

从肺结核病人分离的耐药结核菌致病力的研究

庄玉辉 张 寅 张晓刚 李国利

(解放军 309 医院结核病研究室,北京)

摘要 本文测定了从复治肺结核病人痰标本中分离的 3 株耐药结核菌(耐 R 株、耐 R + K 株和耐 R + S + H 株)对豚鼠的致病力,其结果与对照株(H₃₇RV 和结核菌敏感株)基本相似,毒力无明显变化。5 株菌的 6 周总致病指数分别为 75.2、72.0、71.1、72.6 和 73.3, F 值是 0.15。毒力根指数分别是 1.33、1.39、1.39、1.41 和 1.36, F 值是 0.27。3 株菌经血行播散到豚鼠肺、肝、脾等脏器内,均有形成菌血症的能力。

关键词 结核杆菌;耐药菌株;致病力

目前结核病化疗中一个突出的问题,是病人对大多数抗痨药物原发耐药和继发耐药较为严重。耐药结核菌的致病力是否降低或丧失,是肺结核病防治工作急待解决的课题。对此,国内外研究者作了大量工作,但结果不一,看法各异,多数认为耐异烟肼(INH)结核菌的致病力降低^[1]。耐链霉素(SM)或对氨基水杨酸(PAS)的结核菌与敏感株之间没有差别^[2]。对豚鼠的致病力耐 SM 菌株反比敏感株增高^[3]。对耐利福平(RFP)及耐 2 种或 3 种药物的结核菌,尤其是临床分离株,它们的致病力国外报道较少。本文检测了从结核病人痰标本中分离出的 3 株 3 种类型耐药结核菌,对豚鼠的致病力,其结果如下。

材 料 和 方 法

(一) 供试菌株及来源

1. 临床分离株: 3 株耐药结核菌分离自复治肺结核病人痰标本,经全国结核病细菌检验标准化规程鉴定,药敏试验结果是:耐 R 株[即耐利福平(RFP)250 γ /ml 以上];耐 R + K 株[即耐利福平 250 γ /ml + 卡那霉素(KM)100 γ /ml]和耐 R + S + H 株[即耐利福平 250 γ /ml + 链霉素(SM)100 γ /ml + 异烟肼(INH)10 γ /ml 以上]。

2. 对照株: 标准人型结核菌 H₃₇RV 由中国药品生物制品检定所提供,经小白鼠传代。结核菌敏感株由初治肺结核病人痰标本分离。

(二) 实验动物及分组

豚鼠购自军事医学科学院动物试验场。杂色种,体重 300—350g,选用 5 单位 PPD 皮试阴性的健康豚鼠。每株结核菌感染 10 只豚鼠,随机分 5 组。每组豚鼠被感染后 6 和 12 周各解剖 5 只(雌 3 雄 2,包括活杀和特异性死亡)。3—6 周死亡的按 6 周计,7—12 周死亡的按 12 周计,2 周内死亡的为非特异性死亡,不计数。

(三) 菌悬液制备及感染途径

将供试菌接种在改良罗氏培养基上,37℃ 培养 3 周,取菌苔称重,加生理盐水磨匀制成浓度为 1mg/ml 的菌悬液,每只豚鼠腹腔内注射 0.2ml (相当 0.2 mg 菌湿重),内含活菌数即实际感染剂量。

(四) 观察指标

1. 致病指数: 按 Mitchison 等^[4]报道的计分法计算。

2. 毒力根指数: 按 Mitchison 等^[4]的公式计算。

$$\text{毒力根指数} = \sqrt{\frac{\text{致病指数}}{\text{活杀或死亡时间(天)}}}$$

3. 脏器活菌定量培养: 豚鼠解剖后取肺、脾及肝各 1g,研磨成匀浆,按设计要求加生理盐水 10 倍级稀释至适宜的浓度。每一种脏器做 2 个稀释度(10⁻²,10⁻⁵),取脏器稀释液 0.1ml 接种于改良罗氏培养基上,每一个稀释度接种 2 支斜面,37℃ 培养 4—6 周,计数每支斜面上的菌落数。

