

• 论 著 •

2019 年北京地区某医院非结核分枝杆菌菌种鉴定结果分析

刘鑫梦,黎斌斌,王春雷,范艳艳,邹晓辉,熊祝嘉,赵建康,张玉林,
李海波,夏雨頔,韩嘉静,叶雨菲,祝 越,鲁炳怀[△]

(中日友好医院呼吸与危重症医学科二部临床微生物与感染实验室,北京 100029)

摘 要:目的 研究该院 2019 年收治人群检出非结核分枝杆菌(NTM)菌种分布情况,以指导临床诊断。
方法 收集该院 2019 年咳出痰、肺泡灌洗液等样本分离出来的 NTM,菌种鉴定统一采用 16S rRNA 和 hsp65 基因片段测序。同时,收集患者 γ -干扰素释放试验(IGRA)结果,对 IGRA 在不同 NTM 感染中的水平变化进行分析。
结果 研究期间检出 NTM 样本 183 份,同一患者多次检出同一种 NTM 按 1 份统计。患者中男性 47.0%(86/183),女性 53.0%(97/183);青年组(20~<45 岁)19 人,中年组(45~<65 岁)67 人,老年组($\geq$ 65 岁)97 人;菌种鉴定结果显示共检出 17 种 NTM,菌种分布构成比前 4 位为胞内分枝杆菌 54.6%(100/183)、脓肿分枝杆菌 12.0%(22/183)、鸟分枝杆菌 9.3%(17/183)、堪萨斯分枝杆菌 4.4%(8/183)。老年组检出 NTM 97 人(53.0%),其中男性占 43.3%,女性占 56.7%。183 人中有 120 人进行 IGRA 检测,阳性率 27.5%(33/120)。快生长分枝杆菌组与慢生长分枝杆菌组的 IGRA 结果阴、阳性比较,差异无统计学意义($\chi^2=0.252, P=0.616$)。
结论 NTM 所致感染中,以胞内分枝杆菌、脓肿分枝杆菌为主要致病菌,尤其好发于年龄大于或等于 65 岁的老年人,IGRA 检测结果对于 NTM 感染无明确诊断价值。

关键词:分枝杆菌; 非结核; γ -干扰素释放试验
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.08.016 **中图法分类号:**R446.5
文章编号:1673-4130(2020)08-0960-04 **文献标识码:**A

Analysis on non-tuberculous mycobacteria identification in a general hospital in Beijing during 2019

LIU Xinmeng, LI Binbin, WANG Chunlei, FAN Yanyan, ZOU Xiaohui, XIONG Zhujia,
ZHAO Jiankang, ZHANG Yulin, LI Haibo, XIA Yudi, HAN Jiajing, YE Yufei,
ZHU Yue, LU Binghuai[△]

(Laboratory of Clinical Microbiology and Infectious Disease, Second Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China)

Abstract: **Objective** To analyze the distribution of non-tuberculous mycobacteria (NTM) strains detected in a hospital during 2019, so as to guide clinical practice. **Methods** NTM isolates were collected from sputum, bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and other samples in a hospital during 2019, which were identified to the species level by 16S rRNA and hsp65 gene sequencing. At the same time, the results of interferon- γ release assays (IGRA) were also collected to analyze the changes of IGRA in different NTM infections. **Results** The data of 183 NTM samples were collected. Only one isolate was chosen for further study if more isolates have the same identification results in a patient. Among the patients, males were 47.0% (86/183) and females were 53.0% (97/183). There were 19 people in the youth group (20- <45 years old), 67 people in the middle age group (45- <65 years old), and 97 people in the old age group ($\geq$ 65 years old). Furthermore, 17 NTM species were identified and the top of 4 species included isolates of *Mycobacterium intracellulare* [54.6% (100/183)], *Mycobacterium abscess* [12.0% (22/183)], *Mycobacterium avium* [9.3% (17/183)] and *Mycobacterium kansasii* [4.4% (8/183)]. There were 97 NTM patients (53.0%) in the elderly group, of whom 43.3% were males and 56.7% were females. Moreover, IGRA test was performed on 120 of 183 patients, with a positive rate of 27.5% (33/120). There was no significant differences in IGRA results between the fast-growing *Mycobacterium* group and the slow-growing *Mycobacterium* group ($\chi^2=0.252, P=0.616$). **Conclusion** In the infections

