技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)03-0389-04

结核分枝杆菌噬菌体试剂盒的研制与初步评价

彭 丽[1],沈小兵[2],罗永艾[1],王国治[2]

(1. 重庆医科大学附属第一医院呼吸科,重庆 400016;2. 中国药品生物制品检定所菌苗室,北京 100050)

【摘 要】目的:研制能快速检测标本中结核分枝杆菌的噬菌体试剂盒,并对之在临床上的应用做出初步评价。方法:采用不同方法对噬菌体的生产和保存工艺进行探讨,并且观察该方法中所用试剂的稳定性。建立噬菌体快速检测结核分枝杆菌的方法,分别用噬菌体法与传统培养法检测 34 份临床标本中的结核分枝杆菌,以培养法作为金标准观察噬菌体法的敏感度、特异度和符合率。结果:①在 37℃环境中采用琼脂双层法进行噬菌体扩增生产,48 h 后采用孵育 - 过滤法收集,可以获得较为理想的产量且简单易行。②噬菌体以液体形式 4℃保存或以噬菌体宿主菌的无细胞菌苗作为保护剂进行真空冻干后 4℃保存,28 周后效价下降不足 10 的一个数量级。③噬菌体法中的重要试剂:辅助细菌和杀病毒剂,4℃保存 40 周均具有良好的稳定性。④34 份痰标本培养 4 周,其中 2 份污染,29 份阳性,3 份阴性;噬菌体法检测标本中结核分枝杆菌的敏感度、特异度和符合率分别为 86.2%(25/29)、66.7%(2/3)、84.4%(27/32)。结论:噬菌体法在 48 h 内可以快速检测标本中的结核分枝杆菌活菌,并且具有以试剂盒形式进行商业化生产的可行性,将有助于临床结核病的快速诊断。

【关键词】噬菌体;分枝杆菌,结核;诊断

【中国图书分类法分类号】R521;R446 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-11-04

A study and evaluation of bacteriophage's utilization in rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis*

PENG Li, et al

(*Department of Pulmonary Disease, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study and evaluate the utilization of bacteriophage in rapid detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical samples. *Methods*: The titer of replicated phage with different methods in 24 or 48 hours were compared, including centrifuge-filter method and incubate-filter method with 0.2 μm filter. When the phages were preserved at different conditions with various preservers, the titer was tested and compared in 28 weeks. Other agents of the method, including virucide and help bacteria (Mycobacterium smegmatis) were investigated at different time when they were preserved at 4℃. After the phage assay was established, 34 sputum samples were tested by both phage assay and culture method in L-J medium. Based on the results of culture method, phage assay in detection of mycobacterium tuberculosis were evaluated by the sensitivity, specificity and accordance. *Results*: ①The titer of replicated phage was high, when it had been collected after infected for 48 hours. The collection through incubation-filter method was simple and effect. ② The phage stored at 4℃ with liquid form was stable, and the declined titer was not more than 101. when the preserver was phage's host bacteria and it was stored at 4℃, it was as stable as that in dehydration form. ③The important agents, including virucide and help bacteria, had the same character in 40 weeks, when they were stored at 4℃. ④ Compared with the results of culture method, the sensitivity, specificity and accordance of phage assay in rapid detection of mycobacterium tuberculosis were 86.2%, 66.7%, and 84.4% respectively. *Conclusion*: The phage assay could detect viable Mycobacterium tuberculosis of sputum samples in 48 hours. it is feasible to produce testing reagent box from the phage, and can be expected to be used for clinical.

【Key words】Bacteriophage(phage); Mycobacterium tuberculosis; Diagnosis

全球结核病疫情严峻,快速诊断已成为当今研究的热点。近年,快速诊断结核病和检测结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis,MTB)的方法层出不穷,其中血清学和核酸扩增技术得到了快速发展。血清学方法存在灵敏度较低的缺点;核酸扩增技术的灵敏度高,但检测的是标本中的 DNA 而非活菌,并且存在特异性不高的缺点,因此不能作为诊断活动性肺结核的依据。利用噬菌体快速检测标本中是否存在 MTB 活菌在最近几年得到了广泛关注,国外已有商业性试剂盒进入临床试验阶段[1]。本实验以研制生物制品体外诊断试剂盒作为标准,对噬菌体试剂盒的生产和保存工艺、稳定性以及可行性进行探讨和初步评价。

