

柳州市区及周边地区临床分离非结核分枝杆菌的菌种分布研究*

唐柳生, 张 明, 唐国林, 廖光付, 冯光辉[△]

广西壮族自治区龙潭医院, 广西柳州 545005

摘要:目的 分析柳州市区及周边地区近年非结核分枝杆菌(NTM)临床分离率和菌种分布特征,掌握该地区 NTM 优势菌群,为 NTM 感染的临床诊治工作提供参考依据。方法 选取 2016 年 3 月至 2019 年 4 月柳州市区及周边地区分枝杆菌临床分离株 1 033 株,经 PNB 法初步鉴定,获得 NTM 菌株 184 株,再用微阵列基因芯片法行进一步的菌种鉴定。结果 184 株 NTM 经微阵列基因芯片法鉴定,检测出 9 种 NTM,其中鸟分枝杆菌占比最大,为 50.5%,其次是龟/脓肿分枝杆菌,占 27.1%,胞内分枝杆菌占 8.2%,戈登分枝杆菌占 3.8%,堪萨斯分枝杆菌占 3.3%,偶然分枝杆菌、浅黄分枝杆菌、苏尔加/玛尔摩分枝杆菌各占 2.2%,土分枝杆菌占 0.5%。184 例 NTM 感染患者中,85.9%患者年龄为 40 岁及以上。结论 鸟分枝杆菌和龟/脓肿分枝杆菌为柳州市区及周边地区近年流行的 NTM 菌种,中老年人是 NTM 的易感人群,NTM 主要引起肺部感染。

关键词:基因芯片法; 非结核分枝杆菌; 菌种鉴定

中图分类号:R446.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2020)06-0736-03

Study on species distribution of clinically isolated non-tuberculosis

Mycobacterium in Liuzhou City and surrounding area*

TANG Liusheng, ZHANG Ming, TANG Guolin, LIAO Guangfu, FENG Guanghui[△]

Guangxi Zhuang Autonomous Region Longtan Hospital, Liuzhou, Guangxi 545005, China

Abstract: Objective To study the clinical separation rate and bacterial species distribution characteristics of non-tuberculosis Mycobacterium (NTM) in Liuzhou City and surrounding area in recent years to master the dominant NTM flora in this area to provide a reference basis for clinical diagnosis and treatment work of NTM disease. **Methods** A total of 1 033 clinically isolated strains of Mycobacterium in Liuzhou City and surrounding areas from March 2016 to April 2019 were selected, after preliminary identification by using the PNB method, 184 strains of NTM were obtained, and conducted the species identification by using the microarray gene chip method. **Results** One hundred and eighty-four strains of NTM were identified by using the microarray gene chip method, and 9 specieses of NTM were identified, in which Mycobacterium avian accounted for the largest proportion (50.5%), followed by Mycobacterium tortoise/abscess, accounting for 27.1%, and Mycobacterium intracellular for 8.2%, Gordon Mycobacterium for 3.8%, Kansas Mycobacterium for 3.3%, Accidental Mycobacterium, Mycobacterium flavum and Suerjia/Maermo Mycobacterium for 2.2%, and Mycobacteria for 0.5%. Among 184 cases of NTM infection, 85.9% of the patients were over 40 years old. **Conclusion** Mycobacterium avian and Mycobacterium tortoise/abscess are the dominant NTM species in Liuzhou City and surrounding area in recent years. The middle-aged and elderly people are susceptible to NTM infection, which mainly causes lung infection.

Key words: gene chip method; non-tuberculosis Mycobacterium; bacterial species identification

随着结核病防治工作的不断深入,近年来非结核分枝杆菌(NTM)感染的报道也不断增多,已成为目前研究者关注的问题。有报道,NTM 的发病率在逐年提高,但各地报道主要致病的 NTM 菌种存在一定的差异,流行特征也不尽相同^[1]。目前柳州市区及周边地区较缺乏相关资料,为了解近年 NTM 临床分离株的菌种分布情况,本研究采用微阵列基因芯片

法对分布于柳州市区及周边地区人群的 NTM 进行菌种鉴定,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 标本来源 收集 2016 年 3 月至 2019 年 4 月柳州市区及周边地区分枝杆菌临床分离株 1 033 株,均分离自临床患者,结核分枝杆菌标准菌株为 H37Rv。

