

·肺结核·评价与分析·

苏州地区非结核分枝杆菌病原学流行特征分析

刘佳 肖玉梅 曾令武 张耀刚 包紫薇 吴妹英

江苏省苏州市第五人民医院, 苏州大学附属传染病医院肺科, 苏州 210000

通信作者: 吴妹英, Email: wu_my@126.com

【摘要】 目的 了解苏州地区非结核分枝杆菌(NTM)病的病原学特征。方法 回顾性选取就诊于苏州市第五人民医院 2014 年 1 月至 2019 年 1 月期间确诊为 NTM 病患者, 收集年龄、性别等基本信息, 同时对留痰、肺泡灌洗液、脑脊液、尿沉渣、胸腹水等 NTM 阳性样本进行全基因组测序, 建立基因进化树分析菌株间同源性, 对 100%同源样本进行全基因组共线性分析。结果 苏州地区共发现 NTM 病例 67 例, 病例由 2014 年的 3 例增加到 2018 年的 22 例, 以胞内分枝杆菌为主(38 株, 56.7%)。基因进化树分析发现堪萨斯分枝杆菌各菌株间同源性高。同一患者的菌株基因共线性范围较高。结论 苏州地区 NTM 病发现例数逐年增多, 致病菌种以胞内分枝杆菌为主。今后需密切关注堪萨斯分枝杆菌在人际间传播的可能性。

【关键词】 非结核分枝杆菌; 全基因组测序; 基因树; 流行趋势; 病原学

基金项目: 苏州市卫生计生委科技项目 (LCZX201819, LCZX201918); 苏州市科技局民生科技项目 (SS2019010, SS2019074); 苏州市科技局医疗器械与新医药项目 (SLT2021010)

DOI: 10.3760/cma.j.cn331340-20210930-00192

Pathological features of nontuberculous mycobacterial disease in Suzhou region

Liu Jia, Xiao Yumei, Zeng Lingwu, Zhang Yaogang, Bao Ziwei, Wu Meiyang

Department of Pulmonary, Suzhou Fifth People's Hospital, Suzhou Affiliated Infectious Diseases Hospital of Soochow University, Suzhou 210000, China

Corresponding author: Wu Meiyang, Email: wu_my@126.com

【Abstract】 Objective To understand the etiological characteristics of nontuberculous mycobacteria (NTM) infection in Suzhou. **Methods** Patients with NTM disease diagnosed in Suzhou Fifth People's Hospital from January 2014 to January 2019 were retrospectively enrolled. Clinical information about age, gender was collected, and whole gene sequencing was used to analyze NTM positive samples from sputum, alveolar lavage fluid, cerebrospinal fluid, urine sediment, chest and ascites. Then, the gene evolutionary tree was established to analyze the homology between strains, and the whole genome collinear analysis was carried out on 100% homologous samples. **Results** There were 67 patients with NTM disease in Suzhou. The number of cases increased from 3 in 2014 to 22 in 2018, and the majority was *Mycobacterium intracellulare* infection (38 strains, 56.7%). The gene evolution tree revealed high homology among the strains of *Mycobacterium Kansasii*, and the gene collinearity range of strains from the same patient was high. **Conclusions** The number of patients with NTM disease in Suzhou is increasing year by year and the main pathogenic bacteria is *Mycobacterium intracellulare*. Close attention should be paid to the possibility of human-to-human transmission of *Mycobacterium Kansasii*.

【Key words】 Nontuberculous mycobacteria; Whole gene sequencing; Gene tree; Epidemiology; Etiology

Fund program: Suzhou Municipal Health and Family Planning Commission Science and Technology Project (LCZX201819, LCZX201918); Minsheng Science and Technology Project of Suzhou Municipal Science and Technology Bureau (SS2019010, SS2019074); Medical Device and New Medicine Project of Suzhou Science and Technology Bureau (SLT2021010)

DOI: 10.3760/cma.j.cn331340-20210930-00192

由于艾滋病的流行、人口老龄化、环境问题和免疫抑制剂的使用等相关因素的影响,近年来非结核分枝杆菌(NTM)致病率越来越高,在很多国家和地区已成为重要的公共卫生问题之一^[1-3]。NTM 病诊断困难且耐药率高^[2,4],导致诊疗难度加大。目前常规运用分枝杆菌培养法检测 NTM,虽然检测费用低,操作简便,但检测时间长,容易造成患者失访,导致治疗延误。随着生物信息学的迅速发展,全基因测序可以快速检测和鉴定 NTM^[5],已被越来越多地应用于临床,成为鉴定 NTM 的另一项“金标准”^[2,6-7]。本研究利用第二代全基因测序法来分析苏州地区 NTM 病的菌种分布及流行趋势,并通过基因进化树研究 NTM 病是否存在人际间传染的可能,为今后合理地诊疗 NTM 病提供参考,现报告如下。

