

· 论 著 ·

显微镜观察药敏检测技术检测结核分枝杆菌耐药性研究*

黄自坤¹,熊国亮²,姜碧霞¹,方乐¹,李玮婷¹,徐晓萌¹,李俊明^{1△}

(1. 南昌大学第一附属医院检验科,南昌 330006;2. 江西省胸科医院检验科,南昌 330006)

摘要:目的 建立快速测定耐药结核分枝杆菌(MTB)的显微镜观察药敏检测(MODS)技术,并评价其临床应用价值。方法 采用 24 孔细胞培养板液体培养方法建立 MODS 技术,并对最佳检测条件进行探讨。应用该技术对 192 株 MTB 临床分离株进行利福平、异烟肼、乙胺丁醇、链霉素、氧氟沙星的药敏检测,并与传统绝对浓度法药敏结果进行比较,对两法检测结果不一致的菌株进行 BACTEC-960 测定。结果 MODS 药敏检测时间中位数为 6 d。以绝对浓度法药敏结果为判断标准,MODS 技术进行利福平、异烟肼、乙胺丁醇、链霉素、氧氟沙星药敏检测的敏感度分别为 97.8%、98.7%、88.4%、93.2%、96.4%;特异度分别为 98.0%、94.8%、94.3%、99.0%、95.6%;符合率分别为 97.9%、96.4%、92.1%、96.4%、95.8%。结论 MODS 技术可作为 MTB 耐药性的快速检测方法。

关键词:分枝杆菌,结核;抗药性;微生物敏感性试验;显微镜检查

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.19.004

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)19-2194-04

Detection of drug susceptibility in mycobacterium tuberculosis by microscopic observation drug susceptibility assay*

Huang Zikun¹, Xiong Guoliang², Jiang Bixia¹, Fang Le¹, Li Weiting¹, Xu Xiaomeng¹, Li Junming^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the Jiangxi Chest Hospital, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

Abstract: Objective To construct the method of microscopic observation drug susceptibility(MODS) for assaying the drug susceptibility of mycobacterium tuberculosis(MTB), and evaluate its clinical value. **Methods** MODS assay was constructed by using 24-well cell culture plate. The test conditions were discussed. The drug susceptibility of 192 MTB clinical isolates to rifampin (RIF), isoniazid (INH), ethambutol (EMB), streptomycin (SM) and ofloxacin (OFX) was detected by MODS and the result was compared with absolute concentration method on Lowenstein-Jensen (LJ) medium. BACTEC-960 TB system was used to determine the drug susceptibility of MTB strains which obtained inconsistent results from MODS assay and LJ method. **Results** Results of MODS were obtained in a median time of 6 days. When using the absolute concentration method as standard, the sensitivity, specificity and accordance rate were 97.8%, 98.0% and 97.9% in RIF, 98.7%, 94.8% and 96.4% in INH, 88.4%, 94.3% and 92.1% in EMB, 93.2%, 99.0% and 96.4% in SM, 96.4%, 95.6% and 95.8% in OFX, respectively. **Conclusion** MODS assay can be used for rapid detecting of drug susceptibility in MTB.

Key words: mycobacterium tuberculosis; drug resistance; microbial susceptibility tests; microscopy

结核病是严重危害人类健康的感染性疾病,耐药结核分枝杆菌(mycobacterium tuberculosis, MTB)的产生和流行给结核病的防治带来了巨大障碍。由于快速、准确的耐药性检测是指导临床合理用药的前提,因此耐药性检测方法研究具有重要意义^[1]。但传统 MTB 耐药性检测方法需时较长,很难满足临床需要。而在一些发达国家逐渐得到应用的全自动液体培养法虽然在检测报告时间方面有较大改善,但需要昂贵的检测设备,试剂成本也很高,难以在发展中国家获得推广。显微镜观察药敏检测(microscopic observation drug susceptibility, MODS)技术是近年来建立的一种新的 MTB 耐药性检测方法,具有敏感性高、检出时间短、无需昂贵的特殊设备和检测成本低等优点,被认为是一种适于在发展中国家推广使用的结核药物敏感性检测方法^[2-7]。本研究在建立 MODS 技术平台的基础上^[8],将其用于同时检测 MTB 对利福平、异烟肼、乙胺丁

