

刘志昊,穆大业,占玲俊,等. 两种结核分枝杆菌培养法在结核小鼠感染模型实验中的应用对比 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(5): 104-108.

Liu ZH, Mu DY, Zhan LJ, et al. Comparison of the application of two methods of *Mycobacterium tuberculosis* culture in a mouse model of *Mycobacterium tuberculosis* infection[J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(5): 104-108.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.05.016

# 两种结核分枝杆菌培养法在结核小鼠感染模型实验中的应用对比

刘志昊<sup>1</sup>,穆大业<sup>2</sup>,占玲俊<sup>2\*</sup>,章晓联<sup>1\*</sup>

(1. 武汉大学基础医学院免疫学系,病毒学国家重点实验室,湖北省过敏及免疫相关疾病重点实验室和医学研究院,武汉 430071;2. 中国医学科学院医学实验动物研究所,北京协和医学院比较医学中心,北京 100021)

【摘要】 目的 采用两种结核分枝杆菌培养法(BACTEC MGIT 960 培养法与罗氏(Löwenstein-Jensen, L-J)培养法)同时验证利福平(rifampin, RIF)在结核感染小鼠模型中的治疗效果,探讨采用 BACTEC MGIT 960 培养系统在结核感染的小鼠模型中的应用价值。方法 实验分为 BACTEC MGIT 960 培养组与 L-J 培养组,经尾静脉注射  $1.0 \times 10^6$  CFU/mL H37Rv 菌液感染 36 只 C57BL/6 雌性小鼠,感染一周后 18 只小鼠采用利福平治疗四周,18 只小鼠注射等量磷酸缓冲液(PBS)作为对照,用 BACTEC MGIT 960 快速培养与罗氏培养法对 36 只小鼠肺、脾及肝组织匀浆液进行培养。结果 采用 BACTEC MGIT 960 培养法, RIF 治疗组中肝、肺及脾组织培养物的报阳时间分别为  $(187.11 \pm 10.20)$  h、 $(347.22 \pm 12.70)$  h、 $(276.39 \pm 13.09)$  h, 对照组为  $(142.50 \pm 11.70)$  h、 $(251.67 \pm 16.63)$  h、 $(230.28 \pm 7.22)$  h, 组间对比差异有显著性( $P < 0.001$ ); 罗氏培养法, RIF 治疗组中肝、肺及脾组织荷菌量分别为  $(5.15 \pm 0.15) \log_{10}$  CFU、 $(3.30 \pm 0.23) \log_{10}$  CFU、 $(3.40 \pm 0.25) \log_{10}$  CFU, 对照组荷菌量分别为  $(5.90 \pm 0.25) \log_{10}$  CFU、 $(3.88 \pm 0.31) \log_{10}$  CFU、 $(4.15 \pm 0.30) \log_{10}$  CFU, 组间对比差异有显著性( $P < 0.001$ )。结论 采用 BACTEC MGIT 960 培养法和罗氏培养法进行荷菌量检测,其培养结果相符,但是前者检测出阳性结果时间平均缩短一半,并且区分度也较高,说明 BACTEC MGIT 960 培养法在动物模型的荷菌量检测中更有优势,可运用于结核感染动物模型中荷菌量的检测。

【关键词】 结核分枝杆菌;BACTEC MGIT 960;罗氏培养法;小鼠模型

【中图分类号】 R-33 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-7856(2019) 05-0104-05

## Comparison of the application of two methods of *Mycobacterium tuberculosis* culture in a mouse model of *Mycobacterium tuberculosis* infection

LIU Zhihao<sup>1</sup>, MU Daye<sup>2</sup>, ZHAN Lingjun<sup>2\*</sup>, ZHANG XiaoLian<sup>1\*</sup>

(1. Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Wuhan University; the State Key Laboratory of Virology; Hubei Province Key Laboratory of Allergy and Immune-Related Diseases and Institute of Medical Research, Wuhan 430071, China. 2. Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS); Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC), Beijing 100021)

【基金项目】“十三五”国家重大传染病专项(2017ZX10201301-006)。

【作者简介】刘志昊(1993—),男,硕士研究生,主要从事感染免疫与分子免疫研究。E-mail: 527046915@qq.com

【通信作者】章晓联(1965—),女,博士,教授,博士生导师,主要从事病原微生物(结核分枝杆菌、丙型肝炎病毒)感染免疫及糖免疫学方面的研究。E-mail: zhangxiaolian@whu.edu.cn