试验结果

(一) 耐药结核菌对豚鼠的致病指数

结核菌感染豚鼠后,肉眼可见豚鼠腹股沟处的淋巴结、肺、脾及肝等处均发生病变,病变程度以计分法表示(表1)。从表1结果看出,感染3—6周,除耐R结核菌外,其它4株菌的豚鼠都有2—3只死亡。感染7—12周,除耐R+K结核菌外,其它4株菌的豚鼠有1—4只死亡。结果说明,耐R、耐R+K和耐R+S+H 3株耐药结核菌与对照株的致病力相似,都能使豚鼠发病死亡。5株结核菌感染6周内,豚鼠脏器(脾、肺、肝、淋巴结)的致病指数和总致病指数经统计学处理, F值分别为 0.45,

0.69, 0.92, 0.82, 0.15, 差异不显著 ($P > 0.05$)。感染7—12周的F值分别为 1.36, 0.91, 1.03, 0.35, 1.38, 差异也不显著 ($P > 0.05$)。上述结果均说明,供试的3株耐药结核菌和标准株 $H_{37}RV$ 及结核敏感株同样可使豚鼠脏器出现肉眼可见的病理变化。病变程度相似。感染6周内,多数豚鼠腹股沟处的淋巴结肿大、出血;肺肿大,有片状出血区,整叶肺实样变,或有粟粒状小结节,干酪样坏死;肝脏肿大,充血出血,有灰白色小结节。感染7—12周,多数豚鼠淋巴结出血,肿大;肺肿大,出血,有较坚硬的结核结节;脾肿大,少数豚鼠有小结节;肝肿大,部分豚鼠有小结节。

从3株耐药结核菌和2株对照菌的感染豚

表1 各株耐药结核菌对豚鼠致病指数的比较

菌株	动物数 (死亡数/ 实验数)	6周致病指数					动物数 (死亡数/ 实验数)	12周致病指数				
		脾	肺	肝	淋巴结	总		脾	肺	肝	淋巴结	总
标准人型 结核菌 $H_{37}RV$	3/5	19.1	27.0	17.5	9.0	72.6	1/5	26.2	27.0	16.3	7.5	76.9
结核菌敏 感株	2/5	17.3	30.0	17.5	8.5	73.3	3/4	24.0	26.3	21.9	8.1	80.2*
耐R株	1/4	17.3	30.0	20.4	7.5	75.2*	4/4	21.7	26.3	17.2	7.5	72.7*
耐R+K 株	2/5	19.1	27.0	17.4	8.5	72.0	0/5	19.1	22.5	16.3	9.0	66.9
耐R+S +H株	2/5	19.1	28.5	15.0	8.5	71.1	4/5	17.3	24.0	15.0	8.0	64.3
F值		0.45	0.69	0.92	0.82	0.15		1.36	0.91	1.03	0.35	1.38

表中“*”者为4只豚鼠的平均数。

鼠6周和12周的总致病指数相比较来看,结果基本相似,说明3种耐药结核菌和 $H_{37}RV$ 、敏感株一样,能使豚鼠发生进行性病变,没有自愈的倾向。

(二) 耐药结核菌对豚鼠的毒力根指数

毒力根指数是考虑了病变程度和存活时间两个因素的,因此,用它判断结核菌对豚鼠的致病力较为客观,通过对3株耐药结核菌和2株对照菌株6和12周的毒力根指数比较(表2)看出, $H_{37}RV$ 、敏感株、耐R株、耐R+K株和耐R+S+H株的6周毒力根指数分别为 1.41、1.36、1.33、1.39、1.37, F值为 0.27, 差异不显

表2 耐药结核菌对豚鼠毒力根指数(RIV)的比较

菌株	6周 RIV	12周 RIV
标准人型结核 菌 $H_{37}RV$	1.41±0.16	1.01±0.30
结核菌 敏感株	1.36±0.1	1.04±0.16
耐R株	1.33±0.05	0.99±0.12
耐R+K株	1.39±0.09	0.85±0.11
耐R+S+H 株	1.37±0.15	0.95±0.18
F值	0.27	0.65