醇、链霉素、氧氟沙星等 5 种抗结核药物的耐药性,并与传统罗氏培养基的绝对浓度法药敏结果进行比较,对结果不符菌株进行 BACTEC-960 测定,以评价 MODS 检测结果的准确性,探讨其临床应用价值。

1 材料与方 法

1.1 材料 192 株 MTB 临床分离株为江西省胸科医院菌株库保存菌株,全部来自确诊的肺结核患者的痰标本培养物,并经常规生化反应鉴定为 MTB。MTB 标准菌株(H37Rv, ATCC 27294)由重庆市肺科医院惠赠。

1.2 试剂与仪器 链霉素、异烟肼、利福平、乙胺丁醇、氧氟沙星 5 种抗结核药物和酪氨酸蛋白水解物均购于 Sigma 公司,米氏 7H9 培养基干粉购自 Difco 公司,OADC 营养添加剂和 BACTEC-960 试剂购自 Becton Dickinson 公司。MODS 应用液为含酪氨酸蛋白水解物和 10% OADC 的米氏 7H9 液体培养

* 基金项目:江西省卫生厅科技计划资助项目(20081050);江西省科技支撑计划资助项目(2009BSB11219);江西省青年科学家培养计划资助项目(2009DQ01900)。作者简介:黄自坤(1986~),硕士,主要从事抗感染免疫的基础及临床研究工作。△ 通讯作者, Tel: 13870878042; E-mail: lisir361@163.com。

基。罗氏药敏培养基：按《结核病诊断细菌学检查规程》制备^[9]。

1.3 方法

1.3.1 菌悬液制备及菌量浓度选择 取处于对数生长期的 MTB 纯培养物，研磨后加入 7H9 培养基，经麦氏标准管比浊配成 1×10^7 cfu/mL 的菌悬液，稀释成实验所需菌液浓度待检。将 H37Rv 磨菌配成 1×10^7 cfu/mL 的菌悬液，然后做 $10^1 \sim 10^6$ cfu/mL 稀释。在 24 孔细胞培养板内按每孔 800 μ L 加入 MODS 培养基，取稀释后的菌悬液以每孔 200 μ L 接种于培养板中，每块培养板设两个阴性对照培养孔。培养板接种完毕后装入拉链式透气塑料袋中，置 37 $^{\circ}$ C、10% CO_2 浓度的培养箱培养。培养结果在倒置显微镜下观察，每天 1 次，记录各稀释度菌液呈索状结构生长情况及所需时间。

1.3.2 药物浓度的选择 将利福平、异烟肼、乙胺丁醇、链霉素和氧氟沙星分别采用 0.062 5~32.000 0 μ g/mL 系列梯度倍比稀释，再分别与经绝对浓度法检测对利福平、异烟肼、乙胺丁醇、链霉素和氧氟沙星均敏感的 10 株 MTB，以及分别对这 5 种药物耐药的各 10 株耐药株作用，进行 MODS 耐药性检测，观察索状结构的生长状况。

1.3.3 稳定性试验 采用预试验选择的最佳菌液作用浓度和药物作用浓度，对 10 株经传统罗氏药敏试验判定对这 5 种药物敏感的敏感株和经罗氏药敏试验判定的分别对这 5 种药物耐药的各 10 株耐药株运用 MODS 技术进行检测，重复 5 次试验，观察测定方法的稳定性。

