

· 现场调查 ·

深圳地区生态环境中非结核分枝杆菌分布状况调查

林世平 杨应周 谭卫国 程锦泉 罗道泉

【摘要】 目的 调查广东省深圳地区生态环境中非结核分枝杆菌 (NTM) 分布及其药敏情况。**方法** 对采集到的 145 份环境样品按《结核病诊断实验室检验规程》进行 NTM 分离培养、鉴定和药敏试验。**结果** 145 份样品中共检出 NTM 53 株, 其中医院处理前地下水检出 6 株, 处理后地下水检出 4 株; 医院空调过滤网灰尘检出 4 株; 居民生活污水检出 34 株; 海水检出 3 株; 人工喷泉水检出 2 株; 检出的细菌有: 无色分枝杆菌、鸟分枝杆菌、偶发分枝杆菌、戈登分枝杆菌、日内瓦分枝杆菌、龟分枝杆菌和胞内分枝杆菌。**结论** NTM 在深圳市自然环境中普遍存在, 且对抗结核药物有较高耐药性。

【关键词】 非结核分枝杆菌; 环境; 鉴定; 药物敏感试验

An epidemiological study on the ecological environment related to *Nontuberculous mycobacteria* in Shenzhen city of Guangdong province LIN Shi-ping, YANG Ying-zhou, TAN Wei-guo, CHENG Jin-quan, LUO Dao-quan. Shenzhen Municipal Center for Prevention and Control of Chronic Diseases, Shenzhen 518020, China

【Abstract】 Objective To investigate the distribution of *Nontuberculous mycobacteria* in the environment of Shenzhen city and its related sensitivity to drugs. **Methods** 145 samples in the environment of Shenzhen city were collected and the samples were isolated, identified and its drug sensitivity were detected according to the "Procedure of Bacteriological Determination Regulation for Tuberculous Diagnosis", issued in 1995 by the Antituberculosis Association of China. **Results** All together, 53 strains of *Mycobacteria* were detected from the 145 sample, including 6 of them isolated from the polluted water in the hospital before disinfected, 4 from the polluted water in the hospital after disinfected, 4 from the dirt of air condition in the hospital, 34 from the polluted water in the residential area, 3 from the ocean water and 2 from the fountain. *M. nonchromogenicum*, *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. genavense*, *M. chelonae* and *M. intracellulare* were identified. **Conclusion** *Nontuberculous mycobacteria* seemed to widely exist in the environment of Shenzhen city and the ratio of drug-resistant was high. Attention should be paid to the influence of *Nontuberculous mycobacteria* on humans in order to formulate effective control measure.

【Key words】 *Nontuberculous mycobacteria*; Environment; Identification; Drug sensitivity test

非结核分枝杆菌 (*Nontuberculous mycobacteria*, NTM) 是指结核分枝杆菌复合群和麻风分枝杆菌以外的其他分枝杆菌^[1]。NTM 是一群广泛存在于污水、土壤、海水、自来水及气溶胶中的细菌。近年来国外 NTM 病的发病率日益提高^[2-4], 国内由 NTM 引起的肺病散发及流行也屡有报道^[5-9], 为此于 2005 年 6 月对深圳市生态环境中 NTM 分布状况进行了调查, 并对所分离的 NTM 菌株进行鉴定及药物敏感试验。

材料与方法

1. 样品采集:

(1) 环境样品的采集: 深圳地区生活污水样品在居民区明沟及肉菜市场明沟污水中用无菌吸管吸取, 每个样品采集 20 ml 于无菌带盖试管内; 医院地下水 (处理前及处理后)、海水、游泳池水及人工喷泉水用 50 ml 灭菌试管采集, 每个样品采集 100 ml。

(2) 医院空调样品采集: 将空调过滤网取下, 用无菌棉签蘸取生理盐水洗下网上附着物于无菌试管内。将采集的样品放入 4~8℃ 冰箱自然沉淀 48 h 后弃去沉淀, 将上层混悬液倒于另一试管内, 10 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 加入适量 20% NaOH 充分混匀, 室温放置 20 min。

