

計畫編號：DOH91-DC-1038

行政院衛生署疾病管制局九十一年度科技研究發展計畫

BACTEC MGIT 和 microcolony 判讀的直接 Method of proportion 方法二種方法在縮短結核病藥物敏感性報告時間之效益分析

## 研究報告

執行機構：長庚紀念醫院林口醫學中心

計畫主持人：吳竹蘭

研究人員：姜義新 郭安靜 郭力維

執行期間：自 91 年 2 月 16 日至 91 年 12 月 31 日止

\* 本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見 \*

目錄	頁碼
封面	1
目錄	2
中文摘要	3
英文摘要	4
前言	5
材料與方法	6
結果	9
討論	11
建議	12
參考資料	13
表	14

資料讀我檔案

計畫名稱：BACTEC MGIT 和 microcolony 判讀的直接 Method of proportion 方法二種方法在縮短結核菌藥物感受性報告時間之效益分析

計畫編號：DOH91-DC-1038

執行機構：長庚紀念醫院林口醫學中心

計畫主持人：吳竹蘭

計畫主持人服務單位：臨床病理科

計畫主持人職稱：技術主任

研究報告中文摘要：

背景：檢驗室在診斷及控制結核病方面扮演一個很重要的角色，檢驗室應該盡力提供一個快速且正確的結核菌培養方法。美國疾病管制局建議檢驗室接到檢體後，應在平均 15-30 天內發出藥物感受性試驗結果。本研究目的是了解用顯微鏡看 Microcolony 方法對間接 MOP 方法提早偵測抗藥菌株的幫助，同時評估 BACTEC MGIT (Mycobacterial growth indicator tube)系統作抗藥試驗的正確性及兩者成本之差異。方法：自 91 年 7 月 30 日至 91 年 11 月 19 日 355 株由到臨床病理科結核菌室培養出的結核桿菌株，用顯微鏡判讀 Microcolony 方式操作 MOP 藥敏試驗，其中 244 株作 BACTEC MGIT 藥物感受性試驗。結果：B BACTEC MGIT 藥敏試驗方法與傳統 Method of Proportion(MOP)方法一致性比較部分，244 株不重複菌株，BBL MGIT AST SIRE 方法與 MOP 方法比較，對 INH Rifampin Streptomycin Ethambutol 的一致性分別是 95.9%、99.6%、96.3%、96.3%。2、BACTEC MGIT 藥敏試驗方法可發報告時間，244 組 MGIT 藥物感受性試驗平均 7.2 天可以發出報告，範圍是 4-13 天。3、Microcolony MOP 觀察到抗藥菌株的時間，測試 Microcolony MOP 的 324 株菌種中，76 個抗藥菌種判讀平均 15.6 天可以判讀確認抗藥菌株，28 株(37%) 可以在 14 天內判定細菌具抗藥性。4、成本比較：採用 BACTEC MGIT 藥敏試驗方法作結核菌藥物感受性試驗，成本傳統 MOP 方法的 3.9 倍。而 Microcolony MOP 方法成本與成本傳統 MOP 方法相近。結論用 BACTEC MGIT 方法作初步培養及抗藥試驗，平均收件後 18 天可以有抗藥結果，若是由固體培養基菌落作 BACTEC MGIT 藥敏試驗則平均 21 天可以有抗藥結果，都符合美國疾病管制局 15-30 天的建議，但是成本太高，臨床可行性低。用 BACTEC MGIT 試管作初步培養加上 Microcolony MOP 方法，收件後平均 30 天可以有抗藥試驗的結果，雖然是美國疾病管制局的建議的下限，但是成本增加少，臨床檢驗室接受度較高。

中文關鍵詞(至少三個)：結核菌藥物感受性試驗 Method of Proportion BACTEC MGIT

Research Data Archive, Center for Disease Control, The Executive Yuan, R.O.C.  
Readme file

Project Title: Comparison of BACTEC MGIT Automation system and Microcolony reading indirect proportion method of the Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* for the turnaround time and cost analysis

Project Number:DOH91-DC-1038

Executing Institute: Chang Gung Memorial Hospital

Principal Investigator(P.I.):Wu, Tsu-Lan

P.I. Position Title:Chief Technologist

P.I. Institute: Department of Clinical Pathology

Abstract:

