

[8] 戴林峰,王醒. 脓毒症与凝血功能异常[J]. 东南大学学报:医学版,2012,31(3):359-362.

[9] 刘伟,初晶学. 凝血功能检测在脑出血患者预后评估中的应用价值[J]. 中国临床保健杂志,2016,19(1):61-63.

[10] 张洁. 老年社区获得性肺炎与 D-二聚体,纤维蛋白原的相关性[J]. 实用老年医学,2015,29(11):923-925.

[11] YI YA MA-DA, YAMADA G, OTSUKA M, et al. Volatile organic compounds in exhaled breath of idiopathic pulmonary fibrosis for discrimination from healthy subjects[J]. Lung,2017,195(2):247-254.

[12] 张学林,王震,吕淑慧,等. C 反应蛋白、降钙素原、D-二聚体在社区获得性肺炎的临床意义[J]. 海南医学院学报,2016,22(15):1640-1642.

[13] HEVRONI A, GOLDMAN A, SPRINGER C. Infant pulmonary function testing in chronic pneumonitis of infancy due to surfactant protein C mutation[J]. Pediatr Pul-

monol,2015,50(6):17-23.

[14] RAMOS-SEVILLANO E, URZAINQUI A, CAMPUZANO S A, et al. Pleiotropic effects of cell wall amidase LytA on streptococcus pneumoniae sensitivity to the host immune response [J]. Infect Immun, 2015, 83 (2): 591-603.

[15] RODELO J R, DE LA ROSA G, VALENCIA M L, et al. D-dimer is a significant prognostic factor in patients with suspected infection and sepsis [J]. Am J Emerg Med, 2012,30(9):1991-1999.

[16] 郑文枝,黄宏佳. 血清 hs-CRP, cTnI 和 D-D 水平在早期诊断 CAP 患者中的价值[J]. 中国实用医药,2017,12(22):77-78.

(收稿日期:2018-08-16 修回日期:2018-11-24)

• 短篇论著 •

苏州地区非结核分枝杆菌的菌种鉴定和药敏相关性分析*

宋华峰^{1,2}, 李声竹³, 赵静^{1,2}, 陈兴年², 唐佩军², 胥萍^{1,2}

(1. 苏州市第五人民医院检验中心, 江苏苏州 2150072; 2. 苏州市结核病防治重点实验室, 江苏苏州 2150073; 3. 苏州大学医学部, 江苏苏州 215007)

摘要:目的 分析苏州地区非结核分枝杆菌(NTM)的菌种鉴定组成结构以及耐药情况。方法 药敏试验采用改良的罗氏培养比例法。采用基因芯片对非结核分枝杆菌进行菌种鉴定。结果 苏州地区的非结核分枝杆菌共鉴定出 6 种,其中包括:胞内分枝杆菌 73 株(57.2%),堪萨斯分枝杆菌 32 株(25%),龟/脓肿分枝杆菌 15 株(11.7%),鸟分枝杆菌 6 株(4.7%),草分枝杆菌 1 株(0.7%),偶然分枝杆菌 1 株(0.7%)。NTM 对抗结核一线药物的链霉素和异烟肼的耐药率最高,分别为 95.3%和 98.4%。其次对利福平和乙胺丁醇的耐药率分别为 72.7%与 28.9%。对与二线药物对氨基水杨酸与阿米卡星的耐药率最高,分别是 99.1%和 90.2%。其次对左氧氟沙星和丙硫异烟胺的耐药率为 76.5%与 18.6%。结论 苏州地区的 NTM 以胞内分枝杆菌为主,且不同的 NTM 之间对于药物的耐药情况存在差异,准确进行菌种鉴定,有利于患者的精准治疗。

