养法($P<0.05$)。Chy2-PhaB法对痰标本的检测灵敏度、特异性、Youden指数、阳性预测值和阴性预测值分别为94.7%、85.0%、0.797、0.923、0.895,D29-PhaB法的检测结果相应为76.3%、95.0%、0.713、0.967、0.678,Chy2-PhaB法的灵敏度、阴性预测值优于D29-PhaB法($P<0.05$),两者特异性、Youden指数、阳性预测值无统计学差异($P>0.05$)。

3 讨论

根据WHO发布的《2011年全球结核病控制报告》最新统计数据显示,全球每年结核病新发病例数呈下降趋势,但要在2050年达到根除结核病的目标,依旧任重而道远[8]。快速、准确检测MTB,及时对结核病作出正确诊断是当前结核病防控的重要途径。噬菌体生物扩增法的实验室诊断技术操作简便,可直接反映MTB活菌的存在,无需昂贵的仪器设备,仅48 h内即可报告结果,为快速准确诊断结核病提供了新的契机[9]。

本课题组自本院结核病房的花盆泥土发现1株分枝杆菌噬菌体,经分离、纯化,对其生物学特性、遗传背景、基因序列进行对比分析,证明是一种新结核分枝杆菌噬菌体,命名为Chy2[6]。根据PhaB法的技术原理,噬菌体杀灭剂的工作浓度、作用时间以及噬菌体感染结核分枝杆菌的最佳时间和滴度是诊断实验的关键条件,因此本研究对Chy2应用于PhaB法进行了方法学的探讨。实验发现,最低浓度为6%时,FAS仅作用5 min可彻底灭活游离Chy2。Chy2和MTB共同孵育到4 h的时候,噬菌体与MTB吸附最多,注入MTB的DNA量最大,4~4.5 h处于平台期,4.5 h后释放至胞外的子代噬菌体被FAS灭活,因此共同孵育4 h是最佳感染时间。与耻垢分枝杆菌相比,Chy2与MTB的最佳感染时间出现较晚,噬菌斑数量的增减幅度更平缓,这可能与MTB的繁殖周期长、菌体结构复杂等因素导致噬菌体扩增速度相对较慢有关。感染滴度实验发现,噬菌斑数量随Chy2滴度升高而增加,提示Chy2的滴度越高,对MTB的感染能力更强。而McNerney等[10]对D29的研究结果显示,D29滴度超过1.6×10^{8} PFU/mL时,噬菌斑数量不会随噬菌体滴度的升高而增加,原因可能是高滴度D29发生了顿挫感染。

有研究表明,由于痰液中残存的大分子糖蛋白物质和来自气道的细胞成分阻碍噬菌体与MTB的吸附,PhaB法对痰标本的检测灵敏度低于MTT培养分离株[11]。本研究结果显示,Chy2-PhaB法的检测特异性较D29-PhaB法无统计学差异,但灵敏度更高($P<0.05$)。究其原因为高滴度噬菌体有助于突破痰标本

残留成分的物理屏障,增加 MTB 感染概率,但 D29 滴度超过 10^8 数量级时易发生顿挫感染,裂解 MTB 的活性下降,而 Chy2 却仍能维持很强的感染力。Chy2-PhaB 法检测的特异性不如灵敏度的优势明显,可能原因是 Chy2 除裂解 MTB 外还能裂解非结核分枝杆菌[6],产生部分假阳性。Chy2-PhaB 法的高灵敏度体现其对痰液结核分枝杆菌检测的优越性,有助于为早期发现和诊断结核病提供参考,具有一定的临床应用价值。

参考文献:

[1] Lonnroth K, Castro K G. Tuberculosis control and elimination 2010 – 50: cure, care, and social development[J]. Lancet, 2010, 375(9728): 1814 – 1829.

[2] Mi X, He F, Xiang M, *et al*. Novel phage amplified multichannel series piezoelectric quartz crystal sensor for rapid and sensitive detection of Mycobacterium tuberculosis[J]. Anal Chem, 2012, 84(2): 939 – 946.

[3] Jain P, Thaler D S, Maiga M, *et al*. Reporter phage and breath tests: emerging phenotypic assays for diagnosing active tuberculosis, antibiotic resistance, and treatment efficacy[J]. J Infect Dis, 2011, 204(Suppl 4): S1142 – S1150.

[4] Kalantri S, Pai M, Pascopella L, *et al*. Bacteriophage-based tests for the detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical specimens: a systematic review and meta-analysis[J]. BMC Infect Dis, 2005, 5(1): 59.

