

五种结核检测方法在支气管肺泡灌洗液中对结核病的独立和联合诊断价值

彭利君 刘立宾 王静 方婷婷 蔡龙

[摘要] 目的 在大样本量支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中分析五种结核检测方法独立和不同联合方式检测结核病的诊断效能,旨在找到一种合适的方案提高临床疑似的肺结核的阳性检出率。**方法** 回顾性分析2016年7月至2021年9月期间在浙江大学医学院附属杭州市胸科医院住院的7 718名患者病历资料,所有患者的BALF样本均接受了五项测试:涂片、培养、结核/非结核分枝杆菌核酸检测(TB-DNA)、结核分枝杆菌RNA恒温扩增实时检测技术(SAT-TB)和Xpert MTB/RIF检测(Xpert),以临床诊断为金标准,比较五项独立测试和不同组合方案对肺结核的诊断价值。**结果** 共有7 718名患者被纳入分析。涂片、培养、TB-DNA、SAT-TB和Xpert检测肺结核的曲线下面积(AUC)分别为0.58、0.70、0.77、0.73、0.79, Xpert最优。对五种方法进行排列组合并比较诊断效能发现:两项联合中TB-DNA+Xpert联合AUC最佳,三项联合中TB-DNA+Xpert+培养联合AUC最佳,四项联合中TB-DNA+SAT-TB+Xpert+培养联合AUC最佳。对以上最佳组合的AUC进行两两比较发现,两项联合的AUC低于三项和四项(Z 分别=9.63、9.90, P 均 <0.05),三项联合的AUC低于四项和五项(Z 分别=4.14、3.65, P 均 <0.05),五项联合的AUC低于四项($Z=6.97$, $P<0.05$),两项联合与五项的AUC之间比较,差异无统计学意义($Z=1.62$, $P>0.05$)。**结论** 在BALF样本中诊断结核时, Xpert明显优于涂片、培养、TB-DNA、SAT-TB;临床为提高结核阳性检出率进行项目联合时,推荐使用TB-DNA+Xpert联合或TB-DNA+SAT-TB+Xpert+培养联合的方案检测结核。

[关键词] 结核; 支气管肺泡灌洗液; 诊断; 分子检测

The independent or combined diagnostic values of five tuberculosis detection methods in bronchoalveolar lavage fluid for tuberculosis PENG Lijun, LIU Libin, WANG Jing, et al. Clinical Laboratory Center, Affiliated Hangzhou Chest Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310003, China.

[Abstract] **Objective** To analyze the diagnostic values of five tuberculosis detection methods with different combinations in large samples of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) in detecting tuberculosis, thus to find an appropriate protocol to improve the positive detection rate of clinically suspected pulmonary tuberculosis. **Methods** The medical records of inpatients in Hangzhou Chest Hospital Affiliated to Zhejiang University School of Medicine from July 2016 to September 2021 were retrospectively analyzed. All patients used the same BALF sample and underwent five tests (smear, culture, TB-DNA, SAT-TB and Xpert). Using clinical diagnosis as the gold standard, the sensitivity, specificity, PPV, NPV and AUC of five tests independently and with different combination regimens were compared. **Results** A total of 7718 patients were included for analysis. The area under the curve (AUC) of smear, culture, TB-DNA, SAT-TB and Xpert to detect pulmonary tuberculosis were 0.58, 0.70, 0.77, 0.73 and 0.79, respectively, and the diagnostic value of Xpert was the best. The five methods were arranged, combined and compared in terms of diagnostic performance, and it showed that the TB-DNA+Xpert combination was the best in the two combinations, the TB-DNA+Xpert+culture combination was the best in the three combinations, and among the four combinations, TB-DNA+SAT-TB+Xpert+culture combination was the

best. Comparing the AUC of the above best combinations, the AUC of the two combinations was lower than three or four combination ($Z=9.63, 9.90, P<0.05$), and the AUC of the three combination was lower than four or five combination ($Z=4.14, 3.65, P$

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2022.009.004

基金项目: 杭州市医药卫生科技重点项目(ZD20210018)

作者单位: 310003 浙江杭州, 浙江大学医学院附属杭州市胸科医院临床医学检验实验中心

通讯作者: 蔡龙, Email: 359286603@qq.com

<0.05), the AUC of the five combination was lower than that of the four combination ($Z=6.97, P<0.05$), and there was no statistically significant difference in AUC between the two combination and the five combination ($Z=1.62, P>0.05$).

