

DOI: 10. 12138/j. issn. 1671—9638. 20216570

· 论 著 ·

湖南省某专科医院非结核分枝杆菌临床分离株菌种鉴定及药敏结果

陈振华, 胡培磊, 易松林, 张小萍, 段 洁, 刘昭国, 谭云洪

(湖南省胸科医院检验科, 湖南 长沙 410013)

[摘要] **目的** 探讨非结核分枝杆菌肺病(NTMPD)菌种分布及耐药性,为其临床诊治提供依据。**方法** 收集 2017—2019 年湖南省某胸科医院 BACTEC MGIT 960 系统培养阳性的临床分离菌株,经 MPB64 检测以及 PNB、TCH 培养基生长试验分离出非结核分枝杆菌(NTM),应用 16Sr RNA、Hsp65、ITS 基因测序法将 NTM 鉴定至种,采用最低抑菌浓度(MIC)法检测其中脓肿分枝杆菌对 10 种抗菌药物的耐药性。**结果** 10 443 份 MGIT 960 报告阳性的菌株中,共检出 NTM 1 227 株,检出率为 11.7%。经菌种鉴定,居前 4 位者依次为胞内分枝杆菌(27.8%)、脓肿分枝杆菌(25.3%)、戈登分枝杆菌(16.5%)、鸟分枝杆菌(16.1%)。脓肿分枝杆菌对阿米卡星、克拉霉素和利奈唑胺的敏感性较高,敏感率分别是 94.6%、87.5%、82.1%;对其他药物的敏感率均低于 50%。**结论**

湖南省 NTM 流行的菌种以脓肿分枝杆菌和胞内分枝杆菌为主,阿米卡星和克拉霉素可作为该省临床治疗脓肿分枝杆菌感染患者的优选抗菌药物。

[关键词] 非结核分枝杆菌; 脓肿分枝杆菌; 菌种; 抗菌药物; 药敏试验; 非结核分枝杆菌肺病

[中图分类号] R181.3⁺2

Species identification and antimicrobial susceptibility testing result of clinically isolated non-tuberculous mycobacteria in a specialized hospital in Hunan Province

CHEN Zhen-hua, HU Pei-lei, YI Song-lin, ZHANG Xiao-ping, DUAN Jie, LIU Zhao-guo, TAN Yun-hong (Department of Laboratory Medicine, Hunan Chest Hospital, Changsha 410013, China)

[Abstract] **Objective** To investigate species distribution and antimicrobial resistance of non-tuberculous mycobacterial pulmonary disease (NTMPD), and provide basis for clinical diagnosis and treatment. **Methods** Positive clinical isolates cultured with BACTEC MGIT 960 system in a chest hospital in Hunan Province from 2017 to 2019 were collected, non-tuberculous mycobacteria (NTM) was isolated by MPB64 detection and PNB/TCH medium growth testing, NTM species were identified by 16Sr RNA, Hsp65 and ITS gene sequencing, resistance of *Mycobacterium abscessus* to 10 kinds of antimicrobial agents was detected with minimal inhibitory concentration (MIC) method.

Results Among 10 443 positive strains reported by MGIT 960, 1 227 NTM strains were isolated, isolation rate was 11.7%. The top 4 strains were *Mycobacterium intracellulare* (27.8%), *Mycobacterium abscessus* (25.3%), *Mycobacterium gordonae* (16.5%) and *Mycobacterium avium* (16.1%). Susceptibility rates of *Mycobacterium abscessus* to amikacin, clarithromycin and linezolid were high, which were 94.6%, 87.5% and 82.1% respectively, while susceptibility rates to other antimicrobial agents were all lower than 50%. **Conclusion** *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium intracellulare* are the most prevalent strains of NTM in Hunan Province, amikacin and clarithromycin can be used as the preferred antimicrobial agents for clinical treatment of patients with *Mycobacterium abscessus* infection in Hunan Province.

