维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)01-0088-03

比较称重法和比浊法对分枝杆菌活菌计数和药敏的差异

黎友伦[1],陈保文[2],沈小兵[2],彭 丽[1],王国治[2]

(1. 重庆医科大学附属第一医院肺科,重庆 400016;2. 中国药品生物制品检定所,北京 100050)

【摘 要】目的:比较用称重法和比浊法对分枝杆菌活菌计数、对结核分枝杆菌(MTB)绝对浓度法和比例法药物敏感性(药敏)结果的差异。方法:用称重法和比浊法制作非结核分枝杆菌(NTM)28 株、MTB42 株菌悬液,10 倍梯度稀释,10^{-4}mg/ml、10^{-5}/mg/ml、10^{-6}mg/ml 菌悬液 0.1ml 接种于改良 L-J 培养基上作活菌计数,10^{-2}mg/ml 菌悬液 0.1ml 接种于含药改良 L-J 培养基上作绝对浓度法药敏,10^{-3}mg/ml、10^{-5}mg/ml 菌悬液 0.1ml 接种于含药改良 L-J 培养基上作比例法药敏。结果:两种方法 NTM 活菌计数比较有显著性差异 ($P<0.05$),活菌计数值在 $2\times10^{7}\sim8\times10^{8}$CFU/ml;两种方法 MTB 活菌计数值比较无显著性差异 ($P>0.05$),在 $5\times10^{6}\sim5\times10^{7}$CFU/ml。MTB 称重法和比浊法菌悬液绝对浓度法药敏一致率异烟肼、利福平分别达 95.2%、97.6%,与比例法比较符合率异烟肼、利福平分别达 95.2%、92.8%。结论:分枝杆菌不同菌株两种方法活菌计数值有较大差异,药敏结果一致性好。

【关键词】分枝杆菌;活菌计数;药敏试验

【中国图书分类法分类号】R378.91 【文献标识码】A 【收稿日期】2005-08-23

Comparison of colony-forming units and drug susceptibility to mycobacteria between weighting method and Mcfarland method

LI Youlun, et al

(*Department of Pulmonary Disease, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To compare the difference in colony-forming units (CFU) of mycobacteria and drug susceptibility to mycobacterium tuberculosis (MTB) between weighting method and Mcfarland method. *Methods*: The bacterial suspensions of non-tuberculosis mycobacteria(NTM) 28 strains, MTB 42 strains were prepared by using both weighting method and Mcfarland method. 0.1ml of bacterial suspensions (10^{-4}mg/ml, 10^{-5}mg/ml, 10^{-6}mg/ml) were incubated for CFU of mycobacteria. 0.1ml of bacterial suspensions (10^{-2}mg/ml) of MTB were incubated for the drug susceptibility testing of absolute concentration method. 0.1ml of bacterial suspensions (10^{-3}mg/ml, 10^{-5}mg/ml) of MTB were incubated for the drug susceptibility testing of proportion method. *Results*: The CFU of NTM showed significant difference ($P<0.05$), the CFU quantity of NTM was from 2×10^{7} CFU/ml to 8×10^{8}CFU/ml in weighting method and Mcfarland method. The CFU of MTB did not show significant difference ($P>0.05$), the CFU quantity of MTB was from 5×10^{6}CFU/ml to 5×10^{7}CFU/ml in weighting method and Mcfarland method.The accordance rate of drug susceptibility of MTB with absolute concentration method between weighting method and Mcfarland method were 95.2% and 97.6% in INH and RFP, respectively. The accordance rate of drug susceptibility of MTB were 95.2% and 92.8% in absolute concentration method and proportion method about Isonizid and Rifampicin,respectively. *Conclusion*: The CFU of different mycobacteria strains are significant different.The accordance rate of drug susceptibility of MTB between weighting method and Mcfarland method is high.

