

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

桂 静, 王 峰, 李金莉

(广东省深圳市慢性病防治中心病原检验科, 广东 深圳 518020)

摘要:目的 评价 16S~23S rRNA 基因转录间隔区聚合酶链反应 (ITS-PCR) 在非结核分枝杆菌 (NTM) 菌种鉴定中的临床价值。方法 采用 ITS-PCR 鉴定随机抽取的 80 株 NTM, 应用生长特性鉴定试验及鉴定性药物敏感性试验鉴定其表型特征, 将 3 种鉴定方法所示结果进行对比分析。结果 80 株 NTM 中, 鸟-胞分枝杆菌复合群 (MAC) 与脓肿分枝杆菌共占 85%, 运用 ITS-PCR 可将脓肿分枝杆菌、堪萨分枝杆菌、偶发分枝杆菌、苏尔加分枝杆菌准确鉴定, 与生长特性鉴定试验及鉴定性药物敏感性试验结果基本符合; MAC 采用 3 种方法鉴定其结果符合率存在偏差。结论 NTM ITS-PCR 鉴定法与表型鉴定法相结合更适合临床应用。

关键词:非结核分枝杆菌; 基因转录间隔区聚合酶链反应; 生长特性鉴定试验; 药物敏感性试验

Contrast observation of ITS-PCR identification and phenotypic identification for nontuberculous *Mycobacterium* GUI Jing, WANG Feng, LI Jinli. (Department of Pathogenic Laboratory, Shenzhen Center for Chronic Disease Control, Guangdong Shenzhen 518020, China)

Abstract: Objective To evaluate the clinical significance of 16S-23S rRNA intergenic transcribed spacer-polymerase chain reaction (ITS-PCR) identification for nontuberculous *Mycobacterium* (NTM). **Methods** A total of 80 NTM identified by ITS-PCR were randomly selected. Phenotypic characteristics of NTM were identified by growth characterization test and drug sensitivity test. The results for the 3 identification methods were analyzed contrastively. **Results** The proportion of *Mycobacterium avium complex* (MAC) and *Mycobacterium abscessus* was 85%. *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium szulgai* were identified accurately by ITS-PCR. The results were consistent among the results of growth characterization test, drug sensitivity test and ITS-PCR except that of MAC. **Conclusions** The combination of ITS-PCR with the phenotypic identification for NTM is suitable to the clinical application.

Key words: Nontuberculous *Mycobacterium*; Intergenic transcribed spacer-polymerase chain reaction; Growth characterization test; Drug sensitivity test

分枝杆菌属内除结核分枝杆菌复合群(结核分枝杆菌、牛分枝杆菌、非洲分枝杆菌、田鼠分枝杆菌)和麻风分枝杆菌外统称为非结核分枝杆菌(nontuberculous *Mycobacterium*, NTM)。NTM 包含许多菌种, 均来源于自然环境(水、土壤等)中, 其引起的感染被认为是一种机会性感染^[1-2]。对人有致病能力的 NTM 可从临床标本中分离出来, 对分离出的 NTM 予以正确鉴定, 能帮助临床医生慎重判断此细菌与人所患疾病是否符合, 从而确立正规的治疗方案。深圳市慢性病防治中心结核病实验室以 16S~23S rRNA 基因转录间隔区聚合酶链反应(intergenic transcribed spacer-polymerase chain reaction, ITS-PCR)对本实验室分离保存的

80 株 NTM 进行菌种鉴定, 同时对其表型特征进行病原学研究, 评价采用 ITS-PCR 测序法鉴定 NTM 的临床价值, 为临床实验室正确认识和鉴别 NTM 提供试验依据。

材料和方法

一、材料

NTM 临床分离株由深圳市慢性病防治中心结核病参比实验室提供, 药物粉剂纯品异烟肼、链霉素、利福平、乙胺丁醇均购自美国 Sigma 公司; PCR 试剂购自大连(宝)生物技术有限公司; 中性罗氏培养基(L-J)及药物敏感性培养基均由本实验室自配。

