

· 论著 · 胸部 ·

两种分枝杆菌菌种鉴定方法在疑似非结核分枝杆菌肺病的应用*

吴睿彦* 陈品儒 谭耀驹

广州市胸科医院重症结核科内一区(广东广州 510095)

【摘要】目的 分析对比本院患者BALF tNGS及抗酸杆菌分离培养+基因芯片菌种鉴定法两种分枝杆菌菌种鉴定的结果,为快速诊断NTM-PD提供依据。**方法** 用tNGS及抗酸杆菌分离培养+基因芯片菌种鉴定法对127例疑似NTM-PD患者BALF标本进行检测,对两种方法的阳性率结果对比评价。**结果** 127例患者的BALF标本,tNGS检测出NTM阳性率81.1%,分离培养+基因芯片菌种鉴定阳性率85.8%,tNGS与分离培养+基因芯片菌种鉴定在NTM的检测能力McNemer检测结果 $P=0.405>0.05$,没有统计学差异,说明两种方法无差异。两种方法联合检测阳性率97.6%。78例两种方法鉴定为同一菌(群)符合率61.4%。**结论** tNGS及分离培养+基因芯片菌种鉴定法对NTM检测的阳性率接近,tNGS检测出报告时间短、鉴别种类多且可至亚种,能为NTM-PD的诊断提供较大的临床参考价值,分离培养+基因芯片菌种鉴定可帮助修正NTM-PD的早期诊断,两种方法联合检测可提高阳性率,及早对NTM-PD作出诊断。

【关键词】 分枝杆菌菌种鉴定; 病原体靶向测序法; 分离培养+基因芯片菌种鉴定; 非结核分枝杆菌肺病

【中图分类号】 R563.1

【文献标识码】 A

【基金项目】 广州市科学技术局基础与应用基础研究项目(2023A03J0991); 广州市科技计划项目(2023A03J0539)

DOI:10.3969/j.issn.1009-3257.2025.6.016

Application of Two Identification Methods for Mycobacterium Species in Suspected Non-tuberculous Mycobacterial Lung Disease*

WU Rui-yan*, CHEN Pin-ru, TAN Yao-ju.

Department of Severe Tuberculosis - Inpatient Unit 1, Guangzhou Chest Hospital, Guangzhou 510095, Guangdong Province, China.

Abstract: Objective To analyze and compare the results of targeted next-generation sequencing and acid-fast bacilli isolation culture+ Gene chip bacterial identification in bronchoalveolar lavage fluid of patients in our hospital, so as to provide a basis for rapid diagnosis of NTM-PD. **Methods** Using targeted next-generation sequencing and acid-fast bacilli isolation culture + Gene chip bacterial identification on BALF samples from 127 suspected non-tuberculous mycobacterial lung disease patients, compare and evaluate the positive rate results of the two methods. **Results** Out of 127 patients' BALF samples, 103 cases were detected as NTM positive by tNGS, with a positivity rate of 81.1%, and 109 cases were identified as NTM positive through isolation culture+ Gene chip bacterial identification, with a positivity rate of 85.8%, the detection abilities of tNGS and isolation culture+ Gene chip bacterial identification in NTM were compared using the ratio X2 test method, the McNemer test result showed $P=0.405>0.05$, with no statistically significant difference. There is no difference between the tNGS detection and isolation culture+ Gene chip bacterial identification. The positive rate of the combined detection of the two methods was 97.6%. 78 cases were identified as the same bacterial community using both methods, with a consistency rate of 61.4%. **Conclusion** The positive rates of NTM detection using tNGS and isolation culture+ Gene chip bacterial identification are similar. The detection of tNGS has a short reporting time, multiple types of identification, and can even reach subspecies, which can provide significant clinical reference value for the diagnosis of NTM-PD. Isolation culture+ Gene chip bacterial identification can help correct the early diagnosis of NTM-PD. The combined detection of two methods can improve the positivity rate and enable early diagnosis of NTM-PD.

