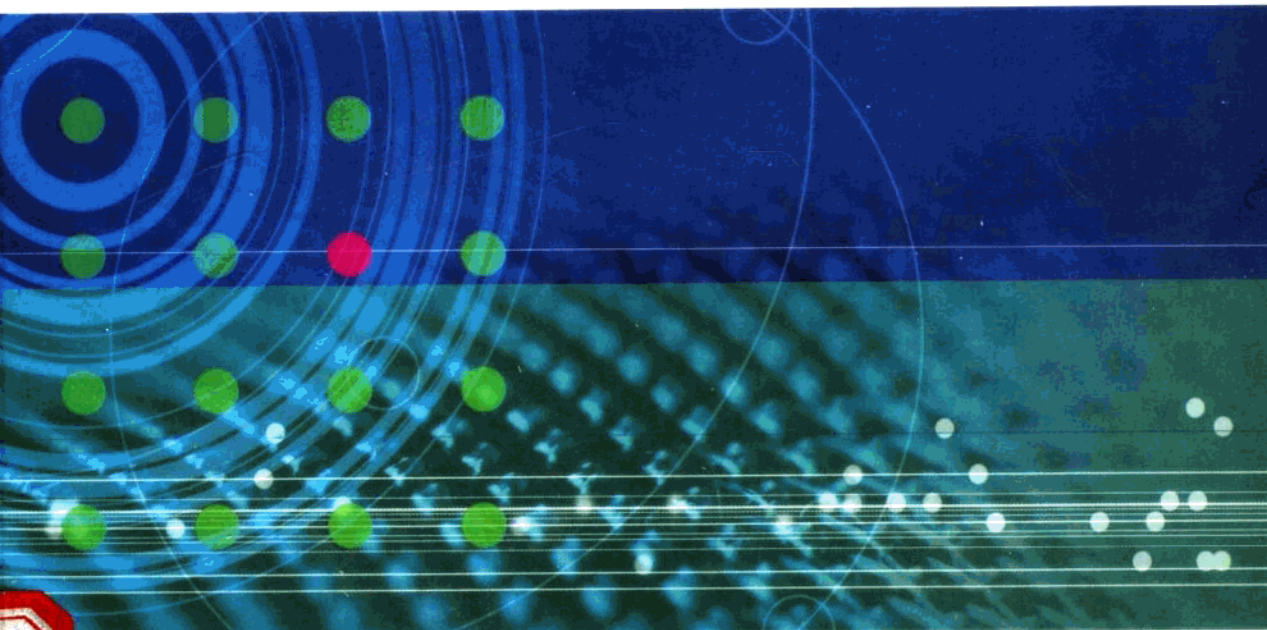


结核病 实验诊断学

熊礼宽 主编



 人民卫生出版社

前言

我国的结核病疫情和耐药情况仍然相当严重,非结核分枝杆菌病的发病率也呈逐年上升趋势。2000年第四次全国结核病流行病学抽样调查结果表明,我国结核病已经过“世界银行贷款项目”治疗了10年,但结核病的疫情并未明显下降,我国现有4亿多人感染了结核分枝杆菌;有肺结核病人450万,其中传染性肺结核病人150万(1990年为151万);结核病死亡率为9.8/10万,在我国各种死亡原因中居第9位,在传染病中居第一位;耐药结核病人多,耐药率高达27.8%,初治耐药率18.6%,获得性耐药率46.5%,MOTT分离率11.6%(1979年为5%)。近年来,河北省、深圳市、南平市曾先后发生脓肿分枝杆菌和偶然分枝杆菌暴发感染。面对这种严峻的形势,结核病的预防和治疗已引起国内外政府及学者的高度重视。2001年9月国家科委将“耐多药结核病的快速检测”列为国家“十五”重点攻关项目。

近年来,结核病的实验诊断已取得较大进展,如分枝杆菌快速培养、鉴定和药物敏感性测定,特别是分枝杆菌变色液体培养基系统不需要特殊仪器,能快速培养分枝杆菌,在2~6d内快速鉴定出结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌,并能检测出10多种抗结核分枝杆菌药物的耐药性及最小抑菌浓度。在血清学诊断方面,由于基因工程技术的广泛应用,结核分枝杆菌重组抗原的增加,结核分枝杆菌特异性抗体检测技术不断完善,使结核病的血清学诊断的特异性日益提高。在分子生物学技术方面,定量PCR技术已日益标准化和规范化,其临床含义日益明确,分枝杆菌DNA指印技术部分已正在标准化,为分枝杆菌的鉴定提供了一种新的方法,为证明结核病是内源性复发还是外源性感染提供了科学依据。不久的将来,基因芯片技术有可能用于结核分枝杆菌的鉴定和耐药性测定。

有鉴于此,控制结核病已是我们当务之急。控制结核病关键在于早期诊断、准确鉴别诊断结核病和非结核分枝杆菌感染、快速检测出耐多药的结核分枝杆菌,早期发现传染源,以便早期治疗。为此,我们组织了国内外23位学者编写了这本《结核病实验诊断学》。

本书根据近年来结核病实验诊断有关进展,结合我国的实际情况,本着理论与实际、实用与进展、普及与提高相结合的原则,就

分枝杆菌基础理论进行了较详细的阐述,对结核病实验诊断技术特别是分枝杆菌的快速培养、鉴定和耐药性测定以及分子生物学诊断等方面进行了全面系统的介绍。

参加本书编写者均为正从事结核病实验研究和实验诊断工作人员。深圳市慢性病防治院熊礼宽、程锦泉、杨应周,卫生部北京结核病肺部肿瘤研究所潘毓萱、王甦民,徐州医学院免疫学教研室王慧,广州市结核病肺部肿瘤研究所刘志辉,解放军 309 医院结核病研究中心吴雪琼、李国利、何秀云,暨南大学附属二院刘瑜、何林、吴幼松、梁训宏,武汉科技大学医学院张天民,上海市肺科医院结核病研究室胡忠义,宁夏医学院附属医院彭卫生,复旦大学生命科学院谢建平,约翰霍普金斯大学公共卫生学院分子微生物和免疫学研究室张颖,瑞士 Vaudois 大学微生物研究所传染病室阿玛略·泰伦提。

