

• 个案与短篇 •

1 株脓肿分枝杆菌临床分离株的鉴定

郭素芳¹, 王俊瑞¹, 范文兵¹, 王艳艳¹, 刘超梅^{2△}

(1. 内蒙古医科大学附属医院检验科, 呼和浩特 010050; 2. 解放军第二五三医院感染控制科, 呼和浩特 010051)

关键词: 脓肿分枝杆菌; 菌种鉴定; 16S rRNA

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.20.066 文献标识码: C 文章编号: 1673-4130(2016)20-2944-02

脓肿分枝杆菌是一种不产色素的快速生长的分枝杆菌, 与龟分枝杆菌亲缘关系较近。在快速生长的分枝杆菌引起的疾病中, 60%~80% 的慢性肺病由该菌导致, 该菌也是引起创伤后伤口感染的主要病原体。在我国有脓肿分枝杆菌造成肺部病变和软组织损害的报道^[1-3]。

1 资料与方法

1.1 一般资料 患者, 男, 74 岁。因气短、咳嗽咳痰 20 余年, 加重 5 d, 发热体温 38.5℃ 伴有寒战, 咳黄色黏痰入院。胸腹 CT 显示有肺炎, 双侧胸腔积液, 左侧加重并局部包裹, 左肺下叶压缩性肺不张, 肝右叶小囊肿, 盆腔少量积液。胸腔置管引流出黄色脓性积液 1 000 mL, 送检进行常规、生化及一般细菌培养。培养 6 d 有草兰阳性球菌生长, 抗酸染色阳性, 疑似非结核分枝杆菌。

1.2 仪器与试剂 PCR 仪(伯乐公司); 电泳仪、凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司); 血平皿购自天津金章公司。沙保罗培养基用英国 OXOID 公司干粉自配; 聚合酶链反应(PCR)扩增引物试剂由上海生工合成, 聚合酶(Ex Taq DNA Polymerase, TAKARA)。

1.3 方法

1.3.1 DNA 提取 菌株 DNA 严格提取按照试剂盒说明书进行, 试剂盒由天根有限公司提供。收集沙保罗培养基上的新鲜培养物 5~6 环, 采用 20 mg/mL 溶菌酶作用 30 min, 蛋白酶 K 及 RNase A 破除细胞壁, 去除蛋白、RNA 等物质, 最后使用 TE 溶解 DNA 沉淀, -20℃ 保存备用。

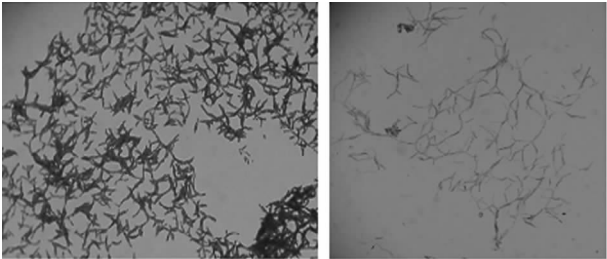
1.3.2 产物 PCR 扩增 反应体系: 1 μL 模板, 1 μL 引物 F, 1 μL 引物 R, 12.5 μL 聚合酶(Ex Taq DNA Polymerase, TAKARA), 9.5 μL dd H₂O。16S rRNA 基因序列引物由上海生工合成提供。16S rRNA-27F, 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'; 16S rRNA-1492R, 5'-ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3'。PCR 反应条件: 94℃, 5 min, 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共 35 个循环; 72℃, 7 min。反应结束后其产物进行琼脂糖凝胶电泳, 条件为 1% 的琼脂糖含 1 μg/mL EB, 缓冲液为 1×TBE, 电泳为 100 V/cm 约 30 min。相对分子质量标志使用 DL 2000 Marker, 结果分析使用凝胶图像分析系统。

1.3.3 PCR 及分子测序技术及序列比对 PCR 产物的基因测序由上海生工基因科技有限公司完成, 并与公共数据库(GenBank database, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行 DNA 序列同源性比较, 确定菌种类型。

2 结 果

2.1 培养鉴定 胸腔积液标本接种至血平皿、麦康凯平皿 35℃、5% CO₂ 培养, 培养 48 h 血平皿、麦康凯平皿上均无肉

眼可见的细菌生长。取血平皿原始接种区培养物涂片革兰染色, 显微镜下见少量非常小的草兰阳性球菌, 散在和串珠排列, 疑为慢性生长菌。转种血平皿继续培养 4 d, 转种血平皿可见直径约 1 mm、灰黄色、圆形、光滑、边缘整齐且不溶血的大小相同的小菌落, 麦康凯平皿上未见生长。涂片革兰染色阳性杆菌呈索条状, 抗酸染色阳性, 疑似快生长非结核分枝杆菌。见图 1。