Keywords: Identification of Mycobacterium; Species Targeted Next-generation Sequencing; Isolation Culture+Gene Chip; Bacterial Identification Non-tuberculous Mycobacterial Lung Disease

非结核分枝杆菌肺病(non-tuberculous mycobacterial lung disease, NTM-PD)是非结核分枝杆菌(non-tuberculous mycobacterial, NTM)引起的肺部疾病。诊断主要依据是痰或支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)找到NTM菌^[1]。但临床应用中,NTM培养时间长约10~45天,且NTM菌种多达200多种而临床常见的检测方法仅能鉴别10~30种。如何快速鉴别NTM菌并提供充足依据成为诊断该病的关键。tNGS(targeted next-generation sequencing, 病原体靶向测序)是近年常用于病原体检测的一种快速检测方法,由于该技术应用的普及,临床上常见NTM检测阳性报告,是

否可据此对患者作出诊断?现将我院2023年6月至2024年8月期间采集的数据报告如下并展开讨论。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2023年6月至2024年8月期间,我院收治的127例疑似NTM-PD患者。其中男性39例,女性88例,年龄21~80岁(54.3±11.5)。

1.2 方法 125例患者入院行1次电子支气管镜检查,严格按操作规程采集支气管肺泡灌洗液,弃去前段可能污染的部分,回收20mL置无菌螺帽管(塑料或玻璃质地均可)中,内含支气

【第一作者】 吴睿彦,男,副主任医师,主要研究方向:结核病、非结核分枝杆菌病。E-mail: 674812868@qq.com

【通讯作者】 吴睿彦

管末梢和肺泡中的分泌物分别送检tNGS检测及抗酸杆菌分离培养+基因芯片菌种鉴定法(下文简称“抗酸杆菌分离培养鉴定”)。依据《非结核分枝杆菌病诊断与治疗指南(2020年版)》^[2],将抗酸杆菌分离培养鉴定设为金标准,根据检测结果比较BALF tNGS与抗酸杆菌分离培养鉴定对NTM检测的阳性率,用SPSS 26.0统计软件检查数值。

tNGS样本送广州金域医学检验中心的KM MiniSeqDx-CN系统检测。肺泡灌洗液液体标本量需2~3ml,用无菌采样管或杯密封后冷藏(2~8℃)保存、运输。tNGS采用多重PCR联合NGS技术,以病原高保守区域靶标设计特异性引物,行PCR扩增目标病原,通过第2轮PCR连接分样本来源测序接头,用基因测序仪得到测序数据,用生物信息学软件对数据过滤并与参考基因组比对,判读检测结果(结果包括MTB,脓肿分枝杆菌的脓肿亚种及其他亚种、胞内、堪萨斯、猿、瘰疬、首尔、玛格丽特等NTM,检出NTM但未能鉴定具体菌种为“NTM”;诺卡菌、曲霉菌、铜绿假单胞菌等除分枝杆菌以外的统称“其他病原体”;未检出病原体为“未检出”)。抗酸杆菌分离培养鉴定将BALF样本送我院检验科,由美国BD公司BACTEC MGIT 960系统培养,分离培养阳性标本由北京博奥分枝杆菌菌种鉴定基因芯片判别系统行菌种鉴定,检测报告包括MAC、胞内、鸟、MABC等NTM及MTB;检测出NTM但未能鉴定菌种为“NTM”;经45天无分枝杆菌生长为“培养阴性”。(为避免文字繁琐,下文内容中分枝杆菌的名称如鸟-胞内复合群分枝杆菌、龟-脓肿复合群分枝杆菌、结核分枝杆菌,分别以MAC、MABC、MTB替代;其他NTM称谓省略“分枝杆菌”4字,如“胞内分枝杆菌”简称“胞内”。)

2 结果

2.1 127例患者BALF tNGS检出MABC共51例(37+7+6+1),其中脓肿37例,脓肿亚种7例,马赛亚种6例,博莱亚种1例;MAC共36例(30+6),其中胞内30例,鸟6例;猿2例,首尔1例,堪萨斯4例,玛格丽特1例,偶发1例,瘰疬5例,NTM4例,2例患者同时检测出2种NTM(脓肿+鸟1例,胞内+NTM1例)。3例检测出MTB无NTM,同时检测有NTM及MTB 31例,19例有病原体但无分枝杆菌,2例未检出病原体。分枝杆菌分离培养MABC 46例,MAC 49例(41+1+7),其中鉴定为MAC 41例,胞内1例,鸟7例;蟾蜍1例,堪萨斯3例,偶发2例,瘰疬3例,NTM9例,培养阴性18例。有4例培养鉴定同时有2种NTM菌(2例MABC+鸟,1例MABC +MAC,1例MABC+蟾蜍),2例培养同时检测有NTM及MTB(1例脓肿+MTB,1例MAC+MTB)。具体菌种如下,见表1。

