

• 基础实验研究 •

MGIT 及 BacT/Alert MP 液体培养基检测分枝杆菌效果的评价*

蔡杏珊, 谢敏娜, 罗春明, 谭耀驹[△]

(广东省广州市胸科医院检验科 510095)

摘要:目的 评价 BacT/Alert MP、MGIT 960 7 mL、MGIT 4 mL 3 种液体培养基检测分枝杆菌的效果。方法 收集肺结核病疑似患者的 149 份抗酸染色涂阳、188 份涂阴痰标本, 分别采用 BacT/Alert MP、MGIT 960 7 mL、MGIT 4 mL 以及罗氏培养基(L-J)进行分离培养效果比对。另对 12 株标准分枝杆菌进行检出限的测试。结果 (1) 337 份痰标本共分离出 207(61.4%)株分枝杆菌, 其中 167 株为结核分枝杆菌(MTBc), 40 株为非结核分枝杆菌(NTM)。BacT/Alert MP、MGIT 960 7 mL、MGIT 4 mL、L-J 法的检出率是: 56.7%(191/337)、56.7%(191/337)、55.2%(186/337)、47.5%(160/337), 前 3 者的检出率高于 L-J 法, 差异有统计学意义($\chi^2=5.7, 5.7, 4.0, P<0.05$)。188 份涂阴标本, 以上 4 法的检出率分别为 25.0%(47/188)、23.4%(44/188)、22.9%(43/188)、11.7%(22/188), 3 种液体培养基法高于 L-J 法, 差异有统计学意义($\chi^2=10.1, 8.1, 7.5, P<0.05$)。(2) 以 L-J 法结果为标准, BacT/Alert MP、MGIT 960 7 mL、MGIT 4 mL 的灵敏度、特异性、符合率分别为: 93.8%、82.7%、88.2%; 95.7%、83.4%、89.5%; 95.6%、85.0%、90.3%, 与 L-J 法结果具有高度一致性($kappa=0.8, 0.8, 0.8, P<0.05$)。(3) BacT/Alert MP、MGIT 960 7 mL、MGIT 4 mL、L-J 法的阳性报告日期为: 17、11、11、20 d; 污染率为: 3.0%、3.0%、4.2%、3.3%。(4) 标准分枝杆菌 H37RV、堪萨斯、戈登、新金黄、瘰癧、鸟、胞内、不产色、土、次要、龟、脓肿在以上 4 法的检出限为: 3~300 CFU/mL。(5) 液体培养基费用为 L-J 法的 5 倍, BacT/Alert MP 与 MGIT 960 7 mL 需使用大型仪器。结论 液体培养基法检出率高、阳性报告时间短、能准确快速检测分枝杆菌, MGIT 4mL 不需昂贵仪器, 适合基层实验室应用。

关键词: 分枝杆菌属; 分离培养; 方法学评价

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.21.019

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)21-2469-03

Evaluation of effectiveness of MGIT and BacT/Alert MP liquid medium culture manual method for Mycobacterium detection*

Cai Xingshan, Xie Minna, Luo Chunming, Tanyaoju[△]

(Department of Clinical Laboratory, Guangzhou Chest Hospital, 510095, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the effectiveness of BacT/Alert MP, MGIT 960 7 mL, MGIT 4 mL three liquid medium in detecting Mycobacterium. **Methods** 337 suspected pulmonary tuberculosis patients' sputa specimens were collected, among which, 149 specimens were positive in acid-fast stained while the other 188 were negative. The results of all isolated specimens cultured in BacT/Alert MP, MGIT 960 7 mL, MGIT 4 mL and Löwenstein-Jensen (L-J) medium were compared. In addition, detection limit of 12 types culture strain with Mycobacterium were tested. **Results** (1) 207(61.4%) mycobacterial isolates grew from 337 specimens, these included Mycobacteria tuberculosis complex (MTBc, $n=167$) and Nontuberculous Mycobacteria (NTM, $n=40$). The isolation rates of BacT/Alert MP, MGIT 960 7 mL, MGIT 4 mL, L-J were 56.7%(191/337), 56.7%(191/337), 55.2%(186/337), 47.5%(160/337) respectively. The isolation rates of L-J method was significantly lower than the other three method($\chi^2=5.7, 5.7, 4.0, P<0.05$). In the 188 smear-negative samples, the isolation rates of the four method were 25.0%(47/188), 23.4%(44/188), 22.9%(43/188), 11.7%(22/188), which showed the former three methods were significantly higher than L-J($\chi^2=10.1, 8.1, 7.5, P<0.05$). (2) The sensitivity, specificity and coincidence of BacT/Alert MP, MGIT 960 7 mL, MGIT 4 mL methods were 93.8%, 82.7%, 88.2%; 95.7%, 83.4%, 89.5%; 95.6%, 85.0%, 90.3% with the standard of L-J result. They have good consistency with L-J's($kappa=0.8, 0.8, 0.8, P<0.05$). (3) Detection times of mycobacteria with BacT/Alert MP, MGIT 960 7 mL, MGIT 4 mL, L-J were 17, 11, 11, 20 days, the nonmycobacterial overgrowth rates were 3.0%, 3.0%, 4.2%, 3.3%. (4) Detection limit of 12 types culture strain with Mycobacterium (*M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. gordonae*, *M. neoaurum*, *M. scrofulaceum*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. nonchromogenicum*, *M. terrae*, *M. triviale*, *M. chelonae*, *M. abscessus*) were 3~300 CFU/mL. (5) The 5 double cast of liquid culture method than L-J's. BacT/Alert Mp and MGIT 960 7 mL method must use expensive equipment. **Conclusion** Liquid medium manual methods are rapid detection methods of Mycobacterium with high positive detection rate. MGIT 4 mL method may be suitable to resource limited medical institutions because of low cost and short round time.