在编写过程中,得到了庄玉辉(解放军 309 医院结核病研究中心)教授和潘毓萱研究员的大力支持,并在百忙之中对全书进行了审阅,提出了宝贵的修改意见,在此深表谢意。此外,还要特别感谢我的妻子周亚红,她为本书做了大量的编辑工作。

本书适用于医学检验人员、临床医生、结核病控制工作者及从事结核病研究的科研人员。由于编写人员较多,学术风格和水平各异,可能有很多不妥甚至错误之处,殷切希望读者、同行和专家在使用过程中随时提出意见和建议,通过大家的努力,使此书日臻完善。同时,希望此书对读者能有所启迪,以期能够对提高我国结核病和非结核分枝杆菌感染的早期诊断、合理治疗,降低结核病的发病率有所贡献。

熊礼宽

2003 年 11 月

目 录

第一章 绪论	1
第一节 分枝杆菌感染实验诊断的现状.....	1
第二节 分枝杆菌感染实验诊断研究展望.....	4
第二章 分枝杆菌的分类	5
第一节 概论.....	5
第二节 分类.....	5
第三节 属以下的分类和命名.....	8
第四节 复合分枝杆菌	13
第三章 结核分枝杆菌生物学特性	14
第一节 结核分枝杆菌的形态和结构	14
第二节 结核分枝杆菌的理化特性	16
第三节 结核分枝杆菌变异性	17
第四节 结核分枝杆菌的抵抗力	17
第五节 结核分枝杆菌的致病性	18
第六节 结核分枝杆菌的化学成分及其生物学活性	19
第四章 非结核分枝杆菌的生物学特性	23
第一节 非结核分枝杆菌的理化特性	24
第二节 致病性	25
第三节 药物敏感性	26
第五章 常见结核分枝杆菌抗原的分子生物学	28
第一节 抗原 85 系列.....	28
第二节 Ag85 的物理化学和生物学活性	30
第三节 Ag5	31
第四节 ESAT6	34
第六章 分枝杆菌噬菌体分子生物学及其应用	37
第一节 概述	37
第二节 噬菌体位点特异性整合的研究	38

第三节	噬菌体研究的应用	39
第七章	分枝杆菌的质粒	41
第一节	概述	41
第二节	质粒相伴的功能	43
第三节	pA15000	43
第四节	其他质粒	45
第八章	结核分枝杆菌的基因组结构	47
第一节	概述	47
第二节	结核分枝杆菌毒力相关基因	48
第三节	结核分枝杆菌功能基因学研究策略	48
第九章	分枝杆菌耐药性	54
第一节	概述	55
第二节	药物作用及耐药机制	56
第三节	耐药与毒力	67
第四节	耐药株的快速检测	68
第十章	结核病免疫学	69
第一节	结核病的细胞凋亡	69
第二节	结核病免疫	71
第三节	结核病 DNA 疫苗的免疫学机制	76
第四节	结核病 DNA 疫苗的构建与接种	78
第五节	结核病 DNA 疫苗的安全性	81
第十一章	单克隆抗体技术在结核病诊断中的应用	83
第一节	结核分枝杆菌的单克隆抗体制备	83
第二节	结核分枝杆菌的单克隆抗体的应用	87
第十二章	结核病诊断实验室的规则及管理	89
第一节	结核病诊断实验室规则	89
第二节	结核病诊断实验室管理	90
第十三章	分枝杆菌显微镜检查	92
第一节	直接涂片法	92
第二节	集菌涂片法	93
第三节	染色方法	93
第四节	镜检方法与报告	97

第十四章	分枝杆菌培养	100
第一节	培养基的营养成分.....	100
第二节	影响分枝杆菌的生长因素.....	104
第三节	培养基的制备.....	105
第四节	培养基制备的质量控制.....	109
第五节	各种培养基的应用与评价.....	110
第六节	标本的前处理与接种.....	111
第七节	结果观察与报告.....	113
第八节	分枝杆菌 L 型的培养	114
第九节	分枝杆菌的菌种保存.....	116
第十五章	分枝杆菌的鉴定	117
第一节	分枝杆菌鉴定的生物学特性.....	117
第二节	分枝杆菌鉴定培养基及方法.....	119
第三节	分枝杆菌鉴定的生化反应及方法.....	121
第四节	常见分枝杆菌的鉴定程序.....	128
第五节	分枝杆菌鉴定的质量控制.....	129
第六节	色谱技术鉴定分枝杆菌.....	130
第十六章	分枝杆菌的药敏试验	135
第一节	绝对浓度法.....	135
第二节	比例法.....	138
第三节	仪器快速鉴定药物敏感性.....	140
第四节	Etest 法分枝杆菌药敏试验	147
第五节	微量快速显色药敏检测法.....	151
第六节	直接药敏试验.....	152
第十七章	结核病的免疫学检验	154
第一节	非特异性免疫功能测定.....	154
第二节	免疫球蛋白测定.....	161
第三节	特异性抗体测定.....	167
第四节	结核分枝杆菌抗原测定.....	175
第五节	循环免疫复合物测定.....	178
第六节	细胞免疫功能测定.....	185
第七节	细胞因子测定.....	193
第十八章	结核病的生物化学检验	201
第一节	酶学测定.....	201
第二节	蛋白质测定.....	213

