

• 论 著 •

基因芯片技术分析 HIV 合并非结核分枝杆菌感染患者的菌种分布和免疫学特征^{*}

张桂仙,高丽[△],李正伦,张米,谢祺

云南省传染病医院检验科,云南昆明 650301

摘要:目的 利用基因芯片技术检测非结核分枝杆菌(NTM),以此了解该院人类免疫缺陷病毒(HIV)合并 NTM 感染患者的菌种分布和免疫学特征。**方法** 分析该院 2012 年 9 月至 2019 年 12 月从 90 例 HIV 感染者标本中分离到的 90 株 NTM 的分布情况,并分析患者的 CD4⁺ T 淋巴细胞检测结果。**结果** 90 例 HIV 合并 NTM 感染患者中共检出鸟分枝杆菌 73 株(81.11%),堪萨斯分枝杆菌 6 株(6.67%),龟脓分枝杆菌 4 株(4.44%),戈登分枝杆菌 2 株(2.22%),瘰疬分枝杆菌 2 株(2.22%),偶然分枝杆菌 2 株(2.22%),浅黄分枝杆菌 1 株(1.11%)。CD4⁺ T 淋巴细胞<50 个/μL 的患者多为鸟分枝杆菌感染(42.22%);其次为堪萨斯分枝杆菌(4.44%),CD4⁺ T 淋巴细胞为 50~200 个/μL 的患者感染鸟分枝杆菌也居多(28.89%)。**结论** 鸟分枝杆菌是 HIV 合并 NTM 感染的主要菌种,基因芯片检测技术能够快速对 NTM 进行鉴定,并能用于多种类型标本检测,是值得推广的检测 NTM 感染的方法。

关键词:非结核分枝杆菌; 人类免疫缺陷病毒; CD4⁺ T 淋巴细胞; 寡核苷酸序列分析**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2021.10.006**中图法分类号:**R446.5**文章编号:**1673-4130(2021)10-1176-04**文献标志码:**A

Analysis of distribution and immunological characteristics of HIV co-infected with non-tuberculosis mycobacteria patients based on gene chip technology^{*}

ZHANG Guixian, GAO Li[△], LI Zhenglun, ZHANG Mi, XIE Qi

Department of Clinical Laboratory, Yunnan Provincial Hospital of Infectious Diseases, Kunming, Yunnan 650301, China

Abstract: Objective Non-tuberculosis mycobacteria (NTM) were detected by gene chip technology in order to understand the distribution and immunological characteristics of human immunodeficiency virus (HIV) co-infected with NTM in Yunnan Provincial Hospital of Infectious Diseases. **Methods** To analyze the distribution of 90 NTM strains isolated from HIV infected patients in Yunnan Hospital of Infectious Diseases from September 2012 to December 2019, and analyze the results of CD4⁺ T lymphocytes. **Results** Among 90 HIV co-infected with NTM patients, 73 strains of *Mycobacterium Avium* (81.11%), 6 strains of *M. Kansas* (6.67%), 4 strains of *M. Chelonis* (4.44%), 2 strains of *M. Gordon* (2.22%), 2 strains of *Mycobacterium Scrofula* (2.22%), 2 strains of *Mycobacterium Fortuitum* (2.22%) and 1 strain of *Mycobacterium Phlei* (1.11%) were detected. The infection rate of *Mycobacterium avium* in patients with CD4⁺ T lymphocyte less than 50 cells per μL was highest (42.22%), and followed with *Kansas* (4.44%), the CD4⁺ T lymphocyte of *Mycobacterium avium* was also higher (28.89%) inpatients with CD4⁺ T lymphocyte between 50 and 200 cells per μL. **Conclusion** *Mycobacterium avium* is the main bacteria of HIV co-infected with NTM, gene chip technology could rapidly identify NTM, and could be used for the detection of many types of specimens, which is worthy of promotion in the diagnosis and treatment of NTM infection.

Key words: non-tuberculosis mycobacteria; human immunodeficiency virus; CD4⁺ T lymphocytes; oligonucleotide sequence analysis

* 基金项目:云南省高层次卫生健康技术人才培养专项经费资助项目(H-2018018);云南省教育厅科学基金项目(2020J0234、2018JS251)。

作者简介:张桂仙,女,主管技师,主要从事微生物检验研究。 △ 通信作者,E-mail:619082874@qq.com。

本文引用格式:张桂仙,高丽,李正伦,等.基因芯片技术分析 HIV 合并非结核分枝杆菌感染患者的菌种分布和免疫学特征[J].国际检验医学杂志,2021,42(10):1176-1179.