【Key words】Mycobacterium; Colony-forming units; Drug susceptibility testing

分枝杆菌的药敏试验和菌种鉴定生化反应等检测中,均需将分枝杆菌,包括结核分枝杆菌(MTB)和非结核分枝杆菌(NTM),用麦氏(Mcfarland)标准比浊法或称重法预先进行定量。目前通常采用的方法是用麦氏标准比浊管进行比浊配制成 mg(湿菌)/ml(单位体积)菌悬液,然后进行 10 倍梯度稀释成所需浓度菌悬液,进行活菌计数和药敏试验等。在实际工作中,不同分枝杆菌菌株的活菌计数差异较大。本实验对分枝杆菌用称重法和

作者介绍:黎友伦(1965-),男,副主任医师,博士生,主要研究方向:结核病发病机制和耐药研究。

维普资讯 http://www.cqvip.com

比浊法进行活菌计数比较，MTB 进行绝对浓度法和比例法药敏检测，观察其有无差异。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 $BaCl_2$，分析纯，纯度 >99.5%，购自北京世纪红星化工有限公司；浓 H_2SO_4，纯度 >95%，购自北京化工厂；异烟肼（INH 03K0813）、利福平（RFP 090K1206）购于 Sigma 公司；其它试剂均为国产分析纯。

1.1.2 电子天平 Sartorius(analytic)，精度达 1/10000 级。

1.1.3 菌株 标准菌株（H37Rv）、NTM 28 株、MTB 42 株 由中国药品生物制品检定所分枝杆菌专业实验室提供，质控菌株由韩国结核病研究所跨国参比室提供。

1.2 方法

1.2.1 比浊管制作 按《结核病诊断细菌学检验规程》[1]准确称取 $BaCl_2$ 并配成 0.25% 的 $BaCl_2$ 溶液，稀释液为无菌双蒸水，并按要求配制相当于不同湿菌浓度（mg/ml）的比浊管。

1.2.2 改良 L-J 培养基和含药培养基的制备 按《结核病诊断细菌学检验规程》[1]制备改良 L-J 培养基和含 INH、RFP 培养基。INH、RFP 溶解后分别加入基础培养基中，使最终浓度为改良 L-J 培养基含 INH 浓度分别为 0.2μg/ml、1μg/ml、10μg/ml；RFP 浓度分别为 40μg/ml、50μg/ml、250μg/ml，分装后经培养基凝固灭菌箱，85℃凝固灭菌 50min 后取出。无菌试验合格后 4℃保存，1 个月内使用。

1.2.3 菌液的制备 慢生长分枝杆菌用竹签在培养基斜面上刮取 3～4w 菌龄的菌落，快生长分枝杆菌用竹签在培养基斜面上刮取 1w 菌龄的菌落，放入无菌的小研磨器中，用电子天平称刮取的分枝杆菌的重量，加适量无菌生理盐水研磨，制成 1mg/ml 菌悬液。同时用标准 Mcfarland No.1 比浊管比浊，制成 1mg/ml 菌悬液。分别 10 倍梯度稀释成 10^{-1}mg/ml、10^{-2}mg/ml、10^{-3}mg/ml、10^{-4}mg/ml、10^{-5}mg/ml、10^{-6}mg/ml 菌悬液备用。

1.2.4 接种方法 活菌计数：用微量加样器吸取 10^{-6}mg/ml、10^{-5}mg/ml、10^{-4}mg/ml 的菌悬液 0.1ml 分别接种于无药培养基上作活菌计数。

比例法：用微量加样器吸取 10^{-3}mg/ml、10^{-5}mg/ml 的菌悬液 0.1ml 分别接种于含 INH 0.2μg/ml、RFP 40μg/ml 培养基。绝对浓度法：用微量加样器吸取 10^{-2}mg/ml 的菌悬液 0.1ml 分别接种于含 INH 1μg/ml、10μg/ml，RFP 50μg/ml、250μg/ml 培养基，每批药敏试验用 H37Rv 作质控药敏对照以考核含药培养基质量，并设无药培养基空白对照，置于 37℃下孵育。

1.2.5 观察活菌计数和 MTB 药敏 快生长分枝杆菌 1 周后进行菌落计数，慢生长分枝杆菌 4w 后进行菌落计数和观察 MTB 药敏，并比较药物敏感性的差异。判读结果：培养基上分枝杆菌生长情况的报告，融合成片（≥500 个菌落）报告（4+）；大部分融合成片（200～500 个菌落）报告（3+）；100～200 个菌落，报告（2+）；50～100 个菌落，报告（1+）；<50 个菌落，报告菌落数。