二、方法

1. 菌株准备 NTM 试验株为 2008 至 2010 年本实验室 NTM 保存菌株中随机抽取, 共计 80 株, 经对硝基苯甲酸生长试验 (PNB) 重复鉴定为 NTM。6 株标准株分别为鸟分枝杆菌 (ATCC 25291)、胞内分枝杆菌 (ATCC 13950)、堪萨分枝杆菌 (ATCC 12478)、脓肿分枝杆菌 (ATCC 19977)、偶发分枝杆菌 (ATCC 6841)、苏尔加分枝杆菌 (NCTC 10831), 均购自中国医学细菌保藏管理中心, 由本中心实验室转种保存。

2. 细菌 DNA 制备 水煮法提取 DNA。将菌株重悬于水溶液中, 置 100 °C 沸水浴 30 min, 以 5 500 × g 离心 10 min, 取上清液作为 DNA 模板, 于 -20 °C 冰箱保存。

3. 引物合成与扩增 参照文献[3], 根据分枝杆菌 16S ~ 23S rDNA 内转录间隔区序列设计引物。引物序列: ITS F 5'-GAAGTCGTAACAAGGTAGC-CG-3', ITS R 5'-GATGCTCGCAACCACTATCYA-3'。PCR 反应体系 (25 μL): 10 × Taq 缓冲液 2.5 μL, 引物 F (10 pmol/μL) 2.5 μL, 引物 R (10 pmol/μL) 2.5 μL, rTaq DNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.25 μL, dNTP mixture (2.5 mmol/L) 3 μL, 三蒸水 10.25 μL, 模板 DNA 5 μL。反应条件: 95 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 62 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后由上海英骏生物技术有限公司双向测序, 测序引物同扩增引物。

4. DNA 测序及分析 PCR 产物由上海英俊生物科技有限公司纯化及测序。测序得到的基因片段采用 DNASTar 软件和 BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行序列拼接与同源性比对分析。

5. NTM 生长特征鉴定试验 鉴定试验主要包括观察分枝杆菌的生长速度、生长温度、色素产生情况、菌落形态特征及相关生化鉴定试验 (耐热触酶试验和麦康凯琼脂生长试验)。操作步骤参见《结核病诊断实验室检验规程》^[4]。

6. NTM 药物敏感性试验 按 1% 比例法配制含药 L-J 培养基, 方法参见文献[5], 培养基含药浓度分别为异烟肼 1 μg/mL、链霉素 2 μg/mL、利福平 25 μg/mL、乙胺丁醇 5 μg/mL, 取在改良罗氏培养基中传代 2 周后生长良好的菌落研磨、比浊、制备 1 g/L 菌悬液, 以终浓度 1 × 10⁻⁴ 和 1 × 10⁻⁶ g/L 接种于上述不同浓度的含药 L-J 培养基

中, 37 °C 孵育, 每周观察 1 次。

结 果

一、80 株 NTM ITS-PCR 菌种鉴定

80 株 NTM 中速生长型分枝杆菌脓肿分枝杆菌占到试验菌株的 55%, 其次是慢生长型分枝杆菌鸟-胞分枝杆菌复合群 (*Mycobacterium avium complex*, MAC), 所占比率为 30%; 堪萨分枝杆菌、偶发分枝杆菌、苏尔加分枝杆菌所占比率分别为 8%、6% 和 1%, 分离率显著低于脓肿分枝杆菌及 MAC。6 株标准株鸟分枝杆菌 (ATCC 25291)、胞内分枝杆菌 (ATCC 13950)、堪萨分枝杆菌 (ATCC 12478)、脓肿分枝杆菌 (ATCC 19977)、偶发分枝杆菌 (ATCC 6841)、苏尔加分枝杆菌 (NCTC 10831) 测序结果与相应菌种分离株序列匹配。见表 1。

表 1 80 株 NTM 菌种构成情况

菌种	分离数	loyal 分类	构成比 (%)
MAC	24	III	30
堪萨分枝杆菌	6	I	8
脓肿分枝杆菌	44	IV	55
偶发分枝杆菌	5	IV	6
苏尔加分枝杆菌	1	II	1
合计	80	4 类	100