作者简介:刘鑫梦,女,技师,主要从事临床微生物检验的相关研究。 [△] 通信作者, E-mail: zs25041@126.com。

本文引用格式:刘鑫梦,黎斌斌,王春雷,等. 2019 年北京地区某医院非结核分枝杆菌菌种鉴定结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(8): 960-963.

caused by NTM, *Mycobacterium intracellulare* and *Mycobacterium abscessus* are the main pathogenic bacteria, especially in elderly people older than or equal to 65 years. IGRA results have no clear diagnostic value for NTM infection.

Key words: *Mycobacterium*; non-tuberculous; interferon- γ release assays

非结核分枝杆菌(NTM)病是指由 NTM 所引起的疾病,易继发于各类慢性肺病如慢性阻塞性肺疾病、支气管扩张、尘肺和肺结核等,是人类免疫力低下时的常见并发症,如人类免疫缺陷病毒(HIV)感染者或长期使用免疫抑制剂者^[1]。也是某些医院不严格执行消毒隔离制度,引起院内感染暴发流行的常见病原菌。本研究对 2019 年某综合医院临床微生物与感染实验室分枝杆菌培养阳性并鉴定为 NTM 的登记资料进行回顾性分析,旨在提高 NTM 病的诊疗水平,为相关科室 NTM 病的诊疗提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 标本来源 收集 2019 年本院临床微生物与感染实验室分枝杆菌培养阳性并鉴定为 NTM 的登记资料 183 份,患者多次培养阳性且鉴定结果相同,按 1 份统计。

1.2 仪器与试剂 全自动 BACTEC MGIT960 系统, ABI7500 荧光定量 PCR 仪;MGITTM 960 液体培养试剂,博奥生物有限公司结核/NTM 核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法),牛津免疫技术有限公司结核感染 T 细胞检测试剂盒。

1.3 方法

1.3.1 液体培养 将痰、支气管肺泡灌洗液等样本处理后,采用 BD 分枝杆菌培养管进行培养,仪器阳性报警后,取出等待核酸扩增检测。

1.3.2 NTM-DNA 检测 取 1 mL 阳性培养物手动提取核酸,严格按照检测试剂盒说明书进行操作,并加入阴性、阳性对照。在保证实验有效的前提下,根据说明书判读结果。

1.3.3 分枝杆菌菌种鉴定 将 DNA 检测结果为 NTM 的核酸送至睿博兴科生物技术有限公司进行测序。采用 16S rRNA(27F:5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3';1492R:5'-TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T-3')和 hsp65(hsp65-F:5'-ATC GCC AAG GAG ATC GAG CT-3';hsp65-R:5'-AAG GTG CCG CGG ATC TTG TT-3')基因测序。PCR 扩增产物测序后 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库比对,进行菌种鉴定。

1.3.4 IGRA 检测 使用肝素抗凝的真空采血管采集外周静脉血,严格按照检测试剂盒说明书进行操作。阳性结果判读为空白对照孔斑点数为 0~5 个时,(抗原 A 或抗原 B 孔的斑点数)-(空白对照孔斑

点数) ≥ 6 ,空白对照孔斑点数为 6~10 个时,(抗原 A 或抗原 B 孔的斑点数) $\geq 2 \times$ (空白对照孔斑点数);如果上述标准不符合且阳性质控对照孔正常时检测结果为“阴性”。

1.3.5 诊断标准 NTM 病的诊断标准参照《非结核分枝杆菌病诊断与处理指南》^[2]。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计学软件进行分析,计数资料组间比对采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2019 年 183 份 NTM 培养标本菌株的鉴定结果 共鉴定 NTM 17 种,其中快生长分枝杆菌共 6 种,按数量排比前 4 位为脓肿分枝杆菌占 12.0%(22/183),男性占 4.4%,女性占 7.7%;偶发分枝杆菌占 3.3%(6/183),男性占 1.6%,女性占 1.6%;外来分枝杆菌占 1.1%(2/183),女性占 1.1%;产黏液分枝杆菌占 1.1%(2/183),男性 1.1%;慢生长分枝杆菌共 11 种,按数量排比前 4 位为胞内分枝杆菌占 54.6%(100/183),男性占 25.1%,女性占 29.5%;鸟分枝杆菌 9.3%(17/183),男性占 2.2%,女性占 7.1%;堪萨斯分枝杆菌占 4.4%(8/183),男性占 3.3%,女性占 1.1%;副癆病分枝杆菌占 3.3%(6/183),男性占 1.1%,女性占 2.2%。快生长分枝杆菌共 34 株,慢生长分枝杆菌共 149 株,以胞内分枝杆菌、脓肿分枝杆菌为主。

