

深圳市临床分枝杆菌菌种鉴定分析*

李爱敏, 李芳芳, 唐曙明[△], 侯 沪

(深圳市人民医院龙华分院, 广东深圳 518000)

摘要:目的 了解深圳地区分枝杆菌的感染、分布状况, 为临床诊断和治疗提供科学依据。方法 采用基因芯片, 对 1 096 例临床疑似标本进行菌种鉴定。结果 基因芯片鉴定结果阳性检出率为 9.40%(103/1 096)。阳性患者中有 87 例为结核分枝杆菌感染, 另有 16 例为非结核分枝杆菌感染, 其中脓肿分枝杆菌 5 例、胞内分枝杆菌 3 例、鸟分枝杆菌 3 例、偶发分枝杆菌 2 例、堪萨斯分枝杆菌 1 例、海分枝杆菌 1 例、戈登分枝杆菌 1 例。结论 深圳地区分枝杆菌感染, 结核分枝杆菌占 84.47%, 为主要发病类型; 非结核分枝杆菌分离率比例已达到 15.53%, 其感染菌株包括 7 个种类, 因此开展分枝杆菌菌种鉴定, 明确病因, 对实现个体化治疗有着重要意义。

关键词:分枝杆菌; 菌种鉴定; 基因芯片**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2014.18.037**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2014)18-2510-02

Identification and analysis of mycobacterium isolated from clinical samples in ShenZhen*

Li Aimin, Li Fangfang, Tang Shuming[△], Hou Hu

(Longhua Branch of Shenzhen People's Hospital, ShenZhen, Guangdong 518000, China)

Abstract:Objective To investigate the status and species of mycobacterial infections in Shenzhen for clinical diagnosis and treatment to provide a reliable scientific basis. **Methods** 1 096 of samples from patients with suspicious were detection by gene chip. **Results** Positive rate of microarray detection mycobacterium was 9.40%(103/1 096). 103 cases of positive were 87 mycobacteria by gene chip, and 16 cases of non-tuberculosis(5 cases of M. abscessus, 3 cases of M. intracellulare, 3 cases of M. avium, 2 cases of M. fortuitum, 1 cases of M. kansas, 1 case of M. marinum, 1 case of M. gordonae. **Conclusion** The mycobacterial infections in Shenzhen, tuberculosis infection as the main disease types(84.47%). Non-tuberculous mycobacteria's isolation ratio has reached 15.53%, including 7 kinds of species infection and one case of mixed infections. Identification of Mycobacterium by genechip have great significances for individualized treatment.

Key words: Mycobacterium; species identification; microarray

近年来,我国分枝杆菌疫情不断升高,尤以非结核分枝杆菌的上升趋势最为显著。2010 年第五次全国结核病流行病学抽样调查结果显示:非结核分枝杆菌在分枝杆菌分离菌株中占比高达 22.9%相比 1990 年的 4.9%^[1],增长率超过了 360%。非结核分枝杆菌感染导致的肺疾病和结核病有着相似的临床表现,非结核分枝杆菌对大多数抗结核药物耐药,如作为结核误治,疗效不佳,其耐药率为 95.9%;耐多药率为 83.7%。不仅如此,不同的菌株间的药物敏感性也有明显差异。因此,及时、准确地鉴定分枝杆菌菌种对于分枝杆菌感染引起的疾病的诊断、控制和治疗具有重要的意义。本项目通过基因芯片技术对深圳地区临床疑似分枝杆菌感染患者进行菌种鉴定,以了解该地区分枝杆菌的感染和分布情况,对个体化治疗提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 标本来源 1 096 例分枝杆菌临床分离株和痰标本来自本院 2010 年 10 月至 2013 年 10 月门诊和住院患者。

1.2 仪器与试剂 PCR 仪购自珠海黑马公司;电泳仪购自北京六一仪器厂;核酸/蛋白凝胶图像管理系统,型号为 GSG-2000;分子杂交箱购自韩国 FINE PCR 公司。试剂 分枝杆菌

