

• 论 著 •

## 分枝杆菌快速培养鉴定及耐药性检测的结果分析\*

温贵华, 刘晋洪, 刘 婷, 陈 伊, 郭夏娜, 翁琼琳, 邱勇龙, 赖惠婷  
(广东省深圳市宝安区慢性病防治院 518133)

**摘 要:**目的 评价变色液体培养基快速一步法检测试剂对分枝杆菌培养、鉴定和药敏测定的效果。方法 采用快速变色液体培养基和传统酸性罗氏培养基对 198 例痰标本进行结核分枝杆菌检测。结果 快速变色液体培养基法和酸性罗氏培养基法, 整个试验完成平均检出时间分别为 28、62 d。与传统酸性罗氏培养基相比, 快速一步法可缩短 30~60 d 完成; 两法阳性检出率 (37.9% 和 37.4%) 与初治耐药率结果 (35.6% 和 36.9%) 之间差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。结论 变色液体培养基快速一步法是一种快速、简便、敏感性高、特异性强的结核分枝杆菌辅助诊断方法, 具有重要的应用价值。

**关键词:**分枝杆菌; 结核; 培养技术; 微生物敏感性试验

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.12.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)12-1275-02

## The analysis of identification and drug tolerance testing for Mycobacterium tuberculosis through the rapid cultivation\*

Wen Guihua, Liu Jinhong, Liu Ting, Chen Yi, Guo Xia'na, Weng Qionglin, Qiu Yonglong, Lai Huiting

(Department of Clinical Laboratory, Bao'an Chronic Diseases Prevent and Cure Hospital, Shenzhen Guangdong 518133, China)

**Abstract:** Objective To evaluate the effect of cultivation, identification and drugs susceptibility testing for Mycobacterium tuberculosis through the rapid liquid cultivation. **Methods** the rapid liquid culture mediums and Lowenstein-Jensen cultures were used to detect Mycobacterium tuberculosis in 198 sputum specimens. **Results** The rapid liquid cultures and Lowenstein-Jensen cultures were used to test 198 sputum specimens respectively, the average time of whole test were 28 and 62 days. The time of the rapid liquid cultivation for detection of Mycobacterium tuberculosis was significantly shorter than that of Lowenstein-Jensen medium about 30-60 days. The positive rates (37.9%/37.4%) and primal drug resistance rates (35.6%/36.9%) of the two methods was no significance ( $P>0.05$ ). **Conclusion** the rapid liquid cultivation is a rapid and simple method for diagnosis of tuberculosis, which shows a high specificity and sensitivity. It is a useful tool for diagnosis of Mycobacterium tuberculosis in the future.

**Key words:** mycobacterium tuberculosis; culture techniques; microbial sensitivity tests

据世界卫生组织估计, 全球结核病发病率每年仍在以 1% 的速度增长, 中国是结核病高负荷国家之一<sup>[1]</sup>。中国结核疫情和结核分枝杆菌耐药情况相当严重, 2000 年第四次全国结核病流行病学抽样调查结果表明<sup>[2]</sup>, 中国结核病死亡率为 9.8/10 万, 在中国各种死亡原因中居第 9 位, 在传染病中居第一位, 且耐药结核患者逐渐增多, 因此, 控制结核病已是当务之急。

尽管结核病的实验室诊断方法日益增多<sup>[3-4]</sup>, 包括目前尚在研究验证的环介导等温扩增法等技术<sup>[5]</sup>, 多是培养出分枝杆菌后再进行结核与非结核分枝杆菌的鉴定及结核分枝杆菌药敏检测, 如美国 BACTEC-TB 系统仪器。鉴于此, 作者采用分枝杆菌培养、结核分枝杆菌鉴定和药物敏感检测一步法完成, 改进并整合以往国内外首先进行分枝杆菌培养, 对其鉴别区分后, 最后进行药敏试验的三段式检测。旨在建立特异、敏感、价廉、可靠的分枝杆菌快速培养、鉴定及耐药性的检测方法, 从而早期发现结核病和非结核分枝杆菌感染患者, 特别是快速发现耐多药和广泛耐药的结核患者, 为指导临床合理选择抗菌剂及减少耐药性传播, 提供客观依据。现将研究结果报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 标本来源** 198 例标本来自本院 2010 年 9 月 1~10 日结核项目科门诊有慢性咳嗽、咳痰 3 周以上或有咯血等症状, 胸透有阴影的门诊初诊患者。采集的痰标本要求抗结核治疗前痰培养生长菌株, 痰涂片及痰培养工作按项目工作手册要求

