

• 短篇论著 •

339 株非结核分枝杆菌临床分离株菌种鉴定及耐药性分析

秦中华 景晔 杜岩青 宋晓梅 张丽霞

【摘要】 回顾性分析 2014 年 3 月至 2019 年 3 月天津市海河医院经罗氏培养和“DNA 微阵列芯片技术”确定的 339 株非结核分枝杆菌(NTM),并对其药物敏感性试验(简称“药敏试验”)结果进行分析。339 株 NTM 临床分离株中,排在前 3 位者分别为胞内分枝杆菌 38.6%(131/339)、龟-脓肿分枝杆菌 21.2%(72/339)、堪萨斯分枝杆菌 18.3%(62/339)。体外药敏试验显示胞内分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌和龟-脓肿分枝杆菌对 8 种抗结核药品(异烟肼、利福平、链霉素、乙胺丁醇、对氨基水杨酸、卡那霉素、卷曲霉素、氧氟沙星)耐药率情况为:胞内分枝杆菌的耐药率分别为 95.6%(108/113)、82.3%(93/113)、94.7%(107/113)、54.0%(61/113)、92.0%(69/75)、81.3%(61/75)、85.3%(64/75)、87.5%(49/56);堪萨斯分枝杆菌的耐药率分别为 100.0%(54/54)、3.7%(2/54)、98.1%(53/54)、11.1%(6/54)、95.0%(38/40)、90.0%(36/40)、27.5%(11/40)、13.8%(4/29);龟-脓肿分枝杆菌的耐药率分别为 96.9%(62/64)、93.8%(60/64)、95.3%(61/64)、92.2%(59/64)、88.4%(38/43)、86.0%(37/43)、88.4%(38/43)、87.1%(27/31)。临床分离 NTM 菌种以胞内分枝杆菌、龟-脓肿分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌为主,其中胞内分枝杆菌、龟-脓肿分枝杆菌对常用一线、二线抗结核药品具有较高的耐药性,堪萨斯分枝杆菌对利福平、乙胺丁醇、氧氟沙星、卷曲霉素的耐药率低。

【关键词】 分枝杆菌,非典型性; 生物学鉴定法; 细菌分型技术; 微生物敏感试验; 数据说明; 统计

Spectrum and drug resistance analysis of 339 strains of nontuberculous mycobacterium isolated from clinical practice

QIN Zhong-hua*, JING Ye, DU Yan-qing, SONG Xiao-mei, ZHANG Li-xia. * Laboratory of Tianjin Respiratory Research Institute of Haihe Hospital, Tianjin 300350, China

Corresponding author: JIN Ye, Email: crosshermit@sina.com

【Abstract】 From March 2014 to March 2019, 339 strains were identified as nontuberculous mycobacterium (NTM) by Roche culture and DNA microarray technology in Tianjin Haihe Hospital. Drug sensitivity test (DST) were performed. Among 339 NTM clinical isolates, the top three were *M. intracellulare* (38.6%, 131/339), *M. chelonii-abscessus* (21.2%, 72/339) and *M. kansas* (18.3%, 62/339). *In vitro* DST showed that the drug resistance rates of *M. intracellulare*, *M. Kansas* and *M. chelonii-abscessus* to 8 antituberculosis drugs (isoniazid, rifampin, streptomycin, ethambutol, p-aminosalicylic acid, kanamycin, capreomycin, ofloxacin) were: 95.6% (108/113), 82.3% (93/113), 94.7% (107/113), 54.0% (61/113), 92.0% (69/75), 81.3% (61/75), 85.3% (64/75), 87.5% (49/56) for *M. intracellulare*; 100.0% (54/54), 3.7% (2/54), 98.1% (53/54), 11.1% (6/54), 95.0% (38/40), 90.0% (36/40), 27.5% (11/40), 13.8% (4/29) for *M. kansas*; 96.9% (62/64), 93.8% (60/64), 95.3% (61/64), 92.2% (59/64), 88.4% (38/43), 86.0% (37/43), 88.4% (38/43), 87.1% (27/31) for *M. chelonii-abscessus*. The clinical isolates of NTM were mainly *M. intracellulare*, *M. chelonii-abscess* and *M. Kansas*, of which *M. intracellulare* and *M. chelonii-abscess* had high resistance to common first-line and second-line anti tuberculosis drugs, while *M. Kansas* had low resistance to rifampin, ethambutol, ofloxacin and capreomycin.