在对照培养基菌落生长良好的前提下，绝对浓度法低浓度含药培养基上生长的菌落数多于 20 个，可判断为耐药。比例法耐药百分比的计算公式：耐药百分比 =（含药培养基上的菌落个数 / 相应对照培养基上的菌落数）×100%，若百分比 >1% 为耐药，<1% 为敏感。

1.2.6 结果处理 比较两种方法活菌计数结果，用 Minitab 软件处理。

2 结 果

2.1 NTM 和 MTB 用称重法和比浊法对分枝杆菌活菌计数结果

NTM 活菌计数在 2×10^7～8×10^8CFU/ml，直接计数比较有显著性差异（$P<0.05$），对数值比较无显著性差异（$P>0.05$）。MTB 活菌计数在 5×10^6～5×10^7CFU/ml，直接计数和对数值比较均无显著性差异（$P>0.05$）（见表 1，表 2）。

表 1 NTM 用称重法和比浊法活菌计数比较结果(n=28)

方法	直接计数	Log(10)
称重法	$1.467\times10^8\pm1.637\times10^8$[a]	7.913 ± 0.509
比浊法	$7.933\times10^7\pm5.908\times10^7$[a]	7.732 ± 0.379

a 两法比较有显著性差异（$P<0.05$）

表 2 MTB 用称重法和比浊法活菌计数比较结果比较(n= 42)

方法	直接计数	Log(10)
称重法	$1.653\times10^7\pm1.085\times10^7$	7.199 ± 0.389
比浊法	$1.352\times10^7\pm1.071\times10^7$	7.161 ± 0.406

两法比较无显著性差异（$P>0.05$）

2.2 绝对浓度法药敏结果

称重法和比浊法药敏试验结果符合率高，达 95.2% 以上。见表 3。

表 3 MTB 称重法和比浊法绝对浓度法药敏结果符合率(n= 42)

药物	均敏感	均耐药	称重法敏感比浊法耐药	比浊法敏感称重法耐药	符合率 (%)
INH	15	25	1	1	95.2
RFP	12	29	1	0	97.6

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.3 绝对浓度法药敏结果与比例法药敏试验结果

比较结果一致率好,达 92.8%以上(见表 4,表 5)。

表 4 MTB 称重法绝对浓度法药敏与比例法药敏结果一致率(n= 42)

药物	均敏感	均耐药	浓度法敏感比例法耐药	比例法敏感浓度法耐药	一致率(%)
INH	14	26	2	0	95.2
RFP	11	28	2	1	92.8

表 5 MTB 比浊法绝对浓度法药敏与比例法药敏结果一致率(n= 42)

药物	均敏感	均耐药	浓度法敏感比例法耐药	比例法敏感浓度法耐药	一致率(%)
INH	14	26	2	0	95.2
RFP	12	29	1	0	97.6

2.4 称重法和比浊法计数 MTB 的比例法药敏结果

一致率达 100%。

表 6 MTB 称重法和比浊法计数的比例法药敏结果一致率(n= 42)

药物	均敏感	均耐药	称重法敏感比浊法耐药	比浊法敏感称重法耐药	符合率(%)
INH	14	28	0	0	100.0
RFP	12	30	0	0	100.0

3 讨 论

分枝杆菌称重法和比浊法每毫克的活菌计数结果比较有一定差异,但从活菌计数的数量看,比浊法较称重法略低。不同分枝杆菌每毫克的活菌计数差异很大,可达 1 个数量级以上。这与分枝杆菌的大小、生长情况及有无产色有关。

