

临床微生物学教育丛书

CLINICAL MICROBIOLOGY EDUCATIONAL SERIES

主编

王金良 倪语星
胡必杰 徐英春

主审

司徒永康

审阅

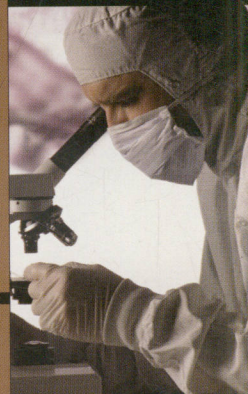
梁皓钧 任永昌

DIAGNOSIS OF MYCOBACTERIOSIS
IN THE LABORATORY

分枝杆菌病

GOOD LABORATORY
PRACTICES

实验诊断规范



上海科学技术出版社

5

临床微生物学教育丛书
CLINICAL MICROBIOLOGY EDUCATIONAL SERIES

主编

王金良 倪语星
胡必杰 徐英春

主审

司徒永康

审阅

梁皓钧 任永昌

DIAGNOSIS OF MYCOBACTERIOSIS
IN THE LABORATORY

分枝杆菌病

GOOD LABORATORY
PRACTICES

实验诊断规范

上海科学技术出版社

5

图书在版编目(CIP)数据

分枝杆菌病实验诊断规范 / 王金良等主编. —上海:
上海科学技术出版社, 2006. 5
(临床微生物学教育丛书)
ISBN 7-5323-8338-5

I. 分... II. 王... III. 分枝杆菌—感染—实验室
诊断—规范 IV. R519.1-65

中国版本图书馆CIP数据核字(2005)第147862号

上海世纪出版股份有限公司 出版、发行
上海科学技术出版社

(上海钦州南路71号 邮政编码200235)

新华书店上海发行所经销

上海市美术印刷厂印刷

开本 787×1092 1/16 印张 4.75

字数 50 000

2006年5月第1版

2006年5月第1次印刷

定价 15.00元

本书如有缺页、错装或损坏等严重质量问题,
请向工厂联系调换

内容提要

本书借鉴国际上最新的观念、方法,并结合我国的实际情况,主要介绍分枝杆菌病的流行病学、临床特征、分类、分级检验、安全措施、标本收集、染色方法、显微镜检查、培养基选择、培养条件、鉴定技术、药物敏感性试验、质量保证、分枝杆菌属的临床意义。

本书可为广大临床微生物学工作者及感染性疾病、呼吸科疾病专业的临床医生参考使用。

主编

王金良 倪语星 胡必杰 徐英春

作者

王金良 路秀文 巩岩霞

主审

司徒永康

审阅

梁皓钧 任永昌

前言

临床微生物学诊断在感染性疾病及相关疾病的诊断、治疗、预防以及研究工作中起着越来越重要的作用。它既是实验诊断的重要组成部分,又是医学领域相对独立的学科。

在我国,临床微生物学诊断这一学科的发展相对滞后,与实验诊断的其他学科相比,尚未受到应有的、足够的重视。

医学发展的现状,尤其是感染性疾病发展的形势,要求我们必须充分重视并努力加强临床微生物学诊断这一学科的发展。

其理由:

第一,新的病原体及其所致的新的感染性疾病不断出现。WHO 已发布近 30 年来明确肯定的 30 余种新病原体,其数目现仍在不断增加。尤其是以疯牛病为代表的新病原体 prion(国内部分专家提议译为朊粒)的确定,改变了我们对传统病原体的认识,无疑对病原体的实验诊断提出新的挑战。

第二,许多传统的老病原体出现了临床新问题,对实验诊断提出了新的要求,如霍乱弧菌 O139,多种多样的致腹泻大肠埃希菌,引起中毒性休克综合征的葡萄球菌和链球菌,迅速增加的性传播性疾病病原体,基因变异的乙型、丙型肝炎病毒等,迫使实验诊断手段必须不断改进才能与之相适应。