1.2 仪器与试剂 抗酸染色液和改良罗氏培养基

* 基金项目:广西壮族自治区卫生和计划生育委员会自筹经费科研课题(Z20180063)。

作者简介:唐柳生,男,副主任技师,主要从事结核病细菌学实验室研究。 [△] 通信作者, E-mail:892193726@qq.com。

(L-J 培养基)由珠海贝索公司提供。晶芯分枝杆菌菌种鉴定试剂盒、晶芯 Extractor36 核酸快速提取仪、PCR 扩增仪、BioMixer™ II 芯片杂交仪、恒温水浴锅、SlideWasher™8 芯片干洗仪、LuxScan10K-B 微阵列芯片扫描仪均由博奥生物集团有限公司提供。N-乙酰-L-半胱氨酸-NaOH 混合溶液和 pH6.8 的磷酸盐缓冲液为本室自配^[2]。ZDP-A2270 恒温培养箱由上海智诚分析仪器制造有限公司提供。KDC-2046 低速离心机由安徽中科中佳科学仪器有限公司提供。

1.3 方法

1.3.1 分枝杆菌培养及初步鉴定 采用改良罗氏培养基(L-J 培养基)进行分枝杆菌培养,阳性菌株再用 PNB 和 TCH 鉴别培养基(PNB 法)进行初步鉴定:PNB 和 TCH 培养基均生长的菌株初步判定为 NTM;PNB 不生长、TCH 生长或不生长的菌株初步判定为结核分枝杆菌复合群。具体操作参照分枝杆菌分离培养标准化操作程序及质量保证手册^[2]。

1.3.2 NTM 的菌种鉴定 将初步鉴定为 NTM 的菌株用无菌的接种环挑取其菌落于核酸提取管中,95 °C 10 min 灭活,1 200 r/min 离心 5 min,倾倒入去上清液。向核酸提取管中加入 80 μL 核酸提取液,使用核酸快速提取仪振荡 5 min 后取出核酸提取管,放入 95 °C 水浴锅 5 min。然后 12 000 r/min 离心 1 min,取上清液 2 μL 于规格为 200 μL 的离心管中,

加入扩增试剂 18 μL,用 PCR 扩增仪进行扩增。取 6 μL 相应的扩增产物与 9 μL 杂交缓冲液混匀,95 °C 变性 5 min 后冰浴 3 min。将 13.5 μL 杂交反应混合物加到芯片上,迅速盖上杂交盒并密封,立即将密封好的杂交盒水平放入 50 °C 预热的恒温水浴锅中杂交 120 min。将杂交后的芯片用干洗仪进行洗涤和甩干,再通过扫描仪和相应的软件分别进行扫描和结果的判读。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行统计分析,计数资料以例数表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 分枝杆菌菌群鉴定结果 1 033 株分枝杆菌临床分离株用 PNB 和 TCH 鉴别培养基进行初步鉴定,检测出结核分枝杆菌复合群 849 株,占 82.2%,检测出 NTM 184 株,占 17.8%。

2.2 NTM 的菌种鉴定结果 184 株 NTM 用基因芯片法进行菌种鉴定,共检测出 NTM 9 种,其中鸟分枝杆菌占比最大,为 50.5%,其次是龟/脓肿分枝杆菌,占 27.1%,胞内分枝杆菌占 8.2%。绝大部分 NTM 分布于痰液标本。NTM 感染患者中,男 107 例,占 58.2%,女 77 例,占 41.8%,男性感染 NTM 的比例高于女性($P < 0.05$)。NTM 感染患者年龄为 25~82 岁,85.9%患者年龄为 40 岁及以上。见表 1~2。

