

· 短篇论著 ·

县域单中心痰/支气管肺泡灌洗液涂片抗酸杆菌阳性病例的分析及诊断流程优化

钱海江¹ 姚青¹ 周晓¹ 王晓瑾¹ 葛宇佳¹ 章益民²

¹海宁市人民医院感染科, 嘉兴 314400; ²浙江大学医学院附属第一医院传染病诊治国家重点实验室、国家感染性疾病临床医学研究中心、国家传染病医学中心、感染性疾病诊治协同创新中心, 杭州 310005

通信作者: 章益民, Email: 1307020@zju.edu.cn

【关键词】 分枝杆菌属; 涂片抗酸杆菌阳性; Gene Xpert MTB/RIF; γ -干扰素释放试验

基金项目: 浙江省医药卫生科技项目创新引导专项(2023XY184)

DOI: 10.3760/cma.j.cn331340-20230315-00042

Analysis of acidobacillus positive cases based on sputum /bronchoalveolar lavage fluid smear in county single center and optimization of diagnosis process

Qian Haijiang¹, Yao Qing¹, Zhou Xiao¹, Wang Xiaojin¹, Ge Yujia¹, Zhang Yimin²

¹Department of Infection, Haining People's Hospital, Jiaxing 314400, China; ²State Key Laboratory for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, National Clinical Medical Research Center for Infectious Diseases, National Medical Center for Infectious Diseases, Collaborative Innovation Center for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310005, China

Corresponding author: Zhang Yimin, Email: 1307020@zju.edu.cn

【Key words】 *Mycobacterium*; Smears positive for acid-fast bacilli; Gene Xpert MTB/RIF; Interferon- γ release test

Fund program: Zhejiang Province Medical and Health Science and Technology Project Innovation Guidance Project (2023XY184)

DOI: 10.3760/cma.j.cn331340-20230315-00042

分枝杆菌可分为结核分枝杆菌复合群(MTBC)、非结核分枝杆菌(NTM)和麻风分枝杆菌 3 类。结核病(TB)是由结核分枝杆菌(MTB)感染引起的一种慢性传染性疾病,其中肺结核是 TB 最主要的类型,尤其是痰菌阳性者,通过把含有结核菌的微粒排到空气中进行飞沫传播^[1]。早期发现和诊治肺结核是 TB 疫情控制中的关键环节。我国 TB 的随访、管理与宣教等工作均依赖于基层医疗卫生机构,因此,基层医疗卫生机构在肺结核诊治与防控中发挥着至关重要的作用^[2]。人感染致病性的分枝杆菌主要是 MTB,但是近年来,NTM 感染呈快速增多趋势,使得痰/支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 抗酸杆菌涂片阳性已不能成为确诊肺结核的标准,而分枝杆菌培养常需要数周到数月的时间,且基层开展培养的医院较少,有研究指出:涂片抗酸染色镜检阳

性,应报告为“抗酸杆菌阳性”,而非“MTBC 阳性”,应考虑 MTB、NTM 或其他可能性,建议进一步鉴别^[3]。在临床工作中,抗酸杆菌涂片阳性可能是 MTB,也可能是 NTM 或者诺卡菌等疾病,因此抗酸杆菌涂片阳性患者还需要进一步检查明确。本文收集 2020—2021 年海宁市人民医院痰/BALF 涂片抗酸杆菌阳性患者的病历资料,分析 MTB、NTM 和其他疾病的比例,总结诊断思路,为临床诊治提供依据和参考。

对象与方法

一、研究对象

收集海宁市人民医院 2020 年 1 月 1 日至 2021 年 12 月 31 日痰/BALF 涂片抗酸杆菌阳性住院及门诊患者 210 例进行观察性研究。本研究经浙江省海宁市人民医院医学伦理委

员会审批通过(2022 伦审 87 号)。

二、主要研究方法

收集患者基本信息以及痰/BALF 抗酸杆菌涂片、MTB/利福平耐药实时荧光定量核酸扩增检测(Xpert MTB/RIF,简称 Xpert)技术和 IFN- γ 释放试验(TB-IGRA)的结果,对痰/BALF 涂片抗酸杆菌阳性,但 Xpert 呈阴性病例根据患者意愿进行分枝杆菌菌种鉴定、宏基因组二代测序(mNGS)检测。