进行<sup>[6-8]</sup>。

**1.1.2 分枝杆菌快速变色液体培养基** 结核分枝杆菌培养、鉴定及耐药性快速检测一步法培养基试剂盒, 其中药敏含 5 种抗菌剂: 链霉素 (streptomycin, SM)、异烟肼 (isoniazide, INH)、利福平 (rifampicine, RFP)、乙胺丁醇 (ethambutol, EMB)、氧氟沙星 (ofloxacin, OFL), 由深圳市怡百世生物技术有限公司提供。

**1.1.3 对硝基苯甲酸 (P-nitro benzoic acid, PNB) 培养基、改良酸性罗氏培养基及其药敏基** 均由深圳市慢性病防治中心病原检验科提供。其中药敏培养基有 SM、INH、RFP、EMB 4 种常规抗结核药物。

### 1.2 方法

**1.2.1 标本处理** 198 例痰标本先作痰涂片抗酸染色镜检后, 余下标本均参考两试剂盒说明书要求分别作前处理。

**1.2.2 变色液体培养基及药敏** 将前处理后的标本混匀后接种于变色液体培养基中, 再待充分混匀后, 取 200  $\mu$ L 混匀液加入微孔板 1~6 或 7~8 中, 每种药有 2 个浓度, 即 A 为低浓度, B 为高浓度。再各加入无菌液体石蜡 50  $\mu$ L, 37  $^{\circ}$ C 培养, 按试剂盒说明书要求观察颜色变化, 分析判读结果。

**1.2.3 传统酸性罗氏培养及药敏** 将前处理后的标本接种酸性罗氏培养基、PNB 鉴别培养基, 经 37  $^{\circ}$ C 培养分型后取得的结核分枝杆菌菌株作为试验株。用试验株在酸性罗氏药敏基上按常规比例浓度试验方法作 4 种常用抗结核药物敏感试验对照研究。按试剂说明书操作和判读结果。

\* 基金项目: 2010 年深圳市科技计划项目 (201003376)。

1.2.4 质量控制 全程用卡介苗菌株进行质量监控,结果在质控范围内。

1.2.5 统计学处理 采用 SPSS 统计软件进行统计分析。率的比较采用  $\chi^2$  检验进行比较分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 痰涂片结果 198 例可疑患者送痰涂片阳性检出率为 27.8%(55/198)。

2.2 痰培养结果 55 例涂片阳性患者痰两法均培养阳性,另 143 例涂片阴性患者样本在快速变色液体培养基上培养阳性 20 例,在酸性罗氏培养基上培养阳性 19 例,两法同是涂片阴性、培养阳性 19 例;即快速变色液体基培养阳性检出率为 37.9%(75/198),酸性罗氏基培养阳性检出率为 37.4%(74/198)。快速变色液体培养基和酸性罗氏培养基涂片阳性的培养阳性平均检出时间分别为 12、18 d,涂片阴性、培养阳性的平均检出时间分别为 23、31 d。本试验无污染现象。

两法涂阳培阳 55 例、涂阴培阳 19 例,共 74 例为最后筛选病例在快速变色液体培养基上和 PNB 鉴别培养基鉴定,均为结核分枝杆菌 73 例,另鉴定出 1 例为非结核分枝杆菌。

2.3 痰结核分枝杆菌药敏结果 快速变色液体培养基是一步法培养、鉴定与药敏同时进行,平均检出时间为 28 d;而酸性罗氏培养、鉴定和药敏是分步检出,最终时间平均为 62 d。快速法和罗氏法药敏结果同时耐药有 26 株,另发现有 1 株罗氏法耐 SM 和 INH,而快速法均敏感,原因有待通过增加试验例数后进行总结。一步法试剂盒中含有 5 种药,增加了药物种类耐药性检查,本文仅取其与酸性罗氏药敏试验国家常用 4 种抗结核药结果进行敏感性测试比较。本文快速法和罗氏法耐药情况显示,检出初治耐药率分别为 35.6%(26/73)和 36.9%(27/73),其中符合项目初治多药耐药要求快速法和罗氏法耐药菌株 4 株分别占 5.5%(4/73)和 5.5%(4/73)。结核分枝杆菌药敏结果见表 1。本研究结果与第四次全国结核病流行病学调查结果比较,见表 2。

