

非结核分枝杆菌鉴定 1 例

黄文焰, 郑 军 (广东省深圳市宝安区慢性病防治院 518101)

【关键词】 非结核分枝杆菌; 结核分枝杆菌; 菌种分型
DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2011. 22. 069 文献标志码: B 文章编号: 1672-9455(2011)22-2807-01

非结核分枝杆菌 (NTM) 是指除结核分枝杆菌复合群 (人型、牛型、非洲、田鼠分枝杆菌) 和麻风分枝杆菌以外的其他分枝杆菌, 其中部分是条件致病菌^[1]。肺结核患者同时感染 NTM, 其临床表现、X 线片特征与肺部感染极其相似, 因此, 分枝杆菌及非分枝杆菌的培养、鉴定对结核病的诊断、鉴别诊断及有效化疗都有极其重要的意义。以下是作者在实际工作中遇到的 1 例结核病同时感染 NTM 的病例, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 患者, 男, 56 岁, 连续咳嗽并伴午后低热 3 周, 于 2008 年 3 月 14 日来本院治疗。行三大常规、痰涂片、痰培养及 DR 照片检查。结果如下: 血常规中白细胞 $7.8 \times 10^9/L$, 血红蛋白 113 g/L, 白细胞分类中性粒细胞 0.43, 淋巴细胞 0.51, 单核细胞 0.06。痰涂片抗酸染色 (++++), 同时做痰培养及药敏试验。DR 片右上肺有明显空洞, 诊断为肺结核。询问病史, 未曾做过抗结核治疗。进行规则化疗 2 个月末、3 个月末复查痰, 痰涂片仍 (++++), 此时痰培养及药敏结果出来, 除异烟肼高浓度轻度耐药外, 其他药物如链霉素、利福平均强耐药, 疗程结束后, 痰涂片 (++++), 再做痰培养及药敏试验, 2 个月后果同前, 初治失败, 转复治, 至今规范化治疗已 2 年, 痰涂片仍 (++++), 怀疑其为结核病同时感染 NTM, 采集菌种进行培养及菌型鉴定。

1.2 方法 按照《结核病诊断细菌学检验规程》操作^[2]。

1.2.1 分离培养基 丙酮酸培养基为本室自制, 包括磷酸二氢钾 2.4 g、枸橼酸钠 0.6 g、硫酸镁 0.24 g、味精 (99%) 7.2 g、丙酮酸钠 1.6 g、蒸馏水 600 mL、葡萄糖 4.0 g、马铃薯粉 30 g、全卵液 1 000 mL、2% 孔雀绿 20 mL。根据所需按比例加減。制备方法: 将盐类成分溶解后, 用 10% 氢氧化钠调 pH 值至 7.2, 再加葡萄糖、马铃薯粉, 放水浴锅内煮沸 20 min, 冷却后, 加入经搅拌用纱布过滤的全卵液孔雀绿液混匀分装, 间歇灭菌 2 次。

1.2.2 标本前处理及接种 取痰标本 1~2 mL, 加 4~5 倍量 4% 硫酸 (依痰液黏度而定), 振荡 20 min, 使充分液化, 4 000 r/min 离心沉淀 10 min, 取沉渣 0.1 mL 接种于丙酮酸培养基斜面上, 接种 2 支试管, 置 37 °C 温箱, 先平放 24 h, 再竖置培养。

1.2.3 3 种鉴别培养基 (1) 改良罗氏 (L-J) 培养基, 其成分如下: 磷酸二氢钾 2.4 g、硫酸镁 0.24 g、枸橼酸钠 0.6 g、丙三醇 12 g、味精 (95%) 7.2 g、马铃薯粉 30 g、蒸馏水 600 mL、全卵液 1 000 mL、2% 孔雀绿 20 mL。制备方法同丙酮酸培养基。(2) 噻吩-2-羟酸肼 (TCH) 培养基。称取 TCH 50 mg, 加蒸馏水 100 mL 成为 500 mg/mL, 取其 1 mL 加入 L-J 培养基 100 mL 中使其最终浓度为 5 mg/mL, 混匀分装, 凝固灭菌待用。(3) 对硝基苯甲酸 (PNB) 培养基: PNB 用二甲枫溶解后加入 L-J 培养基内, 使其最终浓度为 PNB 0.5 mg/mL, 混匀分装, 凝固灭菌待用。

1.2.4 培养及菌型鉴定^[3] 将丙酮酸钠培养基斜面上培养生长的菌落进行 Ziehl-Neelsen 染色镜检, 证实为抗酸菌的培养

物制成 0.1 mg/mL 菌液, 分别接种于 L-J、PNB、TCH 培养基, 37 °C 培养 4 周。菌型鉴定标准见表 1。生化反应及生长特性: 具备 37 °C 生长, 28 °C 及 45 °C 均不生长, 粗糙型菌落, 产淡黄色素或无色, 2~3 周生长的共性, 硝酸还原、尿素酶试验阳性、耐触酶、吐温聚氮乙烯油酸山梨醇脂水解试验阴性者为 人型结核分枝杆菌。上述 4 项生化反应均为阴性者为牛型结核分枝杆菌; 37、28 °C 全部生长, 45 °C 大部分生长, 菌落光滑或粗糙, 3~21 d 生长, 仅产黄色素, 具有不同生化反应者为 NTM。

表 1 菌型鉴定标准

分枝杆菌类型	L-J	PNB	TCH
人型结核分枝杆菌	(+)	(-)	(+)
牛型结核分枝杆菌	(+)	(-)	(-)
NTM	(-)	(-)	(-)

注: (+) 表示阳性, (-) 表示阴性。

2 结 果

2.1 培养基生长物经 Ziehl-Neelsen 染色镜检证实为抗酸菌。

2.2 鉴别培养基初步筛选为人型结核分枝杆菌, 但生化反应及生长特性模棱两可。首先, 菌落有粗糙型亦有光滑型, 3~21 d 就生长, 产黄色素, 37、28 及 45 °C 全部生长, 吐温水解试验阳性, 证明有 NTM 存在。即该患者为结核病同时感染 NTM 患者。

3 讨 论

临床上对结核分枝杆菌和 NTM 病很难作出鉴别诊断, 因为这两种疾病在发病、临床表现、影像学、涂片和培养、结核菌素试验、病理学检查等方面均十分相似, 故只能从标本中分离出分枝杆菌, 进行菌型鉴定, 才能确诊为 NTM 病。肺结核患者同时感染 NTM, 临床治疗差别较大。许多 NTM 对抗结核药物耐药率高或对抗结核药物呈天然耐药 (本病例即是), 若按结核病治疗, 即使患者长期规则化疗效果依然不佳, 成为所谓“难治、复治”结核患者^[4]。

因此, 分枝杆菌的培养、鉴定对核病的诊断、鉴别诊断及有效化疗都有极其重要的意义, 建议基层结核病防治机构能够创造条件进行分枝杆菌菌种分型和鉴定。

参考文献

[1] 王巍. 重视非结核分枝杆菌病诊断和治疗的研究[J]. 传染病信息, 2009, 22(1): 14-15.
[2] 中国防痨协会. 结核病诊断细菌学检验规程[J]. 中国防痨杂志, 1996, 18(2): 28-31.
[3] 中华医学会结核病学分会. 非典型分枝杆菌诊断试行标准[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2003, 23(11): 650-653.
[4] 王睿, 李聰然, 梁蓓蓓, 等. 非结核分枝杆菌感染特点与药物选择研究进展[J]. 国际呼吸杂志, 2006, 26(4): 280-282.