

非结核分枝杆菌的实验室鉴定方法学进展*

李地灵 综述, 陈 晋[△] 审校

(同济大学医学院附属上海市肺科医院检验科, 上海 200433)

关键词: 分枝杆菌感染, 非典型性; 实验室技术和方法; 聚合酶链反应; 多态性, 限制性片段长度

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.14.028

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)14-1840-03

非结核分枝杆菌(NTM)是指除结核分枝杆菌复合群(人型、牛型、非洲和田鼠分枝杆菌)及麻风分枝杆菌以外的其他分枝杆菌,是一种条件致病菌,极易导致院内感染。NTM 可以侵犯人体肺脏、淋巴结、骨骼、关节、皮肤和软组织等组织器官,并可引起全身播散性疾病。近年来,由于 AIDS 患者、长期使用免疫抑制剂患者^[1]和器官移植术后患者并发 NTM 病的增多而日益受到重视;如美国报告 NTM 约占分枝杆菌分离株的 1/3;在我国,2000 年第四次全国结核病流行病学抽样调查报告指出 NTM 菌株比例明显增加,1985 年为 4.2%,2000 年上升到 11.1%^[2],渐渐引起人们的重视,因此 NTM 已成为临床不可忽视的病原微生物之一。NTM 感染与结核分枝杆菌(MTB)感染引起的疾病在临床表现和影像特征上极其相似,但 NTM 对一线和二线抗结核药物天然耐药,造成两者的临床治疗差别大;所以及时准确地进行菌型鉴定对临床治疗十分重要。

传统的实验室鉴定方法为培养基培养后辅以生化试验鉴定来区分 MTB 和 NTM。陈小蓉等^[3]利用美国 Becton Dickinson 公司提供的分枝杆菌生长指示管(MGIT)加入对硝基苯甲酸(PNB),建立 Bactec MGIT960 培养法,设定 PNB300 μ g/ml 为实验界限浓度,并辅以 28 $^{\circ}$ C 生长试验,耐 68 $^{\circ}$ C 耐热触酶试验以及细菌的生长速度和光反应等来鉴定 MTB 或 NTM。在 PNB 培养基上生长、28 $^{\circ}$ C 生长、耐热触酶试验阳性、菌落颜色有或无的为 NTM;若 PNB 上不生长、28 $^{\circ}$ C 不生长、耐热触酶试验阴性、菌落无颜色则为 MTB。传统的实验室鉴定方法简单,试剂价格合理,并易于推广而一直沿用至今,但是耗时较长,污染大,缺乏可重复性,不能及时、准确为临床提供参考。PCR 技术及新型技术准确快速,特异、灵敏,结果更客观。本文现就 NTM 的 PCR 技术及新型技术的现状作一综述。

1 NTM 鉴定的聚合酶链反应(PCR)技术

PCR 是指在 DNA 聚合酶催化下,以母链 DNA 为模板,以特定引物为延伸起点,通过变性、退火、延伸等步骤,体外复制出与母链模板 DNA 互补的子链 DNA 的过程。1989 年 Hance 等^[4]在世界上首次将 PCR 技术应用于结核分枝杆菌的检测,PCR 技术简便、快速,灵敏度高、特异性好,可以定量,对样本纯度要求低;但它存在的主要问题是扩增时气溶胶污染容易导致假阳性结果,目前市面缺少商品化的 NTM 诊断试剂盒,限制了 PCR 技术在 NTM 鉴定中的应用。

1.1 PCR-直接测序法 DNA 序列分析方法由 1977 年英国 Sanger 等发明的双脱氧链终止法和美国 A. M. Maxam 和 W. Gilbert 发明的 Maxam-Gilbert 化学降解法发展到 20 世纪 80 年代的自动测序技术。

GJ 等应用 PCR-直接测序法对 22 种 30 株分枝杆菌参考

菌株和 16 株分枝杆菌临床分离菌株 16S-23SrDNA ITS 测序,利用 16S-23SrDNA 内转录间隔区序列^[5]既有高度保守的属特异性序列又有高度可变的种特异性序列的特点,设计种特异性引物,并以此序列为靶基因,经 PCR 扩增^[6]后形成 3'末端带有荧光标记的相差一个碱基的不同长度的产物,由于 16S-23SrDNA ITS 序列长度较短,PCR 扩增产物一次测序可获得全序列,含有足够信息,再构建分枝杆菌菌种聚类分析树状谱,进行核苷酸序列分析,即可鉴别 MTB 与 NTM。直接测序法操作易于标准化与自动化;利用对 16S-23SrDNA ITS 序列的分析,即可将 NTM 鉴定至种的水平,准确、快速。由于是自动测序,要求 PCR 产物纯化,PCR 的反应条件也需要优化,DNA 自动测序仪需要专人操作、管理和维护,且不同实验室缺乏人工判读结果的统一标准,限制了其在临床实验室的大规模应用。