著 ($P > 0.05$)。根据Ramakishnam^[4]的分类,毒力根指数在0.9或0.9以上的菌株为高毒力

菌株。由此说明,这5株结核菌均是强毒株。尽管12周的毒力根指数与6周相比,绝对数值偏低(耐R+K株为0.85),但5株菌之间的毒力根指数F值为0.65,差异仍不显著($P > 0.05$)。

(三) 耐药结核菌在豚鼠脏器内的播散能力

Smith^[2]指出脾脏的菌数反映了细菌感染后发生菌血症的能力,毒力高的菌株产生菌血症的能力就强,所以脾脏菌数就多;而毒力低的菌则不产生或较少产生菌血症。细菌若具有从感染部位沿血行播散的能力,也可证明该菌的毒力。本试验取感染后豚鼠的脾、肺和肝做活菌定量培养(表3),观察菌在脏器内的生长繁殖情况。

从表3结果看出,5株结核菌培养6和12周,在肺、脾和肝内的菌落数基本保持在同一个水平上,没有下降或消失的趋势。说明临床分离的3株耐药结核菌(耐R株、耐R+K株和耐R+S+H株)能在豚鼠体内生长繁殖,未被机体的防御系统迅速消灭,具有血行播散至脏器形成菌血症的能力。

从表3还可看出,耐R+S+H株与H₃₇RV株比较,培养6周和12周,在3种脏器内的菌落数基本相同,均在10⁶—10⁷之间。而与敏感株比较,在12周的菌落数相似,但在6周的菌落数则高出10—100倍。耐R株和耐R+K株与2株对照株相比,菌落数低得很多。其原因可能与菌株生长繁殖能力的高低有关。

表3 耐药结核菌感染豚鼠后脏器内活菌定量培养的结果

菌株	感染剂量 (菌落数×10 ⁷ / 0.2ml/只)	6周菌落数/1g 脏器			12周菌落数/1g 脏器		
		脾	肺	肝	脾	肺	肝
标准人型结核菌 H ₃₇ RV	9.7	20.6×10 ⁶	41.6×10 ⁶	8.8×10 ⁶	19.4×10 ⁶	1.94×10 ⁶	3.21×10 ⁶
结核菌敏感*株	2.1	51.6×10 ⁴	10.12×10 ⁴	10.2×10 ⁴	0.25×10 ⁶	6.5×10 ⁶	1.75×10 ⁶
耐R株*	6.8	3.3×10 ⁴	1.5×10 ⁴	0.63×10 ⁴	2.68×10 ³	1.34×10 ⁴	2.94×10 ³
耐R+K株	2.4	2.0×10 ³	10.4×10 ³	0	12.0×10 ⁴	10.3×10 ²	0.4×10 ²
耐R+S+H株	7.1	17.76×10 ⁶	2.2×10 ⁶	11.82×10 ⁶	0.1×10 ⁶	0.1×10 ⁶	2.9×10 ⁶

表中“*”示4只豚鼠的平均数(敏感株在12周的数据为4只平均数)

讨 论

1. 本实验结果证明,自临床分离到的3株耐药结核菌(耐R株、耐R+K株和耐R+S+H株)对豚鼠具有致病力,而且致病力无明显变化,与标准人型结核菌H₃₇RV和结核菌敏感株的致病力基本相同。这一结果对肺结核慢性传染源的控制和加强防治是有益的。

作者的另一篇报道^[9]指出,结核菌敏感株与耐药菌株的枝菌酸甲基酯均由α-枝菌酸酯、甲氧基-枝菌酸酯和酮基-枝菌酸酯组成。构成结核菌毒力基础的枝菌酸和索状因子在耐药结核菌中仍然存在。这一结果进一步证实了耐药结核菌对豚鼠具有致病力。

2. 多年来,国外一些研究者测定了从不同地区、不同临床标本分离的结核菌的毒力,发现即使是敏感株,其中低毒力的菌株占相当大的比例,如Mitchison^[5]等报道,从南印度群岛分离的254株敏感株中,约有1/3菌株对豚鼠是低毒力的。Naganathan等^[4]报道在Bangalore市区分离的结核菌中低毒力菌株占27.4%,而在市郊分离的结核菌中低毒力菌株占53.3%。由此说明,从临床分离的耐药结核菌对豚鼠显示低毒力,不一定是耐药突变体生物学特征的改变,很可能是一种结核菌致病力自然分布的现象。这一问题对评价耐药结核菌的致病力有一定的参考价值。