MTB 活菌计数值较 NTM 低约 1 个数量级,范围多在 5×10^6CFU/ml ~ 5×10^7CFU/ml,平均为(1 ~ 2) $\times10^7$CFU/ml,H37Rv 活菌计数为 1×10^7CFU/ml。NTM 活菌计数值较 MTB 高略 1 个数量级,范围在 2×10^7 CFU/ml ~ 8×10^8CFU/ml,平均约为 1×10^8 CFU/ml,其中龟分枝杆菌每毫克活菌计数最多,达 8×10^8CFU/ml。故作 MTB 和 NTM 活菌计数或药敏检测时应引起注意。Bowends 等[2]在检测鸟分枝杆菌药敏时,其菌液浓度 Mcfarland No.1 达 3×10^8 CFU/ml。在分枝杆菌病实验诊断学上检测鸟、海分枝杆菌时菌浓度用 Mcfarland No.1,而堪萨氏分枝杆菌菌浓度用 Mcfarland No.3[3]。

从药敏结果看,用称重法和比浊法菌悬液接种作绝对浓度法药敏,其结果符合率高。本实验用称重法和比浊法定量 MTB 作绝对浓度法药敏符合率达 95.2% ~ 96.7%。理论上绝对浓度法药敏时与接种菌量有关,常规方法为接种 10^{-2}mg/ml 菌悬液 0.1ml,而实际接种不同菌株菌量有较大差异,有可能影响结果。菌悬液含菌量对 MTB 绝对浓度法药敏试验有一定影响,含菌量越少,其敏感率越高,反之,其耐药率越高。若接种菌量偏多,则可致耐药率检出增多的可能。实验中 INH 出现 1 例称重法耐药而比浊法敏感,符合上述推测,但 INH、RFP 各有 1 例称重法敏感而比浊法耐药的不符合推测的情况。实验总的符合率高,故在常规药敏实验检测中,更多的是高度敏感或明显耐药的菌株,用称重法和比浊法定量 MTB 的绝对浓度法不会明显影响检查结果。

称重法或比浊法定量 MTB 的绝对浓度法药敏,与比例法药敏试验结果比较符合率高,达 92.8% ~ 97.6%,而称重法或比浊法的比例法药敏结果完全一致。从试验技术角度讲,比例法与绝对浓度法的主要区别是:① 绝对浓度法对接种量要求十分严格,既要避免由于过量接种产生自然突变的可能,又要保证对照培养基上菌落生长旺盛;相比之下,比例法由于设定了高、低 2 个接种量的参考系统,且试验结果的判断是通过计算活菌单位的比值获得,因此对接种量这一重要变异因素进行了一定程度的校正。②比例法定义 1%为敏感和耐药的临界点,而绝对浓度法规定低浓度含药培养基上生长的菌落数多于 20 个判断为耐药,按接种量的活菌单位计算与比例法的 1%耐药有相同的理论基础,在此基础上,由于绝对浓度法每种药物设定高、低 2 个药物浓度,所以绝对浓度法在一定程度上反映了耐药的程度和水平。如果说比例法是定性的药敏试验,绝对浓度法则包含有半定量之意。③比例法操作较为繁琐,且需要定量技术[4]。

MTB 药敏试验的检测方法很多,目前 WHO/I-UATLD 推荐用比例法。用称重法和比浊法菌悬液接种作比例法药敏,其结果一致性好。因比例法是

(下转第 131 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

参 考 文 献

[1] Andrulli A, Perri F, Annese V. Guidelines for treatment of acute pancreatitis[J]. Gut, 1999; 44:579-580.

[2] 刘又玲.急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征的诊断标准（草案）[J].中华结核和呼吸病杂志,2000; 23(4): 203.

[3] 王茂旭, 田伏洲, 李素芝, 等. 经内镜胆管引流术治疗急性胰腺炎[J]. 中国消化内科杂志, 1998;15 : 208.

[4] 陆仁达, 李能平, 周鸣清.早期 EST 治疗重症胰腺炎[J]. 肝胆外科学杂志, 1999; 11: 70.

[5] Kusske AM, Rongione AJ, Reber HA. Cytokines and acute pancreatitis[J]. Gastroenterology, 1996; 110:639-642.

[6] Mandell GL, Karl IE , Timmins HS, et al. Neutrophils and pentoxiofylline[J].Am Rev Respir Dis,1988;138:1103-1105.

[7] 钟 清, 甘 华, 杜晓刚,等. 连续性静脉－静脉血液滤过在重症胰腺炎治疗中的价值 [J]. 中华内科杂志, 2003;7: 483-485.

