

基层实验室肺结核检测方法的优化组合

余琴¹, 刘海灿², 赵爱兰¹, 俞南¹, 张爱洁¹, 徐伟¹, 魏云芳¹

1. 北京市朝阳区疾病预防控制中心, 北京 100021; 2. 中国疾病预防控制中心传染病控制研究所, 北京 102206

摘要: **目的** 探讨不同实验室检测方法在基层实验室协助诊断肺结核的最佳组合。 **方法** 回顾性分析 2016 年 1 月—2020 年 12 月在北京市朝阳区结核病门诊疑似肺结核患者初次就诊时临床资料。统计抗酸染色镜检、痰培养、利福平耐药实时荧光定量核酸检测 (GeneXpert MTB/RIF 检测)、结核分枝杆菌 IgM/IgG 抗体检测和 γ -干扰素释放试验 (tuberculosis-interfering gamma release assay, TB-IGRA) 5 种检测方法诊断结核分枝杆菌感染的性能, 分析几种检测方法辅助诊断肺结核的最优组合。 **结果** 研究纳入 3 560 例疑似肺结核患者, 经临床诊断 1 017 例为肺结核患者。抗酸染色镜检、痰培养、GeneXpert MTB/RIF 检测、IgM/IgG 抗体检测和 TB-IGRA 的阳性检出率分别为 9.3%、13.5%、22.8%、16.2% 和 23.7%, 差异有统计学意义; 灵敏度介于 31.9%~80.0%, 特异度介于 98.9%~99.8%。以临床诊断为金标准, 病原学检测+IgM/IgG 抗体检测+TB-IGRA 的组合具有最高的诊断性能, 约登指数 0.806。 **结论** 结核分枝杆菌 IgM/IgG 抗体检测和 TB-IGRA 是实验室辅助诊断肺结核的有效手段。

关键词: 实验室; 肺结核; 病原学; 免疫学; 抗体; γ -干扰素; 利福平

中图分类号: R521; R446 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2023)03-0365-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2023.03.029

目前, 结核病依旧是威胁人类生存和健康的重大传染病之一。结核病是由结核分枝杆菌感染引起的一种慢性传染病, 其传播性强。据 WHO 统计, 全球有约 20 亿结核分枝杆菌感染者, 每年约有 900 万人患活动性结核, 导致 200 万人死亡。WHO 在《2021 年全球结核病控制报告》中指出, 我国作为 30 个结核病高负担国家之一, 其发病数及新发利福平耐药结核病/耐多药结核病 (multi-drug resistance/rifampicin resistance-tuberculosis, MDR/RR-TB) 发病例数仅次于印度, 高居世界第二^[1]。因此, 结核病的早期诊断, 成为我国防控结核病至关重要的一步。

结核分枝杆菌的实验室检测, 在一定程度上为结核病的早期诊断提供必不可少的依据。由于成本及实验室技术条件等原因, 基层实验室的结核病检测长期依赖于抗酸染色镜检、罗氏固体培养等病原学传统方法。这两种检测方法分别存在灵敏度低、耗时较长等缺陷, 因此补充免疫学的 IgM/IgG 抗体和 γ -干扰素检测技术以及分子生物学的利福平耐药实时荧光定量核酸检测可以有效弥补病原学检测方法的不足。考虑到基层实验室条件有限, 如何有效选择检测方法, 使其在提高检测能力的同时节省成本, 成为本次研究的重点。因此本研究就 5 种结核分枝杆菌的实验室检测方法进行分析, 筛选最佳的检测方法组合, 评估其在基层实验

室的应用价值。

1 材料与方法

1.1 研究对象和入组标准 纳入 2016 年 1 月—2020 年 12 月北京市朝阳区结核病门诊部收治的初诊疑似肺结核患者 3 560 例。经门诊医生结合疑似患者临床症状、影像及实验室结果, 确诊肺结核患者 1 017 例^[2]。所有纳入的初诊疑似肺结核患者, 其中男性 2 034 例, 女性 1 526 例, 年龄 19~82 岁; 无合并糖尿病等代谢性疾病; 既往无肺结核病史; 患者均知情并同意本次研究。

1.2 仪器与试剂 实时荧光定量核酸扩增仪 (美国 Cepheid 公司)、萘尼氏抗酸染液 (珠海贝索生物技术有限公司)、罗氏固体培养基 (珠海贝索生物技术有限公司)、结核分枝杆菌 IgG/IgM 抗体检测试剂盒 (北京健乃喜生物技术有限公司)、结核感染 T 细胞检测试剂盒 (北京万泰生物药业股份有限公司)、GeneXpert MTB/RIF 检测试剂盒 (美国赛沛公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 抗酸染色镜检和分离培养 对所有门诊纳入研究的疑似患者, 采集痰标本, 样本收集后, 按照《痰涂片镜检标准化操作及质量保证手册》^[3] 的要求进行萘尼氏抗酸染色镜检, 同时对痰标本进行分离培养, 标准操作按照《结核病实验室检验规程》^[4] 进行。

