

• 论 著 •

肺泡灌洗液和痰液涂片抗酸染色半定量与 GeneXpert MTB/RIF 半定量分析临床应用*

刘桂治, 周旋, 林茂锐, 李明友, 孙亮, 余子龙, 曹东林[△]
(广东省第二人民医院检验医学部, 广东广州 510317)

摘要:目的 评估不同类型的标本应用于 GeneXpert MTB/RIF 对结核病诊治的指导意义。方法 回顾性调查分析该院 2017 年 6 月至 2019 年 6 月 249 例疑似结核病患者痰液、肺泡灌洗液涂片抗酸染色半定量与 GeneXpert MTB/RIF 检测半定量是否存在相关性。结果 GeneXpert MTB/RIF 检测 Ct 值与涂片染色半定量之间有一致性。当涂片半定量结果为(-)、(+)时,肺泡灌洗液在进行 GeneXpert MTB/RIF 检测时 Ct 值不同于痰液,差异有统计学意义($P < 0.05$);当涂片半定量结果为(++),(+++),(++++)时,肺泡灌洗液在进行 GeneXpert MTB/RIF 检测时的 Ct 值与痰液差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 结核细菌载量较低时,采集肺泡灌洗液应用于 GeneXpert MTB/RIF 半定量检测,能够提高结核检出率,支气管镜的广泛使用有助于结核病的诊断。GeneXpert MTB/RIF 检测的 Ct 值对于结核杆菌半定量有重要提示作用。

关键词: GeneXpert MTB/RIF; 肺泡灌洗液; 半定量; 抗酸染色

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2020.21.018 **中图法分类号:** R521

文章编号: 1673-4130(2020)21-2637-04 **文献标识码:** A

Clinical application of alveolar lavage fluid in GeneXpert MTB/RIF detection and Ziehl-Neelsen staining semi-quantitative detection*

LIU Guizhi, ZHOU Xuan, LIN Maorui, LI Mingyou, SUN Liang, YU Zilong, CAO Donglin[△]
(Department of Clinical Laboratory, Guangdong No. 2 Provincial People's Hospital, Guangzhou, Guangdong 510317, China)

Abstract: Objective To investigate the clinical value of different samples apply to GeneXpert MTB/RIF on tuberculosis diagnosis. **Methods** A total of 249 patients with suspected tuberculosis were retrospectively analyzed from June 2017 to June 2019. The relationship was analyzed between detection quantitative staining semi-smear acid fast and GeneXpert MTB/RIF with sputum and bronchoalveolar lavage fluid. **Results** The Ct value of GeneXpert MTB/RIF detection was consistent with smear staining semi-quantitative detection. The Ct value of sputum was significantly different from that of bronchoalveolar lavage fluid in GeneXpert MTB/RIF only when smear staining semi-quantitative detection were defined as (-) and (+) ($P < 0.05$). The difference between sputum and bronchoalveolar lavage fluid was not statistically significant when smear staining semi-quantitative detection were defined as(++), (+++) or(++++) ($P > 0.05$). **Conclusion** The application of bronchoalveolar lavage fluid in GeneXpert MTB/RIF can improve the detection rate of tuberculosis when Mycobacterium tuberculosis load is low. The Ct value of GeneXpert MTB/RIF is an important indicator for the semi quantitative detection of Mycobacterium tuberculosis.

Key words: GeneXpert MTB/RIF; bronchoalveolar lavage fluid; semi-quantitative detection; acid fast staining

一直以来,结核病都是受全世界关注的公共卫生问题。根据我国结核病患者登记情况,广东省是结核病最为严重的几个区域之一^[1-3]。GeneXpert MTB/RIF 是近年来实验室诊断结核病的新兴技术,因其方

便、快捷、灵敏度高,已在临床广泛应用^[4-5]。随着 2017 年颁布的新版肺结核诊断标准中加入支气管镜检查及气管、支气管结核镜下表现,肺泡灌洗液逐渐成为 GeneXpert MTB/RIF 检测的主要标本^[2],结核

* 基金项目:2013 年度省级财政技术研究开发与推广应用专项资助项目[粤财工(2013)401 号]。

作者简介:刘桂治,女,主管技师,主要从事微生物耐药机制方面的研究。△ 通信作者,E-mail:caodl@126.com。

本文引用格式:刘桂治,周旋,林茂锐,等.肺泡灌洗液和痰液涂片抗酸染色半定量与 GeneXpert MTB/RIF 半定量分析临床应用[J].国际检验医学杂志,2020,41(21):2637-2640.

