

· 论 著 ·

2013—2015 年广州市旧城区各类分枝杆菌流行情况

马品云 谭耀驹 蔡杏珊 陈俊宇 刘欣

【摘要】 目的 了解 2013—2015 年广州市旧城区分枝杆菌的流行情况。**方法** 选取广州市胸科医院 2013 年 1 月至 2015 年 12 月门诊和住院患者作为研究对象,共 10 743 例。研究对象均由结核病实验室收集了痰液、尿液、胸腹腔积液、脑脊液和穿刺液等标本,并经分枝杆菌培养为阳性。采用结核菌群特异性分泌蛋白 MPB64 免疫胶体金法进行菌群鉴定,对 MPB64 检测阴性或阳性但怀疑非结核分枝杆菌(non-tuberculosis mycobacteria, NTM)混合生长者,使用基因芯片法进行菌种鉴定,对芯片法无法鉴定者进行基因测序。**结果** 10 743 例研究对象中,有 201 例鉴定为无分枝杆菌,涂片结果为杂菌生长。共鉴定出 8012 株 MTB(76.00%),2530 株 NTM(24.00%)。NTM 种群分布达 17 种,最常见的是龟-脓肿复合群分枝杆菌、胞内分枝杆菌、鸟分枝杆菌,分别占 10.64%(1122/10 542)、6.24%(658/10 542)、3.00%(316/10 542)。NTM 阳性患者中,男性占 49.48%(1133/2290),女性占 50.52%(1157/2290),男性、女性感染比例最高的年龄段均为 55~64 岁,分别占 26.30%(298/1133)和 25.32%(293/1157)。**结论** 2013—2015 年广州市旧城区分枝杆菌感染者中 MTB 为主要致病菌。NTM 感染菌群种类较多,中老年人感染比例较高。

【关键词】 分枝杆菌属; 分枝杆菌; 结核; 横断面研究; 疾病流行

Prevalence of mycobacterium species in the inner cities of Guangzhou between 2013 and 2015 MA Pin-yun, TAN Yao-ju, CAI Xing-shan, CHEN Jun-yu, LIU Xin. Department of Laboratory, Guangzhou Chest Hospital, Guangzhou 510095, China

Corresponding author: MA Pin-yun, Email: kastty@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the prevalence of mycobacterium species in the inner cities of Guangzhou between 2013 and 2015. **Methods** A total of 10 743 cases, including outpatient and hospitalized patients, from Guangzhou Chest Hospital between January 2013 and December 2015 were selected. All of the subjects were culture positive specimens from sputum, urine, abdominal effusion, cerebrospinal fluid and puncture fluid. TB-specific secretory protein MPB64 immune colloidal gold method was used to identify strains, while specimens with MPB64 tested negative or MPB64 tested positive but were suspected of no-tuberculous mycobacteria (NTM) mixed growth were identified by gene chip method. Strains which could not be determined by gene chip were then sequenced. **Results** Of the 10 743 cases, 201 were with no-mycobacterial but mixed bacterium, 8012 (76.00%) were with *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), 2530 (24.00%) were with NTM. NTM included 17 bacteria population, the turtle-abscess complex group mycobacteria, *M. intracellulare*, *M. avium* were the top three, accounted for 10.64% (1122/10 542), 6.24% (658/10 542), and 3.00% (316/10 542), respectively. Among the NTM positive patients, 49.48% (1133/2290) were male and 50.52% (1157/2290) were female, with the highest proportion of 55 to 64 years old, which accounted for 26.30% (298/1133) and 25.32% (293/1157). **Conclusion** MTB was the main pathogen in the inner cities of Guangzhou between 2013 and 2015. NTM is various, and the infection percentage is higher in the elder.

【Key words】 *Mycobacterium*; *Mycobacterium tuberculosis*; Cross-sectional studies; Epidemics

近年来,非结核分枝杆菌(non-tuberculosis mycobacteria, NTM)肺病疫情呈上升趋势,因其具有与结核病临床表现相似的全身中毒症状及局部损

害表现,常被误诊为肺结核,且 NTM 感染患者抗结核治疗无效。通常对分枝杆菌感染患者先进行治疗,再做分枝杆菌培养,然后再做药物敏感性试验(简称“药敏试验”)及细菌的初步分型,此过程需要 2~3 个月,如此,则往往延误患者病情,造成不必要的医疗浪费和加重患者多方面的负担。因此,了解各地区分枝杆菌菌种感染的分布情况,对分枝杆菌感染患者进行菌种的快速分型鉴定十分必要^[1]。

doi:10.3969/j.issn.1000-6621.2016.10.008

基金项目:广州市医药卫生科技项目(20161A10044)