占玲俊(1981—),女,博士,副研究员,硕士生导师,主要从事结核动物模型及结核病研究。E-mail: zhanlj@cnilas.org \* 共同通信作者

**【Abstract】 Objective** To compare two method of *Mycobacterium tuberculosis* culture (the BACTEC MGIT 960 rapid culture system and the Löwenstein-Jensen plates (L-J plates) culture method) and to explore the value of the BACTEC MGIT 960 rapid culture system in a *Mycobacterium tuberculosis* (M.tb)-infected mouse model. **Methods** The experimental groups were divided into BACTEC MGIT 960 and L-J culture groups. Thirty-six female C57BL/6 mice were infected with  $1.0 \times 10^6$  colony forming units (CFU)/mL H37Rv via the tail vein. Eighteen mice were treated with rifampicin for 1 week after infection. Eighteen mice were injected with the same amount of phosphate buffer (PBS) as a control. The lung, spleen, and liver homogenates of 36 mice were cultured by BACTEC MGIT 960 rapid culture and L-J culture. **Results** In the BACTEC MGIT 960 culture system group, the time for a positive result in the liver, lung, and spleen tissue cultures in the RIF treatment group was  $(187.11 \pm 10.20)$  h,  $(347.22 \pm 12.70)$  h, and  $(276.39 \pm 13.09)$  h, respectively, and in the control group it was  $(142.50 \pm 11.70)$  h,  $(251.67 \pm 16.63)$  h, and  $(230.28 \pm 7.22)$  h, respectively. There were significant differences between the two groups ( $P < 0.001$ ). In the L-J plates group, the bacterial load of the liver, lung, and spleen tissue cultures in the RIF treatment group was  $(5.15 \pm 0.15) \log_{10}$  CFU, and  $(3.30 \pm 0.23) \log_{10}$  CFU, and  $(3.40 \pm 0.25) \log_{10}$  CFU, and in the control group it was  $(5.90 \pm 0.25) \log_{10}$  CFU,  $(3.88 \pm 0.31) \log_{10}$  CFU, and  $(4.15 \pm 0.30) \log_{10}$  CFU. There were significant differences between the two groups ( $P < 0.001$ ). **Conclusions** The culture results are consistent between the BACTEC MGIT 960 and the L-J plates culture methods. However, the time to detect a positive result is reduced by half on average, and the discrimination is higher when using the BACTEC MGIT 960 culture method in an animal model.

**【Keywords】** *Mycobacterium tuberculosis*; BACTEC MGIT 960; L-J culture method; mouse model

结核病已成为全球第九大死因,持续威胁人类健康。据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)报告,2017 年全球结核病新发病例数约为 1000 万例,新增 55.8 万例利福平耐药结核病,其中 82% 是耐多药结核病,给结核的防治带来极大的障碍<sup>[1]</sup>。

早诊断、早治疗尤其是有效治疗是防治结核病的关键,因此 WHO 近年来不断推动结核的快速诊断、药敏实验(drug susceptibility testing, DST)快速检测和新药及短程化疗方案的开发<sup>[2]</sup>。目前结核的诊断和药敏实验包括以基因检测为基础的检测法和培养法,其中培养法是 WHO 推荐的金标准法。尽管现在以基因检测为基础的检测方法可在 2~24 h 内获得诊断和一二线药物药敏实验结果<sup>[3-5]</sup>,但基于基因检测的方法无法判定菌的存活,且对某些重要二线药物耐药分子的认知不足,基因检测法的应用有局限,培养法在结核的诊断与 DST 与临床治疗方案制定中仍有重要作用<sup>[6]</sup>。临床样本的培养中多项研究均证明 BACTEC MGIT 960 系统培养和传统 L-J 培养法检测结果具有高度的可比性和一致性<sup>[7-8]</sup>,然而 BACTEC MGIT 960 从操作标准化与检测时间上均优于 L-J 培养法,故 BACTEC MGIT 960 培养在临床上在结核诊断和一二线药物药敏实验中应用逐步增多<sup>[9]</sup>。

在结核动物模型的体内药物和疫苗效果评价的最主要的判断指标之一是检测组织荷菌量<sup>[10-12]</sup>,目

前采用 L-J 或 7H11 培养法进行菌落计数,通过菌落计数结果分析判断药物或疫苗在动物模型中是否有效,而 BACTEC MGIT 960 仅用于体外新药的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)<sup>[13-14]</sup>或临床痰标本的药敏测定,较少应用于结核感染动物模型中荷菌量检测。因此,本研究通过 BACTEC MGIT 960 培养法与 L-J 培养法检测结核模型对照小鼠和利福平(rifampin, RIF)治疗后结核感染小鼠模型中的荷菌量变化,以比较两种方法在小鼠结核动物模型中组织荷菌量的精确性和吻合度,以期将 BACTEC MGIT 960 培养系统用于结核药物和疫苗早期效果评价从而快速获得结果。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 菌株