2.2 各年龄组不同性别感染 NTM 的构成比 患者根据年龄区间分为青年组(20~<45 岁)19 人,中年组(45~<65 岁)67 人,老年组(≥ 65 岁)97 人,各年龄组不同性别感染 NTM 的构成比见表 1。

表 1 各年龄组不同性别感染 NTM 的构成比[n(%)]			
年龄组	男性	女性	合计
青年组	10(52.6)	9(47.4)	19(10.4)
中年组	34(50.7)	33(49.2)	67(36.6)
老年组	42(43.3)	55(56.7)	97(53.0)
合计	86(47.0)	97(53.0)	183(100.0)

2.3 患者就诊类型、培养标本类型及患者人群疾病分布 183 例患者中,住院患者例 139 例占 76.0%,门诊患者 44 例占 24.0%。送检样本类型痰 126 例占 68.9%,支气管肺泡灌洗液 44 例占 24.0%,组织 6 例占 3.3%,胸腔积液 2 例占 1.1%,其他 5 例占 2.7%。

送检的科室主要是呼吸科(包括肺移植科)占 93.4%,其他送检科室包括风湿免疫科、细胞免疫治疗中心、外科重症监护室(SICU)、急诊科、感染科、肾病科及内分泌科。其中诊断为呼吸道相关性疾病的有 173 例,主要包括肺部感染、肺炎、支气管扩张、慢性阻塞性肺疾病、间质性肺病、肺恶性肿瘤、肺脓肿等;其他疾病的 10 例,主要包括发热待查、狼疮性肾炎、胸腔积液、慢性咽喉炎、类风湿关节炎、皮炎、非霍奇金淋巴瘤等。

2.4 IGRA 检测结果 183 例患者中有 IGRA 结果的样本 120 例,阳性率 27.5%(33/120)。按快生长分枝杆菌与慢生长分枝杆菌分类比较见表 2。

IGRA 结果阳性的患者中,快生长分枝杆菌阳性率为 31.8%(7/22);慢生长分枝杆菌阳性率为 26.5%(26/98),略低于快生长分枝杆菌的阳性率。快生长分枝杆菌与慢生长分枝杆菌 IGRA 结果的阴性率、阳性率比较,差异无统计学意义($\chi^2=0.252, P=0.616$)。

表 2 快/慢生长分枝杆菌 IGRA 结果分析			
分类	阳性率[n(%)]	阴性率[n(%)]	合计(n)
快生长分枝杆菌			
脓肿分枝杆菌	3(25.0)	9(75.0)	12
偶发分枝杆菌	3(60.0)	2(40.0)	5
外来分枝杆菌	0(0.0)	2(100.0)	2
产黏液分枝杆菌	1(100.0)	0(0.0)	1
美容分枝杆菌	0(0.0)	1(100.0)	1
海滩分枝杆菌	0(0.0)	1(100.0)	1
合计	7(31.8)	15(68.2)	22
慢生长分枝杆菌			
胞内分枝杆菌	20(29.9)	47(70.1)	67
鸟分枝杆菌	1(9.1)	11(90.9)	12
堪萨斯分枝杆菌	2(50.0)	2(50.0)	4
副癆病分枝杆菌	0(0.0)	2(100.0)	2
慢生黄分枝杆菌	0(0.0)	3(100.0)	3
戈登分枝杆菌	2(66.7)	1(33.3)	3
蟾蜍分枝杆菌	0(0.0)	3(100.0)	3
猿猴分枝杆菌	1(100.0)	0(0.0)	1
苏加分枝杆菌	0(0.0)	1(100.0)	1
哥伦比亚分枝杆菌	0(0.0)	1(100.0)	1
中间分枝杆菌	0(0.0)	1(100.0)	1
合计	26(26.5)	72(73.2)	98
NTM 总计	33(27.5)	87(72.5)	120