1.3.4 临床分离株耐药性检测 将 192 株 MTB 临床株运用 MODS 技术进行耐药性检测，操作如下：在 24 孔细胞培养板内按每孔 800 μ L 加入 MODS 培养基，每块培养板设两孔试剂空白对照，每株菌株设置两个无药对照孔，10 个加药孔。每次实验设立 H37Rv 为质控株。在无药对照孔和加药孔内分别加入 1×10^4 cfu/mL 待检菌液 200 μ L，然后在加药孔内分别加入利福平、异烟肼、乙胺丁醇、链霉素和氧氟沙星，每种药物检测两孔。培养结果在倒置显微镜下观察，每天 1 次，在培养第 3 天后，质控孔和无药对照孔出现典型索状结构开始进行结果判断。若分离株在无药对照孔和加药孔都有索状结构形成即取此部分培养物进行抗酸染色鉴定，若抗酸染色发现抗酸杆菌则判定为耐药株；若在无药对照孔有索状结构形成且抗酸染色法为阳性，在加药孔无索状结构，则判定为敏感株。

1.3.5 绝对浓度法 参照中国防痨协会制定的操作规程^[9]进行 MTB 耐药性测定，药物浓度分别为利福平 50 μ g/mL 和 250 μ g/mL、异烟肼 1 μ g/mL 和 10 μ g/mL、乙胺丁醇 5 μ g/mL 和 50 μ g/mL、链霉素 10 μ g/mL 和 50 μ g/mL、氧氟沙星 3 μ g/mL 和 10 μ g/mL。

1.3.6 BACTEC-960 药敏法 利福平、异烟肼、乙胺丁醇、链霉素药敏按照 MGIT 的操作说明进行，氧氟沙星药敏参考文献^[10]。

1.4 统计学处理 采用 SPSS15.0 统计软件进行分析。计算敏感度、特异度、阳性预测值、阴性预测值和准确性。MODS 技术与罗氏药敏试验检测结果的一致性检验用 Kappa 检验。对应用 MODS 技术检测的 MTB 的耐药性结果与药敏试验测定结果的比较采用 χ^2 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ ，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MODS 检测条件选择

2.1.1 菌量作用浓度选择 结果表明， 1.0×10^4 cfu/mL 浓度既不影响结果观察，又能缩短观察结果的时间，因此本试验选用 1.0×10^4 cfu/mL 为菌液待检浓度。MTB 在液体培养基中的特征性索状结构，见图 1。



图 1 培养第 7 天时 MTB 在液体培养基中形成的特征性索状结构(倒置显微镜 $\times 400$)

2.1.2 药物作用浓度选择 利福平、异烟肼、乙胺丁醇、链霉素、氧氟沙星终浓度分别为 1.000、0.125、2.000、2.000、2.000 μ g/mL 时，10 株均对这 5 种药物敏感的敏感株无索状结构出现，分别对这 5 种药物耐药的各 10 株耐药株均出现索状结构。因此，选用利福平 1.0 μ g/mL、异烟肼 0.125 μ g/mL、乙胺丁醇 2.0 μ g/mL、链霉素 2.0 μ g/mL、氧氟沙星 2.0 μ g/mL 为检测条件时，可区分 MTB 敏感株和耐药株。

2.1.3 稳定性试验 采用同样的检测条件，对敏感株和耐药株运用 MODS 技术进行检测，结果表明，5 次实验中，采用 1×10^4 cfu/mL 为菌量作用浓度和利福平 1.0 μ g/mL、异烟肼 0.125 μ g/mL、乙胺丁醇 2.0 μ g/mL、链霉素 2.0 μ g/mL、氧氟沙星 2.0 μ g/mL 为药物作用浓度时，每次检测敏感株均判断为敏感，耐药株均判断为耐药；有较好的重复性。

2.2 临床分离株耐药性测定结果

2.2.1 MODS 与绝对浓度法药敏检测时间比较 MODS 技术对 192 株 MTB 临床分离株进行耐药性检测，其中 134 株在 6 d 内获得药敏结果，41 株在第 7 天获得药敏结果，11 株在第 8 天获得药敏结果，2 株在第 9 天获得药敏结果，4 株在第 10 天获得药敏结果；而绝对浓度法药敏约 4 周才能判定结果。