【Key words】 Mycobacterium, atypical; Biological assay; Bacterial typing techniques; Microbial sensitivity tests; Data interpretation, statistical



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。

(2018KYJJ006)

作者单位:300350 天津市海河医院 天津市呼吸病研究所检验科(秦中华、杜岩青、张丽霞);天津康复疗养中心(景晔);天津市海河教育园区达文路社区卫生院(宋晓梅)

通信作者:景晔, Email: crosshermit@sina.com

非结核分枝杆菌(non-tuberculous mycobacteria, NTM)指除结核分枝杆菌复合群和麻风分枝杆菌以外的分枝杆菌,迄今已发现 170 多种^[1],同时还有新的种别不断被发现。与专性致病菌结核分枝杆菌和麻风分枝杆菌不同,绝大多数 NTM 是环境微生物,通常作为机会性病原体,引起局部(皮肤和软组织、淋巴结、骨骼、肺)或播散性感染^[2]。从我国结核病流行病学调查资料显示,NTM 分离率由 1979 年的 4.3% 上升至 2000 年的 11.1%,到 2010 年的 21.0%,反映了我国的 NTM 病呈明显上升的态势^[3]。有研究显示,NTM 对常用的治疗药品耐药,导致 NTM 病的治疗较为困难,且治疗效果不理想^[4]。因此,笔者了解天津海河医院 NTM 病流行状况及耐药性特征,为临床 NTM 病的诊断和治疗提供参考。

资料和方法

一、研究对象

天津市海河医院 2014 年 3 月至 2019 年 3 月应用“DNA 微阵列芯片技术”进行菌种鉴定确定的 339 株 NTM。菌株来源于同一患者多次送检样本不重复计算,且选择初次实验室结果纳入统计分析。其中包括痰 271 份,肺泡灌洗液 49 份,胸腔积液 13 份、肺组织穿刺研磨标本 6 份。

二、实验方法

(一)分枝杆菌培养及初步菌种鉴定

分枝杆菌培养采用 BACTEC MGIT 960 系统及配套基础培养基(美国 BD 公司),阳性培养物采用对硝基苯甲酸(PNB)鉴别培养基(杭州创新生物技术有限公司)进行初步 NTM 鉴定。初步鉴定为 NTM 的菌株进行药物敏感性试验(简称“药敏试验”)及分枝杆菌菌种鉴定试验。

(二)药敏试验

药敏试验采用比例法,药品种类和浓度分别是异烟肼(0.2 μg/ml)、利福平(40 μg/ml)、链霉素(4 μg/ml)、乙胺丁醇(2 μg/ml)、对氨基水杨酸(1 μg/ml)、卡那霉素(30 μg/ml)、卷曲霉素(40 μg/ml)、氧氟沙星(3 μg/ml)。

(三)分枝杆菌菌种鉴定

1. 方法:DNA 微阵列芯片法。
2. 仪器:PCR 扩增仪、芯片杂交仪、芯片洗干仪(北京博奥生物有限公司);微型高速离心机(Eppendorf, 5424)。
3. 试剂:分枝杆菌菌种鉴定试剂盒(北京博奥生物有限公司)。
4. 操作步骤:参照说明书进行。

结 果

一、NTM 菌种的分布情况

临床分离的 339 株 NTM 菌株经菌种鉴定,排在前 3 位者分别为:胞内分枝杆菌 131 株,占 38.6%;龟-脓肿分枝杆

菌 72 株,占 21.2%;堪萨斯分枝杆菌 62 株,占 18.3%(表 1)。

表 1 339 株 NTM 菌种鉴定结果

NTM 名称	株数	构成比(%)
胞内分枝杆菌	131	38.6
龟-脓肿分枝杆菌	72	21.2
堪萨斯分枝杆菌	62	18.3
鸟分枝杆菌	30	8.8
偶然分枝杆菌	20	5.9
戈登分枝杆菌	8	2.4
浅黄分枝杆菌	6	1.8
瘰癧分枝杆菌	3	0.9
耻垢分枝杆菌	3	0.9
草分枝杆菌	2	0.6
蟾蜍分枝杆菌	2	0.6

二、不同 NTM 菌种的药敏试验结果

对罗氏培养出的菌株经“DNA 微阵列芯片技术”进行菌种鉴定,并对鉴定出的 NTM 菌株用比例法对 8 种抗结核药品(异烟肼、利福平、链霉素、乙胺丁醇、对氨基水杨酸、卡那霉素、卷曲霉素、氧氟沙星)进行药敏试验,结果:胞内分枝杆菌对上述药品的耐药率分别为 95.6%、82.3%、94.7%、54.0%、92.0%、81.3%、85.3%、87.5%;堪萨斯分枝杆菌对上述药品的耐药率分别为 100.0%、3.7%、98.1%、11.1%、95.0%、90.0%、27.5%、13.8%;龟-脓肿分枝杆菌对上述药品的耐药率分别为 96.9%、93.8%、95.3%、92.2%、88.4%、86.0%、88.4%、87.1%(表 2)。

