

HIV/AIDS 合并分枝杆菌感染的菌种分离、鉴定及耐药性研究

刘淑梅* 赵秀英**

(首都医科大学教学医院北京丰台医院*北京 100071, 首都医科大学附属佑安医院**,
Beijing, 100069.)

摘要: 目的 监测并分析我市人类免疫缺陷病毒感染者或获得性免疫缺陷综合征患者(HIV/AIDS)合并分枝杆菌感染情况、菌种谱特征及耐药性,为临床确定诊断、流行病学分析及治疗评估提供理论依据。**方法** 收集 HIV/AIDS 疑似合并分枝杆菌感染患者标本 410 人份(其中血液培养标本 98 人份,局部标本 312 人份),进行分枝杆菌的菌种分离。将分离出的分枝杆菌与首都医科大学附属地坛医院选择 HIV/AIDS 疑似合并分枝杆菌感染患者标本以同样方法分离出的 60 株分枝杆菌传代培养,选择有效菌株进行菌种鉴定及耐药性分析。**结果** 98 人份血液标本、312 人份局部标本中抗酸染色阳性分枝杆菌的阳性率分别为 11.22% (11/98)、8.97% (28/312)。其中有 4 株为痰液和血液重复培养阳性,将其按照重复样本计算后,共分离出 35 株非重复性分枝杆菌。加上首都医科大学附属地坛医院 HIV/AIDS 疑似合并分枝杆菌感染患者中分离出的 60 株分枝杆菌共 95 株经传代培养,得到 73 株有效分枝杆菌菌株经鉴定与基因分型显示结核分枝杆菌(MTB) MTB 株,占 90.41%,结核分枝杆菌(NTM) 7 株占 9.59%。其中 7 株非结核分枝杆菌经 hsp65 引物扩增测序后,筛选出 4 株鸟分枝杆菌、2 株堪萨斯分枝杆菌、1 株胞内分枝杆菌。66 株 MTB 对 8 种抗结核药物的耐药率为:一线药物异烟肼(INH) 33.33%、利福平(RFP) 19.70%、链霉素(SM) 45.45%、乙胺丁醇(EMB) 12.12%,总耐药率为 63.64%;二线药物卷曲霉素(CPM) 50.00%、氧氟沙星(OFLX) 22.73%、卡那霉素(K) 24.24%、丙硫异烟胺(PTH) 9.09%,总耐药率为 59.09%。**结论** 本市就诊的 HIV/AIDS 患者合并分枝杆菌的感染主要以 MTB 感染为主,同时有 9.59%的 NTM 感染,应引起重视;HIV/AIDS 合并分枝杆菌感染患者分枝杆菌对一线药物和二线药物的耐药非常严重

关键词 人类免疫缺陷病毒感染者或获得性免疫缺陷综合征患者;分枝杆菌;结核分枝杆菌;非结核分枝杆菌;菌种分离;菌种鉴定;药物敏感性

获得性免疫缺陷综合征(Acquired immunodeficiency syndrome, AIDS),简称艾滋病,是由人类免疫缺陷病毒(Human immunodeficiency virus, HIV)所引起的慢性传染病,本病主要通过性接触和血液传播。HIV 病毒主要侵犯和破坏人类 CD4⁺ T 淋巴细胞(Helper T lymphocyte, CD4⁺ T),使人体对各种病原体丧失了抵抗能力,从而发生多种感染或肿瘤,最后导致死亡。随着人体免疫力的降低,HIV/AIDS 患者会越来越频繁地感染上各种致病微生物,而且感染的程度也会变得越来越严重,最终会因各种复合感染而导致死亡。

结核病(Tuberculosis, TB)是由结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis, MTB)引起的严重威胁人类健康的慢性传染病^[1],结核分枝杆菌感染是我国艾滋病患者最为

常见的机会性感染之一，也是我国艾滋病患者死亡的主要原因，同时HIV病毒的感染是结核分枝杆菌感染的重要危险因素^[2]，结核分枝杆菌的感染同时可加重HIV病毒感染的免疫缺陷进程^[3]，因此，在HIV/AIDS患者中进行合并结核分枝杆菌感染的诊断和治疗，对AIDS患者及结核病防控均有重大意义。