表 1 结核分枝杆菌药敏试验耐药情况

| 药敏项目       | 阳性数(快/罗, n) | 阳性率(快/罗, %)   |
|------------|-------------|---------------|
| SM         | 6/6         | 23.07/22.22   |
| INH        | 4/4         | 15.39/14.81   |
| EMB        | 3/3         | 11.53/11.12   |
| RFP        | 3/3         | 11.53/11.12   |
| INH+RFP    | 3/3         | 11.53/11.12   |
| SM+INH     | 1/2         | 3.85/7.41     |
| SM+EMB     | 1/1         | 3.85/3.70     |
| SM+RFP     | 1/1         | 3.85/3.70     |
| INH+EMB    | 1/1         | 3.85/3.70     |
| EMB+RFP    | 1/1         | 3.85/3.70     |
| SM+INH+EB  | 1/1         | 3.85/3.70     |
| SM+INH+RFP | 1/1         | 3.85/3.70     |
| 合计         | 26/27       | 100.00/100.00 |

快:快速法;罗:罗氏法(下同)。

表 2 深圳市宝安区与第四次全国结核病流行病学调查结果比较

| 项目         | 深圳市宝安区(快/罗) | 全国   |
|------------|-------------|------|
| 初治耐药率(%)   | 35.6/36.9   | 18.6 |
| 初治多药耐药率(%) | 5.5/5.5     | 7.6  |

3 讨 论

分枝杆菌培养基种类很多,主要有固体培养基和液体培养基。变色液体快速培养基的可靠性研究早曾由王莉莉等<sup>[9]</sup>进行了评价。目前,传统的分枝杆菌鉴定方法相对烦琐、费时(4~8 周),影响因素多,如菌量、菌龄等,尤其是菌量控制无客观标准,重复性差。而 BACTEC-TB 系统仪器和试剂价格昂贵,难以在普通实验室广泛开展,且该系统是将分枝杆菌培养、鉴定和药敏试验分步进行。为此,本研究对分枝杆菌快速变色液体培养基系统一次完成分枝杆菌培养、鉴定和药敏试验进行了评价。

本研究结果快速变色液体培养基上和酸性罗氏培养基上 55 例涂阳患者痰均培养阳性,两法可比性好,特异性 100%;198 例痰标本培养前者阳性检出率为 37.9%(75/198),后者阳性检出率为 37.4%(74/198);两结果差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。药敏结果平均检出时间分别为 28、62 d;与传统酸性罗氏培养基相比,快速一步法可缩短 30~60 d 完成;初治耐药率分别检出为 35.6%(26/73)和 36.9%(27/73),其中符合项目初治多耐要求快速法和罗氏法耐药菌株 4 株分别占 5.5%(4/73)和 5.5%(4/73);多药耐药判断标准:对 INH 和 RFP 两种以上药物都产生耐药的结核分枝杆菌定义为多重耐药结核菌。表 1 结果说明深圳市宝安区的结核分枝杆菌初治患者对 SM、INH 较易产生耐药,需引起重视;有报道<sup>[10-11]</sup> INH 较易产生耐药与 KatGj 基因突变或缺失所致耐药有关,有待进一步研究。表 2 结果显示,深圳市宝安区的快速法和罗氏法结果之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),但均低于全国平均水平( $P < 0.05$ );可见深圳市宝安区 10 多年结控项目工作富有成效。

本地结核分枝杆菌对国家方案的几种药物的初治耐药率比全国水平高(表 2),并有逐渐向多药耐药发展的趋势(表 1),应引起足够重视。众所周知,临床治疗结核分枝杆菌病和非结核分枝杆菌感染差别颇大,许多非结核分枝杆菌对抗结核药耐药率高或呈天然耐药性,若按治疗结核病的药物和时间治疗,即患者经规则化疗而疗效依然不佳,成为所谓“难治、复治”结核患者。因此,使用快速培养诊断、快速药敏及快速用药治疗控制传染源结核分枝杆菌在人群中的播散更起着决定性作用。本文鉴定出 1 例为非结核分枝杆菌,这说明深圳地区与各地报道非结核分枝杆菌感染和发病近年来呈现上升趋势吻合<sup>[12]</sup>,应引起临床医师注意,防误诊误治。