1.3.2 结核分枝杆菌 IgG/IgM 抗体检测 取所有疑似患者空腹静脉血 3 ml, 以 3 000 r/min 离心 10 min,

作者介绍: 余琴, 女, 湖南岳阳人, 硕士, 主管检验师, 主要从事结核病实验室检测工作。

通信作者: 魏云芳, E-mail: weiyunfang127@163.com。

吸取血清 4 ℃ 保存待检,采用胶体金免疫层析法检测结核分枝杆菌特异性 IgG/IgM 抗体。试验操作和结果判定严格按照说明书的要求进行。

1.3.3 γ -干扰素释放试验 (tuberculosis-interfering gamma release assay, TB-IGRA) 取所有疑似患者空腹静脉血 5 ml,置于肝素锂抗凝管中,轻轻摇匀后尽快分装到本底对照管(N)、特异性刺激管(T)、阳性对照管(P)中,每种管分装 1.5 ml 新鲜全血,颠倒混匀后置于含 5% 二氧化碳、37 ℃ 恒温细胞培养箱中培养 20~24 h。按照试剂盒说明书用 ELISA 定量检测释放的 γ -干扰素(interfering gamma, IFN- γ) 水平。根据酶标仪测量结果,计算 T、N、P 管中血浆相应的 IFN- γ 含量。试验操作和结果判定严格按照说明书的要求进行。

1.3.4 GeneXpert MTB/RIF 检测 对所有门诊纳入研究的疑似患者,采集痰标本,样本收集后,视标本性状加入 1~2 倍体积的标本处理液,震荡均匀,静置 15 min,吸取 2 ml 液化标本于 Cartridge 反应盒,将加好标本的 Cartridge 反应盒放入 GeneXpert 检测仪内,开始自动检测,反应结束后在检测系统窗口下直接观察测试结果。试验操作和结果判定严格按照说明书的要求进行。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析中, χ^2 检验比较各检测方法之间的差异, $P<0.05$ 为差异有统计学意义;以临床诊断为标准,利用约登指数(Yuden index)判断不同检测方法组合综合检测性能高低。

2 结果

2.1 不同方法检测结核分枝杆菌的比较 3 560 例疑似患者分别采集痰标本和空腹静脉血,进行抗酸染色镜检、痰培养、GeneXpert MTB/RIF、IgG/IgM 抗体检测及 TB-IGRA 5 种检测方法,其中 TB-IGRA 阳性检出率最高(23.7%),各检测方法阳性率差异有统计学意义,见表 1。

表 1 不同方法检测结核分枝杆菌阳性检出率的比较

检测方法	阳性数(%)	阴性数(%)	χ^2 值	P 值
抗酸染色镜检	332(9.3)	3 228(90.7)	3.791	<0.001
痰培养	479(13.5)	3 081(86.5)		
GeneXpert MTB/RIF 检测	812(22.8)	2 748(77.2)		
IgG/IgM 抗体检测	575(16.2)	2 985(83.8)		
TB-IGRA	844(23.7)	2 716(76.3)		

2.2 5 种检测方法对于肺结核的诊断价值 根据最

新发布的《肺结核诊断(WS 288—2017)》,纳入本次研究的 3 560 例疑似患者,经临床诊断确诊肺结核患者 1 017 例^[2],其进行的抗酸染色镜检、痰培养、GeneXpert MTB/RIF 检测、IgG/IgM 抗体检测及 TB-IGRA 这 5 种方法检测结核分枝杆菌感染的灵敏度介于 31.9%~80.0%之间,特异度介于 98.9%~99.8%之间,见表 2。

表 2 5 种检测方法对于肺结核的诊断价值

检测方法	灵敏度	特异度	阳性预测值	阴性预测值
抗酸染色镜检	31.9%(324/1 017)	99.7%(2 535/2 543)	97.6%(324/332)	78.5%(2 535/3 228)
痰培养	46.3%(471/1 017)	99.7%(2 535/2 543)	98.3%(471/479)	82.3%(2 535/3 081)
GeneXpert MTB/RIF 检测	77.0%(783/1 017)	98.9%(2 514/2 543)	96.5%(783/812)	91.5%(2 514/2 748)
IgG/IgM 抗体检测	56.0%(569/1 017)	99.8%(2 537/2 543)	99.0%(569/575)	85.0%(2 537/2 985)
TB-IGRA	80.0%(813/1 017)	98.8%(2 512/2 543)	96.4%(813/844)	92.5%(2 512/2 716)