**Background** : Laboratories are challenged to provide rapid antimicrobial susceptibility testing (AST) for effective treatment of the tuberculosis. Centers for Disease Control and Prevention of U.S.A. have suggested an aggressive goal of average of 15-30 days for drug susceptibility of MTB. The purpose of this study was to evaluate the reliability of the BACTEC MGIT automation system for testing the susceptibility of *M. tuberculosis* and the benefit of microcolony reading for the indirect Method of Proportion for MTB(microcolony MOP). **Method** Total 355 *Mycobacterium tuberculosis* (MTB)isolates from the Clinical Microbioloy Laboratory of Chang Gung Memorial Hospital were tested by either or both of the BACTEC MGIT automation system or microcolony MOP system for the drug susceptibility of MTB. **Results** : 244 MTB isolates were tested by BACTEC MGIT automation system for drug susceptibility tests. Using the indirect method of proportion (MOP) as the "gold standard," the accuracies of isoniazid, rifampin ,ethambutol, streptomycin susceptibility testing by the direct MGIT system were 92.5%, 99.6%, 96.3% and 96.3%, respectively. Turnaround times were 4 to 13 days (median, 7.2 days) for BACTEC MGIT. Automation system . For 76 drug resistant isolates, the turnaround times were and 10 to 21 days (mean, 15.6 days ) for the Microcolony MOP method .For the cost analysis comparison, the cost for MTB drug suscptibility of BACTEC MGIT automation system was 3.9 times of MOP method, while the cost of microcolony MOP was almost equal to the cost of MOP method.

**Conclusion** :If we use the BACTEC MGIT automation system for both the primary isolation and drug susceptibility, the average days between sample receiving to final reporting drug results will be 18 days. That will fulfill the requirement of Central Disease Control and Prevention of U.S.A. But the cost is too high to be accepted by the clinical laboratories. But if we use the BACTEC MGIT automation system for the primary isolation and the microcolony MOP method for the drug susceptibility, the average days between sample receiving to reporting final drug results will be 30 days. Although it's the lower limit of requirement of Central Disease Control and Prevention of U.S.A, but the cost is acceptable by most clinical laboratories.

Keyword: Antimycobacterial susceptibility test Method of Proportion BACTEC MGIT

前言：

檢驗室在診斷及控制結核病方面扮演一個很重要的角色，檢驗室應該盡力提供一個快速且正確的結核菌培養方法。在美國由於抗藥菌菌株的增加，為避免抗藥菌株的擴散，所以美國疾病管制局建議檢驗室接到檢體後 24 小時內應發出抗酸菌染色結果，平均 14-28 天內發出鑑定結果，平均 15-30 天內發出藥物感受性試驗結果<sup>1</sup>。依本科的統計<sup>2</sup>，使用 BACTEC MGIT 方法平均 11 天，可以偵測菌落，接種 Middlebrook 培養基約 3-5 天可看到菌落，若用 Method of proportion (MOP)方法，則另需 21 天才會有結果，加上培養的時間，平均 39 天才會有最終報告，與美國疾病管制局的建議有一段差距。傳統 MOP 方法作藥物感受性試驗，雖然建議 21 天後判讀結果，但是依據 Welch<sup>3</sup> 等人的報告，如果在顯微鏡下觀察 microcolony，培養抹片陽性檢體可以在平均 7 天看到菌落。但是由於本研究採用 Oxalic acid 處理檢體，直接藥敏試驗顯微鏡觀察雜質多，無法正確在顯微鏡下區分是雜質或菌落，所以本研究目的是了解用顯微鏡看 Microcolony 方法對間接 MOP 方法提早偵測抗藥菌株的幫助，同時評估 BBL MGIT (Mycobacterial growth indicator tube) AST SIRE 作抗藥試驗的正確性及兩者成本之差異。

## 材料與方法

### 一、測試菌株之收集：

收集自 91 年 7 月 30 日至 91 年 11 月 19 日,共 355 株非重複的菌株。其中 244 株作 BACTEC MGIT 藥物感受性試驗, 324 株作 Micorcolony 藥物感受性試驗。