1.2 PCR-核酸探针技术

1.2.1 PCR-寡核苷酸探针阵列技术 PCR-寡核苷酸探针阵列技术借助反向斑点杂交核酸分子杂交配对的特性对 DNA 样品的序列信息进行分析。梁建琴等^[7]先通过 PCR-SSCP 初步分析鉴定 253 株分枝杆菌临床分离株,再根据 16SrRNA PCR-寡核苷酸探针与待测菌株生物素标记的 16SrRNA 基因 PCR 产物进行反向斑点杂交,以此建立寡核苷酸探针阵列法鉴定分枝杆菌到种。此技术具有高灵敏性和高特异性,方法准确、简便、快速,2~3 d 即可出结果,对指导临床医生准确诊断、及时用药非常有价值;但当靶序列存在个别碱基与探针错配时仍可以发生杂交,因此存在个别碱基差异的核苷酸序列不容易区分;操作复杂,费用较高,多在实验室对分枝杆菌深入研究时应用,临床科室一般较少使用。

1.2.2 PCR-荧光探针法 梁建琴等^[8]利用 PCR-荧光探针法采用博奥生物有限公司分枝杆菌核酸检测试剂盒^[9]对 1 015 例临床标本和 56 株临床分离株进行临床研究,并与达安公司结核分枝杆菌检测试剂盒检测结果比较。临床标本经过处理后,进行 PCR 扩增,PCR 管放入荧光定量 PCR 仪内,PCR 结束后,根据样品的 Ct 值判断是否存在结核或者非结核分枝杆菌。FAM 通道阳性,VIC 通道阴性或者阳性为结核分枝杆菌;FAM 通道阴性,VIC 通道阳性为非结核分枝杆菌;FAM 通道阴性,VIC 通道阴性,无分枝杆菌。检测结果与达安公司试剂盒比较总体符合率 95.1%,两种检测方法无显著性差异。这种实时荧光 PCR 技术^[10-11]特异性强,灵敏度高,可以定量^[12-13],简单易行,可同时检测 MTB 与 NTM,有利于指导临床开展早期有效的化疗。

1.3 PCR-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术 PCR-RFLP 是将 PCR 技术、RFLP 电泳方法联合,通过 PCR 扩增一

* 基金项目:上海市浦江人才基金(11PJ1408200)。 作者简介:李地灵,女,本科,主要从事微生物分子诊断研究。 [△] 通讯作者,E-mail:chenjindor@126.com。

段 DNA 片段,然后再选择适当的限制性内切酶,对扩增产物进行酶切,最后经电泳分析靶 DNA 片段,可得到有特异性的电泳谱带,从而达到鉴定不同基因型的目的。

PCR-RFLP 法首先用通用引物扩增各种分枝杆菌的共同靶序列,然后用限制性内切酶对扩增产物进行消化,不同分枝杆菌获得的酶切片段数目和分子大小不同,根据酶切图谱的差异,即可鉴别出不同种的分枝杆菌。Kim 等^[12]以 hsp65 基因和 rpoB 基因为靶基因,分别扩增 MTB 和 NTM 的 235、136 bp 的基因片段,对 44 株分枝杆菌参考株和 379 株临床分离株进行检测,并进一步对 18 株 NTM 选用限制性内切酶 Msp I、HaeIII 进行酶切鉴定和序列测定,以此建立了 PCR-RFLP 法^[14]。该方法可以准确、快速的对 MTB 和 NTM 进行鉴别,敏感性和特异性均为 100%,并能将 NTM 鉴定至种的水平。Shojaei 等^[15]采用 hsp65 PCR-RFLP、16SrRNA 测序结合的方法对 67 株临床分离的 NTM 进行菌种鉴定。PCR 扩增 644 bp 的 hsp65 基因序列,并用限制性内切酶 Ava II、Hph I、Hpa II 分别进行酶切鉴定,该方法可以对 NTM 的流行情况及菌种分布特点进行监测,有利于 NTM 病的防控及早期诊断。万彦彬^[16]设计分枝杆菌属特异性通用引物,用限制性内切酶 Msp I 对 PCR 产物进行酶切,对酶切结果进行聚类分析,以与人结核分枝杆菌 H37Rv 相似度大于 90% 为阈值,建立鉴别 NTM 与 MTB 的 PCR-RFLP 方法。