第三,新、老病原体的耐药性明显增强,不仅带来治疗上的困难,也向实验诊断提出挑战。许多耐药细菌,如耐甲氧西林葡萄球菌(MRSA 和 MRCS)、耐万古霉素肠球菌(VRE)、耐青霉素肺炎链球菌(PRSP)、低耐万古霉素金黄色葡萄球菌(VISA)、产超广谱 β 内酰胺酶(ESBL)、金属酶及多重

耐药的肠杆菌、非发酵菌、耐多药的结核分枝杆菌等已成为临床治疗中的棘手问题。病毒的耐药性也日趋严重。这不仅要求用正确、迅速的手段检出,而且要给临床解释性判读提供可能存在的耐药机制。

第四,临床微生物学诊断技术日新月异,明显地提高了诊断的敏感性、特异性和及时性,其突出表现是分子生物学技术的进步,微生物的基因检测手段和检验的自动化或半自动化正在改变着微生物检验的面貌。

这一切要求临床微生物学检验工作者重新学习、更新知识、改进技术、提高水平,于是“临床微生物学教育丛书”就应运而生了。

本丛书编写的指导思想及其特点是:

一、突出规范化操作这一中心。就微生物学诊断的主要领域各成一分册,如血培养操作规范、抗微生物药物敏感性试验规范、细菌性腹泻实验诊断规范等已出版。

二、重在规范常规检验技术,介绍国内外认可的、最为适用的、可靠的技术方法,同时力求反映微生物实验诊断的最新成果与信息。

三、吸取美国微生物学会(ASM)的 CUMITECH 先进经验,又努力结合我国的实际情况,力求兼具先进性与实用性。

四、每分册均由国内富有经验的专家编写并集体讨论,由香港专家指导审阅,由香港中文大学微生物科主任司徒永康教授主审。

为方便读者用活页夹存放本套丛书,所以在版面设计时做了适当安排。

全体编审者热切希望本丛书能为规范我国的微生物学检验技术做出努力,但规范也要随着技术发展而改变,正如 CUMITECH 仍在不断更新一样。我们希望本丛书在国内同仁们的实践中不断完善。我们真诚期待大家的评论与指正。

主编

目 录

2	一、流行病学及临床特征
4	二、分类
7	三、分级检验
9	四、安全措施
11	五、标本
	(一) 标本收集.....11
	(二) 可能污染的标本.....12
	(三) 无菌标本.....13
	(四) 标本处理.....14
	(五) 消化和去污染法.....14
17	六、显微镜检查
	(一) 染色方法.....17
	(二) 涂片镜检.....18
	(三) 结果报告.....18
	(四) 注意事项.....19
20	七、培养基
	(一) 非选择性培养基.....20
	(二) 选择性培养基.....21
23	八、自动化与半自动化检测系统
	(一) BACTEC 系统.....23
	(二) MGIT 系统.....24
	(三) ESP 系统 II24
	(四) BacT/Alert 3D 系统.....24

25	九、培养条件
27	十、鉴定技术
	(一) 主要生化试验.....27
	(二) 试验方法.....30
	(三) 核酸探针、PCR 等分子生物学技术.....36
	(四) 色谱分析.....38
	(五) 抗体检查.....38
	(六) 结核杆菌的抗原检查.....39
	(七) 基因芯片.....39
	(八) 快速嗜菌体生物扩增技术.....39
41	十一、药敏试验
	(一) 药物纸片洗脱法.....42
	(二) 微量肉汤稀释法.....43
	(三) MGIT 960 和 MGIT 手工法.....44
45	十二、质量保证
	(一) 操作方法及人员.....45
	(二) 质量评价.....45
	(三) 标本及处理.....46
	(四) 显微镜检查.....46
	(五) 结果解释.....47
	(六) 交叉污染.....47
	(七) 质量控制因素.....48
	(八) 鉴定及敏感性试验.....49
	(九) 装备.....49
51	十三、分枝杆菌属的临床意义
	(一) 结核杆菌.....51
	(二) 牛分枝杆菌.....52
	(三) 非洲分枝杆菌.....52
	(四) 溃疡分枝杆菌.....52

