

结核分枝杆菌实验室检测方法的 差异分析及临床诊断评估

张帆, 刘守江, 魏巍, 黄垚, 刘盛元

深圳市南山区慢性病防治院, 广东 深圳 518054

摘要: **目的** 分析常见结核分枝杆菌实验室检测结果,并探讨各个检测方法的临床诊断价值。**方法** 采用痰涂片抗酸染色、BD BACTEC MGIT 960 分枝杆菌快速培养法(BD-960)、实时荧光定量 PCR 法(TB-DNA 检测方法),对 357 例痰标本进行检测,并对其结果进行组合分析。**结果** 痰涂片抗酸染色法、BD-960 培养法、TB-DNA 检测的阳性率分别为 14.3%、40.9%、30.5%($\chi^2=62.9, P<0.05$)。在 146 例培养(+)标本中, TB-DNA 阳性率为 68.5%;在 211 例培养(-)中, TB-DNA 阳性率为 4.3%;在培养(+)DNA(+)菌株中,痰涂片阳性率为 48.0%;在培养(+)DNA(-)菌株中,痰涂片阳性率为 4.3%;在培养(-)DNA(-)菌株中,痰涂片阳性率为 0;在培养(-)DNA(+)菌株中,痰涂片阳性率 11.1%。**结论** BD-960 培养法的结核分枝杆菌检测阳性率、准确率高,仍是确诊肺结核的金标准,但结合其他检测方法,可进一步提早、提高检测的准确率。

关键词: 结核分枝杆菌; 抗酸涂片; BACTEC MGIT 960 培养; 荧光定量 PCR 检测

中图分类号: R378 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2019)08-1010-03 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2019.08.033

结核分枝杆菌的早期、快速、准确检测是结核病预防和控制的重要手段之一目前检测手段多样,各有利弊,如传统的痰涂片找抗酸杆菌,快速、简便,易推广,但敏感度低,特异性低,漏诊率高;BD-960 液体结核菌培养法,比传统罗氏培养法更短的报阳时间,平均缩短至 10 d,且提高 10% 的阳性检出率,但液体培养法污染率相对更高^[1-2]。荧光定量 PCR 检测 TB-DNA 快速、敏感度较高,可提高结核菌检出率,但也可能存在假阳性,且无法区分死菌和活菌^[3]。痰检阳性率除了与检验方法、检验水平、实验环境等有关外,也取决于患者留取的痰量、痰标本质量、咳痰时间、送检及时性等因素^[4-5],因此痰检实验室结果可能会出现与医生预想不一致的情况。本文通过分析痰涂片抗酸染色法、BD-960 培养法、TB-DNA PCR 法对痰液标本的检测情况,探讨这 3 种结核检测方法如果出现结果不一致的情况下,该如何进一步分析其在结核病诊断中的临床价值。

1 材料和方法

1.1 标本留取 痰液标本来自南山区慢性病防治院 2017 年 8 月-2018 年 3 月门诊患者,患者纳入标准:综

基金项目: 深圳市医疗卫生三名工程项目(No SZSM201603029)

作者简介: 张帆(1982-),女,河南信阳人,博士,副主任医师,研究方向:结核病的相关临床及实验室研究。

通信作者: 刘盛元, E-mail: nsjfk@163.com。

合既往病史、目前临床症状、影像学检查等初步诊断为疑似肺结核病,且同时送检痰涂片抗酸染色、结核杆菌培养及 TB-DNA PCR 检测的患者,每位患者要求送晚上、早上、随机痰液标本共三份,痰液量大于 5 ml/盒,所有痰液标本均需检验科工作人员目视或镜检确认为合格标本(粘液痰、脓液痰、干酪痰、或血丝痰),不合格标本需患者重新再次留痰。挑取痰液质量最好的部分用于痰涂片镜检,余下的痰液混匀,取一份用于 TB-DNA PCR 检测,一份用于 BACTEC MGIT960 快速培养。

1.2 仪器与试剂 全自动 BACTEC MGIT960 系统(美国, BD), 显微镜(奥林巴斯), 荧光定量 PCR 仪(Lightcycler580II, 罗氏)。抗酸染色试剂(珠海, 贝索), MGITM 960 液体培养试剂(美国, BD), 结核分枝杆菌核酸检测试剂盒(湖南, 圣湘)。