作者单位:510095 广州市胸科医院检验科

通信作者:马品云,Email:kastty@163.com

DNA 微阵列芯片检测病原菌核酸技术近几年来在医疗领域发展迅速,可快速检测疑似标本中的分枝杆菌 DNA^[2-3],以确定标本中的分枝杆菌种属,能够鉴定临床常见的 16 种 NTM。笔者对广州市胸科医院结核病实验室近 3 年来分枝杆菌培养阳性标本进行菌种鉴定,以了解广州市旧城区分枝杆菌各菌种感染分布情况,现将结果报告如下。

材料和方法

1. 菌株来源:选取广州市胸科医院 2013 年 1 月至 2015 年 12 月门诊和住院患者作为研究对象,共 10 743 例。研究对象均由结核病实验室收集了痰液、尿液、胸腹腔积液、脑脊液和穿刺液等标本,并经分枝杆菌培养鉴定为阳性。

2. 仪器和试剂:基因芯片检测平台及配套试剂、LuxScan-10K/B 微阵列芯片激光扫描仪均购自北京博奥生物有限公司;抗原检测试剂(胶体金法)购自杭州创新生物公司;PCR 扩增仪、高速离心机购自德国 Eppendorf 公司;分枝杆菌细胞破碎仪购自上海仁度公司。

3. 试验方法:(1)对研究对象的标本采用结核分枝杆菌菌群特异性分泌蛋白 MPB64 免疫胶体金法检测试剂进行检测。将 100 μ l 标本滴到检测板的样本滴下部,15 min 后观察结果。检测区和控制区均出现紫红色条带为阳性;在控制区出现紫红色条带,在检测区未出现为阴性。控制区未出现任何条带需重新检测。(2)对 MPB64 检测阴性和检测阳性但怀疑混合 NTM 生长的患者标本用基因芯片法进行菌种鉴定。流程如下:①提取:向核酸提取管中加入 80 μ l 核酸提取液;挑取肉眼可见菌落或 20 μ l 液体培养阳性标本加入核酸提取管中;将提取管放入超声破碎仪破碎提取 15 min,取出置于 95 $^{\circ}$ C 金属浴 5 min,5000 r/min 离心 1 min(离心半径为 8.4 cm),即得核酸溶液。②扩增:在 18 μ l PCR 扩增试剂中加入 2 μ l 样本核酸溶液,按照分枝杆菌菌种鉴定 PCR 扩增程序进行扩增,扩增条件:37 $^{\circ}$ C 600 s, 94 $^{\circ}$ C 600 s 预变性后,进入 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s,总共 45 个循环。然后进入 94 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 60 s,共计 20 个循环。最后 72 $^{\circ}$ C 420 s 延伸后进入 4 $^{\circ}$ C 保存。③杂交:将 PCR 产物 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min,随后立即置于冰水混合物中骤冷冰浴 3 min;取出 PCR 产物,按照 9 μ l 杂交缓冲液、6 μ l PCR 产物配制杂交混合物;吸取 13.5 μ l 杂交混合物经加样孔加入杂交盒的芯片点阵中,盖好盒

盖并使用金属封条密封杂交盒;将杂交盒放入杂交仪,杂交条件为 50 $^{\circ}$ C 杂交 2 h,转速为 15 r/min。(3)基因芯片不能鉴定或者鉴定结果与菌落形态、颜色不相符的菌株提取 DNA 后送北京博奥生物有限公司进行基因测序,测序方法为一代 Sanger 测序法。利用 BLAST 软件,将测序得到的基因序列与 GenBank 数据库中的序列作比对分析,进行同源性比较。进一步确定该菌株种群。

4. 质量控制:试验过程所用标准菌株为结核分枝杆菌 H37Rv,来自中国疾病预防控制中心结核病参比实验室。

5. 统计学分析:利用 WPS 2015 进行数据整理,应用 SPSS19.0 软件进行统计分析。

结 果

1. MPB64 免疫胶体金检测结果:10 743 例研究对象中分泌蛋白 MPB64 检测阳性共有 7532 例,其中 7427 例结合菌落形态特点、生长特性直接判定为 MTB,105 例为检测阳性并混合其他菌生长;3211 例检测阴性。

2. 基因芯片鉴定结果:将 105 例 MPB64 检测阳性并混合其他菌生长患者标本和 3211 例 MPB64 检测阴性患者标本进行基因芯片检测。结果显示,2513 例鉴定为 NTM;201 例鉴定为无分枝杆菌,涂片染色判定为杂菌生长;105 例鉴定为 MTB 与 NTM 混合生长;478 例鉴定为 MPB64 阴性的 MTB;17 例芯片无法判定或者鉴定与形态特性不符。