第三节	微量元素测定	219
第四节	其他生化指标测定	222
第十九章	结核病的分子生物学检验	227
第一节	聚合酶链反应检测和鉴定结核分枝杆菌	227
第二节	其他核酸体外扩增技术	246
第三节	DNA 指纹技术在结核病中的应用	257
第四节	DNA 探针技术及其在结核病中的应用	261
第五节	PCR-SSCP 分枝杆菌菌种鉴定方法	292
第六节	基因芯片技术在结核分枝杆菌鉴定和耐药性检测中的应用	295
第二十章	结核病治疗药物监测	301
第一节	尿中抗结核药物的定性测定	302
第二节	抗结核药物的生物学测定法	309
第三节	体液中抗结核药物的化学定量法测定	313
第四节	高效液相色谱测定	315
第二十一章	分枝杆菌药物最小抑菌浓度测定	321
第一节	概述	321
第二节	MIC 测定	322
第二十二章	肺结核的实验室诊断	325
第一节	细菌学诊断	325
第二节	分子生物学诊断	327
第三节	免疫学诊断	327
第二十三章	结核性胸(腹)膜炎的实验室诊断	329
第一节	细胞学诊断	329
第二节	生物化学诊断	330
第三节	免疫学诊断	331
第二十四章	结核性脑膜炎的实验室诊断	333
第一节	生物化学诊断	333
第二节	细菌学诊断	334
第三节	免疫学诊断	335
第四节	分子生物学诊断	341
第二十五章	肾结核的实验室诊断	343
第一节	概况	343

第二节 实验室诊断.....	343
主要参考文献.....	346
附录 本书通用缓冲液的配制.....	348

全世界,由于艾滋病(acquired immune deficiency syndrome, AIDS)患者增加,结核病和非结核分枝杆菌病(nontuberculous mycobacteria, NTM)的发病率呈逐年上升的趋势,部分肺结核病人同时感染非结核分枝杆菌(*mycobacteria other than mycobacterium tuberculosis*, MOTT)。虽然 MOTT 的临床表现、X 线特征与肺部感染(结核病、支气管扩张合并感染等)极其相似;痰涂片发现抗酸杆菌(acid-fast bacilli, AFB)与结核病相同,两者形态学上很难鉴别,但临床治疗差别较大,许多 MOTT 对抗结核药耐药率高或对抗结核药物呈天然耐药,若按结核病治疗,即使病人经长期规则化疗而疗效依然不佳,成为所谓“难治、复治”结核病人。因此,分枝杆菌的培养、菌种鉴定对结核病的诊断、鉴别诊断和有效化疗都有极其重要的意义。MOTT 的菌型鉴定及最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)测定在 MOTT 或 NTM 的治疗中起着决定性作用。

第一节 分枝杆菌感染实验诊断的现状

一、涂片染色和培养

尽管涂片染色检查分枝杆菌需标本中含 10^4 /ml 条分枝杆菌方能检出,约 40%~60% 的肺结核和约 75% 的肺外结核病人涂片阴性。但由于其简单、快速,故一直是检查分枝杆菌的首选方法。涂片染色包括抗酸染色、活体染色和荧光染色。由于荧光染色阳性率高于抗酸染色,所需检查时间短,因此,有条件的实验可进行荧光染色。尽管如此,分枝杆菌涂片染色阳性率仍然不高(15%~25%),且鉴别死菌和活菌比较困难,需进行特殊染色,不能鉴别结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTb)和 MOTT,导致半数以上的活动性结核病人涂片为阴性,尤其是儿童结核病。因此,分枝杆菌培养和鉴定在诊断结核病过程中起着决定性作用。分枝杆菌培养基种类很多,主要有固体培养基和液体培养基,固体培养基有改良罗-琼(Lowenstein-Jensen, L-J)培养基、酸性 L-J 培养基、丙酮酸钠培养基和 Middlebrook 系列固体培养基等。液体培养基有变色液体培养基, Middlebrook 7H9、7H11 和 7H12B 液体培养基等,它们适用于临床上各种标本分离培养分枝杆

菌,如痰、脓液和分泌物等。我国大多数医院实验室使用 L-J 培养基培养分枝杆菌(阳性率 30%~40%),再经过对硝基苯甲酸(paranitrobenzoic acid, PNB)耐受试验进行鉴别是 MTb,还是 MOTT,其药敏试验也是在改良 L-J 固体培养基中加入一定量的药物来进行,包括绝对浓度法和比例法等。其所需时间长,培养和药敏一般要 2~3 个月才能出结果,已不能满足临床的要求。结核病专科实验室采用液体培养基培养分枝杆菌,包括分枝杆菌变色液体培养基系统、分枝杆菌生长指数管(mycobacteria growth indicator tube, MGIT)系统、BACTEC-TB 系统(460 和 960 系统)、ESP II 系统和 MB/BacT 系统。绝大多数分枝杆菌液体培养基系统是在 7H9 或 7H11 液体培养基的基础上增加了分枝杆菌促生长剂、抗生素和氧化还原指示剂(色原底物)或荧光底物等标记物。均为选择培养基,抗生素混合液抑制和杀死真菌和普通细菌,一旦微生物生长,则分解色原等标记底物,产生肉眼可见的紫红色、紫色或蓝色的颗粒或溶液,或产生荧光,或者是感应器变色。BACTEC-TB460 采用含放射性的碳(^{14}C)标记底物棕榈酸,当有活的微生物生长时,则分解棕榈酸(^{14}C -labeled palmitic acid)脱羧产生有放射性的 CO_2 ,通过检测 CO_2 含量来判断分枝杆菌是否存在。再经 α -硝基- α -乙酰氨基- β -羟基苯丙酮(α -nitro- α -acetylamino- β -hydroxypophenone, NAP)耐受试验鉴别是 MTb,还是 MOTT。由于有放射性污染,现采用荧光底物(tris(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline) ruthenium chloride pentahydrate),如 BACTEC-TB960 和 MGIT 系列。ESP II 系统是一种全自动分枝杆菌培养系统,培养基也为选择性培养基,当有微生物生长时,氧含量减少,通过测定培养瓶中压力变化判断是否有分枝杆菌生长。MB/BacT 系统中培养基底部固态感受器为比色显色器,当培养瓶中有 CO_2 产生时,显色器由绿色变为黄色。由于液体培养基检测分枝杆菌阳性率高于固体培养基,所需时间也明显缩短,但除变色液体培养基系统外,均需要特殊仪器,试剂昂贵,且依靠进口。变色液体培养基不仅能快速检测分枝杆菌,还能快速鉴别 MTb 和 MOTT(见第十五章),同时进行分枝杆菌药敏试验和 MIC 测定(见第十六章、第二十一章),且不需特殊仪器,为一种经济实用的 MTb 培养、鉴定、药敏和 MIC 测定系统。

