

2017 年绍兴地区 106 株非结核分枝杆菌 菌种鉴定结果分析

金法祥 陶学芳 王华钧 许文芳 陈雪芳

【摘要】 目的 分析绍兴地区非结核分枝杆菌(NTM)的流行情况,为 NTM 诊疗提供科学依据。方法 对绍兴地区 2017 年临床分离的 972 株分枝杆菌,采用结核分枝杆菌抗原检测胶体金法进行结核分枝杆菌复合群和 NTM 的初步菌种鉴定,结果 106 株为 NTM,占分枝杆菌培养阳性菌株的 10.91%(106/972),对初步鉴定为 NTM 的菌株应用 DNA 微阵列芯片法进行 NTM 菌种鉴定。结果 106 株 NTM 菌株经 DNA 微阵列芯片法鉴定,共有 14 个菌种,其中菌株数量前 3 位的菌种为:胞内分枝杆菌[55 株(51.89%)],鸟分枝杆菌[19 株(17.92%)],堪萨斯分枝杆菌[13 株(12.26%)].其余分别为:龟-脓肿分枝杆菌[4 株(3.77%)],瘰疬分枝杆菌[3 株(2.83%)],戈登分枝杆菌[3 株(2.83%)],土分枝杆菌[2 株(1.89%)],其他[7 株(6.60%)].结论 2017 年绍兴地区 NTM 临床分离率占分枝杆菌培养阳性菌株的 10.91%;NTM 种类多,以胞内分枝杆菌、鸟分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌为主要流行菌种。

【关键词】 分枝杆菌,非典型性; 细菌分型技术; 芯片分析技术; 小地区分析

Analysis of identification results of 106 strains of non-tuberculous mycobacteria in Shaoxing area in 2017 JIN Fa-xiang, TAO Xue-fang, WANG Hua-jun, XU Wen-fang, CHEN Xue-fang. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Shaoxing College of Arts and Sciences, Zhejiang Province, Shaoxing 312000, China
Corresponding author: JIN Fa-xiang, Email: sxjfx0575@126.com

【Abstract】 Objective Analyze the prevalence of non-tuberculous mycobacteria (NTM) in Shaoxing and provide a scientific basis for NTM diagnosis and treatment. **Methods** In the Shaoxing area, 972 strains of mycobacteria were isolated in 2017, and the preliminary strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex and NTM was carried out by using the colloidal gold method of *Mycobacterium tuberculosis* antigen detection. 106 strains were NTM, accounting for mycobacterial culture-positive strains 10.91% (106/972), for the initial identification of NTM strains using DNA microarray method for NTM strain identification. **Results** One hundred and six strains of NTM were identified by DNA microarray method. There were 14 species of bacteria. The top 3 strains were 55 strains of *Mycobacteria intracellulare* (51.89%), 19 strains of *Mycobacterium avium* (17.92%) and 13 strains of *Mycobacterium kansasii* (12.26%). The remaining ones were: 4 strains of *Mycobacteria chelonae-abscessus* (3.77%), 3 strains of *Mycobacterium scrofulaceum* (2.83%), 3 strains of *Mycobacterium gordonae* (2.83%), and 2 strains of *Mycobacterium terrae* (1.89%), the other 7 strains (6.60%). **Conclusion** In 2017, the clinical isolation rate of NTM in Shaoxing accounted for 10.91% of the positive strains of mycobacterial culture, and there were many NTM species. *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium kansasii* were the main epidemic strains of NTM in Shaoxing.

【Key words】 Mycobacteria, atypical; Bacterial typing techniques; Microchip analytical procedures; Small-area analysis



开放科学(资源服务)标识码(OSID)的开放科学计划以二维码为入口,提供丰富的线上扩展功能,包括作者对论文背景的语音介绍、该研究的附加说明、与读者的交互问答、拓展学术圈等。读者“扫一扫”此二维码即可获得上述增值服务。

doi:10.3969/j.issn.1000-6621.2019.11.007

基金项目:浙江省绍兴市耐多药肺结核研究创新团队(绍兴市

级创新团队基金);绍兴市医药卫生科技计划(2017CX010, 2017ZH004)