127例患者的BALF样本tNGS与抗酸杆菌分离培养鉴定均为阴性共3例。tNGS检测中共有103例检出NTM占81.1%,21例未检出NTM但抗酸杆菌分离培养鉴定阳性占16.5%(假阴性);抗酸杆菌分离培养鉴定有109例检出NTM占85.8%,15例培养阴性但tNGS检测阳性占11.8%(假阴性)。88例tNGS与抗酸杆菌分离培养鉴定均检出NTM,鉴定为同一菌(群)78例符合率61.4%(78/127),其中MABC 41例,MAC 26例,堪萨斯2

例,胞内1例,鸟5例,瘰疬2例,偶发1例。2种方法联合检测的阳性率为97.6%(124/127),见表2。

如表2,用配比 χ^2 检验对tNGS与抗酸杆菌分离培养鉴定2种方法检测能力对比,McNemer检测结果 $P=0.405>0.05$,无统计学差异。说明tNGS检测与抗酸杆菌分离培养鉴定两种方法无差异。

表1 127例患者BALF tNGS及抗酸杆菌分离培养鉴定

菌种	tNGS		抗酸杆菌分离培养鉴定	
	例	占比%	例	占比%
龟-脓肿复合群分枝杆菌	(51)	(40.2)	46	36.2
脓肿分枝杆菌	37	29.1	0	0
脓肿亚种	7	5.5	0	0
马赛亚种	6	4.7	0	0
博莱亚种	1	0.8	0	0
鸟-胞内复合群分枝杆菌	(36)	(28.3)	41	32.3
胞内分枝杆菌	30	23.6	1	0.8
鸟分枝杆菌	6	4.7	7	5.5
猿分枝杆菌	2	1.6	0	0
首尔分枝杆菌	1	0.8	0	0
瘰疬分枝杆菌	5	3.9	3	2.4
偶发分枝杆菌	1	0.8	2	1.6
堪萨斯分枝杆菌	4	3.1	3	2.4
玛格丽特分枝杆菌	1	0.8	0	0
蟾蜍分枝杆菌	0	0	1	0.8
非结核分枝杆菌(NTM)	4	3.1	9	7.1
结核分枝杆菌(MTB)	34	26.8	2	1.6
其他病原体但无分枝杆菌	19	15.0	0	0
未检出/培养阴性	2	1.6	18	14.2

注: MABC包括脓肿、脓肿亚种、博莱亚种、马赛亚种、龟等种及亚种。MAC包括胞内、鸟等种及亚种。

表2 127例tNGS与抗酸杆菌分离培养鉴定对比n(%)

tNGS	分离培养鉴定		合计
	+	-	
+	88	15	103
-	21	3	24
合计	109	18	127

3 讨论

非结核分枝杆菌肺病(NTM-PD)是NTM病的主要表现形式,其在肺部疾病的重要性越来越明显^[2-3]。NTM各菌种在不同地域及气候环境发病率不同,存在地域差异。本研究收集的127例病例中,主要为MABC及MAC,与Yaoju Tan^[4]、刘东鑫^[5]、林建林^[6]、谭蛟^[7]、郭志平^[8]等研究相近;本研究中MABC所占比例略高于MAC,与刘东鑫等^[5]研究相似。脓肿分枝杆菌在中国南部的流行率较高,考虑常与潮湿和高温环境有关^[9]。在本研究中tNGS及抗酸杆菌分离培养鉴定的阳性率分别为81.1%及85.8%,与前期研究^[10]tNGS及分枝杆菌培养鉴定检测阳性率为80.5%及83.2%相

