

SHIYONG JIEHEBING  
SHIYANSHI ZHENDUAN

# 实用结核病实验室诊断



主 编 綦迎成 李君莲 陈美娟

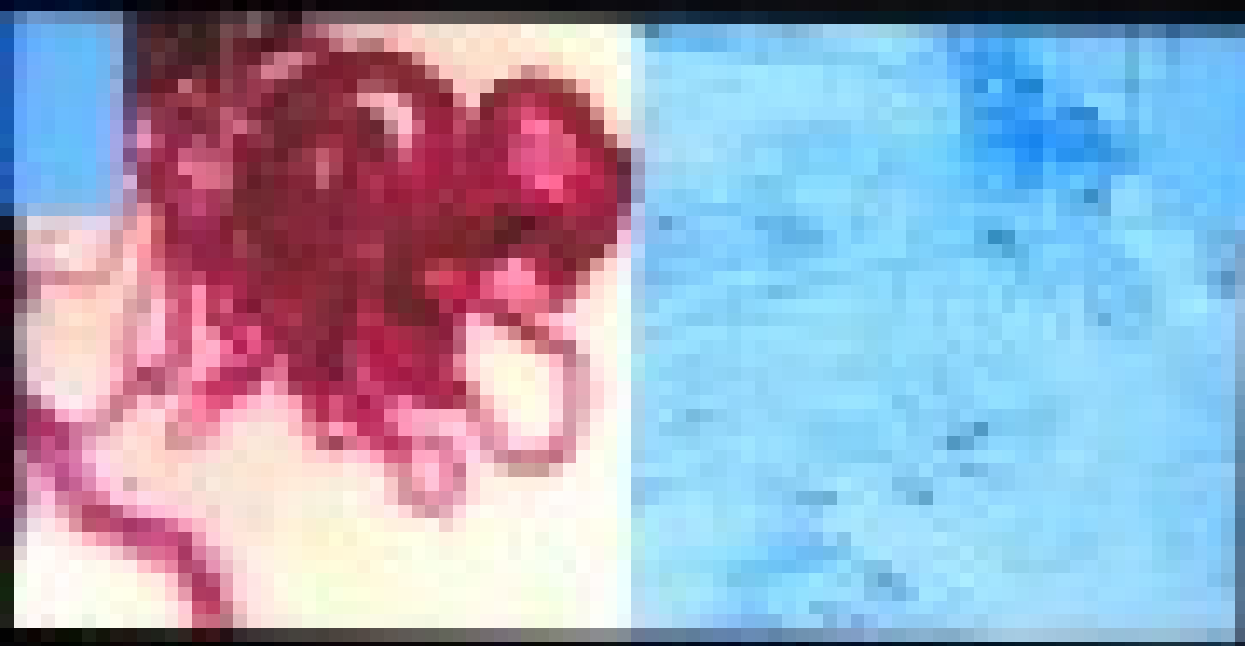


人民军医出版社

PEOPLE'S MILITARY MEDICAL PRESS

SHIYONG JIEHEBING  
SHIYANSHI ZHENDUAN

# 实用结核病实验室诊断



主 编 李树刚 李树刚 李树刚 李树刚



人民卫生出版社  
REMIN JIAOYU CHUBANSHE

---

**图书在版编目(CIP)数据**

实用结核病实验室诊断/綦迎成,李君莲,陈美娟主编. —北京:人民军医出版社,2012. 1  
ISBN 978-7-5091-5414-4

I. ①实… II. ①綦… ②李… ③陈… III. ①结核病—实验室诊断 IV. ①R520.4

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 270253 号

---

策划编辑:高爱英 文字编辑:张 然 吴 倩 黄维佳 责任审读:陈晓平

出 版 人:石 虹

出版发行:人民军医出版社

经销:新华书店

通信地址:北京市 100036 信箱 188 分箱

邮编:100036

质量反馈电话:(010)51927290;(010)51927283

邮购电话:(010)51927252

策划编辑电话:(010)51927300—8172

网址:[www. pmmp. com. cn](http://www.pmmp.com.cn)

---

印刷:三河市春园印刷有限公司

开本:787mm×1092mm 1/16

印张:21.25 字数:525 千字

版、印次:2012 年 1 月第 1 版第 1 次印刷

印数:0001—3000

定价:79.00 元

---

版权所有 侵权必究

购买本社图书,凡有缺、倒、脱页者,本社负责调换

## 内 容 提 要

本书共 8 章,分别介绍了分枝杆菌的生物学特性、细菌学诊断、结核病的生物化学检验、免疫学检验、分子生物学诊断、治疗药物监测、实验室方法在结核病诊断中的临床应用及结核病实验室管理要求,从多角度、多层次对结核病防控工作的重要环节——实验室诊断进行了系统的阐述。本书语言简明,实用性较强,适合专科医院和各级医疗机构结核病临床实验室人员及相关医务人员参考阅读。

# 前言

结核病是当今全球范围对人类最具威胁性的感染性疾病之一,是危害人类健康的主要杀手。根据世界卫生组织的统计,我国是全球 22 个结核病流行严重的国家之一,同时也是全球 27 个耐多药结核病流行严重的国家之一。目前,我国结核病年发病人数约为 130 万,占全球发病总人数的 14.3%,位居全球第 2 位。

近年来,随着结核病实验室诊断技术的快速发展,各种先进完善的检测系统在国内得到普及和广泛应用,提高了结核病的诊断率,使结核病检验在临床疾病的诊断、治疗、预后等方面发挥出举足轻重的作用。新技术的更新和发展需要临床检验工作人员和临床医师不断地更新知识,新知识的更新学习是对结核病诊断的挑战,更是新的发展机遇。为方便医务人员的临床诊断,并予以相应指导,我们编写了这本《实用结核病实验室诊断》。

本书共分 8 章,分别从结核分枝杆菌的生物学特性、细菌学诊断、结核病治疗药物监测、结核病实验室管理要求等方面进行了阐述,可以使读者更全面、更系统地了解结核病实验室诊断技术。每章后附参考文献,以便读者查阅。本书面向基层医疗机构及专科医院医务人员,具有临床实用性、操作性和指导性,可供结核病实验操作人员、临床医生、疾病预防控制中心结核病防治人员学习和参考。