作者单位:312000 浙江省绍兴文理学院附属医院检验科 绍兴市传染病重点实验室

通信作者:金法祥,Email: sxjfx0575@126.com

非结核分枝杆菌(non-tuberculous mycobacteria, NTM)是一种环境生长菌,目前已鉴别出 175 种和 13 个亚种(<http://www.bacterio.net/mycobacterium.html>),对人体具有致病性的有 40 余种^[1]。NTM 可以侵犯人体肺脏、淋巴结、骨骼、关节、皮肤和软组织等,并可引起全身播散性疾病。NTM 感染肺脏,引起肺部病变称为非结核分枝杆菌肺病。NTM 感染的高危人群主要是慢性呼吸道疾病患者(慢性阻塞性肺疾病、肺结核残余空洞、尘肺、支气管扩张等)、老年人和免疫功能缺陷者,特别是艾滋病(AIDS)患者。近年来,人口老龄化及其免疫力降低,各种免疫抑制剂的使用、AIDS 的流行及医源性感染机会增多、环境污染等诸多因素导致 NTM 病呈快速增多趋势^[1],并已成为威胁人类健康的重要公共卫生问题。NTM 对人致病,90% 以上发生 NTM 肺病;美国研究数据显示,65 岁以上的老年人肺部 NTM 感染的年发病率由 1997 年的 20/10 万增加到 2007 年的 47/10 万^[2]。随着现代医疗技术的不断提高、NTM 菌种鉴定技术的进步,以及免疫抑制剂使用等因素,临床分离培养到 NTM 及其相关的疾病呈增多趋势^[3-4]。本研究对绍兴地区 2017 年临床分离的 972 株分枝杆菌进行菌种鉴定,了解本地区 NTM 的优势菌群,为 NTM 病的诊疗提供科学依据。

资料和方法

一、菌株来源

2017 年绍兴市立医院(现为绍兴文理学院附属医院)采用 BACTEC MGIT 960 全自动分枝杆菌培养仪,绍兴市中心医院、诸暨市人民医院、上虞市人民医院、新昌县人民医院采用 BACTEC MGIT 320 全自动分枝杆菌培养仪,共液体培养分离分枝杆菌 972 株。结核分枝杆菌(MTB)标准株 H37Rv(ATCC27294)来源于中国疾病预防控制中心结核病参比室传代培养。胞内分枝杆菌(ATCC13950)、鸟分枝杆菌(ATCC25291)、堪萨斯分枝杆菌(ATCC12478)菌株来源于中国医学细菌保藏管理中心。

二、试剂、仪器与操作

(一)试剂、仪器

分枝杆菌液体培养基由美国 BD 公司提供,结核分枝杆菌抗原检测试剂盒(胶体金法)购自杭州创新生物检控技术有限公司,分枝杆菌菌种鉴定试剂盒由北京博奥生物集团有限公司提供。

日本奥林巴斯显微镜,美国 Thermo Fisher Scientific 公司低温高速离心机,上海 Heal Force B2 生物安全柜,杭州创新科技公司 PCR 扩增仪,HybSet 微阵列芯片杂交仪、芯片洗干仪、微阵列芯片扫描仪(LuxScan 10K-B)均由北京博奥生物集团有限公司提供。

(二)操作方法

1. 核酸提取:将核酸提取管采用离心半径 8 cm,12 000 r/min 离心 1 min,备用;将 1 ml NTM 菌液加入到 1.5 ml 的离心管中,离心半径 8 cm,12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液;向离心管中加入 1 ml 0.9%氯化钠溶液,涡旋振荡混匀,离心半径 8 cm,12 000 r/min 离心 10 min,弃上液清;用移液器将离心管中剩余液体吸干;每个离心管中加入 50 μ l NTM 菌种鉴定核酸提取液,用移液器吹吸沉淀,将液体和沉淀一起转移到核酸提取管中,涡旋充分振荡混匀 5 min;将核酸提取管置于 95 $^{\circ}$ C 金属浴 10 min;离心半径 8 cm,12 000 r/min 离心 1 min,备用。