作者介绍:彭 丽(1972-),女,讲师,博士,

研究方向:呼吸系统疾病和结核病研究。

基金项目:国家重大科技专项(编号:2008ZX10003-016)。

1 材料与方法

1.1 菌株与培养

结核分枝杆菌标准株（CMCCB93009）和临床株均来自中国医学菌种保藏中心，耻垢分枝杆菌（ATCC607）、分枝杆菌噬菌体（10#）来自中国药品生物制品检定所分枝杆菌专业实验室。结核分枝杆菌菌株在 L-J 培养基上 37℃培养 2～4 周，耻垢分枝杆菌在 L-J 培养基上 37℃培养 4～7 d。

1.2 噬菌体的效价检测

1.2.1 指示平皿的制备 10 ml 7H9 培养基（Difco 公司）含 10%营养添加剂（自制）和 0.75%琼脂，45℃～50℃时加入 5 mg/ml 的耻垢分枝杆菌菌悬液 1ml，待平皿（Greiner 公司）中培养基凝固后，4℃保存备用，1 个月内用完。

1.2.2 效价测定 用噬菌体稀释液（SM 液，配方见参考文献 2）将噬菌体进行 10 倍梯度稀释，每个稀释度取 20 μl 滴加于指示平皿，设 2 个平行对照，37℃培养 24 h 后观察噬菌斑形成单位（pfu）数量，推算出噬菌体原液的效价。

1.3 噬菌体生产工艺

1.3.1 增殖方法比较 分别采用单层和双层琼脂 7H9 培养基，单层培养基与双层培养基的上层均含有 10^6pfu 噬菌体和 1 mg 耻垢分枝杆菌。37℃培养 24、48 h 后再分别取 2 种不同培养方法的平皿采用离心－过滤法进行噬菌体收集（方法同 3.3），并检测效价，推算出噬菌体的产量，每组 2 个平皿，取平均值。

1.3.2 不同噬菌体/宿主菌比例对增殖效率的影响 采用 3.1 的琼脂双层法，培养基上层加不同比例的噬菌体（pfu）/宿主菌（cfu）：$10^5/10^9$、$10^5/5\times10^8$、$10^5/10^8$、$10^6/10^9$、$10^5/5\times10^8$、$10^5/10^8$、$10^7/10^9$、$10^7/5\times10^8$、$10^7/10^8$、$10^8/10^9$。37℃培养 48 h 后采用孵育－过滤法收集扩增的噬菌体（方法同 3.3），并进行效价检测。

1.3.3 收集方法比较 采用 3.1 的双层琼脂培养法，48 h 后用不同方法收集噬菌体，方法一（孵育－过滤法）：扩增平皿中加 9 ml SM 液，37℃孵育 1 h 后回收全部液体，用 0.2 μm 无菌滤器（Millipore 公司）过滤收集的液体[2]，检测效价。方法二（离心－过滤法）：取上层培养基于研磨器中加 9 ml SM 液研磨，然后 4℃ 4 000 r/min 离心 20 min，上清再用 0.2 μm 无菌滤器过滤，得到的噬菌体扩增液进行效价检测。

1.4 噬菌体保存工艺

1.4.1 液体形式保存 2 ml 噬菌体液（10^{10} pfu/ml）中分别加 18 ml 不同的保护剂：7H9（10%营养添加剂）+30%甘油；7H9（10%营养添加剂）+1mmol/L 氯化钙；7H9（10%营养添加剂）+10%甘油 +1mmol/L 氯化钙 +0.05%叠氮化钠（wt/v）[3]；SM；4%小牛血清白蛋白（Sigma）[4]。将上述添加不同保护剂的噬菌体（10^9 pfu/ml）分装后，分别 4℃和 -70℃保存。

1.4.2 冻干形式保存 2 ml 噬菌体液（10^{10}pfu/ml）中分别加 18ml 不同的保护剂：10%灭菌脱脂牛奶[6]；7H9（10%营养添加剂）+1 mmol/L $CaCl_2$；4%小牛血清白蛋白；SM；无细胞耻垢分枝杆菌菌苗，蛋白浓度分别为 7%、3.5%、1.75%（中国药品生物制品检定所菌苗室自制）。分装于安瓿中，每支 0.5 ml，采用真空冷冻干燥方法制备冻干制品，分别室温和 4℃保存。