[Key words] non-tuberculous mycobacteria; *Mycobacterium abscessus*; species; antimicrobial agent; antimicrobial susceptibility testing; non-tuberculous mycobacterial pulmonary disease

[收稿日期] 2020-03-06

[作者简介] 陈振华(1982-),男(汉族),湖南省衡阳市人,副主任技师,主要从事结核病实验室检测。

[通信作者] 谭云洪 E-mail:tanyunhong@163.com

非结核分枝杆菌(non-tuberculous mycobacteria, NTM)是一种条件致病菌,对人的致病程度较结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)弱,但能引起多种疾病^[1-2]。近年来,世界范围内 NTM 感染并致病呈上升趋势,既有医源性 NTM 感染的暴发流行,也有散发性 NTM 病,如 NTM 肺病(NTMPD)、NTM 皮肤感染和可播散性 NTM 疾病,许多国家均有报道^[1-4]。NTMPD 的发病率逐年上升,其临床症状、X 线表现与肺结核相似,但治疗方案差别明显,临床上多造成误诊、误治,使得患者病程迁延。人们对 NTMPD 的认识不断加深,NTMPD 诊治上的困难及其带来的危害已引起临床医生的高度重视^[2,5-7]。本研究对 2017—2019 年湖南省胸科医院培养分离的分枝杆菌临床株进行菌种鉴定,并对其中部分脓肿分枝杆菌进行药敏试验测试,分析 NTM 菌种分布及耐药性,旨在为临床诊治 NTMPD 提供依据。

1 对象与方法

1.1 菌株来源 2017—2019 年湖南省胸科医院经 BACTEC MGIT 960 System(简称 MGIT 960)培养阳性的 10 443 株非重复分枝杆菌临床分离菌株。

1.2 主要试剂与仪器 罗氏(L-J)培养基、对硝基苯甲酸(PNB)培养基及噻吩-2-羧酸肼(TCH)培养基购于珠海贝索生物技术公司,MPB64 抗原检测试剂盒(胶体金法)购自杭州创新生物检控技术公司。lab-aid 824 核酸提取仪及其配套试剂购于厦门致善生物科技有限公司。PCR 反应试剂购于北京全式金生物技术公司,引物由北京睿博兴科生物技术有限公司合成。PCR 扩增仪购自杭州博日科技公司。快速生长分枝杆菌(rapidly growing mycobacteria, RGM)药敏板购于赛默世尔科技公司。

1.3 标准质控菌株 MTB 对照标准菌株 H37RV 由国家结核病参比实验室提供,药敏质控菌株金黄色葡萄球菌 ATCC 29213、铜绿假单胞菌 ATCC 27853 购于卫生部临床检验中心。

1.4 研究方法

1.4.1 分枝杆菌鉴定 MGIT 960 培养报阳性菌株经抗酸染色涂片、结核分枝杆菌抗原 MPB64 检测、PNB 培养基生长试验、TCH 培养基生长试验,鉴定出结核分枝杆菌复合群(*Mycobacterium tuberculosis* complex, MTBC)和 NTM,试验操作及判读标准均参照《结核病实验室检验规程》^[8]进行。见表 1。

表 1 分枝杆菌鉴定试验 MTBC 和 NTM 判断标准
Table 1 Judgement criteria of MTBC and NTM in *Mycobacterium* identification testing

鉴定试验	MTBC*	NTM
MPB64 抗原	+	-
L-J 培养基	+	+
PNB 培养基	-	+
TCH 培养基	+	+

注: + 表示为阳性或生长; - 表示为阴性或不生长; * 其中牛分枝杆菌在 TCH 培养基上不生长。

1.4.2 NTM 菌种鉴定

1.4.2.1 DNA 提取 初步鉴定为 NTM 后,从 L-J 固体培养基斜面上刮取 2 接种环菌落重悬于生理盐水中,使用 lab-aid 824 仪器提取 DNA,上清用作基因测序模板液, - 20℃ 保存备用。

1.4.2.2 聚合酶链反应(PCR) 采用 16S rRNA、Hsp65、内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)三对引物扩增,16S rRNA 上游引物为 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',下游引物为: 5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'; Hsp65 上游引物为 5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT',下游引物为 5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT-3'; ITS 上游引物为 5'-AAGTCGTAACAAGGTARCCG-3',下游引物为 5'-TCGCCAAGGCATCACC-3'。16S rRNA 产物 1 500 bp, Hsp65 产物 400 bp, ITS 产物 380 bp。PCR 反应体系 30 μL: 上下游引物各 1 μL, 2× Tag PCR Master Mix 15 μL, ddH₂O 12 μL, DNA 模板 1 μL, 同时取两管 PCR 反应管分别加入结核分枝杆菌阳性质控品和结核分枝杆菌阴性质控品。按如下程序扩增: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 57℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 90 s, 共 25 个循环; 72℃ 终延伸 7 min。取 5 μL 扩增产物在 1% 琼脂糖(含 GelRed 核酸染料)凝胶中电泳, 观察结果。

1.4.2.3 测序及同源性比对 PCR 扩增产物送北京睿博兴科生物技术有限公司进行测序, 利用 BLAST 软件将测序得到的基因序列与美国国立生物技术信息中心(NCBI)网站(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)作同源性比较, 相似度 ≥ 97% 即可确定菌种。