Conclusion When diagnosing tuberculosis in BALF samples, Xpert is significantly better than smear, culture, TB-DNA, and SAT-TB. In order to improve the positive detection rate of tuberculosis, it is recommended to use TB-DNA + Xpert combination or TB-DNA + SAT-TB + Xpert + culture combined protocol to detect tuberculosis.

[Key words] tuberculosis; bronchoalveolar lavage fluid; diagnosis; molecular detection

在全球范围内,结核病是导致死亡的主要原因之一,预计2020年结核病是位于COVID-19之后的第二大单一感染源致死原因^[1]。获取优质的检测样本进行灵敏、快速地诊断对结核病的发现和后续治疗至关重要。支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)有助于痰涂片阴性和少痰的结核病诊断。研究表明, BALF改善了肺结核的检测^[2-5]。随着博奥结核/非结核分枝杆菌核酸检测(TB-DNA)、结核分枝杆菌RNA恒温扩增实时检测技术(simultaneous amplification and testing for Mycobacterium tuberculosis, SAT-TB)、Xpert MTB/RIF检测(Xpert)、涂片、培养等结核病检测技术的广泛开展,这些方法在BALF样本中的诊断价值尚未得到全面评估。涂片、TB-DNA、SAT-TB和Xpert可当日获得检验结果,而培养一般需要2~8周。在获得BALF样本后,临床医生为提高检测阳性率,可能对一份样本进行一种或多种检测,本次研究以临床诊断为金标准,通过大样本量数据分析,评估涂片、培养、TB-DNA、SAT-TB、Xpert检测在BALF样本中的独立和不同联合方式检测结核的诊断效能,旨在找到一种合适的方案,准确、快速地诊断临床疑似的肺结核。

1 资料与方法

1.1 一般资料 回顾性分析2016年7月至2021年9月期间在浙江大学医学院附属杭州市胸科医院住院治疗的疑似结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis, MTB)感染患者的临床资料,所有患者使用同一份BALF样本且均接受了五项测试(涂片、培养、TB-DNA、SAT-TB和Xpert),排除了出院时诊断不明确的患者。共收集BALF标本7 718份,参照《肺结核诊断和治疗指南》^[6],确诊的肺结核患者4 692例,确诊为其他疾病的非肺结核患者3 026例。其中男性4 665例、女性3 053例,年龄1~86岁,平均 (46.90 ± 17.80) 岁。本次研究经浙江大学医学院附属杭州市胸科医院人体研究伦理委员会批准。由于本次研究为回顾性研究,伦理委员

会免除了患者的知情同意。

1.2 方法

1.2.1 标本采集和处理 所有患者均由临床医生采集新鲜BALF标本10~20 ml,均分后分别进行涂片、培养、TB-DNA、SAT-TB和Xpert检测。

1.2.2 涂片 涂片检查遵守《中国结核病防治规划痰涂片镜检质量保证手册》^[7]中的操作程序对BALF标本进行抗酸染色涂片检查。采用抗酸染色试剂(由珠海贝索生物技术有限公司生产)对每份样本行三张抗酸染色涂片镜检。其中一张涂片镜检阳性则为涂片阳性。

1.2.3 培养 按照《结核病实验室标准化操作与网络建设》^[8]中的操作程序 and 标准使用Lowenstein-Jensen固体培养基(由杭州创新生物技术有限公司生产)和960液体培养基(由美国BD公司生产)对BALF样本进行分枝杆菌培养。固体或液体培养阳性并鉴定为MTB为MTB培养阳性,若鉴定为非结核分枝杆菌(non-tuberculous Mycobacterium, NTM)则视为MTB培养阴性,固体或液体培养均阴性视为MTB培养阴性。

