

• 短篇论著 •

BACTEC MGIT 960 培养管内浑浊生长抗酸杆菌的分析

杨翰 党丽云 崔晓利 尤震宇 谈小文 刘元

【摘要】 收集 2012 年 11 月至 2015 年 12 月西安市胸科医院分枝杆菌培养阳性标本中, 在 BACTEC MGIT 960 培养管内浑浊生长且萼-尼抗酸染色阳性的标本 58 份(来自 58 例患者)。通过萼-尼染色、对硝基苯甲酸(PNB)鉴别培养、MPB64 蛋白免疫胶体金法检测、结核分枝杆菌(MTB)及非结核分枝杆菌(NTM)特异性基因片段 PCR-荧光探针法检测、DNA 微阵列芯片法菌种鉴定及耐药基因检测等方法对这 58 例标本进行菌种鉴定, 并回顾 58 例患者的相关标本的 MTB 及 NTM 特异性基因片段 PCR-荧光探针法的检测结果。结果发现, 58 份标本浑浊生长抗酸杆菌呈分散逗点、杆状生长; 其中 56 份标本有 NTM 单独生长, 1 份为 MTB 单独生长, 1 份为 NTM 和 MTB 混合生长。58 例患者中有 5 例存在 NTM 与 MTB 混合感染, 且 MTB 的利福平和异烟肼耐药基因均为野生型。由此可初步判定浑浊生长的培养管需排除管内 NTM 生长后, 才能判断 MTB 单独感染。

【关键词】 分枝杆菌; 结核; 分枝杆菌感染; 诊断, 鉴别

Analysis of acid fast bacilli with turbidity growth in the BACTEC MGIT 960 culture tubes YANG Han, DANG Liyun, CUI Xiao-li, YOU Zhen-yu, TAN Xiao-wen, LIU Yuan. Xi'an Chest Hospital, Xi'an 710061, China
Corresponding author: DANG Li-yun, Email: dangliyun@sina.com

【Abstract】 Specimens with mycobacterium positive from Xi'an Chest Hospital between November 2012 and December 2015 were collected, and of them, 58 specimens from 58 patients were with turbidity growth in culture tubes and were found positive using acid-fast staining. The 58 specimens were dealt with acid-fast staining, PNB differential culture, immune colloidal of MPB64 protein, non-tuberculosis mycobacteria (NTM) specific real-time fluorescence quantitative PCR, DNA microarray and drug resistance gene to identify the component of the bacteria. Results of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) and NTM specific real-time fluorescence quantitative PCR were reviewed and it was found that all the 58 specimens with turbidity growth growing in types of comma and pod; 56 of them separately grew with NTM, one with MTB separately and one with MTB and NTM mixed. Five cases were infected by both MTB and NTM, and resistance genes of RFP and INH were both wild type. Hence, separate infection of MTB could be confirmed only after ruling out the growth of NTM.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; Mycobacterium infections; Diagnosis, differential

BACTEC MGIT 960 是目前应用最广泛的液体培养基全自动分枝杆菌检测仪器。其进行分枝杆菌培养时偶尔会出现培养管内抗酸杆菌浑浊生长的情况。对上述现象进行深入了解并分析其成分, 笔者收集 2012 年 11 月至 2015 年 12 月西安市胸科医院分枝杆菌培养阳性并在 BACTEC MGIT 960 培养管内浑浊生长且萼-尼抗酸染色阳性的标本, 对生长物进行抗酸染色观察其形态, 并鉴定分析菌液成分, 现报告如下。

材料和方法

1. 材料: 收集 2012 年 11 月至 2015 年 12 月西安市胸科医院分枝杆菌培养阳性标本 7389 份, 选取其中在培养管内

浑浊生长且萼-尼抗酸染色阳性标本 58 份, 来自 58 例患者。

2. 仪器和试剂: 抗酸染色试剂盒(批号: 412091; 珠海贝索生物技术有限公司)、结核分枝杆菌抗原检测试剂盒(批号: TB140701、TB150902; 杭州创新生物检控技术有限公司)、分枝杆菌核酸检测试剂盒(批号: 0108141504; 北京博奥生物技术有限公司)、结核分枝杆菌菌种鉴定试剂盒(批号: 0106151512; 北京博奥生物技术有限公司)、结核分枝杆菌耐药基因检测试剂盒(批号: 01112151606; 北京博奥生物技术有限公司)、ABI7300 荧光定量 PCR 仪(美国应用生物公司)、杂交仪 BioMixer™ II (北京博奥生物技术有限公司)、芯片扫描仪 LuxScan-10K/B(北京博奥生物技术有限公司)。