编 者

2012 年 1 月

# 目 录

|                                         |       |
|-----------------------------------------|-------|
| <b>第 1 章 结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌的生物学特性</b> ..... | (1)   |
| 第一节 结核分枝杆菌的分类和命名.....                   | (1)   |
| 第二节 结核分枝杆菌的形态和结构.....                   | (3)   |
| 第三节 结核分枝杆菌的理化特性.....                    | (7)   |
| 第四节 结核分枝杆菌的变异性.....                     | (8)   |
| 第五节 结核分枝杆菌的抵抗力与消毒.....                  | (9)   |
| 第六节 结核分枝杆菌的致病性 .....                    | (10)  |
| 第七节 非结核分枝杆菌的生物学特性 .....                 | (13)  |
| <b>第 2 章 分枝杆菌的细菌学诊断</b> .....           | (20)  |
| 第一节 标本的采集和检测方法 .....                    | (20)  |
| 第二节 分枝杆菌培养基、培养系统、培养方法及药物敏感性测定 .....     | (29)  |
| 第三节 快速分离培养系统与快速药敏实验 .....               | (49)  |
| 第四节 分枝杆菌菌种鉴定 .....                      | (60)  |
| <b>第 3 章 结核病的生物化学检验</b> .....           | (72)  |
| 第一节 酶学测定 .....                          | (72)  |
| 第二节 蛋白质测定 .....                         | (88)  |
| 第三节 微量元素测定.....                         | (103) |
| 第四节 生物化学测定.....                         | (108) |
| <b>第 4 章 结核病的免疫学检验</b> .....            | (119) |
| 第一节 结核病免疫学.....                         | (119) |
| 第二节 细胞免疫学测定.....                        | (135) |
| 第三节 结核病体液免疫学测定.....                     | (148) |
| 第四节 非特异性免疫功能测定.....                     | (169) |
| <b>第 5 章 结核病的分子生物学诊断</b> .....          | (177) |
| 第一节 概述.....                             | (177) |
| 第二节 聚合酶链反应.....                         | (185) |
| 第三节 DNA 探针技术 .....                      | (201) |
| 第四节 DNA 指纹技术 .....                      | (230) |
| 第五节 荧光技术.....                           | (240) |
| 第六节 生物芯片技术.....                         | (245) |

|                                    |       |
|------------------------------------|-------|
| <b>第6章 结核病治疗药物监测</b> .....         | (252) |
| 第一节 尿中抗结核药物的定性测定.....              | (252) |
| 第二节 体液中抗结核药物的化学定量法测定.....          | (258) |
| 第三节 体液内抗结核药物的生物学测定法.....           | (260) |
| 第四节 高效液相色谱测定.....                  | (269) |
| <b>第7章 实验室方法在结核病诊断中的临床应用</b> ..... | (275) |
| 第一节 实验室方法在肺结核诊断中的临床应用.....         | (275) |
| 第二节 实验室方法在结核性脑膜炎诊断中的临床应用.....      | (278) |
| 第三节 实验室方法在结核性浆膜炎诊断中的临床应用.....      | (289) |
| 第四节 实验室方法在泌尿系统结核诊断中的临床应用.....      | (292) |
| <b>第8章 结核病实验室管理要求</b> .....        | (295) |
| 第一节 实验室管理.....                     | (295) |
| 第二节 结核杆菌实验室设施基本要求.....             | (296) |
| 第三节 个人防护.....                      | (299) |
| 第四节 废弃物处理.....                     | (303) |
| 第五节 分枝杆菌菌株的保藏.....                 | (304) |
| 第六节 痰涂片显微镜检查质量保证.....              | (311) |
| 第七节 培养质量保证.....                    | (324) |

## 第 1 章

# 结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌的生物学特性

## 第一节 结核分枝杆菌的分类和命名

结核菌的生物分类学名称为结核分枝杆菌,按照分类学单位——门、纲、目、科、属、种的分类单位,结核菌属于厚壁菌门、裂殖菌纲、放线菌目、分枝杆菌科、分枝杆菌属,通过对细菌所属的种、属进行分类学定义,称其为结核分枝杆菌。结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)复合群包括人结核分枝杆菌(*M. tuberculosis complex*, MTC)、牛型分枝杆菌(*M. bovis*)、非洲分枝杆菌(*M. africanum*)和田鼠分枝杆菌(*M. microti*)等,其中前三者对人类致病。人结核分枝杆菌感染的发病率最高。

1882 年, Koch 发现结核杆菌为结核病原菌。1883 年, Zopf 将结核杆菌命名为 *Bacterium tuberculosis*。1886 年, Lehmann 与 Neumann 将其正式命名为结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)。此后的百余年间,分枝杆菌的发现、分类与命名都有了很大的发展。据统计已报道分枝杆菌 100 余种。在微生物分类中,分枝杆菌划归放线菌目、分枝杆菌科、分枝杆菌属。根据《伯杰细菌鉴定手册》(即《Bergey's Manual of Determinative Bacteriology》, 9th Edition), 将分枝杆菌属菌种基本分为两大类:一是在营养丰富的培养基内,在适宜培养温度条件下,接种很稀的新鲜培养物,在 7d 内即可肉眼观察到单个菌落者,称为快速生长分枝杆菌;二是在 7d 以上者,称为缓慢生长分枝杆菌。麻风分枝杆菌虽然也属于后一类,但在体外不能生长,尚难以用人工方法加以培养。人结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*),标准菌株号为 ATCC27294,致病菌种。牛型分枝杆菌(*M. bovis*),标准菌株号为 ATCC19210,致病菌种。非洲分枝杆菌(*M. africanum*),标准菌株号为 ATCC25420,致病菌种。田鼠分枝杆菌(*M. microti*),标准菌株号为 NCTC8710,不致病或偶尔致病菌种。

《伯杰细菌鉴定手册》划分的缓慢生长分枝杆菌与快速生长分枝杆菌的菌种名称见表 1-1 和表 1-2。除了表 1-1 和表 1-2,近年来又发现了许多新的分枝杆菌,并被细菌国际命名委员会审定,但还没有统一的英文译名,故其他新发现的分枝杆菌在此不做介绍。