三、诊断流程及检测方法

WHO 已于 2010 年底批准 Xpert 技术应用,由于检测的是 MTB DNA,因此,目前 Xpert 阳性提示存在 MTB^[4]。故对痰/BALF 涂片抗酸杆菌阳性,且 Xpert 呈阳性病例,临床诊断为 MTB 感染;对痰/BALF 涂片抗酸杆菌阳性,但 Xpert 阴性病例,予进一步查 mNGS 或分枝杆菌菌种鉴定明确诊断。对涂片抗酸阳性、Xpert 阳性,但 IGRA 阴性的病例按结核治疗,进行随访 1 年评估疗效,判定诊断。对涂片抗酸阳性、Xpert 阴性,但 IGRA 呈阳性病例,建议菌种鉴定或 mNGS 检查,治疗后经 1 年随访判定诊断。

痰/BALF 抗酸杆菌涂片采用荧光染色镜,结果判断(标准来源于《中国结核病防治规划痰涂片镜检质量保证手册》):连续 50 个视野未见抗酸杆菌,报告“抗酸杆菌阴性”;1~9 条/50 个视野,报告抗酸杆菌菌数;10~49 条/50 个视野,报告“抗酸杆菌阳性 1+”;1~9 条/每个视野,报告“抗酸杆菌阳性 2+”;10~99 条/每个视野,报告“抗酸杆菌阳性 3+”; ≥ 100 条/每个视野,报告“抗酸杆菌阳性 4+”。TB-IGRA 检测仪器及配套试剂均为厦门万泰凯瑞,检测严格按照操作规范进行。Xpert 方法:Xpert 检测仪器及配套试剂均为美国 Cepheid 公司,检测严格按照操作规范进行,将 1 mL 痰样本放置于有螺旋盖的前处理管中,再放入 2 倍于痰样本的前处理液,前处理管在涡旋振荡器上震荡 30 s,室温静置 15 min 使样本充分液化,打开 cartridge 反应盒,取出 2 mL 处理样品由加样孔缓慢加入反应盒内,仪器自动检测,反应结束后观察结果。分枝杆菌菌种鉴定采用焦磷酸测序法(杭州迪安公司)。mNGS 由杭州华大基因公司检测。

结 果

一、入组患者的基本情况

本研究纳入痰/BALF 涂片抗酸杆菌阳性病例共 210 例(2020 年 93 例,2021 年 117 例)。其中,男性 134 例、女性 76 例,年龄(53.3 \pm 19.8)岁,范围 18~93 岁;合并糖尿病 29 例,占 13.8%(29/210);合并其他基础肺病(如支气管扩张、慢性阻塞性肺疾病、肺肿瘤等)47 例,占 22.4%(47/210);吸烟者 76 例,占 36.2%(76/210);饮酒者 42 例,占 20.0%(42/210)。

痰/BALF 涂片抗酸杆菌阳性病例 210 例,以抗酸杆菌涂片 1+、2+ 为主,分别占 60.0%(126/210) 和 25.7%(54/210)。2020 年 93 例痰/BALF 涂片抗酸杆菌阳性病例中 Xpert 阳性 81 例,占 87.1%(81/93);2021 年 117 例痰/BALF 涂片抗酸杆菌阳性病例中 Xpert 阳性 90 例,占 76.9%(90/117)。两年 Xpert 阳性 171 例,占 81.4%(171/210);阴性 39 例,占 18.6%(39/210)。

二、Xpert 阴性患者的 mNGS 和菌种鉴定结果

对痰/BALF 涂片抗酸杆菌阳性且 Xpert 阴性病例进行菌种鉴定或 mNGS 检查明确病原菌。2020—2021 年抗酸杆菌阳性且 Xpert 阴性病例共 39 例,进一步检测 mNGS 或分枝杆菌菌种鉴定 26 例,明确 NTM 病例共 22 例。2020 年进一步进行菌种鉴定或 mNGS 检查比例为 50.0%(6/12),2021 年上升至 74.1%(20/27),通过这两种方法患者的菌种确诊率从 2020 年的 41.7%(5/12)上升至 2021 年的 59.3%(16/27),其中检测 mNGS 11 例,明确致病菌 8 例;检测分枝杆菌菌种鉴定 15 例,占 38.5%(15/39),明确致病菌 13 例。2020 年,12 例 Xpert 阴性患者中同一 BALF 样本检测 mNGS 3 例,其中 2 例为胞内分枝杆菌,1 例未明确病原菌;同一痰或 BALF 样检测分枝杆菌菌种鉴定 3 例,2 例胞内分枝杆菌,1 例鸟分枝杆菌,另有 1 例痰培养明确诺卡菌病。2021 年,27 例 Xpert 阴性患者中同一 BALF 样本检测 mNGS 8 例,其中胞内分枝杆菌 4 例,堪萨斯分枝杆菌 2 例,另 2 例未明确病原菌;同一痰或 BALF 样本检测分枝杆菌菌种鉴定 12 例,胞内分枝杆菌 6 例,堪萨斯分枝杆菌 2 例,蟾蜍分枝杆菌 1 例,鸟分枝杆菌 1 例,未明确病原菌 2 例,另有 1 例痰培养明确脓肿分枝杆菌。