关键词:非结核分枝杆菌; 菌种鉴定; 耐药

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.04.030

文章编号:1673-4130(2019)04-0494-04

中图法分类号:R446.5

文献标识码:B

非结核分枝杆菌(NTM),是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。NTM 主要是来自水源和土壤中,NTM 的感染通常是不具有传染性的,尽管有一些案例记录了人与人之间的相互传染。NTM 的菌种组成很广泛,目前已经被鉴别出来的已经有大约 186 种,其中的绝大多数对人体健康没有危害^[1-2]。NTM 可侵犯肺部、浅表淋巴结、皮肤软组织,甚至播散全身,其中以 NTM 肺病最为常见。近年来,NTM 感染的报道在全世界范围内增加,并引

起越来越多的关注。

NTM 的感染发生率和菌种分布情况存在明显的地域差异,且 NTM 具有相当高的天然耐药性。NTM 病的治疗效果和成功率在很大程度上取决于菌种,不同的 NTM 菌种耐药情况不同,治疗方案也大相径庭。由于不当的治疗和较高的治疗失败风险,使得 NTM 感染俨然已经成为临床研究的重要课题^[3]。本研究对苏州市第五人民医院的临床资料进行统计分析,旨在了解 NTM 在苏州地区的菌种分布和耐药情

* 基金项目:江苏省科技项目(BK20161230);苏州市青年科技项目(JKWX2016041)。

本文引用格式:宋华峰,李声竹,赵静,等.苏州地区非结核分枝杆菌的菌种鉴定和药敏相关性分析[J].国际检验医学杂志,2019,40(4):

况,并作临床相关性分析,为临床一线治疗 NTM 病提供更有针对性的参考数据。

1 材料与方 法

1.1 样本来源 2015—2017 年苏州市第五人民医院收集的临床患者标本(包括痰、肺泡灌洗液、尿液等),经分枝杆菌培养和对硝基苯甲酸(PNB)选择性培养基确定为 NTM 的标本。共收集了 128 例进行过菌种鉴定的样本信息,其中 128 例进行过一线药敏实验,102 例进行过二线药敏实验。128 例标本来源主要包括:痰标本 103 例、肺泡灌洗液 15 例、尿液 1 例以及苏州本地县级市外送菌株标本 9 例。128 例标本科室分布主要包括:肺科门诊来源的 46 例、肺科病房 75 例以及其他病区 7 例。

1.2 仪器与试剂 BACTEC MGIT 960 分枝杆菌分析系统以及配套的 MGIL 培养管(USA, BD 公司);核酸快速提取仪 Extractor36(北京博奥生物集团有限公司),LUXScan10K-B 微阵列芯片扫描仪(北京博奥生物集团有限公司),PCR 扩增仪(杭州博日科技有限公司),博奥基因芯片试剂盒(北京博奥生物集团有限公司),Biomixer II 芯片杂交仪(北京博奥生物集团有限公司),SlideWasher 8 芯片洗干仪(北京博奥生物集团有限公司)。

1.3 实验方 法

1.3.1 分枝杆菌培养及药敏 分枝杆菌培养采用 BACT EC MGIT 960 系统,药敏试验采用改良的罗氏培养法;结核分枝杆菌复合菌与 NTM 分群主要通过 对硝基苯甲酸(PNB)生长试验以及观察菌株的菌落形态、颜色等生物特征进行区分,所有步骤严格按照结核病诊断实验室检验规程执行^[4]。

1.3.2 菌种鉴定 (1)提取样本 DNA:在核酸提取管中加入 50 μ L 的分枝杆菌核酸提取液,用接种环刮取适量的菌落放入提取管中,高速振荡 15 min 后放入恒温金属浴 95 $^{\circ}$ C 加热 15 min。加热结束后,将核酸提取管 12 000 r/min 离心 1 min,得到的核酸于 -20 $^{\circ}$ C 低温保存备用。(2)PCR 扩增:根据样品数目,在 PCR 反应板中先后加入 18 μ L PCR 扩增试剂和 2 μ L 模板 DNA 或阴、阳性对照品。每份 PCR 反应体系的总体积为 20 μ L。(3)杂交:将 9 μ L 杂交缓冲液和 6 μ L PCR 产物混合,配制成杂交混合物。杂交混合物 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min 后冰浴 3 min。在对应的芯片点阵中加入 13.5 μ L 杂交混合物,盖好杂交盒后密封。杂交盒置于杂交仪中 50 $^{\circ}$ C 温育 120 min;杂交反应结束后,将芯片取出并用芯片洗涤液进行洗涤,甩干然后扫描。

