· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.22.014

福建省龙岩市 333 份分枝杆菌菌种鉴定结果回顾性分析

黄文滨,张满娥,卢志华,邓文华,张洪彬

福建省龙岩市第二医院分子生物实验室,福建龙岩 364000

摘要:目的 了解龙岩市分枝杆菌感染的阳性率及分枝杆菌菌种分布情况,为龙岩市结核病及非结核分枝杆菌病的防治及流行病学研究提供科学依据。**方法** 采用 DNA 微阵列芯片法检测来该院就诊的 756 例疑似结核病患者的标本,并进行临床上常见的 17 种分枝杆菌的检测,计算分枝杆菌感染的阳性率及分枝杆菌菌种的分布特点。**结果** 756 份标本中分枝杆菌阳性 333 份(44.05%),其中结核分枝杆菌复合群阳性 290 份(87.09%),非结核分枝杆菌阳性 43 份(12.91%),非结核分枝杆菌种群分布达 10 种,以胞内分枝杆菌(25.58%)、鸟分枝杆菌(20.93%)、龟或脓肿分枝杆菌(18.60%)菌种为主,有 7 种非结核分枝杆菌未被检出。**结论** 龙岩市分枝杆菌菌种分布广泛,分枝杆菌感染以结核分枝杆菌为主,非结核分枝杆菌感染以胞内分枝杆菌、鸟分枝杆菌、龟或脓肿分枝杆菌为主。分枝杆菌菌种鉴定对结核病及非结核分枝杆菌病的诊断及治疗有较好的指导意义。

关键词:分枝杆菌; 菌种鉴定; 基因芯片技术; 结核病**中图分类号:**R446.5**文献标志码:**A**文章编号:**1672-9455(2020)22-3275-04**Retrospective analysis of the identification results of 333 Mycobacterium species in Longyan City, Fujian Province**

HUANG Wenbin, ZHANG Man'e, LU Zhihua, DENG Wenhua, ZHANG Hongbin

Department of Molecular Biology Laboratory, the Second Hospital of Longyan, Longyan, Fujian 364000, China

Abstract: Objective To understand the positive rate of Mycobacterium infection and the distribution of Mycobacterium species in Longyan City, and provide a scientific basis for prevention and treatment and epidemiological study of tuberculosis and nontuberculosis in Longyan City. **Methods** The DNA microarray chip was used to detect the 756 specimens who suspected tuberculosis in the hospital, to detect the 17 common kinds of Mycobacteria in clinical. **Results** Totally 333(44.05%) specimens out of 756 specimens were positive, among which 290(87.09%) specimens were detected as Mycobacterium tuberculosis complex group, while 43(12.91%) specimens were detected as nontuberculosis Mycobacteria. Nontuberculosis Mycobacteria distribution of 10 species, of which the major species were intracellular Mycobacterium(25.58%), Mycobacterium avium(20.93%) and Mycobacterium abscessus(18.60%), and 7 kinds of non tuberculosis Mycobacteria had not been detected. **Conclusion** Mycobacterium species widely distributed in Longyan City, Mycobacterial infection is mainly caused by Mycobacterium tuberculosis, nontuberculosis Mycobacteria infection in Longyan City is mainly caused by intracellular Mycobacterium, Mycobacterium avium, Mycobacterium abscessus. Identification of Mycobacterium species has a good guiding significance for the diagnosis and treatment of tuberculosis and nontuberculosis Mycobacterial disease.

Key words: Mycobacteria; strain identification; gene chip technology; tuberculosis

分枝杆菌主要分为结核分枝杆菌复合群(MTB)、非结核分枝杆菌(NTM)、麻风分枝杆菌三大类,其中麻风分枝杆菌在临床中较为少见。据全国第 5 次流行病学抽样调查报告结果显示,我国是世界上排名第二的结核病高负担国家,结核病的诊疗及预防形势依

然严峻^[1]。临床资料显示,NTM 病的临床症状与结核病高度相似,且 NTM 对临床一线抗结核药物的耐药率可高达 100%^[2]。有学者研究认为,临床上约有 62% 抗结核疗效不佳的肺结核为 NTM 感染^[3],故区分 MTB 与 NTM 显得尤为重要。北京博奥生物集团