近(对NTM的检测能力用配比 χ^2 检验对比其McNemer检测结果 $P=0.405>0.05$,无统计学差异,说明tNGS检测与抗酸杆菌分离培养鉴定两种方法无差异),高于陈华^[11]的研究35.04%及42.52%,考虑与采集的样本量不同、不同时期患者病种结构不同等原因有关。陈华^[11]、刘佳文^[12]等认为用芯片法和基因测序对NTM临床分离株进行菌种鉴定的一致率较高,刘佳文的研究符合率达到88.5%;本研究中88例患者tNGS与抗酸杆菌分离培养鉴定同时检测出NTM,鉴定同一菌(群)78例符合率61.4%,低于刘佳文^[12]的研究,其差异的原因在于本研究检测的样本为支气管肺泡灌洗液,刘佳文等检测的样本为临床分离株而易于获得所关注的目的基因。对同源DNA序列分析(16S DNA、ITS、rpoB、hsp65等)鉴定细菌至种水平,为菌种鉴定“金标准”;hsp65优于ITS、rpoB,而16SDNA的鉴别能力最低^[13]。基因芯片菌种鉴定法在扩增时气溶胶污染易导致假阳性结果,造成漏诊、误诊、不能鉴别^[14]。tNGS法兼顾PCR和NGS技术特点,可24h内对呼吸道分泌物标本精准分型,并鉴别至亚种^[16]。但未解决对胞内菌、真菌等检出率低的问题^[15]。可见tNGS及抗酸杆菌分离培养鉴定各有优缺点,tNGS能鉴别200多种NTM菌种中的160多种,在鉴别菌种的种类数量上有明显优势。在NTM-PD的临床诊治工作中,需要解决几个问题:明确送检样本中存在何种NTM,NTM与疾病的相关性等。临床上常用的NTM菌种鉴定方法主要有培养基生长试验(传统方法)、线性探针法^[16]、DNA微阵列芯片法、荧光PCR熔解曲线法^[17]、PCR基因测序法^[13,18]等,商业化的菌种判别系统鉴别的NTM菌种种类数量在10~30种之间。抗酸杆菌分离培养鉴定时间需时10~45天^[11]费时较长,严重影响NTM病的诊断及治疗;目前已有商业化DNA微阵列芯片菌种判别系统可直接对BALF等样本直接检测。先用芯片杂交法进行快速诊断,再结合临床和测序法结果确定诊断,流程具有临床实用性^[12],可大大缩短临床诊断NTM-PD的时间。笔者认为菌种鉴定的结果出现以下三种情况可做针对性处理:(1)tNGS与DNA微阵列芯片均检测出同一种常见NTM,可初步研判NTM感染。(2)tNGS与DNA微阵列芯片分别检测出不同种的常见NTM。可反复留取样本进行抗酸杆菌分离培养鉴定;或使用第三种菌种鉴定方法加以验证,如优先使用其他同源基因序列测序进行菌种鉴定,其次为荧光PCR熔解曲线法、线性探针法等,再次为色谱技术、飞行质谱分析等鉴定方法。(3)tNGS检测出少见NTM,而DNA微阵列芯片检测出常见NTM或无检测出任何NTM,可反复留取样本进行抗酸杆菌分离培养鉴定、宏基因组二代测序(mNGS),甚或行Sanger DNA测序及培养基生长试验等;如抗酸杆菌分离培养阳性,则可对分离株行tNGS检测、DNA微阵列芯片等检测等加以验证。经上述反复检验验证后,仍需考虑NTM与临床疾病的相关性。呼吸道标本包括BALF都属于开放性标本,而存在发生标本污染可能^[19-22]。常见NTM多属于机会致病菌(除溃疡分枝杆菌和海参分枝杆菌),可在机体定植而不发生疾病,需依指南推荐标准,辨别是否为引发感染的病原菌^[23]。对于少见NTM,可先不考虑此类罕见分枝杆菌菌种为致病菌,在排除其他微生物致病的情况下,方考虑其致病性。同时了解患者是否存在较严重免疫性疾病或免疫抑制因素^[24]。在环境中普遍存在的某些NTM,即便以不同方法多次检测到,仍应审慎判断其临床相关性^[23]。不同类型标本受定植菌影响程度不一,临床标本质量直

接影响检测结果,导致高通量测序结果可信度存在差异。分枝杆菌病的诊断需结合多方面信息,如临床表现、流行病学史、影像学、实验室结果等综合判断^[23]。总而言之,tNGS及抗酸杆菌分离培养鉴定对NTM检测阳性率接近,tNGS检测出报告时间短、鉴别种类多且可至亚种,能为NTM-PD的诊断提供较大的临床参考价值,但也有假阴性病例;抗酸杆菌分离培养鉴定虽然出报告时间较长,但可帮助修正NTM-PD的早期诊断;两种方法联合检测可提高阳性率,及早对NTM-PD作出诊断。对于检测样本为BALF标本时,两种方法鉴定为同一菌(群)符合率61.4%;当检测样本为培养分离株时,可提高检测符合率。对于BALF tNGS检测的NTM阳性病例,由于NTM多为环境分枝杆菌,在标本采集、送检、处理等各个环节易受污染,影响检测的结果及对病情判断,应当综合病情考虑并采取多种检测手段进行验证。

