

气相色谱法测定结核菌耐药性的研究

梅国华 程冬娥 蔡玉珍

(武汉钢铁公司结核病防治院)

张 天 民

(武汉冶金医学专科学校)

摘要 本文应用气相色谱法对结核菌的耐药性进行了研究。在与传统法对比试验中,两法符合率为 86.4%。气相色谱法可在 6 天报告比较准确的结果,比传统试管法提前 2 周,提示此法有较大的实用价值。

关键词 气相色谱;结核杆菌;耐药性

目前国内外多用间接法作结核菌耐药性测定,一般需要 3—4 周才能得到结果。尤其是当药物加入培养基后,经加温灭菌以及药物与蛋白质结合等因素,使得评价耐药性试验结果难度加大。因此有必要寻找一种较好的方法,以满足临床治疗的需要。

气相色谱 (Gas chromatography, 简称 GC) 法具有选择性强、分离效能高、灵敏度良好、分析速度快等特点,广泛应用于各种化学分析工作中。七十年代国外应用 GC 法分析微生物的研究越来越多,1976 年 Larsson 把它用于分枝杆菌特征的检测^[1]。国内周方等^[2,3]对微生物包括分枝杆菌的分析鉴定也做了多年的研究。近年来我们根据 GC 分析结核菌代谢产物的原理^[4],来测定细菌对药物敏感性,即测定结核菌在静止的液体培养基中氧的消耗量和二氧化碳释放量,以之判断细菌对药物的敏感程度,现将实验结果报告如下。

材料与方 法

(一) 仪器及实验条件

1. 气相色谱仪: 上海分析仪器厂 103 型气

相层析仪。

2. 分析条件: 色谱柱为长 2m, 内径 3mm 的不锈钢柱。固定相 GDX-105 (80—100 目)。载气: 氢气。流量: 50ml/分(柱后流速)。压力: 0.8kgf/cm²。采用热导池检定器, 柱温 50℃, 检测室 100℃, 汽化室 120℃。桥流 180 mA。进样量: 每次 100μl (衰减 1/1), 纸速 8 mm/分。

(二) 标准二氧化碳气体

标准 CO₂ 气体含 300ppm, 北京分析仪器厂提供。

(三) 强毒人型结核菌 H₃₇R₆₁ 株

人工诱导的耐 RFP、SM 100μg/ml 的 H₃₇R₆₁, 由北京结核病研究所提供。

(四) 临床实验菌株

68 株临床分离的结核菌株为本院检验科分离, 并经过常规鉴定。所用菌龄均为 3—4 周。

(五) 培养基

气相色谱分析用 Dubos 培养基, 对照培养

本文得到武汉大学化学系吴采蒙、达世禄两位副教授指导, 特此致谢。

基用 Löwenstein-Jensen 培养基。

(六) 抗结核药物及浓度

抗结核药物：乙胺丁醇 (EMB)、异烟肼 (INH)、利福平 (RFP)、卡那霉素 (KM)、链霉素 (SM) 和对氨基柳酸钠 (PAS) 的最终浓度见表 1。

表 1 试验药物在培养基中最终浓度 (μg/ml)

药物	Dubos 培养基		Loewenstein-Jensen 培养基	
EMB	5	10	5	10
INH	1	10	1	10
RFP ^a	10	50	50	250
KM	5	50	10	100 (10 倍量)
SM	5	50	10	100 (倍量)
PAS	1	10	1	10

△除 RFP 为二甲基甲酰胺溶剂外，其余药物均用无菌蒸馏水溶解。

(七) 实验培养瓶及接种细菌量

实验用 29—30ml 的链霉素瓶，瓶口用透明胶盖封口。实验细菌经研磨制成均匀菌悬液，每个试验瓶内接种 10^{-2} mg 的菌，瓶内有含药培养基 10ml。

(八) 样品中二氧化碳含量的计算公式(外算法)

$$\text{CO}_2 \text{ 在样品中的百分含量} = \frac{\text{样品中 CO}_2 \text{ 的峰高}}{\text{标准 CO}_2 \text{ 的峰高}} \times \text{标准 CO}_2 \text{ 的百分含量}$$

结 果

(一) H₃₇R₆ 株取样时间的确定

H₃₇R₆ 株培养 1—2 天的 CO₂ 含量为 0.15—0.17% (v/v) 与对照管相同。第三天开始变化，CO₂ 的含量为 0.35—0.45%，第六天在 1.02% 左右，第八天为 1.59—1.90%，从以上结果看出，H₃₇R₆ 株的对数生长期从第三天开始，至第六天液体上部分的 CO₂ 含量明显增加，故临床试验菌株的测定采取第六天的培养物。