2. PCR 扩增:取出 PCR 反应管,采用离心半径 8 cm,5000 r/min 离心 2 s,将 PCR 扩增试剂按 18 μ l/管分装,加入已提取的待测标本 DNA 2 μ l,同时取 2 个 PCR 反应管分别加入 MTB 阳性质控品和 MTB 阴性质控品。扩增条件:37 $^{\circ}$ C 5 min,94 $^{\circ}$ C 5 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 40 s \times 35 次,94 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 60 s \times 10 次,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,保持 4 $^{\circ}$ C。

3. 芯片杂交:PCR 产物置于 PCR 仪中 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min,随后置于冰水混合物中 5 min;按照 9 μ l 杂交液、6 μ l PCR 产物的比例配制杂交混合液;在基因微阵列芯片杂交盒的底部加入 200 μ l 蒸馏水,将托架放入盒体内的 2 个定位柱之间,芯片正面向

上,盖片 4 个凸台向下盖在芯片上;吸取 13.5 μl 杂交混合液经加样孔加入芯片点阵中,盖好盒盖并用金属条密封杂交盒;将杂交盒平稳放入杂交仪托盘,以使托盘平衡;运行分枝杆菌菌种鉴定杂交程序,杂交条件为 50 °C 杂交 120 min。

4. 芯片洗涤:根据芯片数量配制洗涤液 I 和洗涤液 II,体积以洗涤时能完全浸没芯片为准。洗涤液 I:依次将蒸馏水、20 × SSC (saline sodium citrate)、10% 十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS) 按 88 : 10 : 2 的比例配置 500 ml 并混合;洗涤液 II:依次将蒸馏水、20 × SSC 按 99 : 1 的比例配置 1000 ml 并混合;预热芯片洗干仪,待仪器屏幕显示“请放入芯片进行洗涤”的对话框时即可放入完成杂交的芯片,运行分枝杆菌菌种鉴定芯片洗涤程序进行洗涤。

5. 扫描判读:使用 LuxScan™10 微阵列芯片扫描仪。开启扫描仪,运行分枝杆菌菌种鉴定芯片判读系统,点击激光控制按钮,预热 10 min;输入芯片编号、标本编号等相关信息;将芯片放入扫描仪插槽内,点击“开始检测”按钮进行芯片扫描,结果将在屏幕上显示并自动保存;1 张芯片扫描完毕后继续重复下一张芯片的扫描;完成全部操作后,关闭激光,退出软件,关闭扫描仪,详细记录判读结果和芯片信息。

三、分枝杆菌菌种初步鉴定

分枝杆菌培养采用液体快速培养法,BACTEC MGIT 960 全自动分枝杆菌培养仪报阳性,培养液经涂片抗酸染色确认,为分枝杆菌培养阳性。分枝

杆菌阳性菌液初步鉴定结核分枝杆菌复合群和 NTM,采用 MTB 抗原检测试剂(胶体金法)。MTB: MTB 抗原检测阳性;NTM: MTB 抗原检测阴性。

分枝杆菌菌种初步鉴定结果:绍兴地区 2017 年 972 株分枝杆菌临床分离株中,经菌种初步鉴定 866 株为结核分枝杆菌复合群(占 89.09%),106 株为 NTM(占 10.91%)。106 株 NTM 中,91 株分离于痰液标本,14 株分离于肺泡灌洗液,1 株分离于脓液。

结 果

对确认的 106 株 NTM 临床分离株采用 DNA 微阵列芯片法进行菌种鉴定,采用微阵列芯片扫描仪和相应软件进行信号读取,NTM 菌株都获得一张清晰的芯片图,以下列举胞内分枝杆菌、鸟分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、浅黄分枝杆菌的芯片图(图 1)。

通过 DNA 微阵列芯片法进行菌种鉴定,106 株 NTM 菌株共有 14 个菌种,菌种数量位列前 5 位的是胞内分枝杆菌、鸟分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、龟-脓肿分枝杆菌、瘰疬分枝杆菌(表 1)。

讨 论

近年来,结核病疫情呈下降趋势而 NTM 病的患病率却逐年上升,甚至可能超过结核病的发病率和患病率^[5-6]。加拿大 Marras 等^[7]研究显示,在安大略省 NTM 患病率从 1997 年的 9.1/10 万增加到 2003 年的 14/10 万,远远超过安大略省的结核病患病率。在日本,NTM 患病率由 1971 年的 0.28/10 万