讨 论

NTM 广泛存在于水、土壤和灰尘等自然环境中,某些 NTM(如鸟分枝杆菌、蟾蜍分枝杆菌、偶然分枝杆菌和龟分枝杆菌)对消毒剂及重金属耐受,使其生存于饮水系统中,其大部分为腐物寄生菌。在供热、供水管道中可分离到嗜热的蟾蜍分枝杆菌、耐热分枝杆菌和缓黄分枝杆菌等。NTM 病以潮热地带为多见,人和某些动物均可感染。目前尚未发现动物传染人以及人与人之间传播的证据。现在普遍认为,人可从环境中感染 NTM 而致病,水和土壤是重要的传播途径^[12]。迄今已发现 170 余种 NTM,其中 37 种已见致病报道^[5]。随着检测手段的提高 NTM 的分离率逐年上升^[3],同时 NTM 病患者在临床症状、影像学表现等方面与肺结核都十分相似,往往导致临床医生错误判断;使得需要很长的治疗时间,但是治疗效果较差。所以,如何快速准确地检测确

表 2 339 株 NTM 临床分离株中不同菌种对常用药品的耐药率

菌种名称	耐药率(%)							
	异烟肼	利福平	链霉素	乙胺丁醇	对氨基水杨酸	卡那霉素	卷曲霉素	氧氟沙星
胞内分枝杆菌	95.6 (108/113)	82.3 (93/113)	94.7 (107/113)	54.0 (61/113)	92.0 (69/75)	81.3 (61/75)	85.3 (64/75)	87.5 (49/56)
堪萨斯分枝杆菌	100.0 (54/54)	3.7 (2/54)	98.1 (53/54)	11.1 (6/54)	95.0 (38/40)	90.0 (36/40)	27.5 (11/40)	13.8 (4/29)
鸟分枝杆菌	100.0 (24/24)	79.2 (19/24)	95.8 (23/24)	54.2 (13/24)	93.8 (15/16)	87.5 (14/16)	75.0 (12/16)	100.0 (12/12)
偶然分枝杆菌	100.0 (18/18)	94.4 (17/18)	100.0 (18/18)	72.2 (13/18)	9/11	9/11	5/11	4/8
戈登分枝杆菌	6/6	0/6	2/6	0/6	2/3	0/3	0/3	0/1
龟-脓肿分枝杆菌	96.9 (62/64)	93.8 (60/64)	95.3 (61/64)	92.2 (59/64)	88.4 (38/43)	86.0 (37/43)	88.4 (38/43)	87.1 (27/31)
瘰癧分枝杆菌	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	— ^a
浅黄分枝杆菌	1/2	0/2	1/2	1/2	0/2	0/2	0/2	0/1
草分枝杆菌	2/2	1/2	0/2	0/2	0/1	0/1	0/1	0/1
蟾蜍分枝杆菌	2/2	1/2	1/2	1/2	1/2	0/2	0/2	0/1
耻垢分枝杆菌	1/2	2/2	1/2	0/2	1/2	0/2	1/2	0/1
合计	96.9	68.1	93.1	53.8	88.8	80.6	67.3	68.1

注 表中中小括号内数值分子为“耐药菌株数”,分母为“检测菌株数”。菌株数<15 株的菌种采用“耐药菌株数/检测菌株数”表示; ^a:未检测

定是否为 NTM 感染就显得尤为重要。目前,国内外大多数实验室采用用硝基苯甲酸/噻吩-2-羧酸胍(PNB/TCH)生长实验作为初步鉴别 NTM 的方法,操作简单,费用低廉^[6],但其报告时间长,且只能初步筛选 NTM,无法满足临床的需求。本研究采用 DNA 微阵列芯片法进行 NTM 菌种鉴定,可在短时间提供临床菌种信息,从而使经验用药改为目标用药,为临床精准治疗提供依据。

本研究发现临床分离出的 339 株 NTM 主要是胞内分枝杆菌(38.6%)、龟-脓肿分枝杆菌(21.2%)、堪萨斯分枝杆菌(18.3%),与吴海良等^[7]统计的山东地区 NTM 菌种病原谱分布情况一致,与广东地区^[8]、上海地区^[9]报告的 NTM 菌种分布资料不同。这可能是地区性差异或临床分离株数量少^[9]、病种分布不同所造成。

多数 NTM 对抗结核药品耐药,用抗结核药品治疗疗效不佳。而 NTM 细胞表面的高疏水性及细胞壁通透屏障是其广谱耐药的生理基础,是有效化疗的障碍。为了克服药品进入细胞的屏障,主张应用破坏细胞壁的药品(如乙胺丁醇)与抑制细菌蛋白质(酶)的合成的药品(如链霉素)、阻碍细菌 mRNA 合成的药品(如利福平)联用。其原因为链霉素和利福平都是杀菌药,链霉素的主要作用机制是通过阻止氨基酰 tRNA 与细菌核糖体 30S 亚单位的结合,从而抑制蛋白质合成时肽链的移位;利福平亲脂性高,很容易通过分枝杆菌的细胞膜,通过与 DNA 依赖的 RNA 聚合酶 β 亚基的 *rpoB* 基