2. 分离培养方法: 经过前处理的样品接种酸性罗氏培养基 2 支, 每支 0.1 ml, 置 37℃ 培养箱培养, 3 d

观察一次结果直到 8 周。再取前处理样品,加入适量 PBS 洗涤中和后取 0.5 ml 接种于专用分枝杆菌培养管内,置 BD960 快速培养仪内培养并记录结果。

3. 分枝杆菌鉴定方法:

(1)BD960 培养仪法:BD960 培养仪自动提示阳性者,对其培养物涂片抗酸染色,证实为抗酸杆菌并观察菌体形态及是否形成索状后,接种中性罗氏培养基 3 支;对硝基苯甲酸(PNB)、噻吩-2-羧酸肼(TCH)各 1 支,置 37℃ 培养箱内每 3 d 观察一次结果,到 30 d 为止。

(2)酸性罗氏培养基上生长的菌落经涂片证实为抗酸杆菌后,挑取菌落,经研磨后制成 10^{-2} mg/ml 菌悬液,接种中性罗氏培养基 3 支,PNB 及 TCH 培养基各 1 支,置培养箱中每 3 d 观察一次结果,到 30 d 为止。

(3)菌落生长特性:观察菌落在 37℃、22℃ 培养生长情况、对光产色性质及 PNB、TCH 培养基生长情况,同时观察菌落形态和菌落颜色。

(4)气相色谱分析:对确认所分离的抗酸杆菌分别接种至 7H₁₀ 培养基,收集菌落于试管内,加 1 ml 皂化剂,100℃ 水浴后置冷水中冷却,再加甲醇使之二甲酯化并用正己烷乙醚等量混合液提取脂肪酸,经氢氧化钠碱洗后,采用 HP6890 气相色谱仪(HP 公司产品)进行检测,同时用 Sherlock 2.95 软件系统(MIDI 公司)进行数据分析处理。

(5)药物敏感试验:按中国防痨协会 1995 年 11 月公布的《结核诊断细菌学检验规程》绝对浓度法进行。试验 10 种药物:异烟肼(TNH)、链霉素(SM)、对氨基水杨酸钠(PAS)、乙胺丁醇(EMB)、利福平(RFP)、丙硫异酰胺(TH)、卡那霉素(KM)、卷曲霉素(CPM)、氧氟沙星(OF)及利福喷丁(RFT)。

结 果

1. 样品 NTM 检测情况:在采集的 145 份样品

中共检出 NTM 53 株,阳性率为 37%;医院空调过滤网标本 32 份,检出 4 株(鸟和偶发分枝杆菌各 1 株、戈登分枝杆菌 2 株);医院处理前污水标本 7 份,检出 6 株(3 株无色分枝杆菌,鸟、偶发和日内瓦分枝杆菌各 1 株);医院处理后污水标本 7 份,检出 4 株(均为无色分枝杆菌);居民生活区明沟污水标本 64 份,检出 34 株(无色 26 株、鸟 10 株、偶发 7 株、戈登 5 株、胞内 1 株、龟和日内瓦分枝杆菌各 2 株);海水标本 10 份,检出 3 株(偶发、胞内和龟分枝杆菌各 1 株);人工喷泉水标本 14 份,检出 2 株(鸟和戈登分枝杆菌各 1 株);游泳池水标本 11 份,未检出。53 株分枝杆菌中检出色 26 株、鸟 10 株、偶发 7 株、戈登 5 株、胞内 1 株、龟 2 株、日内瓦 2 株。

2. 细菌生长特性及在鉴别培养基上生长状况:细菌生长特性按 Runyon 分类法,53 株 NTM 中 Runyou II 群 5 株、III 群 39 株、VI 群 7 株,在 VI 群速生菌中主要以偶发和龟分枝杆菌为主,在液体培养基中有 4 株形成索状生长。53 株菌均可在 TCH 培养基上生长,有 8 株菌在 PNB 培养基上不生长;该菌对生长温度的要求:有 50 株菌可在室温中生长,仅 3 株不生长。除 5 株戈登分枝杆菌菌落呈橘黄色外,其他菌株均为灰白至淡黄色。53 株菌株均未见光产色。53 株 NTM 中缓生菌占 83%,速生菌较少,菌落颜色以灰白至淡黄色为主,95% 菌株在 22℃ 能生长。所有菌株稍研磨后均能在 PBS 缓冲液呈均匀浑浊,而人和牛结核杆菌不能形成此现象。有 8 株菌株在鉴别培养基 PNB 上不生长。