非结核分枝杆菌(NTM)是指除了结核分枝杆菌复合群和麻风分枝杆菌以外的分枝杆菌^[1],机会性感染是此类菌的显著特点。HIV 感染者免疫功能低下,常合并各种机会性感染,合并 NTM 感染就是其中常见的合并感染之一,且已成为 HIV 感染者发病、就诊、入院和死亡的重要原因之一^[2],快速检测 NTM 有助于早期精准治疗 HIV 合并 NTM 感染患者。基因芯片技术是目前较为可靠的 NTM 鉴定技术,此方法可较精确地鉴别多种 NTM,并可以排除卡介苗、结核分枝杆菌的影响^[3]。本研究对本院 2012 年 9 月至 2019 年 12 月使用基因芯片技术进行 NTM 菌种鉴定的 HIV 感染者进行分析,探讨适合本院 NTM 菌株鉴定的方法,以及 HIV 合并 NTM 感染的菌种分布和免疫特征。

1 资料与方法

1.1 一般资料 将本院 2012 年 9 月至 2019 年 12 月收治的 90 例 HIV 合并 NTM 感染患者作为研究对象,分离 NTM 菌株 90 株。

1.2 仪器与试剂 NTM 菌种鉴定试剂由成都博奥晶芯生物有限公司生产;检测仪器包括晶芯® Extractor™ 36 核酸快速提取仪、BioMixer™ II 芯片杂交仪、Slide Washer™ 8 芯片洗干仪、晶芯® LuxScan™ 10K-B 微阵芯片扫描仪、美国 ABI 7300 PCR 扩增仪。CD4⁺ T 淋巴细胞检测试剂由美国 Becton-Dickinson 公司生产;检测仪器为美国 Becton-Dickinson 公司生产的 FACSCalibur 流式细胞仪。

1.3 方法

1.3.1 核酸提取 取 1 mL 菌悬液置入洁净离心管中,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清液;加入 1 mL 生理盐水,涡旋振荡混合均匀后 12 000 r/min 离心 5 min,弃上清液;加入 80 μL 核酸提取液,涡旋振荡混合均匀后转入核酸提取管中,将核酸提取管置于晶芯® Extractor™ 36 核酸快速提取仪上振荡 5 min;然后将核酸提取管置于 95 ℃ 金属浴 5 min,5 000 r/min 离心 1 min。

1.3.2 核酸扩增 取出 PCR 扩增试剂自然解冻,混匀后分别取 18 μL 加入每支扩增管中,然后加入 2 μL 核酸提取管中的核酸溶液,将扩增管放入 PCR 扩增仪中进行扩增。

1.3.3 芯片杂交 取出杂交缓冲液,50 ℃ 加热使其完全融化,充分混匀;将 PCR 产物置于 PCR 仪中 95 ℃ 变性 5 min;取扩增管加 9 μL 杂交缓冲液,再加入 PCR 产物 6 μL,充分混匀,取杂交反应混合物 13.5 μL 加入杂交芯片加样孔中,置于 BioMixer™ II 芯片杂交仪中 50 ℃ 杂交 2 h。

1.3.4 洗涤、干燥及扫描 取出洗液原液 20×SSC、

10% SDS 分别配制。洗液 I:依次将 20×SSC(50 mL)、蒸馏水(440 mL)、10% SDS(10 mL)混合。洗液 II:将 20×SSC(10 mL)与蒸馏水 990 mL 混合。开启 Slide Washer™ 8 芯片洗干仪进行洗涤甩干,开启晶芯® LuxScan™ 10K-B 微阵芯片扫描仪进行结核分枝杆菌菌种鉴定检测,采用芯片判别系统进行结果判读。

1.3.5 CD4⁺ T 淋巴细胞检测 使用含有乙二胺四乙酸二钾或乙二胺四乙酸三钾的真空采血管采集抗凝血标本 2 mL。取 20 μL 抗体(CD4/CD3/CD8/CD45)加入检测管中,并加入患者标本 50 μL,混匀避光 15 min,之后加 450 μL 红细胞裂解液混匀,避光 15 min 后,打开 FACSCalibur 流式细胞仪,运行程序,进行 CD4⁺ T 淋巴细胞计数。