3. 测序结果:根据芯片鉴定结果,将 17 株不能鉴定或者鉴定结果与菌株形态和颜色不符的菌株进行 16SrRNA 测序,结果显示,4 株为猿分枝杆菌、4 株为亚洲分枝杆菌、2 株为副癰疽分枝杆菌、1 株为胞内分枝杆菌、2 株为 MTB 和戈登分枝杆菌混合生长、4 株为分枝杆菌属但不能确定菌种。

4. 病原菌分布:根据 MPB64 胶体金法、基因芯片法和测序结果,共鉴定出 10 542 株分枝杆菌,2013—2015 年分别占 28.93%(3050/10 542)、34.02%(3586/10 542)、37.05%(3906/10 542);其中,MTB 有 8012 株,NTM 有 2530 株。NTM 共有 17 个种群,另有 4 株 NTM 属于分枝杆菌,但不能确定具体菌种,见表 1。3 年来 NTM 的分离率呈上升趋势,2015 年上升至 26.42%(表 2)。在 NTM 中,男性占 49.48%,女性占 50.52%,男、女性所占比例差别不大;男、女性感染比例最高的年龄段均为 55~64 岁,分别占 26.30%和 25.32%(表 3)。

表 1 广州旧城区分枝杆菌感染者菌种在 2013—2015 年间的分布情况

菌种名称	2013 年 [例,构成比(%)]	2014 年 [例,构成比(%)]	2015 年 [例,构成比(%)]	合计 [例,构成比(%)]
结核分枝杆菌	2 327(76.30)	2 811(78.39)	2 874(73.58)	8 012(76.00)
龟-脓肿复合群分枝杆菌	351(11.51)	338(9.42)	433(11.09)	1 122(10.64)
胞内分枝杆菌	170(5.57)	207(5.77)	281(7.19)	658(6.24)
鸟分枝杆菌	85(2.79)	95(2.65)	136(3.48)	316(3.00)
堪萨斯分枝杆菌	42(1.38)	47(1.31)	68(1.74)	157(1.49)
偶然分枝杆菌	32(1.05)	40(1.11)	51(1.31)	123(1.17)
戈登分枝杆菌	28(0.92)	26(0.73)	29(0.74)	83(0.79)
瘰癧分枝杆菌	1(0.03)	5(0.14)	10(0.26)	16(0.15)
浅黄分枝杆菌	8(0.26)	4(0.11)	2(0.05)	14(0.13)
苏尔加分枝杆菌和玛尔摩分枝杆菌	1(0.03)	4(0.11)	5(0.13)	10(0.09)
蟾分枝杆菌	0(0.00)	5(0.14)	2(0.05)	7(0.06)
土分枝杆菌	2(0.07)	1(0.03)	2(0.05)	5(0.05)
猿分枝杆菌	1(0.03)	1(0.03)	2(0.05)	4(0.04)
亚洲分枝杆菌	1(0.03)	1(0.03)	2(0.05)	4(0.04)
草分枝杆菌	0(0.00)	0(0.00)	3(0.08)	3(0.03)
副瘰癧分枝杆菌	0(0.00)	0(0.00)	2(0.05)	2(0.02)
海分枝杆菌和溃疡分枝杆菌	1(0.03)	0(0.00)	0(0.00)	1(0.01)
金色分枝杆菌	0(0.00)	0(0.00)	1(0.02)	1(0.01)
菌种不确定	0(0.00)	1(0.03)	3(0.08)	4(0.04)
合计	3 050(100.00)	3 586(100.00)	3 906(100.00)	10 542(100.00)

表 2 2013—2015 年广州旧城区分枝杆菌感染者
NTM 分离情况

年份	分枝杆菌株数	NTM	
		株数	分离率(%)
2013	3 050	723	23.70
2014	3 586	775	21.61
2015	3 906	1 032	26.42
总数	10 542	2 530	24.00