1.4.3 噬菌体稳定性检测 分别在 0~28 周，检测不同保藏方法保存的噬菌体的效价，方法同 2.2。

1.5 噬菌体法检测 MTB 方法学的建立

方法见参考文献 5。感染环境为 7H9（10%营养添加剂 +1 mmol/L 氯化钙），1 ml 标本加噬菌体 10^9 pfu（100 μl），37℃条件下感染 3 h 后加 4%硫酸亚铁胺（FAS）100 μl，作用 5 min 杀灭胞外噬菌体，再加 7H9（10%营养添加剂 +1 mmol/L 氯化钙）5 ml 和耻垢菌悬液 1 ml 中和杀菌剂作用，与 7 ml 1.5%琼脂 7H9（50℃）一起铺皿，37℃培养 18~24 h 后观察噬菌斑数量。

1.6 噬菌体法中重要试剂的稳定性

1.6.1 杀病毒剂的稳定性 杀病毒剂 4% FAS 高压灭菌后 4℃保存，分别在 0、2、4、8、12、20、28、40 周观察杀灭噬菌体的效果，即 4% FAS 100 μl 作用 5 min 能否杀灭 10^9pfu/ml 噬菌体。

1.6.2 辅助细菌的稳定性 4℃保存的耻垢分枝杆菌菌悬液在 0、2、4、8、12、20、28、40 周进行活菌计数，观察克隆形成单位（cfu）改变情况。

1.7 噬菌体法检测临床标本中结核分枝杆菌的评价

1.7.1 临床痰标本的模拟与前处理 取临床非结核病病人的深部痰液（来自北京市结核病胸部肿瘤研究所），痰涂片抗酸染色阴性。将痰液分装于 15 ml 离心管中，每支 2 ml，共 34 份，再分别加入不等量的不同的 MTB 菌株（包括临床株和标准株）或者生理盐水。标本的前处理方法参考《结核病诊断细菌学检测规程》（1995 年版）：每份模拟临床痰标本中加入 2 倍体积的痰处理液（2%NaOH+1.47%枸橼酸钠 +0.5%N- 乙酰 -L- 半胱氨酸），消化 20 min 后 4 000 r/min 离心 20 min，用 PBS（pH6.8）洗涤 2 次，然后加入 2 ml 7H9（10%营养添加剂 +1 mmol/L 氯化钙），混匀后在 37℃培养箱中过夜预培养。

1.7.2 痰标本中 MTB 的检测

1.7.2.1 培养法 取经过前处理预培养的标本 0.1 ml 接种于 L-J 培养基，每份接种 2 支，37℃培养 4 周后观察结果，菌落≥1 个则为阳性。

1.7.2.2 噬菌体法 取经过前处理预培养的标本 1.0 ml 于 1.5 ml 离心管中，每份标本设 2 管平行对照。每管中加 100 μl 噬菌体（10^9 pfu），37℃感染 3 h 后加杀病毒剂 100 μl 混匀，5 min 后加 5 ml 7H9（10%营养添加剂 +1 mmol/L 氯化钙）和 5 mg/ml 辅助细胞菌液 1ml，与 7 ml 1.5%琼脂 7H9 培养基（50℃）一起铺皿，待凝固后 37℃培养，18~24 h 后观察结果[5]。2 个平行皿中噬菌斑均≥10 个为阳性，其中任意 1 个平皿＜10 个噬菌斑为阴性。

2 结 果

2.1 不同扩增方法对噬菌体生产效率的影响

分别采用单层和双层培养基的方法，10^6pfu 噬菌体培养 24 h 或 48 h 后采用离心－过滤法收集噬菌体扩增液，并检测效价，推算出噬菌体的增殖效率，增殖效率 =（效价 × 体积）/10^6，结果见表 1。

由上表可见，无论采用何种培养方法，噬菌体增殖 48 h 的扩增效率是 24 h 的 10 倍；而双层培养基扩增方法的噬菌体产量是单层的 200 倍之多。此外，实验发现噬菌斑大小在 48 h 后趋于稳定，因此采用双层培养基培养 48 h 可以达到较为理想的噬菌体产量。