1.2.4 TB-DNA检测 提取BALF样本的DNA,使用SLAN-96S实时荧光定量检测仪(由上海宏石医疗科技有限公司生产)进行聚合酶链式反应,依据结核/非结核分枝杆菌核酸检测试剂盒聚合酶链式反应荧光探针法(由博奥生物有限公司生产)的说明书,在3 h内扩增和检测结核特异性IS6110基因和分枝杆菌属共有基因热休克蛋白65(heat shock protein 65, HSP65)。若样本扩增曲线呈S型,且 $Ct < 40$,判定为阳性,否则为阴性。HSP65阳性IS6110基因阳性为MTB阳性, HSP65阳性IS6110基因阴性为NTM阳性。HSP65阴性为MTB和NTM均阴性。

1.2.5 SAT-TB检测 根据制造商提供的结核分枝杆菌核酸检测试剂盒(由上海仁度生物技术有限公司生产)说明书操作。用实时荧光定量检测仪(SLAN-96S)扩增16S rRNA基因,根据 Ct 值判断结

果: $Ct \leq 35$ 为阳性; $35 < Ct < 40$ 需重新检测进行确认; Ct 无数字或 > 40 为阴性。

1.2.6 Xpert MTB/RIF 在 1~2 ml 未离心 BALF 中加入 2 倍体积的处理液混合, 涡旋振荡 15~30 s, 在室温放置 15 min, 取 2 ml 处理过的样本溶液缓慢添加到 Xpert 实时荧光 PCR 检测仪反应盒(由美国 Cepheid 公司生产)中, 并放置在检测模块中以启动自动检测。系统将在 2 h 内自动读取 MTB 检测结果与利福平耐药结果。实验结果 MTB 未检出为阴性, MTB 检出极低、检出低、检出中等和检出高为阳性。

1.3 评价指标 以临床诊断为金标准, 计算各项检测方法的灵敏度、特异度、阳性预测值(positive predictive value, PPV)、阴性预测值(negative predictive value, NPV)、曲线下面积(area under the curve, AUC)。

1.4 统计学方法 利用 Python 语言和 Pandas 包进行数据处理。灵敏度、特异性和 PPV、NPV 比较采用 χ^2 检验, AUC 的比较采用 DeLong 检验。设 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BALF 样本检测结核阳性结果的维恩图见封二图 1

由封二图 1 可见, 涂片、培养、TB-DNA、SAT-TB、Xpert 检测在 BALF 样本中均为阳性的有 680 例。仅有四种方法同时为阳性时, TB-DNA、Xpert、涂片、培养最多为 781 例。仅有三种方法同时为阳性时, TB-DNA、SAT-TB、Xpert 最多为 335 例。仅有两种方法同时为阳性时, TB-DNA 和 Xpert 最多为 292 例。仅有一种方法检出阳性, 最多的是 Xpert, 可单独检出 339 例。

2.2 各检测方法对结核病的诊断价值见表 1

表 1 涂片、培养、TB-DNA、SAT-TB、Xpert 检测肺结核的诊断效能

检验项	灵敏度 /%	特异度 /%	PPV/%	NPV/%	AUC (95%CI)
Xpert	59.14	98.45	98.33	60.85	0.79(0.78~0.80)
TB-DNA	56.20	98.28	98.07	59.14	0.77(0.76~0.78)
SAT-TB	47.19	99.17	98.88	54.77	0.73(0.72~0.74)
培养	40.71	100	100	52.10	0.70(0.69~0.72)
涂片	17.48	97.49	91.52	43.24	0.58(0.56~0.59)