3 讨 论

除结核分枝杆菌、牛分枝杆菌和麻风分枝杆菌以外的其他分枝杆菌称为 NTM,在自然环境中普遍存

在,是一种条件致病菌,当患者免疫力低下时好发。近年来 NTM 发生率呈逐年上升趋势,已成为威胁人类健康的重要公共卫生问题之一[3]。

本研究 183 份鉴定结果中,种群分布达 17 种,胞内分枝杆菌、脓肿分枝杆菌、鸟分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌占绝大多数(80.3%)。尽管 NTM 菌种分布在全球存在地理差异,但总体上仍以鸟分枝杆菌复合群(MAC)为主,而且 MAC 是引起 NTM 肺病最常见致病菌。SIMONS 等[4]研究显示,呼吸道分离的 NTM 菌种以 MAC 最常见,同时 MAC 的临床相关性也是最强的菌种(56.0%),与本研究结果(63.9%)一致。

本研究从中分离出 NTM 的患者显示 NTM 可发生于青年至老年的任何年龄段,但好发于老年人[5],同时免疫力下降是主要易感因素。本研究也显示,65 岁以上人群是 NTM 的分离主体,提示中老年人群可因免疫力下降导致 NTM 感染率增高。但本研究老年人组分离出 NTM 的数据女性例数略多于男性,与其他报道结果不一致[5],这可能与地区、人群不同或只从一家医院取样样本量较少导致。此类患者通常有慢性基础性肺疾病如支气管扩张、慢性阻塞性肺疾病、间质性肺病等。其他如患有恶性肿瘤、血液病、肾病、自身免疫性疾病或长期使用激素免疫力低下的患者。

本研究呼吸道标本比例较高(占 93.4%)。其中痰(68.9%)、支气管肺泡灌洗液(24.0%)、肺穿刺组织(3.3%),包括肺移植科送检的样本。在人体的实体器官移植(SOT)受者人群中,NTM 感染的发生率大约为 1.5%~1.8%。其中,肺为 NTM 感染的主要部位,尤其是肺移植术后,在 SOT 受者人群 NTM 病中,约 86%为 NTM 肺病[6-7]。近年来,随着免疫诱导治疗的临床应用日趋普遍,NTM 感染的发生率显著增加,NTM 病已成为 SOT 术后重要的感染性并发症之一[8]。SOT 受者感染主要菌种为 MAC、堪萨斯分枝杆菌、脓肿分枝杆菌和嗜血分枝杆菌等。本研究肺移植科 6 例中,胞内分枝杆菌 4 例(66.7%),脓肿分枝杆菌 2 例(33.3%),与《器官移植受者非结核分枝杆菌病临床诊疗技术规范》[9]相符。

本研究中 183 例样本中的 120 例曾检测 IGRA,阳性 33 例(27.5%)。120 例患者快生长分枝杆菌与慢生长分枝杆菌 IGRA 结果阴性率、阳性率比较,差异无统计学意义($\chi^2=0.252, P=0.616$)。IGRA 是利用结核分枝杆菌感染者外周血单个核细胞中存在结核特异的效应 T 淋巴细胞,其再受到结核分枝杆菌特有的 DNA 片段所编码的 ESAT-6 和 CFP-10 刺激后分泌 γ -干扰素而设计的 T 细胞免疫斑点试验[10]。ESAT-6 和 CFP-10 均位于结核分枝杆菌称为差异区