参 考 文 献

1. 赵彤等: 中华结核和呼吸系疾病杂志, 7(2): 76, 1984.
2. Gangadharam PRJ: Drug Resistance in Mycobacteria, United States, CRC Press, 35, 1984.
3. Mitchison DA et al.: *Bulletin of the World Health Organization*, 25: 285—312, 1961.
4. Naganathan N et al.: *Tubercle*, 67: 261—267, 1986.
5. 张立兴: 中国防痨通讯, 10(2): 90, 1988.
6. 庄玉辉等: 微生物学报, 29(1): 15—19, 1989.

应用斑点试验检测劳教所女犯人衣原体抗体

陈兆云 宋丽玉

(福建省卫生防疫站, 福州)

摘要 对劳教所性紊乱女犯人检测衣原体抗体。用斑点法检查的阳性检出率为 5.70%, 间接血凝法为 4.88%。

关键词 衣原体抗体; 性病; 斑点试验; 间接血凝

衣原体可致性病, 尤其欧、美较为常见。本省是否有衣原体患者存在, 尚未见到报道。为了探索衣原体感染状况, 对本省劳教所性紊乱女性犯人血清作衣原体抗体调查。现将结果报道如下。

材 料 与 方 法

(一) 抗原制备

由湖北省畜牧兽医研究所提供的衣原体 B11001 株, 接种于七日龄鸡胚胎卵黄囊内, 孵育 3 日以上非细菌性死亡的, 以无菌操作摄取卵黄膜, 在 PBS 缓冲液 (pH7.2) 中漂洗卵黄, 将卵黄膜研碎, 加 PBS 缓冲液 30ml (5 个蛋黄膜), 加 0.1% 福尔马林, 混匀, 置于 4℃, 5 天, 每天摇动一次。经低速离心 1500r/min 10 分钟, 去除沉淀粗块, 吸上清液高速离心 2—3 万 r/min 30 分钟, 去上清, 再洗涤离心一次。沉淀物加 PBS 缓冲液 1ml, 再加乙醚 2 倍, 振荡 30 分钟, 去乙醚层。用乙醚再提纯一次, 去尽乙醚, 将水层抗原贮存于 4℃ 备用。

(二) 抗体来源

取性淫乱女犯人静脉血, 及时分离血清, 于 -20℃ 保存待用。

(三) 试验方法

1. 斑点试验 (DT):

(1) 薄膜处理: 按 0.6 × 7cm 规格将硝酸纤维膜割成片条, 打上印痕 6 个, 浸泡蒸馏水中 15 至 30 分钟, 取出凉干。

(2) 抗原包被: 每点印痕加抗原 10 μ l, 放湿盒内 30 分钟, 用 pH7.4 PBS-T₂₀ 液洗涤三次, 每次约 5 分钟, 稍凉干。

(3) 明胶封闭: 抗原膜条泡于 0.5% 明胶 PBS 缓冲液中, 振荡 15 分钟, 同上洗涤三次, 凉干。

(4) 加抗体: 取待检血清 1:10 稀释, 用约 10 μ l 滴在印痕上, 放室温 15—30 分钟, 洗涤三次, 凉干。

(5) 加结合物: HR-P-A 蛋白 (上海生化研究所产品) 原液 0.1ml 加 PBS-T₂₀ 液 3.9ml, 混匀, 把膜条浸入, 振荡 15 分钟, 洗涤三次, 凉干。

(6) 显色: Tris-HCl 溶液 (pH7.6) 10ml 加 3.3 氨基联苯胺 2 μ g, 溶解后加 30% H₂O₂ 10 μ l, 混匀, 膜条浸泡 2—3 分钟, 待显色后, 以过量水冲洗, 中止反应, 凉干, 及时记录结果, 并贴在本子上保存或摄影。结果判定: 肉眼观察, 棕黄色或黄色为阳性, 以“+”表示, 无色或

李功惠同志协助实验, 特此致谢。