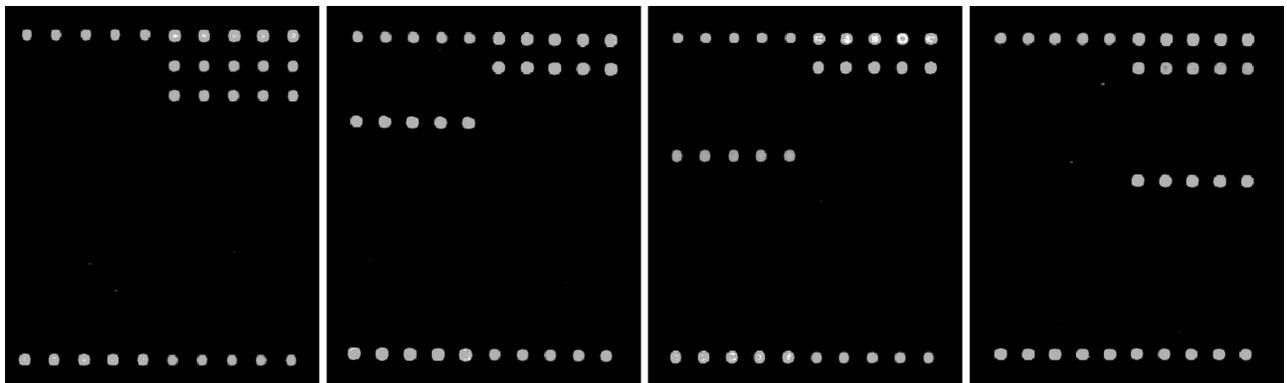


图 1 列举 DNA 微阵列芯片法对 4 种 NTM 菌种进行鉴定的芯片图。从左至右分别为胞内分枝杆菌(*M. intracellulare*)、鸟分枝杆菌(*M. avium*)、堪萨斯分枝杆菌(*M. kansasii*)、浅黄分枝杆菌(*M. gilvum*)

表 1 106 株 NTM 采用 DNA 微阵列芯片法进行菌种鉴定的结果

菌种名称	株数	构成比 (%)
胞内分枝杆菌(<i>M. intracellulare</i>)	55	51.89
鸟分枝杆菌(<i>M. avium</i>)	19	17.92
堪萨斯分枝杆菌(<i>M. kansasii</i>)	13	12.26
龟-脓肿分枝杆菌(<i>M. chelonae-abscessus</i>)	4	3.77
瘰疬分枝杆菌(<i>M. scrofulaceum</i>)	3	2.83
戈登分枝杆菌(<i>M. goodii</i>)	3	2.83
土分枝杆菌(<i>M. terrae</i>)	2	1.89
偶然分枝杆菌(<i>M. fortuitum</i>)	1	0.94
不产色分枝杆菌(<i>M. nonchromogenicum</i>)	1	0.94
金色分枝杆菌(<i>M. aurum</i>)	1	0.94
海-溃疡分枝杆菌(<i>M. marinum-ulcerans</i>)	1	0.94
蟾蜍分枝杆菌(<i>M. xenopi</i>)	1	0.94
浅黄分枝杆菌(<i>M. gilvum</i>)	1	0.94
苏尔加-马尔摩分枝杆菌(<i>M. szulgai-malmoense</i>)	1	0.94

上升到 1997 年的 3.52/10 万^[8]。我国台湾地区 NTM 病的发病率从 2000 年的 2.7/10 万增至 2008 年的 10.2/10 万, NTM 病占有分枝杆菌病的比率从 2000 年的 32.3% 升至 2008 年的 49.8%, 而结核病的比率从 2000 年的 67.7% 降至 2008 年的 50.2%^[9]。NTM 在我国的抗酸染色阳性的分枝杆菌标本中的检出率呈上升趋势^[10]。

