

原 著

BACTEC MGIT 960 システムによる結核菌の迅速薬剤
感受性試験：固形培地を用いる比率法との比較¹阿部千代治 ²青野 昭男 ¹平野 和重¹結核予防会結核研究所, ²結核予防会複十字病院EVALUATION OF THE BACTEC MGIT 960 SYSTEM FOR DRUG SUSCEPTIBILITY
TESTING OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* ISOLATES COMPARED
WITH THE PROPORTION METHOD ON SOLID MEDIA¹*Chiyoji ABE, ²Akio AONO, and ¹Kazue HIRANO¹* *Research Institute of Tuberculosis and* ²*Fukujuji Hospital, Japan Anti-Tuberculosis Association*

The methods most widely used for susceptibility testing against anti-tuberculosis drug (AST) are the proportion method on Löwenstein-Jensen egg (L-J), Ogawa egg or Middlebrook agar media, and BACTEC TB 460 system. Recently, drug concentrations have been established for AST using the automated BACTEC MGIT 960 system (aMGIT). We have evaluated the BACTEC MGIT 960 SIRE kit for AST of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid, rifampin, streptomycin and ethambutol. Also we compared the results with the proportion methods on Middlebrook 7H10 agar (7H10), L-J and Ogawa egg, and the manual MGIT system (mMGIT). Overall concordance rates among aMGIT and the proportion method on 7H10 or Ogawa media were 98.3% and 96.9% for 4 first-line drugs, respectively. Rates were particularly high for isoniazid and rifampin between aMGIT and 7H10 (efficiency of 100%). On the other hand, overall concordance rates among two egg media, L-J and Ogawa were 99.9%. Agreement between aMGIT and mMGIT was high for the AST to isoniazid and rifampin, but lower for the AST to ethambutol (90.9%), which relates to a lower specificity of mMGIT. The mean times to aMGIT and mMGIT results of susceptibility were 7 and 6 days, respectively, contrasted with 3 weeks in 7H10 and 4 weeks in L-J and Ogawa, indicating that both MGIT systems have the potential to consistently meet the turnaround time suggested by Centers for Disease Control and Prevention (CDC) of the United States. These results demonstrate that the fully automated BACTEC MGIT 960 SIRE system for AST is useful for rapid diagnosis of drug resistant tuberculosis.

* 〒204-8533 東京都清瀬市松山3-1-24

* 3-1-24, Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 204-8533 Japan.
(Received 20 Jun. 2001/ Accepted 8 Aug. 2001)

Key words: Drug susceptibility testing, *Mycobacterium tuberculosis*, BACTEC MGIT 960 system, Proportion method

キーワード: 薬剤感受性試験, 結核菌, BACTEC MGIT 960 システム, 比率法

はじめに

1994年に世界保健機関(WHO)と国際結核肺疾患予防連合(IUATLD)は世界的規模で薬剤耐性結核のサーベイランスを開始した¹⁾。これまでに第1報(1994~1997年)と第2報(1996~1999年)が報告された²⁾³⁾。サーベイランスの成績から薬剤耐性結核が世界各地に見られること, イソニアジド(INH)とリファンピシン(RFP)の両者に耐性を獲得した多剤耐性結核の頻度の高い地域があり結核対策を困難にしていることが明らかになった。

適切な治療を行う上で感受性試験の結果を早期に知ることが重要である。米国の疾病対策予防センター(CDC)は検査材料を入手後28日以内に薬剤感受性試験の結果を担当医に報告するよう勧告した⁴⁾。世界では種々の薬剤感受性試験法が用いられているがCDCの勧告を満足する方法は放射性物質を用いるBACTEC TB 460システムのみであった^{5)~9)}。