3. 药物敏感试验:所分离的菌株对主要抗结核药物(I、S、R、E)均呈耐药,53 株菌株对 PAS 呈高度耐药,唯日内瓦分枝杆菌菌株对 SM 敏感。对 KM、CMP、OF 多呈敏感(表 1)。通过表 1 可看出 7 种菌株间药敏试验各有差异,主要是在 SM、EMB、TH 3 种药物高低浓度之间的差异,统计数据按平均数计算。

表1 深圳市 NTM 分离株药物敏感试验结果

分枝杆菌	INH		SM		PAS		EMB		RFP		TH		KM		CMP		OF		RFT	
	1	10	10	100	1	10	5	50	50	250	10	100	10	100	10	100	10	100	10	100
无色	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
偶发	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
鸟	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
龟	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
戈登	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+
日内瓦	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+
胞内	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+

注:表中数字计量单位为 μg/ml;“+”耐药,“-”敏感

讨 论

NTM 在我国流行特点是东南沿海气候温暖的海南、福建地区感染率高于气候寒冷的北方^[10]。深圳市地处南方沿海,常年气温较高,近年来该市 NTM 感染的病例有增多趋势^[11],由 NTM 造成的院内感染也时有发生。本次采集 145 份样品进行 NTM 阳性率达到 37%,证实 NTM 的确广泛存在于深圳地区各种不同环境中。从 53 株 NTM 在不同环境中的分布可以看出,未经处理的医院地下水有 86% 存在 NTM,经处理后,仍有 58% 被检出,说明医院处理地下污水的消毒杀菌剂未能有效杀灭 NTM。在医院空调过滤网标本中检出 4 株菌,深圳地区气温较高,使用空调时间长,过滤网将成为 NTM 滋生的场所,也是造成院内感染的危险因素;提示应加强医院空调过滤网的消毒。

研究显示,NTM 检出较多的是居民区生活污水,阳性率达到 55%,有 6 种菌株分布在污水中,特别是分离到 1 株日内瓦分枝杆菌。该菌能引起弥散感染合并 AIDS 且死亡率高^[12,13]。一般认为,海水是堪萨斯分枝杆菌的自然产生地;而本次从海水分离到是我国临床上常见的胞内和偶发分枝杆菌。应引起重视的是,从 14 份人工喷泉水分离到 2 株 NTM,喷泉水雾具有极小的微粒,若水中存在 NTM 则很容易被人吸入而导致感染。人工喷泉水按规定应定期投放消毒剂,但真正执行者极少,基本上呈无人监管状态。

林世平等^[14]曾提出在所制定的结核诊断细菌学检验操作规程中以 PNB 培养基作为 NTM 的筛选可能会大量漏检 NTM。本研究中有 12% 菌株在 PNB 上不生长,而 95% NTM 可在 22℃ 生长,且 100% 菌株的菌落易于混悬在 PBS 缓冲液中,若以上述这两项试验代替 PNB 试验作为 NTM 的筛选似乎更为理想,且操作简易,易于在基层实验室应用。但需要更多的研究来验证。

53 株 NTM 菌体形态(液体培养基中)主要是球杆状和短杆状。结核杆菌是典型的杆状,此点也是 NTM 与结核菌群区别特征之一^[14]。在液体培养基中结核杆菌可形成索状生长,而 NTM 则很少形成,试验中发现有 4 株可形成索状生长(2 株戈登、2 株鸟分枝杆菌)。Middlebrook 等在 1947 年发现索状因子,注意到强毒菌株及人、牛型结核杆菌在人工培养中有规律地索状生长,而减毒或无毒的菌