结核分枝杆菌标准株 H37Rv(菌株编号 93009)由中国药品生物制品检定所提供。

#### 1.1.2 实验动物

6~8 周龄 SPF 级 C57BL/6 雌性小鼠 36 只,体重 17~19 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2016-0006]。动物的饲养与实验在中国医学科学院医学实验动物研究所生物安全 3 级实验室(国卫 ABSL3-059)进行,在感染前 1 周,将动物放入生物安全 3 级实验室适应。实验动物的使用得到了中国医学科学院医学实验动物研究所实

验动物使用与管理委员会的批准(批准号: ZLJ17002),在实验动物饲养和实验过程中严格按照 3R 原则设计、开展动物实验。

1.2 主要试剂与仪器

分枝杆菌中性罗氏培养管购自中国珠海贝索生物技术有限公司;细菌超声分散计数仪购自中国广东体必康生物科技有限公司;BACTEC MGIT 960 全自动分枝杆菌培养仪及相关试剂购自 BD 公司; NanoZoomer S60 明场荧光切片扫描仪(日本)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组

实验分为两组, MGIT960 组和 L-J 培养组, 每种方法均用于检测结核小鼠模型和 RIF 治疗后小鼠结核模型中组织荷菌量, 感染的模型对照和 RIF 治疗小鼠各 18 只。

1.3.2 菌液制备

将种子批结核分枝杆菌标准株 H37Rv 置于中性罗氏培养培养, 收获培养 4 周的结核分枝杆菌, 无菌过滤制成单细胞悬液, 用细菌超声分散计数仪分散均匀后制备攻击用菌悬液, 浓度为  $1.0 \times 10^7$  CFU (colony forming units, 菌落形成单位)/mL。

1.3.3 动物感染和取材

每只小鼠尾静脉注射 100 mL H37Rv 菌液感染 C57BL/6 小鼠, 菌液浓度为  $1 \times 10^7$  CFU/mL<sup>[15]</sup>。感染 7 d 后, 将小鼠随机分为 RIF 治疗组与感染对照组, RIF 治疗组按每天 20 mg/kg 治疗 4 周, 感染对照组注射等量的 PBS。无菌条件下 4 周后小鼠脱颈椎处死, 解剖肺、脾、肝组织进行荷菌量的检测和病理分析。

1.3.4 靶器官组织荷菌量检测

取左侧肺组织, 脾头三分之一及肝腹背部的小叶, 加入 1 mL 生理盐水进行组织研磨匀浆。

(1)L-J 培养: 将匀浆液用生理盐水按照 1:10 的比例进行梯度稀释, 分别取 1:100、1:1000、1:10 000 三个稀释梯度稀释液 50 L, 接种于分枝杆菌中性罗氏培养管进行培养, 每个梯度接种 3 管, 培养 3 至 4 周进行菌落计数<sup>[15]</sup>。

表 1 小鼠靶器官组织研磨液 BACTEC MGIT 960 培养结果( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=18, h$ )

Table 1	Results of the culture of mouse target organ tissues using the BACTEC MGIT 960 culture system		
分组 Groups	肺 Lung	肝 Liver	脾 Spleen
对照组 Control group	142.50±11.70	251.67±16.63	230.28±7.22
RIF 治疗组 Rifampin treatment group	187.11±10.20	347.22±12.70	276.39±13.09

(2) BACTEC MGIT 960 培养: 按照 BACTEC MGIT 960 全自动分枝杆菌系统操作指南要求, 取 1:10 稀释的研磨液 0.5 mL 接种于 BACTEC MGIT 7H9 培养管中, 加入 0.8 mL 添加剂, 放入 BACTEC MGIT 960 全自动分枝杆菌培养仪中培养, 每日观察培养结果, 记录出现阳性结果的最早时间称为报阳时间(time to positive, TTP)<sup>[16]</sup>。