由表 1 可见, 五种检测中, Xpert 的灵敏度及 NPV 最优, 培养的特异度及 PPV 最优。对各检测方法的 AUC 进行两两比较, TB-DNA 的 AUC 与 SAT-

TB、Xpert、涂片、培养的 AUC 比较, 差异均有统计学意义(Z 分别=12.80、4.57、48.23、18.84, P 均 < 0.05)。SAT-TB 的 AUC 与 Xpert、涂片、培养的 AUC 比较, 差异均有统计学意义(Z 分别=15.63、39.96、8.62, P 均 < 0.05)。Xpert 的 AUC 与涂片、培养的 AUC 比较, 差异均有统计学意义(Z 分别=51.64、23.03, P 均 < 0.05)。涂片的 AUC 与培养的 AUC 比较, 差异有统计学意义($Z=34.91, P < 0.05$)。

2.3 各检测方法对结核病的联合诊断价值 对五种检测方法进行两项、三项、四项、五项排列组合, 评估联合后在 BALF 中对肺结核的诊断效能, 见表 2~4。

表 2 两项联合检测结核的诊断效能

检验项	灵敏度 /%	特异度 /%	PPV/%	NPV/%	AUC (95%CI)
AC	66.94	97.32	97.49	65.50	0.82(0.81~0.83)
BC	64.45	97.82	97.86	63.96	0.81(0.80~0.82)
CD	63.04	98.45	98.44	63.21	0.81(0.80~0.82)
AD	60.89	98.28	98.21	61.84	0.80(0.79~0.81)
AB	60.25	97.88	97.79	61.36	0.79(0.78~0.80)
CE	59.83	95.94	95.80	60.63	0.78(0.77~0.79)
BD	53.60	99.17	99.02	57.96	0.76(0.75~0.77)
AE	56.86	95.80	95.46	58.89	0.76(0.75~0.77)
BE	48.66	96.66	95.76	54.84	0.73(0.72~0.74)
ED	42.65	97.49	96.34	52.30	0.70(0.69~0.71)

注: A: TB-DNA; B: SAT-TB; C: Xpert; D: 培养; E: 涂片。

表 3 三项联合检测结核的诊断效能

检验项	灵敏度 /%	特异度 /%	PPV/%	NPV/%	AUC (95%CI)
ACD	68.88	97.32	97.56	66.86	0.83(0.82~0.84)*
ABC	68.41	96.96	97.21	66.44	0.83(0.82~0.84)*
BCD	66.47	97.82	97.93	65.30	0.82(0.81~0.83)
ACE	67.37	94.84	95.30	65.21	0.81(0.80~0.82)
ABD	63.34	97.88	97.89	63.26	0.81(0.80~0.82)
BCE	64.92	95.31	95.55	63.66	0.80(0.79~0.81)
CDE	63.53	95.94	96.04	62.92	0.80(0.79~0.81)
ADE	61.38	95.80	95.78	61.54	0.79(0.78~0.80)
ABE	60.74	95.41	95.35	61.05	0.78(0.77~0.79)
BED	54.33	96.66	96.19	57.72	0.76(0.74~0.77)

注: *: ACD 三项联合的 AUC 为 0.831; #: ABC 三项联合的 AUC 为 0.827。A: TB-DNA; B: SAT-TB; C: Xpert; D: 培养; E: 涂片。

表4 四项和五项联合检测结核的诊断效能

检验项	灵敏度 /%	特异度 /%	PPV/%	NPV/%	AUC (95%CI)
ABCD	70.03	96.96	97.28	67.60	0.84(0.83~0.84)
ABCDE	70.44	94.48	95.19	67.33	0.83(0.82~0.83)
ACDE	69.29	94.84	95.42	66.57	0.82(0.81~0.83)
ABCE	68.84	94.48	95.08	66.17	0.82(0.81~0.83)
BCDE	66.90	95.31	95.67	65.00	0.81(0.80~0.82)
ABDE	63.81	95.41	95.56	62.97	0.80(0.79~0.81)