目前,在我国部分基层医院,抗酸染色涂片检查是唯一的用来诊断 MTB 感染的方法,可能有不少 NTM 的感染者被误诊为 MTB 感染并接受了错误的抗结核药物治疗^[11],既往曾经对 MTB 具有诊断指导性的抗酸染色,不能鉴别 MTB 与 NTM^[12]。NTM 致病的显著特点是很强的机会性,人体存在 NTM 致病的很多机会或条件导致继发 NTM 肺病,如老年人免疫力下降、慢性支气管炎、支气管扩张、慢性阻塞性肺疾病、恶性肿瘤、血液透析、器官移植,以及使用免疫抑制剂、糖皮质激素等使免疫功能降低的药物、AIDS 患者并发的肺部感染中,NTM 肺病占第 3 位,仅次于卡氏肺孢子虫肺炎和巨细胞病毒肺炎^[11],继发 NTM 感染是导致这些人群预后

差和死亡的重要因素。NTM 肺病多发生于结构性肺部疾病的基础上,如慢性阻塞性肺疾病、支气管扩张、肺结核、尘肺、肺囊性纤维化等,NTM 肺病患者的肺通气功能减退较肺结核更为明显,NTM 肺病病程较长、肺组织破坏较重,加上各种并发症的存在,因此 NTM 感染是慢性呼吸系统疾病患者的噩梦^[13]。

我国历次的全国结核病流行病学调查结果显示,NTM 的分离率从 1990 年的 4.9% 持续增高^[3]。随着结核病疫情逐步得到控制,NTM 感染在分枝杆菌疾病中所占的比例将逐步提高^[4]。NTM 分离率各地报道上海为 5.9%,福建为 10.2%,广东为 19.3%^[14-16]。本研究结果显示,绍兴市共辖三区三区,此次入选患者来源于我市的 6 个行政区,以绍兴市区的柯桥区 and 越城区的 NTM 就诊患者为主,就诊患者中,绝大多数为住院临床诊断为结核病的患者。上述研究表明,NTM 的流行有着显著的区域性差异。本研究 NTM 菌种鉴定采用基因芯片法,又称 DNA 微阵列芯片法。基因芯片法鉴定 NTM 全流程只需要 8 h,简化了操作,具备鉴定临床常见 NTM 菌种的能力,能够有效解决临床 NTM 感染诊断的大部分问题。

NTM 的感染发生率和菌种分布存在着地域差异,且与气候环境相关。具有南方多于北方,气候温和地区多于气候寒冷地区,沿海地区多于内陆地区的特点。绍兴地处浙江省北部,紧靠宁波沿海地区,气候温和。2017 年 NTM 感染患者例数呈增加趋势,且 NTM 菌种种类达 14 种。根据宁波地区报道,93 株 NTM 中以胞内分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌和戈登分枝杆菌为主^[17];而湖南省报道的 51 株 NTM 菌株中以胞内分枝杆菌、鸟分枝杆菌和脓肿分枝杆菌为主^[18]。本次研究结果显示,2017 年绍兴地区 NTM 菌种以胞内分枝杆菌为主,其次为鸟分枝杆菌和堪萨斯分枝杆菌,这三类均属于缓慢生长分枝杆菌。胞内分枝杆菌、鸟分枝杆菌系 III 群 NTM,属于不产色素缓慢生长群;菌落均不产生色素,或呈灰白色、淡黄色;鸟-胞内型复合群是 NTM 肺病最常见的致病菌,尤其常见于免疫功能低

下者^[19-22]。

临床上, MTB 与 NTM 引起的肺病、淋巴结炎等疾病常难以鉴别诊断, 很容易误诊。大量研究及临床治疗经验表明, 多数传统抗结核药物对 NTM 病很少或没有抗菌活性, 为避免临床对 NTM 感染患者给予常规抗结核药物治疗而延误病情, 准确快速的分枝杆菌菌种鉴定对 NTM 病的早期诊断和治疗非常重要。目前, 国内还没有统一的针对 NTM 的药物敏感性试验(简称“药敏试验”)的方法, 多数医院没有开展针对 NTM 的药敏试验, 而 NTM 病的治疗常采用经验治疗。因此, NTM 菌种鉴定就显得更为重要, 以便有针对性地制订化学治疗方案。