表 1-1 缓慢生长分枝杆菌菌种名称

| 序号 | 分枝杆菌名称  | 分枝杆菌名称                     | 标准菌株号     |
|----|---------|----------------------------|-----------|
| 1  | 结核分枝杆菌  | <i>M. tuberculosis</i>     | ATCC27294 |
| 2  | 田鼠分枝杆菌  | <i>M. microti</i>          | NCTC8710  |
| 3  | 牛型分枝杆菌  | <i>M. bovis</i>            | ATCC19210 |
| 4  | 非洲分枝杆菌  | <i>M. africanum</i>        | ATCC25420 |
| 5  | 堪萨斯分枝杆菌 | <i>M. kansasii</i>         | ATCC12478 |
| 6  | 海分枝杆菌   | <i>M. marium</i>           | ATCC927   |
| 7  | 胃分枝杆菌   | <i>Megastore</i>           | ATCC15754 |
| 8  | 不产色分枝杆菌 | <i>M. nonchromogenicum</i> | ATCC19530 |
| 9  | 土地分枝杆菌  | <i>M. terrae</i>           | ATCC15755 |
| 10 | 次要分枝杆菌  | <i>M. triviale</i>         | ATCC23292 |
| 11 | 马尔摩分枝杆菌 | <i>M. nralmoense</i>       | ATCC29571 |
| 12 | 施氏分枝杆菌  | <i>M. shimoidei</i>        | ATCC27962 |
| 13 | 戈登分枝杆菌  | <i>M. gordonae</i>         | ATCC11470 |
| 14 | 亚洲分枝杆菌  | <i>M. asiaticum</i>        | ATCC25276 |
| 15 | 苏尔加分枝杆菌 | <i>M. szulgai</i>          | NCTC10831 |
| 16 | 猿猴分枝杆菌  | <i>M. simiae</i>           | ATCC25275 |
| 17 | 瘰癧分枝杆菌  | <i>M. scrofulaceum</i>     | ATCC19981 |
| 18 | 鸟分枝杆菌   | <i>M. avium</i>            | ATCC25291 |
| 19 | 胞内分枝杆菌  | <i>M. intracellulare</i>   | ATCC13950 |
| 20 | 蟾蜍分枝杆菌  | <i>M. xenopi</i>           | NCTC10042 |
| 21 | 溃疡分枝杆菌  | <i>M. ulcerans</i>         | ATCC19423 |
| 22 | 嗜血分枝杆菌  | <i>M. haemophilum</i>      | ATCC29548 |
| 23 | 产鼻疽分枝杆菌 | <i>M. farcinogenes</i>     | NCTC10955 |
| 24 | 副结核分枝杆菌 | <i>M. paratuberculosis</i> | ATCC19698 |
| 25 | 鼠麻风分枝杆菌 | <i>M. lepraemurium</i>     | —         |
| 26 | 麻风分枝杆菌  | <i>M. leprae</i>           | ATCC4233  |

表 1-2 快速生长分枝杆菌菌种名称

| 序号  | 分枝杆菌名称    | 分枝杆菌名称                              | 标准菌株号     |
|-----|-----------|-------------------------------------|-----------|
| 27a | 龟分枝杆菌龟亚种  | <i>M. chelonae subsp. chelonae</i>  | NCTC946   |
| 27b | 奥分枝杆菌脓肿亚种 | <i>M. chelonae subsp. abscessus</i> | ATCC19977 |
| 28  | 偶然分枝杆菌    | <i>M. fortuitum</i>                 | ATCC6841  |
| 29  | 千田分枝杆菌    | <i>M. chitae</i>                    | ATCC9627  |
| 30  | 塞内加尔分枝杆菌  | <i>M. senegalense</i>               | NCTC10956 |
| 31  | 田野分枝杆菌    | <i>M. agri</i>                      | ATCC27604 |
| 32  | 耻垢分枝杆菌    | <i>M. smegmatis</i>                 | ATCC19420 |
| 33  | 草分枝杆菌     | <i>M. phlei</i>                     | ATCC11758 |
| 34  | 抗热分枝杆菌    | <i>M. thermoresistibile</i>         | ATCC19527 |
| 35  | 爱知分枝杆菌    | <i>M. aichiense</i>                 | ATCC27280 |

(续 表)

| 序号 | 分枝杆菌名称  | 分枝杆菌名称                    | 标准菌株号     |
|----|---------|---------------------------|-----------|
| 36 | 金色分枝杆菌  | <i>M. aurum</i>           | ATCC23366 |
| 37 | 楚布分枝杆菌  | <i>M. chubuense</i>       | ATCC27278 |
| 38 | 杜氏分枝杆菌  | <i>M. duvalii</i>         | NCTC358   |
| 39 | 微黄分枝杆菌  | <i>M. flavescens</i>      | ATCCa4474 |
| 40 | 加地斯分枝杆菌 | <i>M. gadium</i>          | ATCC27726 |
| 41 | 浅黄分枝杆菌  | <i>M. gilvum</i>          | NCTC10742 |
| 42 | 科莫斯分枝杆菌 | <i>M. komossense</i>      | ATCC33013 |
| 43 | 新金色分枝杆菌 | <i>M. neoaurum</i>        | ATCC25795 |
| 44 | 奥布分枝杆菌  | <i>M. obuense</i>         | ATCC27023 |
| 45 | 副偶然分枝杆菌 | <i>M. para fortuitum</i>  | ATCC19686 |
| 46 | 罗德岛分枝杆菌 | <i>M. rhodesiae</i>       | ATCC27024 |
| 47 | 泥炭醉分枝杆菌 | <i>M. sphagni</i>         | ATCC33027 |
| 48 | 东海分枝杆菌  | <i>M. tokaiense</i>       | ATCC27282 |
| 49 | 母牛分枝杆菌  | <i>M. vaccae</i>          | ATCC15483 |
| 50 | 猪分枝杆菌   | <i>M. porcinum</i>        | ATCC33776 |
| 51 | 诡诈分枝杆菌  | <i>M. fallax</i>          | CIP8139   |
| 52 | 南非分枝杆菌  | <i>M. austroafricanum</i> | ATCC33464 |
| 53 | 迪氏分枝杆菌  | <i>M. diernhoferi</i>     | ATCC19340 |
| 54 | 灰尘分枝杆菌  | <i>M. pulveris</i>        | ATCC35154 |