杆菌载量的半定量对结核患者的追踪治疗观察有重要价值。本研究拟回顾性调查分析 GeneXpert MTB/RIF 技术和结核涂片抗酸染色半定量在临床中的应用,探讨不同类型的标本应用于该项诊断新技术对结核病诊治的指导意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 回顾性调查分析本院 2017 年 6 月至 2019 年 6 月送检的肺泡灌洗液患者 820 例,其中男 499 例,女 321 例,年龄 15~89 岁。回顾性调查分析本院同期疑似结核病患者 249 例,比较 GeneXpert MTB/RIF 半定量检测与涂片抗酸染色半定量检测结果。

1.2 研究方法

1.2.1 肺泡灌洗液与痰液标本准备^[1] 肺泡灌洗液收集:按照病变部位选择灌洗肺段,将电子支气管镜顶端插入肺段支气管开口处,经活检孔注入 2%利多卡因 2 mL 行肺段局部麻醉,然后注入 37 °C 生理盐水 5~10 mL,重复灌洗肺部 2~3 次,收集肺泡灌洗液约 15 mL,3 000 r/min 离心 15 min 备用。痰液标本:患者晨起立即用清水漱口后,咳出深部的第 2 口、第 3 口痰液。收到痰液后进行痰液常规判断是否为合格痰液,若不合格嘱其重新留取。

1.2.2 涂片抗酸染色 取 0.05~0.10 mL 患者痰液标本或肺泡灌洗液沉渣标本在玻片上涂抹成卵圆形的膜,面积为 1 cm×2 cm,萋-尼氏染色法抗酸染色,镜检,涂片检查按《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》^[1] 操作。按照萋-尼氏染色镜检结果分级报告,抗酸杆菌阴性(-):连续观察 300 个不同视野,未发现抗酸杆菌,报告抗酸杆菌数 1~8 条/300 视野;抗酸杆菌阳性(+):3~9 条/100 视野;抗酸杆菌阳性(++):1~9 条/10 视野;抗酸杆菌阳性(+++):1~9 条/每个视野;抗酸杆菌阳性(++++): ≥ 10 条/每个视野。抗酸染色液试剂盒由珠海贝索生物技术有限公司提供。

1.2.3 GeneXpert MTB/RIF 技术 GeneXpert MTB/RIF 系统和检测试剂盒由赛沛(上海)商贸有限公司提供。GeneXpert MTB/RIF 技术不同标本类型按照仪器说明书规范操作。结核分枝杆菌检测基于标本中结核分枝杆菌的 Ct 值,结果将以高、中、低或非常低来显示,其中 Ct<16 为高水平,Ct 为 16~22 为中等水平,Ct>22~28 为低水平,Ct>28 为极低水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计软件进行数据分析处理。计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验;符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 支气管肺泡灌洗液标本的科室分布 在所有送

检标本中,呼吸与危重症医学科送检率最高,为 38.54%,其次是重症监护室,为 24.51%,其余科室送检率较低,见表 1。

表 1 支气管肺泡灌洗液标本的科室分布(*n*=820)

科室	2017 年 6 月至	2018 年 7 月至	合计[<i>n</i> (%)]
	2018 年 6 月(<i>n</i>)	2019 年 6 月(<i>n</i>)	
呼吸与危重症医学科	122	194	316(38.54)
重症监护室	28	173	201(24.51)
神经内科	29	13	42(5.12)
神经外科	31	14	45(5.49)
心内一科	15	14	29(3.54)
普外二科	8	10	18(2.20)
创伤外科	9	8	17(2.07)
心胸外科	7	12	19(2.32)
普外一科	10	10	20(2.44)
骨科	4	5	9(1.10)
肾内科	6	6	12(1.46)
心内二科	2	6	8(0.98)
心内三科	4	5	9(1.10)
消化内科	3	1	4(0.49)
感染科	2	1	3(0.37)
肿瘤一科	5	7	12(1.46)
肿瘤二科	5	3	8(0.98)
血液科	8	10	18(2.20)
内分泌科	1	1	2(0.24)
耳鼻喉科	4	0	4(0.49)
儿科	3	6	9(1.10)
泌尿外科	5	3	8(0.98)
风湿免疫科	4	1	5(0.61)
心血管外科	2	0	2(0.24)