注:A:TB-DNA; B:SAT-TB; C:Xpert; D:培养; E:涂片。

由表2~4可见,两项、三项、四项、五项最高的AUC分别为TB-DNA+Xpert联合、TB-DNA+Xpert+培养联合、TB-DNA+SAT-TB+Xpert+培养联合、五项联合。对以上最优的组合方式进行诊断效能比较发现:两项联合的灵敏度低于三项、四项、五项联合(χ^2 分别=4.05、10.38、13.33, P 均 <0.05),三项、四项、五项联合之间的灵敏度进行两两比较,差异无统计学意义(χ^2 分别=1.47、2.69、0.18, P 均 >0.05);两项联合特异度与三项和四项相比,差异无统计学意义(χ^2 分别=0.00、0.72, P 均 >0.05),三项联合的特异度与四项相比,差异无统计学意义($\chi^2=0.72$, $P>0.05$),五项联合的特异度低于两项、三项、四项(χ^2 分别=31.10、31.10、22.69, P 均 <0.05);两项联合的PPV与三项和四项相比,差异无统计学意义(χ^2 分别=0.03、0.28, P 均 >0.05),三项联合的PPV与四项相比,差异无统计学意义($\chi^2=0.52$, $P>0.05$),五项联合的PPV低于两项、三项、四项(χ^2 分别=24.69、26.93、20.49, P 均 <0.05);两项联合的NPV低于四项联合($\chi^2=4.38$, $P<0.05$),两项与三项、两项与五项、三项与四项、三项与五项、四项与五项之间的NPV之间,差异均无统计学意义(χ^2 分别=1.82、3.28、0.56、0.22、0.07; P 均 >0.05)。两项联合的AUC低于三项和四项(Z 分别=9.63、9.90, P 均 <0.05),三项联合的AUC低于四项和五项(Z 分别=4.14、3.65, P 均 <0.05),五项联合的AUC低于四项($Z=6.97$, $P<0.05$),两项联合与五项的AUC之间比较,差异无统计学意义($Z=1.62$, $P>0.05$)。

3 讨论

痰涂片镜检经济、易于操作,但其灵敏度较低,且不能区分MTB和NTM感染。分枝杆菌培养敏感度较高,一直作为结核病的金标准,但其检测周期长,不利于肺结核的快速诊断。TB-DNA可在数小

时内同时检测MTB或NTM感染,防止临床对肺NTM和肺结核的误诊。SAT-TB是以MTB特异的16S rRNA为靶标,可快速准确地检测存活的结核分枝杆菌。Xpert检测可以在2 h内同时检测出结核病和利福平耐药情况,优势是操作简单,结果可靠,为患者提供及时、有效的治疗指导,并协助限制耐多药结核病的传播,缺点是成本较高。

本次研究通过比较涂片、培养、TB-DNA、SAT-TB、Xpert在BALF样本中的检测效能发现,在单独诊断BALF样本结核时Xpert明显优于其他检测,三种分子诊断方法的诊断效果均高于传统的培养和涂片。但是考虑到各种方法的优缺点和临床有多种方法同时用于检测结核以增加阳性检出率的需求,对五种检测进行排列组合后比较诊断效能发现:两项联合中TB-DNA+Xpert联合最佳、三项联合中TB-DNA+Xpert+培养联合最佳、四项联合中TB-DNA+SAT-TB+Xpert+培养联合最佳。理论上联合检测的项目越多,灵敏度越高。但综合考虑经济、周转时间、指导后续治疗等因素,推荐两项中的TB-DNA+Xpert联合或四项联合中TB-DNA+SAT-TB+Xpert+培养联合来提高结核的阳性检出率。因为TB-DNA+Xpert联合与五项联合的AUC之间差异无统计学意义。TB-DNA+Xpert联合可以获得的收益包括:两种检测的灵敏度可达66.94%,略低于五项联合的70.44%;当日可出报告,速度快;可以同时鉴别MTB和NTM感染;可以获得利福平耐药情况。TB-DNA+SAT-TB+Xpert+培养联合的灵敏度(70.03%)与五项(70.44%)最佳联合相比,差异无统计学意义。TB-DNA+SAT-TB+Xpert+培养联合与TB-DNA+Xpert联合相比增加了培养和结核RNA检测,可以判定体内存在活菌且后续获得纯菌株可进行更多药敏检测,弥补Xpert只包括利福平药敏的局限性。