近年BACTEC TB 460に代わる非放射性迅速培養システムであるMycobacteria Growth Indicator Tube(MGIT)が開発された。手法MGIT(mMGIT)は検査材料からの抗酸菌分離^{10)~15)}および結核菌の薬剤感受性試験^{13)16)~20)}に有効であることが多くの研究から明らかになった。ごく最近, 自動検出装置を備えたBACTEC MGIT 960(aMGIT)が開発され, 主要4抗結核薬の感受性試験の基準濃度が決定された。この研究で, aMGITによる臨床分離結核菌の薬剤感受性試験の成績をミドルブルック7H10寒天培地(7H10), 小川培地またはレーベンシュタイン・イエンセン卵培地(L-J)を用いる比率法およびmMGIT法と比較した。

材料および方法

1. 結核菌分離株

種々の薬剤耐性パターンを持つ121株の結核菌臨床分離株を研究に用いた。分離株の鑑別・同定にはアキュプローブ結核菌群同定(極東製薬), 抗MPB64モノクローナル抗体を用いるイムノクロマトグラフィ²¹⁾(キャピリアTB, ベクトン・ディッキンソン)およびDDHマイコバクテリア(極東製薬)を用いた。また薬剤感受性試験の標準株として結核菌H37Rv(JATA11-01)を用いた。

2. 接種菌の調製

接種菌は540 nmにおける吸光度(OD)が0.1に到達するまでミドルブルック7H9液体培地で培養した(この菌濃度はMcFarland No. 0.5に相当する)。この菌液をすべての薬剤感受性試験の菌原液として用いた。

3. 薬剤感受性試験

(1) aMGIT

BACTEC MGIT 960 SIREキットはBBL MGIT 7 mlチューブ(初回分離チューブと共通), 4種の薬剤(SM, INH, RFP, EMB)それぞれの凍結乾燥バイアルおよびOADCサプリメントから構成されている。凍結乾燥バイアルに4 mlの滅菌蒸留水を加え溶解し, 薬剤溶液とした。薬剤の試験濃度はTable 1に示した。7 mlのMGITチューブに0.8 mlのBACTEC MGIT SIREサプリメントと0.1 mlの薬剤溶液を加え, 試験培地とした。薬剤を含むチューブへの接種のために菌原液から生理食塩水で1:5希釈液を作成した。対照チューブへの接種のために, 1:5希釈液をさらに1:100希釈した。薬剤培地に1:5希釈液を対照培地にはその1:100希釈液を0.5 ml接種した。キャップを閉め, 転倒混和後

Table 1 Drug concentrations used for susceptibility testing

Drug	L-J	Ogawa	7H10	aMGIT	mMGIT
Isoniazid-low	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1
Isoniazid-high	1.0	1.0	1.0	0.4	
Rifampin	40	40	1.0	1.0	1.0
Streptomycin	4.0	10	2.0	1.0	0.8
Ethambutol	2.0	2.5	5.0	5.0	3.5

BACTEC MGIT 960 システムにセットした。チューブは自動的に測定され、対照培地の発育がシステムで決めた陽性値に達した時点の薬剤含有培地の値が比較され、感受性 (S) または耐性 (R) として報告される。

(2) mMGIT

薬剤別に凍結乾燥したバイアルに 4 ml の滅菌蒸留水を加え溶解し、薬剤溶液とした。試験培地は、4 ml の MGIT チューブに 0.5 ml の MGIT OADC サプリメントと 0.1 ml の薬剤溶液を加え、調製した。薬剤培地と対照培地に菌原液の 1:5 希釈液を 0.5 ml 接種し、37℃で培養した。菌接種 3 日目より毎日 365 nm の UV トランスイルミネーターで蛍光を観察した。対照培地に蛍光が現れた後 2 日目以内に薬剤を含むチューブに蛍光が見られた場合は耐性と判定した。これに対し、2 日目以内に蛍光が見られなかった場合は感受性と判定した。

