



[DOI] 10.3969/j.issn.1001-9057.2022.02.017

http://www.lcnkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2022.02.017

· 论著摘要 ·

经皮肺穿刺组织行结核分枝杆菌/利福平耐药基因快速检测对涂阴肺结核的诊断价值

曹探赜 梅春林 商会会 杨澄清 周萌 杜荣辉 陈淑芳

[关键词] 肺结核; 结核分枝杆菌/利福平耐药基因快速检测; 经皮肺穿刺组织; 诊断

[中图分类号] R521 [文献标识码] A

据 WHO 估算,2017 年全球新发结核病患者约 1 000 万,结核病发病率为 133/10 万,其中中国的估算结核病新发患者数为 88.9 万,估算结核病发病率为 63/10 万^[1]。结核病的有效控制依赖于准确而快速的诊断及治疗。涂阴肺结核因其诊断较涂阳肺结核困难,尤其当肺部影像学特征不典型时,往往易造成漏诊、误治。临床工作中涂阴肺结核占活动性肺结核的比例超过 60%^[2],涂阴肺结核已成为我国结核病患病率下降的主要障碍。相关研究表明,涂阴肺结核患者如不予治疗,1~5 年内约有 20.8%~64.0% 会转化为排菌患者,成为新的传染源。因此,寻求涂阴肺结核快速而准确的诊断手段至关重要。痰涂片抗酸染色镜检法方法简单、快速,但敏感性较差,每毫升标本中需含 5 000~10 000 条细菌才能检出。培养法是检测的金标准,但耗时较长,且需要在 P2 实验室开展。结核分枝杆菌/利福平耐药基因快速检测 (GeneXpert MTB/RIP) 是目前 WHO 推荐的快速诊断结核病的方法,可在 2 小时内获得结果,且其敏感性 & 特异性均相对较高,而病灶位于外周的涂阴肺结核患者,如何取到适合的标本用于准确诊断是临床工作中的难题。CT 引导下经皮肺穿刺活检术 (CT-PTLB) 是一种相对安全、有效的诊断方法,所取标本既可行病原学、分子生物学等相关实验室检查,亦可行病理学检查,有助于临床诊断及治疗^[3]。因此,我们以病灶位于肺外周的涂阴肺结核患者为研究对象,检测其气管镜灌洗液及经皮肺穿刺活检组织的相关指标,以评价经皮肺穿刺活检组织行 GeneXpert MTB/RIP 对涂阴肺结核的检测效能。

对象与方法

1. 对象:2017 年 1 月~2018 年 12 月于我院就诊的涂阴肺结核患者 146 例,诊断标准参照《2018 年卫生部肺结核诊断标准》^[3],所有患者均行胸部 CT 检查提示肺周围性病变(病灶直径 > 10 mm),均行气管镜检查及经皮肺穿刺活检,其灌洗液及活检组织送检行抗酸染色涂片 (AFB)、液体培养、结核分枝杆菌 DNA 实时荧光定量检测 (TB-DNA) 及 GeneXpert MTB/RIP。其中男 94 例,女 52 例,年龄 18~85 岁,平均年龄 (44.0 ± 8.6) 岁。根据经皮肺穿刺活检前是否行抗结核治疗,将 146 例患者分为

未行抗结核治疗组 86 例和已行抗结核治疗组 60 例。本研究经我院伦理委员会审核批准,所有患者均签署知情同意书。

2. 方法

(1) 标本采集与处理:在美国 GE 公司 64 排螺旋 CT 引导下,使用美国巴德一次性活检针 (18G) 经皮肺穿刺取肺组织 2~3 条,长度约 1.5~2.0 cm,取 1 条组织捣碎、研磨,加入 0.9% 氯化钠 2 ml 送检 AFB、液体培养、TB-DNA 和 GeneXpert MTB/RIP; 奥林巴斯纤维支气管镜取灌洗液至少 10 ml 送检 AFB、液体培养、TB-DNA 和 GeneXpert MTB/RIP。

(2) AFB 操作方法:按照“结核病实验室标准化操作与网络建设”标准进行操作,结核菌荧光染色液套装购自珠海贝索生物技术有限公司。

(3) 液体培养操作方法:根据《分枝杆菌分离培养标准化程序及质量保证手册》、《结核分枝杆菌药物敏感性试验标准化程序及质量保证手册》严格进行操作,分枝杆菌酸性罗氏培养基购自珠海贝索生物技术有限公司。