有限公司的分枝杆菌菌种鉴定试剂盒采用基因芯片技术,可较为精确地区分 MTB 和 NTM,并可鉴别多种 NTM,是目前较为可靠的分子层面分枝杆菌鉴定技术^[4]。本文回顾性分析 2016 年 5 月至 2019 年 12 月来本院就诊的疑似结核病患者分枝杆菌菌种鉴定结果,以期为临床诊疗提供指导依据,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 5 月至 2019 年 12 月来本院就诊的 756 例疑似结核病的门诊或住院患者为研究对象,其中男 536 例、女 220 例,年龄 12~93 岁、中位年龄 56 岁。收集所有患者检测标本进行分枝杆菌菌种鉴定,标本类型包括痰液、肺泡灌洗液、纤维支气管镜刷物、胸腔积液、腹水、脑脊液、尿液、关节液、伤口分泌物、穿刺液、前列腺液等。

1.2 仪器与试剂 检验仪器为杭州博日科技有限公司生产的 Tc-s-B Gene Max 基因扩增仪,北京博奥生物集团有限公司生产的核酸快速提取仪、芯片洗干仪、微阵列芯片扫描仪。分枝杆菌菌种鉴定诊断试剂盒由北京博奥生物集团有限公司提供。

1.3 方法

1.3.1 标本处理 根据标本类型不同,标本前处理有所差别,其中痰液、肺泡灌洗液、纤维支气管镜刷物、胸腔积液及腹水等呼吸道标本及黏稠度比较高的关节分泌物,用 10% NaOH 液化,10% NaOH 添加量根据标本的黏度进行适当调整,放置室温 30 min 或更长时间,直至标本完全液化,取 1.0 mL 标本于 1.5 mL 离心管中,12 000×g 离心 5 min,弃上清液,加 1 mL 生理盐水,振荡混匀备用。尿液标本取 1.0 mL 标本于 1.5 mL 离心管中,12 000×g 离心 5 min,弃上清液,加 1 mL 生理盐水,振荡混匀备用。核酸提取、PCR 扩增、杂交反应、洗片与芯片扫描等操作过程严格按照试剂说明书进行。其余伤口分泌物及脑脊液等标本无特殊前处理,直接进行核酸提取。

1.3.2 分枝杆菌鉴定 采用基因芯片技术检测分枝杆菌。针对临床常见的分枝杆菌设计特异性的 PCR 扩增引物及种属特异性寡核苷酸探针。以临床样品中分离的致病菌 DNA 为模板,运用独特的不对称 PCR 技术进行扩增反应。由于引物末端标记有荧光分子,因此,在扩增过程中待检测的 DNA 分子被扩增为带有荧光分子的 DNA 片段。将标记有荧光分子的 PCR 扩增产物与芯片上的探针在一定的条件下进行杂交反应,根据碱基互补配对原则,序列匹配的 PCR 扩增产物与探针形成稳定的二级结构。根据探针在芯片上的特定位置排布,就可以推断出相应被测细菌

的相关信息,鉴定出被测细菌的种类。鉴定的细菌种类为临床常见分枝杆菌的 17 个种或群,包括 MTB、胞内分枝杆菌、鸟分枝杆菌、戈登分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、偶然分枝杆菌、瘰疬分枝杆菌、浅黄分枝杆菌、土分枝杆菌、龟或脓肿分枝杆菌、草分枝杆菌、不产色分枝杆菌、海/溃疡分枝杆菌、金色分枝杆菌、苏尔加分枝杆菌和玛尔摩分枝杆菌、蟾蜍分枝杆菌、耻垢分枝杆菌。