### 二、Microcolony 藥物感受性試驗之操作步驟

#### 1、材料及試劑

1. sterile normal saline 4.5mL/tube, 4 支/件
2. sterile normal saline 含玻璃珠 5mL/tube, 1 支/件
3. Middlebrook sensitivity 7H10 tetra-plate 五種藥+2 Growth control
  - A. Isoniazid(INH) 1.0 $\mu$ g
  - B. Streptomycin(S) 10 $\mu$ g
  - C. Rifampin(RIF) 1.0 $\mu$ g
  - D. Ethambutol(EMB) 5.0 $\mu$ g
  - E. Kanamycin(K) 6.0 $\mu$ g
  - F. Pyrazinamide (PZA) 25 $\mu$ g (biplate) 含 growth control

#### 2、操作步驟：

- A. 先準備好 4.5 mL Saline tube 4 支 label 1-4, 取約 0.5 gm 菌落種入含玻璃珠之 normal saline 中, 在 mixer 上混合到混濁度達 McFarland No.1 的程度。靜置待大顆粒菌落下沉後,以無菌吸管取 0.5 mL 到第一支 4.5mL N.S.做 10 倍稀釋, 重覆作序列 10 倍稀釋,最後稀釋倍數為  $10^{-4}$ 。
- B. 以吸管取  $10^{-2}$  稀釋菌液,接種 0.1mL 到 Middlebrook 7H10 藥敏試驗培養皿上, 包括 1.0 $\mu$ g/mL Isoniazid(INH), 10 $\mu$ g/mL

Streptomycin(S), 1.0 $\mu$ g/mL Rifampin (RIF), 5.0 $\mu$ g/mL Ethambutol (EMB), 6.0 $\mu$ g/mL Kanamycin(K), 25 $\mu$ g/mL Pyrazinamide (PZA) 以及 Growth control (1)。再另取 0.1 mL 之  $10^{-4}$  稀釋菌液接種到 growth control (2)。

- C. 將培養皿一個一個用塑膠袋包好,封口,置於 35 溫箱培養。
- D. 培養基接種後,第三天開始判讀,以後每週一,三,五觀察至 21 天,每次用顯微鏡在 10X 物鏡下觀察菌落。先觀察  $10^{-2}$  之 Growth Control,在此區有菌落後再觀察其它加藥區。每一種藥錠使用 10 個視野來計算。菌落大小以 0.2 cm 做為計算的基準,在 10 個視野下,菌落數達 50 個,報為: +。
- E. 以顯微鏡判讀 6 次後,相當於 2 週,改為肉眼判讀。肉眼判讀之標準,若菌落數 < 50,則報實際數目; 50-100 則 1+; 100-200 則報 2+; 200-500 則報 3+; > 500 則報 4+。以肉眼判讀為 3 次,相當於 1 週。
- F. 當以顯微鏡觀時,含藥區判讀為 1+ 時則視為抗藥性。當以肉眼觀察時,判讀方法為: 抗藥菌百分比 1%,報告 Sensitive; 抗藥菌百分比 > 1%,報告 Resistant。

### 3、品管

- G. 每次必須同時操作一品管菌種 H37 RV, 必須 growth control 有菌落, 且 Growth control(1)總菌落數 > 100 加藥區全未發現菌落,表示培養皿品管通過

### 三、BBL MGIT AST SIRE 藥敏試驗

#### 4. 材料及試劑:

- A. MGIT PANTA 。
- B. MGIT TUBE 。
- C. MGIT Streptomycin 1.0 $\mu$ g/mL 及 4.0  $\mu$ g/mL、 MGIT Isoniazid 0.1  $\mu$ g/mL 及 0.4  $\mu$ g/mL、 MGIT rifampin 1.0  $\mu$ g/mL、 MGIT ethambutol 5  $\mu$ g/mL 及 7.5  $\mu$ g/mL。

5. 操作步驟: :