1.4.3 药敏试验 参照美国临床实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)《M24-A2 指南》标准^[9], 采用 RGM 药敏板检

测脓肿分枝杆菌 10 种抗菌药物的 MIC 值,操作和结果判断参照《M24-A2 指南》和试剂盒说明书进行。

1.5 统计学分析 应用 Excle 2016 软件对资料进行统计分析。

2 结果

2.1 分枝杆菌鉴定结果 2017—2019 年, MGIT

960 培养报阳性的菌株数分别为 3 342、3 535、3 566 株,从中分别分离出 NTM 371、403、453 株,各年度检出率分别为 11.1%、11.4%、12.7%;共分离 NTM 1 227 株,总检出率为 11.7%。

2.2 NTM 菌种鉴定结果 1 227 株 NTM 中,经测序进行菌种鉴定,剔除测序失败的菌株,最终有 1 189 株确定菌种,居前四位的菌种分别是胞内分枝杆菌(27.8%)、脓肿分枝杆菌(25.3%)、戈登分枝杆菌(16.5%)、鸟分枝杆菌(16.1%)。见表 2。

表 2 2017—2019 年湖南省胸科医院 NTM 菌种分布情况

Table 2 Distribution of NTM species in Hunan Chest Hospital from 2017 to 2019

菌种类型	2017 年		2018 年		2019 年		合计	
	株数	构成比(%)	株数	构成比(%)	株数	构成比(%)	株数	构成比(%)
快生长非结核分枝杆菌	85	23.6	120	30.9	148	33.5	353	29.7
脓肿分枝杆菌	74	20.6	100	25.8	127	28.8	301	25.3
龟分枝杆菌	5	1.4	8	2.1	9	2.0	22	1.9
偶发分枝杆菌	6	1.7	12	3.1	12	2.7	30	2.5
慢生长非结核分枝杆菌	244	67.8	235	60.6	268	60.8	747	62.8
胞内分枝杆菌	106	29.4	105	27.1	120	27.2	331	27.8
鸟分枝杆菌	62	17.2	56	14.4	73	16.6	191	16.1
戈登分枝杆菌	71	19.7	60	15.5	65	14.7	196	16.5
堪萨斯分枝杆菌	5	1.4	14	3.6	10	2.3	29	2.4
其他非结核分枝杆菌	31	8.6	33	8.5	25	5.7	89	7.5
合计	360	100.0	388	100.0	441	100.0	1 189	100.0

2.3 NTM 药敏试验结果 因条件限制,只对临床诊断为 NTMPD 且病原菌为脓肿分枝杆菌的部分菌株的进行了药敏试验。结果显示,56 株脓肿分枝

杆菌对阿米卡星、克拉霉素和利奈唑胺的敏感性较高,敏感率分别为 94.6%、87.5%、82.1%,对其他药物的敏感率均低于 50%。见表 3。

表 3 56 株脓肿分枝杆菌对 10 种抗菌药物的药敏结果

Table 3 Antimicrobial susceptibility testing result of 56 strains of *Mycobacterium abscessus* to 10 kinds of antimicrobial agents

抗菌药物	MIC 范围 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	MIC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	MIC ₉₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	敏感		中介		耐药	
				株数	构成比(%)	株数	构成比(%)	株数	构成比(%)
环丙沙星	0.25~>4	4	>4	13	23.2	7	12.5	36	64.3
莫西沙星	0.25~>8	2	8	14	25.0	16	28.6	26	46.4
阿米卡星	1~>64	2	8	53	94.6	1	1.8	2	3.6
妥布霉素	<1~>16	4	16	8	14.3	22	39.3	26	46.4
多西环素	0.25~>16	>16	>16	6	10.7	2	3.6	48	85.7
克拉霉素	0.06~>16	0.12	8	49	87.5	0	0.0	7	12.5
利奈唑胺	1~32	4	16	46	82.1	8	14.3	2	3.6
亚胺培南	<2~>64	32	>64	6	10.7	12	21.4	38	67.9
头孢西丁	8~>128	32	64	23	41.1	31	55.4	2	3.5
复方磺胺甲噁唑	0.5/9.5~>8/152	4/76	8/152	14	25.0	-	-	40	71.4