Key words: mycobacterium; isolation culture; methodology evaluation

结核病是威胁人类健康的重大疾病和严重的公共卫生问题, 早期发现是结核病控制工作的重要环节。目前, 结核病的诊断主要依据 X 线检查、抗酸染色镜检和分离培养及血清学辅助^[1]。作为结核病诊断金标准的分离培养, 由于结核分枝杆菌生长慢的特性, 影响了临床的诊断和治疗工作。因此, 如何提高分枝杆菌的快速检测是一个迫切需要解决的问题^[2]。以检测结核菌代谢产物的 BACTEC TB 460 检测系统的成功研制开创了结核菌快速分离培养的先河, 但放射线的危害限制了

它的使用, 现在取而代之的有 BacT/ALERT 3D 系统、MGIT 960 系统, 其中考虑到基层单位的使用, 美国 BD 公司在研制 MGIT 960 系统的同时, 还研制了适于基层单位应用的 MGIT 培养管 4 mL 手工判读系统。为此, 将上述 3 种培养方法与传统的罗氏培养方法进行比较, 评价分离效果。

1 材料与方法

1.1 材料 收集 2009 年 5 月至 7 月本院初诊患者痰标本 337 份, 其中涂片阳性样本 149 份、涂片阴性样本 188 份。

* 基金项目: 广州市医药卫生科技项目(2009-YB-100)。 [△] 通讯作者, E-mail: gzchtan@163.com。

1.2 方法

1.2.1 仪器与试剂 (1)BacT/Alert 3D 全自动分枝杆菌培养系统;BacT/Alert MP 培养瓶(批号:1022459)、复溶液和抗生素干粉添加剂(批号:736104),均为生物梅里埃原厂试剂。(2) BACTEC MGIT 960 自动分枝杆菌培养仪;MGIT 960 7 mL 培养管(批号:9090855)、添加剂(批号:9174900),均为美国 BD 公司原装进口。(3) BD BBLTM MGIT TM 手工判读系统;MGIT 4 mL 培养管(批号:9108271)、添加剂(批号:9068676),均为 BD 公司产品。(4)改良罗氏(L-J)培养基,由本实验室参照文献[3]自行配制,原材料购自 BD 公司。

1.2.2 实验方法 吸取 2~3 mL 黏液样或干酪样痰标本至 50 mL 无菌离心管内,按照《结核病诊断实验室检验规程》^[3]推荐的 NALC-NaOH 法进行前处理,充分液化后加入 0.067 mmol/mL pH6.8 的磷酸缓冲液(PBS)至刻度 45 mL,混匀,3 000×g 离心 15 min,去上清液,然后加入 2 mL PBS,混匀,分别加 0.5 mL 至 BacT/Alert MP、MGIT 960 7 mL、MGIT 4 mL 管内。余下悬浮液接种于 2 支 L-J 培养基,每管 0.1 mL。最后取 0.1 mL 悬浮液进行涂片、抗酸染色镜检。L-J 管置 37℃ 孵育箱内培养,在开始时,于第 3、7 天各观察 1 次,以后每周观察 1 次,有菌落生长者,经涂片抗酸染色确认后报告阳性并进行菌种鉴定,8 周后未见菌落生长者为阴性。BacT/Alert MP、MGIT 960 7 mL 管分别置仪器内孵育,由仪器自动监测。MGIT 4 mL 管放入 37℃ 温箱内孵育,第 2 天起每天使用判读仪判读阴阳性,直至第 42 天。仪器或手工判读仪提示阳性后,抽取培养液涂片,经抗酸染色证实后报告阳性结果。培养 42 d 未生长者则报告阴性结果。以上操作均按各自操作手册进行。3 种液体培养法阳性菌株接种 L-J 管培养,待菌落形成后与 L-J 法的菌株同时进行菌种鉴定,实验方法按照《结核病诊断实验室检验规程》^[3]推荐的传统生化反应试验进行。

