

刃天青显色法检测结核分枝杆菌的耐药性

王 敏¹, 付光宇², 罗江卫³ (1. 郑州人民医院呼吸科 450003; 2. 郑州大学基础医学院 450001; 3. 郑州安图绿科生物工程有限公司 450016)

【摘要】 目的 用刃天青显色法检测结核分枝杆菌对 4 种一线抗结核药物的耐药性, 并探讨该法的临床应用价值。**方法** 来自河南省 3 家结核病医院的共 240 株结核分枝杆菌分别用刃天青显色法检测异烟肼(INH)、利福平(RFP)、乙胺丁醇(EMB)、硫酸链霉素(SM)的耐药性, 并与比例法作比较。**结果** 刃天青显色法检测平均时间为 8 d, 与比例法相比结果一致性好, INH、RFP、EMB、SM 4 种药物的折点浓度分别为 0.25、2.0、4.0、2.0 $\mu\text{g/mL}$ 。**结论** 刃天青显色法检测结核分枝杆菌的耐药性具有成本低、快捷、操作简便、准确等优点, 为结核耐药检测提供了一种较好的方法。

【关键词】 刃天青显色法; 结核分枝杆菌; 耐药性

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2012.13.025 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2012)13-1587-02

Drug resistance testing of Mycobacterium tuberculosis by resazurin microplate assay WANG Min¹, FU Guang-yu², LUO Jiang-wei³ (1. Department of Respiration, Zhengzhou People's Hospital, Zhengzhou, Henan 450003, China; 2. Basic Medical College, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450001, China; 3. Autobio Bioengineering Co. Ltd., Zhengzhou, Henan 450016, China)

【Abstract】 Objective To investigate the Mycobacterium tuberculosis resistance to 4 kinds of first-line antituberculous drugs by using the resazurin microplate assay and to study its clinical application value. **Methods** 240 clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis from 3 tuberculosis hospitals in Henan province were applied to test their resistance to isoniazid(INH), rifampicin(RFP), ethambutol(EMB) and streptomycin(SM) by resazurin microplate assay and compared with the proportion method. **Results** The average detection time in the resazurin microplate assay was 8 d. Compared with the routine proportion method, the resazurin microplate assay showed good consistency of results. The breakpoints concentrations for the four drugs INH, RFP, EMB and SM were 0.25, 2.0, 4.0, 2.0 $\mu\text{g/mL}$, respectively. **Conclusion** The resazurin microplate assay has the advantages of low cost, rapidness, convenience, simply operating and accuracy, which may become a promising method for detecting drug resistance of Mycobacterium tuberculosis.

【Key words】 resazurin microplate assay; Mycobacterium tuberculosis; drug resistance

我国每年有 13 万人死于结核病, 是全球 22 个结核病高负担国家之一。耐多药结核菌株的增加, 给结核病的防治带来了极大的困难。传统的结核药敏试验是在罗氏固体培养基上进行的, 药物按一定的稀释梯度加入培养基中, 将分离培养阳性的细菌接种于含药培养基中, 观察分枝杆菌在含药培养基中的生长情况。由于结核杆菌生长缓慢, 一般的结核杆菌分离培养需时 2~6 周, 药敏试验需时 4~6 周, 共需 6~10 周, 不仅费时, 更耽误了患者的合理治疗, 因此缩短药敏试验时间, 并增加准确性, 是一个迫切的问题。BACTEC MGIT 960 检测系统虽然缩短了时间, 实现了自动化, 但是设备昂贵, 难以得到普及。一种成本较低且快速药敏试验的方法——微孔板比色法已经早有报道, 该法可以检测临床分离结核分枝杆菌的最小抑制浓度(MIC)^[1]。本研究分别从河南省的 3 个结核病医院检测了 240 株临床分离结核杆菌对一线药物利福平、硫酸链霉素、异烟肼、乙胺丁醇的耐药性, 并同时采用比例法结果作为对照, 研究显色法检测结核分枝杆菌耐药的可行性。