注: A 表示转种培养后抗酸染色; B 表示转种培养后革兰染色。

图 1 菌株的培养鉴定

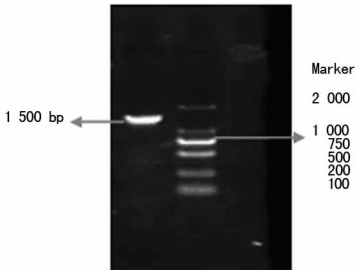


图 2 16S rRNA 片段的 PCR 扩增

Mycobacterium abscessus chromosome, complete sequence									
Sequence ID: ref:NC_010397.1 Length: 5067172 Number of Matches: 1									
Range 1: 1463288 to 1463786		GenBank	Graphics			▼ Next Match	▲ Previous Match		
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand					
917 bits(496)	0.0	498/499(99%)	0/499(0%)	Plus/Minus					
Features: rRNA-16S ribosomal RNA									
Query 1	CGACCTTCATGACGTGACGGGCGGTGTGTACAAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCGT								60
Sbjct 1463786	CGACCTTCATGACGTGACGGGCGGTGTGTACAAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCGT								1463727
Query 61	TGCTGATCTGCGATTACTACGACACTCCGACTTCATGGGGCTCGAGTTCGACAGCCCAATCC								120
Sbjct 1463726	TGCTGATCTGCGATTACTACGACACTCCGACTTCATGGGGCTCGAGTTCGACAGCCCAATCC								1463667
Query 121	GAACAGACAGCACTTTAAGGGATTCGCTCCAACCTTCGCGCTTCGACGCCCTCTGACTGT								180
Sbjct 1463666	GAACAGACAGCACTTTAAGGGATTCGCTCCAACCTTCGCGCTTCGACGCCCTCTGACTGT								1463607
Query 181	GCCATTGTAGCATGTGTGAAGCCCTGACATTAAGGGCATGATGACTTGAACATCATCCCC								240
Sbjct 1463606	GCCATTGTAGCATGTGTGAAGCCCTGACATTAAGGGCATGATGACTTGAACATCATCCCC								1463547
Query 241	ACCTTCCTCGAGTTCACCCCGGCGAGTCTCTCAAGAGTTCGCGCATTCACCGCTGCGAA								300
Sbjct 1463546	ACCTTCCTCGAGTTCACCCCGGCGAGTCTCTCAAGAGTTCGCGCATTCACCGCTGCGAA								1463487
Query 301	CATAGACAAAGGTTGCGCTCTTTCGCGAGTTAACCAACTCTACACAGAGGACTGA								360
Sbjct 1463486	CATAGACAAAGGTTGCGCTCTTTCGCGAGTTAACCAACTCTACACAGAGGACTGA								1463427
Query 361	CGACAGCCATGACCACTCTGCACACAGGCGCAAGGGGAATACCTATCTTAAAGTACGTCC								420
Sbjct 1463426	CGACAGCCATGACCACTCTGCACACAGGCGCAAGGGGAATACCTATCTTAAAGTACGTCC								1463367
Query 421	TGTGATGTCAAAACCGAGTGAAGTCTTCGCGTTGATGACGATTAATCCACATGCTCCG								480
Sbjct 1463366	TGTGATGTCAAAACCGAGTGAAGTCTTCGCGTTGATGACGATTAATCCACATGCTCCG								1463307
Query 481	CCGCTTGTGCGGGCCCCCG 499								
Sbjct 1463306	CCGCTTGTGCGGGCCCCCG 1463288								

图 3 菌株 16S rRNA 基因序列比对分析

2.2 DNA 提取和 PCR 扩增 取沙保罗培养基上生长对数期

△ 通讯作者, E-mail: chaomei253@sina.com。

菌落,抽提菌株 DNA;PCR 扩增 16S rRNA 基因序列,1.0%琼脂凝胶电泳分析,16S rRNA PCR 扩增产物大小约 1 500 bp。见图 2。

2.3 测序分析 对其 PCR 产物进行测序并与 <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 进行 DNA 序列同源性比较,测序结果与脓肿分枝杆菌同源性达 90%。见图 3。

3 讨 论

脓肿分枝杆菌为一种非结核分枝杆菌,该菌广泛存在于自然界,人和某些动物均可感染致病,至今尚未发现动物传染人或人与人直接传染的证据^[4-5]。近年来,脓肿分枝杆菌引起人感染的报道越来越多,慢性呼吸道疾病患者是其易感人群^[6]。本实验菌株来源于肺炎患者的胸腔积液,培养 48 h 未见细菌生长。因送检胸腔积液呈脓性且涂片可见大量的白细胞,故取原始接种区涂片革兰染色见少量革兰阳性球菌。继续培养 4 d 可见针尖大小菌落,因此对疑似细菌感染标本如培养 48 h 未见细菌生长时,认为取原始接种区标本涂片革兰染色镜检可避免一些慢性生长菌漏检。本研究脓肿分枝杆菌转种血平皿培养 4 d 可见菌落灰黄色,且随培养时间延长,颜色逐渐加深,与桂静等^[7]报道一致。

