

临床培养分枝杆菌菌种鉴定方法的比较以及相关临床分析

沈瑶杰 金嘉琳 冯云 阮裴怡 张文宏

【摘要】 目的 评价目前两种商用试剂盒对分枝杆菌菌种鉴定的诊断价值,并对结核及非结核分枝杆菌感染的临床特点进行回顾性分析。**方法** 对临床样本中培养出的 51 株分枝杆菌分别用免疫胶体金法(结核分枝杆菌抗原检测试剂盒)和多重聚合酶链反应(Multiplex PCR)方法(Seeplex® MTB NTM ACE Detection 试剂盒)进行菌株鉴定,并用 16S rDNA 测序的方法评价此两种快速检测技术的诊断价值;在菌种鉴定的基础上分析结核与非结核分枝杆菌临床特点的异同。**结果** 以 16S rRNA 测序结果为金标准,胶体金法敏感性为 56.3% (9/16),特异性为 97.1% (34/35);多重 PCR 法敏感性为 81.3% (13/16),特异性为 100% (35/35)。51 株罗氏培养分枝杆菌阳性菌株中,经明确鉴定为非结核分枝杆菌的共 16 株,主要来自创面、皮肤组织及痰、渗出液等分泌物取材培养,且以龟/脓肿分枝杆菌(50.0%, 8/16)、海分枝杆菌(25.0%, 4/16)感染占多数。**结论** 两种结核分枝杆菌菌株快速鉴定试剂均具有较好的特异性,多重 PCR 法在敏感性上显著优于胶体金法,更适合用于临床对结核分枝杆菌及非结核分枝杆菌的鉴别。16S rDNA 直接测序能更好的鉴定分枝杆菌至种水平,有效鉴别各种非结核分枝杆菌,有助于临床诊断。

【关键词】 分枝杆菌;非结核分枝杆菌;菌种鉴定

Comparison of two methods for the identification of *Mycobacterium* isolates and the relevant clinical analysis SHEN Yao-jie, JIN Jia-lin, FENG Yun, RUAN Pei-yi, ZHANG Wen-hong. Department of Infectious Diseases, Huashan Hospital Fudan University, Shanghai 200040, China
Corresponding author: JIN Jia-lin, Email: jinjialin@fudan.edu.cn

【Abstract】 Objective To evaluate the diagnostic value of two commercial kits in identifying *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) and *Nontuberculous mycobacterium* (NTM) infection, and to compare the clinical characteristics of the two types of infections. **Methods** The MTB isolates from 51 clinical samples were identified by Diagnostic Kit for MTB (Colloidal Gold) and Seeplex® MTB NTM ACE Detection Kit (Multiplex PCR). 16S rDNA PCR assay was applied to compare the diagnostic value of the two methods. The similarity and differences of the clinical characteristics of the two types of infections were compared, retrospectively. **Results** The sensitivities of Colloidal Gold method and Seeplex® Multiplex PCR method were 56.3% (9/16) and 81.3% (13/16), respectively, while the specificities were 97.1% (34/35) and 100% (35/35), respectively. Among the 51 isolates, 16S rDNA direct sequencing demonstrated that 16 of them were NTM, most of which were from cultures of skin samples and sputum, with the majority of *M. chelonae*/*M. abscessus* and *M. marinum* were 50.0% (8/16) and 25.0% (4/16), respectively. **Conclusions** The specificities of the two kits are both high, while the sensitivity of Multiplex PCR method is significantly higher, which is more suitable for clinical practice to distinguish MTB and NTM infection. Furthermore, 16S rDNA direct sequencing could effectively identify *Mycobacteria* to species level, which could be helpful for the clinical diagnosis on distinguishing MTB infection.

【Key words】 *Mycobacterium*; *Nontuberculous mycobacterium*; Bacterium species identification

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2013.01.010

基金项目:上海市卫生局课题(No. 2010088);上海市科委重点项目(No. 10411955000)

作者单位:200040 上海,上海复旦大学附属华山医院感染科(沈瑶杰、金嘉琳、冯云、张文宏),检验科细菌室(阮裴怡);复旦大学生物医学研究院(沈瑶杰、张文宏)

通讯作者:金嘉琳,Email:jinjialin@fudan.edu.cn

分枝杆菌属包括结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)和非结核分枝杆菌(*Nontuberculous mycobacterium*, NTM)。前者由于患病率高,在世界范围内受到了广泛的瞩目,后者属于环境中常见菌群,种类繁多,致病性菌株较少,发病率较低,以往很少受到研究者的重视^[1]。近年来,由于 HIV 传播的日益猖獗,作为机会性感染之一,非结核分枝杆菌渐渐进入人们的视野^[2]。值得重视的是,免疫功能正常的人群中也存在发生非结核分枝杆菌感染的可能。这两类分枝杆菌,由于其对不同抗菌药物敏感性不同,治疗方案存在很大差别,故二者的鉴别具有重要的临床意义^[3]。