表 1 MODS 与罗氏绝对浓度法药敏结果比较

药物	MODS 药敏结果	绝对浓度法药敏结果(n)		敏感度 (%)	特异度 (%)	准确度 (%)
		耐药	敏感			
利福平	耐药	91	2	97.8	98.0	97.9
	敏感	2	97			
异烟肼	耐药	75	6	98.7	94.8	96.4
	敏感	1	110			
乙胺丁醇	耐药	61	7	88.4	94.3	92.1
	敏感	8	116			
链霉素	耐药	82	1	93.2	99.0	96.4
	敏感	6	103			
氧氟沙星	耐药	54	6	96.4	95.6	95.8
	敏感	2	130			

2.2.2 MODS 与绝对浓度法药敏结果比较 如以绝对浓度法作为参考标准,MODS 进行利福平、异烟肼、乙胺丁醇、链霉素、氧氟沙星药敏试验的敏感度、特异度、准确度,见表 1。阳性预测值分别为 87.8%、92.6%、89.7%、98.8%、90.0%;阴性预测值分别为 98.0%、99.1%、93.5%、94.5%、98.5%。5 种抗结核药物应用 MODS 与绝对浓度法的 Kappa 值为:利福平 0.901,异烟肼 0.925,乙胺丁醇 0.830,链霉素 0.926,氧氟沙星 0.937。

2.3 药敏结果不符合菌株的 BACTEC-960 测定 192 株 MTB 分离株中共有 25 株 41 个药敏结果不符合,MODS 与罗氏药敏结果不符合菌株的 BACTEC-960 测定结果(表 2)。BACTEC-960 检测结果有 27 个药敏结果支持 MODS 结果,14 个药敏结果支持罗氏绝对浓度法结果。

表 2 25 株 MODS 与罗氏绝对浓度法药敏结果不符合菌株的 BACTEC-960 测定结果

菌株编号	药物名称	药敏结果		
		MODS	绝对浓度法	BACTEC-960
1	乙胺丁醇	耐药	敏感	耐药
	链霉素	敏感	耐药	敏感
2	异烟肼	耐药	敏感	敏感
	氧氟沙星	敏感	耐药	耐药
3	乙胺丁醇	敏感	耐药	耐药
	异烟肼	敏感	耐药	敏感
4	氧氟沙星	耐药	敏感	耐药
	链霉素	敏感	耐药	耐药
5	乙胺丁醇	耐药	敏感	耐药
	利福平	耐药	敏感	耐药
6	乙胺丁醇	耐药	敏感	敏感
	异烟肼	耐药	敏感	耐药
7	氧氟沙星	敏感	耐药	敏感
	利福平	敏感	耐药	耐药
8	乙胺丁醇	耐药	敏感	敏感
	异烟肼	耐药	敏感	耐药
9	氧氟沙星	敏感	耐药	敏感
	利福平	敏感	耐药	耐药
10	乙胺丁醇	耐药	敏感	敏感
	乙胺丁醇	敏感	耐药	敏感
11	链霉素	耐药	敏感	耐药
	氧氟沙星	耐药	敏感	敏感
12	乙胺丁醇	敏感	耐药	耐药
	异烟肼	耐药	敏感	耐药
13	乙胺丁醇	耐药	敏感	耐药
	链霉素	敏感	耐药	耐药
14	乙胺丁醇	耐药	敏感	敏感
	氧氟沙星	耐药	敏感	耐药
15	乙胺丁醇	敏感	耐药	敏感
	异烟肼	耐药	敏感	敏感
16	氧氟沙星	耐药	敏感	耐药
	乙胺丁醇	耐药	敏感	耐药
17	利福平	耐药	敏感	耐药

续表 2 25 株 MODS 与罗氏绝对浓度法药敏结果不符合菌株的 BACTEC-960 测定结果

菌株编号	药物名称	药敏结果		
		MODS	绝对浓度法	BACTEC-960
17	氧氟沙星	耐药	敏感	耐药
18	链霉素	敏感	耐药	敏感
	乙胺丁醇	敏感	耐药	敏感
19	异烟肼	耐药	敏感	耐药
20	链霉素	敏感	耐药	耐药
21	乙胺丁醇	敏感	耐药	敏感
22	乙胺丁醇	敏感	耐药	敏感
	利福平	敏感	耐药	敏感
23	链霉素	敏感	耐药	耐药
24	乙胺丁醇	敏感	耐药	敏感
25	异烟肼	耐药	敏感	耐药
	氧氟沙星	耐药	敏感	耐药