表 1 9 种 NTM 在各种标本中的分布情况

项目	痰液(n)	骨髓(n)	淋巴结(n)	脓液(n)	大便(n)	分泌物(n)	合计(n)	构成比(%)
胞内分枝杆菌	14	0	0	0	0	1	15	8.2
戈登分枝杆菌	7	0	0	0	0	0	7	3.8
龟/脓肿分枝杆菌	50	0	0	0	0	0	50	27.1
堪萨斯分枝杆菌	6	0	0	0	0	0	6	3.3
鸟分枝杆菌	89	1	1	1	1	0	93	50.5
偶然分枝杆菌	3	0	0	1	0	0	4	2.2
浅黄分枝杆菌	4	0	0	0	0	0	4	2.2
苏尔加/玛尔摩分枝杆菌	4	0	0	0	0	0	4	2.2
土分枝杆菌	1	0	0	0	0	0	1	0.5
合计	178	1	1	2	1	1	184	100.0

表 2 各年龄段不同性别感染 NTM 的情况[n(%)]

年龄段(岁)	男	女	合计
25~<40	21(19.6)	5(6.5)	26(14.1)
40~<60	35(32.7)	32(41.6)	67(36.3)
≥60	51(47.7)	40(51.9)	91(49.5)
合计	107(100.0)	77(100.0)	184(100.0)

3 讨 论

近年来,NTM 感染所致疾病的发病率呈上升趋势^[1],可能与分枝杆菌菌种鉴定水平的不断提高、人

口老龄化、免疫力低下人群增多有一定的关系^[3-5]。笔者曾报道 2015 年柳州市艾滋病患者合并分枝杆菌感染情况:1 106 例艾滋病患者的各类标本经分枝杆菌培养,共分离出分枝杆菌 148 株,其中 NTM 27 株,占 18.2%^[3]。其他相关研究也有类似的报道,证明人类免疫缺陷病毒(HIV)阳性者是感染 NTM 的高危人群^[4-5]。本研究结果显示,NTM 在分枝杆菌中所占比例为 17.8%,与笔者当年的报道大致接近,与其他研究相比,本研究结果中 NTM 分离率高于北方地区而低于沿海地区^[6],证明 NTM 的分离率在地域上存

在一定的差异。

本研究采用基因芯片法进行 NTM 菌种鉴定,共检测出 9 种 NTM,其中鸟分枝杆菌占比最大,为 50.5%,其次是龟/脓肿分枝杆菌,占 27.1%,胞内分枝杆菌占 8.2%,表明柳州市区及周边地区以鸟分枝杆菌和龟/脓肿分枝杆菌为主要流行菌株。文献[7-14]报道,北京地区和宁波地区以胞内分枝杆菌和堪萨斯分枝杆菌为主要流行菌株,天津市以胞内分枝杆菌和龟/脓肿分枝杆菌为主要流行菌株,山东、甘肃、福建省和杭州市以胞内分枝杆菌为主要流行菌株,广州市以龟/脓肿分枝杆菌为主要流行菌株。本研究和这些报道都证明了 NTM 的菌种分布也存在区域性的差异。

本研究显示,184 例 NTM 感染患者中,男性占比高于女性,85.9%患者年龄为 40 岁及以上,60 岁及以上患者占 49.5%。张结等^[7]报道,130 例 NTM 感染者中,男 87 例,女 43 例,60 岁及以上占 40%(52/130)。本研究及以上报道均显示 NTM 感染者以男性居多,中老年人作为 NTM 的易感人群。