1.4 统计学处理 应用 SPSS20.0 统计软件进行数据分析,计数资料以率表示,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 MTB、NTM 分布情况 756 份标本中分枝杆菌阳性 333 份(44.05%),其中 MTB 290 份(87.09%),NTM 43 份(12.91%)。MTB 阳性标本中男性检出 237 份,女性检出 53 份,男性检出率明显高于女性,差异有统计学意义($\chi^2 = 26.72, P < 0.05$)。而 NTM 男性检出 19 份,女性检出 24 份,女性检出率略高于男性,差异无统计学意义($\chi^2 = 3.58, P > 0.05$)。见表 1。

表 1 756 份标本中 MTB、NTM 分布情况(n)

性别	检测份数	MTB	NTM	未检出分枝杆菌
男	536	237	19	280
女	220	53	24	143
合计	756	290	43	433

2.2 各类型标本 MTB 及 NTM 分离情况 290 份 MTB 中,痰液分离 205 份,占 70.69%;肺泡灌洗液分离 73 份,占 25.17%;胸腔积液分离 3 份,创口分泌物分离 2 份,关节液、穿刺液、前列腺液、尿液各分离 1 份;另有 3 份标本类型未明。43 份分离出 NTM 的标本中,痰液分离 28 份,占 65.12%;肺泡灌洗液分离 10 份,占 23.26%;创口分泌物分离 2 份;另有 3 份标本类型未明。

2.3 MTB 及 NTM 感染者性别及年龄分布情况 MTB 感染主要集中于 20~80 岁,>50~60 岁感染者最多,10~20 岁及>80 岁感染者比例较小,除>20~30 岁男女性别比例为 1:1 外,其他各个年龄段男性患者比例均明显高于女性患者比例。女性 NTM 感染者略多于男性 NTM 感染者,女性和男性比例为 1.26:1,其中 10~20 岁及>80 岁感染者未见,感染者主要集中于>40~80 岁,其中>70~80 岁感染得最多。见表 2。

2.4 43 份 NTM 菌种分布情况 见表 3。

表 2 MTB 及 NTM 感染者性别及年龄分布情况(n)

项目	10~20 岁	>20~30 岁	>30~40 岁	>40~50 岁	>50~60 岁	>60~70 岁	>70~80 岁	>80 岁	合计
MTB	9	32	28	46	67	50	41	17	290
男	7	16	19	40	60	42	38	15	237
女	2	16	9	6	7	8	3	2	53
NTM	0	2	1	7	8	12	13	0	43
男	0	1	1	1	5	5	6	0	19
女	0	1	0	6	3	7	7	0	24

表 3 43 份 NTM 菌种分布情况

菌种类别	检出份数(n)	构成比(%)
龟或脓肿分枝杆菌	8	18.60
胞内分枝杆菌	11	25.58
鸟分枝杆菌	9	20.93
瘰癧分枝杆菌	4	9.30
堪萨斯分枝杆菌	2	4.65
浅黄分枝杆菌	3	6.98
偶然分枝杆菌	1	2.33
金色分枝杆菌	1	2.33
海/溃疡分枝杆菌	3	6.98
胞内/不产色/浅黄分枝杆菌混合感染	1	2.33
合计	43	100.00

3 讨 论

福建省龙岩市第二医院为位于闽、粤、赣三省交界的龙岩市,作为龙岩市结核病定点医院,本院为结核病专科医疗联合体的牵头单位,联合各县(市、区)医院负责龙岩市结核病的诊疗和预防工作,特别是疑难病例的诊断及治疗。既往对龙岩市分枝杆菌菌种分布特征的研究报道较少^[2,5]。本研究结果显示,756 份标本中检出分枝杆菌 333 份(44.05%),其中 MTB 阳性 290 份(87.09%),NTM 阳性 43 份(12.91%),MTB 检出率与徐州地区的 84.6%相近,但低于四川、衢州、长沙、重庆等^[6-9]地区,与全国第五次结核病流行病学抽样调查报告一致^[1];NTM 阳性检出率高于四川、长沙、重庆等地区,符合我国 NTM 感染沿海地区高于内地地区的分布特征^[6]。本研究中,龙岩市 MTB 检出率低于 2017 年本市相关调查的 95.9%,NTM 检出率则高于 2017 年的 4.5%,表明龙岩市 NTM 感染有上升趋势,且有相关报道研究显示,龙岩市 NTM 患者对一线、二线抗结核药均 100%耐药^[2],故疑似结核病患者治疗前进行分枝杆菌菌种鉴定尤为重要。本研究 MTB 标本中男性检出 237 份,女性检出 53 份,男性检出率明显高于女性,差异有统计学意义($P < 0.05$),说明本市结核病患者以男性为主,与