3 讨论

快速、准确的耐药性测定,不仅有助于早期发现耐多药的结核病患者,同时可为患者的治疗用药提供准确依据。目前,MTB 耐药性检测方法主要有传统罗氏药敏法、耐药基因的分子生物学检测及快速培养仪检测系统^[1]。由于存在检测时间长、成本较高等不足,难以满足临床诊治的需求。

MODS 技术是近年来建立的一种新的 MTB 耐药性检测技术,其主要原理是利用 MTB 在适宜的液体培养基中的生长速度较在固体培养基上快,且会形成特征性的索状结构的特性,通过在液体培养基中加入抗结核药物,并以不含药物孔为对照,采用倒置显微镜观察含药孔和对照孔中 MTB 索状结构的有无进行耐药性判断^[2]。该方法虽然目前还未应用于常规的临床结核菌耐药性检测,但已有一些国家开展了临床应用研究,并显示出了良好的应用前景^[3-6]。本研究在建立 MODS 技术的基础上,对其检测方法学进行了探讨。通过对不同检测条件的摸索,最终选用 1.0×10^4 cfu/mL 浓度作为本实验的菌液待检浓度,以利福平 $1.0 \mu\text{g/mL}$ 、异烟肼 $0.125 \mu\text{g/mL}$ 、乙胺丁醇 $2.0 \mu\text{g/mL}$ 、链霉素 $2.0 \mu\text{g/mL}$ 、氧氟沙星 $2.0 \mu\text{g/mL}$ 为检测条件时,可将敏感株和耐药株区分开来。

本研究结果表明 MODS 具有较高的敏感性和特异性,检测利福平、异烟肼、乙胺丁醇、链霉素、氧氟沙星药敏结果与罗氏药敏结果符合率分别为 97.9%、96.4%、92.1%、96.4%、95.8%。本研究共计测定 192 株 MTB 960 个药敏结果,共有 25 株 41 个药敏结果与罗氏药敏结果不符。对这些不符合的菌株进行 BACTEC-960 测定,结果表明,其中的 17 株 27 个药敏结果支持 MODS 结果,只有 8 株 14 个药敏结果支持罗氏药敏结果。该结果再次说明 MODS 检测 MTB 耐药性具有较高的准确性。

综上所述,MODS 技术用于 MTB 药物敏感性测定具有成本低、操作简单、快速等优点,并且与传统罗氏药敏结果有较高的符合率。但作为一种新兴的技术,MODS 技术在实际应用过程中还面临一定的问题,其中最主要的是需要实现检测过程

的标准化,目前所报道的 MODS 检测技术,所使用的药物浓度均不统一,缺乏统一标准。但随着技术的不断改进和完善,相信该技术有望成为临床常用的 MTB 耐药性检测方法。

参考文献:

- [1] Lonnroth K, Castro KG. Tuberculosis control and elimination 2010-50: cure, care, and social development [J]. *Lancet*, 2010, 375(9728):1814-1829.
- [2] Caviedes L, Lee TS, Gilman RH, et al. Rapid, efficient detection and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by microscopic observation of broth cultures [J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(3):1203-1208.
- [3] Moore DA, Evans CA, Gilman RH, et al. Microscopic-observation drug-susceptibility assay for the diagnosis of TB [J]. *N Engl J Med*, 2006, 355(15):1539-1550.
- [4] Ejigu GS, Woldeamanuel Y, Shah NS, et al. Microscopic-observation drug susceptibility assay provides rapid and reliable identification of MDR-TB [J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2008, 12(3):332-337.
- [5] Limaye K, Kanade S, Nataraj G, et al. Utility of microscopic observation of drug susceptibility (MODS) assay for *Mycobacterium tuberculosis* in resource constrained

settings [J]. *Indian J Tuberc*, 2010, 57(4):207-212.