株则否。当然,不能说分枝杆菌形成索状生长就肯定有致病力,但若从环境中分离到菌株有此现象的可以推断这些菌株毒力较强。

许多 NTM 对抗结核药物呈现天然的抗药性^[15],本文所分离到的菌株对 INH、PAS、RFP、RFT 呈高度的耐药性,对 SM、EMB、TH 等的耐药性也较高。只对 KM、CMP 及 OF 较敏感。另外从 7 种 53 株 NTM 药敏情况来看,除对 PAS、INH、RFP、RFT 低浓度与高浓度的耐药率较一致外,对其他 6 种药的耐药情况是低浓度比高浓度的耐药率高得多,提示在治疗中增加药物的剂量,对 NTM 病可能会取得较佳的临床效果。

目前,伴随着 AIDS 发病率的增加,合并 NTM 也有逐步增高的趋势,特别是由堪萨斯、鸟和胞内分枝杆菌引起的肺部感染,已成为世界上的重要疾病之一,其临床症状和胸部 X 线表现难与肺结核病相区别^[16]。

参 考 文 献

- [1] 中华医学会结核病学分会. 非结核分枝杆菌病诊断与处理指南. 中华结核和呼吸杂志, 2000, 23 (11): 650-653.
- [2] 王忠仁, 张宗德, 张本. 非结核分枝杆菌病的流行趋势. 中华结核和呼吸杂志, 2000, 23 (5): 263-265.
- [3] Sakatani M. Nontuberculous mycobacteriosis: the present of epidemiology and clinical studies. Kwkkaku, 1999, 74 (3): 377-384.
- [4] Folkinham JD. Epidemiology of infection by Nontuberculosis mycobacterial, geographic distribution in the Eastern U. S. Am Rev Resp Dis, 1980, 121: 931-937.
- [5] 吴龙章, 蔡杏珊, 关玉华, 等. 66 例非结核分枝杆菌肺病的临床分析. 中国防痨杂志, 2003, 25(4): 257-259.
- [6] 夏祥新, 桂晓红. 非结核分枝杆菌肺病 96 例临床分析. 中华结核和呼吸杂志, 1999, 22(4): 239-241.
- [7] 黄明忠, 蒋克琨. 非结核分枝杆菌肺病 48 例诊治体会. 重庆医学, 2002, 31(8): 758-759.
- [8] 杨凤娥, 李跃明. 非结核分枝杆菌肺病临床分析. 福建医药杂志, 2003, 25(6): 90-91.
- [9] 胡忠义. 非结核分枝杆菌与医院感染的暴发流行和预防控制. 疾病控制杂志, 2002, 4 (4): 350-353.
- [10] 王忠仁, 张宗德, 张本. 非结核分枝杆菌的流行趋势. 临床肺科杂志, 2000, 2(5): 83-85.
- [11] 谭卫国, 杨应周, 罗道泉, 等. 深圳市结核耐药状况分析. 中华检验医学杂志, 2005, 8(28): 1-6.
- [12] 熊礼宽. 结核病实验诊断学. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 6.
- [13] American Thoracic Society. Diagnosis and treatment of disease caused by Nontuberculous mycobacteria. Am J Respir Crit Care Med, 1997, 156 Suppl: S1-25.
- [14] 林世平, 杨应周, 谭卫国. 牛鼻腔分泌物非结核分枝杆菌分离培养结果分析. 中国热带医学, 2005, 5(6): 1207-1209.
- [15] Lelany PG, Ferrera A, Galvez CA, et al. Drug-resistant Mycobacterium tuberculosis and Atypical mycobacteria isolated from patients with suspected pulmonary tuberculosis in Honduras. Chest, 1997, 111: 148-153.
- [16] Mcfadden JJ, Kunze ZM, Portaels F, et al. Epidemiological and genetic markers, virulence factors and intracellular growth of M. Avium in AIDS. Res Microbiol, 1992, 143: 423.

(收稿日期: 2006-06-30)

(本文编辑: 尹廉)