(4) TB-DNA 操作方法:按照试剂盒使用说明书和聚合酶链反应 (PCR) 扩增仪操作说明进行。结核分枝杆菌核酸检测试剂盒购自中山大学达安基因股份有限公司,采用 ABI ViiA™ 7 荧光定量 PCR 扩增仪进行检测。反应体系 50 μl, FAM 通道检测。扩增反应:①93 ℃ 2 min 预变性;②93 ℃ 45 s→55 ℃ 1 min, 10 个循环;③93 ℃ 45 s→55 ℃ 45 s, 30 个循环,55 ℃ 采集荧光信号。根据标准曲线计算 TB-DNA 含量, < 500 拷贝为阴性。

(5) GeneXpert MTB/RIP 操作方法:按照 GeneXpert MTB/RIP 操作说明书进行。仪器与试剂均购自美国赛沛公司。移取 1.0 ml 样本加入无菌螺旋盖试管中,加入 2.0 ml 处理液,漩涡震荡器充分震荡混匀,室温静置 15 min。用试剂盒配套吸管移取处理后的样本 2.0 ml 加入反应盒,上机检测。仪器自动提取 DNA,进行 DNA 扩增和检测,软件自动输出检测结果。

3. 统计学处理:应用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。计数资料以例数和百分比表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1. 不同标本行不同检测方法的敏感度比较:经皮肺穿刺活检组织行 AFB、液体培养法、TB-DNA、GeneXpert MTB/RIP 的敏感度均高于支气管镜灌洗液 ($P < 0.001$)。见表 1。

基金项目:武汉市医学科研项目 (WX18D07)

作者单位:430030 武汉市肺科医院呼吸与危重症医学科

通讯作者:杜荣辉, E-mail: bluesearh@sohu.com

表 1 不同标本行不同检测方法的敏感度比较[例,(%)]

检查方法	例数	阳性		χ^2 值	P 值
		支气管 镜灌洗液	经皮肺 穿刺组织		
AFB	146	0(0)	24(16.4)	26.149	0.001
液体培养法	146	4(2.7)	28(19.2)	20.215	0.001
TB-DNA	146	10(6.8)	40(27.4)	21.719	0.001
GeneXpert MTB/RIP	146	18(12.3)	58(39.7)	28.460	0.001

2. 经皮肺穿刺组织行 GeneXpert MTB/RIP 与行其他检查的敏感度比较:经皮肺穿刺组织行 GeneXpert MTB/RIP 的敏感度高于 AFP($\chi^2 = 19.602, P < 0.001$)、液体培养法($\chi^2 = 14.834, P < 0.001$)、TB-DNA($\chi^2 = 4.976, P = 0.026$)。见表 2。

表 2 经皮肺穿刺组织行 GeneXpert MTB/RIP 与行其他检查的敏感度比较(例)

检查方法	例数	阳性	阴性
AFB	146	24	122
液体培养法	146	28	118
TB-DNA	146	40	106
GeneXpert MTB/RIP	146	58	88

3. 已行抗结核治疗组和未行抗结核治疗组患者经皮肺穿刺组织行 GeneXpert MTB/RIP 的敏感度比较:未行抗结核治疗组患者经皮肺穿刺组织行 GeneXpert MTB/RIP 的敏感度(55.8%, 48/86)高于已行抗结核治疗组(16.7%, 10/60), 差异有统计学意义($\chi^2 = 22.620, P < 0.001$)。

讨 论

根据《中国结核病防治规划实施工作指南》(2008 年版), 涂阴肺结核的诊断必须结合症状、胸部影像学、结核菌素检查、病理学等多种辅助检查结果综合判断。因此诊断的准确性受临床医生诊断水平的影响, 可能存在过度或延误诊断的情况。国内研究表明涂阴肺结核总过诊率达 20.78%^[4]。结核杆菌痰培养的敏感度较痰涂片高, 一直是肺结核诊断的金标准, 但其耗时长, 即使现在常用的 MGIT960 快速培养也需 2~6 周, 药敏试验耗时更长, 且对实验室的生物安全要求高。经纤支镜灌洗和经纤支镜活检技术解决了很大一部分经传统痰检难以诊断的疑难肺结核的诊断问题, 但对于影像学表现为肺外周病变的涂阴肺结核的诊断, 尤其是病变范围较小、表现为结节、肿块者, 送检纤支镜肺泡灌洗液查涂片、培养甚至 TB-DNA 等相关分子生物学检查的敏感度均有限。因此, 经皮肺穿刺活检技术越来越多的应用于表现为肺外周病变的肺部病变的鉴别诊断。

GeneXpert MTB/RIP 技术是一种新型、简便易行的分子检测方法, 可在 2 小时内同时检测 MTB 和 RIF 耐药, 由于其高度的敏感度和特异度已广泛应用于肺结核及肺外结核的诊断^[5], 目前临床研究中更多地将其应用于痰标本及纤支镜肺泡灌洗液的检测, 亦有部分文献报道在非呼吸道标本中诊断结核病的敏感度不一致, 但特异度均较高。GeneXpert MTB/RIP 检测脓液、穿刺物及组织的敏感度依次为 95%、86% 和 73%, 未发现与非结核分枝杆菌有交叉反应^[5,6]。