## 第二节 结核分枝杆菌的形态和结构

### 一、结核分枝杆菌基本形态

结核分枝杆菌经萁尔-尼尔逊染色(Ziehl-Neelson, Z-N, 简称萁-尼染色), 在生物显微镜( $1\ 000\times$ )下观察, 发现不同种的分枝杆菌形态变化各异, 呈略弯曲或直的两端钝圆的杆菌, 多数为杆状、稍弯曲; 单个排列, 或偶呈串珠颗粒状, 菌体宽度  $0.3\sim0.6\mu\text{m}$ ; 菌体长度不一, 在  $0.5\sim8\mu\text{m}$ , 多数在  $1.5\sim3\mu\text{m}$ ; 牛型分枝杆菌则比较粗短, 少数菌体较长者可呈螺旋状; 染色良好的结核分枝杆菌菌体内, 能够发现着色较深的异染颗粒。金胺 O 染色后的分枝杆菌在暗的背景下呈现明亮的黄色, 颜色明亮的分枝杆菌与暗背景之间具有极大的视觉反差, 便于大面积扫描观看分枝杆菌。多数非结核分枝杆菌(non-tuberculosis mycobacteria, NTM)的形态较结核分枝杆菌短且粗, 呈棒状、短棒状, 甚至颗粒状。

分枝杆菌在大多数培养基上, 菌落粗糙、凸起、致密、有表面皱褶和薄的不规则边缘。菌落质地脆, 色泽为黄白、浅黄、黄色, 无可溶性色素。在液体培养基培养时, 在培养基底部和表面膜样生长方式。表面薄膜白色, 继续培养逐渐加厚, 皱褶, 呈淡黄色。有毒株在液体培养基中可呈索状生长。在吐温 80 培养基中可分散均匀生长。但在含微量琼脂的半流体培养基中, 显现在试管中部单个致密菌团样生长。临床野生株, 特别是化疗后菌落常有不典型的菌落形态, 以及生长贫瘠、缓慢、湿润等表型异质性改变。培养生长的菌落经生理盐水研磨、悬浮物稀释

后涂片镜检,结核分枝杆菌的形态较标本直接涂片的稍短且粗,常聚集而形成“索状”,经培养的非结核分枝杆菌菌体形态与临床标本相比变化不大,且较少聚集。

在发现结核杆菌是结核病病原菌后不久,人们就发现了结核分枝杆菌的形态多样性。在患病淋巴结中观察到了颗粒样、球状等各种大小、各种排列的多形态现象。因此,与其他微生物一样,由于菌株、菌龄等发育和生长环境条件的不同,结核分枝杆菌存在形态的多样性,特别是化疗增加了形态多样性出现的机会。

### (一)结核分枝杆菌的形态

结核分枝杆菌不仅有上述典型形态,还有细长状、丝状、短链状、球形状、颗粒状等多种形态。这是由于生长环境的变化、营养条件的变化,并在抗结核药物的作用和机体免疫功能的影响下,细菌为保持自身功能和生存及对环境的适应性而产生的。

结核分枝杆菌(MTB)菌体具有多形态特征,其各种形态可归纳为杆菌型(基本形态)、颗粒型、球菌型(L型)、滤过型四种类型。

1. 杆菌型(基本形态) MTB正常典型的形态是直的或是稍弯曲、两端钝圆的杆菌。无芽胞、无荚膜、无鞭毛,生长发育期间有分支生长倾向。经抗酸染色菌体呈红色杆状,单个散在或呈人形、V形、T形、Y形排列,菌体多时细菌扭集在一起呈绳索状、束状或丛状,菌体堆积一团时类似“菊花冠”状杆菌团。

2. 颗粒型 1908年,Much(莫赫)在结核性脓肿、浆液性渗出液、淋巴结和痰标本中检出到草兰染色阳性颗粒,称为莫赫颗粒。一般认为,莫赫颗粒为非抗酸性非细胞型体,但有感染豚鼠并发育成正常杆菌的能力。至于颗粒型是个体发育阶段或是环境的适应均未得到深入的研究。

3. 球菌型(L型) 球菌型体是结核分枝杆菌在内外环境(免疫、营养、药物)的作用下,使细菌在发育生长过程中呈现的一种变异的菌体形态。细菌之所以呈现球菌型体是由于维持细菌固有形态的细胞壁内某些成分的缺损或丧失。依据细胞壁的某些成分缺损程度呈现形态大小不一的球菌型体。L型细菌就是球菌型之一。

1935年,Lister医学研究院的Kleneberger在研究念珠状链杆菌时发现一种生长极小的菌落,检查中观察到细菌呈现多形态,有线状体及膨大的球形体,被命名L型细菌。张世馥等于1994年报道,在对结核性淋巴结炎的病理切片中观察到L型细菌。

L型细菌细胞壁的缺损,致细菌形态、生化、生理、毒力与病理等生物学方面均与亲代菌株不同,反映在临床病理组织学上的不典型结核结节,临床体征上的非特征型表现。

L型细菌在机体的存活,具有潜在的危害性,当机体免疫功能低下时,细菌复活发育繁殖,返祖为亲代细菌的毒力,使结核病恶化与进展。有资料报道骨关节结核病灶中存在L型细菌。

4. 滤过型 早在1901年,就发现结核病患者的临床材料存在可通过细菌滤膜的颗粒。1991年,Khoomenkov在豚鼠损坏性肺结核模型中证实了滤过型的存在。经化疗后,虽未能由豚鼠组织中分离培养出结核分枝杆菌,但电镜检查发现空洞壁上存在可通过细菌滤膜的超小型菌体,体积约为正常细菌的1/20,具有电子致密的外壳和很低的蛋白含量,可在宿主组织中长期存在。液体培养基中培养后出现球状体,可染色检出。病变滤液连续数次通过动物后,可在动物脏器组织中分离得到典型的结核分枝杆菌。