如何发现双重感染，提高确诊率，及时治疗，并制定有效的防控策略，很大程度取决于临床实验室对HIV/AIDS患者合并分枝杆菌感染的检测能力^[4-6]，以及HIV/AIDS患者合并分枝杆菌感染的菌谱分析与抗结核药的耐药状况。本文通过监测并分析我市人类免疫缺陷病毒感染或获得性免疫缺陷综合征患者（HIV/AIDS）合并分枝杆菌感染情况、菌种谱特征及耐药性，为临床确定诊断、流行病学分析及治疗评估提供理论依据。

1、资料与方法

1.1. 对象

收集2010年7至2012年12月之间，首都医科大学附属佑安医院感染科和北京丰台医院门诊临床就诊的HIV/AIDS疑似合并分枝杆菌感染患者标本410人份，其中血液培养标本98人份，痰液、脑脊液，肺泡盥洗液、尿液、便、胸水、腹水、分泌物以及疑似感染部位的穿刺液等局部标本312人份，进行结核分枝杆菌培养。取分离出的35株分枝杆菌和首都医科大学附属地坛医院选择HIV/AIDS疑似合并分枝杆菌感染患者标本以同样方法分离出的60株分枝杆菌，共95株在国家疾病预防控制中心结核病预防控制中心进行传代培养，用得到的73株有效菌株进行菌种鉴定和耐药性分析。在首都医科大学附属佑安医院和首都医科大学附属地坛医院（两家医院为北京市指定传染病(艾滋病)诊疗重点医院。）对所有患者的HIV/AIDS诊断均符合中华人民共和国卫生部2008年颁布的《艾滋病和艾滋病病毒感染诊断标准》。

1.2. 仪器与方法

美国Becton, Dickinson and Company (BD公司)生产的BACTEC 9120 血培养系统和ACTEC™ MGIT™960系统及系统配套试剂、PCR基因扩增系统。贝索(Baso)公司生产的萘尔逊染色试剂及配置。生物梅里埃公司生产的改良罗氏斜面培养基（L-J培养基）。美国Sigma-Aldrich公司生产的对硝基苯甲酸（PNB）培养基与噻吩-2-羧酸肼（TCH）培养基鉴别培养基，中性改良罗氏（L-J）培养基。国家疾控中心国家结核病参比实验室提供的结核分枝杆菌标准株H37Rv。美国Sigma公司生产的药物，包括：一线药物：异烟肼（isoniazid、INH）、利福平(rifampicin、RFP)、链霉素(streptomycin、SM)、乙胺丁醇(ethambutol、EMB)；二线药物：卷曲霉素(capreomycin、CPM)、卡那霉素(kanamycin、K)、氧氟沙星(ofloxacin、OFLX)、丙硫异烟胺 (prothionamide、PTH)。

1.3. 方法

1.3.1. 菌株分离：局部标本按照BACTEC™ MGIT™960系统快速液体培养技术的进行分离培养，血液标本直接加入含MFL培养基的血液培养瓶中混匀，放入BACTEC 9120血液培养系统内进行分枝杆菌分离培养。

1.3.2. 菌种的鉴定：利用对硝基苯甲酸（Para Nitro Benzoic Acid, PNB）/噻吩-2-羧酸肼（Thiophene - 2 - carboxylic acid hydrazine medium, TCH）鉴别培养基培养法，将分枝杆菌初步分为3种：人结核分枝杆菌复合群(Mycobacterium tuberculosis, MTB)、牛分枝杆菌

（*Mycobacterium bovis*）和非结核分枝杆菌（*Nontuberculosis mycobacteria*，NTM）。并使用多位点PCR方法从分子水平对上述结核分枝杆菌进行菌种确证。

1.3.3. 药物敏感性检测：采用《中国结核病防治规划实施工作指南（2008）》^[7]中推荐的比例法药物敏感性试验方法，按照中国防痨协会《结核菌检验细菌学检验规程》^[8]进行操作，选择中心改良罗氏培养基做基础培养基。

2、结果：

2.1.菌株的分离：从 98 人份血液标本中，分离出 11 株抗酸染色阳性分枝杆菌，阳性率为 11.22%（11/98）；其余 312 人份局部标本，分离出抗酸试验阳性分枝杆菌 28 株，阳性率为 8.97%（28/312）。其中有 4 株为痰液和血液重复培养阳性，将其按照重复样本计算后，共分离出 35 株非重复性分枝杆菌。图 1 为液体培养物涂片，抗酸染色后油镜下所见分枝杆菌图像。