- [6] Bwanga F, Haile M, Joloba ML, et al. Direct Nitrate Reductase Assay versus Microscopic Observation Drug Susceptibility Test for Rapid Detection of MDR-TB in Uganda [J]. *PLoS One*, 2011, 6(5):e19565.
- [7] 黄自坤,李俊明. MODS 技术的研究和应用进展 [J]. *中国实验诊断学*, 2012, 16(3):564-567.
- [8] 黄自坤,方乐,姜碧霞,等. 显微镜观察药物敏感度检测技术在肺外结核诊断中的应用 [J]. *中华传染病杂志*, 2012, 16(3):564-567.
- [9] 中国防痨协会基础专业委员会. 结核病诊断实验室检验规程 [M]. 北京:中国教育文化出版社, 2006:18-20.
- [10] Lin SY, Desmond E, Bonato D, et al. Multicenter evaluation of Bactec MGIT 960 system for second-line drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* complex [J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(11):3630-3634.
- [11] Migliori GB, Matteelli A, Cirillo D, et al. Diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis and extensively drug-resistant tuberculosis: Current standards and challenges [J]. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 2008, 19(2):169-172.

(收稿日期:2012-12-08 修回日期:2013-03-18)

(上接第 2193 页)

术后同一时间点,截骨组与骨折组之间相比,均无统计学差异。然而截骨组手术侧髌突应力改变或减少的更加明显,却未造成两者之间的差异。分析可能的原因:(1)髌突作为生长区,拥有代偿性增生的能力。下颌骨的正常生长发育与髌突的生长潜能有紧密的联系,而髌突的生长潜能主要存在于髌突软骨内。(2)Petrovic 的伺服系统理论认为髌突这类继发性软骨的生长在一定程度上受局部外界因素的作用。雄性 SD 大鼠的咬肌相当发达,髌突颈部的截骨和骨折,并不会对咬肌造成过多损失,从而维持了整个下颌的位置关系。(3)截骨组的手术侧髌突术后术区均被大量的纤维软骨包裹,促使髌突仍位于原来的位置。SD 大鼠牙尖交错位时,髌突(通过关节盘)与槽形的颞骨关节面形态吻合,髌突在颞骨关节面下可以有较大幅度的前后向运动,但侧向运动受到较大的限制,同时尖窝锁结关系较好,这在一定程度上也减轻了下颌的偏斜程度。

综上所述,本建模方法 SD 大鼠耐受性好,并具有可重复性,是一种可靠的大鼠髌突颈截骨、骨折模型的建立方法。单侧髌突颈截骨后髌突在愈合过程中先代偿性增大,后缩小。截骨组手术侧与对照组比较,下颌骨生长发育受到限制。单侧髌突颈部截骨、骨折均会使下颌向手术侧偏斜,引起面部的不对称。但两者在程度上无区别。

参考文献:

- [1] Sakr K, Farag IA, Zeitoun IM. Review of 509 mandibular

fractures treated at the University Hospital, Alexandria, Egypt [J]. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 2006, 44(2):107-111.

- [2] Norholt SE, Krishnan V, Sindet-Petersen S, et al. Pediatric condylar fractures: a long-term follow-up study of 55 patients [J]. *J Oral Maxillofac Surg*, 51:1302-1310, 1993.
- [3] Hovinga J, Boering G, Stegenga B. Long term results of nonsurgical management of condylar fractures in children [J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 1999, 28:429-440.
- [4] Defabianis P. The importance of early recognition of condylar fractures in children: a study of 2 cases [J]. *J Orofac Pain*, 2004, 18(3):253-260.
- [5] Teixeira VC, Teixeira AC, Luz JG. Skeletal changes after experimentally displaced condylar process fracture in growing rats [J]. *J Craniomaxillofac Surg*, 2006, 34(4):220-225.
- [6] 饶跃,罗颂椒,肖邦良,等. 大鼠下颌髌突生长发育的组织学和组织化学研究 [J]. *华西口腔医学杂志*, 1990, 8(1):30-33.

(收稿日期:2013-01-08 修回日期:2013-04-21)