3. 萼-尼氏抗酸染色: 取 0.1 ml 菌液涂片, 并加入 1 滴小牛血浆, 待干燥后应用紫外线消毒 2 h, 固定进行萼-尼抗酸染色^[1]。

4. 对硝基苯甲酸(PNB)鉴别培养^[2]: 取 0.2 ml 菌液接种在 PNB 鉴别培养基斜面上, 37 °C 恒温箱内放置 4 周观察结果, 结果判读: 有抗酸菌生长则该抗酸菌为非结核分枝杆菌(NTM); 不生长则该抗酸菌为结核分枝杆菌(MTB)。

5. MPB64 蛋白免疫胶体金法检测^[3]:取 100 μl 液体培养基菌悬液加入到试剂检测孔中,15 min 后观察,1 h 内判定结果。结果判读:检测线和质控线均出现紫红色条带为阳性;质控线出现,但检测线未出现紫红色条带者为阴性;质控线未出者表示试剂存在问题,须重新检测。

6. MTB 及 NTM 特异性基因片段 PCR-荧光探针法检测:取 1 ml 菌液加入 1.5 ml 离心管中,以离心半径 9.7 cm,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 1 ml 生理盐水涡旋震荡后,再以离心半径 9.7 cm,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清。向沉淀中加入 50 μl 核酸提取液并转入带磁珠的核酸提取管中,提取仪快速震荡 10 min,然后 95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min。取 2 μl 提取好的核酸溶液加入 18 μl PCR 扩增试剂中进行扩增:37 $^{\circ}\text{C}$ 、300 s(1 个循环),94 $^{\circ}\text{C}$ 、180 s(1 个循环),94 $^{\circ}\text{C}$ 、15 s(40 个循环),60 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s(40 个循环),50 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s(1 个循环);荧光采集点选择 60 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,同时检测 FAM 通道和 HEX 通道。结果判读:样本曲线与阈值线交点的横坐标读数循环阈值(Ct 值) <40 的样本为阳性,Ct 值 >40 或无数值的为阴性,检测结果的解释见表 1。

表 1 MTB 及 NTM 特异性基因片段 PCR-荧光探针法检测结果解释		
检测结果		结果解释
FAM 通道	HEX 通道	
+	+	MTB 核酸检测阳性
+	-	MTB 核酸检测阳性
-	+	NTM 核酸检测阳性
-	-	分枝杆菌核酸检测阴性

注 FAM 通道为 MTB 复合群特异性序列荧光标记探针通道;HEX 通道为分枝杆菌特异性序列荧光标记探针通道

7. NTM 的菌种鉴定^[4-6]:采用 DNA 微阵列芯片法。杂交反应:按每管 9 μl 分装,每管加入 6 μl 相应 PCR 产物形成杂交产物混合液,将混合液加热 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min,立即冰浴 3 min;将杂交反应混合物混匀,经盖片的加样孔加入 13.5 μl 杂交反应混合物,密封;芯片洗涤液 I、II 洗涤芯片,在恒温摇床上使用 80~100 r/min 转速,室温洗涤 3 min,然后以离心半径 7 cm,800 r/min 离心 5 min,甩干扫描。结果判断:探针信号值与参考值进行比较,如果探针信号值大于或等于该探针的参考值,则判读为阳性,否则判读为阴性,以探针信号的组合情况来确定相应的分枝杆菌种或群。

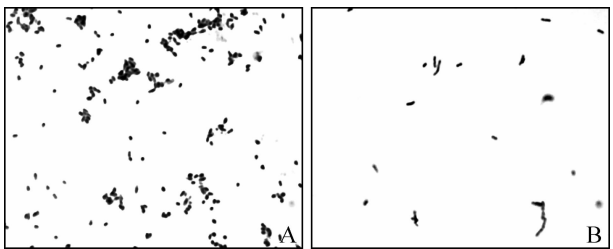
8. 耐药基因检测^[7]:回顾分析 NTM 感染者同时期相关标本 TB-PCR-荧光探针法结果,检测是否存在 MTB 感染,并应用 DNA 微阵列芯片法检测耐药基因。步骤如下:每份标本均进行分枝杆菌属探针序列(扩增产物 1)、*rpoB* 基因位点突变序列(扩增产物 2)、*KatG* 和 *inhA* 基因位点突变序列(扩增产物 3)扩增,扩增程序按说明书要求进行。扩增产物于 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min,立即置冰水中 3 min,每份标本分为 2 管,分别加入 9 μl 杂交缓冲液,其中一管加入 3 μl 扩增产物 1 和 2,另一管中加入 3 μl 扩增产物 1 和 3,吹吸混匀后