二、NTM 生长特征分析

不同菌株分离株与标准株生长特性基本相符, 存在一定的生长特性差异。所有菌种在 37 °C 均生长良好, 相关菌种标准株生长特性与文献报道一致^[4,6], 生长特性差异状况见表 2。MAC 在 15 ~ 20 d 内生长的占 87.5% (21/24), 在 7 d 内生长的占 12.5% (3/24); 41 °C 生长良好的 MAC 占 58.3% (14/24), 44 °C 生长良好的 MAC 仅占 8.3% (2/24), 绝大多数 MAC 在 44 °C 均不能生长; 菌落形态均为光滑型, 色泽灰白, 随着培养天数的延长, 形态、色泽均无改变; 耐热触酶试验阳性的仅占 33.3% (8/24)。堪萨分枝杆菌在 15 ~ 20 d 内生长的占 66.6% (4/6), 在 7 d 内生长的占 33.3% (2/6); 41 °C 生长良好的菌株占 50.0% (3/6), 44 °C 均不能生长; 菌落形态多为粗糙型, 占 66.6% (4/6), 2 株早期为光滑型, 随着培养时间延长逐渐变为粗糙型, 色泽为微桔黄, 耐热触酶试验均为阳性。脓肿分枝杆菌与偶发分枝杆菌在 3 d 内生长的分别占 93.2% (41/44) 和 80.0%

(4/5), 7 d 左右生长的分别为 6.8% (3/44) 和 20.0% (1/5), 41 和 44 °C 均可生长; 菌落形态仅脓肿分枝杆菌呈粗糙与光滑 2 种表现, 以粗糙的占多数 59.1% (26/44); 色泽随培养时间的延长由灰白变为灰黄; 偶发分枝杆菌为光滑型, 色乳白, 培养时间延长形态无改变; 耐热触酶试验与麦

康凯琼脂试验均为阳性, 脓肿分枝杆菌麦康凯琼脂试验阳性率为 47.7% (21/44)。苏尔加分枝杆菌为慢生长分枝杆菌, 仅 1 株, 形态特征为 15 ~ 20 d 内生长, 仅 37 °C 生长良好, 光滑型, 深桔黄, 耐热触酶试验阳性。

表 2 80 株 NTM 表型特征分析

生长特性试验	NTM 野生株				
	MAC	堪萨分枝杆菌	脓肿分枝杆菌	偶发分枝杆菌	苏尔加分枝杆菌
生长速度:					
2 ~ 3 d	-	-	+(41)	+(4)	-
7 d	+(3)	+(2)	+(3)	+(1)	-
15 ~ 20 d	+(21)	+(4)	/	/	+(1)
生长温度(°C):					
37	+(24)	+(6)	+(44)	+(5)	+(1)
41	+(14)	+(3)	+(44)	+(4)	-
44	+(2)	-	+(44)	+(4)	-
菌落形态(R/S)					
7 d	S	R(4), S(2)	R(26), S(18)	S	-
15 ~ 20 d	S	R	R(26), S(18)	S	S
色素	灰白	微桔黄	灰白→灰黄	乳白	深桔黄
耐热触酶试验	+(8)	+	+	+	+
麦康凯琼脂	+(21)	+	...

生长特性试验	NTM 标准株				
	MAC (ATCC 25291, ATCC 13950)	堪萨分枝杆菌 (ATCC 12478)	脓肿分枝杆菌 (ATCC 19977)	偶发分枝杆菌 (ATCC 6841)	苏尔加分枝杆菌 (NCTC 10831)
生长速度(d):					
2 ~ 3	-	-	+	+	-
7	-	-	-	-	-
15 ~ 20	+	+	-	-	+
生长温度(°C):					
37	+	+	+	+	+
41	+	+	+	+	-
44	+	-	-	-	-
菌落形态(R/S)					
7 d	S	R	R	S	-
15 ~ 20 d	S	R	R	S	S
色素	灰白	微桔黄	灰白	乳白	深桔黄
耐热触酶试验	+	+	+	+	+
麦康凯琼脂	+	+	...

注: R 为粗糙; S 为光滑; ... 为未做

三、NTM 药物敏感性试验
5 种 NTM 中绝大部分对 4 种一线抗结核药高

度耐药。见表 3。堪萨分枝杆菌和苏尔加分枝杆菌对利福平及乙胺丁醇均敏感, 对异烟肼和链霉素

均耐药,与标准株药物敏感性试验结果一致;MAC 对利福平及乙胺丁醇的耐药率为 79% 和 83%,对异烟肼和链霉素均耐药,标准株药物敏感性试验

结果为 4 种一线抗结核药均耐药;脓肿分枝杆菌与偶发分枝杆菌对 4 种一线抗结核药的耐药率为 100%,与标准株药物敏感性试验结果一致。

表 3 NTM 对一线抗结核药物的耐药情况

[例(%)]

