

广州市旧城区 1994 - 2003 年非结核分枝杆菌 流行状况分析

刘志辉 罗春明 蔡杏姗

【摘要】 目的 探讨近 10 年广州市旧城区非结核分枝杆菌(MOTT)流行状况及流行趋势。
方法 分析 1994 - 2003 年广州市结核病肺部肿瘤防治所结核专科门诊患者的分枝杆菌培养、分群鉴定、部分 MOTT 菌株耐药性测定及菌种鉴定情况。结果 检出 12 634 株分枝杆菌,其中 MOTT 794 株,其分离率为 6.28%,年分离率 3.51% ~ 10.06%,10 年上升幅度为 73.15%;对 613 株 MOTT 进行异烟肼(H)、利福平(R)、链霉素(SM)和乙胺丁醇(EMB)4 种主要抗结核药物耐药性测定,至少耐 R 和 H 的菌株 512 株,耐多药率为 83.5%,各年耐多药率 71.4% ~ 93.9%;菌种分布主要为致病性鸟-胞内、龟-脓肿分枝杆菌和瘰疬、偶发分枝杆菌等条件致病性 MOTT;45 岁以上年龄组为 MOTT 易感人群,55 ~ 65 岁为感染高峰,男女性别构成平均为 3.36:1。结论 10 年来,广州市旧城区人口 MOTT 流行情况及长期变异趋势和全国水平相当,但分离率呈大幅上升趋势,主要为致病性菌种,并具有极高的耐药率,故对 MOTT 致病的流行病学研究应纳入国家结核病控制规划。

【关键词】 结核病;分枝杆菌;菌种鉴定

Analysis on the current situation of *Mycobacteria* other than tuberculosis during 1994 - 2003 in the old city area of Guangzhou LIU Zhi-hui*, LUO Chun-ming, CAI Xing-shan. *Department of Clinical Laboratory, Guangzhou Chest Hospital, Guangzhou 510095, China

【Abstract】 Objective To analyze the current situation and trend of *Mycobacteria* other than tuberculosis(MOTT) in the old city area of Guangzhou and to provide information for diagnosis, treatment and policy on tuberculosis(TB) control in the city. **Methods** Relevant data regarding *Mycobacteria* culture, species identification and drug-resistance from out-patients under suspicion of having pulmonary tuberculosis seen at our TB and Pulmonary Tumor Control Institute, was analyzed retrospectively during 1994 - 2003. **Results** A total number of 12 634 strains of *Mycobacteria* were isolated and 794 strains were identified as MOTT which accounted for 6.28% of the isolated strains during the ten years. The annual isolation rates of MOTT were between 3.51% and 10.06%. When compared with 1994, the rates of isolation on MOTT had increased 73.15% in 2003, i. e. from 5.81% in 1994 to 10.06% in 2003. 512 strains were not susceptible at least to rifampin and isoniazid out of 613 MOTT strains tested for drug susceptibility to isoniazid, rifampin, streptomycin sulfate and ethambutol. The average rate of multi-drugs resistance of these strains was 83.5%, and the annual rates were between 71.4% and 93.9%. Based on the results of species identification on 136 strains of MOTT in 2003, most of them belonged to pathogenic/opportunistic species of *Mycobacteria*. All together, 30 strains of *M. abscessus*, 26 of *M. intracellulare*, 17 of *M. smegmatis*, 14 of *M. scrofulaceum*, 11 of *M. avium*, 5 of *M. kansasii* and *M. chelonae* and *M. fortuitum* respectively, 4 of *M. nonchromogenicum*, 2 of *M. triviale* and 1 of *M. aurum* were identified. People at 45 years of age or older, with 55-65 the most, were more susceptible to MOTT than other age groups. Sex ratio was 3.36 to 1. **Conclusion** Based on information from the Third National Tuberculosis Epidemiology Survey in 1990 and the Fourth one in 2000, the current situation and trend of MOTT were nearly the same in the old city area of Guangzhou during 1994 - 2003. However, the rising tendency of rate of isolation, mainly consisted of opportunistic pathogens and the surprisingly high rate of multi-drugs resistance to MOTT all call for special attention. Studies regarding the epidemiology of MOTT should be posed and implemented in the National TB Control Program.