(五) 海分枝杆菌·····	52
(六) 嗜血分枝杆菌·····	52
(七) 堪萨斯分枝杆菌·····	53
(八) 猿分枝杆菌·····	53
(九) 亚洲分枝杆菌·····	54
(十) 苏尔加分枝杆菌·····	54
(十一) 戈氏分枝杆菌·····	54
(十二) 瘰癧分枝杆菌·····	54
(十三) 蟾分枝杆菌·····	55
(十四) 转黄分枝杆菌·····	55
(十五) 马尔摩分枝杆菌·····	55
(十六) MAC·····	55
(十七) MAIS 及 MAIS 中间物·····	56
(十八) 胃分枝杆菌·····	56
(十九) 日内瓦分枝杆菌·····	56
(二十) 脑分枝杆菌·····	57
(二十一) 副结核分枝杆菌·····	57
(二十二) 地分枝杆菌复合物·····	57
(二十三) 偶发-龟分枝杆菌复合物·····	57
(二十四) 耻垢分枝杆菌·····	58
(二十五) 腐生型快速生长菌·····	59
(二十六) 其他新发现的分枝杆菌·····	59

近年来,结核分枝杆菌(简称结核杆菌,TB)感染又重新上升,且发现了一些新的致病菌株。对于分枝杆菌的快速检测和鉴定新技术也有发展,如分子生物学技术、新的鉴定技术、新的检测方法、特异DNA探针和基因扩增技术、结核杆菌的抗原和抗体检查及基因芯片等用于鉴定。治疗结核及非结核分枝杆菌(简称非结核杆菌,NTM)的药物和药敏试验方法也有发展。

一、流行病学及临床特征

据 2000 年我国结核病流行病学抽样调查结果, 活动性肺结核患病率为 367/10 万, 涂片阳性(涂阳)肺结核患病率为 122/10 万, 细菌培养阳性(菌核, 患病率为 160/10 万, 估算全国现有约 450 万活动性肺结核病人, 在世界居第二位(仅次于印度)。结核病死亡率为 9.8/10 万, 每年死于结核病者达 13 万人。全年龄组结核感染率达 44.5%。估计我国已有 5.5 亿人受到结核杆菌的感染。

我国肺结核病人结核杆菌的初始耐药率为 18.6%, 获得性耐药率为 46.5%, 初始耐多药率(即耐 2 个以上药物者)为 7.6%, 获得性耐多药率为 17.1%。

人类免疫缺陷病毒感染者和艾滋病病人(HIV/AIDS)增多(目前我国估计达 100 万)加重了结核病控制的难度, 人口增加和流动人口急剧增加使结核病疫情回升。

在过去的 20 年间, 美国结核病病例的数量实际上在增加, 艾滋病病人与结核病人的登记显示有交叉, 约 5% 的艾滋病病人有结核病。登记低估了艾滋病与结核病的相关, 大多数结核病例发生在 HIV 感染者而无症状, 且 CD4 细胞计数 $> 100 \times 10^6/L$ 。在农村, 艾滋病和结核病较常见, 20% ~ 40% 的结核病人均为 HIV 阳性。HIV 的流行不是结核病增加的惟一原因。多重耐药结核杆菌的出现, 对治疗结核病提出了挑战。

非结核杆菌可引起肺病、皮肤和软组织感染、淋巴腺炎及播散性疾病等。对肺病可能了解的最多, 鸟分枝杆菌复合体(MAC)包括鸟分枝杆菌和胞内分枝杆菌两种, 是最常见的致病菌, 其次是堪萨斯分枝杆菌、脓肿分枝杆菌(以前的龟分枝杆菌脓肿亚种)、偶发分枝杆菌、猿分枝杆菌、蟾分枝杆菌及其他