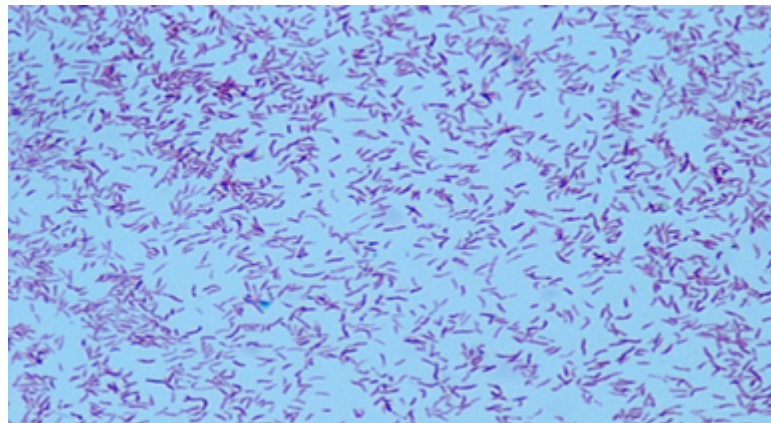


图1液体培养物涂片，抗酸染色后油镜下所见分枝杆菌图像

2.2.菌种鉴定：在 73 株有效分枝杆菌菌株中，经 PNB、TCH 鉴定与多位点 PCR 基因分型，显示分离菌株中包括 MTB 66 株（见图 2），占 90.41%（66/73），NTM 7 株占 9.59%（7/73）。其中 7 株非结核分枝杆菌经 hsp65 引物扩增测序后，筛选出 4 株鸟分枝杆菌、2 株堪萨斯分枝杆菌、1 株胞内分枝杆菌。

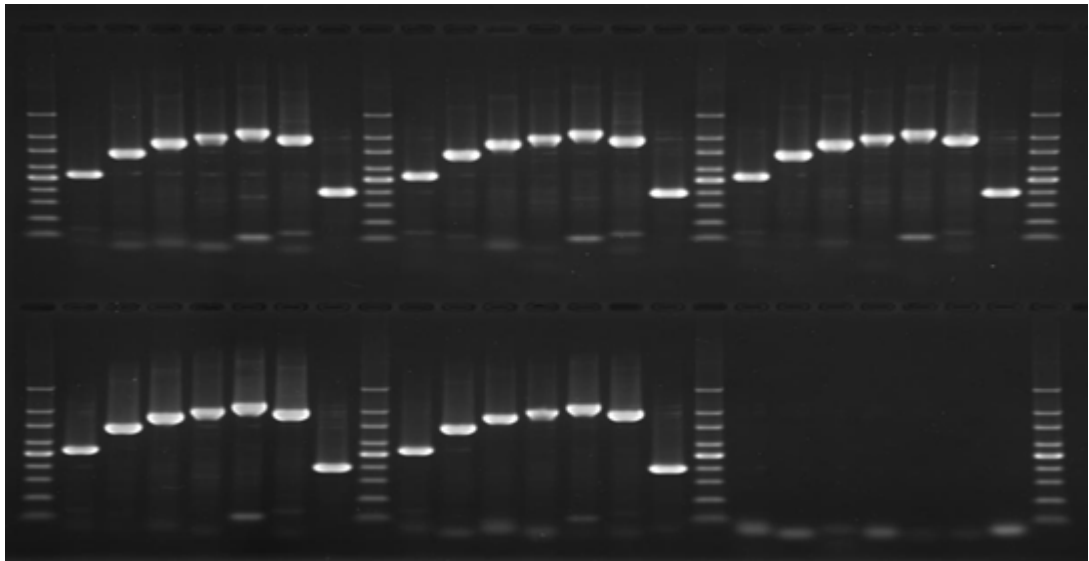


图 2 多位点 PCR 分枝杆菌菌种鉴定结果图像

注：图 2 为 6 个小图组合图像，分上下两排，上排左至右分别为 a 图、b 图、c 图；下排左至右分别为 d 图、e 图、f 图。其中 a-d 为患者 MTB，e 为 MTB H37Rv 阳性标准株对照，f 为 MTB H37Rv 阴性对照。

2.3. 药物敏感性实验

通过对 66 株结核分枝杆菌和 6 株非结核分枝杆菌（分离出的 7 株非结核分枝杆菌中的胞内分枝杆菌的药敏结果失败）进行比例法药物敏感实验。得出 MTB、NTM 比例法药物敏感性实验耐药结果。耐药率分别为：一线药物异烟肼（INH）33.33%、利福平（RFP）19.70%、链霉素（SM）45.45%、乙胺丁醇（EMB）12.12%，总耐药率为 63.64%；二线药物卷曲霉素（CPM）50.00%、氧氟沙星（OFLX）22.73%、卡那霉素（K）24.24%、丙硫异烟胺（PTH）9.09%，总耐药率为 59.09%（见表 1）。结果显示 MTB、NTM 对一线药物和二线药物的耐药都非常严重。