域(RD1)的特定基因组区域。RD1 存在于结核分枝杆菌复合群中,以及极少数 NTM 菌属中如海分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、苏加分枝杆菌、戈登分枝杆菌等,感染者理论上可致 IGRA 阳性^[11-12]。本研究中戈登分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌阳性结果共 4 例,占这两种菌总人数的 57.1%(4/7)。我国学者曾对含有 RD1 的 NTM 皮肤感染患者 17 例(15 例海分枝杆菌、1 例戈登分枝杆菌、1 例苏加分枝杆菌)进行 IGRA 检测,其中 12 例阳性,阳性率 70.6%,高于本研究的 57.1%^[13]。AUGUSTYNOWICZ-KOPEC 等^[14]的研究中,对结核病史阴性的 61 例患者进行 IGRA 检测,其中 8%阳性;堪萨斯分枝杆菌分离株为 22%,影像学提示既往结核病史为 18%。IGRA 阳性结果可能主要取决于过去无症状的结核感染。堪萨斯分枝杆菌与 IGRA 的交叉反应可能性较小,但是尚需进一步调查。结核分枝杆菌潜伏感染者或有既往结核病的患者在检测出 NTM 的同时,查出 IGRA 阳性,不能单纯认为是 NTM 导致 IGRA 阳性,还要结合病史、影像学检测等综合考虑。也有韩国学者认为,在结核高发地区,IGRA 无法鉴别活动性结核、MAC 与潜伏结核感染^[15]。本研究样本量较少,比例波动较大,可能存在偏倚,有待于扩大样本进一步研究。

4 结 论

综上所述,本研究 NTM 所致感染中,以胞内分枝杆菌、脓肿分枝杆菌为主要致病菌,尤其好发于年龄大于或等于 65 岁的老年人,IGRA 结果对于 NTM 感染无明确诊断价值。

参考文献

[1] 贾彤,张海晴,魏素梅,等. 2013—2017 年徐州市非结核分枝杆菌菌种鉴定、三间分布和耐药性分析[J]. 中国临床医生杂志,2019,47(2):173-175.

[2] 中华医学会结核病学分会. 非结核分枝杆菌诊断与处理指南[J]. 中华结核和呼吸杂志,2000,23(11):650-653.

[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 Respir J, 2013, 42(6):1604-1613.

[4] SIMONS S, VAN INGEN J, HSUEH P R, et al. Nontuberculous mycobacteria in respiratory tract infections,

eastern Asia[J]. Emer Infect Dis, 2011, 17(3):343-349.

[5] 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.

[6] VAN INGEN J. Diagnosis of nontuberculous mycobacterial infections[J]. Semin Respir Crit Care Med, 2013, 34(1):103-109.

[7] SHAH S K, MCANALLY K J, SEOANE L, et al. Analysis of pulmonary non-tuberculous mycobacterial infections after lung transplantation[J]. Transpl Infect Dis, 2016, 18(4):585-591.

[8] LONGWORTH S A, DALY J S. Management of infections due to nontuberculous mycobacteria in solid organ transplant recipients-guidelines from the American society of transplantation infectious diseases community of practice[J]. Clin Transplant, 2019, 33(9):e13588.

[9] 中华医学会器官移植学分会. 器官移植受者非结核分枝杆菌病临床诊疗技术规范(2019 版)[J]. 器官移植, 2019, 10(4):364-368.

[10] RICHELDI L. An update on the diagnosis of tuberculosis infection[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2006, 174(7):736-742.

[11] 姚雨濛,潘珏,高晓东,等. T 细胞斑点试验对活动性结核与非结核分枝杆菌感染的鉴别诊断价值[J]. 中华医院感染学杂志,2017,27(12):2683-2685.

[12] VAN INGEN J, DE ZWAAN R, DEKHUIJZEN R, et al. Region of difference 1 in nontuberculous Mycobacterium species adds a phylogenetic and taxonomical character [J]. J Bacteriol, 2009, 191(18):5865-5867.

[13] 陈燕清. T-SPOT. TB 对含 RD1 的分枝杆菌皮肤感染的诊断、疗效评估的价值研究[D]. 北京:北京协和医学院中国医学科学院,2017:1-66.

[14] AUGUSTYNOWICZ-KOPEC E, SIEMION-SZCZESNIAK I, ZABOST A, et al. Interferon gamma release assays in patients with respiratory isolates of non-tuberculous mycobacteria-a preliminary study[J]. Pol J Microbiol, 2019, 68(1):15-19.

[15] NIEDERMANMS. De-escalation therapy in ventilator-associated pneumonia[J]. Current Opin Crit Care, 2006, 12(5):452-457.

(收稿日期:2019-12-15 修回日期:2020-01-05)