二、鉴 定

自 1882 年 Koch 发现 MTb 以来,已报道了 100 余种分枝杆菌,被细菌国际命名委员会审定的有 54 种,我国从临床标本中已分离出近 20 种分枝杆菌,如 MTb、牛结核分枝杆菌、偶然分枝杆菌、鸟分枝杆菌、胞内分枝杆菌、龟分枝杆菌、脓肿分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、瘰疬分枝杆菌、浅黄分枝杆菌、戈登分枝杆菌、耐热分枝杆菌、微黄分枝杆菌、草分枝杆菌、不产色分枝杆菌、金色分枝杆菌、次要分枝杆菌、土地分枝杆菌、耻垢分枝杆菌、溃疡分枝杆菌等。2000 年第四次全国结核病流行病学调查资料显示分枝杆菌培养阳性者,MTb 占 86.4%,牛结核分枝杆菌占 2.5%,MOTT 占 11.1%。目前,传统的分枝杆菌菌种鉴定方法需在改良 L-J 培养基、PNB 和 2-噻吩羧酸肼(2-thiophene carbonylic acid hydrazide, TCH)鉴别培养基上初步鉴定 MTb 和 MOTT 后,再观察细菌菌落形态、生长速度、生长温度和色素,进行一系列生化试验,如 PNB 或 NAP 耐受试验、生长速度(7d)、生长温度(28℃、35℃和 45℃)、耐热触酶试验、烟酸试验、耐热磷酸酶试验、吐温水解试验、尿素酶试验、氯化钠耐受试验、苦味酸试验、芳香硫酸酯酶试验(3d、14d)、硝酸盐还原试验、铁吸收试验、麦康凯琼脂生长试验等。这些操作相对繁琐、费时,需 4~8 周时间,影响因素多,

如菌量、菌龄,尤其是菌量控制无客观标准,重复性差。目前临床实验室常规开展的不多。BACTAC-TB460和960系统问世以来,以其简便、快速(培养需1~6d)、可同时报告药敏试验结果及初步鉴别结核分枝杆菌复合群(*Mycobacterium tuberculosis complex*, MTC)和MOTT(需2~6d)的优点,在国内外已成为结核病诊断的标准参照系统之一。BACTEC-TB460系统快速菌种鉴定法是利用NAP对MTC生长有抑制作用,而对MOTT生长无抑制作用,在BACTAEC-TB460系统内加入NAP继续培养2~6d后,根据生长指数初步鉴别MTC和MOTT。目前BACTEC-TB460和960系统菌种初步鉴定法与传统鉴定法比较,其特异性为95%~100%,但由于BACTEC-TB460和960系统仪器和试剂价格昂贵,难以在普通实验室广泛开展。BACTEC-TB460和960系统还需同时接种改良L-J培养基以便进一步进行菌性型鉴定。

近年来建立的色谱方法(如气相色谱、高效液相色谱和薄层色谱)、核酸探针、聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(*polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*, PCR-RFLP)分析等方法只能鉴别部分分枝杆菌,而且色谱技术需特殊的仪器,核酸探针的敏感性较低,目前PCR-RFLP的重复性较差,PCR-DNA测序法虽能够可靠地确定分枝杆菌种特异性核苷酸序列,但测序费用较高,需有测序仪器。因此,尚未在临床广泛开展。

此外, Tec ETprobe系统可快速检测MTb。Gen-PROBE也可快速鉴别MTC和MOTT。高效液相色谱分析分枝杆菌也可用作分枝杆菌鉴定的辅助指标。DNA芯片技术鉴定分枝杆菌正处于研究阶段。

三、药物敏感试验

MTb药物敏感试验方法有比例法、绝对浓度法、微量快速法、E-test法和耐药基因检测等。MOTT多对常见的抗结核药物耐药,一旦确定为MOTT,则不必再做常规抗结核药物敏感试验。尽管上个世纪60年代WHO推荐采用绝对浓度法在L-J培养基进行抗结核药物敏感试验,但美国疾病控制中心(CDC)和国家临床实验标准委员会(NCCLS)现推荐采用Middlebrook7H10琼脂培养基加油酸-白蛋白-葡萄糖-触酶(OADC)以比例法作为慢生长分枝杆菌药物敏感试验的标准方法。对于耐多药的MTb和MOTT最好采用液体培养基测定药物MIC,如亚胺培南(imipenem, IM)、阿米卡星(amikacin, AMI)、羟氨苄青霉素-棒酸(amoxicillin clavulan)、妥布霉素(tobramycin, TOB)、头孢西丁(cefboxitin, CEF)、克拉霉素(clarithromycin, CLA)、阿奇霉素(azithromycin, AZI)、罗红霉素(roxithromycin, ROX)、氧氟沙星(ofloxacin, OFL)、环丙沙星(ciprofloxacin, CIP)、米诺环素(minocycline, MIN)和多西环素(deoxycline, DOX)等。

