



BACTEC MGIT 960系统与改良罗氏培养基抗酸分枝杆菌药敏结果的评估

美国疾病控制中心指出快速灵敏的抗酸性分枝杆菌培养和药敏试验是控制结核病的首要条件[1]。建立快速的分枝杆菌培养方法和药敏试验,为临床结核病早诊断、早治疗及其化疗方案的确立、评估提供重要依据,是结核实验室的当务之急。BACTEC MGIT 960是美国BD公司在BACTAC 460TB基础上技术不断改进和完善的新一代荧光检测系统。选择4种一线抗结核药:链霉素、异烟肼、利福平、乙胺丁醇与传统改良罗氏(Löwenstein-Jensen, L-J)培养基药敏试验进行比较,结果如下:

1 材料与方法

1.1 标本来源

本院2000年1月~2004年8月住院和门诊病人(包括已确诊结核病和鉴别诊断的患者)标本179份(痰178份,颈淋巴结穿刺物1例),其中男性:129例(18~89岁) 女性:50例(14~79岁)。

1.2 试剂

1.2.1 BACTEC MGIT 960系统 分枝杆菌生长指示管(MGIT)为改良Middle Brook 7H9 增菌肉汤培养基、检测结核分枝杆菌药敏试剂盒:链霉素、异烟肼、利福平、乙胺丁醇及药敏添加剂为BD公司提供。

1.2.2 L-J方法 培养基文献[2]方法制备。药品硫酸链霉素(粉针剂):山东鲁抗制药股份有限公司提供、异烟肼(注射针剂):天津市氨基酸公司人民制药厂提供、利福平(纯品):上海信谊制药厂提供、盐酸乙胺丁醇(纯品):上海信谊制药厂提供。

1.3 方法

1.3.1 BACTEC MGIT 960系统 MGIT底部包埋对培养基内氧浓度高度敏感的荧光指示剂。氧熄灭荧光感受器结合计算机的技术每小时自动检测MGIT内细菌生长对氧消耗所致荧光强度的变化,检测仪将测到的荧光强度以生长单位形式报告标本生长情况。AST操做程序按试剂说明进行:5支MGIT管均加入0.8 ml添加剂,将链霉素、异烟肼、利福平、乙胺丁醇应用液100 μ l分别加入MGIT管,使其终浓度为1.0、0.1、1.0、5.0 μ g/ml,最后各管加1:5无菌生理盐水稀释的菌悬液(3~5 d阳性标本,1~2 d者直接接种)0.5 ml。生长对照管加1:100无菌生理盐水稀释的菌悬液0.5 ml。GCT放入AST测试架左侧第一个孔,按次序放入链霉素、异烟肼、利福平、乙胺丁醇系统扫描测试架条形码,按照仪器指示位置放入。

1.3.2 L-J药敏试验 采用绝对浓度的间接法。培养基每种药物均设高、低两个浓度:链霉素10, 100 μ g/ml;异烟肼 1, 10 μ g/ml;利福平 50, 250 μ g/ml;乙胺丁醇 5, 50 μ g/ml。菌落经无菌0.5% Tween-80生理盐水研磨成奶酪样,用无菌生理盐水稀释、比浊呈麦氏单位1 mg/ml的浓度经两次10倍稀释,无菌条件下取0.1 ml菌液接种含药培养基斜面,同时接种两支不含药的L-J培养基作为对照,每批药敏试验以结核分支杆菌标准株H37RV敏感株做质控,检测每批培养基质量。置35 $^{\circ}$ C 孵育4周,观察结果。结果判定标准:在对照管生长的前提下,含药培养基斜面菌落数少于20个为不生长,大于20个为生长。含药高、低浓度管不生长为敏感;低浓度管生长,高浓度管不生长为中度耐药;含药高、低浓度管均生长为高度, H37RV须全敏感。如对照管不生

长, 该批药敏试验须重做。

1.3.3 统计学处理 两种方法测试时间比较用t检验, 药敏结果比较用 χ^2 检验。

2 结果

179株分离培养阳性标本960系统检测时间平均9.5 d, 比L-J方法31.74 d早22.24 d, 两者比较有显著差异 $P < 0.001$ ($t = 28.68$); 960系统药敏检测时间平均6.7 d, 较L-J方法28 d早21.3 d, 两者比较有显著差异 $P < 0.001$ (表1, $t = 117.33$) [2] [3]。

表 1 960 系统与 L-J 方法阳性标本培养和药敏所需时间

| 培养基 | n | 阳性标本培养时间 (d) | 药敏所需时间 (d) |
|------|-----|--------------|------------|
| MGIT | 179 | 9.50 | 6.70 |
| L-J | 179 | 31.74 | 28 |

L-J药敏方法链霉素、异烟肼、利福平、乙胺丁醇的耐药率分别为24.02% (43/179)、32.40% (58/179)、34.08% (61/179)、9.50% (17/179); 960系统30.17% (54/179)、34.64% (62/179)、25.70% (46/179)、14.53% (26/179)。960系统与L-J法药敏结果比较无显著差异 $P > 0.05$ ($\chi^2 = 0.30$)。

960系统与L-J方法4种药物的总符合率94.55%, 与报道[3]的总符合率93.5%相近。

多重耐药菌检测: 同时耐异烟肼、利福平及其他抗结核药, 960系统检测率25.70% (46/179), L-J法为27.93% (50/179)。同时耐链霉素、INH、RFP的耐药率两种方法均为12.29% (22/179), 全耐药960系统为12.29% (22/179), L-J法为7.82% (14/179)。

3 讨论

分枝杆菌耐药性试验是国家结核病控制规程的重点。在我国绝对浓度法药敏试验已采用40多年, 但有些标准仍然无足够的理论和实验依据。例如培养基成分对药物的吸附、加热凝固制备中对药物有效剂量的损失, 加倍量法只是一种粗略的估算, 难以精确估计药物的有效浓度, 如链霉素的加倍量; 操作人员肉眼麦氏管比浊的个体差异和稀释过程的操作偏差, 使实验接种浓度呈指数上升的差异, 这些因素直接影响药敏的结果。

传统经典的L-J方法分离培养抗酸分枝杆菌虽然方法简单、经济, 易于推广, 但培养周期长(培养需4~8周), 不能满足医生和患者早诊断、早治疗的要求, 且药敏时间需4周。BACTAC MGIT 960是美国BD公司在BACTAC 460TB基础上技术不断改进和完善的新一代产品, 采用荧光技术解决了BACTAC 460TB废弃物(含14C对环境的污染)及探针穿刺开放性检测技术对实验室工作人员健康造成危害的问题。

参考文献:

[1]Centers for Disease Control and Prevention. Tuberculosis morbidity -United States, 1995 morbid mortal, Weekly report, 1996, 45: 365-70.

[2]Katila ML, Katila P, Erkinjuntti-Pekkamäen R. Accelerated detection and identification of mycobacteria with MGIT 960 and COBAS AM-PLICOR systems[J]. J Clin

Microbiol, 2000, 38(3): 960-4.

[3]Bemer P, Palicova F, Rüsç-Gerdes S. Multicenter evaluation of fully automated BACTAC mycobacteria growth indicator tube 960 system for susceptibility testing of mycobacterium tuberculosis[J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(1): 150-4.

[回结果列表](#)