参 考 文 献

- [1] 沙巍. 重视非结核分枝杆菌病的规范化诊治. 中国防痨杂志, 2017, 39 (3): 217-219.
- [2] Johnson MM, Odell JA. Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections. J Thorac Dis, 2014, 6(3): 210-220.
- [3] 全国结核病流行病学抽样调查技术指导组. 第四次全国结核病流行病学抽样调查报告. 中华结核和呼吸杂志, 2002, 25 (1): 3-7.
- [4] Brode SK, Daley CL, Marras TK. The epidemiologic relationship between tuberculosis and non-tuberculous mycobacterial disease: a systematic review. Int J Tuberc Lung Dis, 2014, 18 (11): 1370-1377.
- [5] Yeh JJ, Wang YC, Sung FC, et al. Nontuberculosis mycobacterium disease is a risk factor for chronic obstructive pulmonary disease: a nationwide cohort study. Lung, 2014, 192 (3): 403-411.
- [6] Chung J, Ince D, Ford BA, et al. Cutaneous infections due to nontuberculosis mycobacterium: recognition and management. Am J Clin Dermatol, 2018, 19(6): 867-878.
- [7] Marras TK, Chedore P, Ying AM, et al. Isolation prevalence of pulmonary nontuberculous mycobacteria in Ontario, 1997—2003. Thorax, 2007, 62(8): 661-666.
- [8] Tsai CF, Shiau MY, Chang YH, et al. Trends of mycobacterial clinical isolates in Taiwan. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2011, 105 (3): 148-152.
- [9] Lai CC, Tan CK, Chou CH, et al. Increasing incidence of nontuberculous mycobacteria, Taiwan, 2000—2008. Emerg Infect Dis, 2010, 16(2): 294-296.
- [10] Xu K, Bi S, Ji Z, et al. Distinguishing nontuberculous mycobacteria from multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, China. Emerg Infect Dis, 2014, 20(6): 1060-1062.
- [11] Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. Am J Respir Crit Care Med, 2007, 175(4): 367-416.
- [12] 马小军. 国内外非结核分枝杆菌诊治指南比较及临床适用性思考. 中华内科杂志, 2016, 55(4): 264-266.
- [13] Mehta M, Marras TK. Impaired health-related quality of life in pulmonary nontuberculous mycobacterial disease. Respir Med, 2011, 105(11): 1718-1725.
- [14] Wu J, Zhang Y, Li J, et al. Increase in nontuberculous mycobacteria isolated in Shanghai, China: results from a population-based study. PLoS One, 2014, 9(10): e109736.
- [15] 黄明翔, 王康林, 陈力舟, 等. 福建省临床分离 MTM 非结核分枝杆菌菌种分布研究. 中国人兽共患病学报, 2014, 30 (12): 1227-1230.
- [16] Wang X, Li H, Jiang G, et al. Prevalence and drug resistance of nontuberculous mycobacteria, northern China, 2008—2011. Emerg Infect Dis, 2014, 20(7): 1252-1253.
- [17] 平国华, 于梅, 潘爱珍, 等. 宁波地区非结核分枝杆菌病原谱的分析. 卫生研究, 2014, 43(5): 849-850.
- [18] 赵秀芹, 连璐璐, 易松林, 等. 湖南省 51 株疑似非结核分枝杆菌临床分离株的菌种鉴定. 中国预防医学杂志, 2013, 14 (3): 161-166.
- [19] 曾旋, 陆坚, 徐宇翔, 等. 非结核分枝杆菌菌种鉴定技术研究进展. 结核病与肺部健康杂志, 2019, 8(2): 146-148.
- [20] 刘佳文, 吕红艳, 丁北川, 等. 129 株非结核分枝杆菌采用两种分子检测技术行菌种鉴定的结果分析. 中国防痨杂志, 2019, 41(9): 999-1003.
- [21] 王春花, 庞学文, 傅衍勇. 非结核分枝杆菌相关研究新进展. 结核病与肺部健康杂志, 2015, 4(1): 61-64.
- [22] 刘东鑫, 郑惠文, 贺文从, 等. 广州市非结核分枝杆菌临床分离株菌种鉴定及药物敏感性试验结果分析. 中国防痨杂志, 2019, 41(5): 534-540.

(收稿日期: 2019-09-21)

(本文编辑: 薛爱华)