PCR-RFLP 技术结合了 PCR 的快速灵敏与 RFLP 的准确特异,结果稳定,无需特殊的仪器设备,可操作性强,耗时短,大多数实验室均可进行,为早期诊断 NTM 病提供了新的工具;但需注意到引物的设计要求严格,酶消化的过程不充分容易导致假阴性结果。

1.4 PCR-单链构象多态性(PCR-SSCP)技术 PCR-SSCP 技术是 1989 年日本 Orita 等^[17]创建的一种在 PCR 技术基础上发展起来的筛查 PCR 扩增产物点突变的新技术。它的原理是 PCR 扩增后的 DNA 片段经变性成单链 DNA,单链 DNA 在非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳时形成不同的立体构象,其构象直接影响泳动速率,相同长度的 DNA 单链其核苷酸顺序仅有单个碱基的差别,就可以产生立体构象的不同,造成泳动速率的不同,产生不同的电泳带,从而分离出构象有差异的分子。

运用 PCR-SSCP 方法,通过设计 2 对引物分别扩增 16SrDNA 2 条核苷酸片段,根据 SSCP 电泳图谱与 MTB 标准株的相似性鉴别 MTB 与 NTM。此种 PCR-SSCP 技术是先 PCR 扩增靶 DNA,将特异的 PCR 扩增产物变性,而后快速复性,使之成为具有一定空间结构的单链 DNA 分子;再将适量的单链 DNA 进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳;根据 SSCP 电泳图谱与 MTB 标准株的电泳结果,进行相似性比较。方法快速,仅用 3 d;简单、快速、经济、灵敏,且不需要特殊的仪器,适合临床实验室的要求,对于临床复治、难治结核病的诊断及药物的选择有重要作用;不足之处在于电泳条件要求比较严格,当某些位置的点突变对单链 DNA 分子立体构象的改变不起作用或作用很小时,可能会使聚丙烯酰胺凝胶电泳无法分辨,造成漏检。

2 新型技术

2.1 基因芯片技术 基因芯片(Gene Chip)是通过原位合成、点接触法或喷墨法等将大量的 DNA 分子固定于膜或支持物上而成。将基因芯片与标记的样品分子进行杂交后,通过检测每个探针分子的杂交信号强度,就可以同时对所有被检测基因进行序列和数量的分析。

石玉玲等^[18]采用基因芯片法检测 379 例临床疑似分枝杆

菌感染患者的标本,先行 PCR 扩增、分子杂交、微阵列芯片扫描,最后由计算机收集荧光信号,并对每个点的荧光强度数字化后进行分析,根据探针在芯片上的特定位置排布,推断出相应被测病原菌的相关信息,从而鉴定出 MTB 与 NTM。整个检测过程 6 h 内完成,可为早期诊断提供依据;灵敏度高,通量高;安全系数高,无须接触活菌;检测效率高,自动化程度高,无污染,便于在大型综合医院和研究机构广泛开展;但由于成本高,目前只有公司从事 DNA 芯片的研究,临床科室研究极少。

2.2 恒温扩增技术(LAMP) 自 20 世纪 90 年代初,对恒温扩增技术的研究进入了人们的视野,2000 年日本学者 Notomi 等^[19]发明 LAMP,作为一种新型的核酸扩增技术,可用于病原微生物的检测。

LAMP 使用一种具有自动链置换活性的 BstDNA 聚合酶,通过 2 条特异的外部引物和 2 条特异的内部引物,在等温(60~65 ℃)的条件下进行靶序列特异度扩增,通过加入 SYBRGreen I 观察颜色变化来判断扩增与否^[20]。若反应液的颜色呈现绿色则为结核分枝杆菌,呈现橙色则为 NTM。LAMP 技术特异度高、灵敏度高,等温条件进行,操作简单,无需特殊仪器设备,快速高效,适于及时、现场、快速检测,在病原微生物检测及疾病诊断方面得到广泛应用,有很好的发展前景。但其不能进行长链 DNA 的扩增,易受污染,产生假阳性。此技术目前于处理理论研究阶段,未进入临床检测。