对结核分枝杆菌多形态的认识,特别是非杆菌型的存在与否,对结核病诊断、治疗和预防

有很大的关系。但是,异型结核分枝杆菌是否确切存在,其产生的机制、可信的检出和鉴定,以及与临床结核病关系的本质阐明,这些都关系到“菌阴”结核病的诊断、疗效和痊愈标准的判定、化疗方案的评价等一系列临床结核病关键问题的认识,仍有待明确可信的阐明。因此,目前临床细菌学检查中仍以典型的杆菌形态为依据。

## (二)结核分枝杆菌的细微结构

由于分枝杆菌细胞结构和细胞成分的特殊性,具有经碱性染料染色后能够耐受酸性介质脱色的特征,具备相应染色特征的细菌习惯上被称为抗酸菌(acid-fast bacillus, AFB)。目前,除结核分枝杆菌(临床上最常见的分枝杆菌)外发现的分枝杆菌种类已有 100 余种。当然,除分枝杆菌外还有少数细菌具有抗酸染色特征。

1. 抗酸菌菌体细胞结构的完整性与其抗酸染色特性有着密切联系 通过电子显微镜观察分枝杆菌,完整的细胞结构主要有以下部分组成。

(1)细胞壁:分内、中、外三层,外层细胞壁的主要成分为分枝菌酸,是分枝杆菌细胞抗酸染色特征的主要成分;中层细胞壁的主要成分有肽脂糖和磷脂蛋白;内层细胞壁的主要成分是多糖体。分枝杆菌细胞壁的组成和结构的完整性,对相应细菌的抗酸染色特性起到关键作用。

(2)细胞膜:主要由脂蛋白组成。部分细胞膜通过折叠、卷曲,能够形成层状结构,被称为中介体(或间体)的细胞器。

(3)细胞质:基本成分是水、蛋白质、核酸、脂质以及少数的糖类和无机盐类。

(4)核区:由 DNA 和参与遗传表达的 RNA 密集而形成。

(5)细胞器:主要成分为三酰甘油、抗酸脱色能力较差的脂质空泡和主要成分是聚磷酸盐、具有极强抗酸脱色性的异染小体(异染颗粒)等。

2. 在电子显微镜下观察菌体超薄切片可见其微细结构 结核分枝杆菌由细胞壁、细胞膜、细胞质、核质组成。

(1)细胞壁:结核分枝杆菌细胞壁厚度约 20nm,具有较强的坚韧性和弹性,从而保护和维持细菌的固有形态。细胞壁的坚韧性与其化学结构上肽聚糖等特定性组成成分直接相关。结核分枝杆菌胞壁含有丰富的脂质,约占细胞壁的 60%,丰富的脂质胞壁结构赋予结核分枝杆菌抗酸染色性、通透性、表面抗原性、毒力等一系列相关性状。

电镜下可观察到结核分枝杆菌细胞壁由三层组成,即内、外电子密度层和中间电子透明层。细胞壁内层包裹在质膜外,由肽葡聚糖和二氨基庚二酸的肽聚糖组成的胞壁质构成。多糖链交错位置上含 N-糖基胞壁酸和乙酰葡萄糖胺,交链肽是由 L-丙氨酸、D-异谷氨酰胺、内消旋二氨基庚二酸组成的小肽。中间较宽的电子透明层是由脂阿拉伯半乳糖分枝菌酸构成,阿拉伯半乳糖内端和内层肽聚糖相连,其阿拉伯糖共价连接到分枝菌酸为末端的长脂肪酸链上,形成致密的网状结构,细胞壁的刚性和细菌形态,也是苯胺染料着色的部位。最外层是电子不透明胞膜层,厚度变化较大,由分枝菌糖苷脂(mycoside)为末端的肽聚糖脂(peptidoglycolipid)组成。脂阿拉伯甘露聚糖是磷脂酰基多糖,锚定在质膜上穿过整个胞壁,伸展在胞壁表面。

(2)细胞膜:细胞膜位于细胞壁内层,是围绕于细胞质外的一层具有柔软性和富于弹性的半透膜,主要成分是脂类蛋白质,脂类物质构成细胞膜的脂质双分子层,蛋白质镶嵌在液态的脂质双层内和附着在脂质双层的内表面上,同时膜上含有许多酶类。在结核分枝杆菌与外界环境进行物质交换和引起细菌细胞内一系列的代谢活动中起重要作用。

(3)细胞质:细胞质是带黏滞性的液体,充满了细胞膜内的整个空间。其中可见大小不同,多少不等的颗粒。核糖体是游离于细胞质的小颗粒,每一菌细胞内含有核糖体的数目有数万之多,是合成蛋白质的重要物质。核糖体化学成分70%为RNA,30%为蛋白质。在菌细胞内约有90%RNA和40%蛋白质存在于核糖体内。在mRNA作用下,核糖体进一步合成蛋白质。细胞质内还含有多种颗粒,颗粒内含有多糖、脂类、无机盐类等成分,是营养储存的场所。颗粒大小与多少,在不同环境和不同生长发育期不尽相同。在营养物质充足的培养条件下,胞质内颗粒增多,营养缺乏时,颗粒减少或消失,这可能是由于细胞储藏的营养物质或代谢不同所致。细胞质是细胞合成蛋白质和RNA生命活性物质的场所,也是细菌对营养物质进行同化作用和异化作用的场所。细胞质内不含内质网与线粒体等结构。细胞质内的中介体(简体)是一种膜样构造,由细胞膜向胞质内凹陷折叠而形成。在中介体膜上含有许多酶类系统,如琥珀酸脱氢酶、细胞色素氧化酶、三羧酸腺苷酶、酸性磷酸酶等,因此中介体与细菌呼吸、分裂、染色体的复制与分配上有密切关系。

(4)核质:核质有单一双股DNA或染色体组成,是遗传物质基础。在电子显微镜下可见由极细的纤维状物质组成,与细胞质不分开,无核膜,也无核仁。一个菌细胞内一般有1~2个核质,多位于菌体内的中部。核分裂先于细胞分裂,菌细胞的分裂、核的复制为简单分裂,而不是有丝分裂。