表 2 GeneXpert MTB/RIF 技术与涂片抗酸染色法检测结果比较

标本类型	<i>n</i>	涂片抗酸染色法	GeneXpert MTB/RIF 技术	
			(+)	(-)
痰液	137	(+)	26	3
		(-)	45	63
肺泡灌洗液	104	(+)	19	1
		(-)	25	59
脑脊液	4	(+)	0	0
		(-)	1	3
大便	2	(+)	0	0
		(-)	0	2
关节穿刺液	2	(+)	0	0
		(-)	0	2

2.2 GeneXpert MTB/RIF 技术与涂片抗酸染色法检测结果比较 根据 2017 年肺结核诊断标准,挑选符合临床诊断的病例 249 例,将 249 例按照标本类型

分类, GeneXpert MTB/RIF 技术与涂片抗酸染色法检测结果见表 2。结果显示, 痰液(137 例)和肺泡灌洗液(104 例)占大部分, 其他标本类型如脑脊液(4 例)、大便(2 例)和关节穿刺液(2 例)较少。其中痰液阳性预测值和阴性预测值分别为 36.6%、95.5%; 肺泡灌洗液的阳性预测值和阴性预测值分别为 43.2%、98.3%。

2.3 肺泡灌洗液与痰液在不同涂片半定量时 GeneXpert MTB/RIF 的 Ct 值比较 对 GeneXpert

表 3 肺泡灌洗液与痰液在不同涂片半定量时 GeneXpert MTB/RIF 的 Ct 值比较($\bar{x} \pm s$)

涂片类型	n	(-)	(+)	(++)	(+++)	(++++)
肺泡灌洗液	44	25.88±2.96	22.7±1.95	20.30±2.13	16.10±1.60	10.10±1.61
痰液	71	26.41±3.57	24.8±1.24	21.84±2.33	17.00±0.90	11.30±1.73
P		0.005	0.001	0.057	0.165	0.237

3 讨 论

2011—2015 年我国共登记结核病患者发病 4 562 613 例, 死亡 12 598 例, 其中仅培养阳性患者发病 11 692 例, 患者的地区分布最高为广东省^[3], 这可能与广东人口密度较高, 空气潮湿闷热, 使结核杆菌很容易传播有关。目前, 虽然我国结核病患者数量正在逐年减少, 但每年仍然有高达 80 多万的发病数, 表明我国在结核病的防治道路上依然任重道远。已有研究表明, 早期诊断和合理的治疗对结核病的控制极为重要^[1]。许多结核病疑似患者并没有典型的影像学征象, 部分初发患者也缺乏典型的临床症状, 因此, 实验室检查就显得尤为重要^[6]。GeneXpert MTB/RIF 技术是一项以结核分枝杆菌核酸扩增为基础的全自动分子诊断方法, 因其实验环境要求简单, 操作容易, 实验人员技术要求门槛低, 所以在世界范围内容易推广^[7-8]。2017 年颁布的新版肺结核诊断标准已经将结核分枝杆菌核酸检测加为确诊条件之一^[2]。

随着 2017 年颁布的新版肺结核诊断标准里加入支气管镜检查及气管、支气管结核镜下表现^[2], 呼吸科及重症监护室等结核重点监护科室对支气管镜诊疗日益重视, 肺泡灌洗液送检比例大大提高。本研究回顾性分析结果显示, 本院 2017 年 6 月至 2019 年 6 月肺泡灌洗液送检科室以呼吸与危重症医学科及重症监护室最多。其他科室送检率较低, 虽然与患者类型分布有极大联系, 但其他科室对支气管肺泡灌洗液的诊断价值认识仍存在不足。将符合临床诊断的标本(249 例)的 GeneXpert MTB/RIF 技术检测结果与对应涂片抗酸染色法结果进行比较, 提示痰液和肺泡灌洗液标本阴性预测值较高(95.5%~98.3%), 与其他研究较为接近^[9], 而阳性预测值较低(36.6%~43.2%), 这可能与综合性医院相对于传染病专科医