1.3.5 病理学检测

无菌条件下将剩余肺、脾、肝组织于 4% 多聚甲醛中固定, 经脱水、浸蜡、包埋, 切成 5 μm 切片后行 HE 染色, 观察各组织病变情况。

1.4 统计学方法

建立 EXCEL 表收集实验数据, 所有结果采用 SPSS 23.0 进行统计学分析。所有数据均采用平均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。结果比较采用 *t* 检验分析,  $P < 0.05$  为差异有显著性。

2 结果

2.1 BACTEC MGIT 960 全自动分枝杆菌培养仪培养结果

RIF 治疗组肺、肝及脾组织报阳时间分别为 (187.11±10.20) h、(347.22±12.70) h、(276.39±13.09) h, 模型对照组肺、肝及脾报阳时间分别为 (142.50±11.70) h、(251.67±16.63) h、(230.28±7.22) h(表 1)。RIF 治疗组脏器报阳时间均长于感染对照组, 差异有显著性( $P < 0.001$ )(图 1), 说明 RIF 治疗组小鼠脏器菌量较少即 RIF 能在小鼠体内能抑制结核分枝杆菌。

2.2 分枝杆菌中性罗氏培养管培养结果

RIF 治疗组肺、肝及脾组织菌落数分别为 (5.15±0.15) log<sub>10</sub> CFU、(3.30±0.23) log<sub>10</sub> CFU、(3.40±0.25) log<sub>10</sub> CFU, 模型对照组肺、肝及脾菌落数分别为 (5.90±0.25) log<sub>10</sub> CFU、(3.88±0.31) log<sub>10</sub> CFU、(4.15±0.30) log<sub>10</sub> CFU(表 2)。RIF 治疗组脏器菌落数均少于感染对照组, 差异有显著性( $P < 0.001$ )(图 2), 说明 RIF 治疗组小鼠脏器菌量较少即 RIF 能在小鼠体内能抑制结核分枝杆菌。

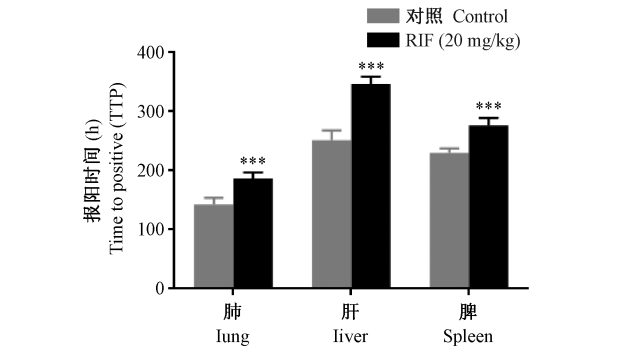


图 1 960 培养系统靶器官荷菌量比较

Figure 1 Comparison of bacterial loading counts in the target organs by 960 culture system

表 2 小鼠靶器官组织研磨液罗氏培养基结果  
( $\bar{x} \pm s, n = 18, \log_{10} \text{CFU}$ )

Table 2 Results of the culture of mouse target organ tissues by L-J culture

分组 Groups	肺 Lung	肝 Liver	脾 Spleen
对照组 Control group	5.90±0.25	3.88±0.31	4.15±0.30
RIF 治疗组 Rifampin treatment group	5.15±0.15	3.30±0.23	3.40±0.25