全球结核患者的性别分布情况一致^[10],与中国全国第五次结核病流行病学抽样调查报告的结核患者的性别分布也一致^[1]。可能与男性不健康的生活方式(如饮酒、吸烟、熬夜、活动范围大、交友广泛)有关,尤其是吸烟会损害呼吸器官的屏障作用,进一步降低肺功能,增加诱发结核病的可能性^[11-12]。从各类型标本 MTB 及 NTM 的分离情况可以看出,MTB(95.86%)及 NTM(88.38%)大多数是从痰液及肺泡灌洗液中分离的,说明目前 MTB 及 NTM 感染主要是以呼吸道感染,即肺内感染为主,肺外感染较少见。但需要特别注意的是,呼吸道标本中分离出 NTM,并不表示它一定致病,可能原因是呼吸道定植或者标本存在污染所致,因此,临床医生需要谨慎分析。MTB 感染者年龄主要集中在>50~60 岁,以中老年为主,可能因为中老年人的抵抗力较差所致。NTM 感染者年龄主要集中在>40~80 岁,年龄较重庆地区^[13]明显增高,与江苏地区^[14]一致。

检出的 43 份 NTM 以胞内分枝杆菌(25.58%)、鸟分枝杆菌(20.93%)、龟或脓肿分枝杆菌菌种(18.60%)为主,该结果与福建、湖南、重庆等地区^[5,9,13]的临床 NTM 菌种鉴定结果相同。与北京、四川、江苏等地区^[6-7,14-15]的临床 NTM 菌种鉴定结果不同。与北京、江苏等地区相比,龙岩市 NTM 菌种分布具有本地区的特点:北京堪萨斯分枝杆菌及偶然分枝杆菌分离率较高,而龙岩市较少见,仅为 4.65%和 2.33%。江苏徐州地区 NTM 除胞内分枝杆菌外,以堪萨斯分枝杆菌、浅黄分枝杆菌及戈登分枝杆菌为主,然而龙岩市浅黄分枝杆菌少见,戈登分枝杆菌未检出。这些研究结果提示,NTM 感染可能与地域环境及感染方式有关。本研究结果表明,中国 NTM 致病菌的种类分布存在明显的地域差异性。本研究结果还显示,女性 NTM 检出率略高于男性,与江苏、重庆等地区^[8,13]报道的男性 NTM 感染率较高不同,与海南地区^[16]报道的 NTM 感染者女性多于男性的报道一致,其原因可能与 NTM 感染在不同人群中有不同的机制和影响因素有关。本研究共检出胞内分枝

杆菌、鸟分枝杆菌、龟或脓肿分枝杆菌、瘰疬分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、海/溃疡分枝杆菌、浅黄分枝杆菌、不产色分枝杆菌、偶然分枝杆菌、金色分枝杆菌共 10 种菌种。

有研究发现,大部分抗结核效果不佳的病例是由 NTM 引起的,其主要原因是由于 NTM 与 MTB 的临床表现、影像学特征及痰涂片等结果都极其类似,容易误诊、误治^[3]。而由不同菌种感染引起的疾病其治疗方案是截然不同的,尤其是由不同的 NTM 引起的 NTM 病,化疗方案的选择和用药时间都各不相同^[17]。目前国内大部分医院并没有开展 NTM 的药敏试验^[5],故在开始治疗结核病前,进行分枝杆菌菌种鉴定是非常有必要的。