1.3 检验方法

1.3.1 痰涂片萋尼氏抗酸染色法 严格按照《痰涂片镜检查标准化操作及质量保证手册》进行痰标本处理、涂片、染色、光学显微镜油镜下观察^[6]。

1.3.2 结核菌培养 余下痰标本经处理后,采用 BD-960 培养基培养法进行培养。每天观察培养情况,观察 2 月。

1.3.3 TB-DNA 检测 严格按照 DNA-PCR 检测试剂盒说明书进行操作,并加入阳性对照、阴性对照,在保证实验有效的前提下,采用荧光定量 PCR 仪判定

结果。

1.3.4 菌种鉴定 培养仍为阳性患者将痰标本送到深圳市慢性病防治院省级结核病参比实验室进行结核菌培养和菌种鉴定^[7]。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。率之间的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 种检测方法检测结果比较 共收集 357 例疑似肺结核患者痰液标本,痰涂片抗酸染色法、BD-960 培养基培养法、TB-DNA PCR 检测的阳性率分别为 14.3%、40.9%、30.5%, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 62.9$, $P < 0.001$)。见表 1。

表 1 357 例疑似肺结核患者痰液标本检测结果(例)

检测方法	检测数	阳性数	阳性率(%)
涂片抗酸染色	357	51	14.3
BD-960 培养	357	146	40.9
TB-DNA	357	109	30.5

2.2 TB-DNA 在痰培养阳性标本中的比例 在 146 例培养(+)中,TB-DNA 阳性率为 68.5%;在 211 例培养(-)标本中,TB-DNA 阳性率为 4.3%。见表 2。

表 2 TB-DNA 在培养阳性标本中的比例(例)

BD-960 培养	例数	TB-DNA		
		阳性数	阴性数	阳性率(%)
阳性	146	100	46	68.5
阴性	211	9	202	4.3
合计	357	109	248	30.5

2.3 在不同痰培养,TB-DNA 结果中痰涂片抗酸染色阳性率比较 在 100 例培养(+)DNA(+)菌株中,痰涂片阳性率为 48%,随机对 100 例中的 43 例行菌种鉴定分析,发现 43 例均为结核分枝杆菌。在 46 例培养(+)DNA(-)菌株中,痰涂片阳性率为 4.3%;随机对 46 例中的 16 例行菌种鉴定分析,发现 15 例结核分枝杆菌,1 例非结核分枝杆菌(偶发分枝杆菌)。见表 3。

表 3 痰涂片抗酸染色在不同痰培养,TB-DNA 中的结果(例)

TB-DNA、痰培养结果	例数	痰涂片		
		阳性	阴性	阳性率(%)
培养(+),DNA(+)	100	48	52	48.0
培养(+),DNA(-)	46	2	44	4.3
培养(-),DNA(-)	202	0	202	0
培养(-),DNA(+)	9	1	8	11.1
合计	357	51	306	14.3

3 讨论

早期快速诊断、治疗结核病对控制结核病传播非常重要。本研究分析临床常规开展的 3 种实验室方法,分析不同的实验结果在结核病诊断中的临床价值,

及在实验室结果有矛盾的情况下,该如何进一步分析,取舍。

从本文统计数据可以看到,3 种检测方法阳性率由高至低依次为:BD-960 培养法 40.9%、TB-DNA 30.5%、痰涂片 14.3%。测定的 TB-DNA 阳性率略低于痰培养法,这与以一些文献报道不符,但也有些研究结果显示 TB-DNA 阳性率略低于 BD960 培养法^[8],TB-DNA 阳性率略低于培养法,可能的原因有:1) 荧光定量 PCR 检测易受不同公司检测试剂质量的影响;2) 菌量太低,超出荧光定量 PCR 的检测下限。3) 痰培养阳性菌有部分是非结核分枝杆菌,而 TB-DNA 阴性;4) BD960 液体培养法更为敏感,研究表明其比罗氏固体培养法可提高约 10% 的阳性率。5) 也可能与患者取痰质量,实验室环境有关。