## 二、结核分枝杆菌菌体的化学成分

### (一)脂质

脂质是结核分枝杆菌的重要组成成分,细胞壁内含量最高,约占细胞壁干重的60%。一般认为脂质含量与细菌毒力有关,结核分枝杆菌脂质含量最高,而毒力较弱的牛分枝杆菌含量较少。脂质主要包括磷脂、脂肪酸和蜡质等成分,多与蛋白质和多糖以结合形式存在。

1. 分枝菌酸是Stodol于1938年分离得到的具有分支的高分子长链 $\alpha$ -烷基- $\beta$ -羟基脂肪酸。鉴于分枝从属于主链故应采用分枝菌酸的译名。分枝菌酸及其衍生物是分枝杆菌属所共有,其碳链长度为28~40的碳原子。在相关的棒状杆菌属和诺卡菌属中也存在各自的分枝菌酸,但是它们的碳原子数不同,可作为属鉴别的依据。这些分枝菌酸均具有抗酸着色性,但随着它们碳链的延长,抗酸着色性减弱。

2. 酰化海藻糖包括海藻糖双分枝菌酸酯和硫苷脂。海藻糖-6,6'-双分枝菌酸酯是1977年从牛型分枝杆菌中分离得到的。海藻糖双分支菌酸酯在胞壁中是和阿拉伯半乳聚糖结合存在或独立存在尚无定论。海藻糖双分枝菌酸具有介导肉芽肿形成、诱导巨噬细胞释放细胞趋化因子的作用。

### (二)脂多糖

1. 肽分枝菌酸阿拉伯半乳聚糖(mAGP)是分枝杆菌细胞壁的最的IV型肽聚糖。肽聚糖是氨基酸和氨基糖的聚合物,由大量二氨基庚二酸连接分枝菌酸阿拉伯半乳聚糖组成胞壁的电子透明胞壁中层,占据了胞壁的主要部分。氨基肽聚葡萄糖构成电子密度内层。内层肽聚糖通过磷酸脂双键共价连接在中层的分枝菌酸阿拉伯半乳聚糖的阿拉伯聚糖上。

2. 脂阿拉伯甘露聚糖(LAM):是分枝杆菌细胞壁上第二个多糖分子,是分支多糖链,锚定在质膜磷脂上,穿过整个细胞壁,向胞外方向延伸至胞壁表面,是分枝杆菌的显性抗原性分子。LAM是一种中性多糖,由D-甘露吡喃糖骨架组成,有酰化和非酰化两型。LAM是分枝

杆菌属各种共同具有的分子。

### (三)核酸(DNA 和 RNA)

1. DNA 是具有遗传功能的核酸分子,因其特定的双螺旋结构、碱基堆积力和氢键决定了其稳定性。与其他细菌一样,分枝杆菌基因组是由简单的共价封闭环 DNA 链组成。富含G+C 是分枝杆菌基因组构成的共同特点,大多数分枝杆菌的 G+C 含量为 64%~70%,结核分枝杆菌复合群为 65%左右。Athwal 于 1989 年指出,结核分枝杆菌复合群(结核分枝杆菌、牛型分枝杆菌、非洲分枝杆菌和田鼠分枝杆菌)内 DNA 杂交同源性的 78%~98%,形成一个高度同源性的复合群。它们与快速生长分枝杆菌的同源性为 4%~26%,但与同为缓慢生长的麻风分枝杆菌的同源性仅为 1%。

2. RNA。参与细胞基因表达过程的 RNA 主要有三大类,即核糖体 RNA(rRNA)、转运 RNA(tRNA)和信使 RNA(mRNA)。rRNA 与许多不同的蛋白质结合形成核糖体,提供蛋白质合成中所有相互作用的分子所必需的结合部位。rRNA 在总 RNA 分子中含量丰富(75%~80%),在原核生物中多拷贝存在。结核分枝杆菌的 rRNA 有近 4 000 拷贝。由 23S rRNA 和 16S rRNA 组成,16S rRNA 是更为保守的序列,其序列微小的变异反映了种系发生上的相关性,可作为分枝杆菌种的鉴定(ribotype)依据。一般情况下,tRNA 占细胞总 RNA 的 15%左右,主要功能是将特异的氨基酸运送至核糖体,参与多肽的合成。tRNA 反密码子和 mRNA 密码子碱基互补,使 mRNA 携带的遗传信息和一定的氨基酸相对应。在细菌中,rRNA 和 tRNA 可能是连续形成的,由于它们对核酸酶的抵抗力大于 mRNA,可在细胞中存留。mRNA 分子种类多,分子量大小不一,在细胞中含量少 1%~5%。mRNA 是依赖于 DNA 的 RNA 聚合酶转录的产物,传递 DNA 信息,指导蛋白质的合成。编码不同蛋白质的不同 mRNA 在结核分枝杆菌细胞内的确切拷贝数仍不清楚。原核生物 mRNA 的半衰期很短,仅 2~3min。

## 第三节 结核分枝杆菌的理化特性

### 一、结核分枝杆菌的染色

结核分枝杆菌与其他细菌一样为无色的微生物,观察结核分枝杆菌经染色后,才能够在生物显微镜或荧光显微镜下观察和确认。普通细菌较易着色,而结核分枝杆菌的染色,细胞壁含有大量脂质,不易着色,必须在染色液内加苯酚才可着色,一旦着色,不会被盐酸酒精等脱色剂所脱色,而其他细菌均被脱色。把不被盐酸酒精脱色的细菌称为抗酸菌,将此种方法称为抗酸染色法。萼-尼(Ziehl-Neelsen)染色法为最常见的一种抗酸染色法,经此法染色后,分枝杆菌呈红色,无菌毛和鞭毛,不形成芽胞,现证明有荚膜。而标本中其他细菌、细胞、杂质等均呈蓝色。抗酸染色法的标本经染色后在生物显微镜下分出 AFB(多为分枝杆菌)和非抗酸菌(非分枝杆菌)。

### 二、结核分枝杆菌的生长环境

结核分枝杆菌生长缓慢,在人工固体培养基内需 15~20h、在静脉感染未经免疫小鼠肺中约需 15h、在巨噬细胞内 15~20h,在家兔角膜中需 20~22h 繁殖一代。早先的理论认为,用表