MTB/RIF 阳性标本(肺泡灌洗液 44 例, 痰液 71 例)按照涂片半定量标准分类后比较, 当涂片半定量结果为(-)、(+)时, 肺泡灌洗液在进行 GeneXpert MTB/RIF 检测时 Ct 值明显不同于痰液, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 当涂片半定量结果为(++)、(+++)、(++++)时, 肺泡灌洗液在进行 GeneXpert MTB/RIF 检测时 Ct 值与痰液差异无统计学意义($P > 0.05$), 见表 3。

院, 初次就诊患者较多有关。其余标本类型由于数据有限, 其预测价值有限, 其中 4 例 GeneXpert MTB/RIF 技术检测阴性, 而涂片抗酸染色法阳性患者为非结核类分枝杆菌污染导致。表明 GeneXpert MTB/RIF 技术能够大大提高结核病的阴性预测值, 准确区分结核分枝杆菌与其他抗酸阳性的非结核分枝杆菌, 这在其他研究中有类似结论^[10-11]。因此, 对于结核患者的诊断, 仍需结合其他影像学或病原生物学结果综合分析。

结核杆菌的半定量对结核患者的追踪治疗及观察具有重要价值^[1], 但 GeneXpert MTB/RIF 技术采用的半定量检测与传统的涂片抗酸染色半定量方法是否有一定相关性尚不清楚。本研究对临床确诊的结核患者回顾性调查发现, 在 GeneXpert MTB/RIF 技术检测阳性的标本中, 当涂片抗酸染色半定量结果为(-)、(+)时, GeneXpert MTB/RIF 检测各组 Ct 值差异均有统计学意义($P < 0.05$), 说明 GeneXpert MTB/RIF 技术检测 Ct 值对结核杆菌半定量有一定的提示作用。肺泡灌洗液应用于 GeneXpert MTB/RIF 技术检测是否优于痰液? 本研究调查表明, 当涂片抗酸染色半定量结果为(-)、(+)时, 肺泡灌洗液在进行 GeneXpert MTB/RIF 检测时 Ct 值与痰液差异有统计学意义($P < 0.05$); 当涂片半定量结果为(++)、(+++)、(++++)时, 肺泡灌洗液在进行 GeneXpert MTB/RIF 检测时 Ct 值与痰液差异无统计学意义($P > 0.05$)。表明在结核患者细菌载量较高的情况下, 采集肺泡灌洗液或痰液进行 GeneXpert MTB/RIF 技术检测对病原学检测结果判定影响不大, 当细菌载量涂片抗酸染色半定量为(-)、(+)时, 留取肺泡灌洗液有助于提高检出率, 这与邱文娜等^[12]的研究有一定区别, 在他们的研究中总体认为 GeneXpert MTB/RIF 技术检测肺泡灌洗液灵敏度更

高,这可能是因为他们没有对细菌载量半定量区分的原因。在细菌水平较低时,进行针对性的肺段冲洗能够增加结核杆菌的获取概率,而痰液中经常混合口咽部其他杂菌,这些杂菌对结核杆菌的核酸扩增也会产生一定程度的抑制。当结核杆菌细菌载量较高时,结核杆菌的核酸水平和纯度已经足够高,在不同类型标本中扩增差异不大。因此,支气管镜诊疗的推广应用是结核病防治能力提高的一项重要措施^[13]。

4 结 论

结核病的实验室诊断技术已取得极大的进展,新的检测技术大大提高了结核病诊断的灵敏度和特异性,但不管是哪种检测技术,均存在一定的局限性^[14]。在研究新技术 GeneXpert MTB/RIF 应用深度的同时也要扩展其广度,本研究提示,肺泡灌洗液相对于痰液在结核杆菌低载量时应用 GeneXpert MTB/RIF 技术具有更好的提示作用。未来联合多种检测技术,对疑似结核病患者同时进行诊断,综合分析检测结果,将成为结核病防治的重要方向。

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部疾病预防控制局. 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,2008:7-10.

[2] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 肺结核诊断标准:WS288-2017[S]. 北京:人民卫生出版社,2017.

[3] 王黎霞,成诗明,陈明亭,等. 2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告[J]. 中国防痨杂志,2012,34(8):485-508.

[4] 钟莉,许铠. GeneXpert MTB/RIF 快速检测在肺结核患者诊断中的应用价值[J]. 国际检验医学杂志,2019,40(23):2887-2889.