本研究中检测出的 NTM 大多为痰液标本分离株,说明 NTM 感染大多发生在肺部。鸟分枝杆菌感染后可侵害包括肺、骨髓和淋巴结在内的多种器官和组织。临床类型主要包括单一结节、结节状支气管扩张、结节样浸润和在免疫力低下患者中的扩散性浸润 4 种,大多数鸟分枝杆菌菌株具有多重耐药性,给临床治疗带来一定的困难。该类患者胸部 X 线片上病变见于右上肺,早期临床很容易被误诊为肺结核。龟/脓肿分枝杆菌是一种快速生长的 NTM,主要引起肺部和皮肤伤口感染。胞内分枝杆菌感染主要表现为慢性肺部感染。堪萨斯分枝杆菌存在于灰尘和水中,但不太容易从环境中分离。系统疾病、免疫抑制剂应用和长期暴露于污染的水中是发病的危险因素。该菌可以感染机体而不发病,直至宿主免疫功能缺陷时发病,主要侵犯肺部。戈登分枝杆菌一般情况下不易致病,在身体抵抗力低的情况下可引起机会性感染和发病。偶然分枝杆菌属于迅速生长的分枝杆菌,发病机制还不确切,吴海良等^[10]报道 40 株 NTM 中偶然分枝杆菌有 2 株,本文报道 184 株 NTM 中偶然分枝杆菌有 4 株,二者比较,差异有统计学意义($\chi^2 = 174.09, P < 0.01$)。浅黄分枝杆菌生长速度介于慢生长菌与快生长菌之间,但此菌与快生长菌更为接近。吴海良等^[10]报道 40 株 NTM 中浅黄分枝杆菌有 1 株,本文报道 184 株 NTM 中浅黄分枝杆菌有 4 株,二者比较,差异有统计学意义($\chi^2 = 177.02, P < 0.01$),表明偶然分枝杆菌、浅黄分枝杆菌在柳州市区及周边地区的分离率与山东省^[10]的分离率存在较大差异。苏尔加/玛尔摩分枝杆菌和土分枝杆菌的相关研究报道较少,本文报道 184 株 NTM 中苏尔加/玛尔摩分枝

杆菌有 4 株,土分枝杆菌有 1 株,虽然这些菌种所占比例很少,但仍然不能忽略其带来的感染风险。

综上所述,本研究显示柳州市区及周边地区 NTM 的菌种分布与其他地区存在一定差异,NTM 感染大多数发生在肺部,流行的 NTM 以鸟分枝杆菌和龟/脓肿分枝杆菌为主,NTM 感染以男性居多,中老年人作为 NTM 的易感人群。本研究结果反映了柳州市区及周边地区近年来 NTM 的流行特征,为 NTM 感染的临床诊治工作提供了重要的参考依据。

参考文献

- [1] 黄明翔,万康林,陈力舟,等.福建省临床分离非结核分枝杆菌菌种分布研究[J].中国人兽共患病学报,2014,30(12):1227-1229.
- [2] 赵雁林,王黎霞,成诗明,等.分枝杆菌分离培养标准化操作程序及质量保证手册[M].北京:人民卫生出版社,2012:30-31.
- [3] 唐柳生,蒙志好,陈敬捷,等.艾滋病患者合并分枝杆菌感染及耐药性分析[J].国际病毒学杂志,2016,33(5):336-338.
- [4] 田景辉,吴利先. HIV/AIDS 合并 NTM 病的研究进展[J].中国病原生物学杂志,2018,31(7):804-806.
- [5] 程睿傑,吴利先,王国富. AIDS 合并非结核分枝杆菌肺炎的研究进展[J].中国病原生物学杂志,2018,31(6):671-673.
- [6] 金法祥,王华钧,张伟阳,等.临床分离非结核分枝杆菌的菌种分布特征分析[J].中华医院感染学杂志,2017,27(7):1480-1482.
- [7] 张结,苏建荣,丁北川,等.北京地区非结核分枝杆菌菌种分布及耐药性研究[J].中华结核和呼吸杂志,2017,40(3):210-214.
- [8] 景辉,王燕,蒋彩花,等.山东省非结核分枝杆菌感染的菌种分布研究[J].中国防痨杂志,2009,31(5):273-276.
- [9] 张鑫,蔡静,姜元,等.43 株甘肃临床分离非结核分枝杆菌分类鉴定[J].中国人兽共患病学报,2017,33(2):173-176.
- [10] 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[J].山东医药,2014,54(40):44-45.
- [11] 郭明日,张丽霞,周洪经,等.非结核分枝杆菌肺病患者下呼吸道感染病原菌分布及耐药性分析[J].中华医院感染学杂志,2016,26(20):4641-4644.
- [12] 吴亦斐,刘伟,谢捷,等.杭州地区流行非结核分枝杆菌鉴定、易感因素和耐药性分析[J].中国人兽共患病学报,2017,33(10):882-887.
- [13] 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[J].卫生研究,2014,43(5):849-850.
- [14] 李昕浩,谭守勇,黄业伦,等.812 株非结核分枝杆菌临床分离株流行病学特征分析[J].中国防痨杂志,2010,32(12):811-814.