吡嗪酰胺(pyrazinamide, PZA)的最适pH为5.5,而分枝杆菌最适pH为6.8~7.2。Salfinger等推荐检测PZA药物敏感性的培养基pH为 5.9 ± 0.1 ,但此时仍有约25%的MTb分离株生长不良。尽管以BACTEC 12B培养基为基础,但有些菌株也需2周时间才能获得结果。且必须进行对照试验,牛结核分枝杆菌和卡介苗(*Bacille Calmette Guerin*, BCG)菌株耐PZA, MTb中H37Rv对PZA敏感。因此, PZA对分枝杆菌敏感性试验仍需进一步研究,以满足临床需要。

目前,噬菌体荧光素酶法、生物发光法和流式细胞仪等测定分枝杆菌药物敏感性尚在

研究阶段。分子生物学测定分枝杆菌耐药基因有 *katG*、*inhA*、*rpoB*、*embB*、*mabA*、*ahpC*、*oxyR*、*pncA*、*rrs*、*rpsL*、*gyrA* 和 *gyrB* 等。

四、血清学诊断

在美国每年也有 15% 以上的结核病是没有细菌学[涂片和(或)培养]证据,靠临床表现、X 线和诊断性治疗,因此,血清学诊断在细菌学阴性的结核病、肺外结核病和儿童结核病等诊断中起着重要作用。由于 MTb 纯化蛋白衍生物(purified protein derivation, PPD)抗体(不应称为结核抗体)特异性和敏感性差,已不用作诊断结核病的指标,现多用 MTb 特异性重组抗原检测其特异性抗体,如 38kD 蛋白(抗原 5)诊断活动性肺结核的敏感性和特异性分别为 64%~89% 和 81%~100%,为目前诊断结核病特异性最好的抗原之一。有研究表明,该抗原可用于鉴别诊断 MTb 和 MOTT 感染。抗原 60、抗原 Kp90、抗原 19、索状因子、早期分泌抗原靶(6kD early secreted antigenic target, ESAT-6)、CFP10、MPT32、DAT、45kD/47kD 抗原复合物和抗原 85 系列等虽然其特异性高,可鉴别 MTb 和 MOTT 感染,但其敏感性有待提高,且需大量的临床研究。

第二节 分枝杆菌感染实验诊断研究展望

据 WHO 估计,未来 10 年全球将有 3000 多万人死于结核病,且耐多药的结核病(multidrug resistance-tuberculosis, MDR-TB)正在逐年增加,MOTT 感染暴发流行时有发生,目前我国有 5 亿人曾感染 MTb,600 多万人患肺结核,其中 200 多万人具有传染性,每年死于此病者高达 25 万之多,且 MDR-TB 患者所占的比例大。无疑给结核病实验诊断提出了更高的要求。

1. 由于分枝杆菌在液体培养基中生长速度快于固体培养基,因此,应加强分枝杆菌液体培养基的研究与临床评价,以利于新的抗结核药敏试验标准的建立。同时,可进行将多种生化反应在固体培养基中同时进行的探索,有望通过菌落的颜色和形态快速鉴定常见的致病性分枝杆菌。此外,MTb 的 L 型的检出及临床意义研究也应加强。

2. 利用基因工程技术高效表达具有免疫活性的重组蛋白,如抗原 85A、抗原 85B、抗原 85C、CFP10、ESAT-6、CFP17、CFP20、CFP21、CFP22、CFP25、19kD 脂蛋白、24kD 脂蛋白、27kD 脂蛋白、38kD 脂蛋白等。检测其特异性抗体,采用多种纯化抗原同时检测,以提高其敏感性。利用高度纯化的重组蛋白制备单克隆抗体诊断结核性脑膜炎、腹(胸)膜炎等。利用特异性循环免疫复合物和抗体动态水平评价临床疗效。

3. 由于 MTb(H37Rv)全基因序列已清楚,因此,应加强耐药基因的研究,以利于耐药基因芯片的早日问世。

4. 加强分枝杆菌 DNA 指纹技术研究,结合计算机技术,可快速鉴定各种分枝杆菌。同时,将基因芯片技术用于分枝杆菌菌型鉴定,以利于有实用性的基因芯片用于分枝杆菌的快速鉴定和药敏。

(熊礼宽)

第二章

分枝杆菌的分类

第一节 概 论

结核病的病原体为结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTb), 简称结核菌, 按生物学分类学的界、亚界、门、纲、目、科、属、种进行分类, MTb 是属于原核生物界(Prokaryotae)、真细菌亚门(Eubacteria)、厚壁菌门(Firmacutes)、放线菌纲(Antinomycetes)或裂殖菌纲(Schizomycetes)、放线菌目(Actinomycetales)、分枝杆菌科(Mycobacteriaceae)、分枝杆菌属(Mycobacterium)、结核种(tuberculosis)。属和属以上的名称首字母都要大写。

分枝杆菌的分类法有多种: 如数值分类法, 按分枝菌酸(mycolic acid)的碳原子数(在 50~100)顺序排列分类; 种系发育分类; 树枝分类和语意分类等。过去的分类法比较注重于表型分类, 其代表即 Runyon 分类, 今后要逐渐过渡到基因分类, 以 16S~23S rRNA (DNA) 序列等生物技术为主, 因为后者比较准确(见表 2-1)。