从杂交盒的小孔处向芯片点阵加入 13.5 μl 杂交混合物,置于 50 $^{\circ}\text{C}$ 杂交仪中杂交 2 h。按说明书配置洗液 1 和洗液 2,按已设置的洗涤程序洗片,读片结束后置于甩干仪中甩干,然后把芯片放入扫描仪中自动读取数据。结果判读:待测样品某一基因所有检测位点均为野生型则报告该基因为野生型;若待测样本某一个或几个位点为突变型,则报告全部为突变型。

9. 质量控制:(1)萋-尼抗酸染色液及免疫胶体金法检测质量控制:使用 H37Rv 标准菌株进行阳性标本的质控,抗酸染色阴性对照使用已知正常人痰液,免疫胶体金法检测阴性对照使用临床分析已确定的鸟分枝杆菌。(2)PCR-荧光探针法质量控制:采用罗-琴(L-J)质控法,0.5 麦氏单位 H37Rv 菌悬液提取核酸调至 10¹⁰ IU/ml 作为阳性质控应用液,以 $\bar{x} \pm 2s$ 为警告线, $\bar{x} \pm 3s$ 为失控线($\bar{x}$ 为每月阳性质控 Ct 值的平均值, s 为每月阳性质控 Ct 值的标准差),阴性对照品用于检测环境及操作过程中的污染。(3)基因芯片质量控制:每次扩增均使用阳性对照品和阴性对照品,其中阳性对照品可用于杂交过程中的质控,阴性对照品用于检测环境及操作过程中的污染。

结 果

1. 形态分析:对培养管内菌液进行萋-尼抗酸染色,观察到细菌呈分散型生长(逗点样或长杆样),不同于 MTB 的典型索状生长,见图 1。



A:逗点样;B:长杆样

图 1 培养管内细菌生长形态(抗酸染色 $\times 100$)

2. 菌液成分分析:PNB 鉴别培养、免疫胶体金法检测、PCR-荧光探针法进行菌液成分的分析发现 1 号标本为 MTB;2 号标本菌液中存在分泌 MPB 64 蛋白的抗酸杆菌,且 MTB 特异性基因序列有拷贝,证明存在 MTB;而 PNB 鉴别培养基上分离出的菌落不分泌 MPB 64 蛋白,PCR-荧光探针法检测 MTB 阴性,NTM 阳性,经鉴别为 NTM,因此,考虑 2 号标本存在 MTB 与 NTM 混合生长。3~58 号标本均为 NTM。

3. 耐药情况分析:对 2~58 号标本分离出的 NTM 进行菌种鉴定,结果显示,鸟分枝杆菌 7 份、胞内分枝杆菌 32 份、堪萨分枝杆菌 4 份、偶然分枝杆菌 1 份、龟-脓肿分枝杆菌 10 份、耻垢分枝杆菌 2 份、土分枝杆菌 1 份。

回顾分析 3~58 号标本对应的 56 例 NTM 感染患者同时期相关标本 TB-PCR-荧光探针法结果,发现仅有 3~6 号

这 4 例患者 TB-PCR 结果阳性,存在混合感染。对这 4 例 TB-PCR 产物进行耐药基因分析,结果均为利福平和异烟肼敏感(野生型),同时检测 2 号标本对应患者耐药基因,也为利福平和异烟肼敏感(野生型)。

讨 论

BACTEC MGIT 960 液体培养主要用于 MTB 培养。典型的 MTB 呈索状生长(即非浑浊的,成颗粒或团块生长)^[8],污染菌呈均匀浑浊生长,这些污染菌抗酸染色为阴性。笔者对培养管内均匀浑浊生长的不典型抗酸杆菌进行了分析,了解菌液的成分,并对分析菌液成分时发现的混合感染进行了深入的探讨。

本研究显示,58 份浑浊生长的不典型抗酸杆菌培养管内,细菌生长的形态区别于 MTB 复合群的索状生长形态,呈分散的逗点和长杆样生长^[9-10]。通过对细菌 16s 特异性序列的鉴别,发现 NTM 生长的有 57 份标本。究其原因,可能是 NTM 含索状因子较少或不含所致。因此,BACTEC MGIT 960 培养管浑浊生长可以作为 NTM 的初步筛查依据,当 BACTEC MGIT 960 培养管内菌液呈浑浊生长时,应考虑 NTM 的存在。