- A. 由 Middlebrook 7H11 plate or Lowenstein-Jensen slant 菌落:取 1~2 個菌落, 加入 MGIT TUBE 中 ( TUBE 中要加入 0.5 ml MGIT PANTA ), 放入 MGIT 960 機器中培養, 待機器培養出陽性的 MGIT TUBE 再作做 MGIT 藥敏試驗, 或由陽性的 MGIT TUBE 直接作做 MGIT 藥敏試驗。
- B. 將陽性的的 MGIT TUBE 於 1~2 天內(如 3~5 天之陽性管則須稀釋 1:5 後再操作), 以 1:100 蒸餾水稀釋, 加入 0.5 c.c. 於 Control TUBE 中, 再由陽性的 MGIT TUBE, 以原倍 0.5 c.c. 加入 STR 1.0、 STR 4.0、 INH 0.1、 INH 0.4、 RIF 1.0、 EMB 5、 EMB 7.5 之 TUBE 中。將 8 管以 Control、 STR 1.0、 STR 4.0、 INH 0.1、 INH 0.4、 RIF 1.0、 EMB 5.0、 EMB 7.5 排列方式放入 MGIT 專用架中。將其架子上下搖晃, 使菌落與 KIT 混合均勻。將架上條碼掃入, 放入 MGIT 960 機器中培養。
- C. 在 MGIT 960 判讀 5~12 天, 當 CONTROL TUBE 呈陽性後, 機器會再多判讀兩天, 如果兩天內加藥管呈陽性則視為抗藥性, 如果呈陰性則視為 SUSCEPTIBLE。



## 結果

### 1、BBL MGIT AST SIRE 藥敏試驗方法與傳統 Method of Proportion(MOP)方法一致性比較：

共測試 244 株不重複菌株，在 INH 部分，MOP、MGIT 藥敏試驗都具感受性有 193 株、MOP、MGIT 藥敏試驗都呈抗藥性有 41 株，MOP 呈抗藥性、MGIT 呈感受性有 4 株，MOP 呈感受性、MGIT 呈抗藥性有 6 株；在 Rifampin 部分，MOP、MGIT 都具感受性有 229 株，MOP、MGIT 都呈抗藥性有 14 株，MOP 呈感受性、MGIT 呈抗藥性有 1 株；在 Streptomycin 部分，MOP、MGIT 都具感受性有 217 株、MOP、MGIT 都呈抗藥性有 18 株，MGIT 呈抗藥性、MOP 呈感受性有 9 株；在 Ethambutol 部分，MOP、MGIT 都具感受性有 227 株、MOP、MGIT 都呈抗藥性有 8 株，MGIT 呈抗藥性、MOP 呈感受性有 2 株，MOP 呈抗藥性、MGIT 呈感受性有 7 株。所以 BACTEC MGIT 方法與 MOP 方法比較對 INH、Rifampin、Streptomycin、Ethambutol 的一致性分別是 95.9%、99.6%、96.3%、96.3%。

### 2、BBL MGIT AST SIRE 藥敏試驗方法可發報告時間：

244 組 MGIT 藥物感受性試驗發報告時間分部如表一，平均 7.2 天可以發出報告，範圍是 4-13 天。

### 3、Microcolony MOP 觀察到抗藥菌株的時間

測試 Microcolony MOP 的 324 株菌種中，有 49 株對一種或多種藥物呈抗藥性。其中 38 株對 INH 具抗藥性，8 株對 Ethambutol 具抗藥性、10 株對 Rifampin 具抗藥性、20 株對 Streptomycin 具抗藥性。其中 8 株屬於 MDR-TB。

38 株對 INH 具抗藥性的菌株中，平均 15.8 天可以判定細菌具抗藥

性，範圍是 10-21 天，12 株 (32%) 可以在 14 天內判定細菌具抗藥性，包括 2 株 MDR-TB；8 株對 Ethambutol 具抗藥性的菌株中，平均 16.3 天可以判定細菌具抗藥性，範圍是 11-20 天，3 株 (38%) 可以在 14 天內判定細菌具抗藥性；10 株對 Rifampin 具抗藥性的菌株中，平均 15.6 天可以判定細菌具抗藥性，範圍是 11-20 天，4 株 (40%) 可以在 14 天內判定細菌具抗藥性；20 株對 Streptomycin 具抗藥性的菌株中，平均 15 天可以判定細菌具抗藥性，範圍是 7-20 天，9 株 (45%) 可以在 14 天內判定細菌具抗藥性。整體而言，76 個抗藥判讀平均 15.6 天可以判讀確認抗藥菌株，比標準 21 天快了 5 天，而 28 株(37%) 可以在 14 天內判定細菌具抗藥性。

