DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.10.035
第26卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 10
932 2004年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2004

经验交流

文章编号:1000-5404(2004)10-0932-02

结核分支杆菌吡嗪酰胺敏感试验方法的比较研究

Comparison of tests of susceptibility of *Mycobacterium* tuberculosis to pyrazinamide

王金河,裴 宁,匡铁吉,王心静,宋 萍,金关甫,刘金伟,仲 斌 (解放军309医院结核病中心,北京 100091)

吡嗪酰胺被广泛应用于短程化疗方案中,因此耐吡嗪酰胺的结核菌也越来越多[1]。但由于吡嗪酰胺仅在pH为5.5的酸性条件下才能转化为杀菌的吡嗪酸,而结核菌在酸性条件下生长很差,甚至不生长,从而导致吡嗪酰胺的敏感试验一直是实验室中的一个难题。本研究对4种吡嗪酰胺敏感试验方法进行对比研究,以明确各种方法在实验室的应用范围和应用价值。

1 材料和方法

1.1 痰标本

受试痰标本60例,留自本院结核科住院涂阳肺结核患者。40株结核杆菌临床分离物来自本实验室保存的于2000年2月至2002年4月从住院肺结核患者痰标本分离并做过菌型鉴定的结核杆菌分离株。

1.2 试验用培养基

酸罗氏对照和含吡嗪酰胺培基的制备参照文献[2]。分别制作匡氏基础琼脂培养基(DT1),含吡嗪酰胺匡氏酸性琼脂培养基(Z1),不含吡嗪酰胺匡氏酸性琼脂培养基(Z0)及酸性匡氏液体培养基(PZ0)。

1.3 酸罗氏法

酸罗氏培养基吡嗪酰胺间接药敏试验按常规操作[3],接种液浓度为10^{-3} mg/ml,接种量为0.1 ml,置于35 ℃温箱培养,至2、3、4周观察结果。

1.4 匡氏琼脂培基法

1.4.1 匡氏琼脂培基法吡嗪酰胺直接药敏试验 痰标本用2%氢氧化钠液化,除杂菌20 min,取0.1 ml分别接种于Z1和Z0斜面上,置35 ℃温箱内培养,每周观察,根据Z1、Z0生长情况判定结果,至4周。

1.4.2 匡氏琼脂培基法吡嗪酰胺间接敏感试验 40株临床分离结核杆菌复活后,用无菌生理盐水稀释成10^{-3} mg/ml菌悬液,各取1 ml分别接种于Z1和Z0上,观察结果同上,具体操作详见有关报道。

1.5 吡嗪酰胺水解酶分析法

痰标本按常规方法接种培养于DT1上,原保存菌株也按常规复活,从结核菌分离斜面上刮取约10 mg湿菌,接种于4 ml PZ0试管中,35 ℃培养3 d后取出,加入10%新鲜配制的硫酸亚铁铵溶液1 ml,置于冰箱内冷藏4 h后取出观察结果,出现粉红色(各种程度)则为阳性,指示为敏感株,无颜色管为耐药株。

作者简介:王金河(1965—),男,河南省上蔡县人,主治医师。电话:(010)86730673

收稿日期:2004-02-05;修回日期:2004-04-15

1.6 PnCA基因检测法

结核分支杆菌菌株:痰标本按常规接种于DT1上培养,原保存菌株按常规方法复活[2],DNA的制备按药盒说明进行。

1.7 统计学方法

计量资料数据用$\bar{x}\pm s$表示,运用SPSS 10.0统计软件行方差分析及均数间多重比较。

2 结果

4种检测方法的报告时间及与酸罗氏法的符合率。与酸罗氏法的符合率分别为:匡氏琼脂法为100%,吡嗪酰胺水解酶分析法为95%,PnCA基因检测法为75%。匡氏法、吡嗪酰胺水解酶分析法及PnCA基因检测法用于吡嗪酰胺敏感性鉴定时间所耗时间均显著低于酸罗氏法($P<0.01$),见表1。