三、Xpert 阴性患者的 TB-IGRA 结果

210 例痰/BALF 涂片抗酸杆菌阳性病例中,有 160 例同时检测了 TB-IGRA(余 50 例因患者意愿、经济原因未检测),其中 Xpert 阳性患者 126 例,阴性患者 34 例。126 例检测 TB-IGRA 的 Xpert 阳性病例中,IGRA 呈阳性 116 例,占 92.1%(116/126),经门诊随访半年以上均确诊为 TB;IGRA 呈阴性 10 例,该 10 例患者经半年以上随访,除 1 例回原籍地治疗丢失外其余 9 例均确诊为 TB。34 例检测 TB-IGRA 的 Xpert 阴性病例中,IGRA 呈阳性 6 例,占 17.6%(6/34),该 6 例患者经 mNGS 或菌种鉴定检测及半年以上随访 3 例为 NTM,2 例为 TB,1 例回原籍地治疗丢失;IGRA 呈阴性 28 例,占 82.4%(28/34)。

讨 论

之前,痰/BALF 涂片抗酸杆菌阳性与否是诊断 MTB 感染的常用、简便和有效的方法,但是近年来随着 NTM 发病率的

增高,仅检测抗酸杆菌无法确诊 TB,并且 NTM 感染者通常需检测至菌种水平才能正确选择治疗方案,而常规分枝杆菌培养常需数周至数月时间,多数基层综合性医院未开展该类检查,这给基层医院的诊治 MTB 感染带来挑战。Xpert 方法是集痰样本处理、DNA 提取、核酸扩增、MTB 特异核酸检测、利福平耐药基因 *rpoB* 突变检测于一体的结核病和利福平耐药结核快速诊断方法,在 TB 高发地区此技术已经作为疑似肺结核的一线检测方法^[4]。谢平等^[5]研究发现,以肺结核确诊为金标准,Xpert 法和涂片法诊断肺结核的灵敏度分别为 71.04% 和 39.39%, 特异性分别为 97.77% 和 98.56%, Xpert 法的灵敏度显著高于涂片法。鉴于 Xpert 方法可靠性,本文对抗酸杆菌涂片阳性且 Xpert 阳性的患者给予抗结核治疗,对涂片阳性但 Xpert 阴性的患者根据患者意愿及沟通结果,经 mNGS 或分枝杆菌菌种鉴定明确分枝杆菌类型后再给予相应的抗分枝杆菌治疗。

一、2020—2021 年涂片抗酸杆菌阳性、Xpert 阴性样本方法时效性相当,各有优势

2020—2021 年海口市人民医院共收治痰/BALF 涂片抗酸杆菌阳性,但 Xpert 阴性患者 39 例,进一步检测 mNGS 或分枝杆菌菌种鉴定 26 例,其余患者因经济、自身意愿或样本存放过期等原因未检测。该 26 例患者中 NTM 感染 21 例,另通过痰细菌培养检出脓肿分枝杆菌 1 例、诺卡菌 1 例。mNGS 及菌种鉴定阴性病例考虑与样本中含菌量低、分枝杆菌细胞壁厚而难裂解、样本存放时间长等因素有关,临床工作中建议可多次送检新鲜样本提高阳性率,特别是 BALF 样本阳性率更高。对痰/BALF 涂片抗酸杆菌阳性但 Xpert 阴性患者进行 mNGS 或菌种鉴定相对于传统的分枝杆菌培养法具有敏感性高、时效性强的特点,能更快地检测出病原菌,更迅速制定有效的治疗方案。分枝杆菌菌种鉴定具有低成本、高检出率的优势,值得临床推广,而 mNGS 同样具有检测面广、不易漏诊诺卡菌等放线菌感染等优势,两种检测方法时效性相当,在临床工作中需医生权衡决定。本文有 2 例患者通过痰样本细菌培养检出诺卡菌、脓肿分枝杆菌,因此在工作中不能忽视痰样本培养的送检以提高检出率。