少见菌。多数肺病病人在 50 岁以上,除了吸烟而引起的慢性肺疾患外,几乎没有基础疾病。50% 的非结核杆菌肺病人没有特别的危险因子。由非结核杆菌引起的皮肤和软组织疾病的数量正在增加。麻风分枝杆菌引起的疾病仍然是世界范围内发病和死亡的主要原因。利福平治疗麻风病有了明显进展,但其价格使第三世界国家的使用受到限制。海分枝杆菌引起肢体外伤后皮肤和软组织感染,是肢体接触咸水或淡水所致。偶发分枝杆菌、脓肿分枝杆菌和龟分枝杆菌(以前的龟分枝杆菌龟亚种)引起各种浅表皮肤感染,它们常与海分枝杆菌一起引起该地区原发浅表分枝杆菌病。其他少见浅表致病菌包括 MAC、地分枝杆菌复合体、堪萨斯分枝杆菌和耻垢分枝杆菌。最近发现接受器官移植者和艾滋病病人的皮肤感染是由嗜血分枝杆菌引起的。非结核杆菌引起的淋巴结炎主要见于 1~5 岁的儿童,它仅限于颈部淋巴结,常用外科切除法治疗。

目前,这类病例约 80% 是由 MAC 引起。

约 40% CD4 淋巴细胞计数低的艾滋病病人感染 MAC。这是新的播散性疾病。有此播散性疾病的艾滋病病人常无明显的皮肤和肺疾患,病变集中在胃肠道、骨髓、肝脏和脾脏。少见的难以生长的日内瓦分枝杆菌也引起与 MAC 相似的疾病。传播感染的诊断是依据血培养,有时是骨髓和粪便培养。

要点:

结核和肺结核杆菌感染仍是危害人类健康的重要传染病,在我国等第三世界国家感染率极高。此类感染由于 HIV/AIDS 的迅速增加和耐多药(MDR)结核杆菌的传播而更加严重。结核杆菌主要引起肺和肺外结核。非结核杆菌的菌种日益增多,主要引起肺、皮肤和淋巴腺感染。

二、分 类

传统上实验室根据非结核杆菌的生长速度及色素的产生将其分为四群。把细菌生长分离 <7 d 的称为速生群, >7 d 的称为缓生群。在这种分类法中, Ernst Runyon 规定, 评价色素的产生要依接触光与否。缓生光色群称为 I 群(菌落色素只在接触光后产生, 例如堪萨斯分枝杆菌和海分枝杆菌), 缓生暗色群称为 II 群(菌落色素在暗处产生, 如瘰癧分枝杆菌和戈氏分枝杆菌), 缓生无色群称为 III 群(如 MAC), 速生菌称为 IV 群(主要有偶发分枝杆菌、龟分枝杆菌和脓肿分枝杆菌)。这种分类法在只能见到六七种非结核杆菌的常规实验室是有用的。目前, 已有 20 多种不同致病菌, 每种菌都有其独特的临床特征, 由于菌种数量如此之多, 难以记住每个菌种属于 Runyon 的哪一群, 况且有些菌种不易归类于 Runyon 系

统中。例如从艾滋病病人中分离出的多数鸟分枝杆菌产色素误被列在 II 群; 同样, 苏尔加分枝杆菌在 35℃ 为暗色, 而在 25℃ 时为光色。

由于以上这些原因, 非结核杆菌传统的分类法已经被新的分类法替代。新的分类法是基于菌种产生的疾病类型, 如肺病或皮肤病(表 1)。此分类法是美国胸科协会(ATS)在最近关于诊断和治疗非结核杆菌的报告中提出的。这种按疾病分类的方法为临床和实验室提供了更多的优点, 他们是按临床标本的来源(痰、伤口、血液等)而不是按形态学特征来考虑病原。例如, 从血液分离出的非结核杆菌与 MAC 的差别有限, 皮肤病则有不同的致病菌, 包括海分枝杆菌和嗜血分枝杆菌, 以这两种菌较常见。

