

分子生物学和液体培养方法提高综合医院 结核病病原学诊断能力的价值

崔晓敬 魏栋 王春雷 曹彬

【摘要】 目的 分析应用分子生物学检测及液体培养法对提升综合医院结核病病原学诊断能力的价值。方法 提取中日友好医院病案系统中 2014 年 3 月至 2018 年 12 月全院各科室诊断为肺结核且上报传染病卡的 1438 例住院患者的诊断依据、病原学检测方法及结果、病原学送检时间及结果返回时间、入院时间及出院时间等信息。分析该院 2014—2016 年开展抗酸染色和分枝杆菌固体培养法(罗氏培养法)时与 2017—2018 年开展分子生物学检测[GeneXpert MTB/RIF 检测(简称“GeneXpert 检测”)]和液体培养法(BACTEC MGIT 960 分枝杆菌快速液体培养)后肺结核患者病原学诊断能力和确诊时间的变化情况。结果 2014 年该院肺结核患者病原学检测阳性率仅为 19.83%(24/121),2018 年升至 53.89%(256/475)。分子生物学检测及液体培养法开展前后,肺结核患者病原学检测阳性率分别为 22.68%(132/582)和 49.65%(425/856),差异有统计学意义($\chi^2=106.184, P=0.000$)。开展 GeneXpert 检测后(2017—2018 年),该院经检测确诊的肺结核患者中利福平耐药比例为 7.45%(28/376),而在开展前无耐药结核病诊断能力。开展分子生物学和液体培养法检测后(2017—2018 年),肺结核患者确诊时间为 7.00(3.00,12.00) d 明显短于开展之前(2014—2016 年)的 10.00(6.00,14.00) d,差异有统计学意义($Z=-7.815, P=0.000$)。结论 分子生物学和液体培养方法的应用可提高综合医院结核病病原学诊断能力,缩短患者确诊时间。

【关键词】 结核,肺; 早期诊断; 分子诊断技术; 医院,综合; 评价研究

Value of molecular diagnosis and liquid culture methods in improving the pathogenic diagnosis of pulmonary tuberculosis in general hospitals CUI Xiao-jing, WEI Dong, WANG Chun-lei, CAO Bin. *China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China*

Corresponding author: CAO Bin, Email: caobin_ben@163.com

【Abstract】 **Objective** To analyze the value of applying molecular diagnosis and liquid culture methods in improving the diagnostic capabilities of tuberculosis in general hospitals. **Methods** Data of diagnostic basis, etiological test and the results, submitting time of specimen and result returning time, admission time and discharge time of 1438 inpatients diagnosed with pulmonary tuberculosis and reported with infectious disease cards in China-Japan Friendship Hospital from March 2014 to December 2018 in the medical record system were collected. The changes in the pathogenic diagnosis ability and time of diagnosis of tuberculosis were analyzed, between 2014—2016 when the hospital only carried out acid-fast staining and solid culture method of mycobacteria (Roche culture method), and 2017—2018 when the hospital carried out molecular diagnosis technique (GeneXpert MTB/RIF test) and liquid culture method (BACTEC MGIT 960 mycobacterium rapid liquid culture). **Results** The positive rate of pathogenic detection of pulmonary tuberculosis increased from 19.83% (24/121) in 2014 to 53.89% (256/475) in 2018. The difference of positive rate of pathogenic detection of pulmonary tuberculosis before and after the use of molecular diagnosis technique and liquid culture method was significant (22.68% (132/582) vs. 49.65% (425/856), $\chi^2=106.184, P=0.000$). After carrying out the GeneXpert MTB/RIF test (2017—2018), the rate of rifampin-resistant was found to be 7.45% (28/376), while drug resistant tuberculosis couldn't be diagnosed before the use of the test. After carrying out molecular diagnosis technique and liquid culture method (2017—2018), the diagnosis



开放科学(资源服务)标识码(OSID)的开放科学计划以二维码为入口,提供丰富的线上扩展功能,包括作者对论文背景的语音介绍、该研究的附加说明、与读者的交互问答、拓展学术圈等。读者“扫一扫”此二维码即可获得上述增值服务。

doi:10.3969/j.issn.1000-6621.2021.02.008

基金项目:中国医学科学院中央级公益性科研院所基本科研业

务费(2019TX320004);中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2018-I2M-1-003);中日友好医院 2019 年院级科研基金(2018-2-QN-26)

作者单位:100029 北京,中日友好医院

通信作者:曹彬,Email:caobin_ben@163.com

time of tuberculosis was 7.00 (3.00, 12.00) d, which was significantly shorter than before (2014–2016)(10.00 (6.00, 14.00) d; $Z = -7.815, P = 0.000$). **Conclusion** The application of molecular diagnosis technique and liquid culture method in general hospital can improve the diagnosis of tuberculosis and shorten the diagnosis time.