2.2 不同噬菌体/宿主菌比例对噬菌体生产效率的影响

噬菌体扩增时按不同比例的噬菌体（pfu）/ 宿主菌（cfu）培养 48 h，其中比例为 $10^5/5\times10^8$、$10^6/10^9$、$10^7/10^9$ 时，噬菌体扩增后的效价≥10^{10}pfu/ml，可以获得较高的生产效率。宿主菌必须比噬菌体多才能达到增殖噬菌体的目的，但太多也会因为不能将宿主菌裂解完全而回收液中细菌较多导致过滤纯化噬菌体较为困难。

2.3 不同收集方法对噬菌体回收效果的影响

采用双层培养基法增殖噬菌体，48 h 后分别采用离心 - 过滤法和孵育 - 过滤法收集。

离心 - 过滤法回收的噬菌体效价为 2.0×10^{10} pfu/ml，10^6 pfu 噬菌体在 48 h 后的产量为 1.8×10^{11} pfu。离心 - 过滤法回收的噬菌体效价为 2.1×10^{10} pfu/ml，10^6 pfu 噬菌体在 48h 后的产量为 1.89×10^{11} pfu。由此可见，2 种方法的回收效果大致相同，但孵育过滤法更简单。

2.4 噬菌体保存效果比较

10^9 pfu/ml 噬菌体分别采用液体形式 4℃或 -70℃保存以及真空冷冻干燥后室温或 4℃保存，在 0 ~ 28 周后的效价变化见图 1、2。

由图 1 可见，噬菌体采用液体形式 4℃保存，无论保护剂是什么，噬菌体的效价在 28 周内均未降低 10^1 以上，稳定性好，操作方便，不需要特殊设备，如低温冰箱、冻干机等。-70℃保存在 10 周后效价下降明显，效果不如 4℃保存。

由图 2 可见，噬菌体采用真空冻干后 4℃、室温保存，总体上 4℃优于室温，不同的保护剂保存效果相差较大。采用宿主菌（耻垢分枝杆菌）的无细胞菌苗作为保护剂冻干后室温或 4℃保存时，28 周内效价仅下降 10^1，较为理想。

2.5 噬菌体法中重要试剂的稳定性

杀灭未感染宿主菌的噬菌体的试剂是 FAS，4%FAS 灭菌后 4℃保存 40 周后，其活性与新鲜配制的相同，0.1 ml 能将 10^9pfu/1.0 ml 噬菌体完全杀灭。

辅助细菌是一种快生长分枝杆菌，菌液 4℃保存 40 周后，活菌数量由 10^9cfu 减少至 2×10^8cfu。实验证实等量噬菌体在活菌数量为 10^7 ~ 10^9cfu 的指示平皿中出现相同的噬菌斑数量，因此辅助细菌保存 40 周内不会影响噬菌体的检测结果。

2.6 噬菌体法检测痰标本中 MTB 的评价

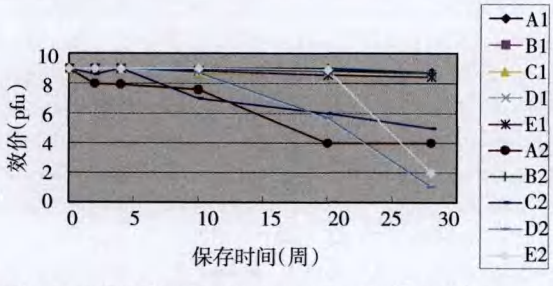
34 份模拟临床结核病人痰标本分别采用培养法和噬菌体法检测。2 份标本因在 L-J 培养基上培养 4 周期间污染而被排除，29 份培养阳性，3 份培养阴性，其中加生理盐水的痰标本培养阴性。噬菌体法的检测结果见表 2。

表 1 不同增殖培养基和时间对噬菌体扩增效率的影响

增殖培养基	增殖时间（h）	效价（pfu/ml）	增殖倍数
双层培养基	24	2.0×10^9	1.80×10^4
	48	2.1×10^{10}	1.89×10^5
单层培养基	24	4×10^7	3.60×10^2
	48	5×10^8	4.50×10^3