本书分类仍沿用分枝杆菌国际研究班、国际微生物学会协会、国际系统细菌学委员会(International Committee of Systemic Bacteriology, ICSB)等的研究确定, 将分枝杆菌分为迟缓生长分枝杆菌和迅速生长分枝杆菌两大类, 本章先把 2000 年底以前已知分枝杆菌 128 种菌名列出, 然后再按原次序将重要的、致病的分枝杆菌重点给予略为详细的介绍。

第二节 分 类

一、迟缓生长分枝杆菌

1. 结核分枝杆菌群 包括 MTb、牛结核分枝杆菌、非洲分枝杆菌和田鼠分枝杆菌。
2. Runyon I 群 包括堪萨斯分枝杆菌、海分枝杆菌、猿分枝杆菌和亚洲分枝杆菌。
3. Runyon II 群 包括瘰疬分枝杆菌、戈登分枝杆菌、苏尔加分枝杆菌和皮疽分枝杆菌。

4. RunyonⅢ群 包括鸟分枝杆菌、蟾分枝杆菌、马尔摩分枝杆菌、嗜血分枝杆菌、溃疡分枝杆菌、胃分枝杆菌、胞内分枝杆菌、地分枝杆菌、无色分枝杆菌、次要分枝杆菌、副结核分枝杆菌、鼠麻风分枝杆菌和麻风分枝杆菌。

二、迅速生长分枝杆菌

迅速生长分枝杆菌(RunyonⅣ群) 包括偶然分枝杆菌、龟分枝杆菌、脓肿分枝杆菌、耻垢分枝杆菌、赤塔分枝杆菌、草分枝杆菌、转黄分枝杆菌、副偶然分枝杆菌、耐热分枝杆菌、金色分枝杆菌、杜瓦尔分枝杆菌、新金色分枝杆菌、淡黄分枝杆菌、加德斯分枝杆菌、牡牛分枝杆菌、卡默森分枝杆菌、塞内加尔分枝杆菌、舍木地分枝杆菌、田地分枝杆菌、爱知分枝杆菌、中部分枝杆菌、大府分枝杆菌、猪分枝杆菌、罗德西亚分枝杆菌、沼鲜分枝杆菌、东海分枝杆菌、假分枝杆菌、南非分枝杆菌、迪氏分枝杆菌和尘埃分枝杆菌。

三、其他分枝杆菌

1. 伯杰细菌手册第一版收入而新版未收的菌种 石蜡分枝杆菌、蛇分枝杆菌和外来分枝杆菌。

2. 其他文献报告的分枝杆菌 ①阿加普尔分枝杆菌;②白色分枝杆菌;③攀登分枝杆菌;④厌氧分枝杆菌;⑤吸氮分枝杆菌;⑥巴氏分枝杆菌;⑦布兰分枝杆菌;⑧硝化丁烷分枝杆菌;⑨柠檬产生分枝杆菌;⑩旋卷分枝杆菌;⑪库奇分枝杆菌;⑫蓝色分枝杆菌;⑬肠类分枝杆菌;⑭铁硅分枝杆菌;⑮线形分枝杆菌;⑯粪土分枝杆菌;⑰丝状分枝杆菌;⑱黄色分枝杆菌;⑲荧光分枝杆菌;⑳鸡分枝杆菌;㉑球形分枝杆菌;㉒乳生分枝杆菌;㉓约氏分枝杆菌;㉔藤黄分枝杆菌;㉕甲烷分枝杆菌;㉖盛冈分枝杆菌;㉗鼠型分枝杆菌;㉘嗜寡氮分枝杆菌;㉙红皮分枝杆菌;㉚红色分枝杆菌;㉛萨氏分枝杆菌;㉜唾液分枝杆菌;㉝单纯分枝杆菌;㉞上海分枝杆菌;㉟信州分枝杆菌;㊱32型分枝杆菌;㊲粪堆分枝杆菌;㊳高田分枝杆菌;㊴肿胀分枝杆菌;㊵巴伦西亚分枝杆菌;㊶云南分枝杆菌。

3. 1990年~2000年新发现的MOTT

(1)日内瓦分枝杆菌(*M. genavense*):1990年由 Hirschel 首先报道,索引病例在日内瓦,故名,为迟缓生长分枝杆菌,对人类引起播散性感染,好合并于 AIDS,报告近百例,已获公认。死亡率高,表现与鸟复合分枝杆菌(*M. avium* complex, MAC)感染相似,鉴别点在于在液体培养基中 MAC10d 就有生长,本病菌要 58d 才生长,多重 PCR 可快速检出,治疗要用 CLA 在内的对 MAC 感染化疗方案。

(2)隐藏分枝杆菌(*M. celatum*):1993年 Butler 首先报道。为迟缓生长分枝杆菌。生化反应类似鸟分枝杆菌,分枝菌酸与蟾分枝杆菌相仿。引起播散性感染、颈淋巴结炎、阴茎感染。也常并发于 AIDS,对于抗结核药呈原发耐药性。有 I~Ⅲ型之分,Ⅰ型与 MTC 在基因探针上有交叉反应,需 16Sr RNA 序列分析等法鉴别。

(3)粘液分枝杆菌(*M. mucogenicum* sp. nov.):1995年 Springer 首先报道,属偶然分枝杆菌群的成员,为迅速生长分枝杆菌,在固体培养基上能高产粘液样物质,故名,在高效液相色谱上呈独特的分枝菌酸图谱。可引起创伤后皮肤感染和败血症。鉴定菌株号为 ATCC49649 和 ATCC49651。

(4)居间分枝杆菌(*M. interjectum* sp. nov.):1993年 Springer 首先报道,可致儿童

淋巴结炎及慢性毁损性肺疾病。需用 16S rRNA 序列分析。

(5)海德堡分枝杆菌(*M. heidelbergense sp. nov.*):1997年 Haas 首先报道,为迟缓生长分枝杆菌,不产色,在海德堡发现,故名。从儿童淋巴组织分离而得。在色谱上似马尔摩分枝杆菌,以 16S rRNA 测序,与猿分枝杆菌近似,对抗常规结核药高度敏感。鉴定菌株号为 ATCC51253。