2 结 果

2.1 基因芯片菌种鉴定结果 经分枝杆菌培养和药敏试验初筛的 128 株 NTM,经过基因芯片分枝杆菌

鉴定后菌种分布达 6 个种。其中分离率最高的是胞内分枝杆菌 57.2%(73/128),其次是堪萨斯分枝杆菌 25.0%(32/128),其余龟/脓肿分枝杆菌 11.7%(15/128)、鸟分枝杆菌 4.7%(6/128)、偶然分枝杆菌 0.7%(1/128)、草分枝杆菌 0.7%(1/128)等分离率较低。具体菌种鉴定结果见表 1。

表 1 128 株 NTM 菌种分布情况

菌种名称	n	百分比(%)
胞内分枝杆菌	73	57.2
堪萨斯分枝杆菌	32	25.0
龟/脓肿分枝杆菌	15	11.7
鸟分枝杆菌	6	4.7
草分枝杆菌	1	0.7
偶然分枝杆菌	1	0.7
合计	128	100.0

2.2 NTM 药敏结果 由于部分患者只做一线抗结核药的药敏试验,故部分 NTM 菌株耐药资料不完整。本课题组共收集了 128 株 NTM 菌株对 4 种一线抗结核药(异烟肼、链霉素、利福平、乙胺丁醇)耐药情况,以及 102 株 NTM 菌株对 4 种二线抗结核药(左氧氟沙星、对氨基水杨酸、丙硫异烟胺、阿米卡星)耐药情况。对于一线药物,NTM 对异烟肼和链霉素的耐药率最高,分别到达了 98.4%和 95.3%。其次是利福平的耐药率为 72.7%,乙胺丁醇的耐药率最低为 28.9%。对于二线药物,NTM 对对氨基水杨酸和阿米卡星的耐药率最高,分别为 99.1%和 90.2%,其次是左氧氟沙星的耐药率为 76.5%,丙硫异烟胺的耐药率最低为 18.6%。总体耐药情况见表 2。

表 2 NTM 总体药敏情况

药物名称	耐药菌株数(n)	实验菌株数(n)	百分比(%)
链霉素	122	128	95.3
异烟肼	126	128	98.4
利福平	93	128	72.7
乙胺丁醇	37	128	28.9
左氧氟沙星	78	102	76.5
对氨基水杨酸	101	102	99.1
丙硫异烟胺	19	102	18.6
阿米卡星	92	102	90.2

2.3 各 NTM 菌种一线药物的耐药结果 分析结果显示,胞内分枝杆菌对链霉素、异烟肼以及利福平耐药率分别为 97.3%、98.6%、91.8%,耐药率均大于 90%,而对乙胺丁醇则较为敏感,药物耐药率仅为 21.9%。堪萨斯分枝杆菌对链霉素和异烟肼的耐药率比较高,分别为 90.6%和 96.8%。而对利福平和

乙胺丁醇有较为敏感,耐药率为 12.5%和 9.4%;龟/脓肿分枝杆菌对 4 种一线抗结核药物耐药率均为 100%;鸟分枝杆菌对链霉素和异烟肼具有 100%的耐药性,对利福平和乙胺丁醇的耐药率分别为 83.3%与 33.3%。具体的一线抗结核药耐药情况见表 3。

表 3 NTM 的一线药物耐药情况[n(%)]