表1 酸罗氏法、匡氏直接敏感试验、**PZAase**分析法、**PnCA**基因检测法时间和结果比较

	结果(例)		报告时间(d)
	敏感	耐药	$\bar{x}\pm s$
罗氏法	43	52	38±3
匡氏法	45	55	21±2
PZAase分析	43	57	13±3
PnCA基因检测	59	41	10±1

*:酸罗氏PZA敏感试验中有5株在对照和含药培养基上均无生长

3 讨论

酸罗氏法用于吡嗪酰胺敏感试验,耗时长,且有些菌株生长不好,甚至不生长,致使敏感试验没有结果,已不能完全适应临床快速敏感试验的要求。本研究所用其它3种方法,各自存在优势。匡氏法用于吡嗪酰胺敏感试验,与酸罗氏法比较,可靠性和重复性均较好,达到了99%,且结核菌生长快速,大大缩短了吡嗪酰胺敏感试验的时间,且培基制作简单,价格低廉,值得推广[4-5]。吡嗪酰胺水解酶分析法与酸罗氏法比较,首先不需在酸性培基上培养结核菌,缩短了敏感试验时间,结果与酸罗氏法符合率达到95%,较为可靠。但也存在一定的限制,首先接种量要足够大,否则会出现假阴性结果。出现的2例假阴性结果考虑与此有关。第二,如果为耐药和敏感的混合株,也只能指示为敏感;第三,高度耐药菌株部分仍具有吡嗪酰胺水解酶活力,可出现假敏感结果。故而在实际应用中还应根据病人具体情况具体分析。PnCA基因检测法在4种方法中最快速,可弥补常规药敏试验的不足。但与酸罗氏法的符合率为75%,符合70%左右的吡嗪酰胺耐药株存在PnCA基因突变这一耐药分子机制,但仍有30%左右的菌株不能用此方法正确地鉴定出

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

来，故而在可靠性方面与匡氏法及吡嗪酰胺水解酶分析法存在一定的差距。

综上结果可看出，诊断实验室可根据临床的不同需要，分别选用匡氏法，吡嗪酰胺水解酶分析法及 PnCA 基因检测法，从而可以更准确，更快速地为临床用药提供依据。

关键词：结核分枝杆菌；吡嗪酰胺；敏感试验
中图法分类号：R378.911　文献标识码：B

参考文献：

[1] Butler W R, Kilburn J O. Improved method for testing susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to pyrazinamide[J]. J Clin Microbiol, 1982, 16(6): 1106—1109.

[2] 匡铁吉，王利平. 92 号土豆汤琼脂培养基用于临床标本结核菌分离的效果[J]. 中华结核和呼吸杂志，1990, 13(6): 376.

[3] 匡铁吉，宋　萍，王利平，分枝杆菌简化琼脂培养基的研究[J]. 微生物学报，1995, 35(4): 298—302.

[4] Tatar J. Sensitivity of tubercle bacilli to pyrazinamide determined on the basis of their sensitivity to nicotinamide and their pyrazinamidase and nictinamidase Activities[J]. Gruzlica, 1974, 42(8): 773—777.

[5] Salfinger M, Kafader F M. Susceptibility testing of mycobacterium tuberculosis to pyrazinamide[J]. Zentralbl, Bakteriol, Mikrobiol, Hyg, 1987, 265(3-4): 404—407.

[6] Kantor I N, Amadio G E. Pyrazinamidase activity and susceptibility to pyrazinamide in clinical isolstes of mycobacterium tuberculosis, pyrazinamide susceptibility of M. Tuberculosis[J]. Bull Int Union Tuberc, 1986, 61: 60.

