

MPT64 检测作为结核分枝杆菌生长指标的研究

尹小毛, 刘志辉*

摘要:目的 分析把检测 MPT64 作为结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)生长指标的可行性。方法 对 MTB 阳性液体培养物进行 MPT64 检测, 分析其作为 MTB 生长指标的有效性; 对不同稀释浓度(1mg/ml、0.1mg/ml、0.01mg/ml 和 0.001mg/ml) 的 MTB 阳性液体培养物进行 MPT64 检测, 分析该项检测的指示最低限; 对不同放置时间(10d、30d、60d)的 MTB 阳性液体培养物进行 MPT64 检测, 分析指示的稳定性。结果 20 份 MTB 阳性液体培养物的 MPT64 检测均阳性, 该项检测能 100%有效指示 MTB 的生长; 3 份 MTB 阳性液体培养物 1mg/ml、0.1mg/ml、0.01mg/ml 稀释浓度的 MPT64 检测均阳性, 其中 2 份 MTB 阳性液体培养物 0.001mg/ml 稀释浓度的 MPT64 检测阳性, 而另 1 份则检测阴性, 该项检测的指示最低限为 0.01mg/ml; 10 份 MTB 阳性液体培养物放置 30d、60d 后 MPT64 检测均为阳性, 该项检测用于指示 MTB 生长具有很好的稳定性。结论 MPT64 检测可作为 MTB 生长的一种指示手段。

关键词: MPT64; 结核分枝杆菌; 指示物

中图分类号: R521 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-9727(2011)11-1313-02

Development of a novel method for indicating growth of *Mycobacterium tuberculosis* by detecting MPT64. YIN Xiao-mao, LIU Zhi-hui. (Guangzhou Chest Hospital, Guangzhou 510095, P. R. China)

Abstract Objective To develop a novel method for indicating growth of MTB (*Mycobacterium tuberculosis*) by detecting MPT64. **Methods** Effectiveness, down limitation and stability of this method were analyzed respectively by detecting MPT64 of positive culture of different-concentration dilution of different-time preserved culture. **Results** All 20 positive fluid cultures of MTB were successfully conformed by detecting MPT64 and effectiveness of this method was 100%. All dilutions (1mg/ml, 0.1mg/ml, 0.01mg/ml and 0.001mg/ml) of 2 positive fluid culture were positive when MPT64 was detected. Three dilutions (1mg/ml, 0.1mg/ml and 0.01mg/ml) were positive for 1 positive fluid culture, so down limitation was 0.01mg/ml. MPT 64 detection was still positive for all 10 positive fluid cultures after 30-day preservation and 60-day preservation. **Conclusion** Detection of MPT64 could be used for indicating growth of MTB.

Key words: MPT64; *Mycobacterium tuberculosis*; Indicator

目前, 结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)的生长指示手段有多种, 常见的有菌落直接观察、噬菌体裂解试验和代谢反应检测等。菌落直接观察是一种传统生长指示手段, 包括肉眼观察和显微镜观察两种方式, 其缺点主要是灵敏度低、耗时长。噬菌体裂解试验应用特异的噬菌体侵噬 MTB, 由于噬菌体只能感染活菌, 因而溶菌现象可间接指示 MTB 的生长, 该指示手段的主要缺点是准确性差。代谢反应检测通过检测 MTB 生长过程中某些代谢物的增加或减少来间接反映 MTB 的生长情况, 如 BACTEC 460 系统通过检测 CO₂ 的增加来指示 MTB 的生长、BACTEC 960 系统通过监测 O₂ 的含量来判断 MTB 是否生长、传统生化鉴定试验通过尿素酶的产生鉴定 MTB 等。其中 BACTEC 460 和 BACTEC 960 系统因成本高难以在基层实验室推广, 其它代谢反应检测虽然成本较低, 但操作繁琐, 同时也存在灵敏度低、耗时长的缺点。由于现有各种指示手段的不足, 寻找新的性能更佳的 MTB 生长指示手段显得十分必要。MPT64 是 MTB 生长早中期分泌的一种特异性蛋白, 又被称为 MPB64^[1], 广义上也属于 MTB 生长过程中的代谢产物, 因此通过检测 MPT64 的产生可间接反映 MTB 的生长情况, 对此