对象与方法

一、研究对象

收集 2014 年 1 月至 2019 年 1 月就诊于苏州市第五人民医院诊断为 NTM 病患者信息,包括性别、年龄、居住地、职业等,同时收集患者痰、肺泡灌洗液、脑脊液、尿沉渣、胸腹水等样本,所有样本均经分枝杆菌培养提示阳性,同一患者相同样本来源仅选取 1 株。另选取 1 例患者不同时期 2 株菌株用于基因进化树中比对分析。本研究通过苏州市第五人民医院医学伦理委员会批准 [伦理审批号:(2021)院伦理审字(012)号]。

二、研究方法

1. 分枝杆菌培养

在样本瓶里加入等量的 4% 氢氧化钠(NaOH)处理液,混匀;取 5 mL 处理后样本置入 50 mL 已标记的离心管中,放入振荡器上强力涡旋振荡 30 min,混匀;在离心管中加入 pH 6.8 PBS 缓冲液至 40 mL 后离心 15 min,相对离心力 2 572×g;倒去上清液,加入 1~2 mL 的 PBS 缓冲液,中和 pH 至 6.8。样本接种前,在 BBL MGIT 培养管中先加入营养添加剂(OADC)和杂菌抑制剂(PANTA)混合添加剂 0.8 mL,抽取 0.5 mL 已处理样本注入 MGIT 培养管中,将接

种好的 MGIT 培养管放入 BACTEC MGIT 960 Tb 全自动分枝杆菌快速培养鉴定药敏仪(美国 BD 公司)中培养。

2. DNA 提取及测序

使用核酸提取试剂盒进行各类样本中 DNA 的提取(美国 BD 公司 MGIT 960 型全自动分枝杆菌检测仪),并进行扩增(杭州博日科技有限公司 PCR 扩增仪)。

将提取的 DNA 外送行全基因测序(杭州迪安检测公司),具体方法如下:(1)将 DNA 打断成约 400 bp 大小的片段,在 DNA 片段两端加上一定序列的接头,PCR 扩增进行文库的富集,Qubit 对纯化后的文库浓度进行检测,用 Agilent420 检测文库片段大小,用 Q-PCR 检测文库的摩尔浓度;(2)用 NaOH 进行 DNA 文库的变性,产生 DNA 单链,用 HT1 缓冲液将变性后的文库进行稀释至上机浓度;(3)Illumina[®] Nextseq 测序仪(美国 Illumina 公司)进行测序。

3. 全基因组共线性分析

对 2 组同源性 100% 的菌株进一步行全基因组共线性分析。使用 MUMmer 软件(Version 3.23)进行菌株比对,确定基因组间的大范围共线性关系,共线范围大,亲缘性更近。使用 LASTZ(Version 1.03.54)对区域间进行比对,确认局部位置排列关系,并从中查找易位、倒置、易位+倒置的区域,菌株间发生更少的易位、倒置,进化关系尺度更小。

三、统计学方法

采用描述性流行病学方法进行统计学分析,符合正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料采用例数、株数和率表示。

结 果

一、流行特征

共收集到 NTM 病患者 67 例,其中 2014—2018 年 64 例。2014—2018 年不同年份 NTM 病的分布情况详见表 1,表中可见检出数逐年增多,总体上女性多于男性,农村多于城市,职员发病率较少,基础疾病以合并糖尿病较常见。

表 1 苏州地区 2014—2018 年非结核分枝杆菌病患者分布情况 (n=64)

因素	例数 (例)	年份(年)				
		2014 (n=3)	2015 (n=6)	2016 (n=9)	2017 (n=24)	2018 (n=22)
性别(例)						
男	28	1	2	4	10	11
女	36	2	4	5	14	11
年龄(岁, $\bar{x}\pm s$)						
	74.0± 10.1	67.8± 11.5	68.9± 15.8	54.9± 13.6	57.4± 12.8	
居住地(例)						
农村	38	2	4	5	13	14
城市	26	1	2	4	11	8
职业(例)						
工人	11	0	1	2	5	3
职员	6	0	1	0	2	3
无业	47	3	4	7	17	16
合并疾病(例)						
糖尿病	12	1	2	2	3	4
高血压	7	0	1	1	2	3
自身免疫病	2	0	0	0	1	1