2.3 免疫学方法 Anna 等^[21]利用 Mce 家族蛋白是存在于 NTM,不存在于结核分枝杆菌复合群的特异性抗原,建立识别 NTM 特异抗原的免疫学方法,并研究了 T 细胞对这些抗原的免疫反应。下载含有短序列 BLAST 蛋白和 TBLASTN 蛋白质的基因组序列,采用 IFN-γ 体外酶联免疫斑点法和 6 d 的增殖试验,聚类分析分枝杆菌蛋白和 NTM 特定蛋白,从而区分 MTB 与 NTM。该方法特异度、灵敏度很高,且 NTM 特异性抗原可以用来研究具有高度专一性的 NTM 曝光;此技术对于结核病新疫苗的产生有很重要的影响,但目前只是出于理论设想阶段,未进入临床检测。

3 总 结

NTM 是一种条件致病菌,且存在范围广,容易感染。近年来,由 NTM 感染的病例逐年增加,因其对一线二线抗结核药耐药,且其临床特征与结核病很相似,但临床治疗差别大,造成误诊、漏检,因此 NTM 与 MTB 的快速准确鉴定对临床意义重大。PCR 技术及其他相关技术敏感、特异、准确,能及时为临床提供有价值的参考意见,但仪器设备要求高。而近年新生的变性高效液相色谱技术^[22]及基质辅助激光解析电离飞行时间质谱技术^[23]在分枝杆菌鉴定^[24]中具有绝对优势,对于 NTM 菌种鉴定有很大的潜力,是未来一个很好的发展方向。相信随着技术的不断发展和成熟,能找到一种简单、快速、准确、经济,适合临床开展的 NTM 鉴定的方法。

参考文献

- [1] 傅红梅,谭毅刚,刘志辉,等. 免疫受损状态下非结核分枝杆菌感染的临床特征[J]. 广东医学,2011,32(4):1900-1902.
- [2] 全国结核病流行病学调查技术指导组. 第四次全国结核病流行病学抽样调查报告[J]. 中华结核和呼吸杂志,2002,25(1):3-7.
- [3] 陈小蓉,张侠,施旭东. 利用 960 系统快速鉴定结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌的可行性研究[J]. 中国防痨杂志,2008,30(1):4-24.
- [4] Hance AJ, Grandchamp B, Levy-Frebault V, et al. Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA[J]. Mol Microbiol, 1989, 3(7):843-849.

[5] Ngan GJ, Ng LM, Jureen R, et al. Development of multiplex PCR assays based on the 16S-23SrRNA internal transcribed spacer for the detection of clinically relevant nontuberculous mycobacteria [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2011, 52(5): 546-554.

[6] 王峰, 朱玉梅, 桂静, 等. PCR 测序和基因芯片快速鉴定分枝杆菌菌种的应用研究[J]. *中国防痨杂志*, 2011, 33(11): 713-717.

[7] 梁建琴, 吴雪琼, 王巍, 等. 应用寡核苷酸探针阵列法快速鉴定临床分离株中的分枝杆菌[J]. *军医进修学院学报*, 2007, 28(1): 29-31.

[8] 梁建琴, 高华方, 李洪敏, 等. PCR-荧光探针法快速检测结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌[J]. *中华医学会结核病学分会 2011 年学术会议论文汇编*, 2011, 20(1): 20-23.

[9] 康丽军, 洪峰, 冯建兵, 等. 结核/非结核分枝杆菌核酸快速检测方法临床应用价值[J]. *中国防痨杂志*, 2011, 33(5): 263-266.

[10] Taghi Naserpour Farivar, Pouran Johari, Abbas Ali Moien, Assessment of Prevalence of Non-tuberculous Mycobacteria in Archival Acid-fast Bacilli Positive Smear Slides by TaqMan Real-time PCR Assay[J]. *NORTH American Journal of Medical Sciences*, 2012, 4(5): 231-234.

[11] Young Jin Choi, Hwi Jun Kim, Hee Bong Shin, et al. Evaluation of Peptide Nucleic Acid Probe-based Real-time PCR for Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex and Nontuberculous Mycobacteria in Respiratory Specimens [J]. *Ann Lab Med*, 2012, 32(4): 257-263.

[12] Jeong-Uk Kim, Choong-Hwan Cha, Hae-Kyong An. Multiplex real-time PCR assay and melting curve analysis for identifying mycobacterium tuberculosis complex and nontuberculous mycobacteria [J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(2): 483-487.