我们进行了初步研究, 结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 20 株 MTB 临床株分离自我院肺结核患者的痰液或支气管肺泡灌洗液, 分离培养采用罗氏培养基或 BACTEC MGIT 960 快速培养系统; 所有菌株经传统生化和分子生物学相结合的方法鉴定为 MTB, 转种罗氏培养基后取生长良好的菌落用于 M7H9 液体培养基的转种培养。

1.1.2 主要试剂 M7H9 琼脂粉和 OADC 购自美国 BD 公司, MPT64 检测试剂盒购自杭州创新生物检控技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 M7H9 液体培养基的配制 称取 4.6g M7H9 琼脂粉于锥形瓶中, 加入 900ml 蒸馏水和 2ml 甘油后混匀并置 121℃灭菌 15min; 待锥形瓶温度降至 50℃左右后加入 OADC100ml 并混匀, 然后将培养液分装至无菌培养管中, 每管加入培养液 10ml。分装好的 M7H9 液体培养基于室温放置 3d 后观察有无杂菌生长, 培养基无杂菌污染才用于 MTB 的培养。

1.2.2 MTB 的转种培养 用接种环挑取固体培养基上生长的

基金项目: 广州市医药卫生科技项目(No.2009-YB-101)

作者单位: 广州市胸科医院, 广东 广州 510095

作者简介: 尹小毛, 免疫学硕士, 研究方向: 微生物耐药机制研究。

* 通讯作者 E-mail: lunwentongxun@163.com

MTB 菌落 2~3 个,用生理盐水制成菌悬液后转移至 50ml 离心管中,5 000rpm 离心 15min 后弃上清,加入 50ml 生理盐水后振荡混匀,再于 5 000rpm 离心 15min 后弃上清,用 50ml 生理盐水重复洗涤一次,将沉淀用适量生理盐水配置成 1 麦氏浊度的菌悬液,吸取 0.5ml 菌悬液于 M7H9 液体培养基中,混匀后置 37℃ 孵育箱培养,分别于培养 10d、20d、30d 时观察生长情况。此外,用未加入菌悬液的培养基作为生长阴性对照。

1.2.3 MPT64 的检测 采用胶体金法检测标本中的 MPT64,标记的抗体为抗 MPT64 单克隆抗体。取标本 100μl 加入检测板的样本孔内,室温放置 15~25min 后观察结果。

1.2.4 指示有效性试验 将 MTB 临床株转种 M7H9 液体培养基后,立即从每支培养基(包括 20 支加入菌悬液的接种培养基和 1 支未加菌悬液的生长阴性对照培养基)中取 100μl 液体用于 MPT64 检测,转种 10d 后将 MTB 培养阳性的 20 支 M7H9 液体培养基和 1 支对照培养基轻微摇动数次,取 100μl 培养物进行 MPT64 检测。

1.2.5 指示最低限试验 转种 10d 后随机抽取 3 份 MTB 阳性培养物,从每支培养基中各取 1ml 培养液用无菌蒸馏水进行稀释,均配制成 1mg/ml(相当于 1 麦氏浊度)、0.1mg/ml、0.01mg/ml 和 0.001mg/ml 四种稀释液,然后对各稀释液进行 MPT64 检测。

1.2.6 指示稳定性试验 转种 10d 后,从试验的 20 份标本中随机选取 10 份用于指示稳定性试验;将 10 份 MTB 培养阳性培养物放置 30d、60d 后分别进行 MPT64 检测。

2 结果

2.1 MTB 的转种培养 20 株 MTB 临床株转种 10d 后可见培养液浊度增加,但未见明显颗粒,培养 20d 后浊度显著增加,并可见明显颗粒,培养 30d 后培养液中可见大量颗粒,经抗酸涂片观察可见大量抗酸杆菌。阴性对照培养 10d、20d、30d 后均未见培养液浊度增加,抗酸涂片观察未见抗酸杆菌。

2.2 指示有效性试验 刚转种时所有培养基(包括 20 支加入菌悬液的接种培养基和 1 支未加菌悬液的生长阴性对照培养基)的 MPT64 检测结果均为阴性,转种 10d 后 20 份 MTB 阳性液体培养物的 MPT64 检测均阳性,而对照培养基仍为阴性,该项检测指示 MTB 生长的有效性为 100%。

2.3 指示最低限试验 3 份 MTB 阳性液体培养物 1mg/ml、0.1mg/ml、0.01mg/ml 稀释浓度的 MPT64 检测均阳性,其中 2 份 MTB 阳性液体培养物 0.001mg/ml 稀释浓度的 MPT64 检测阳性,而另 1 份则检测阴性,该项检测的指示最低限为 0.01mg/ml。