[5] 韦红,张阳,刘韦卓,等. Gene-Xpert MTB/RiF 与熔解曲线法检测结核分枝杆菌利福平耐药分析[J]. 河南预防医学杂志,2019,30(12):895-899.

[6] 谭耀驹,邓云峰,逢宇,等. 结核病原学分子诊断专家共识[J]. 中华结核和呼吸杂志,2018,41(9):688-695.

[7] PEREIRA G R, BARBOSA M S, DIAS N J D, et al. Impact of introduction of Xpert MTB/RIF test on tuberculosis (TB) diagnosis in a city with high TB incidence in Brazil[J]. PLoS One,2018,13(3):e0193988.

[8] KHAPARDE S, RAIZADA N, NAIR S A, et al. Scaling-up the Xpert MTB/RIF assay for the detection of tuberculosis and rifampicin resistance in india:an economic analysis[J]. PLoS One,2017,12(9):e0184270.

[9] 蒋莎莉,朱德茂,罗海军,等. 肺结核患者肺泡灌洗液中结核杆菌检测的方法学评价[J]. 广东医学,2017,38(1):102-104.

[10] LESSELLS R J, COOKE G S, MCGRATH N, et al. Impact of point-of-care xpert MTB/RIF on tuberculosis treatment initiation. a cluster-randomized trial[J]. Am J Respir Crit Care Med,2017,196(7):901-910.

[11] 张汇征,付宗强,曾婉,等. 结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌 3 种鉴定方法的比较[J]. 医学动物防治,2020,36(1):100-102.

[12] 邱文娜,胥萍,赵静,等. Xpert 技术对痰液和纤支镜洗液标本中结核分枝杆菌检测价值[J]. 中国热带医学,2019,19(12):1165-1168.

[13] 李娜娜,刘梅,刘权贤,等. 两种方法在检测肺泡灌洗液中结核分枝杆菌的结果分析[J]. 智慧健康,2018,4(8):5-6.

[14] 蒋莎莉,梁伟军,朱德茂,等. 不同检测方法对肺结核患者肺泡灌洗液中结核杆菌的诊断价值[J]. 中南大学学报(医学版),2017,42(6):647-651.

(收稿日期:2020-02-07 修回日期:2020-06-10)

(上接第 2636 页)

tool for human oocyte quality[J]. Hum Reprod,2011,26(3):535-544.

[9] TOMARI H, HONJO K, KUNITAKE K, et al. Meiotic spindle size is a strong indicator of human oocyte quality[J]. Reprod Med Biol,2018,17(3):268-274.

[10] MAHFOUDH A M, MOON J H, HENDERSON S, et al. Relationship between pre-ICSI meiotic spindle angle, ovarian reserve, gonadotropin stimulation, and pregnancy outcomes[J]. J Assist Reprod Genet,2017,34(5):609-615.

[11] 赵雪含,吴庚香,杨菁. 高孕激素状态下促排卵方案中胚胎质量影响因素分析[J]. 生殖医学杂志,2019,28(6):583-587.

[12] PENG Q, CAO X, WANG J, et al. Progesterin-primed ovarian stimulation vs mild stimulation in women with advanced age above 40: a retrospective cohort study[J]. Reprod Biol Endocrinol,2019,17(Suppl 4):370-376.

[13] HUANG P, TANG M, QIN A. Progesterin-primed ovarian stimulation is a feasible method for poor ovarian responders undergoing in IVF/ICSI compared to a GnRH antagonist protocol: a retrospective study[J]. J Gynecol Obstet Hum Reprod,2019,48(2):99-102.

[14] 沈秀,李颂军,周睿琼,等. 高孕激素下促排卵方案用于 FSH 升高 DOR 患者的临床效果观察[J]. 生殖医学杂志,2017,26(4):351-356.

[15] LU F, QI X J, HONG Z. Clomiphene citrate or medroxyprogesterone acetate with human menopausal gonadotropin in poor responders during In vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection treatments combined with embryo cryopreservation[J]. Rep Develop Med,2019,3(3):159-164.

[16] 陈艳,周爱莲. 卵巢低反应者减量调节并控制 Gn 启动剂量的体外受精结局[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志,2018,37(1):28-31.

(收稿日期:2020-03-10 修回日期:2020-06-30)