

· 实验研究 ·

硝酸盐还原试验快速检测分离株和痰标本
结核分枝杆菌的耐药性

刘忠泉 李传友 陈效友 陈羲 马琦

【摘要】 目的 建立一种快速结核分枝杆菌耐药性试验方法。方法 以绝对浓度法为“金标准”,对已知耐药浓度的耐药结核分枝杆菌菌株及敏感株采用硝酸盐还原试验检测其对利福平和异烟肼的耐药性。同时用抗酸染色阳性的痰标本经常规处理后进行硝酸盐还原试验。结果 结核分枝杆菌分离株两种方法可比性好,与绝对浓度法比较,硝酸盐还原试验敏感性为96.5%以上,特异性100%;该方法比传统绝对浓度法平均提前3周有结果;硝酸盐还原法的平行试验表明,试验重复性好,符合率为100%。痰标本硝酸盐还原试验在第10-20天能有结果,与痰标本罗氏培养后的分离株的绝对浓度法比较,硝酸盐还原试验敏感性为66.7%以上,特异性100%。结论 硝酸盐还原试验可作为快速结核分枝杆菌耐药性试验方法。

【关键词】 结核分枝杆菌;硝酸盐还原酶类;微生物敏感性试验

Rapid testing on drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* with nitrate reductase assay LIU Zhong-quan, LI Chuan-you, CHEN Xiao-you, CHEN Xi, MA Yu. Department of Bacteriology and Immunology, Beijing Tuberculosis and Thoracic Tumor Research Institute, Beijing 101149, China

【Abstract】 Objective To establish a rapid method for testing drug susceptibility on *Mycobacterium tuberculosis*. **Methods** Taking absolute Concentration method for drug susceptibility testing of *M. tuberculosis* as the “gold standard”, we examined the drug-resistant of *M. tuberculosis* strain with nitrate reductase assay (NRA) and the drug-resistant of *M. tuberculosis* germ in sputum with NRA. **Results** NRA and absolute concentration method was basically comparable with NRA susceptibility as 96.5% and the specificity was 100%. When comparing with traditional absolute concentration method, NRA could shorten the time about 3 weeks. Using NRA to test the drug-resistant of *M. tuberculosis* germ in sputum, its susceptibility was more than 66.7% and specificity was 100%, within 10-20 days. **Conclusion** NRA could be used as a rapid drug susceptibility testing on *M. tuberculosis*.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; Nitrate reductases; Microbial sensitivity tests

随着化疗药物的临床应用,结核病在全球范围内得到了有效的控制,但是近年来由于滥用药物或不规范用药,使得全球耐药多药结核病形势日趋严峻。美国疾病预防控制中心(CDC)建议控制结核病必须建立迅速、准确的结核分枝杆菌药物敏感试验^[1]。因此本研究采用硝酸盐还原酶试验技术检测结核分枝杆菌耐药性^[2-5];探索一种快速、经济、简便的结核分枝杆菌药物敏感性检测方法。

材料与方 法

1. 材料:①菌株:共收集结核分枝杆菌分离株172株。即结核菌绝对浓度法耐药株150株[其中

50株为同时耐利福平(RFP)和异烟肼(INH)的双耐药株]和结核菌绝对浓度法敏感株22株。所有标本均由安徽省肺科医院和广州市胸科医院提供。痰标本:结核病患者抗酸染色阳性痰液标本100份,由国家参比实验室提供。②抗结核药物:RFP,批号9910008,纯度93.00%;INH,批号990820,纯度99.37%。③罗氏培养基和含硝酸盐及同时含不同浓度RFP、INH的改良罗氏培养基配制:培养基中硝酸钾含量为1mg/L,RFP、INH浓度按中国防痨协会的规定执行^[6]。④显色剂:0.2%磺胺,0.1%n-1-萘基乙二胺盐酸盐(北京化学试剂公司产品),50%盐酸;上述3种试剂按2:2:1比例实验前临时配制。⑤锌(Zn)粉。