菌种鉴定采用亚能生物技术(深圳)有限公司研制的分枝杆菌菌种鉴定基因检测试剂盒。

1.3 方法

1.3.1 菌种鉴定基因检测 (1)提取样本 DNA:收集临床痰样,加入等量的化痰试剂,充分振荡直至痰液完全液化。取 1.2 mL 痰样消化液到 1.5 mL 离心管中,12 000 r/min,离心 5 min,弃上清,留沉淀备用。向沉淀中加入 1 mL 结核分枝杆菌洗液,混匀,12 000 r/min 离心 2 min,弃上清。向沉淀中加入 50 L 结核分枝杆菌裂解液,充分混匀,沸水浴 10 min,12 000 r/min,离心 2 min,留上清液。(2)PCR 扩增:取出 PCR 反应管,加入已提取的待测样品 DNA 4 L。同时取两管 PCR 反应管分别加入 4 L 结核分枝杆菌阳性质控品和结核分枝杆菌阴性质控品,作为产品使用过程的质量控制。(3)杂交:取 15 mL 塑料离心管,放入标有患者编号的膜条,加入杂交液 5~6 mL 及所有(25 L)PCR 产物后沸水浴 10 min,再放入杂交箱 57 ℃ 杂交 1.5 h;阳性质控品和阴性质控品同步处理。同时将 B 液在杂交箱中预热至 57 ℃ 待用。(4)洗膜:取出膜条,移至预热至 57 ℃ 的 B 液中洗膜 15 min。(5)显色:室温轻摇孵育 30 min,然后用杂交液洗两次,每次 5 min,同时配制显色液。将

* 基金项目:深圳市科技局资助项目(201102151)。 作者简介:李爱敏,女,主管检验技师,主要从事临床检验、分子生物检测工作。

[△] 通讯作者, E-mail: tangshuming@126.com。

膜条浸泡于显色液中避光显色 10~15 min 即可观察结果。

1.3.2 测序分析 经芯片鉴定为非结核分枝杆菌的临床分离株进一步送上海英骏生物技术有限公司进行测序,以检测 PCR 扩增的特异性和芯片鉴定结果的准确性。

2 结 果

2.1 基因芯片的鉴定结果 从 1 096 例临床疑似非结核患者的痰液样本中分离得到 103 株分枝杆菌,阳性率为 9.40%(103/1 096),其中结核分枝杆菌,占 84.47%(87/103);非结核分枝杆菌占 15.53(16/103)。

2.2 病原菌分布 分离出的 16 株非结核分枝杆菌菌,均为单一感染,具体分布见表 1。

表 1 16 株非结核分枝杆菌菌分布情况		
菌种名称	n	构成比(%)
脓肿分枝杆菌	5	31.3
胞内分枝杆菌	3	18.8
鸟分枝杆	3	18.8
偶发分枝杆菌	2	12.5
堪萨斯分枝杆菌	1	6.2
海分枝杆菌	1	6.2
戈登分枝杆菌	1	6.2

2.3 测序结果 根据芯片鉴定结果,将 16 株非结核分枝杆菌和随机挑选的 20 株结核分枝杆菌复合群进行 DNA 测序。测序结果与基因库中已报道的序列进行对照分析,芯片鉴定结果和测序结果完全一致。鉴定出的非结核分枝杆菌测序结果见附图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

3 讨 论

分枝杆菌属除结核分枝杆菌复合群(包括结核分枝杆菌、牛分枝杆菌、非洲分枝杆菌、田鼠分枝杆菌)和麻风分枝杆菌外统称非结核分枝杆菌。非结核分枝杆菌引起的疾病称为非结核分枝杆菌病,可累及淋巴结、皮肤、软组织和肺。非结核分枝杆菌在世界上报道的有 150 多种,其中命名了 54 种,有致病性的分枝杆菌有 37 种,中国境内分离出了 20 多种。