传统菌种鉴定方法耗时长且准确性差,不能鉴定到种,同时要求实验人员对观察结果的判定具备高度的专业知识,才能得到可靠的结果。近年来,一些基于分子生物学的菌种鉴定方法已广泛使用,极大地提高了对该菌种鉴定的诊断水平^[8]。PCR 具有特异性和敏感性高、快速、简便、重复性好及易自动化等优点。PCR 和 DNA 碱基序列测序技术迅速发展,对 16S rRNA 基因进行测序并与基因序列进行比对,可将分枝杆菌鉴定至种,成为鉴定分枝杆菌菌种的金标准^[9-10]。

临床表现及病理等方面表明,非结核分枝杆菌和结核分枝杆菌感染还是比较难以区别,在无菌种鉴定结果情况下,可能长期被误诊为结核病。由于其对常见的抗结核药物大多耐药,给临床治疗带来很大困难,故准确鉴别两者具有重要的临床意义^[11]。该菌对抗结核药物天然耐药,不同菌种对药物敏感性也不相同,治疗方案与疗程应根据菌种而定^[12-13]。因此,快速、准确地鉴定分枝杆菌菌种对于疾病诊断、治疗和控制具有重要的临床价值。

参考文献

[1] Jeon K, Kwon OJ, Lee NY, et al. Antibiotic treatment of
• 个案与短篇 •

Mycobacterium abscessus lung disease; a retrospective analysis of 65 patients[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2009, 180(9):896-902.

- [2] 段鸿飞,王敬,初乃惠,等. 鸟胞内分枝杆菌复合菌组肺病与脓肿分枝杆菌肺病临床表现的对比观察[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2012, 35(8):588-591.
- [3] 曾平,邹自英,吴艾霖,等. 糖尿病患者右小腿脓肿分枝杆菌感染菌种鉴定分析[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(19):2607-2609.
- [4] 谭守勇,吴碧彤. 应关注快速生长分枝杆菌病[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2012, 35(8):569-571.
- [5] Kramer J, Breitenseher M, Imhof H, et al. Diagnostic imaging in femur head necrosis[J]. Orthopade, 2000, 29(5):380-388.
- [6] 罗春明,邹桂敏,刘国标,等. 广州市 2003~2012 年非结核分枝杆菌菌种鉴定结果分析[J]. 结核病与肺部健康杂志, 2014, 3(1):15-20.
- [7] 桂静,王峰,李金莉. 非结核分枝杆菌菌种 ITS-PCR 测序鉴定法与表型鉴定法对比观察[J]. 检验医学, 2012, 27(11):908-912.
- [8] 赵建宏,李雅静,温海楠,等. 非结核分枝杆菌感染的分子诊断研究进展[J]. 检验医学, 2012, 27(3):155-158.
- [9] 吴雪琼,张宗德,乐军. 分枝杆菌生物学[M]. 北京:人民军医出版社, 2010:175-180.
- [10] 张阳奔,李静,江渊,等. 三种不同方法鉴别非结合分枝杆菌的应用评估[J]. 中华检验医学杂志, 2014, 37(4):305-306.
- [11] 沈瑶杰,金嘉琳,冯云. 临床培养分枝杆菌菌种鉴定方法的比较以及相关临床分析[J]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2013, 7(1):46-49.
- [12] 何国钧,肖和平. 非结核分枝杆菌病的治疗研究进展[J]. 抗感染药学, 2005, 2(2):60-63.
- [13] 白广红,李耀军,焦向阳. 胶体金法快速检测结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(10):1274-1276.

(收稿日期:2016-03-16 修回日期:2016-05-21)

某地区抗 Mur 抗体分布频率的调查研究及输血策略

陆奉科¹, 莫柱宁², 黎海澜², 韦海春¹

(1. 广西壮族自治区柳州市妇幼保健院 545001; 2. 广西壮族自治区人民医院, 南宁 530021)

关键词: 不规则抗体; Mur 抗体; 分布频率

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2016. 20. 067

文献标识码: C

文章编号: 1673-4130(2016)20-2945-02

目前人类血型有 30 余种之多,不规则抗体指除 ABO 血型系统以外的抗体,在日常输血工作中是常见的干扰试验因素^[1]。由于未输注完全相配合血型,可产生 MNSs 血型系统的不规则抗体,其抗体可导致患者发生严重的输血反应,抗 Mur 抗体属于 MNSs 血型系统的不规则抗体^[2]。国内外研究报道,东南亚部分地区稀有血型抗原的分布频率不相同^[3]。现

对广西少数民族人群分布较多地区的抗 Mur 抗体分布频率进行调查,有效建立和完善该地区稀有血型的信息档案。报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2013 年 3 月 26 日至 2016 年 1 月 25 日南宁、柳州 2 家医院患者及配血不合之献血者,共 45 208 例,年龄