1.4 统计学处理 采用 Excel2007 统计软件进行数据库建立和数据录入,采用 SPSS19.0 统计软件进行数据处理及统计分析。计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同年龄 HIV 合并 NTM 感染患者性别情况比较 90 例 HIV 合并 NTM 感染患者中男 69 例(76.67%),女 21 例(23.33%)。≥70 岁年龄组男女比例比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),其余各年龄组男性明显多于女性,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 不同年龄 HIV 合并 NTM 感染患者性别情况比较($n=90$)

年龄(岁)	男[n(%)]	女[n(%)]	合计[n(%)]	男:女
≥70	1(1.11)	0(0.00)	1(1.11)	1.00:0.00
60~<70	4(4.44)	1(1.11)	5(5.55)	4.00:1.00
50~<60	12(13.33)	1(1.11)	13(14.44)	12.00:1.00
40~<50	20(22.22)	8(8.89)	28(31.11)	2.50:1.00
30~<40	25(27.78)	8(8.89)	33(36.67)	3.13:1.00
20~<30	5(5.56)	2(2.22)	7(7.78)	2.50:1.00
<20	2(2.22)	1(1.11)	3(3.33)	2.00:1.00
合计	69(76.67)	21(23.33)	90(100.00)	3.29:1.00

2.2 NTM 菌种鉴定结果 90 株 NTM 经基因芯片技术检测为鸟分枝杆菌 73 株[81.11% (73/90)],堪萨斯分枝杆菌 6 株[6.67% (6/90)],龟脓分枝杆菌 4 株[4.44% (4/90)],戈登分枝杆菌 2 株[2.22% (2/90)],偶然分枝杆菌 2 株[2.22% (2/90)],瘰疬分枝杆菌 2 株[2.22% (2/90)],浅黄分枝杆菌 1 株[1.11% (1/90)]。在标本类型中,痰液最多,占 67.78%;粪便次之,占 16.67%;灌洗液再次之,占

3.33%; 骨髓、尿液、腹水、血液、脑脊液标本均占 1.11%。见表 2。

表 2 90 株 NTM 标本类型及菌种分布情况

标本类型	菌种	n	构成比(%)
脓液	鸟分枝杆菌	4	4.44
	瘰疬分枝杆菌	1	1.11
	戈登分枝杆菌	1	1.11
骨髓	鸟分枝杆菌	1	1.11
粪便	鸟分枝杆菌	15	16.67
尿液	鸟分枝杆菌	1	1.11
腹水	鸟分枝杆菌	1	1.11
血液	鸟分枝杆菌	1	1.11
脑脊液	鸟分枝杆菌	1	1.11
灌洗液	鸟分枝杆菌	2	2.22
	堪萨斯分枝杆菌	1	1.11
痰液	鸟分枝杆菌	47	52.22
	堪萨斯分枝杆菌	5	5.56
	龟脓分枝杆菌	4	4.44
	偶然分枝杆菌	2	2.22
	戈登分枝杆菌	1	1.11
	浅黄分枝杆菌	1	1.11
	瘰疬分枝杆菌	1	1.11

2.3 CD4⁺ T 淋巴细胞检测结果 CD4⁺ T 淋巴细胞<50 个/ μ L 的患者多为鸟分枝杆菌感染, 占总人数的 42.22%; 堪萨斯分枝杆菌占 4.44%。CD4⁺ T 淋巴细胞为 50~<200 个/ μ L 的患者感染鸟分枝杆菌也居多, 占总人数的 28.89%。见表 3。

表 3 CD4⁺ T 淋巴细胞检测结果

菌种	CD4 ⁺ T 淋巴细胞(个/ μ L)	n	构成比(%)
鸟分枝杆菌	<50	38	42.22
	50~<100	14	15.56
	100~<200	12	13.33
	≥200	9	10.00
堪萨斯分枝杆菌	<50	4	4.44
	50~<100	2	2.22
龟脓分枝杆菌	100~<200	2	2.22
	≥200	2	2.22
	50~<100	1	1.11
戈登分枝杆菌	100~<200	1	1.11
	100~<200	1	1.11
	≥200	1	1.11
瘰疬分枝杆菌	100~<200	1	1.11
	≥200	1	1.11
偶然分枝杆菌	100~<200	2	2.22
浅黄分枝杆菌	100~<200	1	1.11