菌种名称	n	链霉素	异烟肼	利福平	乙胺丁醇
胞内分枝杆菌	73	71(97.3)	72(98.6)	67(91.8)	16(21.9)
堪萨斯分枝杆菌	32	29(90.6)	31(96.8)	4(12.5)	3(9.4)
龟/脓肿分枝杆菌	15	15(100.0)	15(100.0)	15(100.0)	15(100.0)
鸟分枝杆菌	6	6(100.0)	6(100.0)	5(83.3)	2(33.3)
草分枝杆菌	1	0(0.0)	1(100.0)	1(100.0)	0(0.0)
偶然分枝杆菌	1	1(100.0)	1(100.0)	1(100.0)	1(100.0)

2.4 各 NTM 菌种二线药物的耐药结果 分析结果显示,胞内分枝杆菌对左氧氟沙星、对氨基水杨酸以及阿米卡星的耐药率很高,分别为 96.5%、100%、96.5%,耐药率均大于 95%,而对丙硫异烟胺则较为敏感,药物耐药率仅为 8.8%。堪萨斯分枝杆菌对对氨基水杨酸 100%耐药,但对丙硫异烟胺 100%敏感。其对阿米卡星和左氧氟沙星的耐药率较低,分别为 69.2%和 19.2%。龟/脓肿分枝杆菌对 4 种二线抗结核药物耐药率均为 100%;鸟分枝杆菌对阿米卡星具有 100%的耐药性,对左氧氟沙星和对氨基水杨酸的耐药率都为 80%,而对丙硫异烟胺耐药率仅为 20%。偶然分枝杆菌丙硫异烟胺敏感,对其他三种药物均耐药。对具体的二线抗结核药耐药情况见表 4。

表 4 NTM 的二线药物耐药情况[n(%)]

菌种名称	n	左氧氟沙星	对氨基水杨酸	丙硫异烟胺	阿米卡星
胞内分枝杆菌	57	55(96.5)	57(100.0)	5(8.8)	55(96.5)
堪萨斯分枝杆菌	26	5(19.2)	26(100.0)	0(0.0)	18(69.2)
龟/脓肿分枝杆菌	13	13(100.0)	13(100.0)	13(100.0)	13(100.0)
鸟分枝杆菌	5	4(80.0)	4(80.0)	1(20.0)	5(100.0)
偶然分枝杆菌	1	1(100.0)	1(100.0)	0(0.0)	1(100.0)

3 讨 论

近年来,结核病疫情逐渐得到控制,NTM 的分离率却呈增高趋势,由 NTM 引起的肺病已经在全球范围内得到越来越多的关注。一些研究表明 NTM 的发病率正在逐步增加,MORIMOTO 等^[5]估计,由 NTM 感染导致的肺部疾病的流行率为 35~65/100 000 人。由于不当的治疗和较高的治疗失败风险,NTM 肺病的病死率高达 30%^[6],NTM 感染所带来的挑战越来越严峻。

NTM 的感染发生率和菌种分布情况存在明显的

地域差异,并且与气候因素有关。现有的流行病学资料显示,我国 NTM 感染呈现南方多于北方、沿海地区多于内陆地区、气候温和地区多于气候寒冷地区的特点^[7]。本课题组共鉴定出 6 种 NTM,依次为胞内分枝杆菌 57.2%、堪萨斯分枝杆菌 25%、龟/脓肿分枝杆菌 11.7%、鸟分枝杆菌 4.7%、偶然分枝杆菌 0.7%、草分枝杆菌 0.7%。YAN 等^[8]对江苏省 NTM 的流行病学和地理学分布也进行过研究,该研究显示 NTM 中胞内分枝杆菌(68.33%)是主要菌种,均匀分布在江苏省范围内,龟/脓肿分枝杆菌(13.33%)以及堪萨斯分枝杆菌(6.67%)的分布仅限于江苏省部分城市,在苏州并没有分布。本研究结果与 YAN 等^[8]的分析相比较,胞内分枝杆菌均为主要的分离株,两者相一致。另外,YAN 等^[8]的研究中在苏州地区没有龟/脓肿分枝杆菌以及堪萨斯分枝杆菌分布,本研究证实在苏州地区确实存在,并且占有一定比例,龟/脓肿分枝杆菌百分比 11.7%接近全省平均水平 13.33%,而堪萨斯分枝杆菌的占比为 25%,远高于全省平均水平 6.67%;同时,本研究还发现了鸟分枝杆菌(1.4%)、偶然分枝杆菌(1.4%)、草分枝杆菌(1.4%)等三种较少见的菌种,补充了江苏省 NTM 流行病学资料,但由于标本量过少,数据缺乏代表性,有待继续收集相关资料再做具体讨论。