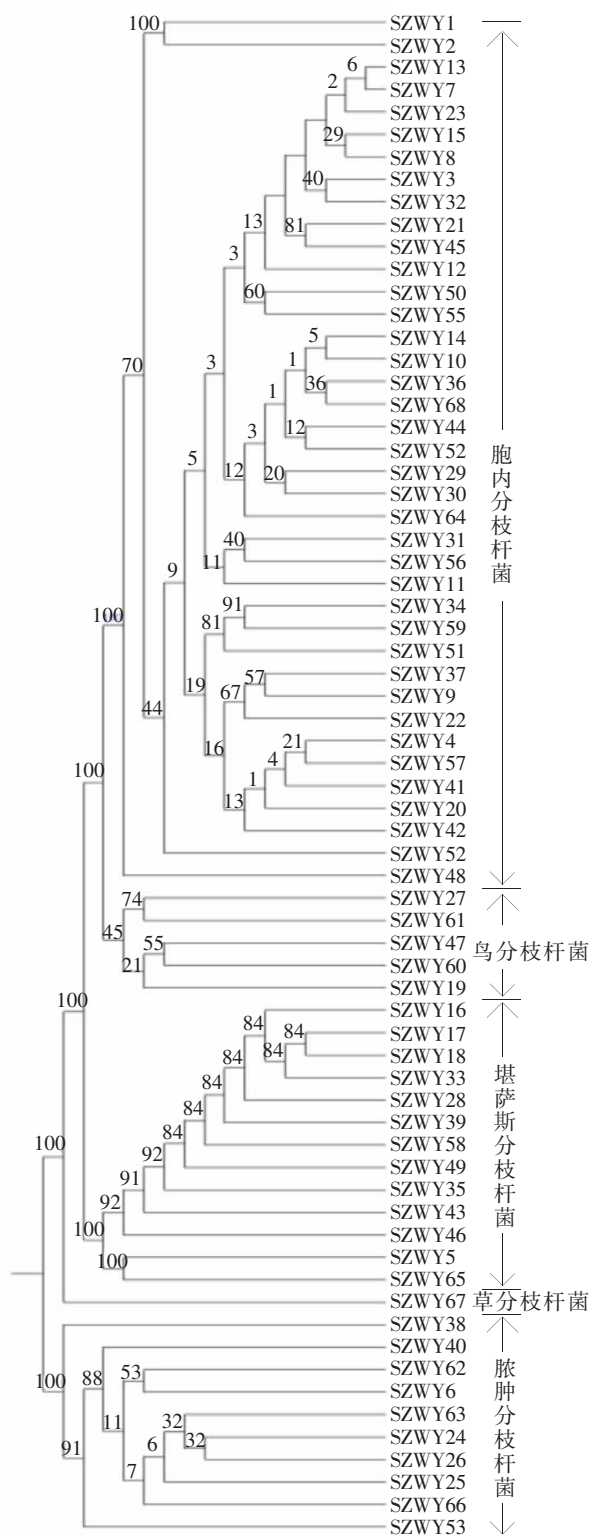
二、不同检测方法结果对比

67 株 NTM 菌株均采用全基因测序法检测、传统分枝杆菌培养结合 PCR 芯片技术检测。全基因测序法检测结果有胞内分枝杆菌 38 株 (56.7%), 堪萨斯分枝杆菌 13 株 (19.4%), 脓肿分枝杆菌 10 株 (14.9%), 鸟分枝杆菌 5 株 (7.5%), 草分枝杆菌 1 株 (1.5%)。传统检测法显示有 59 株菌种与全基因测序法一致, 另有 8 株结果不同, 全基因测序法与传统检验法的诊断一致率达 88.06% (59/67)。

三、基因进化树分析

68 株 (含 1 例患者不同时期 2 株菌株) NTM 菌株基因进化树分析见图 1。图 1 显示有 2 组菌株同源性均为 100%, 分别是 SZWY1 和 SZWY2 (同一患者不同时期菌株)、SZWY5 和 SZWY65 (不同患者菌株); 堪萨斯分枝杆菌菌株间的同源性高于胞内分枝杆菌菌株间、鸟分枝杆菌菌株间、脓肿分枝杆菌菌株间的同源性。

对 2 组同源性 100% 的菌株进行全基因组共线分析发现: SZWY1 和 SZWY2 的共线性范围明显大于 SZWY5 和 SZWY65, 且两组的变异均以易位基因为主。同一患者的共线范围大于不同患者, 亲缘性



注: 68 株菌株包含 1 例患者不同时期检出的 2 株 NTM; 样本名称从上往下读取, SZWY1~SZWY48 为胞内分枝杆菌, SZWY27~SZWY19 为鸟分枝杆菌, SZWY16~SZWY65 为堪萨斯分枝杆菌, SZWY67 为草分枝杆菌, SZWY38~SZWY53 为脓肿分枝杆菌; 分支上的数字表示分支同源性, 值越接近 100 表示同源性越高