本研究说明,快速变色液体培养法和酸性罗氏培养法结果特异性、敏感性、可比性好;前者操作比罗氏法简单,也不需要特殊设备,结果判断容易,此外可显著提高活动性结核病的诊断速度,提高结核控制的效果,对基层快速发现耐多药和广泛耐药的结核病患者,为指导临床合理选择抗菌剂,减少传播有积极作用。

参考文献

[1] 珥凤玲,王黎霞,李亮.中国全球基金耐多药结核病项目阶段性实施结果分析[J].中国防痨杂志,2010,32(11):700-704.  
[2] 刘宇红,姜广路,赵立平,等.第四次全国结核病流行病学抽样调查——结核分枝杆菌耐药性分析与评价[J].中华结核和呼吸杂志,2002,25(4):224-227.  
[3] 韩敏,乐军.结核病诊断和耐药性检测新技术[J].国际检验医学杂志,2010,31(3):260-262.  
[4] 吴雪琼,张宗德,乐军.分枝杆菌分子生物学[M].北京:人民军医出版社,2010. (下转第 1278 页)

| 表 1 不同组别 TA 检测结果 |    |             |      |               |
|------------------|----|-------------|------|---------------|
| 组别               | 精浆 |             | 睾丸组织 |               |
|                  | n  | 阳性[%(n/n)]  | n    | 阳性[%(n/n)]    |
| 阻塞性无精子症组         | 7  | 14. 29(1/7) | 7    | 71. 43(5/7)   |
| 生精功能障碍组          | 7  | 0. 00(0/7)  | 7    | 85. 71(6/7)   |
| 唯支持细胞综合征组        | 2  | 0. 00(0/2)  | 2    | 0. 00(0/2)* # |
| 少弱精子症组           | 7  | 14. 29(1/7) | 7    | 71. 43(5/7)   |
| 对照组              | 7  | 28. 57(2/7) | 2    | 100. 00(2/2)  |

\* : $P<0.05$ ,与对照组相同类型标本 TA 检测阳性率比较;# : $P<0.05$ ,与少弱精子症组相同类型标本 TA 检测阳性率比较。

### 3 讨 论

端粒酶长度及活性在生精细胞分化与增殖的各个阶段各不相同,从精原细胞到精子的成熟过程中,TA 不断下降,端粒酶长度不断增加,二者间呈负相关;在成熟精子细胞和精子中,TA 完全丧失。随着端粒酶检测技术的发展,深入研究端粒酶在男性生殖生理及病理学意义已成为可能,有助于探讨激素及其他药物治疗的端粒酶机制,也使端粒酶技术成为诊断及治疗男性生殖疾病的重要手段之一。本研究探讨了 TA 与少弱精子症的关系,以期在基因水平探寻少弱精子症的发病机制,为少弱精子症的临床诊治提供新的研究方向和理论依据。

本研究显示,阻塞性无精子症组和生精功能障碍组睾丸组织 TA 阳性率分别为 71. 43% 和 85. 71%,与国外研究报道结果基本一致<sup>[7]</sup>;唯支持细胞综合征组未检出 TA,国内外研究结果一致<sup>[8-10]</sup>。无生精细胞的唯支持细胞综合征患者睾丸组织中未检出 TA,提示生精细胞可能是 TA 的主要来源,说明 TA 是反映精子发生的高敏感和高特异标志。少弱精子症组与其他各组精浆 TA 检出阳性率比较差异无统计学意义,且少弱精子症组阳性率仅为 14. 29%,证实精子中 TA 表达受抑,与 Yamamoto 等<sup>[11]</sup>的研究结论一致。笔者认为,在精子发生过程中,TA 的表达水平呈下降趋势,在精子形成后,成熟精子中无 TA 表达;而少弱精子症患者的发病可能与 TA 的异常无关。少弱精子症组睾丸组织 TA 阳性率为 71. 43%,与无生精细胞的唯支持细胞综合征组比较差异有统计学意义。少弱精子症患者睾丸组织 TA 的高低受生殖细胞发育所停滞的阶段及各级生殖细胞的数量影响。在精子形成前阶段,少弱精子症的发病与端粒酶有关,TA 的缺乏可能是生殖细胞发育停滞的原因之一,但是不是其发病的决定性因素有待进一步探索。睾丸组织的 TA 是反映精子形成的高敏感和高特异标记物。随着精子细胞的分化,TA 减弱,但对于在精子形成的哪一期 TA 停止表达仍不清楚。在精子细胞分化过程中 TA 的调节作用仍不确定。