2.3 不同检测方法组合综合检测性能比较 以临床诊断为金标准,分析传统病原学检测方法与新兴方法的组合检测性能高低,经综合检测性能分析显示病原学+IgG/IgM 抗体检测+TB-IGRA 组合的约登指数最高,为 0.806,见表 3。

表 3 不同检测方法组合诊断肺结核综合检测性能比较

检测方法	灵敏度	特异度	约登指数
①	52.3%(532/1 017)	99.6%(2 532/2 543)	0.519
①+②	77.4%(787/1 017)	98.3%(2 501/2 543)	0.757
①+③	58.4%(594/1 017)	99.4%(2 528/2 543)	0.578
①+④	80.6%(820/1 017)	98.5%(2 505/2 543)	0.791
①+②+③	80.0%(814/1 017)	98.6%(2 507/2 543)	0.786
①+②+④	81.7%(831/1 017)	97.9%(2 489/2 543)	0.796
①+③+④	82.2%(836/1 017)	98.4%(2 503/2 543)	0.806
①+②+③+④	83.3%(847/1 017)	97.2%(2 472/2 543)	0.805

注:①传统病原学方法(抗酸染色镜检+痰培养);②GeneXpert MTB/RIF 检测;③IgG/IgM 抗体检测;④TB-IGRA。

3 讨论

目前,结核病的临床诊断主要是依据临床症状、影像学特征和实验室检测三个方面,而结核病实验室的检测技术又分为病原学诊断技术、分子生物学技术及免疫学方法^[5]。在常规病原学检查技术中,抗酸染色镜检要求每毫升痰标本中抗酸杆菌达到 5 000~10 000 条菌以上才能被检出^[6],对痰标本要求较高,同时容易造成误诊或者漏诊^[7-9],而痰培养阳性率高但检测周期较长^[9]。在本研究中,痰培养的阳性检出率(13.5%)及灵敏度(46.3%)均高于抗酸染色涂片(9.3% & 31.9%)。结核分枝杆菌 IgG/IgM 抗体检测

试剂盒采用 ESAT-6、14 kD、16 kD 和 38 kD 结核分枝杆菌重组抗原。研究表明,这 4 种蛋白分别具有高特异性、较强的免疫原性及帮助结核菌在宿主内存活的特征^[10-13]。与传统的痰培养、痰涂片检测结果相比,该方法的阳性检出率明显提高,用于结核病的辅助诊断可增加临床中结核病的阳性检出率。与国外其他研究比较^[14],本次检测的敏感度略低(56.0%),其原因可能是引起免疫应答的抗原性较复杂,而仅用有限的 4 种抗原检测,存在一定的漏诊可能。

2017 年最新提出的《肺结核诊断(WS 288—2017)》中首次将 TB-IGRA 纳入免疫学检查加以推广。本研究中 TB-IGRA 阳性检出率(23.7%)最高,且灵敏度最高(80.0%)。这种方法是利用结核分枝杆菌感染者外周血中存在结核分枝杆菌致敏的 T 淋巴细胞,这些 T 淋巴细胞再次接触结核分枝杆菌特异性抗原时可发生克隆增殖分化并释放 IFN- γ 的原理进行检测^[15]。采用的特异性抗原主要是 ESA-6、CFP-10 和 TB7.7,这三种抗原主要在结核分枝杆菌中存在,而在卡介苗和大部分非结核分枝杆菌中是不表达的,因此不受卡介苗接种的影响^[16]。同时,不同于抗酸染色镜检及痰培养,不需要痰标本,因此 TB-IGRA 不受痰液质量的影响。但是该方法无法区别潜伏性感染和活动性肺结核,与国外相比较,TB-IGRA 检测主要用于诊断潜伏性肺结核、监测潜伏结核分枝杆菌发展为活动性肺结核,而我国主要是用于活动性结核病的辅助检测方法。因此在本研究中,TB-IGRA 检出的灵敏度和阴性预测值分别为 80.0% 和 92.5%,而特异度和阳性预测值稍高,说明在未诊断结核病的疑似患者中,存在一定比率的潜伏感染可能性。