(3) 固形培地による比率法

試験には小川および L-J 卵斜面培地と 7H10 寒天 4 分割平板を用いた。用いた薬剤の濃度を Table 1 に示した。薬剤培地には菌原液の 1:100 希釈の 100 μl (小川および L-J) または 50 μl (7H10) を接種した。対照培地には 1:100 と 1:10,000 希釈液を薬剤培地と同様の量を接種した。7H10 培地は 5% 炭酸ガスインキュベーター、卵培地は通常のフラン器で培養した。結果は、1:10,000 希釈液接種対照培地のコロニー数より薬剤培地のコロニー数が多ければ耐性菌の割合が 1% 以上と判定し、耐性と記録した。7H10 については耐性 (R) の判定は 2 週後に対照培地の発育が 3+~4+ になった時点で行ったが、感受性 (S) の最終判定は 3 週目まで観察を行った²²⁾。同様に卵培地について、感受性 (S) の判定は 4 週目まで待つて行った。

4. 結果の解析

感度 (sensitivity) は真の耐性菌の検出率、特異度 (specificity) は真の感受性菌の検出率、耐性の予測値 (predictive value R, PV-R) は耐性と判定した例の真の耐性の割合、感受性の予測値 (predictive value S, PV-S) は感受性と判定した例の真の感受性の割合、一致率 (efficiency) は真の耐性菌と感受性菌をそれぞれ耐性および感受性と判定した割合として計算した。統計学的有意差はフィッシャーの χ^2 分析により計算した。

結 果

この研究では、aMGIT で得られた薬剤感受性試験の結果を小川、L-J および 7H10 による比率法または mMGIT の結果と比較した。試験には種々の耐性パターンを持つ 121 の臨床分離株を用いた。mMGIT では菌接種後 12 日目まで、aMGIT では 13 日目までに対照培地に発育が見られなかった場合は試験を繰り返した。

INH について、卵培地 (小川と L-J) 間およびミドルブルック培地 (7H10, aMGIT, mMGIT) 間で成績が完全に一致した (Table 2)。4 株は INH の低濃度、5 株は INH の高濃度で卵培地法とミドルブルック培地法の間で異なる結果であった。これらは、すべて卵培地で感受性しかしミドルブルック培地で耐性の結果であった。RFP の結果は、5 方法の間で 98.3% (119/121) の高い一致率であった。異なる成績を示した 1 株は卵培地で耐性しかしミドルブルック培地で感受性であった。もう 1 株は mMGIT で感受性しかし他の方法では耐性であった。ストレプトマイシン (SM) について、110 株 (90.9%) の成績は 5 方法の間で一致していた。11 株は異なる 5 種の耐性/感受性パターンを示した。9 株は mMGIT

Table 2 Comparison of drug susceptibility test results measured with the five systems (n=121)

Drug	No. of isolates with the following results ^a .													
	7H10	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	
aMGIT	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	
mMGIT	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	
L-J	S	R	S	S	R	S	R	S	R	R	R	S	R	
Ogawa	S	R	S	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	
INH-low	57								4		60			
INH-high	69								5		47			
RFP	76		1								1		43	
SM	70		2		5		1		2		1		40	
EMB	77		7		1		1		3		3		4 25	

^a 7H10, Middlebrook 7H10; aMGIT, automated BACTEC MGIT 960; mMGIT, manual MGIT; L-J, Löwenstein-Jensen; S, susceptible; R, resistant.

Table 3 Accuracy and reliability of the aMGIT or mMGIT systems compared with the proportion method on 7H10

Drug	Sensitivity	Specificity	PV-R ^a	PV-S ^b	Efficiency
aMGIT					
INH-low	100	100	100	100	100
INH-high	100	100	100	100	100
RFP	100	100	100	100	100
SM	97.6	97.5	95.2	98.7	97.5
EMB	90.6	95.5	87.9	96.6	94.2
mMGIT					
INH	100	100	100	100	100
RFP	97.7	100	100	98.7	99.2
SM	100	90.0	83.7	100	93.4
EMB	100	86.5	72.7	100	90.1

^a PV-R, Predictive value resistant, ^b PV-S, Predictive value susceptible.