【Key words】 Tuberculosis; *Mycobacteria*; Species identification

非结核分枝杆菌 (*Mycobacteria other than tuberculosis*, MOTT) 感染患者的临床症状及病理变化与结核病极为相似, 但前者抗结核治疗效果不佳, 而细菌学检查最终确定为 MOTT 致病的病例在临床上已不少见, 且非结核分枝杆菌病与人类免疫缺陷性疾病的相关性及两者间的互相促进, 使前者发病有不断增多的趋势^[1]。因此, MOTT 致病已成为结核病诊疗及控制的重要课题。由于我国对 MOTT 的调查、研究起步较晚, 加之实验方法繁杂, 目前国内鲜见 MOTT 流行状况及流行趋势分析的系统文献报道。为了解广州市旧城区人口的 MOTT 流行状况及未来趋势, 我们对 1994 - 2003 年广州市胸科医院结核病肺部肿瘤防治所实验室分枝杆菌培养、药敏和菌种鉴定资料进行分析, 结果报道如下。

材料与方法

1. 分析资料: 主要来源于 1994 - 2003 年广州市胸科医院结核病肺部肿瘤防治所实验室分离培养的 12 634 例分枝杆菌培养阳性病例的临床分离株实验登记资料, 必要时查阅相关临床登记资料。其中, 若同一病例多次培养阳性且分群鉴定结果相同者按 1 例计。

2. 实验方法: 分枝杆菌培养、分群鉴定及耐药性测定均应用 BACTEC TB-460 系统, 分群鉴定应用对-硝基-乙酰胺基苯丙酮生长试验, 耐药性测定同结核分枝杆菌测定方法, 测定异烟肼 (H)、利福平 (R)、链霉素 (SM)、乙胺丁醇 (EMB) 四种药物, 菌种鉴定则同时应用 2 种方法进行: 一是应用生化反应和培养特性的传统方法按 1996 年中国防痨协会制订的“结核病诊断细菌学检验规程”^[2,3] 进行鉴定; 二是应用气相色谱技术分析分枝杆菌全细胞脂肪酸进行分枝杆菌菌种鉴定, 以确保实验的准确性。

3. 相关定义: ①分离率是指分枝杆菌培养阳性人群中 MOTT 的百分率; ②耐多药的判定是按当前通用的耐多药结核病定义予以扩展^[4], 以至少耐 R 和 H 者为耐多药 MOTT。

结 果

在 12 634 例分枝杆菌培养阳性病例中共分离到 MOTT 794 株。MOTT 年分离率在 3.51% ~ 10.06% 之间, 平均为 6.28% (表 1)。10 年间, MOTT 分离率呈总体上升变化趋势, 由 1994 年的

5.81% 上升至 2003 年的 10.06%, 上升幅度达 73.15%。

表1 1994 - 2003 年广州市旧城区结核专科门诊患者感染 MOTT 情况

年份	分枝杆菌株数	MOTT	
		株数	分离率 (%)
1994	1240	72	5.81
1995	1122	52	4.63
1996	1266	45	3.55
1997	1241	77	6.20
1998	1280	45	3.51
1999	1297	75	5.78
2000	1318	103	7.81
2001	1238	87	7.03
2002	1280	102	7.97
2003	1352	136	10.06

耐药性测定只在部分菌株中进行, 在测定的 613 株 MOTT 临床分离株中, 至少耐 H、R 者 512 株, 平均耐多药率为 83.5%; 以年度计, MOTT 耐多药率为 71.4% ~ 93.9% (表 2)。观察其耐多药率的长期变异, 呈总体上升变化趋势: 耐多药率从 1994 年的 71.4% 上升至 2003 年的 91.8%, 上升幅度为 28.6%。