3 讨 论

近年来, 随着 HIV 感染发病率的增加, HIV 合并

NTM 感染的发病率也呈现快速上升趋势^[4-5], 严重威胁着 HIV 感染者的健康。由于 NTM 感染患者的相关临床症状、体征及影像学表现等缺乏典型性, 导致其容易被误诊为结核分枝杆菌感染, 且病死率高^[6]。罗氏培养是结核病诊断的金标准, 但用时较长, 不利于早期快速诊断; 威尼抗酸染色具有快速、经济、简便等优点, 且报告及时, 当天可取, 但抗酸染色阳性是分枝杆菌属独有的特点, 也不能作为结核分枝杆菌鉴定的绝对指征, 只能作为初步提示, 故临床急需一种快速、经济、高效的检测方法。基因芯片技术是近几年发展起来的一种新方法, 是目前较为可靠的分子层面的 NTM 鉴定技术, 此方法可较为精确地鉴别多种 NTM, 可用于结核病和非结核病的辅助诊断^[7]。

本研究检测的 90 例患者中, 男性明显多于女性 (69/21, 3.29: 1.00), 这可能与就诊的患者以男性为主有关; 30~<60 岁中青年患者占较大比例 (82.22%), 说明中青年 HIV 感染者是 NTM 的高发人群, 发病人群趋于年轻化, 已成为 HIV 合并 NTM 感染的高危人群。检测的标本类型主要以痰液为主 67.78% (61/90), HIV 合并 NTM 感染临实际上以肺部感染最常见, 这也是本研究中检出 NTM 的标本中痰液标本所占比例较高的原因; 粪便标本次之, 占 16.67% (15/90), 肠道感染较肺部以外的其他部位感染更常见, 并且均为鸟分枝杆菌感染, 其他肺外标本也有检出 NTM, 但所占比例较低。本研究发现 HIV 合并 NTM 感染中, 最多见的是鸟分枝杆菌感染 [81.11% (73/90)], 其次是堪萨斯分枝杆菌感染 [6.67% (6/90)]。在《伯杰细菌鉴定手册》中, 鸟分枝杆菌复合群和堪萨斯分枝杆菌均属于缓慢生长分枝杆菌。在临床治疗上, 鸟分枝杆菌感染需要抗菌药物治疗, 治疗时间长而且任务艰巨, 堪萨斯分枝杆菌感染在治疗效果上最好^[8], 因此, 临床非常急需能快速、准确鉴定出 NTM 的方法, 以利于临床医师及时对患者确诊, 并采取针对性的治疗方案。本院现使用的基因芯片菌种鉴定技术可检测 17 种分枝杆菌, 包括结核分枝杆菌复合群、鸟分枝杆菌、土分枝杆菌、草分枝杆菌、胞内分枝杆菌、偶然分枝杆菌、戈登分枝杆菌、浅黄分枝杆菌、瘰疬分枝杆菌、金色分枝杆菌、蟾蜍分枝杆菌、耻垢分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、不产色分枝杆菌、龟脓分枝杆菌等。各种体液标本直接涂片, 经威尼抗酸染色法检测阳性或分枝杆菌培养阳性的标本均可采用基因芯片技术进行鉴定, 该技术从标本采集到得出结果仅需 2 d, 大大缩短了检测时间^[9]。

AIDS 又称获得性免疫缺陷综合征, 是一种危害极大的传染病, 由 HIV 感染引起。CD4⁺ T 淋巴细胞是 HIV 感染最主要的靶细胞, HIV 感染人

体后,出现 CD4⁺ T 淋巴细胞进行性减少,细胞免疫功能受损^[10],机体免疫力降低,免疫细胞亚群异常活化,诱导机体各器官或系统损伤,最终由于继发感染导致患者死亡^[11-12]。NTM 被认为是 HIV 感染者常见的机会性感染病原体,尤其是 CD4⁺ T 淋巴细胞<50 个/μL 的患者更容易合并 NTM 感染^[13],鸟分枝杆菌感染通常发生于 CD4⁺ T 淋巴细胞<50 个/μL 的 HIV 感染者中^[14]。本研究中 CD4⁺ T 淋巴细胞<50 个/μL 的患者感染鸟分枝杆菌最多,占总人数的 42.22%;CD4⁺ T 淋巴细胞为 50~<100 个/μL 的患者感染鸟分枝杆菌也居多,占总人数的 15.56%;CD4⁺ T 淋巴细胞为 100~<200 个/μL 的患者感染鸟分枝杆菌再次之,占总人数的 13.33%;CD4⁺ T 淋巴细胞≥200 个/μL 的患者感染鸟分枝杆菌占总人数的 10.00%。由此可见,随着 HIV 感染者免疫力降低,感染鸟分枝杆菌的概率增加。早诊断和早治疗可以修复 HIV 感染者受损的免疫功能,减少或避免机会性感染的发生,降低治疗成本,提高生活质量。