GeneXpert MTB/RIF 检测是目前各级实验室推广较为普遍的分子生物学技术。它是一种由巢式 PCR 发展来的基因扩增技术,能在 2 h 内检测是否为结核分枝杆菌复合群,以及是否利福平耐药^[17]。GeneXpert MTB/RIF 检测在本次研究中灵敏度明显高于抗酸染色镜检,同时高于痰培养,究其原因,在本次 GeneXpert MTB/RIF 检测中,未能区别出死的和活的结核分枝杆菌,导致灵敏度高于痰培养,而阳性预测值则略低于痰培养。GeneXpert MTB/RIF 不足之处主要有无法区分活性菌和死亡菌,因此不能用于监测对治疗的反应;无法区分结核分枝杆菌、牛分枝杆菌和卡介苗;昂贵;需要定期校准和维护等。此外,在利福平耐药的判定上,据文献报道存在 5% 的假阴性,因

为 5% 的利福平耐药性不是由 *rpo B* 核心区域内的基因突变所导致^[18]。该方法在提供结核分枝杆菌感染结果的同时,可以以最快的速度为临床利福平耐药病人的诊治提供有利的辅助诊断。

本研究将 GeneXpert MTB/RIF 检测、IgG/IgM 抗体检测、TB-IGRA 3 种方法与细菌学检测进行排列组合进一步分析发现,病原学+IgG/IgM 抗体检测+TB-IGRA 的组合具有最高的约登指数(0.806),并非检测方法越多诊断性能越高。在 2 种诊断方法组合中,病原学+TB-IGRA 具有最高的约登指数(0.791),提示实验室在选择单一辅助诊断方法时可以优先考虑 TB-IGRA。若考虑时效性,病原学+GeneXpert MTB/RIF 检测的性能最优,不仅有较高的约登指数(0.757),还能更快得出检测结果。但 GeneXpert MTB/RIF 检测的成本较高,基层实验室可以根据自身条件开展检测。如希望实验室检测涵盖病原学、免疫学和分子生物学三方面检测,免疫学中 IgG/IgM 抗体检测和 TB-IGRA 对检测性能的提高效果差别甚微,实验室可酌情选择。

综上所述,无论是病原学、免疫学还是分子生物学检测,在结核病的实验室诊断中均存在一定的优缺点。基层结核病实验室需从自身条件出发,根据成本、技术条件、时效性等方面合理选择辅助检测方法,才能达到最好的检测效果。

参考文献

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2021[R]. Geneva: WHO, 2021.
- [2] 国家卫生和计划生育委员会. 肺结核诊断: WS 288—2017[S]. 北京: 人民卫生出版社, 2017: 3—10.
- [3] 赵雁林, 刘宇红, 姜广路, 等. 中国结核病防治规划 痰涂片镜检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: 100—110.
- [4] 赵雁林, 逢宇. 结核病实验室检验规程[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 32—133.
- [5] Abdurrahman ST, Mbanaso O, Lawson L, et al. Testing pooled sputum with Xpert MTB/RIF for the diagnosis of pulmonary tuberculosis to increase affordability in low-income countries[J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(8): 2502—2508.
- [6] Kirwan DE, Ugarte-Gil C, Gilman RH, et al. Microscopic observation drug susceptibility assay for rapid diagnosis of lymph node tuberculosis and detection of drug resistance[J]. J Clin Microbiol, 2016, 54(1): 185—189.
- [7] Ou XC, Li H, Liu DX, et al. Comparison of Xpert MTB/RIF, RealAmp, and CPA tests in detecting mycobacterium tuberculosis[J]. Biomed Environ Sci, 2019, 32(3): 215—219.
- [8] 韩鹏, 赵丽萍, 李彦芳, 等. 3 种方法检测痰标本结果临床应用对比分析[J]. 医学动物防制, 2018, 34(1): 94—96.