(二) H₃₇R₆ 株在第六天 CO₂ (v/v) 测定结果

H₃₇R₆ 株在含药培养基内第六天液体上部

表 2 第六天 CO₂ (v/v) 测定结果

药 物	浓 度 (μg/ml)	CO ₂ 含量 (%)
EMB	5	0.10—0.19
	10	0.15—0.16
INH	1	0.22—0.28
	10	0.25—0.27
RFP	10	0.22—0.25
	50	0.17—0.31
KM	5	0.25—0.29
	50	0.20—0.22
SM	5	0.26—0.31
	50	0.10—0.40
PAS	1	0.14—0.26
	10	0.23—0.40
无药培养基空白对照		0.1 左右

分的 CO₂ 测定结果 (CO₂ v/v) 见表 2。

(三) 耐药 H₃₇R₆ 株分析结果

耐 RFP 100 μg/ml 及耐 SM 100 μg/ml 株在含 RFP 及 SM 培养基内，液体上部分第六天的 CO₂ 含量在 1.0% 左右，与不加药物管相似说明敏感菌株与耐药菌株间 CO₂ 的产量有明显的差别。

(四) 68 例临床分离的结核菌分析结果

68 例未加药物对照管 CO₂ 含量为 0.20—0.67%，其变化范围较大，说明它们之间的生长速度差异十分显著，故确定耐药界线的标准是：采用同一株空白对照 CO₂ 含量与含药培养基内 CO₂ 含量的比值法。即加药培养基瓶中 CO₂ 含量为无药空白对照的 50% 以下者定为敏感菌株，50—70% 为不完全耐药菌株，70% 以上为完全耐药菌株。

临床分离菌株 GC 测定和常规试管法对照，结果见表 3。

表 3 指出，在 68 例中，两法完全一致的符合率为 87.2%，不符合占 12.8%，其中主要是 EMB 的不符合较多，其原因是 EMB 抑制结核菌生长作用与抑制代谢产物碳源物质作用不一致，前者先于后者，有关这方面的机理尚待进一步探讨。

表3 68例临床分离菌株对比试验结果

药 物	EMB		INH		RFP		KM		SM		PAS	
$\mu\text{g/ml}$	10	5	10	1	50	10	50	5	5	5	10	1
两法符合例数	55	52	60	60	59	63	58	55	65	61	60	65
两法符合率%	80.8	76.4	88.2	88.2	86.7	92.6	85.2	80.8	95.5	89.7	88.2	94.1
平均符合率%	78.6		88.2		89.65		83		92.6		91.5	
总符合率%	87.2											

讨 论

应用 GC 法分析微生物,是通过微生物代谢过程中产生挥发性物质(脂肪酸、酯、醇、酮及挥发胺等)进行分析而实现的。目前这种方法比较成功地应用于厌氧菌的鉴定。原认为结核菌是一群生长代谢缓慢,且不发酵一般糖而不产气的微生物,现已发现结核菌在培养基中能产生特征性代谢产物^[4]。本研究是根据结核菌在生长过程中消耗氧及释放 CO_2 的生理特点,应用 GC 法测定其含量。若细菌对药物敏感,则代谢停止或减弱, CO_2 的释放量减少。反之,耐药菌 CO_2 含量增高。以此来判断细菌对药物的敏感性,通过对 68 例临床标本测定,与试管法比较,其符合率达 87.2%,实验证明 GC 法检测结核菌的耐药性是可行的。

GC 法测定结核菌的耐药性只用 6 天时间就可得到结果,比常规试管法提前 2—3 周。GC 法一份样品的分析时间仅需 2 分钟,6 种药物各 2 个浓度的测定,约 25 分钟即可完成,表明

了此法的快速特点。每次所测定的气体为 100 μl ,可见 GC 法灵敏度较高。在基础试验中重复了多次,所得结果基本一致;在同一标本连续 3 次测定,其结果也基本一致,说明其重复性较好。通过对比试验,说明 GC 法测定结核菌耐药性是可行的,值得推广应用,并使其进一步完善。

现代医学的发展,很大程度上依赖于新技术的应用,临床检验中微生物的仪器分析是当前一个重要课题。这种方法还存在着一些问题,如仪器价格较贵,操作比一般检验技术复杂,以及影响因素较多,但将来这种方法若能取代传统的形态学和复杂的试管试验,将是临床检验工作的突破。

参 考 文 献

- [1] Larsson L et al.: *J Clin Microbiol* 3: 81, 1976.
- [2] 周方等: 中华结核和呼吸系疾病杂志, 6(2): 65, 1983.
- [3] 周方: 中华医学检验杂志, 3: 240, 1980.
- [4] 周方等: 气相色谱法在微生物学和医学中的应用, 第