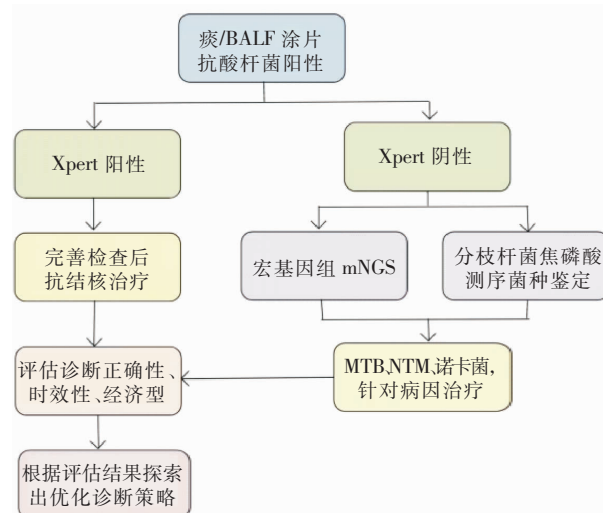
二、Xpert 及 IGRA 联合诊断更精确

IGRA 结果不受卡介苗接种和 NTM 感染的影响,在发达国家 IGRA 正逐渐取代结核菌素皮肤试验成为潜伏性结核感染首选的检测方法^[6]。本研究涂片抗酸杆菌且 Xpert 阳性的病例中 IGRA 呈阳性者占 92.1% (116/126),经门诊随访半年以上均确诊为 TB;IGRA 呈阴性 10 例,该 10 例患者除 1 例回原籍地治疗丢失外其余 9 例均确诊为 TB,证实 Xpert 阳性对 TB 诊断的准确率高。Xpert 阴性病例中 IGRA 呈阳性 6

例,3 例为 NTM,2 例为 TB,1 例回原籍地治疗丢失。涂片抗酸杆菌阳性,但 Xpert 阴性患者中通过分枝杆菌菌种鉴定、mNGS 或培养检测明确 NTM 的病例共 22 例,其中同时检测了 TB-IGRA 的共 20 例,18 例为 TB-IGRA 阴性。上述结果可以看到,Xpert 阳性结果对 TB 诊断价值比 IGRA 结果更可靠,故以 Xpert 结果阳性诊断结核,Xpert 阴性患者进一步行菌种鉴定或 mNGS 检查明确病原菌的诊断流程更合理。Xpert 阴性结果可能会受到样本含菌量少、样本存放时间长等因素影响,如 Xpert 阴性但 IGRA 阳性的患者建议多次送检样本行 Xpert 检测,以提高准确性。在 Xpert 阳性诊断 TB 的病例中 IGRA 亦呈阳性的比例及 NTM 病例中 IGRA 呈阴性的比例均在 90% 左右,通过 Xpert 及 IGRA 结果联合诊断 TB 或 NTM 更为精准合理。年龄增长、HIV 感染、抗结核治疗等可导致 IGRA 假阴性,另外,患者的营养状态(体质量指数)、等位基因及种族等也可能导致 IGRA 假阴性,合并糖尿病及恶性肿瘤、淋巴细胞下降、结核的病程、痰菌阴性、合并肺外结核、肺部病灶范围较广、吸烟、检测方法及环境、影响免疫功能药物的使用等均可能造成 IGRA 假阴性^[7],目前争议颇多,有待更多的研究进一步证实。

三、抗酸杆菌阳性患者诊断流程

根据 2020、2021 年作者对痰/BALF 涂片抗酸杆菌阳性患者的诊治实践经验,总结并制定相应的诊断流程。对痰/BALF 涂片抗酸杆菌阳性病例,进一步进行 Xpert 检测,Xpert 阳性的病例予抗结核治疗;Xpert 阴性的病例按照患者意愿进一步检测 mNGS 或菌种鉴定明确分枝杆菌菌种。门诊随访评估该流程诊断正确性(详见图 1)。



注: BALF: 支气管肺泡灌洗液; Xpert: 结核分枝杆菌/利福平耐药实时荧光定量核酸扩增检测; mNGS: 宏基因组二代测序; MTB: 结核分枝杆菌; NTM: 非结核分枝杆菌