值得注意的是,即使使用五项联合依然有29.37%的漏诊,这可能是由于某些患者根本不排菌,通过实验室方法无法提供病原学依据,这个时候医生可以选择免疫学和病理学的检验来提高检测阳性率并参考患者的影像学表现和抗结核治疗反应来确诊。在BALF样本中诊断结核时,Xpert明显优于涂片、培养、TB-DNA、SAT-TB;临床为提高结核阳性检出率进行项目联合时,推荐使用TB-DNA+XPERT联合或TB-DNA+SAT-TB+Xpert+培养联合的方案检测结核。

参考文献

- 1 World Health Organization. Global tuberculosis report 2021 [EB/OL]. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/. 2021.
- 2 Xu P, Tang P, Song H, et al. The incremental value of bronchoalveolar lavage for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in a high-burden urban setting[J]. J Infect, 2019, 79(1): 24-29.
- 3 Silva TMD, Soares VM, Ramos MG, et al. Accuracy of a rapid molecular test for tuberculosis in sputum samples, bronchoalveolar lavage fluid, and tracheal aspirate obtained from patients with suspected pulmonary tuberculosis at a tertiary referral hospital[J]. J Bras Pneumol, 2019, 45(2): e20170451.
- 4 Gowda NC, Ray A, Soneja M, et al. Evaluation of Xpert® Mycobacterium tuberculosis / rifampin in sputum-smear negative and sputum-scarce patients with pulmonary tuberculosis using bronchoalveolar lavage fluid[J]. Lung India, 2018, 35(4): 295-300.
- 5 Peng J, Song J, Wang F, et al. Harnessing big data to optimize an algorithm for rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis in a real-world setting[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 650163.
- 6 中华医学会结核病学分会. 肺结核诊断和治疗指南[S]. 中国实用乡村医生杂志, 2013, 20(2): 7-10.
- 7 中国疾病预防控制中心. 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: 7.
- 8 赵雁林, 刘志敏. 结核病实验室标准化操作与网络建设[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 244-249.

(收稿日期 2022-03-25)

(本文编辑 葛芳君)

(上接第773页)

导管吸氧, 仍不缓解或加重者, 酌情予无创或有创通气。⑥心血管功能障碍: 维持有效循环血容量; 出现血压降低、心功能障碍者可予升压和强心药物维持适当血压, 改善心肌收缩力。⑦急性肾损伤: 减少或停用利尿剂, 避免使用肾毒性药物, 维持有效血容量。伴低血压者可选用特利加压素或去甲肾上腺素联合白蛋白输注。药物治疗后仍有严重少尿或无尿、液量超载、血清肌酐进行性升高、严重电解质及酸碱平衡紊乱者可予肾替代治疗。⑧控制继发感染: 疑有继发感染时应在留取相关病原学标本后开始抗菌药物治疗, 病原明确后根据培养和药敏结果及时调整, 感染控制后尽早停用。⑨体外

肝脏支持治疗: 主要用于常规治疗不能缓解的严重凝血异常、肝性脑病等, 或作为肝移植前的过渡治疗。可酌情选用血浆置换、血液灌流及血浆吸附等。⑩肝移植: 对内科治疗无效的严重肝衰竭患者, 应尽早组织多学科团队评估, 决定是否行肝移植。

9 防控措施

加强手卫生, 注意佩戴口罩和饮食卫生等。在临床工作中, 医务人员需采取标准预防措施, 一旦发现疑似病例, 应按要求及时上报。

摘自国卫办医函[2022]206号