2. 方法:

(1) 结核分枝杆菌对 RFP (50 μg/ml, 250 μg/ml) 和 INH (1 μg/ml, 10 μg/ml) 的耐药性检测, 用绝对浓度法: 按中国防痨协会规程操作^[6]。

(2) 硝酸盐还原试验检测结核分枝杆菌的耐药性: 参照 Angeby 等^[3] 建立的方法, 作适当修改。取待测细菌, 磨菌, PBS 溶解。麦氏管比浊配成 10~20 mg/ml 细菌原液。取 300 μl 原液于另一灭菌试管中 5 倍稀释。取不含抗生素的硝酸钾罗氏培养基控制管 3 支, 接种 0.1 ml 稀释菌液于控制管中; 取含不同抗生素的硝酸钾罗氏培养基管, 每种管取 2 支, 接种 0.1 ml 原液于各抗生素管中。37℃ 培养 7 d 后, 取 1 支控制管加入 0.5 ml 显色剂: ① 控制管内液体如变为红色, 则为阳性, 或者阴性 (无色) 加 Zn 粉后仍为阴性, 也表示为阳性, 则各抗生素管加 0.5 ml 显色剂, 阳性的记录结果; 阴性的则需加入 Zn 粉, 如仍为阴性, 归阳性结果, 表明耐药; 阴性的加入 Zn 粉如变为阳性, 才为阴性结果, 表明对药物敏感。② 若控制管内液体为无色, 则需加入 Zn 粉, 如果变为阳性, 才表示控制管为阴性, 继续培养。在第 10 和 14 天后分别取另一支控制管加入显色剂, 重复以上 ①、② 步骤操作; 如控制管仍为阴性, 放弃此批试验。

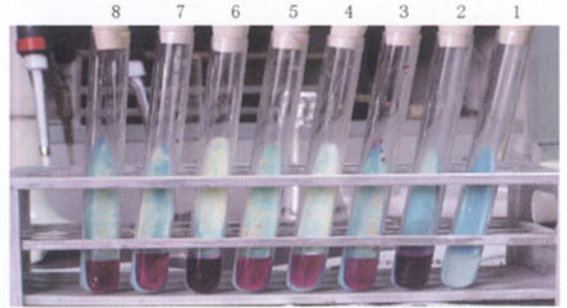
(3) 痰标本按常规方法处理后, 各取 100 μl 分别接种于罗氏培养基和含硝酸盐及同时含不同浓度 RFP、INH 的改良罗氏培养基中, 且接种 PNB、TCH 管各 1 支。罗氏培养阳性分离株进行绝对浓度法耐药性检测; 硝酸盐还原试验分别在第 7、10 和 20 天显色。

3. 统计学分析: 采用校正 χ^2 检验计算 P 值。

结 果

1. 硝酸盐还原试验和绝对浓度法检测结核分枝杆菌分离株耐 RFP、INH 结果比较: 两种方法同时检测了结核分枝杆菌 22 株敏感株、34 株耐 RFP (50 μg/ml)、78 株耐 RFP (250 μg/ml)、59 株耐 INH (1 μg/ml)、29 株耐 INH (10 μg/ml) 菌株。结果表明, 22 株敏感株在含低浓度、高浓度 RFP 和 INH 的培养基中两种方法均不生长, 特异性为 100%; 34 株耐 RFP (50 μg/ml) 两种方法检测全部显示为耐药, 敏感性为 100%; 78 株耐 RFP (250 μg/ml) 中有 2 株硝酸盐还原方法检测显示为敏感, 敏感性为 97.4%; 59 株耐 INH (1 μg/ml) 中有 2 株硝酸盐还原方法检测显示为敏感, 敏感性为 96.6%; 29 株耐 INH (10 μg/ml) 中有 1 株硝酸盐还原方法检测显示为敏