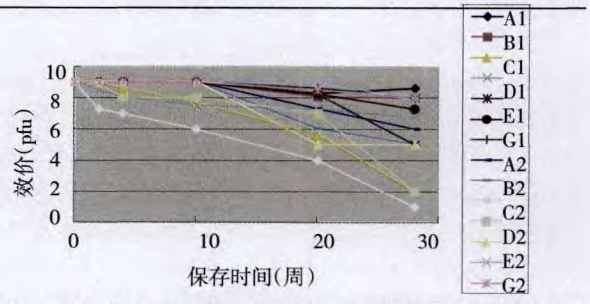
表 2 32 份痰标本用噬菌体法和培养法的检测结果

		培养法		符合率
		阳性	阴性	
噬菌体法	阳性	25	1	84.4%
	阴性	4	2	
合 计		9	3	



注：①A→E 分别代表不同保护剂：7H9（10%营养添加剂）+30%甘油、7H9（10%营养添加剂）+1mmol/L 氯化钙、7H9（10%营养添加剂）+10%甘油 +1mmol/L 氯化钙 +0.05%叠氮化钠（wt/v）、SM、4%小牛血清白蛋白；②1 代表保存温度为 4℃，2 代表保存温度为 -70℃

图 1 噬菌体液体保存的稳定性



注：①A→G 分别代表不同保护剂：10%灭菌脱脂牛奶、7H9（10%营养添加剂）+1mmol/L 氯化钙、4%小牛血清白蛋白、SM、7%无细胞耻垢分枝杆菌菌苗（M.S）蛋白、3.5%M.S 蛋白、1.75%M.S 蛋白。

②1 代表 4℃保存，2 代表室温保存。

图 2 噬菌体冻干保存的稳定性

由表 2 可得知,噬菌体法检测 32 份标本中 MTB 的敏感度(真阳性检出率)、特异度(真阴性检出率)和符合率(真阳性和真阴性检出率)分别为 86.2%(25/29)、66.7%(2/3)、84.4%(27/32)。

3 讨 论

噬菌体是一种专性寄生于细菌的病毒,没有独立的代谢酶系,而是将核酸(DNA 或 RNA)注入宿主菌细胞内,通过宿主菌的代谢体系合成子代噬菌体,最终产生一种裂解酶杀灭宿主菌释放子代噬菌体,开始新一轮的增殖[6]。噬菌体法检测 MTB 在近几年得到广泛关注,具有快速、敏感性和特异性高的特点。它的原理是噬菌体具有较为独特的宿主菌谱和只感染裂解活的宿主菌。噬菌体首先感染标本中活的 MTB,然后加入一种对细胞内噬菌体和 MTB 无影响而在短时间内能杀灭所有胞外噬菌体的杀病毒剂,在中和杀病毒剂作用后,释放的子代噬菌体感染另一种宿主菌,在 24 h 内形成清晰的噬菌斑。若标本中无活的 MTB,噬菌体不能进入宿主菌胞内而被杀灭,则不出现噬菌斑。国外已有用于快速检查结核分枝杆菌的噬菌体商业性试剂盒,在全球多个地区进行了临床实验[1]。但国内尚无具有我国独立知识产权的用于快速诊断结核的噬菌体试剂盒。