で耐性しかし他の方法の間では耐性または感受性の異なるパターンであった。これに対して、エタンブトール (EMB) の5方法間の一致率は84.3% (102/121) と低かった。異なる結果を示したのは19分離株あり、そのすべてがmMGITで耐性しかしその他の方法間では異なる耐性/感受性パターンであった。

aMGITおよびmMGITの成績を7H10または小川と比較した (Table 3)。aMGITの成績を7H10の成績と比較したとき、INHとRFPの一致率は100%、SMは97.5%、EMBは94.2%であった。mMGITの一致率はINH、RFP、SMについては93%以上であったがEMBの一致率は低かった。これはmMGITの特異性の低さと関連していた。aMGITと小川の全体の一致率は96.9%であり、高い一致率であった (Table 2)。また薬剤別に見てもいずれの薬剤についても95%以上の一致率であった。これに対し、mMGITと小川の一致率はINHとRFPについては96%以上であったが、SMとEMBについては少し低かった。

次に小川法の成績をL-Jまたは7H10の成績と比較した。INH、RFP、SMについて、小川とL-J間で感度および特異性の両者とも100%であり、EMBのそれらは100%と94.4%であった。小川、L-J、7H10間の全体の一致率は96.4%であった。

aMGITとmMGITで得られた成績を比較してみると、INHおよびRFPについては両者の一致率はほぼ100%であったが、SMとEMBは幾分低い一致率であった。

個々の薬剤についてみても全体の一致率で見ても5つの方法の間に統計学的有意の差は見られなかった。

薬剤感受性試験に要する時間は7H10で14~21日、小川とL-Jで21~28日であった。これに対し、aMGITでは5~12日の範囲であり、平均値は7日であった。またmMGITでは3~11日の範囲であり、平均値は6日であった。

考 察

WHO/IUATLDにより計画された世界的規模の薬剤耐性結核のサーベイランスにおいて、L-Jまたは小川培地を用いる比率法、固定濃度法、耐性比率法およびBACTEC TB 460が感受性試験に用いられた²⁾³⁾。中でもL-Jまたは小川培地による比率法を半数以上の諸国で用いていた (58.6%, 34/58)。サーベイランスを開始するにあたり、WHOの地域内から選ばれた supranational reference laboratory (SRL) からなるネットワークを構築し²³⁾、参加諸国における reference laboratory (NRL) の検査の精度をチェックした。1996~1999年に行われたサーベイランスの報告によると、SRLとNRLの間の一致率は82~100%であり、用いた試験法による差は認められなかった³⁾。

今回の研究の目的は新しく開発されたaMGITによる薬剤感受性試験の有用性を確かめることであった。これまでにaMGITまたはmMGITとBACTEC TB 460の成績を比較した報告^{13)16)~20)24)25)}はあるが7H10、L-J、小川の成績とaMGITの成績を比較した報告はない。この研究では、aMGITおよびmMGITで得られた感受性試験の成績を7H10、L-J、小川培地を用いた比率法の成績と比較した。

評価には121株の臨床分離株を用い、5種の感受性試

験法により得られた成績を比較した。3種の固形培地を用いる比率法間に高い一致率が見られた。このことはWHO/IUATLDにより計画されたサーベイランスの成績を支持している。結核菌の薬剤感受性試験について、米国のNational Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)は7H10培地による比率法またはBACTEC TB 460の使用を勧めており、卵培地の使用を勧めていない^{22) 26)}。しかし、今回の研究およびWHO/IUATLDの成績^{2) 3)}は、薬剤感受性試験のために適切な精度管理プログラムが遂行されたならばL-Jまたは小川卵培地による比率法を標準化できることを示している。