新生儿重症监护病房医院感染病原菌耐药分析

贾舒雯, 喻晓露

杭州市临平区妇幼保健院, 浙江 杭州 310000

摘要: **目的** 分析新生儿重症监护病房(neonatal intensive care unit, NICU)医院感染病原菌耐药情况,为临床合理选择抗菌药物提供依据。 **方法** 选择 2017 年 1 月—2021 年 12 月杭州市临平区妇幼保健院 NICU 收治的 1 858 例新生儿作为临床观察对象,采集新生儿血液、尿液与呼吸道分泌物进行病原菌培养,并经 K-B 纸片扩散法分析病原菌对不同抗菌药物的耐药性。 **结果** 5 年间在 1 858 例 NICU 新生儿中检出医院感染 82 例,发生率为 4.41%。82 例感染患儿的送检标本中培养及分离出病原菌 107 株,包括 67 株(62.62%)革兰氏阴性菌、34 株(31.78%)革兰氏阳性菌、6 株(5.61%)真菌;革兰氏阴性菌中肺炎克雷伯菌对氨基苄西林、头孢唑林、氨基苄西林/舒巴坦、头孢他啶产生的耐药性较高(耐药率均>70.00%);铜绿假单胞菌对庆大霉素、氨基苄西林、头孢唑林、磺胺甲恶唑/甲氧苄啶产生的耐药性较高(耐药率均>70.00%);大肠埃希菌对氨基苄西林、头孢曲松、头孢唑林产生的耐药性较高(耐药率均>80.00%);革兰氏阳性菌中金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌对头孢唑林、青霉素、氨基苄西林及红霉素产生的耐药性均较高(耐药率均>80.00%)。真菌中近平滑假丝酵母菌、白假丝酵母菌对青霉素、复方新诺明、红霉素及产生的左氧氟沙星耐药性均较高,但对阿奇霉素、头孢塞肟、氨基苄西林的耐药性均较低。 **结论** NICU 新生儿医院感染的主要病原菌为革兰氏阴性菌,对头孢唑林、青霉素等抗生素药物具有较高的耐药特性,临床应制定针对性治疗方案,强化抗生素药物管理,提高临床治疗效果。

关键词: 新生儿;重症监护病房;医院感染;病原菌;耐药性

中图分类号: R722.13 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2023)03-0368-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2023.03.030

新生儿重症监护病房(neonatal intensive care unit, NICU)是医院收治重症新生儿的主要场所,因新生儿病情危重,病情变化快,机体抵抗力较弱,免疫功能等尚未发育成熟,加之吸痰及气管插管治疗、静脉置管等相关侵入性操作,住院治疗期间易并发肺部感染等医院感染,影响临床治疗与预后^[1-2]。当前临床对于

NICU 医院感染的防治仍以抗菌药物为主,但由于临床不合理使用或是滥用抗菌药物现象较为普遍,导致病原菌多重耐药和耐药性增强,临床用药面临严峻考验,不仅增加 NICU 患儿的救治难度,甚至会引发严重并发症,危及患儿生命安全^[3-5]。因此,为了精准指导临床合理使用抗菌药物,减少新生儿感染发生与死亡,早期分析和了解 NICU 新生儿医院感染相关病原菌分布特点与耐药性的意义重大。本研究对 2017—2021 年

作者简介: 贾舒雯(1990-),女,浙江杭州人,大学本科,住院医师,主要从事新生儿常见疾病的诊治工作。

- [9] 张帆,刘守江,魏巍,等.结核分枝杆菌实验室检测方法的结果差异分析及临床诊断评估[J].实用预防医学,2019,26(8):1010-1012.
- [10] Feng X,Xiu B,Chen K,et al.Enhanced serodiagnostic utility of novel *Mycobacterium tuberculosis* polyproteins[J].J Infect,2013,66(4):366-375.
- [11] Sumi MG, Mathai A, Reuben S, et al. A comparative evaluation of dot immunobinding assay (Dot-Iba) and polymerase chain reaction (PCR) for the laboratory diagnosis of tuberculous meningitis[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2002, 42(1): 35-38.
- [12] Demissie A,Leyten EM,Abebe M,et al. Recognition of stage-specific mycobacterial antigens differentiates between acute and latent infections with *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Clin Vaccine Immunol, 2006, 13(2):179-186.
- [13] Imaz MS, Comini MA, Zerbini E, et al. Evaluation of commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits for detection of tuberculosis in Argentinean population[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(2): 884-887.
- [14] 夏强,傅潺潺,竺祖军,等.结核抗体 IgG/IgM 检测在肺结核和肺外结核中的诊断价值[J].中国人兽共患病学报,2014,30(10):1052-1056.
- [15] Della Bella C, Spinicci M, Alnawisri HFM, et al. LIOFeron TB/LTBI: a novel and reliable test for LTBI and tuberculosis[J]. Int J Infect Dis, 2019, 91:177-181.
- [16] Abubakar I, Lalvani A, Southern J, et al. Two interferon gamma release assays for predicting active tuberculosis: the UK PREDICT TB prognostic test study[J]. Health Technol Assess, 2018, 22(56): 1-96.
- [17] 瞿向前, 金建东. 痰 GeneXpert MTB/RIF 临床应用探讨[J]. 中国继续医学教育, 2017, 9(34): 40-42.
- [18] Van Der Zanden AG, Te Koppele-Vije EM, Vijaya Bhanu N, et al. Use of DNA extracts from Ziehl-Neelsen-stained slides for molecular detection of rifampin resistance and spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(3): 1101-1108.