1 材料与方 法

1.1 材料 质控株结核分枝杆菌 H37Rv(ATCC 27924), 河南省胸科医院提供。临床分离株首先用 TCH 培养基和 PNB 培养基鉴定, 得到 240 株结核分枝杆菌, 分别来自河南省胸科医院 113 株, 67 株来自新乡结核病防治研究所, 60 株来自河南

省结核病医院。培养基: 7H9 培养基基础, 营养液在 OADC 基础上稍作改变, 成分包括葡萄糖、氯化钠、小牛血清、油酸。7H9 培养基基础与营养液混合均匀后无菌过滤, 4℃保存备用, 1 个月内用完。刃天青盐, 用去离子水配制成 0.02% 的溶液, 无菌过滤, 4℃避光保存备用^[2]。异烟肼(INH)、利福平(RFP)、乙胺丁醇(EMB)、硫酸链霉素(SM)均为纯品, sigma 公司产品。异烟肼(INH)、乙胺丁醇(EMB)、硫酸链霉素(SM)用蒸馏水稀释后用 0.22 μm 滤膜除菌, 利福平(RFP)用少量二甲基甲酰胺溶解后加灭菌蒸馏水至所需量过滤, 原液置 -20℃备用, 3 个月内使用。

1.2 方 法

1.2.1 刃天青显色法 参考 Franzblau SG 方法^[3], 并稍加改变。采用 24 孔细胞培养板微孔板, 在第 1 孔中添加抗结核药物原液, 用培养基梯度 2 倍稀释, 稀释 10 个梯度, 每孔培养基含量为 1 mL。药物最终浓度范围为 INH 0.031~8.0 $\mu\text{g/mL}$, RFP 0.062~16 $\mu\text{g/mL}$, EMB 0.5~128 $\mu\text{g/mL}$, SM 0.125~32 $\mu\text{g/mL}$, 将培养至对数生长期的结核杆菌收集并调至浊度为 McFarland 1, 1:5 稀释后, 加入各孔 100 μL , 菌液的终浓度为 10^6 cfu/mL, 每板均设 4 个不含抗菌药的生长对照孔。24 孔细胞培养板用透明塑料袋密封置于 37℃, 5% 二氧化碳温箱培养, 待生长至第 3 天开始每日观察, 生长对照孔有明亮结核

分枝杆菌生长,在对照孔内添加刃天青盐溶液 25 μL,5%吐温 80 100 μL,培养过夜观察生长对照孔显色情况,待生长对照孔颜色由蓝色变为粉红色或者紫红色后,在测试孔中加入显色剂(刃天青盐溶液 25 μL,5%吐温 80 100 μL),24 h 后观察颜色是否发生变化,若颜色由蓝色变为粉红色,读出该菌株的 MIC,并依据临界浓度 RFP 2 μg/mL,SM 2 μg/mL,INH 0.25 μg/mL,EMB 4 μg/mL 判断是否耐药,如果测试孔变色不明显,则延迟 1 d 读数。

1.2.2 比例法 培养基制备:基础培养基为改良罗氏培养基,配方及制备方法按照《结核病诊断细菌学检验规程》^[3]。药物称量及其稀释参照,含药培养基最终浓度为 INH 0.2 μg/mL,SM 4.0 μg/mL,EMB 2.0 μg/mL,RFP 40.0 μg/mL。药物敏感性试验方法参照^[4]。

1.3 统计学方法 将两种方法药敏试验结果进行配对比较,用 χ^2 检验统计符合率。

2 结 果

2.1 刃天青显色法的实验影响因素 刃天青作为一种氧化还原指示剂,受到检测结核菌量大小的影响,本文采用不同的接种浓度比较了 4 种抗结核药物对结核分枝杆菌(ATCC 27294)的 MIC,实验结果见表 1。对于 RFP、EMB 来说,最终分枝杆菌浓度为 $(1\sim6)\times10^5$ cfu/mL 时 MIC 较 $(1\sim6)\times10^4$ cfu/mL 约有一个梯度的变动。对于 M 来说,低的分枝杆菌浓度获得的 MIC 较大,不同的接种浓度的 MIC 变宽。由于在分枝杆菌低浓度时,生长时间有所增长,对于代谢比较慢的结核分枝杆菌来说,M 渗透到细胞内作用的时间更长,抑菌浓度变大。这个现象与 Elean Banfi 报道的类似^[5]。在相同的接种浓度下,随着生长时间的延长,MIC 逐渐变大,接种量较小时,需要生长到 14 d 可以观察结果,而接种量稍大,7 d 就可以观察到结果,见表 2。