抗菌药物	MAC [*]		堪萨分枝杆菌 [#]		脓肿分枝杆菌 [#]	
	敏感	耐药	敏感	耐药	敏感	耐药
异烟肼	0(0)	24(100)	0(0)	6(100)	0(0)	44(100)
链霉素	1(4)	23(96)	0(0)	6(100)	0(0)	44(100)
利福平	5(21)	19(79)	6(100)	0(0)	0(0)	44(100)
乙胺丁醇	4(17)	20(83)	6(100)	0(0)	0(0)	44(100)

抗菌药物	偶发分枝杆菌 [#]		苏尔加分枝杆菌 [#]	
	敏感	耐药	敏感	耐药
异烟肼	0(0)	5(100)	0(0)	1(100)
链霉素	0(0)	5(100)	0(0)	1(100)
利福平	0(0)	5(100)	1(100)	0(0)
乙胺丁醇	0(0)	5(100)	1(100)	0(0)

注: * 为部分野生株与标准株药物敏感性结果存在差异;#为野生株与标准株药物敏感性结果一致

讨 论

分枝杆菌传统的鉴定方法包括生物学特征(如生长速度、色素、菌落形态等)、生化特征以及鉴定性药物敏感性试验,这些鉴定分枝杆菌的常规试验经过几十年的发展已逐步标准化,具备可靠、价廉的优点,可作为标准程序使用;缺点是是需要专业经验^[6]。分枝杆菌由于生长缓慢,生物活性低,对各种传统鉴定反应结果容易发生变动,尤其是 NTM 的鉴定,不仅要求试验条件,还要求试验人员对观察结果的判定具备高度的专业知识,才能得到可靠结果^[3]。传统的菌种鉴定方法操作繁琐、费时,影响因素多,临床实验室难以对 NTM 做出正确鉴定,分子诊断技术的应用,极大地提高了我们对 NTM 菌种鉴定的诊断水平,而 ITS-PCR 是目前研究报道较多的一种 NTM 菌种鉴定方法^[6-9]。我们利用 ITS-PCR 随机抽检了 80 株 NTM 菌株,发现目前深圳市慢性病防治中心实验室分离的菌株主要为 MAC 和脓肿分枝杆菌,共占抽检 NTM 菌株的 85%,初步认为深圳的海洋性湿热气候比较适合 MAC 与脓肿分枝杆菌的生长,为深圳地区进一步了解 NTM 的流行病学特征提供了试验依据。

试验中,通过运用 NTM 分离株的生长特性鉴定试验及鉴定性药物敏感性试验综合分析 ITS-PCR 菌种鉴定结果发现,ITS-PCR 鉴定的 24 株

MAC,其生长特性试验中在 44 °C 生长良好的仅 2 株,耐热触酶试验阳性的仅 8 株,而鸟分枝杆菌标准株与胞内分枝杆菌标准株这 2 项试验均为阳性,野生株中较多菌株这 2 项试验均为阴性,与标准株存在差异,部分野生株药物敏感性结果与标准株存在差异。综合文献报道^[10],认为 MAC 目前可分出 8 个菌种,每个菌种的生长特性均有所不同,鉴于 MAC 菌种构成的复杂性,仅靠生长特性观察较难正确区分,突变株的存在同样可以导致菌株生物性状改变。因此,对于复合群的鉴定,分子生物学检测不失为一种重要的鉴定方法^[11]。速生长型分枝杆菌中脓肿分枝杆菌、偶发分枝菌 3 种鉴定方法结果与标准株总体一致,仅偶发分枝杆菌有 4 株在 44 °C 生长良好,与标准株生长温度特性有所差异,认为此 4 株菌株在其他生长特性试验和药物敏感性试验中与标准株有很好的吻合性,考虑为菌株变异所致,不排除菌种鉴定误差导致结果偏差的可能。研究中发现,脓肿分枝杆菌存在色素产生的现象,随培养时间的延长,大部分脓肿分枝杆菌会产生一种灰黄的色素,并逐渐加深,出现一定的色泽改变,色素溶于水,此现象在目前的文献报道中鲜有提及,有助于临床实验室对该细菌的初步判断。堪萨分枝杆菌与苏尔加分枝杆菌 3 种鉴定方法结果与标准株完全一致,与文献所示相符^[3,6],认为结果可靠。