本研究结果显示, 经皮肺穿刺活检组织行 AFB、液体培养

法、TB-DNA 及 GeneXpert MTB/RIP 的敏感度均高于纤支镜灌洗液行对应检查方法的敏感度, 表明诊断分布于肺外周的涂阴肺结核, 经皮肺穿刺活检术优于纤支镜灌洗检查。有资料显示, CT 引导下经皮肺穿刺活检的阳性率 > 87%, 对肺部磨玻璃影和孤立性结节诊断的敏感度及特异度均高于 90%^[7]。

本研究亦显示经皮肺穿刺活检组织行 GeneXpert MTB/RIP 的敏感度高于经皮肺穿刺活检组织行 AFB、液体培养法、TB-DNA。表明 GeneXpert MTB/RIP 诊断涂阴肺结核具有较高的敏感度。本研究中, 经皮肺穿刺前未行抗结核治疗者敏感性明显高于已行抗结核治疗者, 考虑经诊断性抗结核治疗, 结核分枝杆菌部分被杀灭, 从而导致阳性率降低。本研究中经皮肺穿刺活检组织行 GeneXpert MTB/RIP 对肺结核诊断的敏感度仅为 39.7%, 低于部分文献所述^[8,9]。考虑可能因素如下: (1) 现有文献多以诊断为肺结核的患者为研究对象, 未限定为涂阴肺结核, 尤其为分布于肺外周、难以鉴别诊断的涂阴肺结核患者, 且文献中多用痰、肺泡灌洗液等呼吸道标本检测, 而本研究样本则为外周肺穿刺组织条; (2) CT 引导下经皮肺穿刺本身是微创操作, 每次所取标本量较少, 且经皮肺穿刺活检多用于分布于肺外周的孤立性病灶, 需与肿瘤等相关疾病鉴别, 临床医师多亲睐于留取更多组织标本行病理学检查; (3) 穿刺可因操作者经验程度、病灶取材的深度、部位不一, 而实际病灶的内部结构多样, 所取样本间便存在差异, 导致结核检测所用标本并非典型病变部位; (4) 肺穿刺组织经过 N-乙酰-L-半胱氨酸/碳酸氢钠等预处理, 造成结核分枝杆菌被杀灭过多, 从而影响结核 DNA 扩增效率, 造成假阴性。

综上所述, 对于诊断分布于肺外周的涂阴肺结核, 经皮肺穿刺活检术优于纤支镜检查, 且取材过程均为无菌操作, 检测标本直接进入机检流程, 避免了人为污染及人工操作水平差异性的影响; 相比于传统结核细菌学检测, GeneXpert MTB/RIP 显示出敏感度和诊断效率较高等优势, 值得临床推广使用。

参 考 文 献

[1] World Health Organization. Global Tuberculosis control 2018 [M]. Geneva: World Health Organization, 2018. 10.

[2] Dheda K, Pooran A, Pai M, et al. Interpretation of Mycobacterium tuberculosis antigen-specific IFN-gamma release assays (T-SPOT. TB) and factors that may modulate test results[J]. J Infect, 2007, 55(2): 169-173.

[3] 王黎霞, 成诗明, 周林, 等. 中华人民共和国卫生行业标准-肺结核诊断(WS 288-2017)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2018. 642-652.

[4] 马艳, 成诗明, 周林, 等. 初治涂阴肺结核胸片复读结果与诊断质量多因素分析[J]. 中国防痨杂志, 2011, 33(11): 707-712.

[5] Causse M, Ruiz P, Gutierrez-Aroca JB, et al. Comparison of two molecular methods for rapid diagnosis of extra pulmonary tuberculosis[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(8): 3065-3067.

[6] Hillemann D, Riisch-Gerdes S, Boehme C, et al. Rapid molecular detection of extra pulmonary tuberculosis by the automated Gene Xpert MTB/RIF system[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(4): 1202-1205.

[7] Yang W, Sun W, Li Q, et al. Diagnostic accuracy of CT-guided transthoracic needle biopsy for solitary pulmonary nodules[J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0131373.

[8] Jiang F, Huagn W, Wang Y, et al. Nucleic acid amplification testing and sequencing combined with acid-fast staining in needle biopsy lung tissues for the diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis[J]. PLoS One, 2016, 11(12): e0167342.

[9] Ou X, Xia H, Li Q, et al. A feasibility study of the Xpert MTB/RIF test at the peripheral level laboratory in China[J]. Int J Infect Dis, 2015, 31: 41.