2.4 指示稳定性试验 10 份 MTB 阳性液体培养物放置 10d、30d、60d 后的 MPT64 检测结果均为阳性,该项检测用于指示 MTB 生长具有很好的稳定性。

3 讨论

MPT64 作为一种 MTB 特异性分泌的蛋白,可使结核病患者和结核菌素阳性者产生 T 细胞反应和皮肤延迟性超敏反应。它由 RD2 区基因编码,相对分子量为 24 000,是 MTB 早期培养滤液中的主要成分,属结核分枝杆菌复合群特异性抗原,只有 MTB、牛分枝杆菌和某些 BCG 菌株产生^[2]。应用重组 MPT64 免疫动物后再通过杂交瘤细胞技术可制备抗 MPT64 的单克隆抗

体,近年来该单克隆抗体已被广泛用于 MTB 的病原研究、细胞介导免疫研究和结核病诊断研究等方面^[3]。目前采用上述单克隆抗体作为胶体金标记抗体开发的 MTB 抗原检测试剂盒已面世^[4-5],该试剂盒可快速简便地检测各种液体标本中的 MPT64,具有很好的灵敏度和特异性,本研究尝试应用该试剂盒检测培养过程中 MPT64 的产生来间接指示 MTB 的生长,从而为进一步将此指示手段用于 MTB 的培养和药敏试验奠定基础。

由于采用固体培养基上 MTB 菌落直接制成的菌悬液已有 MPT64 存在,因此我们在进行指示有效性试验时对菌悬液进行离心洗涤,去除其中原有的 MPT64,从而能够准确反映菌株生长前后 MPT64 的变化。本研究共对 20 份 MTB 阳性液体培养物进行了 MPT64 检测,所有标本均呈阳性,而刚转种时所有培养基的 MPT64 检测结果均为阴性,因此 MPT64 检测能够 100%有效地指示 MTB 的生长,有效性与其它指示手段一致。指示最低限试验发现 MPT64 检测能够指示的最低菌液浓度为 0.01mg/ml,而通常肉眼见到固体培养基有菌落时,刮取所有菌落于 10ml 生理盐水中配制的菌悬液浓度已远远高于 0.01mg/ml,因此 MPT64 检测指示的最低限高于菌落直接观察方法,因为缺乏噬菌体裂解试验和代谢反应检测指示最低浓度的相关资料,所以在此不进行比较。MTB 培养阳性培养物放置 30d、60d 后,其 MPT64 检测仍为阳性,因此 MPT64 检测作为指示手段最低可持续至 60d;而菌落直接观察却限于固体培养基的保存条件和保存时间,一般也只能持续几个月,噬菌体裂解试验必须在严格规定的时间内观察结果,否则指示结果会有很大的误差,因而其稳定性较差,BACTEC 460 和 BACTEC 960 系统虽然也能在较长时间内保证指示结果的稳定性,但当培养管反复用于其它试验操作后,因空气被带入而造成仪器指示不正确。

综上所述,MPT64 检测作为 MTB 生长的指示手段具有较好的有效性、最低限和稳定性;与菌落直接观察、噬菌体裂解试验和代谢反应检测等指示手段相比,该指示手段在操作、耗时、成本和准确性的综合评价方面更具优势,不失为一种适于基层推广的好方法。

参考文献:

- [1] Abe C, Hirano K, Tomiyama T. Simple and rapid identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by immunochromatographic assay using anti-MPB64 monoclonal antibodies [J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(11): 3693-3697.
- [2] 何霞,谭守勇,刘志辉,等.应用 MPT64 为靶标快速检测结核分枝杆菌生长的研究[J].广东医学,2010,31(2): 222-224.
- [3] 吴雪琼,张俊仙,李洪敏,等.结核分枝杆菌 MPT64 蛋白的表达、纯化及初步应用[J].中国防痨杂志,2001,23(2): 85-89.
- [4] Hasegawa N, Miura T, Ishi K, et al. New simple and rapid test for culture confirmation of *Mycobacterium tuberculosis* complex: a multicenter study[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(3): 908-912.
- [5] 何霞,谭守勇,蔡杏珊,等.应用 MPB64 单克隆抗体检测液体培养基中结核分枝杆菌的初步研究[J].国际医药卫生导报,2007,13(18): 14-16.

收稿日期:2011-08-23 编辑:崔宜庆