传统的分枝杆菌鉴定方法是根据其生物学特征,如生长速度、色素、菌落形态和生化特征,进行形态学鉴定或根据生化试验进行鉴定。近十年来,新的方法也逐步标准化,包括核酸探针、PCR 技术、基因芯片和细胞壁脂肪酸色谱分析等,为临床提供一定的诊治信息^[4]。

本研究对临床分离的 51 株分枝杆菌菌株进行菌种鉴定,评价目前常用的两种商用结核检测试剂盒(胶体金法和多重 PCR 方法)对分枝杆菌菌种鉴定的可靠性,并回顾性分析两类分枝杆菌感染者的临床特点。

资料与方法

一、材料来源

收集本院检验科细菌室 2010 年 3 月~2011 年 7 月通过罗氏固体斜面培养基阳性培养得到的分枝杆菌共 51 株。

二、方法

1. 免疫胶体金法检测:结核分枝杆菌抗原检测试剂盒(商品名:凯必利,杭州创新生物检控技术有限公司产品)是根据免疫层析法原理检测结核培养中分枝杆菌分泌到菌体外的 MPB64 蛋白,用于结核与非结核分枝杆菌的鉴定。将收集到的人体液、组织及支气管灌洗液等临床材料按照说明书进行适当的前处理,然后接种到改良罗氏培养基上,37℃ 培养 2~4 周,直至培养基上能确认菌落生长。采集 1 μl 菌体悬浊于 0.2 ml 生理盐水中并充分混匀,取 100 μl 加入到试剂检测孔中,15 min 后观察,1 h 内判定结果,检测线和质控线均出现紫红色条带为阳性,质控线出现检测线但未出现紫红色条带者为阴性,质控线未出现者表示试剂存在问题而必须重新检测。

2. Multiplex PCR 方法鉴定:Seeplex[®] MTB NTM ACE Detection 试剂盒(美国 Seegen 公司)是基于多重 PCR 原理通过扩增包括 IS6110 及 MPB64 在内的

目的片段达到鉴别 MTB 和 NTM 的目的。按照说明书制备 17 μl PCR Mastermix,包括 4 μl 5 × MTB/NTM ACE PM, 3 μl 8-Mop Solution, 10 μl 2 × Multiplex Master Mix,混匀并短暂离心后加入 3 μl 提取的 DNA 作模板,或同时以 3 μl MTB/NTM ACE PC 作阳性对照和 3 μl ddH₂O 作阴性对照进行 PCR 扩增,反应条件:94℃ 15 min→(94℃ 30 s→60℃ 1 min 30 s→72℃ 1 min 30 s)40 个循环→72℃ 10 min→4℃ ∞。结束后取 5 μl PCR 产物进行 2% 凝胶电泳并鉴定结果。

3. 16S rDNA 测序鉴定:采用 Qiagen DNA mini 试剂盒提取分枝杆菌培养阳性菌株 DNA,合成 16S rDNA 通用引物^[5], 8FPL:5'-AGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 及 1492:5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3',将提取的 DNA 进行 PCR 扩增。50 μl PCR 反应体系:37.5 μl ddH₂O, 1 μl 模板 DNA, 5 μl 10 × PCR Buffer(含 Mg²⁺), 4 μl dNTPs (2.5 mmol/L), 20 μmol/L 引物 8FPL 和 1492 各 1 μl, 2.5 U rTaq DNA 聚合酶(TaKaRa)。PCR 循环条件为 95℃ 5 min→(95℃ 40 s→55℃ 40 s→72℃ 1 min 30 s)35 个循环→72℃ 10 min→4℃ ∞。凝胶电泳检测后送 Invitrogen 公司测序,序列比对后确定相应菌种。

三、病史回顾性分析

收集所有病例资料进行回顾并分析其临床特点。

结 果

一、菌种鉴定结果

本研究收集到经抗酸染色阳性鉴定为分枝杆菌菌株共 51 株。对已通过免疫胶体金法和多重 PCR 法鉴定的 51 株分枝杆菌进行 16S rDNA PCR 测序鉴定,菌种结果及其相应培养标本的采集来源部位见表 1。

二、临床资料

本研究入组 51 株分枝杆菌菌株,来自 50 例患者,这些患者免疫功能均未发现异常。皮肤和局部伤口感染中,海分枝杆菌感染者 4 例,龟/脓肿分枝杆菌感染者 2 例。回顾性分析 4 例海分枝杆菌感染者,其中 1 例有鱼缸锐物刺伤史,1 例有拖把木制把柄刺伤史,1 例有铝合金划伤手指史,1 例病史不详或失访。而结核分枝杆菌皮肤创面感染者中,其中 1 例有甲沟炎拔甲史,其余均无刺伤史。两者的病灶形态及分布区别不大,两种菌株感染若累及关节者均可造成关节肿胀僵硬,海分枝杆菌感染者可造成皮肤多发结节样病灶。病理组织学检测可见肉芽肿反应或朗罕巨细胞反应。