1.3 12 种临床常见分枝杆菌标准菌株的检测限 取生长对数期的 H37RV 结核(ATCC 27294)、堪萨斯(ATCC 12478)、鸟(ATCC 25291)、胞内(ATCC 13950)、戈登(ATCC 14470)、瘰癧(ATCC 19981)、次要(ATCC 23292)、土地(ATCC 15755)、不产色(ATCC 19530)、龟(ATCC 14472)、脓肿(ATCC 19977)、新金黄(ATCC25795)等分枝杆菌标准株菌,用生理盐水将细菌振荡混匀制备成浊度为 1 麦氏单位的生理盐水菌悬液,菌量即为 3×10⁸ CFU/mL,用生理盐水进一步稀释为 3×10⁷~3×10⁶ CFU/mL 菌量管,分别取菌液 0.1 mL 加入到各培养法的培养瓶内进行培养检测。

1.4 统计学处理 所有数据用 SPSS 11.0 统计软件进行分析处理。计算 3 种液体培养和 L-J 培养法检测分枝杆菌的阳性率,4 种方法阳性率的比较采用配对 χ^2 检验。4 种方法检测一致率的比较采用 kappa 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 4 种不同培养方法的检出率 337 份痰标本采用 BacT/Alert MP、MGIT 960 7 mL、MGIT 4 mL、L-J 培养管 4 种方法分离出分枝杆菌 207 株(61.4%),其中结核分枝杆菌菌群(MTBC)167 株,非结核分枝杆菌(NTM)40 株。以上 4 种方法分枝杆菌的检出率为 56.7%(191/337)、56.7%(191/337)、55.2%(185/337)、47.5%(160/337),3 种液体培养法均高于 L-J 法,差异有统计学意义($\chi^2=5.7、5.7、4.0,P<0.05$)。MGIT 4 mL 培养基的检出率与 BacT/Alert MP、MGIT 960 7 mL 相比,差异无统计学意义($\chi^2=0.5,P>0.05$)。涂阳样本有 149 份,阳性率分别为:97.6%(144/149)、98.7%(147/149)、96.0%(143/149)、92.6%(138/149),液体法与 L-J 法比较,差异无统计学意义($\chi^2=0.2、0.5、0.2,P>0.05$)。涂阴样本 188 份,4 法的阳性检出率为 25.0%(47/188)、23.4%(44/

188)、22.9%(43/188)、11.7%(22/188),3 种液体培养法高于 L-J,差异有统计学意义($\chi^2=10.1、8.1、7.5,P<0.05$)。见表 1。

表 1 4 种不同培养方法检测分枝杆菌结果[n=337,n(%)]

培养方法	抗酸染色		合计
	阳性(n=149)	阴性(n=188)	
L-J 法			
阳性	138(92.6)	22(11.7)	160(47.5)
阴性	11(7.4)	166(88.3)	177(52.5)
BacT/Alert MP			
阳性	144(96.6)	47(25.0)	191(56.7)
阴性	5(3.4)	141(75.0)	146(43.3)
MGIT 960 7 mL			
阳性	147(98.7)	44(23.4)	191(56.7)
阴性	2(1.3)	144(76.6)	146(43.3)
MGIT 4 mL			
阳性	143(96.0)	43(22.9)	186(55.2)
阴性	6(4.0)	145(77.1)	151(44.8)

2.2 4 种不同分离培养方法的阳性检测时间 MGIT 960 7 mL 与 MGIT 4 mL 法阳性的平均检测时间最短(11 d)与 L-J 法(20 d)比较差异有统计学意义($t=12,P<0.01$)。BacT/Alert MP 比 L-J 法少 3 d。见表 2。

表 2 4 种不同的分离培养方法的阳性报告时间

培养方法	检测时间	
	阳性检测时间(范围,d)	阳性检测时间均值(d)
L-J 法	4~56	20
BacT/Alert MP	3~56	17
MGIT 960 7 mL	2~56	11
MGIT 4 mL	2~50	11

2.3 4 种方法的污染情况 BacT/Alert MP、MGIT 960 7 mL、MGIT 4 mL、L-J 法四法的污染率分别是:3.0%(10/337)、3.0%(10/337)、4.2%(14/337)、3.3%(11/337)。