面活性剂破坏疏水层后,并未明显增加生长速度,所以此因素并非是导致结核分枝杆菌生长缓慢的主要因素。近年来,有学者经研究提出结核分枝杆菌生长缓慢与其菌体依赖 DNA 的 RNA 多聚酶缺陷有关。在培养基中结核分枝杆菌的 mRNA 链增长速度仅为大肠埃希菌的 1/10,对结核分枝杆菌全细胞渗出物化学分析表明,其 RNA 与 DNA 比值也较大肠埃希菌低 10 倍。上述结果提示,结核分枝杆菌依赖 DNA 的结核分枝杆菌多聚酶缺陷限制了特异性 mRNA 从 DNA 上转录,转录过程低效率,蛋白质合成也成低效率,是结核分枝杆菌生长缓慢的主要原因。生长缓慢是结核分枝杆菌的遗传属性,因此,多年来快速培养结核分枝杆菌的努力均未获得十分满意的结果。人们的努力多集中于寻求微量生长的早期、灵敏检测方法和无培养依赖性的基因诊断技术的研究。

结核分枝杆菌为专性需氧菌,培养时如供给 5%~10% CO<sub>2</sub> 可刺激其生长。生长温度为 35~40℃,最适温度为 35~37℃。生长时尚需一定湿度,固体培养基培养时,需有适量的凝固水以保证培养基湿度。在 pH 5.5~7.2 培养基上能生长,最适 pH 6.8~7.2。

通常认为,结核分枝杆菌营养要求较高且特殊。初次从患者或感染动物体内分离培养时,需用含蛋白质、血清、淀粉、氨基酸、甘油等营养丰富的复杂有机物及少量无机盐类,如磷、钾、硫、镁等的培养基才容易生长。经多次传代或长期保存的菌种在营养较简单的综合培养基中也能良好。在培养基上一般需 2~4 周或更长时间始见菌落生长,甚至有极少数生长极为缓慢者 8 周以上才开始有菌落生长。在改良 L-J 培养基、小川鸡蛋培养基上菌落多呈粗糙型(R 型),菌落粗糙、凸起、厚、呈结节状或颗粒状,边缘薄且不规则,乳白或浅黄色,无可溶性色素。在不含表面活性剂的液体培养基中结核分枝杆菌呈膜样生长,随着菌龄增长,菌膜逐渐加厚、皱褶,有毒株在液体培养基呈索状生长。在 Dubos 吐温白蛋白培养基内则可呈均匀分散生长。在半流体培养基中形成菌膜,中层有颗粒状生长。

### 三、生化反应

结核分枝杆菌与牛结核分枝杆菌均不发酵糖类。触酶活性弱,68℃ 加热后活性丧失,借此与非结核菌相鉴别。结核分枝杆菌烟酸合成实验、硝酸盐还原实验和烟酰胺酶实验均为阳性,而牛结核分枝杆菌则均为阴性,借此可将两者相鉴别。

## 第四节 结核分枝杆菌的变异性

结核分枝杆菌随着环境改变易发生菌落形态、毒力、药物耐药性及 L 型等变异。有毒的结核分枝杆菌,当毒力减弱或失去毒力时,粗糙型菌落(R 型)变为光滑型(S 型),称为菌落变异。

结核分枝杆菌在人工培养基上反复连续传代,可因产生变异而致毒力降低。BCG 即将有毒牛结核分枝杆菌接种于甘油、胆汁、马铃薯培养基上,经 13 年接种传 230 代成为毒力极弱、无致病性,但仍保持免疫原性的变异菌株,接种于人体后,能使人体产生免疫力。

耐药性是指微生物对药物抵抗性增强的一种变异现象,耐药性产生一般可分为靶基因突变、通透性障碍和质粒介导的药物修饰酶等类型。在其他细菌中所见的通透性障碍一般与结核分枝杆菌的自然耐药性相关,如对青霉素,大环内酯类药物的反应在机体内及试管内均能产生,并可传代。野生型结核分枝杆菌对 INH、SM、RFP、EMB 和 PZA 等抗结核药物敏感,但易

产生耐药性变异。目前国内外的研究表明,结核分枝杆菌药物作用的染色体靶基因位点突变,是其产生耐药性变异的主要机制。结核分枝杆菌耐 RFP 是由于其编码 RNA 聚合酶 $\beta$ 亚基的 *rpoB* 基因突变所致;耐 INH 与过氧化氢酶-过氧化物酶编码基因 *katG* 和(或)烯酰基还原酶编码基因 *inhA* 突变有关;耐 SM 与编码核糖体 30S 亚基 S12 蛋白的 *rpsL* 基因和编码 16S rRNA 的 *rrs* 基因突变有关;耐 EMB 与阿拉伯糖基转移酶编码基因 *enbB* 突变有关;耐 PZA 与吡嗪酰胺编码基因 *PncA* 突变有关。

结核分枝杆菌在加有诱导剂的培养基上可诱导形成 L 型,在体内由于抗结核药物影响及机体免疫因子作用易可诱导产生 L 型变异菌。L 型菌由于细胞壁这一重要结构缺损或丧失,故其生物学特性发生了许多改变,如菌体形态多形性,大小不一,可呈球形体、长丝体、巨球体等形态,抗酸染色后可见菌体着色能力不同程度减退或消失;在常规分枝杆菌培养基上不能生长,只能在渗透压适宜的特殊培养基,如琼脂综合培养基或胰酪大豆蛋白胨琼脂培养基(TAS-L)上生长,菌落微小,呈油煎蛋样,菌体可穿入琼脂层基内生长;毒力、对外界环境抵抗力及免疫原性与野生型结核分枝杆菌相比均有减弱;对药物敏感性发生明显变化,对作用部位为细胞壁的药敏不敏感,而对抑制蛋白质合成的药物,因无细胞壁阻挡,易进入细胞内,故对 L 型细菌有较强杀菌力;结核分枝杆菌对 L 型能在宿主体内持续长期存在,存在于局部病灶性结核病变、结核性淋巴结炎及病程迁延性结核病变,具有潜在危险性,当机体免疫功能低下时,细菌复活机遇来临,返祖为亲代结核分枝杆菌,能够大量生长繁殖,使结核病恶化易进展。