表 3 2013—2015 年广州市旧城区各年龄组分性别
NTM 发病构成情况

年龄组 (岁)	男[例, 构成比(%)]	女[例, 构成比(%)]	合计[例, 构成比(%)]
0~	4(0.35)	1(0.09)	5(0.22)
15~	106(9.35)	69(5.96)	175(7.64)
25~	122(10.77)	120(10.37)	242(10.57)
35~	100(8.83)	194(16.77)	294(12.84)
45~	175(15.45)	227(19.62)	402(17.55)
55~	298(26.30)	293(25.32)	591(25.81)
65~	199(17.56)	157(13.57)	356(15.54)
≥75	129(11.39)	96(8.30)	225(9.83)
合计	1133(49.48)	1157(50.52)	2290(100.00)

注 有 240 例年龄不祥,不纳入统计

讨 论

近年来,随着艾滋病发病率升高,全球各地多发报道 NTM 肺病发病率呈明显上升趋势^[4]。临床上常将 NTM 误诊为广泛耐药结核分枝杆菌^[5]。并且不同菌种的 NTM 之间也存在误诊^[6],这些报道更凸显了 NTM 鉴别诊断的意义。因此,为进一步分析、诊治和预防结核病,分枝杆菌的菌种鉴定是不可避免的。

本研究共鉴定出 18 种菌群,其中 MTB 8012 株,NTM 有 17 个种群共 2530 株。其中,14 株是通过测序鉴定菌种,包括 4 株猿分枝杆菌,4 株亚洲分枝杆菌,2 株副瘰癧分枝杆菌。国内报导的副瘰癧分枝杆菌并不多,连璐璐^[7]在 2013 年报导了 3 例。本文中有 4 株属于分枝杆菌属,但不能确定种群,怀疑是新种。MTB 仍为主要发病类型,占 76.00%,NTM 占 24.00%。NTM 的分离率与许蕴怡等^[8]2011 年报道的 19.2% 相比大幅度上升。杭州市 NTM 分离率从 2009 年的 11.9% 上升到 2014 年的 25.8%^[9]。我国台湾地区 NTM 发病占有所有分枝杆菌发病的比率从 2000 年的 32.3% 上升至 2008 年的 49.8%^[10],韩国从 2002 年的 21.0% 增加到 2010

年的 57.8%，其 NTM 的发病率和患病率甚至超过结核病的发病率和患病率^[11]。NTM 患病率普遍升高的原因不明，可能与实验室技术与方法的改进、对 NTM 的认识提高、人口老龄化、免疫抑制人群增多及环境暴露的增加有一定关联^[11]。

广州旧城区 NTM 种群分布达 17 种，以龟-脓肿复合群分枝杆菌、胞内和鸟分枝杆菌为主，是主要的致病菌，与侯沪等^[12]研究结果相同。NTM 在不同国家或同一国家不同地区发病率和主要菌种都有差异^[13-15]。例如，美国和日本以鸟-胞内分枝杆菌复合群和堪萨斯分枝杆菌为主；韩国以鸟-胞内分枝杆菌复合群和脓肿分枝杆菌为主；英格兰、威尔士、波兰和伊朗最常见的是堪萨斯分枝杆菌；匈牙利是蟾分枝杆菌；克罗地亚是戈登分枝杆菌^[16-18]。上海的研究显示，龟分枝杆菌、戈登分枝杆菌和脓肿分枝杆菌最常见，发病率合计为 56.3%，而鸟-胞内分枝杆菌复合群仅为 13.1%^[19]。不同地区 NTM 流行菌种存在的差异与当地的气候因素、地理位置及患者个人的工作生活条件等有密切关系^[20]。

从 NTM 的易感者看，本研究结果显示，广州市旧城区 NTM 易感人群为 45 岁以上，峰值在 55~64 岁，男女性大致相同。此结果与唐惠红等^[21] 2015 年的报道结果相同，但与其他地区报道 NTM 肺病男性多于女性有所不同^[22-23]。NTM 肺病发病女性患者比例增加是本地区值得密切关注的问题，有必要做进一步的流行病学调查。

综上所述，NTM 患病率的居高不下和种类越来越多应引起足够的重视。各地市优势菌群和 NTM 的易感人群有一定差异，针对本市情况，临床医生应提高警惕，以防误诊而拖延患者病情。