二、分 类

表 1 对人致病的非结核杆菌分类

临床疾病	常见致病菌	生长速度	形态学特征	偶见致病菌
肺病	鸟分枝杆菌复合体	慢(>7 d)	通常无色素	蟾分枝杆菌
	堪萨斯分枝杆菌	慢	光产色, AFB 涂片呈大的串珠样	猿分枝杆菌
	脓肿分枝杆菌	快(<7 d)	无色素	苏尔加分枝杆菌 马尔摩分枝杆菌 偶发分枝杆菌 耻垢分枝杆菌 龟分枝杆菌
淋巴腺炎	鸟分枝杆菌复合体	慢	通常无色素	偶发分枝杆菌
	瘰癧分枝杆菌	慢	暗产色	龟分枝杆菌 脓肿分枝杆菌 堪萨斯分枝杆菌 嗜血分枝杆菌
皮肤感染	海分枝杆菌	慢	光产色, 分离需低温 (28 ~ 30℃)	鸟分枝杆菌复合体
	偶发分枝杆菌	快	无色素	堪萨斯分枝杆菌
	偶发分枝杆菌第三生物 变种复合体	快	无色素	
	龟分枝杆菌	快	无色素	无色分枝杆菌
	脓肿分枝杆菌	快	无色素	外来分枝杆菌
	溃疡分枝杆菌	慢	通常暗产色, 分离需低温	耻垢分枝杆菌
	嗜血分枝杆菌	慢	无色素	
播散性疾病	鸟分枝杆菌复合体	慢	从艾滋病病人分离的菌 株常产色素(80%)	偶发分枝杆菌
	堪萨斯分枝杆菌	慢	光产色	脓肿分枝杆菌
	龟分枝杆菌	快	无色素	蟾分枝杆菌
	嗜血分枝杆菌	慢	无色素, 生长需血红素, 常需低温和 CO ₂	戈氏分枝杆菌 日内瓦分枝杆菌

要点:

传统上结核和非结核杆菌依其生长速度及色素的产生分为四群

(Runyon 分类法),即缓生光色群(I群)、缓生暗色群(II群)、缓生无色群(III群)和速生群(IV群),此种分类虽概括的菌种不全面,但仍适用。ATS提出按所致疾病的分类法。

三、分级检验

由于初级分枝杆菌实验室数量在减少,许多一般实验室接替培养分枝杆菌的责任,因为阳性率低,实验室人员花在质控上的时间与细菌鉴定、药敏试验同样多,许多标本少的实验室也做抗酸杆菌(AFB)的涂片和培养,将培养阳性的送参考实验室做鉴定和药敏试验。分级的概念首先由多国公共健康机构于1967年提出,并得到包括CDC和ATS在内的一些组织支持。实验室根据其临床需要、个人经验、实验设备和工

作量来选择等级。美国病理协会(CAP)提出,由ATS推荐的分级见表2。ATS总体上分3个服务等级(I、II、III),对应于CAP分法的2、3、4范围。通常的临床实验室主要是ATS范围2,只有10%可提供全范围的服务。抗酸涂片和培养的量不容易确定,但能解释AFB结果的实验室每周应处理10~15份涂片和20份以上培养。我国对分级尚无明确规定。此两种实验室分级意见可供参考。

表2 实验室自定服务范围或水平

CAP 服务范围 (分枝杆菌实验室间对比调查参加者)	ATS 关于分枝杆菌实验室服务等级
范围1 不进行分枝杆菌工作	水平 I a. 收集适当的临床标本,包括诱导液
范围2 渗出液、渗出物和体液等标本的抗酸染色、接种、培养,送参考实验室鉴定	b. 分离和鉴定的标本送到上一级实验室 c. 做涂片,为化疗监控病人提供推测性诊断 水平 II