表 1 结核分枝杆菌 ATCC 27294 在液体培养基中接种浓度对 MIC 值影

药物	MIC	
	接种浓度	接种浓度
	$(1\sim6)\times10^5$ cfu/mL	$(1\sim6)\times10^6$ cfu/mL
RFP	0.031~0.063	0.063
INH	0.125~0.250	0.125~0.250
SM	1	0.500~1.000
EMB	1	1.000~2.000

表 2 结核分枝杆菌 ATCC 27294 在液体培养基中不同接种浓度不同生长时间对链霉素 MIC 值影响

生长时间 (d)	MIC	
	接种浓度	接种浓度
	$(1\sim6)\times10^6$ cfu/mL	$(1\sim6)\times10^5$ cfu/mL
7	无结果	0.25~0.50
14	1	0.5~1.0
21	2	1
28	2	1~2

2.2 折点值以及 3 所医院结核分枝杆菌耐药率比较 240 株临床分离结核分枝杆菌采用比例法和刃天青显色法的结果进行对比,刃天青显色法采用同时做 3 个测试的办法,以比例法作为标准结果,所得数据采用配对资料统计其符合率,4 种药物的折点值 RFP 为 2 μg/mL,INH 为 0.25 μg/mL,SM 为 2

μg/mL,EMB 为 4 μg/mL。见表 3。结果表明,两者所得实验数据相差不大,本文比较了 3 家医院的耐药情况,见表 4。对于河南省结核病医院和新乡结核病防治研究所 4 种药物的耐药情况,相差不大。河南省胸科医院 4 种药物的耐药率相对较高,其中 INH、SM 二者耐药比例达到了 33%左右。结合患者的耐药情况分析发现,从河南省胸科医院分离的 113 株结核分枝杆菌,大部分来自住院患者,而这些人很多都是结核复发患者来院治疗。从这个结果看,对于该院只采用一线药物治疗效果一般不明显,需要辅助二线药物治疗。

表 3 240 株临床分离菌株比例法和刃天青盐还原显色法的比较

药物	刃天青 显色法	比例法						P
		敏感	耐药	灵敏度特异性		阳性 预测值	阴性 预测值	
				(%)	(%)	(%)	(%)	
RFP	耐药	36	3	90.0	98.3	92.3	98.0	0.00
	敏感	4	197	—	—	—	—	>0.05
INH	耐药	58	6	96.7	96.7	90.6	98.7	—
	耐药	58	6	92.1	96.6	90.6	97.2	0.00
M	敏感	2	174	—	—	—	—	>0.05
	敏感	20	7	80	96.7	74.1	97.7	0.08
EMB	耐药	5	171	—	—	—	—	>0.05
	敏感	5	208	—	—	—	—	>0.05

注:—表示无数据。

表 4 单耐药结果统计[n(%)]

	RFP	INH	SM	EMB
省胸科医院(n=113)	27(24)	38(34)	37(33)	15(13)
新乡结防所(n=60)	6(10)	11(16)	12(20)	4(7)
河南省结核病医院(n=67)	7(11)	11(17)	14(21)	6(9)