[8] 王锦权, 高玉华, 刘 宝,等. 连续性静脉血液滤过在 ICU 中的应用研究[J]. 中国血液净化, 2002; 4: 17-19.

[9] 刘长文, 秦宗和, 王海燕, 等. 早期呼吸机支持加床边血液滤过治疗急性重症胰腺炎合并急性肺损伤[J]. 中国呼吸与危重症监护杂志, 2003; 6: 343-345.

[10] 解力新,刘又宁.肺内源性急性呼吸窘迫综合征（ARDS）与外源性 ARDS [J]. 中华内科杂志, 2003; 42(7): 517-519.

[11] 杨廷旭,吴河山,王彩芝,等.重症急性胰腺炎并多脏器功能障碍综合征 62 例报告[J]. 中国基层医药, 2005;12(1):110-111.

（上接第 49 页）

[1] 覃 数,陈运贞. 大白鼠实验性心肌缺血再灌注模型制备与心电图改变的特点[J]. 重庆医科大学学报, 1998;23(1): 8-11.

[2] Kozlovskis PL, Gerdes AM, Smets M, et al. Regional increase in isolated myocyte volume in chronic myocardial infarction in rats [J]. J Mol Cell Cardiol, 1991;23:1459-1466.

[3] Weber KT. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network[J]. J Am Coll Cardiol, 1989;13:1637-1652.

[4] Anderson KP,Walker R, Urie P, et al. Myocardial electrical propagation in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy [J]. J Clin invest, 1993;92:122-140.

[5] Chen MM, Lam A, Abraham JA, et al. CTGF expression is induced by TGF-? in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes. J Mol Cell Cardiol[J], 2000;32:1805-1819.

[6] Ruperez, Lorenzo, Blanco-Colio, et al. Connective tissue Growth Factor is a Mediator of Angiotensin Ⅱ-Induced Fibrosis Circulation[J], 2003;108(12):1499-1505.

[7] Ohnishi H, Oka T, Kusachi S, et al. Increased expression of connective tissue growth factor in the infarct zone of experimentally induced myocardial infarction in rats[J]. J Mol Cell Cardial, 1998;30(11):2411-2422.

[8] 黄颂敏,刘 芳,刘小青. 血管紧张素Ⅱ及其受体拮抗剂在系膜细胞培养中对结缔组织生长因子表达的影响[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志,2000;9(5):423.

（上接第 90 页）

观察耐药菌比例,与 MTB 菌株活菌量多少无关。但比例法由于操作繁琐、费时,所以我国至今还没有普遍应用。我国大部分地区都用绝对浓度法测定 MTB 药物敏感性，与国际推行的比例法有差别,标准也不一致,不便准确比较评价。比例法由于方法复杂,又不适用临床大量标本。杨立涛等[4]对比例法进行改良,将比例法接种 10^{-3}mg/ml、10^{-5}mg/ml 菌悬液 0.1ml 改为接种 10^{-2}mg/ml、10^{-4}mg/ml 菌悬液 0.1ml，观察显示药敏结果无差异。基础培养基上 MTB 不生长的数目、<50 个菌落的数目、污染的数目随菌液浓度的递减而增高。这表明菌液浓度越低,MTB 药敏试验成功率越低，菌液浓度越高其成功率越高[5]。

参 考 文 献

[1] 中国防痨协会.结核病诊断细菌学检验规程[J].中国防痨杂志,1996;18(2):80-85.

[2] Bowends SE, Kurzynski TA, Norden MA, et al. Rapid susceptibility testing for nontuberculosis mycobacteria using flow cytometry[J]. J Clin Microbiol, 1996;34(6):1386-1390.

[3] 熊礼宽主编.结核病实验诊断学[J]. 第 1 版, 北京:人民卫生出版社, 2003;147-151.

[4] 刘宇红,姜广路,赵立平,等.第四次全国结核病流调分枝杆菌药敏试验的方法学探讨 [J]. 中国防痨杂志, 2003;25(1): 16-20.

[5] 杨立涛,张 莉,李爱华.结核菌药敏试验方法（比例法）改进的研究[J]. 预防医学情报杂志, 2000;16(4):18-20.