因结合从而抑制转录。乙胺丁醇是一个抑菌药,对分枝杆菌细胞壁的破壁作用,有效地促进了其他药品进入细菌体内的速度,提升了胞内的药品浓度,与其他的抗结核药品有协同的作用,而且可以延缓其他药品耐药性的产生。大多数 NTM 对常用的抗分枝杆菌药品耐药,因此,NTM 病的治疗较为困难,且疗效大多不理想^[10]。本研究数据显示,临床分离的 NTM 菌株对一线、二线抗结核药品总的药耐率在 50% 以上,这与吴海良等^[7]报道的山东地区和张娟等^[11]报道的沈阳地区 NTM 临床耐药情况基本一致。

本研究数据显示,作为主要临床 NTM 分离株的堪萨斯分枝杆菌对乙胺丁醇、利福平、卷曲霉素、氧氟沙星具有很好的敏感性,这与中华医学会结核病学分会《非结核分枝杆菌病诊断和治疗》^[12]专家共识推荐,对未经治疗的堪萨斯分枝杆菌病患者,仅需进行利福平药敏试验的指导意见一致;但胞内分枝杆菌和龟-脓肿分枝杆菌对上述药品均具有较高的耐药性,提示临床进行经验治疗过程中应该注意药品的选择和菌种的鉴定。

综上所述,随着临床重视度及实验室诊断技术的不断提高,NTM 临床分离率呈现逐年增高趋势,同时感染后临床表现与结核分枝杆菌临床表现极为相似,但对常用抗结核药品又大部分具有耐药性,因此对 NTM 进行快速准确的鉴定和药敏试验有助于精准地对 NTM 病实施临床治疗。

参 考 文 献

[1] Honda JR, Virdi R, Chan ED. Global environmental nontuberculous mycobacteria and their contemporaneous man-made and natural niches. *Front Microbiol*, 2018, 9: 2029.

[2] Okoi C, Anderson STB, Antonio M, et al. Publisher correction: Non-tuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples in sub-Saharan Africa—a systematic review and Meta analyses. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 7771.

[3] 王宇. 全国第五次结核病流行病学抽样调查资料汇编. 北京: 军事医学科学出版社, 2011.

[4] 邓国防, 付亮, 唐怡敏, 等. 277 例非结核分枝杆菌肺病治疗状况分析. *中国防痨杂志*, 2017, 39(4): 391-396.

[5] 杨栗坤, 曹彦, 曹艳龙, 等. 结核病专科非结核分枝杆菌肺病菌种分布及病例特点研究. *中国人兽共患病学报*, 2018, 34(12): 1-9.

[6] Pang Y, Zheng H, Tan Y, et al. *In vitro* activity of bed aquiline against nontuberculous mycobacteria in China. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 61(5): e02627-16.

[7] 吴海良, 扈广欣, 林爱清. 40 株非结核分枝杆菌菌种鉴定及其耐药情况分析. *山东医药*, 2014, 54(40): 44-45.

[8] 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.

[9] Wang HX, Yue J, Han M, et al. Nontuberculous mycobacteria: susceptibility pattern and prevalence rate in Shanghai from 2005 to 2008. *Chin Med J (Engl)*, 2010, 123(2): 184-187.

[10] 沙巍, 肖和平. 再议非结核分枝杆菌的危害性. *中华结核和呼吸杂志*, 2018, 41(2): 83-85.

[11] 张娟, 孙炳奇, 孙秀华, 等. 2008—2012 年沈阳地区非结核分枝杆菌感染及耐药情况分析. *山东医药*, 2013, 53(35): 49-51.

[12] 中华医学会结核病学分会, 《中华结核和呼吸杂志》编辑委员会. 非结核分枝杆菌病诊断与治疗专家共识. *中华结核与呼吸杂志*, 2016, 35(8): 572-558.

(收稿日期: 2020-04-16)
(本文编辑: 范永德)

关于《结核病与肺部健康杂志》变更刊名的通告

经国家新闻出版署批准(国新出审〔2020〕297 号),《结核病与肺部健康杂志》(CN 10-1059/R)变更刊名为《结核与肺部疾病杂志》,新编国内统一连续出版物号为 CN 10-1695/R,季刊。主管单位为中国科学技术协会;主办单位为中国防痨协会;出版单位为《中国防痨杂志》期刊社。衷心希望社会各

界一如既往地关心、支持本刊,并热忱欢迎新老作者和读者踊跃投稿和订阅。

《中国防痨杂志》期刊社
2020 年 3 月