表2 1994 - 2003 年广州市旧城区结核专科门诊患者 MOTT 分离株药敏测定

年份	测试株数	耐多药株数	耐多药率 (%)
1994	42	30	71.4
1995	30	26	86.7
1996	42	30	71.4
1997	67	52	77.6
1998	33	25	75.8
1999	56	47	83.9
2000	89	71	79.7
2001	65	61	93.9
2002	92	81	88.0
2003	97	89	91.8

2003 年以前, 由于业务开展条件的制约, 广州市胸科医院结核病肺部肿瘤防治所实验室只对分枝杆菌临床分离株进行分群鉴定。因此, 本文资料仅对 2003 年的 136 株 MOTT 进行了菌种鉴定, 共鉴定出 12 个菌种, 其中致病性的鸟-胞内分枝杆菌和龟-脓肿分枝杆菌占多数, 菌种分布情况见表 3。

患者年龄曲线呈单峰负偏态分布, 25 岁以下患者少见, 45 岁以上患者多见, 峰位在 55 ~ 65 岁, 各年间变化不大 (表 4)。

MOTT 分离率男性高于女性, 比值在 2.46 ~

4.03 之间,10 年平均比值为 3.36,10 年间性别模式变化不显著(表 5)。

表3 2003 年 136 株 MOTT 菌种分布

MOTT 分型	株数	构成比 (%)	MOTT 分型	株数	构成比 (%)
缓慢生长型			快速生长型		
胞内	26	19.1	脓肿	30	22.1
瘰疬	14	10.3	耻垢	17	12.5
戈登	11	8.1	偶发	10	7.4
鸟	11	8.1	龟	5	3.7
堪萨斯	5	3.7	金色	1	0.7
不产色	4	2.9			
次要	2	1.5			
合计	73	53.7	合计	63	46.3

讨 论

由于实验条件、人力资源、控制管理等因素的制约,我国对 MOTT 的研究起步较晚,目前我国鲜见 MOTT 流行状况及流行趋势的系统资料。1990、2000 年两次全国结核病流行病学抽样调查(流调)资料显示,我国的 MOTT 分离率分别为 4.9% 和 11.1%^[5],与其相比较,我们的结果表明:广州市旧城区结核专科门诊患者的 MOTT 流行情况及长期变异趋势和全国水平相当。而广东作为“世界银行贷款结核病控制项目”省,在此时期采取了强有力的结核病归口管理措施,因此,在相当的程度上结核专科门诊患者的 MOTT 流行状况可以反映广州市旧城区人口 MOTT 的流行情况,即广州市旧城区 MOTT 的流行状况及长期变异趋势与全国水平相当。广州市地处热带沿海,属于 MOTT 高感染地区,但并未呈现相对全国而言较高的 MOTT 分离率,可能与其疾病控制水平、经济生活条件有关。另

外值得一提的是:虽然我们的实验方法与流调不同(流调主要采用对-硝基苯甲酸培养基分群),但刘晓雪等^[6]的研究结果证明两者具有很高的符合率,因此两种方法结果具有高度的可比性。

从 MOTT 菌种分布情况看,本文结果显示广州市旧城区人口感染的菌种主要为致病性 MOTT(如鸟-胞内分枝杆菌和龟-脓肿分枝杆菌)和条件致病性 MOTT(如瘰疬、偶发分枝杆菌),与 2000 年流调资料所显示的菌种分布大不相同,其分离到的最多菌种为土地不产色分枝杆菌(8/49),而鸟-胞内、龟-脓肿分枝杆菌则较少(均为 4/49)^[5]。从易感者看,本文结果显示广州市旧城区 MOTT 易感人群为 45 岁以上人群,尤以男性为最,年龄构成和流调结果大致相仿。就 MOTT 感染者的治疗而言,MOTT 对多数抗结核药物敏感性差,许多药物对其只起到抑菌作用,这已是不争的事实,但在未发现更有效的治疗药物之前,目前仍以抗结核药物的联合应用为主,因此,其耐药性测定对指导临床治疗仍具有重要意义。