NTM 对常规抗痨药物耐药率相当高,本研究显示,NTM 对链霉素、异烟肼、对氨基水杨酸以及阿米卡星呈现高度的天然耐药性,耐药率分别高达 95.3%、98.4%、99.1%、90.2%;其余药物依次为利福平 72.7%、左氧氟沙星 76.5%、乙胺丁醇 28.9%、丙硫异烟胺 18.6%;由此可见乙胺丁醇和丙硫异烟胺对 NTM 有较强的抗菌效果。与刘一典^[9]等人的报道相比较,两项研究中 NTM 耐药率均处于较高水平。其研究中耐药率最高的异烟肼耐药率为 97.6%,本研究中的耐药率为 98.4%,结果基本一致。另外其研究中链霉素、阿米卡星、左氧氟沙星、利福平、乙胺丁醇的耐药率都较高,而本研究中上述后两种药耐药率较低;差异较大的是乙胺丁醇的耐药情况,本研究中乙胺丁醇药物耐药率为 28.9%,而报道显示乙胺丁醇耐药率高达 86.5%。造成这一差异的原因,可能是两者之间菌株不同,或者是药敏实验操作不同。NTM 其广谱耐药的原因与 NTM 细胞表面的疏水性及细胞壁通透屏障相关,因此有学者主张治疗 NTM 时可以将常规药物与破坏细胞壁的药物或作用机制不同的其他药物联合使用^[10]。

NTM 种类很多,不同的菌种之间的耐药性也存在差异。既往研究显示,胞内分枝杆菌对标准抗结核浓度的异烟肼、利福平、乙胺丁醇、链霉素等一线药物全部耐药^[11]。本研究中胞内分枝杆菌对链霉素、异烟

胍、利福平呈现出高度耐药,耐药率均大于 90%,而对乙胺丁醇则较为敏感。前三种药物的结果与金法祥等^[12]的研究相一致,而乙胺丁醇的耐药率与许蕴怡等^[13]的研究相一致。在二线药物中,除了对丙硫异烟胺较敏感外,其余药物都是高度耐药。堪萨斯分枝杆菌的耐药则与胞内不同,其对链霉素、异烟肼、对氨基水杨酸这三种药物表现出高度耐药,而对其他药物比较敏感。也有研究结果表明,大部分堪萨斯分枝杆菌对利福平敏感,对异烟肼、乙胺丁醇、链霉素等其余三个一线药中度敏感^[14]。龟-脓肿分枝杆菌群包括龟分枝杆菌、脓肿分枝杆菌、致免疫分枝杆菌等 3 个菌种。脓肿分枝杆菌可引起皮肤、肺部等的感染,一般认为脓肿分枝杆菌肺病发病率较低,但 GRIFFITH 等^[15]报道的 153 例快速生长型非结核分枝杆菌肺病中,有 80% 为脓肿分枝杆菌感染所致。脓肿分枝杆菌感染治疗效果不佳且成功率低,一直是临床难题。本研究中龟/脓肿分枝杆菌对 8 种测试药物的耐药率均为 100%,表现出高度的耐药性。与既往研究结果吻合^[15]。