aMGITと7H10, L-J, 小川法の全体の一致率は、主要4薬剤について95.5%以上であった。特にINHとRFPについてaMGITと7H10の間的一致率は100%であった。同様の成績をPfyfferら, Bemer-MelchiorとDrugeonも報告した^{24) 25)}。EMBについてaMGITの成績を7H10, L-J, 小川法と比較したとき、それら的一致率は94.2%, 93.4%, 96.7%であった。これに対しmMGITとの一致率は90.1%, 89.3%, 93.4%であり、aMGITより幾分低い一致率であった。全体としてaMGITの方がmMGITより高い一致率であった。EMBに対する試験で見られたmMGITの低い特異性は、結果として他の4法では感受性の菌を耐性として報告することにつながる。同様のことをBergman and Woodsも指摘している¹⁶⁾。mMGITの低い特異性の1つの説明として、EMBの感受性試験に用いている基準濃度がmMGIT (3.5 µg/mL)とaMGITおよび7H10 (5.0 µg/ml)では異なることがあげられる。EMBの薬剤濃度の設定に関しては再考の余地を残している。

感受性の試験に要する時間はaMGITおよびmMGITで約1週間であり、固形培地の3~4週間と比べ対照的である。両液体培地を初回分離および感受性試験に用いることにより、米国のCDCが提案した所用時間⁴⁾内に報告することが可能である。

米国およびヨーロッパの幾つかの国では放射性BACTEC 460 TBを結核菌の迅速薬剤感受性試験に用いている。感受性試験に要する時間は3~15日であり、aMGITまたはmMGITとほぼ同様である^{9) 11)~13) 16)~18) 20)}。BACTEC 460 TBによる感受性試験では培養と測定は別であり、試験培地はフラン器で培養しなければならない。これに対し、BACTEC MGIT 960システムは培養装置を取り込んだ全自動抗酸菌培養検出装置であり、一度セットするだけで試験培地をフラン器から測定器に移す手間が省ける。その上非放射性システムであり、BACTEC 460 TBと比べ培地の取り扱いや使用後の培地の処理など容易である。

これらの結果は、BACTEC MGIT 960システムは薬剤耐性菌の迅速診断のために有用であることを示している。

謝 辞

BACTEC MGIT 960 SIREキットおよび手法MGIT薬剤感受性試験培地は日本ベクトン・ディッキンソン株式会社より提供された。

文 献

- 1) WHO/IUATLD Global Working Group on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance: Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis. WHO/TB/96. 216, Geneva: WHO, 1997.
- 2) WHO/IUATLD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance: Anti-tuberculosis drug resistance in the world. WHO/TB97. 229, Geneva: WHO, 1998.
- 3) WHO/IUATLD Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance: Anti-tuberculosis drug resistance in the world, Report No. 2. Prevalence and trends. WHO/CDS/TB2000. 278, Geneva: WHO, 2000.
- 4) Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, et al.: Guest Commentary: The resurgence of tuberculosis: Is your laboratory ready? J Clin Microbiol. 1993; 31: 767-770.
- 5) Canetti G, Froman S, Grosset J, et al.: Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. Bull WHO. 1963; 29: 565-578.
- 6) Canetti G, Fox W, Khomenko A, et al.: Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. Bull WHO. 1969; 41: 21-43.
- 7) 日本結核病学会薬剤耐性検査検討委員会: 結核菌の薬剤感受性試験, 特に試験濃度改変と比率法導入への提案. 結核. 1997; 72: 597-598.
- 8) Kent PT, Kubica GP: Public health mycobacteriology. A guide for the level III laboratory. CDC, Atlanta, GA, 1985.
- 9) Siddiqi SH, Hawkins JE, Laszlo A: Interlaboratory drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by radiometric and two conventional methods. J Clin