最常见的 NTM 是鸟分枝杆菌、胞内分枝杆菌、龟脲分枝杆菌、脓肿分枝杆菌、偶然分枝杆菌,而 NTM 感染菌种和流行率随地理位置变化而变化^[15]。本院治疗的 HIV 合并 NTM 感染患者中,最多见的是鸟分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、龟脲分枝杆菌、戈登分枝杆菌、瘰疬分枝杆菌、偶然分枝杆菌及浅黄分枝杆菌,在菌种和流行率上有一些特征。HIV 感染率上升也促进了 NTM 感染率的升高,从而使人们越来越重视 HIV 合并 NTM 感染,NTM 感染正在成为 HIV 感染患者发生肺内外疾病的重要因素,能够早期识别并治疗 NTM 感染引起的疾病,有利于降低 HIV 合并 NTM 感染的发病率和病死率,减轻社会经济负担^[16]。

鸟分枝杆菌是本院 HIV 合并 NTM 感染的主要菌种。基因芯片技术能够快速对 NTM 进行鉴定,是值得推广的检测 NTM 感染的方法。

参考文献

- MORTIER M C, JONGERT E, METTENS P. Sequence conservation analysis and in silico human leukocyte antigen peptide binding predictions for the Mtb72F and M72 tuberculosis candidate vaccine antigens[J]. MBC Immunol, 2015, 16(1): 63.
- 宋炜,刘莉,卢洪洲.艾滋病合并分枝杆菌感染患者分枝杆菌菌种鉴定[J].浙江大学学报(医学版),2016,45(3): 245-248.
- 魏彦昌,付玉荣.非结核分枝杆菌实验室诊断研究进展[J].中国病原生物学杂志,2018,13(8): 911-916.
- MWIKUMA G, KWENDA G, HANG'OMBE B M, et al. Molecular identification of non-tuberculous mycobacteria isolated from clinical specimens in Zambia[J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2015, 14: 1.
- KENDALL B A, WINTHROP K L. Update on the epidemiology of pulmonary nontuberculous mycobacterial infections[J]. Semin Respir Crit Care Med, 2013, 34(1): 87-94.
- 谢周华,林艳荣,卢焕.艾滋病与非结核分枝杆菌的双重感染研究进展[J].中国热带医学,2019,19(4): 396-400.
- 芮东妹,朱珍,樊燕.基因芯片技术在结核分枝杆菌对利福平敏感性检测中的临床价值[J].海南医学,2017,28(22): 3714-3716.
- PHILLEY J V, GRIFFITH D E. Treatment of slowly growing mycobacteria[J]. Clin Chest Med, 2015, 36(1): 79-90.
- 李晓非,梁桂亮,汪亚玲,等.2 种快速检测技术在结核分枝杆菌利福平耐药性检测中的评价[J].中国卫生检验杂志,2015,25(10): 1661-1672.
- 中华医学会感染病学分会艾滋病丙型肝炎学组,中国疾病预防与控制中心.中国艾滋病诊疗指南[J].协和医学杂志,2018,10(1): 41-63.
- 冯瑞芳,刘中夫. HIV 感染者/AIDS 病人死亡原因的研究进展[J].中国艾滋病性病,2013,19(3): 229-230.
- GUILLEN Y, NOGUERA-JULIAN M, RIVEA J, et al. Low nadir CD4⁺ cell counts predict gut dysbiosis in HIV-1 infection[J]. Mucosal Immunol, 2019, 12(1): 232-236.
- 邓西子,陈万山,兰芸,等.广州地区 HIV/AIDS 患者合并感染非结核分枝杆菌的耐药分析[J].热带医学杂志,2015,15(2): 170-173.
- KAPLAN J, BENSON C, HOLMES K, et al. Guidelines for the prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America[EB/OL]. (2013-06-15)[2020-09-06]. http://aidsinfo.nih.gov.er.lib.ncku.edu.tw:2048/contentfile-s/lvguidelines/adult_oi.pdf.
- YN X, LU L, CHEN G, et al. Identification and characterization of non-tuberculous mycobacteria isolated from tuberculosis suspects in Southern Central China[J]. PLoS One, 2014, 9(12): e114353.
- SEBASTION G, NAGARAJA S B, VISHWANATHA T, et al. Non-tuberculosis mycobacterium spp: a using HPLC under Revised National TB Control Program (RNTCP) in India[J]. Appl Microbiol, 2018, 12(1): 267-273.