研究中,1 号标本经鉴定为 MTB,将菌液进行传代培养,抗酸杆菌恢复了索状生长,并分泌 MPB 64 蛋白。其浑浊生长的具体原因可能为细胞壁成分的缺失,L 型变异,导致索状因子的减少。2 号标本经分析,慢生长分枝杆菌与 MTB 的生长速度基本相同,两种细菌得到合适的生长条件从而共同生长。1、2 号标本提示,BACTEC MGIT 960 液体培养中,抗酸染色初步鉴定为抗酸杆菌后,需要进一步鉴定出抗酸杆菌是 MTB 或 NTM。

从 2 号标本可以看出,MTB 与 NTM 混合感染不能忽略。因为治疗方案的不同,实验室对混合感染的检测可以帮助临床医生及时做出正确诊断^[11-12]。本次筛选的 57 例 NTM 感染的患者中,回顾分析其同期相关标本的 MTB 特异性核酸 PCR 的结果,有 5 例菌种鉴定为 MTB。分析原因,可能为龟-脓肿分枝杆菌等快生长分枝杆菌生长迅速,消耗大量营养物质,导致 MTB 营养不良,无法繁殖。这 5 例患者 MTB 耐药基因均为野生型,对异烟肼和利福平敏感。

综上所述,利用浑浊生长这种细菌形态学上特点,可有助于 NTM 感染的早期筛查。培养结果结合早期基因检测,

可以避免混合感染患者的漏诊。MTB 与 NTM 混合感染时,必须各有一种方法证明两种细菌的存在,如传统的 MPB 64 蛋白与 PNB 罗氏培养基检测,或基因层面测定细菌的特异性序列^[13];应建立一个可靠的病原学诊断流程,对混合感染做出明确的诊断,给临床提供可靠的信息。

参 考 文 献

- [1] 赵雁林. 结核病实验室诊断技术培训教程. 北京:人民卫生出版社, 2014:13-17.
- [2] 张洁, 邢青, 王甦民, 等. 传统培养法与 PCR-荧光探针法鉴定分枝杆菌的对比研究. 中国防痨杂志, 2015, 37(3): 291-294.
- [3] 白广红, 李耀军, 焦向阳. 胶体金法快速检测结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌的研究. 国际检验医学杂志, 2013, 34(10): 1274-1276.
- [4] Molicotti P, Bua A, Cannas S, et al. Identification of non-tuberculous mycobacteria from clinical samples. New Microbiol, 2013, 36(4): 409-411.
- [5] Hashemi-Shahraki A, Bostanabad SZ, Heidarieh P, et al. Species spectrum of nontuberculous mycobacteria isolated from suspected tuberculosis patients, identification by multi locus sequence analysis. Infect Genet Evol, 2013, 20: 312-324.
- [6] 李地灵, 陈晋. 非结核分枝杆菌的实验室鉴定方法学进展. 国际检验医学杂志, 2013, 34(14): 1840-1842.
- [7] 李桂莲, 张敬蕊, 赵秀芹, 等. 结核分枝杆菌对异烟肼和利福平的耐药水平与其耐药基因突变的相关性研究. 中国防痨杂志, 2012, 34(6): 354-359.
- [8] 赵立平, 于霞, 姜广路, 等. 对 BACTEC™ MGIT 960 培养报告结果为阴性的培养管中颗粒性物质的研究. 中国防痨杂志, 2013, 35(1): 27-31.
- [9] 邹盛华, 戴腊梅, 张丽水. BACTEC960 培养阳性 530 株分枝杆菌的形态学特征探讨. 中国防痨杂志, 2009, 31(4): 195-198.
- [10] 罗春明, 黄业伦, 邹桂敏. 光镜观察液体培养基中结核与非结核分枝杆菌生长形态的比较. 广东医学院学报, 2007, 25(2): 192-193.
- [11] 何司琪, 陈品儒. 快速生长分枝杆菌肺病 94 例临床分析. 中国防痨杂志, 2015, 37(9): 948-952.
- [12] 吴龙章, 谭守勇, 谭耀驹, 等. 1819 株非结核分枝杆菌行药物敏感性试验的结果分析. 中国防痨杂志, 2012, 34(12): 821-824.
- [13] 桂静, 王峰, 李金莉. 非结核分枝杆菌菌种 ITS-PCR 测序鉴定法与表型鉴定法对比观察. 检验医学, 2012, 27(11): 908-912.

(收稿日期:2016-06-02)

(本文编辑:李敬文)