非结核分枝杆菌引起的感染日益增多,特别是由其引发的医院感染出现频率逐渐增高已越来越受到人们的关注^[2]。非结核分枝杆菌肺病在临床症状常与肺结核相似,但其中绝大多数对抗结核药物并不敏感,往往导致治疗失败^[3]。传统的分枝杆菌菌种鉴定方法是以结核菌的培养为基础,还要进行复杂的后续过程,耗时长,步骤繁琐,而且无法区分结核与非结核^[4-5],如果在这段时间可能因为用药不当或误诊而引起病情加重。因此,需要在治疗前进行菌种鉴定。

本研究以测序作对照,采用亚能生物技术(深圳)有限公司研发的分枝杆菌菌种鉴定试剂盒(基因芯片技术)对临床收集的 1 096 例痰液样本进行鉴定,结果得到 16 株非结核分枝杆菌和 87 株结核菌。将鉴定出的 16 株非结核分枝杆菌和随机

挑选的 20 株结核菌进行 DNA 测序,测序结果与芯片鉴定结果完全一致。

实验数据显示,在深圳龙华地区,分枝杆菌发病阳性率为 9.40%(103/1096),其中结核病占 84.47%(87/103);非结核分枝杆菌病占 15.53%(16/103)。鉴定出的 16 株非结核分枝杆菌中,脓肿分枝杆菌占 31.3%(5/16);胞内和鸟分枝杆菌均占 18.8%(3/16);偶发分枝杆菌占 12.5%(2/16);堪萨斯分枝杆菌、海分枝杆菌、戈登分枝杆菌均为 1 例。从非结核分枝杆菌的分部情况来看,该地区非结核分枝杆菌病患者中脓肿、胞内、鸟、偶发分枝杆菌感染发病率较高,应引起重视。有研究表明,深圳地区,居民区生活污水非结核分枝杆菌,阳性率达到 55%,有 6 种菌株分布在污水中,特别是分离到 1 株日内瓦分枝杆菌。这种菌能引起弥散感染合并 AIDS 有较高的病死率^[6]。本研究中所用到的分枝杆菌菌种鉴定芯片中未包含日内瓦分枝杆菌检测的探针,但添加该检测探针必要性,有待进一步研究证明。

基因芯片是采用 PCR 扩增和核酸分子杂交技术相结合的分子诊断方法^[7],具有高通量能同时检测临床上常见的具有致病性的分枝杆菌种或群,可直接利用痰液样本进行检测,检测过程简便、快速,并有着很高的检测灵敏度和特异性^[8]。检测结果用肉眼即可直接观测,无需特殊仪器设备,非常适于在综合医院、专科医院和研究机构广泛开展。

参考文献

[1] 王黎霞,成诗明,陈明亭,等. 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] Somoskovi A, Mester J, Hale YM, et al. Laboratory diagnosis of nontuberculous mycobacteria[J]. Clin Chest Med, 2002, 23(3): 585.

[3] 薛义庆,高彩霞,孔庆国. 非结核分枝杆菌对四种常用抗结核药的药敏观察[J]. 新疆医学,2004,34(3):46-47.

[4] Sumi S, Radhakrishnan VV. Diagnostic significance of humoral immune responses to recombinant antigens of Mycobacterium tuberculosis in patients with pleural tuberrculosis[J]. J Clin Lab Anal, 2010, 24(5):283-288.

[5] Wu XE, Yang YR, Zhang JX, et al. Comparison of antibody responses to Seventeen antigens from Mycobacterium tuberculosis [J]. Clin Chim Acta, 2010, 411(19/20):1520-1528.

[6] 林世平,杨应周,谭卫国,等. 深圳地区生态环境中非结核分枝杆菌分布状况调查[J]. 中华流行病学杂志,2007,28(5):430-432.

[7] 张翔,卢建平,叶森. 四种结核分枝杆菌检测方法的临床应用评价[J]. 中国防痨杂志,2006,28(1):14-17.

[8] 张俊仙,吴雪琼,邢婉丽,等. 应用 DNA 微阵列技术快速鉴定分枝杆菌菌种[J]. 中国防痨杂志,2007,29(1):1-7.

(收稿日期:2014-03-25)