- Microbiol. 1985; 22: 919-923.
- 10) Abe C, Hirano K, Wada M: Evaluation of the Mycobacteria Growth Indicator Tube system using oxygen sensitive fluorescent sensor for rapid detection of mycobacteria. In: Clinical Mycobacteriology, M. Casal ed, Prous Science, Barcelona, 1998, 175-180.
 - 11) Badak FZ, Kiska DL, Setterquist S, et al.: Comparison of Mycobacterium Growth Indicator Tube with BACTEC 460 for detection and recovery of mycobacteria from clinical specimens. J Clin Microbiol. 1996; 34: 2236-2239.
 - 12) Casal M, Gutierrez J, Vaquero M: Comparative evaluation of the Mycobacteria Growth Indicator Tube with the BACTEC 460 TB system and Löwenstein-Jensen medium for isolation of mycobacteria from clinical specimens. Int J Tuberc Lung Dis. 1997; 1: 81-84.
 - 13) Palaci MS, Ueki YM, Sato DN, et al.: Evaluation of Mycobacteria Growth Indicator Tube for recovery and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from respiratory specimens. J Clin Microbiol. 1996; 34: 762-764.
 - 14) Pfyffer GE, Welscher H-M, Kissling P, et al.: Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) with radiometric and solid culture for recovery of acid-fast bacilli. J Clin Microbiol. 1997; 35: 364-368.
 - 15) Sharp SE, Suarez CA, Lemes M, et al.: Evaluation of the Mycobacteria Growth Indicator Tube compared to Septi-Chek AFB for the detection of mycobacteria. Diagn Microbiol Infect Dis. 1996; 25: 71-75.
 - 16) Bergmann JS, Woods GL: Reliability of Mycobacteria Growth Indicator Tube for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to ethambutol and streptomycin. J Clin Microbiol. 1997; 35: 3325-3327.
 - 17) Reisner BS, Gatson AM, Woods GL: Evaluation of Mycobacteria Growth Indicator Tubes for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampin. Diagn Microbiol Infect Dis. 1995; 22: 325-329.
 - 18) Rusch-Gerdes S, Domehl C, Nardi G, et al.: Multicenter evaluation of the Mycobacteria Growth Indicator Tube for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to first-line drugs. J Clin Microbiol. 1999; 37: 45-48.
 - 19) 鈴木克洋, 露口一成, 松本久子, 他: Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) による結核菌の迅速薬剤感受性検査. 結核. 1997; 72: 187-192.
 - 20) Walters SB, Hanna BA: Testing of susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampin by Mycobacterium Growth Indicator Tube method. J Clin Microbiol. 1996; 34: 1565-1567.
 - 21) Abe C, Hirano K, Tomiyama T: Simple and rapid identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by immunochromatographic assay using anti-MPB64 monoclonal antibodies. J Clin Microbiol. 1999; 37: 3693-3697.
 - 22) Woods GL, Brown-Elliott BA, Desmond EP, et al.: Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardia, and other aerobic Actinomycetes; Tentative standard-second edition. NCCLS M24-T2. 2000; 20: 1-59.
 - 23) Laszlo A, Rahman M, Raviglione M, et al.: Quality assurance programme for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in the WHO/IUATLD Supranational Laboratory Network: first round of proficiency testing. Int J Tuberc Lung Dis. 1997; 1: 231-238.
 - 24) Bemer-Melchior P, Drugeon HB: Clinical evaluation of the BACTEC MGIT 960 antimycobacterial susceptibility test of *Mycobacterium tuberculosis* to front line drugs. RICAI Meeting, Paris, 2000.
 - 25) Pfyffer GE, Baker PJ, Stashak PW, et al.: Susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to rifampin and isoniazid: BACTEC MGIT 960 vs BACTEC 460 TB system. In: Abstracts of the 100th General Meeting of the American Society for Microbiology, Los Angeles, 2000.
 - 26) Kiehn TE, Cynamon MH, Inderlied CB, et al.: Antimycobacterial susceptibility testing for *Mycobacterium tuberculosis* standard. NCCLS M-24T. 1995; 15: 1-31.