(6)新卡城分枝杆菌(*M. novocastrense sp. nov.*):1997年 Shojaei 首先报道,在新卡城发现,故名。为迅速生长分枝杆菌,光产色,黄色。分离自儿童手皮肤慢性肉芽肿,16S rRNA 基因测序呈独特性,鉴定菌株号为 DSM44203。

(7)波希米亚分枝杆菌(*M. bohemicum sp. nov.*):1998年 Reisch 首次报道,为迟缓生长分枝杆菌,暗产色,在 25~40℃ 生长,最适温度 37℃,酶活性弱,从 56 岁男患者痰中分离,原诊断结核病。对乙硫异烟胺(ethionamide, Th1314)、环丝氨酸(cycloserine, CS)、CLA、AMI 和庆大霉素敏感,对 CIP、RFP、乙胺丁醇(ethambutol, EMB)和异烟肼(isoniazid, INH)耐药。有独特的 16S rDNA 核苷酸序列。鉴定菌株为 DSM44277。

(8)沃林斯基分枝杆菌(*M. wolinski sp. nov.*):对 SMZ、AMI、IM 和四环素敏感。鉴定菌株为 ATCC700010^T=M(O)739^T。

(9)戈地分枝杆菌(*M. goodi sp. nov.*):鉴定菌株号 ATCC700504^T=M(O)769^T,对四环素,CLA 耐药,对 TOB 中度耐药。以上两者都是 1999 年由 Brown 首次报道,为迅速生长分枝杆菌,在常规生化反应和生长特征上彼此相似,但在高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)上有相异图谱,多在创伤后或手术后伤口感染或骨髓炎时出现。两者与耻垢分枝杆菌和 *M. mageritense* 密切相关。

(10)脓毒性分枝杆菌(*M. septicum sp. nov.*):于 2000 年由 Schinsky 发现的迅速生长分枝杆菌,致病。鉴定菌株为 ATCC700731。

(11)不可育分枝杆菌(*M. tilburgil sp. nov.*):近似麻风杆菌,分离自 HIV 感染者。

(12)雾分枝杆菌(*M. brumae sp. nov.*):1993年 Luquin 报道,为迅速生长非光产色分枝杆菌,分离自西班牙巴塞罗那的水、土壤和人痰中,根据 G+C 含量、分枝菌酸图谱、色谱分析,证实为分枝杆菌。

(13)缓黄分枝杆菌(*M. lentiflavum sp. nov.*):1996年由 Springer 报道,迟缓生长,产黄色色素。在 Tween80 中水解,烟酸试验、硝酸盐还原试验和尿素水解试验阴性,16S rRNA 呈独特性序列,与猿分枝和日内瓦分枝杆菌密切相关。

(14)霍德勤分枝杆菌(*M. hodleri sp. nov.*):1996年由 Keespies 报道,为迅速生长分枝杆菌,能降解多环芳香烃,从氟蒽污染的土壤中分离而得,根据其脂肪酸图谱分析,属分枝杆菌,16S rRNA 序列呈独特性,在种系发育上与迪氏分枝杆菌和新金色分枝杆菌相近。

(15)三重分枝杆菌(*M. triplex sp. nov.*):1996年 Floyd 报道,为迟缓生长分枝杆菌,不产色,美国多见,HPLC 上的分枝菌酸图谱似猿分枝杆菌,16S rRNA 呈独特性序列,鉴定菌株为 ATCC70071。

(16)爱尔兰分枝杆菌(*M. hiberniae sp. nov.*):为迟缓生长分枝杆菌,暗产色,产玫瑰粉红色素,在爱尔兰土壤中发现。能在 22℃、31℃ 和 37℃ 生长,不能在 45℃ 生长,能还原硝酸盐,鉴定菌株为 ATCC49874。

(17)中间分枝杆菌(*M. intermedium sp. nov.*):1993年 Meier 首先报道,为迟缓生长分枝杆菌,从肺部疾病患者痰中分离出,光产色,生长于 22℃、31℃、37℃ 和 41℃,16S rRNA 测定位于迅速生长分枝杆菌和迟缓生长分枝杆菌之间,故名。鉴定菌株为 1669/91,贮存于 DSM44049。

(18)壁分枝杆菌(*M. murale sp. nov.*):1999年 Vuorio 首先报道,为暗产色菌,分离自托儿所室内墙壁水浸物,10~37℃ 生长,45℃ 无生长,聚胺含量低,G+C 含量 72.9mol%,鉴定菌株号 MA112/96T(=DSM44304T)。

(19)*M. hassiacum sp. nov.*:1998年 Tortoli 首先报道,为迅速生长分枝杆菌,分离自尿样本,但与临床无关联。嗜热,分枝菌酸 HPLC 图谱独特。

(20)哈瓦那分枝杆菌(*M. habana sp. nov.*):90年代初发现,原先与猿分枝杆菌无法鉴别,后来根据本菌有糖肽脂Ⅱ和Ⅲ,而与前者相鉴别。

(21)*M. mageritense sp. nov.*:90年代初发现,应与耻垢分枝杆菌、*M. wolinskyi*、*M. goodii* 鉴别。

(22)氯酚分枝杆菌(*M. chlorophenicum*):90年代初发现,只用于生物工程。

(23)新乳分枝杆菌(*M. neolactis*)。

(24)Lufu 分枝杆菌。

(25)炫耀分枝杆菌(*M. conspicuum*)。

(26)Kitamiense 分枝杆菌。

(27)托斯卡分枝杆菌(*M. tusciae*)。

(28)波特尼分枝杆菌(*M. botniense sp. nov.*):分离自芬兰的溪水。与蟾分枝杆菌相关。

(29)Ratisbonense 分枝杆菌:用于污水处理。

(30)布分枝杆菌(*Branderi sp. nov.*)。

(31)海绵分枝杆菌(*M. poriferae sp. nov.*)。

(32)河床分枝杆菌(*M. alvei sp. nov.*)。

(33)马达加斯加分枝杆菌(*M. madagascariense sp. nov.*)