注: - 表示参照 CLSI《M24-A2 指南》,RGM 对复方磺胺甲噁唑中度敏感没有确定临界值。

3 讨论

我国历次全国结核病流行病学调查^[10]结果显示,NTM 的检出率持续增高。本研究结果显示,2017—2019 年该院 NTM 检出率为 11.7%,检出率有逐年上升趋势,与其他国家报道^[4,11]结果一致。可能原因是临床实验室检验能力不断提升,尤其是免疫和分子生物技术的发展使更多的 NTM 被分离、鉴定出来;随着老年人、慢性阻塞性肺疾病、恶性肿瘤、免疫抑制剂使用增多等导致 NTM 感染的人数越来越多^[12]。

由于 NTM 病与结核病有相似的临床症状,鉴别诊断困难^[7,13]。NTM 致病菌菌种繁多,不同菌种与疾病的相关性不同,不同菌种对抗菌药物的敏感性也不同,增加了治疗的难度^[2,5,7],准确地菌种鉴定是临床正确诊断、有效治疗的前提。本研究通过联合分析 16SrRNA、Hsp65、ITS 同源序列组成差异,将 NTM 鉴定至种水平,结果显示临床分离的 RGM 主要是脓肿分枝杆菌,慢生长分枝杆菌(slowly growing mycobacteria, SGM)主要是胞内分枝杆菌和鸟分枝杆菌。不同类型的临床标本虽然都可分离获得 NTM,但以痰、支气管肺泡灌洗液、肺活检组织获得 NTM 培养阳性的可能性最大^[14-15]。肺部 NTM 感染最常见的菌种是鸟-胞内分枝杆菌复合体(*Mycobacterium avium-intracellulare* complex, MAC)、脓肿分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌和蟾蜍分枝杆菌。该院为结核病专科医院,大部分患者有肺部疾病,且送检标本以痰居多,因此,该院分离的 NTM 也是以 MAC 和脓肿分枝杆菌为主,分布情况与国内外报道结果基本相符,但在 NTM 菌种组成、构成比上仍存在差异^[4,16-18],进一步证实 NTM 种属分布常具有地域特点,不同国家及不同地区菌种构成不同。2017—2019 年该院检出的 NTM 中,RGM 检出率逐年上升,尤其是脓肿分枝杆菌上升较快,可能与该院大部分就诊患者有肺部疾病,而脓肿分枝杆菌主要侵犯人体肺有关^[1]。一般认为,临床标本分离出戈登分枝杆菌很可能是标本被污染且不致病^[2],本研究分离的戈登分枝杆菌占比较高,是标本污染菌还是病原菌,需进一步深入研究确定。

《非结核分枝杆菌病诊断与治疗专家共识》建议,尽可能做体外药敏试验,然后根据药敏试验结果选择相应敏感的治疗药物。本研究结果显示,阿米卡星对脓肿分枝杆菌抗菌活性最强,敏感率为

94.6%,MIC₅₀/MIC₉₀分别为 2.8 μg/mL;其次是克拉霉素,敏感率为 87.5%,MIC₅₀/MIC₉₀分别为 0.12、8 μg/mL;再次是利奈唑胺,敏感率为 82.1%,MIC₅₀/MIC₉₀分别为 4、16 μg/mL,与其他研究结果^[7,11]基本一致,提示阿米卡星和克拉霉素可作为该院临床治疗脓肿分枝杆菌感染患者的优选抗菌药物。利奈唑胺是 FDA 批准用于治疗革兰阳性菌感染的噁唑烷酮类药物,近年来也较多的用于耐药结核病和 MAC 感染的治疗。本研究中利奈唑胺对脓肿分枝杆菌具有良好的抗菌活性,如注意处理好药物不良反应,可以作为治疗脓肿分枝杆菌感染的备选药物^[19]。值得注意的是脓肿分枝杆菌对头孢西丁的耐药率(3.5%)很低,但敏感率不高,其原因与部分菌株(55.4%)药敏结果处在中介水平有关,临床可根据其 MIC 值加大用药剂量,以达到更高的血药浓度,使特定的生理部位获得有效的临床结果,从而使头孢西丁作为治疗脓肿分枝杆菌感染的次选药物。研究^[7,14,19]表明,NTM 感染的治疗效果主要取决于菌种,如堪萨斯分枝杆菌、海分枝杆菌的疗效较好,而 MAC、脓肿分枝杆菌、龟分枝杆菌的疗效较差,表明种属对药物的敏感性至关重要。

本研究存在一定的局限性:目前赛默飞世尔科技公司生产的药敏板只适于 RGM 药敏检测,所以,本研究未获得湖南省 SGM 的药敏结果;另外,RGM 药敏板 2018 年 10 月才获得国家药品监督管理局批准,本实验室 2019 年开展 RGM 药敏检测,本研究的脓肿分枝杆菌数量少,药敏结果可能存在偏倚,后续研究应增加菌株数,检测其对 10 种抗菌药物药敏情况。