参 考 文 献

- [1] Katoch VM. Newer diagnostic techniques for tuberculosis. *Indian J Med Res*, 2004, 120: 418-428.
- [2] Shi XC, Liu XQ, Xie XL, et al. Gene chip array for differentiation of mycobacterial species and detection of drug resistance. *Chin Med J (Engl)*, 2012, 125(18): 3292-3297.
- [3] Yu MC, Chen HY, Wu MH, et al. Evaluation of the rapid MGIT TBc identification test for culture confirmation of *Mycobacterium tuberculosis* complex strain detection. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(3): 802-807.
- [4] Daley CL, Griffith DE. Pulmonary non-tuberculous mycobacterial infections. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2010, 14(6): 665-671.
- [5] Sánchez-Chardi AI, Olivares F, Byrd TF, et al. Demonstration of cord formation by rough *Mycobacterium abscessus* variants: implications for the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(6): 2293-2295.
- [6] Morimoto K, Kazumi Y, Maeda S, et al. *Mycobacterium heckeshornense* lung infection that was diagnosed as *Mycobacterium xenopi* disease by DNA-DNA hybridization (DDH). *Intern Med*, 2011, 50(11): 1251-1253.
- [7] 连璐璐. 中国 8 省非结核分枝杆菌临床分离株的菌种鉴定. 衡阳: 南华大学, 2013.
- [8] 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. *广东医学*, 2011, 32(3): 334-336.
- [9] 余斐, 陈晓, 嵇仲康, 等. 杭州地区 2009—2014 年非结核分枝杆菌流行状况分析. *中国微生态学杂志*, 2016, 28(7): 808-810.
- [10] Lai CC, Tan CK, Chou CH, et al. Increasing incidence of non-tuberculous mycobacteria, Taiwan, 2000-2008. *Emerg Infect Dis*, 2010, 16(2): 294-296.
- [11] Yoo JW, Jo KW, Kim MN, et al. Increasing trend of isolation of non-tuberculous mycobacteria in a tertiary university hospital in South Korea. *Tuberc Respir Dis (Seoul)*, 2012, 72(5): 409-415.
- [12] 侯沪, 李爱敏, 唐曙明. 基因芯片快速分枝杆菌鉴定技术与涂片抗酸染色技术的临床应用比较. *国际检验医学杂志*, 2015, 36(16): 2335-2336.
- [13] Varghese B, Memish Z, Abuljadayel N, et al. Emergence of clinically relevant Non-Tuberculous Mycobacterial infections in Saudi Arabia. *PLoS Negl Trop Dis*, 2013, 7(5): e2234.
- [14] Ogawa K, Sano C. Strategies for *Mycobacterium avium* complex infection control in Japan: how do they improve the present situation. *Kekkaku*, 2013, 88(3): 355-371.
- [15] Matveychuk A, Fuks L, Priess R, et al. Clinical and radiological features of *Mycobacterium kansasii* and other NTM infections. *Respir Med*, 2012, 106(10): 1472-1477.
- [16] Cassidy PM, Hedberg K, Saulson A, et al. Nontuberculous mycobacterial disease prevalence and risk factors: a changing epidemiology. *Clin Infect Dis*, 2009, 49(12): e124-129.
- [17] Saifi M, Jabbarzadeh E, Bahrmand AR, et al. HSP65-PRA identification of non-tuberculosis mycobacteria from 4892 samples suspicious for mycobacterial infections. *Clin Microbiol Infect*, 2013, 19(8): 723-728.
- [18] Moore JE, Kruijshaar ME, Ormerod LP, et al. Increasing reports of non-tuberculous mycobacteria in England, Wales and Northern Ireland, 1995-2006. *BMC Public Health*, 2010, 10: 612.
- [19] Wang HX, Yue J, Han M, et al. Nontuberculous mycobacteria: susceptibility pattern and prevalence rate in Shanghai from 2005 to 2008. *Chin Med J (Engl)*, 123(2): 184-187.
- [20] 胡洁, 徐文贤, 宋秀兰, 等. 嘉兴地区 2013—2014 年非结核分枝杆菌流行状况分析. *中国预防医学杂志*, 2015, 16(9): 731-732.
- [21] 唐惠红, 何志青, 罗春明, 等. 广州市越秀区 2008—2011 年非结核分枝杆菌肺病临床特征及影响治愈因素分析. *实用预防医学*, 2015, 22(11): 1316-1322.
- [22] 梁冰, 黄瑞霞, 邓虹, 等. 63 例非结核分枝杆菌肺病的流行病学及临床特点分析. *实用预防医学*, 2011, 18(12): 2408-2410.
- [23] 史祥, 尹洪云. 58 例非结核分枝杆菌肺病住院患者的临床分析. *临床肺科杂志*, 2013, 18(2): 311-312.

(收稿日期: 2016-07-16)

(本文编辑: 李敬文)