表 1 药物敏感性实验结果

药物类别	药物名称	MTB (n=66)		NTM(n=6)	
		耐药菌株数	耐药率 (%)	耐药菌株数	耐药率 (%)
一线药物	异烟肼	22	33.33	4	66.67
	利福平	12	19.70	5	83.33
	链霉素	30	45.45	6	100.00
	乙胺丁醇	8	12.12	6	100.00
	合计	42	63.64	6	100.00

二线药物	卷曲霉素	33	50.00	6	100.00
	氧氟沙星	15	22.73	5	83.33
	卡那霉素	16	24.24	5	83.33
	丙硫异烟胺	6	9.09	4	66.67
	合计	39	59.09	6	100.00

3、讨论：

3.1 通过对 312 人份局部标本进行初始直接涂片，经抗酸染色后镜检到的抗酸阳性分枝杆菌仅 4 株，而经过培养分离出抗酸阳性分枝杆菌 28 株，进一步说明了直接涂片法对 HIV/AIDS 合并分枝杆菌感染患者的局部标本分枝杆菌检出敏感性较低，并很难在形态学上分出结核分枝杆菌与非结核分枝杆菌。HIV/AIDS 患者合并分枝杆菌感染的菌种分离目前没有统一标准，本研究显示通过联合应用液体快速培养、改良罗氏培养基培养、血液培养等多种方法培养，对培养物阳性者再进行涂片抗酸染色镜检，即能快速分离出分枝杆菌，可以明显提高对合并感染的检出率，有利于指导临床早期用药。

3.2 综合菌种鉴定结果分析，本市就诊的 HIV/AIDS 患者合并分枝杆菌感染者中，90.41%为结核分枝杆菌感染，同时有 9.59%的非结核分枝杆菌感染率，说明感染状况也相当严重，应引起重视。

3.3 HIV/AIDS 合并分枝杆菌感染患者分枝杆菌对一线药物和二线药物的耐药状况非常严重。目前虽然非结核分枝杆菌药敏实验一般不推荐比例法，但本研究仍提示非结核分枝杆菌对常用的抗结核药物呈现高度耐药性【9】。

综合本研究的实验结果，目前要加强对我市就诊的 HIV/AIDS 合并分枝杆菌感染的监测，规范治疗方案，合理用药。

参考文献

- [1] 万康林.中国结核病流行新特点及挑战.疾病监测, 2008,23(11):667-670)
- [2] Boyton RJ.Infectious lung complications in patients with HIV/AIDS[J],Curr Opin Pulm Med,2005,11(3):203-207)
- [3] Lawn SD, Badri M, wood R.Tuberculosis among HIV infected patients receiving HAART:long term incidence and risk factors in a South African cohort [J].AIDS,2005,19(18):2109-2116)
- [4] 蒙志好, 张福杰, 刘存旭, 等.人类免疫缺陷病毒感染/艾滋病合并分枝杆菌肺病 133 例临床分析,临床内科杂志,2008,25(7):478-480.
- [5] 赵雁林, 尚美.我国结核病实验室诊断的现状.中华检验医学杂志,2007,30(7):725-728.
- [6] Cheng VC, Yam WC, Hung IF, et al.Clinical evaluation of the polymerase chain reaction for the rapid diagnosis of tuberculosis. J Clin Pathol 2004, 57(3): 281-285.
- [7] 中华人民共和国卫生部疾病预防控制局。网址 <http://www.moh.gov.cn>.
- [8] 中国防痨协会基础专业委员会主编<<结核菌检验细菌学检验规程>>。2006 年中国教育文化出版社出版。
- [9] 盛青, 马志明, 谭俊豪, 蔡杏珊.非结核分枝杆菌 469 株临床药敏结果分析, 实用医药杂志 2011,27 (13) : 2405-2407

作者简介：刘淑梅，女，汉族，副主任检验师，研究方向：艾滋病合并分枝杆菌感染的菌种分离、鉴定和耐药性研究。

联系方式

通讯地址：北京市丰台区西安街1号检验科

邮政编码：100071

工作单位：北京丰台医院

电子邮件：du77168@163.com