表 1 16S rDNA 测序结果及标本来源分布

标本类型	MTB(株)	NTM(株)	NTM 菌种
痰/灌洗液	13	6	龟/脓肿分枝杆菌 5 株,偶发分枝杆菌 1 株
皮肤/局部创面	7	7	海分枝杆菌 4 株,龟/脓肿分枝杆菌 2 株,其他 1 株
尿液	0	1	龟/脓肿分枝杆菌 1 株
体液(胸腹水,脑脊液)	14	1	鸟分枝杆菌 1 株
血液	1	1	鸟分枝杆菌 1 株
合计	35	16	

注:表中两株鸟分枝杆菌均来源于同一播散性非结核分枝杆菌感染患者血液和胸水培养

三、两种快速鉴定技术的诊断价值

以 16S rDNA PCR 测序结果为标准,评价结核分枝杆菌抗原检测试剂盒(免疫胶体金法)和 Seeplex® MTB NTM ACE Detection 试剂盒(Multiplex PCR 方法),两者的敏感性分别为 56.3% (9/16) 和 81.3% (13/16),特异性分别为 97.1% (34/35) 和 100% (35/35),如表 2 所示两种方法均具有较高的特异性,但多重 PCR 法的敏感性显著优于胶体金法,更适合用于临床中 MTB 与 NTM 的鉴别。

表 2 两种快速鉴定方法与测序鉴定[例(%)]

		16S rDNA 测序	
		MTB(n = 35)	NTM(n = 16)
胶体金法	MTB	34(97.1)	7(43.7)
	NTM	1(2.9)	9(56.3)
多重 PCR 法	MTB	35(100)	3(18.7)
	NTM	0	13(81.3)

讨 论

由于愈来愈多的 NTM 对一线抗结核药物耐药,故准确鉴别 NTM 与 TB 具有重要的现实意义。目前,国内菌种鉴定方法主要参照 1984 年《全国结核病细菌学检验规程》及 1995 年中国防痨协会《结核病诊断细菌学检验规程》进行,即在改良罗氏、对硝基苯甲酸、噻吩-羧酸酐鉴别培养基上均生长的为非结核分枝杆菌;在改良罗氏、噻吩-羧酸酐鉴别培养基上生长而在硝基苯甲酸培养基上不生长的为结核分枝杆菌^[6]。但此种方法耗时较长,且需要依赖检验人员的经验,提供临床信息较慢,并且无法发现菌种变异或者新菌种。

胶体金法的原理则是通过结核分枝杆菌的培养中分泌到菌体外的蛋白质 MPB64 (Mycobacterial Protein from BCG of RM 0.64 in electrophoresis) 与胶体金标记的抗-MPB64 单克隆抗体 A 形成的免疫复

合物,由于毛细管层析现象而移动至被检测线(T),被其中固定化的抗-MPB64 单克隆抗体 B 捕捉,于是在 T 处因胶体金的作用形成肉眼可见的紫红色条带,判为阳性,即 MTB。胶体金法是在 ELISA 基础上发展起来的一种检测技术,具有操作简便、快捷(5~10 min)、可单份检测、便于保存、不需特殊设备、价格便宜等优点,但胶体金法易受环境、湿度、反应时间及加样量的影响,不宜作为确诊实验。鉴于其简便快速,且不需特殊设备并可单份检测等独特的优点,常应用于基层医疗单位以及其他医疗单位为门诊患者或野外、大批量时间较紧的检测或大面积普查等提供方便、快捷的初筛试验^[8]。

而 Seeplex MTB NTM ACE 检测试剂盒则基于多重 PCR 原理通过扩增包括 IS6110 和 MPB64 在内的目的片段达到鉴别 MTB 和 NTM 的目的。PCR 具有特异、敏感、产率高、快速、简便、重复性好以及易自动化等优点,多重 PCR 可以在同一检测管内,同时检测多个指标,进一步提高了效率,节省了时间;缺点则是由于引物间的配对、引物间的竞争性扩增、退火温度等均可影响多重 PCR 的扩增效果,可通过优化 PCR 反应体系和条件来达到最佳效果^[9]。