[参考文献]

- [1] Lopeman RC, Harrison J, Desai M, et al. *Mycobacterium abscessus*: environmental bacterium turned clinical nightmare [J]. *Microorganisms*, 2019, 7(3): 90.
- [2] 李仲兴. 非结核分枝杆菌与临床感染[M]. 北京: 科学出版社, 2015.
- [3] 李欣影, 严彩丽, 钟慧婷. 手术切口非结核分枝杆菌感染 1 例 [J]. *中国感染控制杂志*, 2014, 13(9): 568-570.
- [4] Zhang ZX, Cherg BPZ, Sng LH, et al. Clinical and microbiological characteristics of non-tuberculous mycobacteria diseases in Singapore with a focus on pulmonary disease, 2012-2016 [J]. *BMC Infect Dis*, 2019, 19(1): 436.
- [5] Cowman S, van Ingen J, Griffith DE, et al. Non-tuberculous mycobacterial pulmonary disease[J]. *Eur Respir J*, 2019, 54(1): 1900250.

- [6] Sharma SK, Sharma R, Singh BK, et al. A prospective study of non-tuberculous mycobacterial disease among tuberculosis suspects at a tertiary care centre in North India[J]. Indian J Med Res, 2019, 150(5): 458-467.
- [7] 楼海, 孙勤, 顾瑾, 等. 常见非结核分枝杆菌肺病的临床特征及药物敏感性试验结果分析[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2019, 42(12): 901-906.
- [8] 赵雁林, 逢宇. 结核病实验室检验规程[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 15-53.
- [9] Woods GL, Brown-Elliott BA, Conville PS, et al. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes; approved standard — second edition; M24-A2[S]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011.
- [10] 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.
- [11] Cowman S, Burns K, Benson S, et al. The antimicrobial susceptibility of non-tuberculous mycobacteria [J]. J Infect, 2016, 72(3): 324-331.
- [12] Chin KL, Sarmiento ME, Alvarez-Cabrera N, et al. Pulmonary non-tuberculous mycobacterial infections: current state and future management[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2020, 39(5): 799-826.
- [13] Musaddaq B, Cleverley JR. Diagnosis of non-tuberculous mycobacterial pulmonary disease (NTM-PD): modern challenges [J]. Br J Radiol, 2020, 93(1106): 20190768.
- [14] 中华医学会结核病学分会, 非结核分枝杆菌病实验室诊断专家共识编写组. 非结核分枝杆菌病实验室诊断专家共识[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2016, 39(6): 438-443.
- [15] Schiff HF, Jones S, Achaiah A, et al. Clinical relevance of non-tuberculous mycobacteria isolated from respiratory specimens: seven year experience in a UK hospital[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 1730.
- [16] 刘东鑫, 郑惠文, 贺文从, 等. 广州市非结核分枝杆菌临床分离株菌种鉴定及药物敏感性试验结果分析[J]. 中国防痨杂志, 2019, 41(5): 534-540.
- [17] Wetzstein N, Hügel C, Wichelhaus TA, et al. Species distribution and clinical features of infection and colonisation with non-tuberculous mycobacteria in a tertiary care centre, central Germany, 2006-2016[J]. Infection, 2019, 47(5): 817-825.
- [18] Gomathy NS, Padmapriyadarsini C, Silambuchelvi K, et al. Profile of patients with pulmonary non-tuberculous mycobacterial disease mimicking pulmonary tuberculosis [J]. Indian J Tuberc, 2019, 66(4): 461-467.
- [19] Hatakeyama S, Ohama Y, Okazaki M, et al. Antimicrobial susceptibility testing of rapidly growing mycobacteria isolated in Japan[J]. BMC Infect Dis, 2017, 17(1): 197.

(本文编辑:文细毛)

本文引用格式:陈振华, 胡培磊, 易松林, 等. 湖南省某专科医院非结核分枝杆菌临床分离株菌种鉴定及药敏结果[J]. 中国感染控制杂志, 2021, 20(4): 361-365. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20216570.

Cite this article as: CHEN Zhen-hua, HU Pei-lei, YI Song-lin, et al. Species identification and antimicrobial susceptibility testing result of clinically isolated non-tuberculous mycobacteria in a specialized hospital in Hunan Province[J]. Chin J Infect Control, 2021, 20(4): 361-365. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20216570.