图 1 68 株非结核分枝杆菌菌株基因进化树

更近,菌株间发生更少的易位、倒置,进化关系尺度更小,保留更多的保守区域,同一患者体内不同时期的菌株,更支持内源性复燃。

讨 论

NTM 具有地域性分布特征,好发于我国南方沿海地区^[8-9],据报道我国华北、东北地区 NTM 菌株以胞内分枝杆菌、鸟分枝杆菌为主^[8]。本研究统计共发现苏州地区有 5 种 NTM 菌种:分别为胞内分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、鸟分枝杆菌、脓肿分枝杆菌、草分枝杆菌,以胞内分枝杆菌为主,与既往本地区研究结果一致^[8]。

目前尚无研究支持 NTM 人与人之间具有传染性。本研究利用全基因测序结果,构建基因进化树发现,胞内分枝杆菌菌株间、鸟分枝杆菌菌株间、脓肿分枝杆菌菌株间同源性总体偏低,暂不支持人际传播,但本文发现堪萨斯分枝杆菌菌株之间同源性总体偏高,不排除有传染性可能。同一患者相隔 2 年提供的菌株分析显示,NTM 在人体内的变异较慢,考虑内源性复燃。另外发现 2 株菌株同源性为 100%,查阅 2 株菌株来源患者的临床资料,显示 SZWY5 株来源患者为男性,60 岁,苏州园区人,无业,SZWY65 株来源患者为女性,74 岁,苏州相城区人,农民,患者间无亲属关系,无明确接触史,有待搜集更多的临床资料做进一步验证。本文共线性分析说明同一患者不同菌株和不同患者不同菌株同源性虽为 100%,但共线性范围不同,同一患者比不同患者的亲缘性更近。

综上,随着近来对 NTM 的重视,全基因测序法将会越来越多地用于 NTM 的诊疗,NTM 患者的遗传学信息和基因变异信息也将趋于明朗^[9],以期为今后的临床诊疗及预后评价提供一定的理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 刘佳、吴妹英:直接参与、文章撰写、工作支持;肖玉梅、曾令武:文章撰写、工作支持;张耀刚:直接参与;包紫薇:直接参与、工作支持

参 考 文 献

- [1] 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. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-0939.2016.06.007.
- [2] 杨松,郭建琼,严晓峰,等.欧美 2020 年版《非结核分枝杆菌肺病临床实践指南》解读[J].中华结核和呼吸杂志,2021,44(8):699-704. DOI: 10.3760/cma.j.cn112147-20210222-00115.
- [3] 中华医学会结核病学分会.非结核分枝杆菌病诊断与治疗指南(2020 年版)[J].中华结核和呼吸杂志,2020,43(11):918-946. DOI: 10.3760/cma.j.cn112147-20200508-00570.
- [4] 中国研究型医院学会感染与炎症放射专业委员会,中华医学会放射学分会传染病学组,中国医师协会放射医师分会感染影像专业委员会,等.非结核分枝杆菌肺病影像诊断专家共识[J].中国研究型医院,2021,8(3):1-6. DOI: 10.19450/j.cnki.jcrh.2021.03.001.
- [5] 张宇晔,侯东妮,王苏珍,等.非结核分枝杆菌肺病临床分离株的菌种鉴定及临床特征分析[J].微生物与感染,2020,15(3):172-178. DOI: 10.3969/j.issn.1673-6184.2020.03.006.
- [6] 陈晓红,廖小琴,吴迪,等.福州地区非结核分枝杆菌肺病临床特征[J].中国感染控制杂志,2021,20(8):688-693. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20218191.
- [7] Yoon JK, Kim TS, Kim JI, et al. Whole genome sequencing of nontuberculous mycobacterium (NTM) isolates from sputum specimens of co-habiting patients with NTM pulmonary disease and NTM isolates from their environment[J]. BMC Genomics, 2020, 21(1):322. DOI: 10.1186/s12864-020-6738-2.
- [8] 钱宇迪,宋华峰,赵静,等.苏州地区 2015 年-2018 年间结核菌阳性患者中非结核分枝杆菌的检出及其耐药情况分析[J].抗感染药学,2020,17(5):656-658. DOI: 10.13493/j.issn.1672-7878.2020.05-008.
- [9] 陈曦,李自慧,潘丽萍,等.非结核分枝杆菌的基因组学[J].中华微生物学和免疫学杂志,2016,36(11):872-879. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-5101.2016.11.014.

(收稿日期:2021-09-30)