本研究所示,生物学性状鉴定及鉴定性药物

敏感性试验在同一菌种间不同菌株中存在部分表型差异,由于该类细菌性状的易变性,临床实验室判断存在一定难度,可做为一个辅助诊断措施应用于临床鉴别^[4,7]。ITS-PCR 检测质量的保证主要依赖数据详尽的基因序列数据库以及标准化和规范化检测方法。鉴于此次研究中用于 ITS-PCR 鉴定的覆盖菌种类较少,未能提供较充足的试验数据论证此方法在 NTM 菌种鉴定方面的突出优势,此方法是否能鉴定全部的 NTM 菌种仍有待进一步的试验论证。

综上所述,ITS-PCR 快速、敏感,方法简便,易于标准化,可做为临床 NTM 菌种鉴定的“金标准”^[7]。分子生物学技术与传统的细菌学鉴定方法相结合,为人们进一步认识、研究 NTM 提供试验思路。

参 考 文 献

[1] Falkinham JO 3rd. Epidemiology of infection by nontuberculous *Mycobacteria*[J]. Clin Microbiol Rev, 1996,9 (2): 177-215.

[2] Mohamed AM, Kuyper DJ, Iwen PC, et al. Computational approach involving use of the internal transcribed spacer 1 region for identification of *Mycobacterium* species[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43 (8): 3811-3817.

[3] 今野淳. 非典型分枝杆菌的基础与临床[M]. 关子安,译. 天津:天津科学技术出版社,1998: 21-53.

[4] 中国防痨协会基础专业委员会. 结核病诊断实验室检验规程[M]. 北京: 中国教育文化出版社, 2006 : 46-69.

[5] Xiong L, Kong F, Yang Y, et al. Use of PCR and reverse line blot hybridization macroarray based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences for rapid identification of 34 *Mycobacterium* species[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44 (10): 3544-3550.

[6] 王金良,倪语星,胡必杰,等. 分枝杆菌病实验诊断规范[M]. 上海: 上海科学技术出版社,2006: 27-36.

[7] 吴雪琼,张宗德,乐 军. 分枝杆菌分子生物学[M]. 北京: 人民军医出版社,2010: 175-180.

[8] Turenne CY, Tschetter L, Wolfe J, et al. Necessity of quality-controlled 16S rRNA gene sequence databases: identifying nontuberculous *Mycobacterium* species[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39 (10): 3637-3648.

[9] 李国利,庄玉辉,赵 铭,等. 16S ~ 23S rDNA 内转录间隔区序列分析及其在分支杆菌鉴定中的应用价值[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2002, 25 (3): 166-170.

[10] Cayrou C, Turenne C, Behr MA, et al. Genotyping of *Mycobacterium avium* complex organisms using multispacer sequence typing [J]. Microbiology, 2010, 156 (Pt 3): 687-694.

(收稿日期:2011-12-12)

(本文编辑:姜 敏)

欢迎订阅《检验医学》

《检验医学》(原《上海医学检验杂志》)为上海市卫生局主管、上海市临床检验中心主办的国内、外公开发行的核心期刊。本刊坚持以实用为主,理论与实践、普及与提高、检验与临床实现三结合,报道本专业领域中的最新科研成果、实用技术的新进展、各种检验的方法等,并逐步向临床医学实践渗透。使杂志内容既体现了检验医学界的学术水平,也为全国各级临床检验人员提供了他们所需要的基础知识和新理论、新技术。本刊栏目现设有临床微生物学、临床生物化学、临床免疫学、临床血液与检验学、分子生物学、实验室管理等专业的论著、论著摘要、讲座、综述、会议(座谈)纪要、经验交流、继续教育园地等。本刊还不定期开设“专题”栏目,其内容新,信息量大,深受国内医学检验同道的好评。

近年来,承蒙全国检验界同道关心和厚爱,在杂志编委会及编辑部全体同仁共同努力下,杂志面貌有了较大改观,内在质量也不断提高。本刊从 2009 年 1 月起改为月刊,刊号为 ISSN 1673-8640、CN 31-1915/R。价格为每册 11 元,全年订阅为 132 元。

本刊地址:上海市浦东新区洪山路 528 号《检验医学》编辑部;邮编:200126;电话:021-68316211,021-68316300 × 1102;传真:021-68315766。E-mail:shyy@ chinajournal. net. cn。

《检验医学》编辑部