2.4 敏感性、特异性、符合率 BacT/Alert MP、MGIT 960 7 mL、MGIT 4 mL 以 L-J 培养结果为标准(剔除污染数据),敏感性、特异性、符合率分别为:93.8%(150/160)、82.7%(134/162)、88.2%(284/322);95.7%(154/161)、83.4%(136/163)、89.5%(290/324);95.6%(153/160)、85.0%(136/160)、90.3%(289/320)。3 种液体培养方法与 L-J 法具有一致性,强度高(kappa=0.8、0.8、0.8, $P<0.05$)。见表 3。

表 3 3 种液体培养方法与 L-J 法检测结果比较(n)

培养方法	n	L-J 法		合计
		阳性	阴性	
BacT/Alert MP	322			
阳性		150	28	178
阴性		10	134	144
MGIT 960 7 mL	324			
阳性		154	27	181
阴性		7	136	143
MGIT 4 mL	320			
阳性		153	24	177
阴性		7	136	143

2.5 检出限 12 株标准分枝杆菌菌株在 4 种方法中的检出限:结核菌标准菌株 H37RV 在 4 法中的检出限均为 30 CFU/mL,鸟、胞内、龟、脓肿四种标准分枝杆菌的检出限为 3 CFU/

mL,新金黄、瘰病、不产色、土、次要分枝杆菌在液体培养法中为 30 CFU/mL,在 L-J 法则为 300 CFU/mL,堪萨斯分枝杆菌在液体培养中为 30 CFU/mL,但在 L-J 法则为 3 CFU/mL,戈登分枝杆菌在 BacT/Alert MP 中为 3 CFU/mL,但在其他 3 法中为 300 CFU/mL。

2.6 实验费用 BacT/Alert MP、MGIT 960 7 mL 两培养基需配套进口仪器,3 种液体培养法的试剂成本为 L-J 法的 5 倍。

3 讨 论

分枝杆菌分离培养是结核病诊断的金标准。本研究采用 3 种液体培养基:BacT/Alert MP、MGIT 960 7 mL、MGIT 4 mL 和 L-J 法对 337 份疑似肺结核患者的初诊痰标本进行培养检测,结果显示 3 种液体培养法的检出率分别是:56.7%(191/337)、56.7%(191/337)、55.2%(185/337)比传统 L-J 法的 47.5%(160/337)高,差异有统计学意义($P<0.05$),与李静等^[4]报道相近。尤其在涂阴肺结核上表现更为明显,其检出率分别是 25.0%(47/188)、23.4%(44/188)、22.9%(43/188)比 L-J 法的 11.7%(22/188)高 2 倍,与 Piersimoni 等^[5]报道相近,显示出液体培养法的优势。这可以从液体培养基的营养成分得到解释,BacT/Alert MP 瓶主要含 7H9 肉汤,加上油酸、甘油等营养成分,配以牛血清蛋白结合游离脂肪酸,保护分枝杆菌,促进其生长,MGIT 4 mL 瓶在此基础上加入右旋糖苷增加营养,触媒分解不利于分枝杆菌生长的过氧化物,MGIT 960 7 mL 比 MGIT 4 mL 多加入多氧乙基硬脂酸盐成分促进结核菌生长。这些营养成分与分枝杆菌全面接触比 L-J 培养基的单一鸡蛋养分与细菌单个面接触生长要好得多。

从阳性检测时间来看,3 种液体培养法的平均阳性报告时间为:17、11、11 d,较 L-J 法的 20 d 缩短了 3~10 d,与相关报道相近^[6-8]。

在对杂菌的抑制作用上,MGIT 960 7 mL 与 MGIT 4 mL 法的添加剂含有多黏菌素 B、两性霉素 B、奈啶酸、甲氧苄氨嘧啶和阿洛西林,可抑制大部分的呼吸道常见菌而不伤害分枝杆菌,BacT/Alert MP 在此基础上添加了万古霉素,增强了抑制 G⁺ 球菌的能力,本研究 3 种液体培养方法的污染率在 3.0%~4.2%间,属正常,证明这些抑菌剂能抑制大部分杂菌^[9-11],与 L-J 固体法的抑菌效果相当。

本研究的检测限试验表明,常见的 12 种分枝杆菌在 4 种培养方法中的检测限较低:3~300 CFU/mL。3 种液体法的敏感性、符合率较高,均在 88.2%以上,特异性稍低(82.7%~85.0%),与 Sorlozan 等^[12]报道相近,与 L-J 法结果具有高的一致性。