作为一种生物制品的诊断试剂盒在临床和科研中要得到应用,除了方法学成立外,还需研制试剂盒的生产工艺和保存工艺,并且对之做出科学的评价。本实验以研制新型结核病诊断试剂盒为标准,对国外研究较为成熟的噬菌体法快速检测 MTB 进行了较为全面的研究。结果表明,噬菌体的生产较简便、快速,成本较低。噬菌体保存条件并不高,液体 4℃保存 28 周具有较好的稳定性,但冻干保存更适合于试剂盒中的微生物保存。此外,本研究发现采用一种以宿主菌为主要成分的无细胞菌苗作为冻干保护剂时,噬菌体 28 周内保持较好的稳定性,我们对该保护剂已申请知识产权保护。噬菌体法中杀灭未感染宿主菌的噬菌体所用试剂是一种普通的无机盐,杀菌浓度 4℃保存 40 周内均保持稳定的杀菌活性。应注意的是,在保存过程中会出现沉淀,每次使用前应振荡使之混匀。此试剂所需量少,试剂盒中采用液体方式更便于使用。噬菌体法之所以能快速检测 MTB 是因为采用了一种快生长分枝杆菌作为辅助细菌,噬菌体在此宿主菌中生长一代仅需 90 ~ 120 min[3],因此,从 MTB 释放出的子代噬菌体随后在辅助细菌中快速增殖,24 h 内即可将周围的辅助细菌杀灭形成清晰的噬菌斑。实验发现培养基中所加辅助细菌在 $10^7 \sim 10^9$cfu 范围内对噬菌斑的数量没有明显影响,本研究中辅助细胞的保存采用液体方式是为了使用时操作方便,40 周后活菌数量由 10^9cfu/ml 减至 2×10^8cfu/ml,并不影响噬菌体法的结果,但最好是采用冻干粉剂保存,这样更利于试剂盒运输的安全,尽管此辅助细菌对人并没有致病性。

此外,本研究还对噬菌体法在快速诊断结核病方面的应用进行了初步评价。因临床痰标本存在许多呼吸道常见病菌:链球菌、葡萄球菌、绿脓杆菌等和粘液,首先需对标本进行消化,而标本内 MTB 的活菌量和活性会受消化过程中的强碱影响,在噬菌体法检测前还需恢复 MTB 活性。34 份痰标本经半胱氨酸 -NaOH 处理后,有 2 份因消化不完全培养 1 周即污染;其余 32 份标本中有 29 份培养阳性,3 份培养阴性。目前,培养法是诊断活动性结核最为可靠的方法,以此作为评价噬菌体法的金标准比痰涂片法更有科学性。涂片法尽管简单、快捷,但不能区分死菌与活菌以及 MTB 与 NTM(非结核分枝杆菌),而噬菌体法是检测标本中是否存在活菌。结果显示,噬菌体法的敏感性和符合率较高,分别为 86.2%、84.4%,特异性为 66.7%。与国外报道结果相比[7,8],敏感性和符合率差异不大,但特异性稍差,可能与本研究中的阴性标本数量较少有关。已有报道证实,噬菌体法检测呼吸道常见非分枝杆菌致病菌均为阴性[5]。由此可见,临床可以采用噬菌体法检测结果作为结核病的辅助诊断依据,比培养法更快速,与其他生物化学与分子生物学等快速诊断方法比较,具有可区分死菌与活菌、操作简便而且不需特殊仪器的特点,将有利于结核病的快速诊断和控制。

本研究对结核分枝杆菌噬菌体试剂盒进行了全面的实验室研究,在国内尚属首例,证实噬菌体法具有商业性试剂盒生产的可行性并进行了初步评价。若要应用于临床,还需增大样本量,采用临床痰标本进行验证。

参 考 文 献

[1] Albert H, Heydenrych A, Brookes R, et al. Performance of a rapid phage-based test, FASTPlaqueTBTM, to diagnose pulmonary tuberculosis from sputum specimences in South Africa [J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2002, 6(6): 529-539.

[2] 张德震. 分子克隆实验指南[M]. 北京:科学技术出版社, 2002. 127-133.

[3] McNerney R, Wilson S M, Sidhu A M, et al. Inactivation of mycobacteriophage D29 using ferrous ammonium sulphate as a tool for the detection of viable mycobacterium smegmatis and mycobacterium tuberculosis [J]. Res Microbiol 1998, 149: 487-495.

[4] 顾 铭, 聂峰光, 戚艺华, 等. 传染性法氏囊病病毒弱毒株对 Vero 细胞的适应性研究[J]. 生命科学研究, 2000, 4: 197-201.

[5] 彭 丽, 罗永艾, 王国治. 噬菌体生物扩增法快速检测结核分枝杆菌的标准化研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2004, 27(12): 805-810.

[6] Nelson D, Loomis L, Fischetti V A. Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(7): 4107-4112.

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

[8] Marei A M, El-Behedy E M, Mohtady H A, et al. Evalution of a rapid bacteriophage-based method for the detection of mycobacterium tuberculosis in clinical samples[J]. J Med Microbiol, 2003, 52(4): 331-335.

(责任编辑:冉明会)