#### 4、成本比較：

採用 BBL MGIT AST SIRE 藥敏試驗方法作結核菌藥物感受性試驗，試劑成本 1120 元，人員成本為原來的 MOP 成本的一半約 40 元，傳統 MOP 方法的成本約 300 元，所以 BACTEC MGIT 成本是傳統 MOP 方法的 3.9 倍，健保收費的 3.3 倍。

Microcolony MOP 方法試劑成本與傳統 MOP 方法一樣，但是需要增加顯微鏡判讀的人工費用，以本研究結果可知 10 天以後才有可能判定抗藥結果，所以可以安排 10 天後開始一週判讀 2 次，共需要增加判讀 3 次，以每次 5 分鐘計算共需增加成本 100 元，所以 Microcolony MOP 成本為 400 元，為 MGIT 方法的 34%。

## 討論

MGIT 方法與傳統 Method of Proportion(MOP)方法一致性為 95.9-99.6% , 與國外的報告<sup>4-6</sup>相近。MGIT 方法平均 7.2 天(範圍 4-13 天)可以有報告與 Rusch-Gerdes S<sup>5</sup> 等人的平均 8.8 天(範圍 3-14 天)相近。所以如果用 MGIT 方法作培養加上 BBL MGIT AST SIRE 藥敏試驗平均 18 天可以有抗藥結果,若是由固體培養基菌落作 MGIT 藥敏試驗則平均 21 天可以有抗藥結果,都符合美國疾病管制局的建議,但是成本將是健保收費的 3.3 倍,臨床推廣將非常的困難。反之用 BACTEC MGIT 試管培養加上 Microcolony MOP 方法,收件後平均 30 天可以有抗藥試驗的結果,雖然是美國疾病管制局的建議的下限,但是成本增加少,臨床檢驗室接受度較高。

## 結論與建議

如果用 BACTEC MGIT 方法作培養加上抗藥試驗平均收件後 18 天可以有抗藥結果,若是由固體培養基菌落作 BACTEC MGIT 藥敏試驗則平均 21 天可以有抗藥結果,都符合美國疾病管制局 15-30 天的建議,但是成本太高,臨床可行性低。用 BACTEC MGIT 試管培養加上 Microcolony MOP 方法,收件後平均 30 天可以有抗藥試驗的結果,雖然是美國疾病管制局的建議的下限,但是成本增加少,臨床檢驗室接受度較高。

參考文獻：

- 1、 Control for Disease Control.. National MDR-TB Task Force , national plan to combat multidrug-resistant tuberculosis. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 1992,41:1-48
- 2、 Author unpublished data.
- 3、 DF Welch, AP Guruswamy, SJ Sides, CH Shaw, and MJ Gilchrist. Timely culture for mycobacteria which utilizes a microcolony method J. Clin. Microbiol. 1993 31: 2178-2184.
- 4、 Bergmann JS. Fish G. Woods GL. Evaluation of the BBL MGIT (Mycobacterial growth indicator tube) AST SIRE system for antimycobacterial susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis to 4 primary antituberculous drugs. Archives of Pathology & Laboratory Medicine. 2000,124(1):82-6
- 5、 Rusch-Gerdes S. Domehl C. Nardi G. Gismondo MR. Welscher HM. Pfyffer GE. Institution Multicenter evaluation of the mycobacteria growth indicator tube for testing susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to first-line drugs. Journal of Clinical Microbiology. 1999, 37(1):45-8
- 6 Vera Goloubeva, Maryvonne Lecocq, Piotr Lassowsky, Francine Matthys, Françoise Portaels, and Ivan Bastian 2001 Evaluation of Mycobacteria Growth Indicator Tube for Direct and Indirect Drug Susceptibility Testing of Mycobacterium tuberculosis from Respiratory Specimens in a Siberian Prison Hospital J. Clin. Microbiol. 2001 39: 1501-1505.

圖、表。

表一 BBL MGIT AST SIRE 藥敏試驗發報告時間分佈

天 數	件數	百分比
4	1	0.41%
5	18	7.38%
6	73	29.92%
7	59	24.18%
8	47	19.26%
9	31	12.70%
10	5	2.05%
11	5	2.05%
12	4	1.64%
13	1	0.41%
<b>合計</b>	244	