3 讨 论

采用微孔板法检测结核分枝杆菌的 MIC,国外早有报道^[6]。包括微量稀释法^[7],都需要在微孔板上进行操作,方法优点是所需要培养基量较少,观察比较容易,但是结核分枝杆菌生长缓慢,需要培养 5 d 时间,培养基蒸发比较大,本研究采用一些措施,尽可能的避免了水分的蒸发,但是对结果也有一定程度的影响。从结果可以看到,本法虽然符合率较高,但是培养时间与普通细菌药敏相比,时间还是较长。刃天青在显色过程中会伴随荧光的产生,如果能够采用仪器检测微孔板的信号,就可以对药敏结果进行量化,对检测结果的时间会有较大的提前。同时,由于采用检测抗结核药物 MIC 的方法,对临床检验人员的工作量是一个挑战。本研究曾采用首先把药物添加到微孔板上,先行冻干,然后在实验过程中在培养液中直接添加菌悬液后直接添加到微孔板的办法,培养效果与梯度稀释法相比一样。但是,在冻干后如何保持药敏板内抗结核药物的效价也是一种挑战,需要在工艺上进行研究。当然,本法的缺点是依靠目力观察,对于有些测试菌株来说,MIC 过度不明显,存在主观判断的缺点,为本法的临床应用增加了难度。

近年来,多耐菌株和广泛耐菌株日益增多,临床上迫切需要新的快速、低廉的检测方法,缩短检测周期。传统的结核分枝杆菌药敏检测方法,由于受结核分枝杆菌生长缓慢的制约,至少需要 4 周的时间才得到结果,BACTEC 460 可显著缩短培养时间,药敏试验只需 5~7 d,但是存在放射(下转第 1590 页)

2 结 果

血清和血浆中 Cl^- 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、BUN、Cr、ALT、AST 的检验结果基本一致； Na^+ 和 Glu 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，血清钾浓度 (Y) 与血浆钾浓度 (X) 的回归方程为 $Y = 0.715X + 0.499$, $r = 0.749$ 。结果清晰地表明血清跟血浆中的 K^+ 、Glu、 Na^+ 测定值差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)，而其他的检验项目之间的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨 论

肝素钠抗凝能够较好地避开了血液凝固的过程，可以尽快地对标本进行分离，因此其测定的结果能够更多的反映出体内的真实情况。据结果显示， Cl^- 、BUN、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、Cr、AST、ALT 在血清以及血浆内的浓度基本达到一致。虽然血清的钠浓度跟血浆钠浓度的对比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，但这种情况在临床上并无具体的实际意义。另外，血清葡萄糖的浓度与血浆葡萄糖的浓度差异也有统计学意义 ($P < 0.05$)，与文献所报道的血清放置于室温下的 1~3 h 的血糖值出现明显的下降是相一致^[5]。

文章中显示的血清钾的浓度高于血浆钾的浓度，两者之间的测定结果差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。究其原因因为血液在凝固的过程中由于血小板的破坏，导致了血小板内的钾离子（其浓度远远比血浆钾要高）释放进入血，以及与细胞内外的钾离子进行交换，这个情况使得血清钾远高于血浆钾^[6]。实验的结果也表明了钾离子在血浆中以及血清中均存在一个恒定的浓度差，约 0.5 mmol/L，这个情况可能跟血小板参与了凝血时所释放出钾离子量的基本稳定有关系。

综上所述，采用肝素钠抗凝血浆进行生化检验分析，只要纠正了钾的差异或者可以考虑建立一个血浆钾参考值的范围就能够迅速、准确地报告出检验结果，为协助临床医生的及时

合理用药提供了技术保障。检验是临床上救治时作为病因的诊断、紧急的治疗所必须要做的工作，对一个患者作出迅速的、准确的临床判断以及进行高效率的、高质量的抢救，有效地挽救生命，减少伤残，都离不开准确、精确的检验结果。患者的情况的变化是迅速的，因此，时间就是患者的生命，只有赢得了宝贵的时间，才能够有效地提高救治的成功率。