综上所述,液体培养法不但对 MTBc 和 NTM 有检出能力及抑杂菌能力,敏感性、特异性好,与 L-J 法结果有高的一致性,并且在检出率、阳性报告时间上优于传统的 L-J 法,而 MGIT 4 mL 成本低,不需昂贵的仪器,可在基层推广。

参考文献

- [1] 李琳芸.血清结核分枝杆菌抗体检测对结核病的诊断价值探讨[J].国际检验医学杂志,2009,30(12):1217-1218.
- [2] 赵雁林,尚美.我国结核病实验室诊断的现状[J].中华检验医学杂志,2007,30(7):725-728.
- [3] 中国防痨协会基础专业委员会.结核病诊断实验室检验规程[M].北京:中国教育文化出版社,2006:23-47.
- [4] 李静,桂晓红,孙丕,等. MGIT 液体培养基检测分枝杆菌效果的评价[J].中华检验医学杂志,2011,34(2):111-114.
- [5] Piersimoni C, Scarparo C, Callegaro A, et al. Comparison of MB/Bact ALERT 3D system with radiometric BACTEC system and Lowenstein-Jensen medium for recovery and identification of mycobacteria from clinical Specimens: a multicenter study[J]. J Clinical Microbiology, 2001, 39(2): 651-657.
- [6] 白广红,梁雅萍,朱蕾. BACTEC MGIT 960 system 快速分离结核杆菌的效果评价[J].实用医技杂志,2006,13(18):3187-3188.
- [7] 徐东芳,王庆. BacT/ALERT 3D 在结核分枝杆菌快速培养和药敏试验中的应用[J].临床输血与检验,2011,13(1):59-61.
- [8] 易松林,谭云洪,欧阳晖. BACTEC MGIT 960 分枝杆菌分析系统结果分析[J].实用预防医学,2008,15(3):877-879.
- [9] García F, Piédrola G, García F, et al. Evaluation of the MB/BacT automated mycobacteria culture system versus culture on Lowenstein medium[J]. Clin Microbiol Infect, 1998, 4(6): 339-343.
- [10] 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): 748-752.
- [11] Tortoli E, Mandler F, Tronci M, et al. Multicenter evaluation of mycobacteria growth indicator tube (MGIT) compared with the BACTEC radiometric method, BBL biphasic growth medium and Lowenstein-Jensen medium[J]. Clin Microbiol Infec, 1997, 3(4): 468-473.
- [12] Sorlozano A, Soria I, Roman J, et al. Comparative evaluation of three culture methods for the isolation of mycobacteria from clinical samples[J]. J Microbiol Biotechnol, 2009, 19(10): 1259-1264.

(收稿日期:2011-06-23)

(上接第 2468 页)

参考文献

- [1] 张顺达,鞠守勇. 抗生素滥用[J]. 科技创新导报,2008(14):177-178.
- [2] 朱仲生,段丽芳,张卫星. 医院内获得性感染调查及预防措施[J]. 中国社会医学杂志,2007,24(1):65-67.
- [3] 魏育林,李亚俊. 脂多糖致小鼠 SIRS 和 MODS 的研究[J]. 急诊医学,2000,6(9):370-373.
- [4] Eidfin DN, Mouton C. A rapid method for preparation of rough and smooth lipopolysaccharide from Bacteroides, Porphyromonas and Prevotella[J]. FEMS Microbiology Letter, 1993, 110(2): 133-138.
- [5] 钟启平,陈恩临. 酶解-凝胶色谱法制备志贺氏菌脂多糖[J]. 微生物学报,1997,24(5):313-315.
- [6] 李晓霞,陆书华,徐建设,等. 大肠埃希菌脂多糖脂质的制备及

对肿瘤的抑制作用[J]. 中华肿瘤防治杂志,2010,14(12):916-918.

- [7] Raetz CRH, Reynolds CM, Trent MS, et al. Lipid A Modification Systems in Gram-Negative Bacteria[J]. Annu Rev Biochem, 2007, 76: 295-329.
- [8] Raetz CRH, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins[J]. Annu Rev Biochem, 2002, 71: 635-700.
- [9] Galanos C, Lfideritz O, Rietschel ET, et al. Synthetic and natural Escherichia coli free lipid A express identical endotoxic activities[J]. Eur Bio chem, 1985, 148(1):1-5.
- [10] Caroff M, Karibian D. Structure of bacterial lipopolysaccharides[J]. Carbohydr Res, 2003, 338(23): 2431-2447.
- [11] Lukaszewicz J, Lugowski C. Biologic activity of lipopolysaccharides[J]. Postepy Hig Med Dosw, 2003, 57(1): 33-53.

(收稿日期:2011-07-16)