2.3 小鼠组织病理变化

小鼠感染结核菌 4 周后,肺组织出现多处炎症反应,呈实变趋势,其中肺泡壁增厚,肺泡腔被淋巴

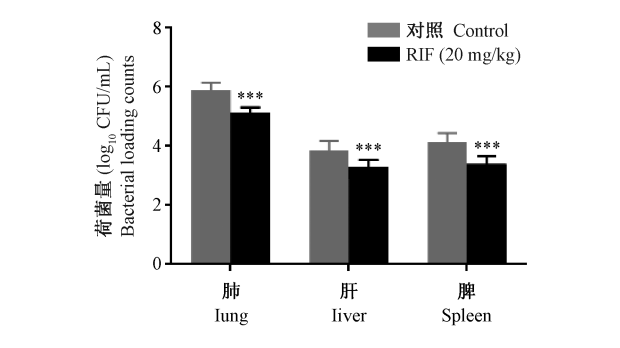


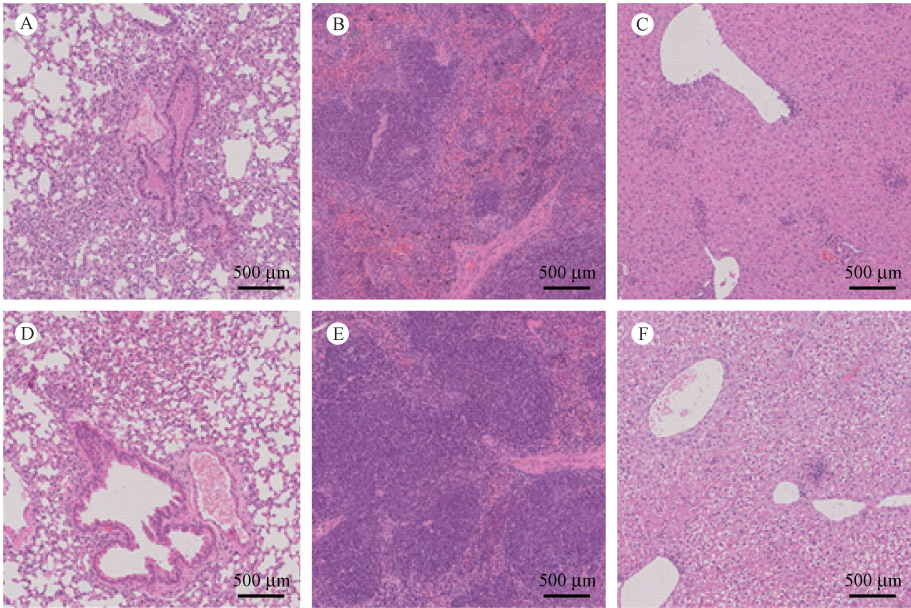
图 2 罗氏培养法靶器官荷菌量比较

Figure 2 Comparison of bacterial loading counts in target organs by L-J plate culture

细胞等炎症细胞填充,RIF 治疗后肺泡结构多数较完整,仅有小面积肺泡被炎症细胞浸润。模型小鼠的脾白髓被结核肉芽肿病变破坏,可见炎症细胞的聚集,RIF 治疗后白髓结构相对完整,炎症细胞聚集较少。模型小鼠肝出现多个散在小肉芽肿样病变,RIF 治疗后病变较轻,仅出现少量肉芽肿样病变及轻度肝细胞水肿。病理结果说明 RIF 治疗组小鼠肺、脾、肝病变均较轻,即 RIF 在小鼠体内能抑制结核分支杆菌。如图 3 所示。

3 讨论

在药效评价和疫苗评价中,通过分析动物模型



注:A、B、C 为对照组肺、脾、肝;D、E、F 为 RIF 治疗组肺、脾、肝。

图 3 小鼠结核模型中治疗组与感染对照组肺脾肝病理变化图(HE 染色,× 50)

Note. A, B, C, Lung, spleen, and liver tissues in the control group. D, E, F, Lung, spleen, and liver in the treatment group.

Figure 3 Pathological changes in the lung, spleen, and liver in the treatment group and infection control group in the mouse tuberculosis model. HE staining

中组织荷菌量是前期评判药物治疗效果的主要方法,采用罗氏培养基培养法进行菌落培养是常用方法之一<sup>[17-18]</sup>。然而,L-J 培养法由于耗时长,操作繁琐需要新的替代方法。

BACTEC MGIT 960 虽然具有培养时间短、操作标准化、工作量较小的优点,用于结核分支杆菌临床检测及药敏实验等定性分析,但较少在动物模型中应用。在抗结核新药 AZD5847、PA-824 组合疗法临床试验中,采用 BACTEC MGIT 960、固体培养法同时培养受试者痰标本,根据标本 TTP 与 CFU 结果判断药物早期杀菌活性(early bactericidal activity, EBA),两种培养方法结果一致<sup>[16,19]</sup>。因此,本实验参考此方法,通过建立小鼠急性结核感染模型,用两种方法同时评估结核模型小鼠及 RIF 治疗的小鼠组织荷菌量,验证两种方法在模型应用中的一致性,从而探索将 MGIT 960 运用于结核小鼠动物模型中结核药物和疫苗效果的快速评估。

本实验结果显示,小鼠感染结核后,虽无明显的临床表现,但是组织病变和菌培养结果证实,结核感染模型构建成功。其中 MGIT 960 和 L-J 培养两种方法均显示:RIF 治疗后肺、脾、肝 3 个靶器官组织培养结果与模型小鼠培养结果相比,差异均有显著性,两种培养方法结论一致,并且 MGIT 960 全自动分枝杆菌培养培养时间 125~354 h(即平均 239 h)远低于罗氏培养基法 4 周(672 h)培养时间,3 个靶器官在模型和 RIF 治疗后之数值差异更大,较传统罗氏培养法组间差异区分度高,在药效或疫苗评价中优势更明显。