感, 敏感性为 96.5% (图 1、表 1)。在 150 株耐药株和 22 株敏感株中重复硝酸盐还原方法, 两次试验完全符合, 符合率为 100%。



注: 1: 敏感株; 2~8: 耐药株

图 1 结核分枝杆菌耐药株、敏感株硝酸盐还原试验检测结果

表 1 结核分枝杆菌分离株药敏对照试验

抗生素 (μg/ml)	绝对浓度法	变色培养法		灵敏度 (%)	特异性 (%)	χ^2 值
		耐药	敏感			
RFP(50)	耐药	34	0	100.0	100.0	0 ^a
	敏感	0	22			
RFP(250)	耐药	76	2	97.4	100.0	2 ^a
	敏感	0	22			
INH(1)	耐药	57	2	96.6	100.0	2 ^a
	敏感	0	22			
INH(10)	耐药	28	1	96.5	100.0	1 ^a
	敏感	0	22			

注: ^a P > 0.05

2. 痰标本硝酸盐还原试验法和罗氏培养后的分离株绝对浓度法检测结核菌耐 RFP、INH 结果比较 (表 2): 两种方法培养了 100 份痰标本, 其中 22 份标本在硝酸盐还原试验中因控制管在培养的第 14 天仍为阴性而放弃了此批试验, 且这 22 份标本罗氏培养也为阴性。另外 78 份标本两种方法的控制管培养均为阳性, 因此取 78 份的结果分析, 痰标本罗氏培养后的分离株经绝对浓度法检测对 RFP 和 INH 敏感的结核菌, 硝酸盐还原试验均显示为敏感 (特异性 100%); 但绝对浓度法对 RFP 低耐的 14 株中, 硝酸盐还原试验有 2 株显示敏感, 敏感性为 85.7%; 绝对浓度法对 RFP 高耐药的 4 株中, 硝酸盐还原试验有 1 株显示敏感, 敏感性为 75.0%; 绝对浓度法对 INH 低耐的 12 株中, 硝酸盐还原试验有 4 株显示敏感, 敏感性为 66.7%; 绝对浓度法对 INH 高耐药的 2 株中, 硝酸盐还原试验均显示耐药, 敏感性为 100% (表 2)。

表2 痰标本两种试验方法后的结核分枝杆菌药敏检测结果

抗生素 ($\mu\text{g/ml}$)	绝对 浓度法	变色培养法		灵敏度 (%)	特异性 (%)	χ^2 值
		耐药	敏感			
RFP(50)	耐药	12	2	85.7	100.0	2 ^a
	敏感	0	64			
RFP(250)	耐药	3	1	75.0	100.0	1 ^a
	敏感	0	74			
INH(1)	耐药	8	4	66.7	100.0	4 ^b
	敏感	0	66			
INH(10)	耐药	2	0	100.0	100.0	0 ^a
	敏感	0	76			

注: ^a $P > 0.05$; ^b $0.025 < P < 0.05$

讨 论

绝对浓度法为传统的结核分枝杆菌药敏试验方法,在我国自 1963 年推广使用以来,几经修改,一直作为常规药敏方法,具有很好的代表性。本研究用绝对浓度法作为“金标准”,探讨变色培养药敏方法的可行性。结果表明:变色培养法对耐 RFP 和 INH 的特异性都达到了 100%,灵敏度分别为对 RFP 低耐为 100%、高耐为 97.4%,对 INH 低耐为 96.6%、高耐为 96.4%。经校正 χ^2 检验两试验差异无统计学意义($P > 0.05$),两方法试验结果具有一致性。所有结果均在第 7 天观察到。阴性管中加入 Zn 粉,显颜色,表明无亚硝酸盐分解为氮氧化物,即无假阴性结果。150 份绝对浓度法为耐药的菌株和 22 份绝对浓度法为敏感的菌株,在硝酸盐还原试验平行的两次试验中,表明硝酸盐还原试验重复结果稳定,两次试验符合率为 100%。与国外文献比较具有一致性^[3]。