16S rDNA 鉴定方法是对分枝杆菌的 16S rDNA 基因进行测序,并与基因库进行比对,可将分枝杆菌鉴定至种及种以下水平,已成为鉴定分枝杆菌菌种的黄金标准^[7]。16S rDNA 方法较传统方法简单快速准确,但由于需要进行 PCR 产物测序,费用及耗时也较为可观。而两种商用试剂盒具有较高的特异性,可区分本研究所入选的大部分 MTB 和 NTM,且方便、快捷,可为临床诊治提供依据。但其缺点在于不能将 NTM 鉴定至菌种,而 NTM 的治疗方案选择及疗程与其菌种相关,故最终的鉴定仍需依靠 16S rDNA 测序法鉴别。

根据临床菌株来源部位的总结分析,发现 NTM 主要出现在皮肤关节感染中且以海分枝杆菌感染为主,与国外研究结果一致^[10]。另外,从同一例播散

性非结核分枝杆菌感染者的血液及胸水中分别培养出分枝杆菌,经鉴定均为鸟分枝杆菌。提示临床医师需要注意在皮肤感染和全身播散性感染诊断中不要忽视非结核分枝杆菌的可能,本研究回顾性分析患者的临床表现,结果发现一些 NTM 感染者有皮肤异物刺伤史。国外文献曾报道与海分枝杆菌感染相关的危险因素包括从事水产相关职业、水族馆或者鱼类相关外伤史^[10],与本研究相吻合。由于非结核分枝杆菌广泛分布于环境中,故需要在临床诊断中注意,有皮肤异物刺伤者除了革兰阳性球菌和真菌等感染的可能性外,非结核分枝杆菌也需纳入考虑范围。此外,从临床表现及病理等方面看,NTM 和 MTB 感染还是较难区别的,准确鉴别这两种感染还是需要依赖分枝杆菌培养及菌种鉴定等辅助检查。

此外,结核特异性 γ -干扰素释放的酶联免疫斑点试验(T-SPOT. TB 检测)具有较高的特异性和敏感性,目前已广泛应用于结核感染的早期诊断中^[11]。虽然仍无法区分活动性结核与潜伏性感染,但值得注意的是,有研究报道,共有 11 例患者曾行 T-SPOT. TB 检查,1 例 NTM 感染者为阴性,10 例 MTB 感染者 T-SPOT. TB 检查(包括外周血及体液)均为阳性,显示了该检查对于 MTB 感染良好的特异性,或者说,该检查不仅是结核分枝杆菌感染的诊断试验^[12],在某种程度上同样可以作为鉴别结核及非结核分枝杆菌感染的手段之一。

参 考 文 献

1 中华医学会结核病学分会. 非结核分枝杆菌病诊断与处理指南.

中华结核和呼吸杂志,2000,23(11):650-653.

- 2 Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, et al. An official ATS/IDSA Statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007,175(4):367-416.
- 3 何国钧,肖和平. 非结核分枝杆菌病的治疗研究进展. *抗感染药学*,2005,2(2):60-63.
- 4 Neonakis IK, Gitti Z, Krambovitis E, et al. Molecular diagnostic tools in mycobacteriology. *J Microbiol Methods*,2008,75(1):1-11.
- 5 Turenne CY, Tschetter L, Wolfe J, et al. Necessity of quality-controlled 16S rRNA gene sequence databases: Identifying nontuberculous mycobacterium species. *J Clin Microbiol*,2001,39(10):3637-3648.
- 6 中国防痨协会. 结核病诊断细菌学检验规程. *中国防痨杂志*,1996,18(1):28-31.
- 7 乐军,谢建平. 分枝杆菌的分子诊断. *国外医学·临床生物化学与检验学分册*,2003,24(1):33-35.
- 8 陈俊林,顾欣荣,顾德林,等. 结核分枝杆菌胶体金法对分枝杆菌菌型快速鉴别价值探讨. *医学综述*,2009,18(15):2847-2848.
- 9 Sarmiento OL, Weikle KA, Alexander J, et al. Assessment by meta-analysis of PCR for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol*,2003,41(7):3233-3240.
- 10 Dodiuk-Gad R, Dyachenko P, Ziv M, et al. Nontuberculous mycobacterial infections of the skin: A retrospective study of 25 cases. *J Am Acad Dermatol*,2007,57(3):413-420.
- 11 吴妹英,王霞芳,肖玉梅,等. 酶联免疫斑点法在快速诊断活动性肺结核中的应用. *中华实验和临床感染病杂志:电子版*,2009,3(2):1-4.
- 12 孟成艳,张舒,金嘉琳,等. T-SPOT TB 技术用于结核的辅助诊断. *微生物与感染*,2006,1(3):190-192.

(收稿日期:2012-06-06)

(本文编辑:孙荣华)

沈瑶杰,金嘉琳,冯云,等. 临床培养分枝杆菌菌种鉴定方法的比较以及相关临床分析[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志:电子版*,2013,7(1):46-49.