参考文献

- [1] 刘敬文. 离子选择电极法测血清和肝素钠抗凝血浆中的钾离子的对照[J]. 医学检验与临床, 2010, 21(1): 131.
- [2] 严勇. 肝素钠抗凝血浆用于生化检验分析的可行性探讨[J]. 安徽卫生职业技术学院学报, 2010, 9(5): 72-73.
- [3] 楼许柏, 高伟英, 楼芳, 等. 肝素抗凝血浆用于急诊生化检验的可行性分析[J]. 当代医学, 2011, 17(20): 16-17.
- [4] Wang, ZM, Li, L, Zheng, BS et al. Preparation and anticoagulation activity of sodium cellulose sulfate[J]. Int J Biol Macromol, 2007, 41(4): 376-382.
- [5] Kaneko J, Sugawara Y, Tamura S, et al. Coagulation and fibrinolytic profiles and appropriate use of heparin after living-donor liver transplantation [J]. Clin transplant, 2005, 19(6): 804-809.
- [6] Jian L, Cheng ZH, Yuan FL, et al. Light-scattering signals from nanoparticles in biochemical assay, pharmaceutical analysis and biological imaging[J]. TrAC, 2009, 28(4): 447-453.

(收稿日期: 2012-03-15)

(上接第 1588 页)

性污染, 现已逐渐少用。BACTEC MGIT 960 虽然检测结果也比较快, 7~10 d 就可以出结果^[8], 但是需要机器配套应用, 价格较贵, 不符合我国的国情。刃天青是 Alamar-Blue 的主要成分, 是一种氧化还原指示剂, 其在氧化状态下呈现紫蓝色无荧光性, 而在还原状态下, 转变为呈粉红色或红色荧光的还原产物, 吸光度和荧光强度与活性细胞数成正比, 通过培养结核杆菌还原刃天青盐来判断结核菌是否生长, 显色剂和培养基用量均较少, 通过颜色变化即可读数, 不需仪器, 比较方便。微量快速比色法在国外的在此方面研究也见报道, 国内也有用观察颜色变化, 应用 Alamar-Blue 法测定抗结核药物的 MIC 值的报道^[9]。Alamar-Blue 的优点是比刃天青稳定, 缺点是价格较高。刃天青价格相对较低, 而且可以采用一些方法使其保持较为稳定的状态。本方法比传统的比例法和绝对浓度法检测时间快 20~30 d。而且采用微孔板法检测, 可以同时检测大量样本, 大大减少了工作人员的工作量。经济、简单、快速。本方法的不足之处是检测 MIC, 导致操作上有点繁琐, 且临界药物的制定也是一大关键, 特别是二线药物, 有许多没有很好的参考标准, 根据药代动力学和临床小样定值, 有一定的局限性。另外, 由于培养时间过长, 如果技术人员操作不够熟练, 可能会产生部分杂菌的污染, 导致结果无法判读, 这也是一个需要解决的问题。

参考文献

- [1] Franzblau SG, Witzig RS, McLaughlin JC, et al. Rapid, low-technology MIC determination with clinical Mycobacterium tuberculosis isolates by using the microplate Alamar Blue assay[J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(2): 362-366.

- [2] Anandi Martin, Mirtha Camacho, Francoise Portaels, et al. Resazurin Microtiter Assay Plate Testing of Mycobacterium tuberculosis susceptibilities to second-line drugs: rapid, simple, and inexpensive method[J]. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2003, 47(11): 3616-3619.
- [3] 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): 28-31.
- [4] 刘宇红, 王魁民, 那希宽. 比例法测试结核分支杆菌药物敏感性的探讨[J]. 中华结核和呼吸感染, 2000, 23(2): 89-92.
- [5] Elena Banfi, Giuditta Scialino, Carlo Monti-Bragadin. Development of a microdilution method to evaluate Mycobacterium tuberculosis drug susceptibility[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2003, 52(5): 796-800.
- [6] Luz Caviedes, Jose Delgado, Robert H. Gilman. Tetrazolium Microplate Assay as a Rapid and Inexpensive Colorimetric Method for Determination of Antibiotic Susceptibility of Mycobacterium tuberculosis[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(2): 1873-1874.
- [7] Ahmet Yilmaz Coban, Asuman Birinci, Bora Ekinci, et al. Drug Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis by the Broth Microdilution Method with 7H9 Broth [J]. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2004, 99(1): 111-113.
- [8] 陆宇, 王彬, 郑梅琴, 等. 应用 Alamar blue 和 MTT 法测定抗结核药物最低抑菌浓度的研究[J]. 中国防痨杂志, 2007, 29(6): 499-501.

(收稿日期: 2011-11-15)