图 1 痰/BALF 涂片抗酸杆菌阳性患者诊断流程图

四、新诊断流程能快速明确病原体,减少盲目用药

以往本院对抗酸杆菌阳性患者通常给予抗结核治疗,门诊随访,发现治疗失败后建议患者上级医院行分枝杆菌培养、药敏检测后再予调整抗分枝杆菌方案。但是随着 NTM 的增多,临床工作中抗结核治疗失败的病例越来越多,抗结核药物不良反应大、疗程长,对患者的身体健康、经济带来很大的负面影响,该流程已不适合目前的医疗形势及精准医疗的要求。本研究调整的流程对抗酸杆菌阳性患者进行 Xpert 检测,对 Xpert 阴性患者进行 mNGS 或菌种鉴定检测后再给予针对性抗病原体治疗,能快速明确病原体、减少盲目用药,减轻对患者的身体、心理、经济的负担,增加了抗分枝杆菌治疗的成功率。

综上所述,经上述流程对涂片抗酸杆菌阳性患者进行诊断,痰/BALF 涂片抗酸杆菌阳性且 Xpert 阳性患者基于 Xpert 可靠性可诊断为 TB。而痰/BALF 涂片抗酸杆菌阳性但 Xpert 阴性的患者,大部分为 NTM(患者均有肺部空洞、感染和支气管扩张等病灶^[6],取得样本环境均经过消毒处理,排除环境污染),亦有可能为诺卡菌病等疾病,对该类患者通常应用 mNGS 或分枝杆菌菌种鉴定来明确病原菌,两种方法时效性、敏感性均较高,菌种鉴定经济成本更低,而 mNGS 对病原菌的检测面更广。建议对痰/BALF 涂片抗酸杆菌阳性,但 Xpert 阴性的患者进一步行 mNGS 或分枝杆菌菌种鉴定明确细菌菌种,根据流程优化患者的诊断流程,提高临床诊断准确性,减少临床误诊率。根据病原制定正确的治疗方案,可以改善患者的治疗结局,减轻患者经济、健康的压力。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 钱海江:文章撰写、统计分析;姚青、王晓瑾、葛宇佳:

病例资料收集、统计分析;周晓:实验室样本测试、整理;章益民:研究设计、论文指导、文章修改

参 考 文 献

- [1] 中华医学会,中华医学会杂志社,中华医学会全科医学分会,等. 肺结核基层诊疗指南(2018年)[J]. 中华全科医师杂志, 2019, 18(8): 709-717. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-7368.2019.08.002.
- [2] 彭丽,陈虹,曹彬. 加强防控,规范基层肺结核诊疗与管理[J]. 中华全科医师杂志, 2019, 18(8):707-708. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-7368.2019.08.001.
- [3] 中国医疗保健国际交流促进会临床微生物与感染分会,中华医学会检验医学分会临床微生物学组,中华医学会微生物学和免疫学分会临床微生物学组. 综合医院结核分枝杆菌感染实验室检查共识[J]. 中华检验医学杂志, 2022, 45(4): 343-353. DOI: 10.3760/cma.j.cn114452-20211118-00722.
- [4] Creswell J, Codlin AJ, Andre E, et al. Results from early programmatic implementation of Xpert MTB/RIF testing in nine countries [J]. BMC Infect Dis, 2014, 4: 2. DOI: 10.1186/1471-2334-14-2.
- [5] 谢平,陈彩萍,白茹,等. GeneXpert MTB/RIF 在快速诊断肺结核和检测利福平耐药中的临床应用价值[J]. 国际呼吸杂志, 2020, 40(24): 1856-1861. DOI:10.3760/cma.j.cn131368-20200326-00217.
- [6] Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance[J]. N Engl J Med, 2010,363(11):1005-1015. DOI: 10.1056/NEJMoa0907847.
- [7] 孙丹雄. γ -干扰素释放试验假阴性影响因素研究进展[J]. 国际呼吸杂志, 2020, 40(22):1756-1760. DOI: 10.3760/cma.j.cn131368-20191217-00032.
- [8] 刘佳,肖玉梅,曾令武,等. 苏州地区非结核分枝杆菌病原学流行特征分析[J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2022, 49(4): 273-276. DOI: 10.3760/cma.j.cn331340-20210930-00192.

(收稿日期:2023-03-15)