本研究采用 DNA 微阵列芯片法鉴定分枝杆菌菌种,此方法与传统细菌培养方法相比,具有快速、准确、标本用量少等优点,可以针对各种临床标本进行检测,6 h 即可鉴定出结果,对快速明确诊断、早期正确治疗起到关键的作用,对临床的早期诊断和治疗具有重要意义。但此检测方法也存在以下不足:首先,此检测方法存在菌量浓度要求在 1×10^3 CFU/mL 及以上的检出限;其次,其仅能检测临床常见的 17 种分枝杆菌;再次,此检测试剂盒仅能鉴定分枝杆菌菌种,不能对 NTM 进行耐药检测。因此,在 MTB 及 NTM 防控中,应加强实验室能力建设,完善检查项目,为临床治疗提供更合理的方案。

综上所述,通过本次研究,基本了解和掌握了龙岩市分枝杆菌感染的菌种特征,可为龙岩市结核病的诊断、治疗及防控策略的制订提供参考依据。但本研究为回顾性分析,标本量不大,仅为对一家医院就诊的疑似结核患者的菌种鉴定结果分析,而并非基于人群的分析,MTB 及 NTM 的检出率可能存在偏倚。

参考文献

[1] 全国第五次结核病流行病学抽样调查技术指导组,全国第五次结核病流行病学抽样调查办公室. 2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告[J]. 中国防痨杂志, 2012,34(8):485-508.

[2] 李燕平,胡职权,郑建莉. 龙岩市 308 株分枝杆菌鉴定及药敏试验结果[J]. 海峡预防医学杂志,2017,23(4):101-103.

[3] 吴志伟,王永珍,杨英姿,等. 非结核分枝杆菌感染占肺结

核治疗效果不佳病例比例的研究[J]. 临床肺科杂志, 2012,17(9):1628-1629.

- [4] 魏彦昌,付玉荣. 非结核分枝杆菌实验室诊断研究进展[J]. 中国病原生物学杂志,2018,13(8):911-913.
- [5] 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):1227-1230.
- [6] 张礼茂,张海晴,贾彤,等. 徐州地区非结核分枝杆菌菌种鉴定、分布趋势及耐药情况研究[J]. 北京医学,2017,39(12):1305-1306.
- [7] 邓建平,王斌,白锐,等. 2011—2018 年四川省自贡市分枝杆菌临床分离株鉴定分析[J]. 疾病监测,2019,34(4):338-343.
- [8] 余旭良,金菊仙,陆军,等. 2013—2016 年衢州市分枝杆菌菌种鉴定和耐药状况分析[J]. 中国卫生检验杂志,2017,27(21):3083-3085.
- [9] 潘建华,石国民,彭雪峰,等. 长沙地区 2012—2017 年非结核分枝杆菌流行状况分析[J]. 国际检验医学杂志,2018,39(20):2496-2498.
- [10] World Health Organization. Global tuberculosis report 2018 [R/OL]. (2018-05-24)[2020-03-11]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
- [11] 万东勇,胡永芳,陈天刚. 影响结核分枝杆菌耐药的临床相关因素分析[J]. 检验医学与临床,2017,14(22):3309-3310.
- [12] 张满娥,黄文滨,卢志华,等. 福建省龙岩市 411 例肺结核患者对利福平和异烟肼耐药状况的研究[J]. 中国防痨杂志,2020,42(1):54-59.
- [13] 罗明,张汇征,李桓,等. 重庆市 2016—2017 年非结核分枝杆菌流行状况分析[J]. 国际检验医学杂志,2019,40(10):1178-1182.
- [14] 贾彤,张海晴,魏素梅. 2013—2018 年徐州市非结核分枝杆菌感染分布和感染危险因素分析[J]. 北京医学,2019,41(10):892-897.
- [15] 张洁,王嫩寒,易俊莉,等. 2016—2017 年北京地区非结核分枝杆菌菌种分布观察[J]. 山东医药,2019,59(12):34-36.
- [16] 钟业腾,林明冠,林翀,等. 海南地区疑似肺结核患者非结核分枝杆菌感染特征[J]. 中国感染控制杂志,2019,18(8):701-707.
- [17] 辛茶香,张周云,熊国亮. 分枝杆菌菌种鉴定方法及其进展[J]. 实验与检验医学,2016,2(1):1-3.

(收稿日期:2020-03-16 修回日期:2020-07-19)