研究中的 172 个菌株绝对浓度法在第 4 周以后才能观察到结果,变色培养法均在第 7 天观察到结果。可见变色培养法比绝对浓度法早 3 周以上观察到结果。与国外文献报道一致^[3]。本试验是利用大多数结核分枝杆菌(99%)生长过程中产生的活性硝酸盐还原酶能分解硝酸盐的特点而设计的,通过显色检测其还原产物亚硝酸盐来判断待测结核分枝杆菌菌株在含药培养基中的生长情况。据文献报道^[3,4],有 <1% 的结核分枝杆菌如牛型结核分枝杆菌不分解硝酸盐。本试验中有 1 例因控制管阴性而认为无效后放弃,究竟是不产硝酸盐还原酶型结核分枝杆菌还是菌量过少的原故,有待做菌种鉴定。结核分枝杆菌分解硝酸盐为亚硝酸盐,同时亚硝酸盐也能继续分解为氮氧化物^[4]。因此在阴性管中必

须加 Zn 粉以校正其结果,但本试验无一例生成了氮氧化物,可以肯定至少前 7 d 亚硝酸盐不会分解成氮氧化物。

痰标本直接做结核菌的药敏试验,在国内鲜见报道。本试验作为初步尝试,希望对结核菌的耐药试验方法有所补充。试验结果显示,痰标本硝酸盐还原试验法和痰标本罗氏培养后的分离株绝对浓度法比较,两种方法均差异无统计学意义($P > 0.025$),结果有一致性。在 100 份痰标本中有 22 份罗氏培养和硝酸盐培养中的控制管均为阴性,78 份硝酸盐培养中控制管和罗氏培养均为阳性,可见痰标本在硝酸盐方法培养中和罗氏培养中具有完全一致的阳性率。因此,硝酸盐还原试验中,控制管在第 20 天仍为阴性的痰标本,可以放弃此批试验。

从结果来看,痰标本罗氏培养后的分离株绝对浓度法的结核菌耐药率要比痰标本硝酸盐还原试验法的结核菌耐药率稍高,但差异无统计学意义($P > 0.025$)。本次试验中,绝对浓度法检测出 14 株对 RFP 耐药,而硝酸盐还原法为 12 株对 RFP 耐药;绝对浓度法检测出 12 株对 INH 耐药,而硝酸盐还原法为 8 株对 INH 耐药。可能为耐药结核菌在药敏管中生长缓慢,产生的亚硝酸盐量少,不足以使显色剂显色的原故。所以,笔者认为在进行硝酸盐还原法试验时,控制管阳性后,可适当延长药敏管的培养时间,以增加结核菌分解硝酸盐为亚硝酸盐的量。总之,变色培养法是一种迅速、廉价、方便的结核分枝杆菌药物敏感试验方法,但在应用于临床之前,此种方法的准确性和重复性还需要更进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] World Health Organization. The WHO/IUATLD global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance. Anti-tuberculosis drug resistance in the world, report no. 2: prevalence and trends. WHO, Geneva, Switzerland, 2000.
- [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——结核分支杆菌耐药性分析与评价.中华结核与呼吸杂志, 2002, 25(4):224-227.
- [3] Angeby KAK, Klintz L, Hoffner SE. Rapid and inexpensive drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* with a nitrate reductase assay. J Clin Microbiol, 2002, 40(2):553-555.
- [4] Warren NG, Body BA, Dalton HP. An improved reagent for mycobacterial nitrate reductase tests. J Clin Microbiol, 1983, 18(3):546-549.
- [5] Panaiotov S, Kantardjiev T. Nitrate reductase assay for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol, 2002, 40(10):3881-3882.
- [6] 中国防痨协会. 结核病诊断细菌学检验规程, 1995.

(收稿日期:2006-12-21)

(本文编辑:尹廉)