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治疗指南(2020年版)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2020, 43(11): 918-946.
- [2] 赖宇, 庄泽钦, 钟典. 广州地区非结核分枝杆菌肺病微生物及临床特征分析[J]. 中华肺部疾病杂志(电子版), 2022, 15(3): 339-343.
- [3] 王青松. 非结核分枝杆菌(NTM)肺病与继发性肺结核的多层螺旋CT征像的比较分析[J]. 罕少疾病杂志, 2023, 30(4): 42-43.
- [4] Yaoju Tan, Yunfeng Deng, Xiaofeng Yan, ect. Nontuberculous mycobacterial pulmonary disease and associated risk factors in China: A prospective surveillance study[J]. Journal of Infection, 2021; S0163-4453(21) 00261-00269.
- [5] 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.
- [6] 林建, 林淑芳, 戴志松, 等. 福建省非结核分枝杆菌菌种分布及其流行病学特征初步研究[J]. 中国防痨杂志, 2020, 42(5): 518-522.
- [7] 谭蛟, 王亚春, 王亚丽, 等. DNA微阵列芯片法在非结核分枝杆菌菌种鉴定的应用探讨[J]. 哈尔滨医药, 2024, 44(1): 26-28.
- [8] 郭志平, 廖小琴, 林剑东, 等. 缓慢与快速生长型非结核分枝杆菌肺病的临床特征对比分析[J]. 罕少疾病杂志, 2022, 29(8): 29-31.
- [9] Nishiuchi Y, Iwamoto T, Maruyama F. Infection Sources of a common non-tuberculous mycobacterial pathogen, mycobacterium avium complex[J]. Front Med (Lausanne), 2017, 4: 27.
- [10] 吴睿彦, 陈品儒, 邓政先, 等. tNGS在分枝杆菌病诊断中的价值[J]. 临床肺科杂志, 2024, 29(9): 1304-1308.
- [11] 陈华, 陈品儒, 李艳阳, 等. 靶向高通量测序鉴定非结核分枝杆菌菌种的应用价值[J]. 中国防痨杂志, 2023, 45(4): 362-366.
- [12] 刘佳文, 吕红艳, 丁北川, 等. 129株非结核分枝杆菌采用两种分子检测技术行菌种鉴定的结果分析[J]. 中国防痨杂志, 2019, 41(9): 999-1004.
- [13] 黄海荣. 非结核分枝杆菌的菌种鉴定技术[J]. 中国医刊, 2016, 51(3): 234-237.
- [14] 刘珑玲, 陈世玖. 非结核分枝杆菌感染的分子生物学快速诊断技术[J]. 中华医学杂志, 2014, 94(38): 3039-3040.
- [15] 徐伟玲. 病原靶向二代测序在下呼吸道感染病原体诊断中应用价值研究进展[J]. 检验医学与临床, 2023, 20(20): 3068-3072.
- [16] 朱玉梅, 钟育权, 李金莉, 等. 线性探针法用于分枝杆菌菌种快速鉴定的应用研究[J]. 新发传染病电子杂志, 2022, 7(2): 47-51.
- [17] 李爱芳, 谈小文, 崔晓利, 等. 荧光PCR熔解曲线法在非结核分枝杆菌菌种鉴定中的应用价值[J]. 中国防痨杂志, 2021, 43(7): 664-669.
- [18] 郭明日, 李玉明, 李妍, 等. 微阵列芯片法和多同源基因序列测序在非结核分枝杆菌菌种鉴定中的差异[J]. 检验医学, 2023, 38(10): 909-914.
- [19] Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2007, 175(4): 367-416.
- [20] 段鸿飞. 非结核分枝杆菌与疾病的相关性[J]. 中国医刊, 2016, 51(3): 227-229.
- [21] 中华医学会呼吸病学分会. 肺部感染性疾病支气管肺泡灌洗病原体检测中国专家共识(2017年版)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2017, 40(8): 578-583.
- [22] 何贵清, 金嘉琳, 孙华平, 等. 呼吸道非结核分枝杆菌分离株的临床意义[J]. 中华传染病杂志, 2018, 36(4): 206-212.
- [23] 高通量测序共识专家组. 高通量测序技术在分枝杆菌病诊断中的应用专家共识[J]. 中华传染病杂志, 2023, 41(3): 175-181.
- [24] 黄海荣. 非结核分枝杆菌相关实验室检查及其结果解读[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2020, 43(11): 910-913.

(收稿日期: 2024-10-16) (校对编辑: 翁佳鸿)