## 第五节 结核分枝杆菌的抵抗力与消毒

结核分枝杆菌和普通细菌相比对理化消毒和灭菌方法具有较强的抵抗力,特别是生存能力较强,对一般的物理、化学因素有较强的抵抗力,在外界环境中可长期存活并保持致病力,认识结核分枝杆菌的抵抗力对结核病的控制工作有重要指导意义。

### 一、物理因素对结核分枝杆菌的影响

1. 热力 加温至 60℃,持续 10~30min,可以杀死培养物内的结核分枝杆菌,加温至 85℃,持续 5min,加温至 95℃,持续 1min 均可杀死结核分枝杆菌。痰液内的结核分枝杆菌,煮沸 2min 可杀死部分的结核分枝杆菌,持续煮沸 5min 才能杀死全部结核分枝杆菌。所以,煮沸方法是灭菌效果最好且安全的消毒方法。

干热方法灭菌的效果低于湿热方法灭菌的效果,如痰液内的结核分枝杆菌放置在 100℃干燥箱内,需持续 4~5h 方可达到灭菌效果。实验室用器材和污染物则需在 160~180℃持续烘烤 1~2h,才能达到完全消除污染的目的。高压蒸汽灭菌器是效果最好的灭菌方法。在 121.3℃(1.05kg/cm<sup>2</sup>),持续 30min 的灭菌处理,可以杀死芽孢和结核分枝杆菌及其污染物。低温无灭菌效果。

结核分枝杆菌在干燥的痰标本内可存活 6~8 个月或更长的时间。在 -8~-6℃时结核分枝杆菌能够存活 4~5 年,一般利用 -40℃冷冻干燥的结核分枝杆菌可长期存活,是保存菌株方法之一。

2. 光线 由于紫外线的穿透力弱,难以透入固体物质内部和液体深层,因此紫外线通常应用于空气和物体表面部位的消毒。结核分枝杆菌对光线和射线敏感,根据实验资料报道,

10W 紫外线灭菌灯,在距离 0.5m 处,结核分枝杆菌制备的 1mg/ml 浓度菌悬液,菌液液层厚度 3mm,持续照射 3min,经培养无细菌生长,在距离 1m 处,用上述相同的实验条件,持续照射 10min,经培养无细菌生长,持续照射 20min 的菌液,接种动物后,未发现明显病变,菌液培养后无细菌生长。根据照射距离决定照射时间,紫外线灭菌灯距照射物 0.5~1m 处,持续照射 30min。

## 二、化学因素对结核分枝杆菌的影响

化学消毒剂对细菌具有抑菌和杀菌作用。化学消毒剂的种类很多,其杀菌的机制因化学药物种类不同而异。消毒剂使细菌菌体蛋白质变性、沉淀、凝固致细菌死亡,有的消毒剂使细菌酶系统丧失活力和功能,影响细菌的新陈代谢或降低细菌细胞表面张力,增加细菌细胞膜的通透性而致细菌裂解、死亡。

1. 乙醇 结核分枝杆菌直接和 70%~75%乙醇接触 3~5min,培养后无细菌生长,延长至 20~30min 可以杀死细菌。乙醇是通过破坏细菌细胞蛋白质变性、凝固而达到杀菌作用,因此可用于皮肤消毒。但由于乙醇能凝固蛋白,使痰表面形成一层把菌体包裹起来的膜,短时间内不能杀死细菌,故乙醇不适用于痰液的消毒。另外,乙醇对芽孢无效。

2. 苯酚 其杀菌作用在于苯酚与细菌接触后,通过破坏菌细胞膜而致细胞质内容物漏出,使菌体蛋白质变性、凝固,抑制菌体脱氢酶和氧化酶等酶系统杀死结核分枝杆菌。结核分枝杆菌经过 2%苯酚溶液处理 5min 或 5%苯酚溶液处理 1min,均可杀灭。但是,苯酚对痰液内的结核分枝杆菌杀菌作用很差,如 5%苯酚溶液和痰液等量混合,处理 24h 才能达到杀菌作用。

3. 煤皂酚溶液 杀菌作用和苯酚相似。1%煤皂酚溶液处理结核分枝杆菌 45min,2%煤皂酚溶液处理细菌 10min,5%煤皂酚溶液处理细菌 5min,均可达到杀灭结核分枝杆菌。5%~10%煤皂酚溶液与痰液等量混合后处理 1~12h,才能够达到杀死结核分枝杆菌。

4. 甲醛 甲醛与细菌接触后使细菌细胞蛋白质变性、凝固,使细菌丧失代谢功能,最终导致细菌死亡。1%甲醛液处理结核分枝杆菌 5min,即可杀死细菌。5%甲醛液与痰液等量混合后在室温下处理 12h 或以上时间,才可以达到杀菌效果。

5. 84 消毒液 84 消毒液是以氯为主要成分的消毒剂。氯是一种氧化剂,能使菌体的酶失活,还能与蛋白质的氨基结合,使菌体蛋白氯化,代谢功能障碍,细菌死亡。0.5%的 84 消毒液 15min 可杀死结核分枝杆菌培养物,但对在蛋白质混合液中的结核分枝杆菌几乎无消毒效果。

结核分枝杆菌对酸、碱抵抗力强,在 4% NaOH、3% HCl 和 6% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 中 30min 仍能存活。临床应用酸或碱加入患者标本,消化蛋白质及杀灭杂菌,以此分离出结核分枝杆菌。结核分枝杆菌对染料,如 1:13 000 孔雀绿和 1:75 000 甲紫有抵抗力,通常在培养基内加入一定量的孔雀绿或甲紫可抑制其他杂菌生长。对普通细菌有较强杀菌作用的苯扎溴铵,对结核分枝杆菌几乎无消毒作用。

## 第六节 结核分枝杆菌的致病性

### 一、病原性和毒力

结核分枝杆菌不产生内毒素和外毒素,其致病性可能与细菌在组织细胞内大量繁殖引起