总之,MOTT 分离率的大幅上升趋势、主要为致病性菌种的 MOTT 菌种分布和极高的耐药率必须引起高度警觉,有必要把 MOTT 的感染监测及防控策略纳入结核病防治规划中。MOTT 广泛分布于自然界,从土壤、尘埃、草木、沼泽、牛奶、人畜粪便等中都可分离出 MOTT,地理环境、气候、土壤、温度等条件的不同,MOTT 的菌种分布也不相同。因此,从流行病学观点出发,多学科、全方位和临床、基础、流行病学相结合,努力探讨我国及各个地区 MOTT 的感染分布及流行特点,为全面防治 MOTT 致病提供科学依据,应成为现时结核病控制的重大课题。否则,在不久之将来,我们将难以应对疫情不明、种类多样、难防难治的 MOTT 致病。我国目前

表4 1994 - 2003 年广州市旧城区结核专科门诊 MOTT 阳性患者不同年龄组分布

年份	年 龄 组 (岁)							
	0~	15~	25~	35~	45~	55~	65~	75~
1994	0(0.00)	1(1.39)	3(4.17)	8(11.11)	7(9.72)	42(58.33)	8(11.11)	3(4.17)
1995	0(0.00)	0(0.00)	3(5.77)	7(13.46)	9(17.31)	26(50.00)	6(11.54)	1(1.92)
1996	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	3(6.67)	7(15.56)	22(48.89)	5(11.11)	8(17.78)
1997	0(0.00)	1(1.30)	5(6.49)	6(7.79)	15(19.48)	39(50.65)	10(12.99)	1(1.30)
1998	0(0.00)	0(0.00)	1(2.22)	2(4.44)	6(13.33)	28(62.22)	4(8.89)	4(8.89)
1999	0(0.00)	2(2.67)	0(0.00)	8(10.67)	14(18.67)	40(53.33)	7(9.33)	4(5.33)
2000	0(0.00)	0(0.00)	4(3.88)	7(6.80)	21(20.39)	51(49.51)	11(10.68)	9(8.74)
2001	0(0.00)	3(3.45)	2(2.30)	5(5.75)	4(4.60)	49(56.32)	10(11.49)	14(16.09)
2002	0(0.00)	0(0.00)	5(4.90)	9(8.82)	21(20.59)	44(43.14)	12(11.76)	11(10.78)
2003	0(0.00)	0(0.00)	4(2.94)	9(6.62)	31(22.79)	60(44.12)	16(11.76)	16(11.76)

注:括号外数据为病例数,括号内数据为阳性率(%)

表5 1994-2003年广州市旧城区结核专科门诊
MOTT 阳性患者性别构成

年份	性 别		
	男	女	男:女
1994	57	15	3.80
1995	39	13	3.00
1996	34	11	3.09
1997	61	16	3.81
1998	32	13	2.46
1999	55	20	2.75
2000	77	26	2.96
2001	68	19	3.58
2002	80	22	3.64
2003	109	27	4.03

此方面的情况是基础薄弱、重视不够、成果鲜见,必须从此正视。笔者认为:在我国结核病控制网络日益健全的今天,在县级结核病防治机构建立分枝杆菌培养、菌种鉴定实验室,并将分枝杆菌培养及菌种鉴定作为结核专科门诊患者的常规检验项目,则可较好地完成该地区 MOTT 疫情监测任务,再集中各

地资料可以准确把握全国情况。当然,对疫情的了解和把握仅是对 MOTT 致病防制的开始,快速准确的诊断方法、有效的预防措施、高效化疗药物的探索都是当前亟待解决的课题。