（编辑　薛国文）

文章编号：1000-5404(2004)10-0933-02

经验交流

高效液相色谱法测定右旋酮洛芬制剂在家兔体内血药浓度及生物利用度

High performance liquid chromatography for the detection of blood concentration and bioavailability of dextroketoprofen preparation in rabbits

杨万兴，向明凤，陈　亮　（第三军医大学大坪医院野战外科研究所药剂科，重庆 400042）

右旋酮洛芬和酮洛芬中的右旋体在体内吸收较慢，吸收程度差，生物利用度低，半衰期短，对胃肠道刺激性大[1~3]。本研究以 S-KP 与β-环糊精(β-CD)形成的包合物(S-KP-β-CD)为被试制剂，以右旋酮洛芬原药为对照，采用高效液相色谱法测定 6 只成年雄性家兔分别单次交叉灌胃给予 S-KPβ-CD 和 S-KP 后不同时刻血浆中 S-KP 的浓度，绘制血药浓度-时间曲线，求算药物动力学参数，对药物动力学参数进行统计分析和生物等效性的评价，为右旋酮洛芬的进一步研究提供实验数据。

1　材料与方法

1.1　材料

成年雄性日本大耳兔 6 只，体质量 1.8～2.5 kg，由第三军医大学野战外科研究所动物室提供。高效液相色谱仪（美国贝克曼公司），GS-15R 低温离心机（美国贝克曼公司），SK-I 型快速混合器（深圳沙头角国华仪器厂）。右旋酮洛芬对照品（99.98%，批号 001106，西南合成制药厂药物研究所），右旋酮洛芬β-环糊精包合物（11.87%，批号 020606 自制）。其他试剂均为分析纯。

1.2　色谱条件

Ultraphere 250 mm×4.6 mm 5μ ODS C_{18}柱。流动相：甲醇：50 mmol·L^{-1}的磷酸二氢钠溶液（30∶70），用磷酸调 pH 值为 2.5～3.0；流速 1.0 ml·min^{-1}，紫外检测波长 260 nm，进样量 20μl。柱温：室温。

1.3　血浆样品的处理

取血浆样品 0.25 ml 置于 5ml 具塞干燥离心管中，加蒸馏水 0.5 ml，旋涡振荡 15 s；加 70%高氯酸 0.2 ml，旋涡振荡 30 s。精密加入乙醚 2.0 ml，旋涡振荡 1 min，离心 5 min（3 000 r/min）。

精密吸取乙醚层 1.0 ml 于编号的尖底离心管中，于 45 ℃下空气流吹干。加流动相 200 μl 溶解残渣，进样 20 μl 进行 HPLC 分析。血浆色谱图中 S-KP 保留时间为 4.32 min。

2　结果

2.1　标准曲线的绘制

精密称取经硅胶干燥过夜的 S-KP 对照品 60 mg，以甲醇溶解配制成 600 mg·ml^{-1}的贮备液。精密吸取 S-KP 标准贮备液适量，空气流吹干，加流动相定容，稀释为 0.50、1.25、2.50、6.25、12.50、25.00 和 62.50 mg·ml^{-1}的标准溶液。取空白血浆 0.25 ml，加入不同浓度 S-KP 标准溶液使血浆最终浓度为 0.2、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、25.0 mg·ml^{-1}。按血浆样品预处理，测其峰面积，以峰面积和 S-KP 血浆浓度进行回归，回归方程为：A=32.4972C—0.1073，r=0.9999（n=5），P=0.0335。

精密度：取高、中、低 3 种浓度样品，同日内同一标准曲线分析，得日内 RSD 分别为 3.4%，4.6%，2.8%。1 周内不同日同一标准曲线分析，得日间 RSD 分别为 4.7%，3.9%，4.4%。

加样回收率：取一血清样品测定 3 次得均值 5.5 mg·ml^{-1}，再取该样品 50 μl，分别加入 0.2 mg·ml^{-1}，5 mg·ml^{-1}，25 mg·ml^{-1} S-KP 标准储备液各 50 μl，每样品测定 3 次得均值为（99.3±1.5）%、（100.0±1.4）%、（99.8±0.9）%。

2.2　给药方案

体质量 1.8～2.5 kg，健康的日本大耳兔 6 只（第三军医大学野战外科研究所动物室提供），均为雄性。实验前禁食 12 h，自由饮水，给药后 4 h 进食，实验期间统一饮食。用随机分段分为两组并编号，每组 3 只。1 组给予 S-KP 5 mg·kg^{-1}灌胃，另 1 组给予 1

作者简介：杨万兴（1961－），男，重庆市人，副主任药师。电话：（023）68757638

收稿日期：2004-03-01；修回日期：2004-05-01

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net