以上 33 种新发现的分枝杆菌绝大多数未获公认,故在名称后注明新种 *sp. nov.*。其中(1)~(11)为致病菌。

第三节 属以下的分类和命名

一、迟缓生长分枝杆菌

(一)结核分枝杆菌群(*Mycobacterium tuberculosis complex*, MTC)

1. 结核分枝杆菌(MTb) Robert Koch 在 1882 年发现本菌时,将其命名为结核杆菌(*tubercle bacillus*),第 2 年由 Zopf 正式命名为 *Bacterium tuberculosis*,10 多年后,Lehmann 和 Neumann 再给分类命名,为结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*);其他的分枝杆菌或其他细菌依此类推。MTb 抗酸染色呈红色,革兰氏染色呈中性(既不呈紫色,也不呈红色),称分枝杆菌革兰氏染色阴影。形态细长稍弯曲或呈 Y、V 和人字形等,经抗结核药

物治疗后可呈链状、球杆状、放线状等多种形态。在含丙三醇鸡卵固体培养基上生长旺盛，最初生长为乳白色菌落，表面粗糙，边缘不整，菜花状易形成广泛菌苔，培养时间延长渐呈淡黄色。菌落难以从培养基上剥离，也难以悬浮于水中。临床上 95% 以上的结核病由 MTb 引起。

按分类学，属(genus)以下为种(species)、变种(variety, var.)或亚种(subspecies)，种以下为型或品系、菌株(form 或 typus)，例如人结核分枝杆菌(*M. tuberculosis var. hominis*)。

最近发现 MTb 有一个山羊亚种即结核分枝杆菌山羊亚种(*M. tuberculosis subsp. caprae subsp. nov.*)，硝酸盐还原试验和烟酸试验阴性，弱水解 Tween80，对 PZA50 μ g/ml 敏感，对 1~2 μ g/ml TCH 有抗性，但对 5 μ g/ml~10 μ g/ml TCH 则否，*pn-cA* 基因序列分析为 MTb 的多态特征。而 *oxyR*、*katG* 和 *gyrA* 序列则为牛结核分枝杆菌的特征，IS6110、直接重复 PGRS-RFLP 和 spoligotyping 分析，为 TMC 的其他成员，暂以山羊亚种命名，鉴定菌株号 gM¹¹(=IP105776^T)。

W 菌株为上世纪 90 年代初在纽约发现的耐多药菌株，耐 7~8 种一、二线抗结核药，曾引起多次暴发流行，此 W 菌株(还有 210 菌株)传播和或复制能力强，位于 H37Rv 基因组序列之内，但 IS6110 插入的 17 个相同位点的其他序列则不在 H37Rv 内，而见于其他临床分离株。Canetti So93 菌株，于 1967 年 Canetti 首先报告，其生化反应与 MTb 相同，16S rRNA 序列分析亦与 MTb 相同，但只呈光滑型，不能回复到粗糙型，对豚鼠致病，含与 H37Rv 相异的糖脂和脂多糖，传代时间短于 H37Rv。

北京家族菌株是近 10 年展开以分子生物学技术研究探讨出来的半成品。传统的菌株包括毒力型的 H37Rv(即粗糙型)和无毒型 H37Ra(光滑型)。

2. 牛结核分枝杆菌(*M. tuberculosis var. bovis*) Karlson 于 1976 年发现，其形态粗短，在含丙三醇的鸡卵固体培养基不易生长，先形成湿润的粟粒大圆形菌落，以后仅能增大，渐呈灰白色，易从培养基上剥离，菌落易悬浮于水中，常导致牛和儿童的胃、关节结核，在结核病中约有 5% 以下由牛结核分枝杆菌引起，也可书写为牛分枝杆菌(*M. bovis*)，其菌株有 Ravenel，另外，BCG 就是经过减毒的牛结核分枝杆菌。

3. 非洲分枝杆菌(*M. africanum*) Castets 于 1969 年发现，为劣势发育的分枝杆菌，分离的西非的肺结核患者的痰，其他地方很少发现，属于人结核分枝杆菌和牛结核分枝杆菌的中间型，天然耐氨硫脲(thiacetazonum, TB1)。有 I 和 II 两种亚型。

4. 田鼠分枝杆菌(*M. magerit*) Reecoin Breed 于 1957 年发现，斋藤认为是一个独立菌种，原来只感染野外田鼠(vole)，有两种类型，一为田鼠型，另一为美洲无峰驼(llama)型。

以上 4 种分枝杆菌都归于 MTC，不少学者还把 BCG 单独列出，于是 MTC 内有 5 个成员。

(二)Runyon I 群分枝杆菌(光产色分枝杆菌)

此菌群在暗处培养时，其菌落难与 MTC 相区别，但遇光会呈现出黄橙色菌落。

1. 堪萨斯分枝杆菌(*M. kansasii*) 1953 年由 Buhler 首先报道，Hauduroy 于 1955 年命名，该菌体比 MTb 稍长而宽，成对或呈曲线排列。在含丙三醇的鸡卵固体斜面上 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 周长出菌落，其表面和边缘不整，暗处生长的菌落无色或白色，在有光条件下