综上所述,BACTEC MGIT 960 培养法可运用于结核感染动物模型中荷菌量的检测,且与 L-J 培养法相比具有培养周期短、区分度高的优势,有望应用于结核药物和疫苗效果的快速评估。

#### 参考文献:

- [1] WHO. Global Tuberculosis Report 2018 [EB/OL]. [https://www.who.int/tb/publications/global\\_report/gtbr2018\\_main\\_text\\_30Oct2018.pdf](https://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr2018_main_text_30Oct2018.pdf)
- [2] World Health Organization. The use of molecular line probe assays for the detection of resistance to second-line anti-tuberculosis drugs: policy guidance [R]. World Health Organization, 2016.
- [3] Boehme CC, Nicol MP, Nabeta P, et al. Feasibility, diagnostic accuracy, and effectiveness of decentralised use of the Xpert MTB/RIF test for diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance: a multicentre implementation study [J]. Lancet, 2011, 377(9776):1495-1505.
- [4] Chakravorty S, Simmons AM, Rowneki M, et al. The new Xpert MTB/RIF Ultra: Improving detection of *Mycobacterium tuberculosis* and resistance to rifampin in an assay suitable for point-of-care testing [J]. mBio, 2017, 8(4): e00812-17.
- [5] Theron G, Peter J, Richardson M, et al. GenoType® MTBDRsl assay for resistance to second-line anti-tuberculosis drugs [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2016, 9(9): 1-178.
- [6] Heyckendorf J, Andres S, Köser CU, et al. What is resistance? Impact of phenotypic versus molecular drug resistance testing on multi- and extensively drug-resistant tuberculosis therapy [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2017; AAC.01550-17.
- [7] 杨顺利, 布红丽, 范梦柏. BACTEC-MGIT 960 快速药敏与罗氏比例法药敏检测方法对比[J]. 临床医药实践, 2015, 24(12): 919-921.
- [8] Hanna BA, Ebrahimzadeh A, Elliott LB, et al. Multicenter evaluation of the BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria.[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(3):748.
- [9] 曹英迪. BACTEC MGIT-960 结核菌快速培养 800 例分析[J]. 河南预防医学杂志, 2017, 28(03):186-187.
- [10] Kaufmann SH, Cotton MF, Eisele B, et al. The BCG replacement vaccine VPM1002: from drawing board to clinical trial [J]. Expert Rev Vaccines, 2014, 13(5):619-630.
- [11] Locher CP, Jones SM, Hanzelka BL, et al. A novel inhibitor of gyrase B is a potent drug candidate for treatment of tuberculosis and nontuberculosis mycobacterial infections [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(3):1455-1465.
- [12] Swanson RV, Ammerman NC, Ngcobo B, et al. Clofazimine contributes sustained antimicrobial activity after treatment cessation in a mouse model of tuberculosis chemotherapy [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2016, 60(5):2864.
- [13] Werngren J, Wijkander M, Perskvist N, et al. In vitro activity of AZD5847 against geographically diverse clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(7):4222-3
- [14] Pethe K, Bifani P, Jang J, et al. Discovery of Q203, a potent clinical candidate for the treatment of tuberculosis [J]. Nat Med, 2013, 19(9):1157-1160.
- [15] 孙萌萌, 秦川, 唐军, 等. 阻断巨噬细胞介导的 PD1/PD-L1 通路对小鼠结核复发的抑制作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(4): 50-58.
- [16] Furin JJ, Du Bois J, Van Brakel E, et al. Early bactericidal activity of AZD5847 in pulmonary tuberculosis[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2016; AAC.01163-16.
- [17] Mir S A, Verma I, Sharma S. Immunotherapeutic potential of recombinant ESAT-6 protein in mouse model of experimental tuberculosis [J]. Immunol Lett, 2014, 158(1-2):88-94.
- [18] Veziris N, Ibrahim M, Lounis N, et al. Sterilizing activity of second-line regimens containing TMC207 in a murine model of tuberculosis [J]. PLoS One, 2011, 6(3): e17556.
- [19] Diacon AH, Dawson R, Groote-Biddingmaier FV, et al. 14-day bactericidal activity of PA-824, bedaquiline, pyrazinamide, and moxifloxacin combinations: a randomised trial [J]. Lancet, 2012, 380(9846): 986-993.

[收稿日期]2019-02-14