[13] Taghi Naserpour Farivar, Pouran Johari, Abbas Ali Moien, et al. Assessment of Prevalence of Non-tuberculous Mycobacteria in Archival Acid-fast Bacilli Positive Smear Slides by TaqMan Real-time PCR Assay [J]. *N Am J Med Sci*, 2012, 4(5): 231-234.

[14] Chia-Sui Ong, Yun-Fong Ngeow. Evaluation of PCR-RFLP analy-

sis targeting hsp65 and rpoB genes for the typing of mycobacterial isolates in Malaysia [J]. *J Med Microbiol*, 2010, 59 (Pt11): 1311-1316.

[15] Shojaei H, Heidarieh P, Hashemi A, et al. Species identification of neglected nontuberculous mycobacteria in a developing country [J]. *Jpn J Infect Dis*, 2011, 64(4): 265-271.

[16] 万彦彬. 用 PCR-限制性长度多态性鉴定结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌[J]. *实用预防医学*, 2010, 17(5): 879-882.

[17] Orita M, Iwahana H. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphisms [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1989, 86(8): 2766-2770.

[18] 石玉玲, 陈建芸, 李林海, 等. 应用基因芯片快速检测分枝杆菌 [J]. *生物技术通讯*, 2011, 3(22): 419-423.

[19] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(12): E63.

[20] 邵军军, 周广青. 环介导等温技术及其在分子诊断中的应用 [J]. *实验诊断与治疗杂志*, 2007, 21(6): 451-459.

[21] Anna M, Checkley DH, Wyllie TJ, et al. Identification of Antigens Specific to Non-Tuberculous Mycobacteria: The Mce Family of Proteins as a Target of T Cell Immune Responses [J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e26434.

[22] 林飞燕, 陆春, 叶庭路, 等. 变性高效液相色谱法在微生物检测的应用进展 [J]. *现代科学仪器*, 2009, 25(5): 116-118.

[23] Aurelie Lotz, Agnès Ferroni. Rapid Identification of Mycobacterial Whole Cells in Solid and Liquid Culture Media by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry [J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(12): 4481-4486.

[24] Joseph Jeong, Sung-Ryul Kim, Seon Ho Lee, et al. The Use of High Performance Liquid Chromatography to Speciate and Characterize the Epidemiology of Mycobacteria [J]. *Lab Medicine*, 2011, 42(10): 612-617.

(收稿日期: 2013-01-23)

• 综 述 •

急性肾损伤的检测指标 NGAL 的研究进展

马玉国, 赵红丽, 任秀华, 赵俊月 综述, 马玉国 审校
(武警河北总队医院检验科, 河北石家庄 050081)

关键词: 肾功能衰竭; 载体蛋白质类; 综述

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2013. 14. 029

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)14-1842-03

急性肾损伤(AKI)原称急性肾功能衰竭(ARF)。它是由各种原因引起的肾功能在短时间(几小时至几天)内突然下降而出现的临床综合征。2005年9月,在阿姆斯特丹召开的合作研讨会上,将肾功能衰竭更名为急性肾损伤^[1]。AKI由于其病死率高,急性肾损伤的早期诊断和分期直接决定其治疗措施,进而影响预后,因此努力提高其早期诊断率,对急性肾损伤进行早期防治,有着积极的临床意义。

在常规评价肾功能降低的指标中,多采用肌酐、尿素氮以及尿量等指标,但是这些指标缺乏较高的敏感性,特异性较差,临床检验中极易受到各种因素的干扰。可靠的检测指标的缺乏,是AKI致死率居高不下的重要原因之一^[2]。近几年,国内外学者对于急性肾损伤的研究主要集中在其早期诊断方面,大量临床研究表明,通过对AKI早期诊断和干预,可以有效降低

患者病死率。中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)作为脂质运载蛋白家族的成员之一,其结构与功能在急性肾损伤的报道成为目前研究的热点。

1 AKI 的定义及诊断标准

AKI的定义:AKI是指不超过3个月的肾脏功能或结构方面的异常,包括血、尿、组织检测或影像学方面的肾损伤标志物的异常。AKI的临床检验诊断标准为:肾功能在48h内突然减退,具体为血清肌酐(SCr)升高绝对值大于26.5 μmol/L;或血肌酐较前升高大于50%;或尿量减少(尿量小于0.5 mL/(kg·h),时间超过6h^[3]。

2 NGAL 的基因结构及功能

2.1 NGAL 的生物学特性 NGAL蛋白的分子量为25×10³,它是lipocalin家族的新成员,Kjeldsen在1993年在人