TB-DNA 在痰培养阳性中,阳性率为 68.5%;在培养阴性中,阴性率为 95.7%。由此可以得出:1) 虽然 TB-DNA 在培养阴性标本中,阴性率高达 95.7,说明 TB-DNA 检测特异性高,但在临床意义上,也只能说明痰中没找到结核杆菌,不能确诊肺结核,但也不能排除不是肺结核;2) 约 TB-DNA 在痰培养阳性标本中阳性率为 68.5%,基本可确诊这部分患者为肺结核,而剩下的 31.5% TB-DNA 阴性,而痰培养阳性的痰标本需进一步做菌种鉴定分析,确定其是否为非结核分枝杆菌;约 56.6%(202/357) 患者痰涂片(-)培养(-)DNA(-),这部分患者因无实验室证据,临床易误诊,临床医师可参照结核菌素皮肤试验(TST)、 γ -干扰素释放试验(IGRAs)^[9]、结核抗体等检测结果,及患者临床表现,影像学表现给以综合诊断,必要时给以诊断性抗炎 2 周后复查胸片排除肺部感染。

DNA(+)培养(+)标本中,痰涂片阳性率约占 1/2,可能与患者痰中结核菌较少有关,一般每毫升痰液中含 5 000~10 000 条菌痰涂片才能得到阳性结果,因此痰液中菌量含量较少的情况下,显微镜下难以看到结核杆菌,而 TB-DNA 和痰培养检测相对敏感性更高,检出率更高。在 DNA(+)培养(-)标本中,可能因为荧光定量 PCR 敏感性过高引起 TB-DNA 阳性,也可能因为污染,其中有 1 个标本痰涂片阳性,除去污染的可能,也可能为死菌。因为痰涂片与培养均不能将结核杆菌与其他分枝杆菌区分开来,而 TB-DNA 检查可以特异性的区分,因此遇到 DNA(-)培养(+)情况下,需进一步考虑非分,可行痰培养物 MBP64 检测和菌种鉴定^[10-11];痰涂片(-),DNA(+)培养(+)可能与痰中结核菌含量较少有关,而痰涂片(-),DNA(-)培养(+),可能由于痰中结核菌含量较少引起,也可能与痰菌为

金华武义社区耐氨苄西林流感嗜血杆菌的流行现状及耐药性研究

董叶青,董春富,俞增仙,陶兴和

浙江武义第一人民医院,浙江 武义 321200

摘要: **目的** 明确金华武义社区临床分离耐氨苄西林流感嗜血杆菌流行现状及耐药性变化。**方法** 收集金华武义社区 2015 年 11 月-2017 年 6 月临床呼吸道标本检出的 163 株流感嗜血杆菌并测定氨苄西林耐药率和耐药谱;通过多位点序列分型技术(mST)对所有菌株进行分子遗传学分析,明确亲缘关系。**结果** 本次研究共检出 68 株耐氨苄西林流感嗜血杆菌,耐药率为 41.72%。氨苄西林耐药株对复方新诺明(75.71% vs. 31.37%, $\chi^2 = 32.65, P < 0.001$)、头孢克洛(67.14% vs. 9.80%, $\chi^2 = 61.60, P < 0.001$)、头孢呋辛(42.86% vs. 8.82%, $\chi^2 = 27.42, P < 0.001$)和阿莫西林/克拉维酸(21.43% vs. 0%, $\chi^2 = 12.97, P < 0.001$)的耐药率比氨苄西林敏感株高,差异均有统计学意义($P < 0.001$)。所有菌株对头孢噻肟、利福平、氧氟沙星敏感。在 68 株氨苄西林耐药株中,共检出 β -内酰胺酶阳性 39 株(57.35%)。mST 结果显示 68 株分离株共获得 30 个已知 ST 型及 11 个新的 ST 型,且以 ST-422(7 株,17.07%)为主。系统进化树显示有两个明显的分支 Group I 和 Group II,且分离株主要存在于 Group II 中。最小生成树图显示 6 株新的 ST 型与 2~3 个已知基因型同属于一个克隆群,具有基因同源性。**结论** 金华武义社区耐氨苄西林流感嗜血杆菌对复方新诺明、头孢克洛抗生素呈现出严重耐药性,而头孢噻肟、氧氟沙星可作为产酶菌株临床治疗的首选药物。流行菌株的流行呈散发趋势,ST-422 为其中的一个优势克隆值得进一步关注。