[5] Prakash S, Katiyar S K, Purwar S, *et al*. Clinical evaluation of the mycobacteriophage-based assay in rapid detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory specimens[J]. Indian J Med Microbiol, 2009, 27(2): 134 – 138.

[6] 刘平, 邬亭亭, 彭丽, 等. 分枝杆菌噬菌体 Chy2 的分离及生物学特性[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(12): 1176 – 1180.

[7] Hatfull G F. Phagehunting Program[M]. Pittsburgh: University of Pittsburgh, 2006: 23 – 24.

[8] WHO. Global tuberculosis control: WHO report 2011[R]. Geneva: World Health Organization, 2011.

[9] Guo S, Ao Z. Phage in the diagnosis and treatment in tuberculosis[J]. Front Biosci, 2012(17): 2691 – 2697.

[10] McNerney R, Kambashi B S, Kinkese J, *et al*. Development of a bacteriophage phage replication assay for diagnosis of pulmonary tuberculosis[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(5): 2115 – 2120.

[11] Stella E J, de-la-Iglesia A I, Morbidoni H R. Mycobacteriophages as versatile tools for genetic manipulation of mycobacteria and development of simple methods for diagnosis of mycobacterial diseases[J]. Rev Argent Microbiol, 2009, 41(1): 45 – 55.

(**收稿**:2012-09-05;**修回**:2012-10-28)

(编辑 邓强庭)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2013)03-0244-01

联合入路切开复位治疗陈旧性髋关节前脱位 1 例

孙文敏,陈泽彬,黄庆雄,黄 敢 (671003 云南 大理,解放军第 60 中心医院骨烧伤神经外科)

[**关键词**] 联合入路;治疗;陈旧性;髋关节前脱位
[**中图法分类号**] R684.7 [**文献标志码**] B

1 临床资料

患者,男性,27 岁,因“高处坠落致右髋部疼痛、畸形伴活动受限 3 个月余”于 2012 年 3 月 18 日入院。患者伤后曾在当地医院行“右髋关节脱位手法复位术”,具体过程不详,治疗前后没有行影像学检查,术后右下肢仍畸形,不能活动,卧床休养 3 个月后未见好转遂来我院就诊。入院查体:右髋关节活动受限,右下肢屈曲外展外旋位弹性固定(图 1A)。右侧会阴部可触及股骨头。右下肢肌肉萎缩。左大腿周径:右大腿周径(髌上 15 cm) = 40 cm:32 cm,左小腿周径:右小腿周径(内踝上 20 cm) = 28 cm:26 cm。右大腿皮肤触觉及痛觉未见异常,股四头肌肌力 4 级。右踝关节及足趾感觉、运动未见异常,足背动脉及胫后动脉搏动有力。X 线片示右髋关节前脱位(图 1B);CT 示右髋臼空虚。

入院后完善术前检查,在全麻下试行闭合复位,复位失败后取髋关节前外侧入路,术中见股直肌紧张,予以切断,见髋臼完全被瘢痕组织填充,予以彻底清理充分暴露髋臼,并清理股骨粗隆及股骨颈周围粘连软组织,但因股骨头位置较深(已越过髂腰肌下方嵌钝于内收肌群之间),且周围瘢痕致密挛缩形成“袖口样”包裹,未能在该切口内完成股骨颈头下方的松解,试行复位未能成功,故于右大腿根部可触及股骨头位置处作一长 8 cm 横形切口(图 1C),钝性分耻骨肌及长收肌肌间隙,暴露股骨头,锐性分离股骨头颈周围“袖口样”瘢痕,充分游离股骨头颈后再次采用牵引回旋法试行复位,同时助手推挤股骨头将其复位于髋臼内。术后畸形纠正,X 线片(图 1D)及 CT 证实复位良好。术后查体:患侧髋关节可主被动屈伸、外展及内收,活动范围较健侧受限,右大腿皮肤触觉及痛觉未见异常,股四头肌肌力 4 级。右踝关节及足趾感觉、运动未见异常,足背动脉及胫后动脉搏动有力。患者术后 3 个月来我院随访,步行入科,未见跛行,患肢主被动屈伸、外展及内收活动范围正常,右大腿皮肤触觉及痛觉未见异常,股四头肌肌力 5 级。

[**通信作者**] 孙文敏,E-mail: sunwenmin791029@sina.com

[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20121128.0912.006.html(2012-11-28)

(下转 254 页)