NTM 病治疗效果和成功率因 NTM 菌种而异。本研究表明苏州地区流行的 NTM 主要为胞内分枝杆菌。NTM 对于多种药物具有高耐药率,并且不同的 NTM 的耐药情况存在差异。所以 NTM 的治疗效果很大程度上取决于机体所感染的细菌的种类及耐药性。及时对 NTM 肺病患者进行菌种鉴定及药物敏感性试验,能够有效改善患者的治疗效果,并且降低患者的身体负担和经济压力。

参考文献

- [1] BRYANT J M, GROGONO D M, RODRIGUEZCON D, et al. Emergence and spread of a human-transmissible multidrug-resistant nontuberculous mycobacterium [J]. *Science*, 2016, 354(6313): 751-757.
- [2] DONOHUE M J. Increasing nontuberculous mycobacteria reporting rates and species diversity identified in clinical laboratory reports[J]. *BMC Infect Dis*, 2018, 18(1): 163.
- [3] HOEFSLOOT W, VAN INGEN J, ANDREJAK C, et al. The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples An NTM-NET collaborative study[J]. *Eur Res J*, 2013, 42(6): 1604-1613.
- [4] 中国防痨协会基础专业委员会. 结核病诊断实验室检验规程[M]. 北京: 中国教育文化出版社, 2006: 53-55.
- [5] MORIMOTO K, IWAI K, UCHIMURA K, et al. A steady increase in nontuberculous mycobacteriosis mortality and estimated prevalence in Japan[J]. *Ann Am Thorac Soc*, 2014, 11(1): 1-8.
- [6] ITO Y, HIRAI T, MAEKAWA K, et al. Predictors of 5-year mortality in pulmonary Mycobacterium avium-intracellulare complex disease[J]. *Inter J Tuber Lung Dis*, 2012, 16(3): 408-414.
- [7] 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[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2012, 35(8): 572-580.
- [8] SHAO YAN, CHEN CHENG, SONG HONG-HUAN, et al. The epidemiology and geographic distribution of nontuberculous mycobacteria clinical isolates from sputum samples in the eastern region of China[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2015, 9(3): 3623.
- [9] 刘一典, 郝晓晖, 唐神结, 等. 非结核分枝杆菌 170 株耐药情况分析[J]. *中华临床医师杂志*, 2012, 6(19): 6018-6020.
- [10] 周伟杰, 王文, 刘同杰. 5 937 例结核病患者非结核分枝杆菌感染及其对抗结核药物耐药情况分析[J]. *山东医药*, 2016, 56(12): 72-73.
- [11] THOMSON R M. ntm working group at queensland tb control centre and queensland mycobacterial reference laboratory[J]. *Changing epidemiology of pulmonary nontuberculous mycobacteria infections*[J]. *Emerg Infect Dis*, 2010, 16(10): 1576-1583.
- [12] 金法祥, 汤佳良, 孙小军, 等. 绍兴市 60 株非结核分枝杆菌的耐药性检测[J]. *中国抗感染化疗杂志*, 2004, 4(5): 300-302.
- [13] 许蕴怡, 李冰, 谭耀驹, 等. 广州地区临床分离非结核分枝杆菌菌种鉴定及耐药结果分析[J]. *广东医学*, 2011, 32(3): 334-336.
- [14] SANTOS A, CREMADES R, RODRIGUEZ J C, et al. Activity of various drugs alone or in combination against Mycobacterium fortuitum[J]. *J Inf Chem*, 2010, 16(1): 64-67.
- [15] GRIFFITH D E, AKSAMIT T, BROWN E, et al. An Official ATS/IDSAS statement: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Nontuberculous mycobacterial Diseases[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, 175(6): 367-416.

(收稿日期: 2018-08-25 修回日期: 2018-11-11)