关于 TA 与少弱精症子症的关系仍有不明确之处,例如 TA 是否为少弱精子症发病的决定性因素? 精子的发生和成熟过程非常复杂,其影响因素和作用机制尚未完全明确,少弱精子症的发生可能是多因素综合影响的结果。从少弱精子症患者睾丸组织中纯化各级精原细胞以定量分析 TA,对了解 TA 对疾病的影响及作用机制具有重大价值。通过调节 TA 以干预精子的发生和成熟还有待更为深入的研究。

本研究表明,睾丸组织的 TA 是反映精子形成的高敏感和高特异标记物;健康者和少弱精子症患者精子的 TA 表达程度较低。

### 参考文献

[1] Kim N, Piatyszek M, Prowse K, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer[J]. Science, 1994, 266(5193): 2011-2015.

[2] Blackburn EH. Structure and function of telomeres[J]. Nature, 1991, 350(6319): 569-573.

[3] Wiener HG, Mian C, Haitel A, et al. Can urine bound diagnostic tests replace cystoscopy in the management of bladder cancer[J]. J Urol, 1997, 159(6): 1876-1880.

[4] Fujisawa M, Yoshida S, Matsumoto O, et al. Deoxyribonucleic acid polymerase activity in the testes of infertile men with varicocele [J]. Fertil Steril, 1988, 50(5): 795-800.

[5] Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer [J]. Eur J Cancer, 1997, 33(5): 787-791.

[6] Hiyama E, Gollahon L, Kataoka T, et al. Telomerase activity in human breast tumors[J]. J Natl Cancer Inst, 1996, 88(2): 116-122.

[7] Martín-Rivera L, Herrera E, Albar J, et al. Expression of mouse telomerase catalytic subunit in embryos and adult tissues[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(18): 10471-10476.

[8] Schrader M, Müller M, Heicapell R, et al. Telomerase activity and expression of telomerase subunits in the testicular tissue of infertile patients[J]. Fertil Steril, 2000, 73(4): 706-711.

[9] Fujisawa M, Tanaka H, Tatsumi N, et al. Telomerase activity in the testis of infertile patients with selected causes[J]. Hum Reprod, 1998, 13(6): 1476-1479.

[10] 叶哲伟, 陈晓春, 范民, 等. 男性不育症患者睾丸组织中端粒酶 RNA 表达状况的研究[J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2003, 32(1): 58-61.

[11] Yamamoto Y, Sofikitis N, Ono K, et al. Postmeiotic modifications of spermatogenic cells are accompanied by inhibition of telomerase activity[J]. Urol Res, 1999, 27(5): 336-345.

(收稿日期: 2011-05-05)

(上接第 1276 页)

[5] 李鹏, 马艳娇, 夏伟, 等. 环介导等温扩增在病原诊断中应用[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(3): 343-344.

[6] 卫生部结核病控制中心. 痰涂片镜检标准化操作及质量保证手册[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2009: 7-14.

[7] 丛玉隆, 尹一兵, 陈瑜. 检验医学高级教程(下册)[M]. 北京: 人民军医出版社, 2010: 992-995.

[8] 刘小立, 冯铁建, 杨应周. 慢性病防治工作规范[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 243-245.

[9] 王莉莉, 张莹蓉, 胡忠义. 分枝杆菌快速变色培养基应用初探[J].

中华结核和呼吸杂志, 2001, 24(8): 460-461.

[10] 黄阿莉, 李卉. 快速检测结核分枝杆菌对异烟肼的耐药性的临床应用[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(3): 294-295.

[11] 管记涌, 王嫩寒, 易俊莉, 等. MTBDR plus 方法快速检测北京地区临床结核分枝杆菌分离株利福平和异烟肼耐药性效果评价[J]. 中国防痨杂志, 2010, 32(10): 611-614.

[12] 孙勤, 沙巍. 非结核分枝杆菌肺病与肺结核患者的临床特征对比分析[J]. 中国防痨杂志, 2011, 33(2): 120-122.

(收稿日期: 2011-05-04)