关键词: 氨苄西林耐药; 流感嗜血杆菌; 多位点序列分型; 克隆播散

中图分类号: R378.4 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2019)08-1012-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2019.08.034

流感嗜血杆菌是社区获得性肺炎(community acquired pneumonia, CAP)、慢性阻塞性肺疾病(chronic

基金项目: 金华科技局社会发展项目(2017-4-078)

作者简介: 董叶青(1979-),女,本科学历,副主任技师,主要从事临床微生物研究工作。

obstructive pulmonary disease, COPD)急性加重患者最主要致病菌^[1]之一。社区呼吸道感染更多依赖临床医生的经验性治疗,抗生素的频繁和不恰当的使用导致了抗生素耐药呼吸细菌的获取和传播。近年来,流感嗜血杆菌对氨苄西林、复方新诺明等抗生素呈逐年

非结核分枝杆菌有关,需进一步行菌种鉴定或 MBP64 检测。

综上所述,痰检找抗酸杆菌受多种因素影响,结核病的实验室检测手段如痰涂片、痰培养和 TB-DNA 等方法各有优劣,但 BD-960 培养法相对阳性率、准确率更高,仍是确诊肺结核的金标准,但还需结合其他检测方法联合判断,而且除了依赖于实验室诊断,特别是痰菌阴性患者,仍需进一步结合患者有无密切接触史,临床表现,影像学结果等进行综合诊断分析。

参考文献

- [1] Rishi S, Sinha P, Malhotra B, et al. A comparative study for the detection of *Mycobacteria* by BACTEC MGIT 960, Lowenstein Jensen media and direct AFB smear examination[J]. *Indian J Med Microbiol*, 2007, 25(4): 383-386.
- [2] 曹英迪. BACTEC MGIT-960 结核菌快速培养 800 例分析[J]. *河南预防医学杂志*, 2017, 28(3): 186-187.
- [3] 王雅宁. 荧光定量 PCR 技术检测结核杆菌临床应用分析[J]. *实用预防医学*, 2012, 19(9): 1404-1406.

- [4] 余丽,李海成,黎贞燕,等. 结核菌及其耐药性不同检测方法的临床应用评价[J]. *广东医学*, 2017, 38(2): 190-193.
- [5] 邹晓艳,杨德远,孔昌盛,等. 肺结核病患者痰标本性状及采样时间与抗酸杆菌阳性结果分析[J]. *检验医学与临床*, 2013, 10(3): 339-341.
- [6] 赵雁林,刘宇红,姜广路,等. 痰涂片镜检查标准化操作及质量保证手册[M]. 北京:中国协和医科大学出版社, 2009: 152-153.
- [7] 邓章莉,吴道深,李彦良,等. 110 例耐药肺结核病临床特征分析[J]. *结核病与肺部健康杂志*, 2015, 4(2): 113-115.
- [8] 杜鹏,郑文斌,卢留珠,等. Xpert MTB/RIF 和荧光定量 PCR 在痰液标本中快速检测结核分枝杆菌的比较[J]. *中国实验诊断学*, 2018, 22(4): 656-659.
- [9] 陈芳,项忠元. T 淋巴细胞干扰素释放试验在检测结核杆菌感染中的应用[J]. *实用预防医学*, 2017, 24(3): 272-274.
- [10] 张帆,刘守江,魏巍,等. 2 月末结核分枝杆菌阳性初治肺结核患者菌型鉴定结果分析[J]. *临床肺科杂志*, 2016, 21(10): 1754-1756.
- [11] 赵冰,侯萍,黄静,等. 高敏感度酶联免疫吸附测定法检测分泌蛋白 MPB64 对于活动性肺结核诊断的价值[J]. *中国防痨杂志*, 2017, 39(12): 1303-1308.

收稿日期:2018-09-28