参 考 文 献

- 1 李一耕. 非结核分枝杆菌病. 见: 谢惠安, 阳国太, 林善梓, 等主编. 现代结核病学. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 390-392.
- 2 中国防痨协会. 结核病诊断细菌学检验规程. 中国防痨杂志, 1996, 18: 28-31.
- 3 中国防痨协会. 结核病诊断细菌学检验规程. 中国防痨杂志, 1996, 18: 80-85.
- 4 周冕. 耐药性结核病. 见: 严碧涯, 端木宏瑾, 主编. 结核病学. 北京: 北京出版社, 2003. 594.
- 5 姜广路, 王苏民, 刘宇红, 等. 2000 年结核病流行病学调查关于分枝杆菌菌种鉴定及其分析. 见: 中华人民共和国卫生部, 编著. 2000 年全国结核病流行病学抽样调查资料汇编. 北京: 人民卫生出版社, 2003. 60-65.
- 6 刘晓雪, 丁北川, 安燕生. 对-硝基苯甲酸(PNB)替代 BACTEC460 NAP 进行分枝杆菌分群的初步研究. 中国防痨杂志, 1996, 18: 23-25.

(收稿日期: 2004-10-21)

(本文编辑: 张林东)

· 疾病控制 ·

用分子生物学方法确诊一例登革 1 型病毒感染病例

王军军 任瑞文 田小东 方美玉 洪文艳

2004 年 8 月广州军区总医院收治 1 例登革热 (DF) 疑似病例, 我们用逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 方法进行了确诊与分析。

1. 对象与方法: 标本来自广州军区总医院收治的一例 1 岁疑似 DF 患者。患者的血清置 -70℃ 低温冰箱保存。根据参考文献我们设计了登革病毒 (DEN) 1~4 型鉴定引物。病毒 RNA 的制备应用碘酸钠法制备。RT-PCR 扩增: 用所提取的病毒 RNA 为模板, 用 MmuLV RT/PCR Kit 反转录试剂盒进行 RT-PCR 反应; 严格按试剂盒说明书操作。反应条件为: 94℃ 5 min, 然后 94℃ 30 s, 55℃ 45 s, 72℃ 120 s, 循环 30 次, 最后一次循环后 72℃ 延伸 10 min。反应结束后, 取 10 μl PCR 后的产物电泳。扩增到的目的基因片段经纯化、回收, 再克隆入 pMD18-T 载体, 并转化到 JM109 宿主菌, 于 37℃ 培养过夜, 挑取白色菌落至 5 ml 加入 AMP^r 抗性的 LB 培养基中, 扩大培养后提取质粒, 经 PCR 鉴定后, 送交测序; 利用 DNASIS 软件把 2004 年病毒的测序结果与 1995、1997、1999、2003 年测定的 DEN 1 型流行株非结构蛋白 NS2a~NS2b 的部分序列进行同源性比较。

2. 结果: 用 DEN 1~4 型特异性引物进行 RT-PCR 扩增,

只有 DEN 1 型特异引物扩增到了 295 bp 的片段, 证明本例感染为 DEN 1 型所致; 序列分析比较, 非结构蛋白 NS2a~NS2b 同源性分析结果显示, 该例感染病毒与我国广东省 1995、1997、1999、2003 年 DEN 1 型流行株的同源性分别为 90.8%、97.6%、100%、98.6%。

3. 讨论: 直接从患者血清中提取 RNA, 再进行 RT-PCR 对病毒基因片段进行扩增, 然后对目的片段进行克隆、测序、分析比较等分子生物学方法, 可直接确诊 DEN 感染和鉴定病毒感染型别, 而且具有快速、敏感、准确等优点。通过对近年来我们所收集的 DEN 1 型流行株非结构蛋白 NS2a~NS2b 序列的比较分析发现, 此例感染与 1999 年的 DEN 1 型中山市流行株非结构蛋白 NS2a~NS2b 的部分序列完全相同, 同源性达 100%; 与 2003 年广州市和 1997 年潮州市的序列同源性也达 99.6% 和 96.6%; 根据国际上 Deubel 等对 DEN 分型的方法, 以核苷酸序列差异在 6% 以上作为 DEN 基因分型的标准, 2004、2003、1999、1997 年和柬埔寨流行株可定为同一基因型; 根据广东省近年 DEN 1 型流行株高同源性的特点, 初步推断, 在我国可能已存在 DEN 1 型的疫源地, 但仍需进一步研究证实。

(收稿日期: 2004-11-04)

(本文编辑: 尹廉)