【Key words】 Tuberculosis, pulmonary; Early diagnosis; Molecular diagnostic techniques; Hospitals, general; Evaluation studies

结核病的临床表现缺乏特异性,甚至 48.5% 的患者无明显临床症状^[1]。因此,病原学检测是发现和确诊肺结核的重要手段。但是,由于初诊查痰率低、检测手段落后、痰液质量差、痰涂片操作欠规范、分枝杆菌培养可及性低等原因^[2],我国肺结核的病原学诊断率较低。2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告显示,我国肺结核病原学诊断比例仅为 26.5%^[3],2020 年 WHO^[4] 报告中我国结核病患者病原学阳性比例为 47%,而全球肺结核患者病原学阳性比例为 57%。病原学阳性率低是造成肺结核诊断延迟的重要原因,而诊断延迟不仅可造成患者肺部结构不可逆性破坏,还会导致结核分枝杆菌(MTB)的持续传播^[5-6]。

目前,肺结核病原学诊断方法有痰抗酸染色、痰分枝杆菌培养、分子生物学检测、病理学检查等,标本类型除痰液外,还可送检支气管肺泡灌洗液(broncho-alveolar lavage fluid, BALF)、活体组织等。分子生物学检测是近年来被 WHO 认可并推荐的快速诊断方法,我国发布的《WS 288—2017 肺结核诊断》也将其作为确诊病例的诊断依据之一^[7]。GeneXpert MTB/RIF(简称“GeneXpert”)是一种全自动半巢式实时荧光核酸扩增技术,可于 2 h 内完成检测并出具报告^[8],2010 年被 WHO 推荐用于结核病的快速诊断和利福平耐药检测^[9]。分枝杆菌 MGIT 液体培养基培养法报告阳性结果时间(11 d)短于固体培养基培养法(22 d),且检出率相当^[10-12]。

我国 90% 以上因症就诊肺结核患者首诊于综合医院、基层医疗卫生机构或私人诊所^[3]。可见,综合医院是我国结核病患者发现的主战场,也是结核病防治工作的第一道防线。运用现有检测手段来切实提高我国各级综合医院肺结核病原学诊断能力需要开展系统性评估。为此,笔者总结对比了中日友好医院引入 GeneXpert 和分枝杆菌 MGIT 液体培养基前后,肺结核患者发现和病原学诊断能力的变化,为进一步强化综合医院在我国结核病防控体系建设中的作用提供数据资料。

资料和方法

1. 研究对象:从中日友好医院病案系统中提取 2014 年 3 月至 2018 年 12 月全院各科室诊断为肺结核且上报传染病卡的住院患者,筛选出院诊断前 2 位包括以下诊断的患者:原发性肺结核、亚急性血行播散性肺结核、急性血行播散性肺结核、空洞型肺结核、浸润性肺结核、继发性肺结核、支气管结核、结核性胸膜炎等,不限年龄、性别、科室及是否有确定病原学证据。排除 3 个月内重复住院者和陈旧性肺结核患者,共纳入 1438 例。对每例患者的诊断依据、病原学检测方法及其结果、病原学送检时间及结果返回时间、入院时间及出院时间等进行查询和登记。

2. 病原学诊断:2014 年 3 月至 2016 年 12 月本院仅开展抗酸染色和分枝杆菌固体培养;2017 年 1 月起开展了 GeneXpert 检测,同时用分枝杆菌液体培养取代了固体培养。送检标本包括痰液、BALF、胸腔积液、活体组织等。所纳入研究对象分别采用了不同的诊断方法或诊断方法组合。任何一种病原学检测方法阳性即定义为病原学阳性,其余基于临床症状、胸部影像学、诊断性治疗等结果确诊者为临床诊断病例^[4]。

抗酸染色为萋-尼染色法显微镜检查,按《分枝杆菌分离培养标准化操作程序及质量保证手册》进行;分枝杆菌固体培养基培养采用罗氏培养法(试剂盒购自瑞士罗氏公司);分枝杆菌液体培养采用 BACTEC MGIT 960 分枝杆菌快速液体培养技术(简称“MGIT 960 液体培养法”;试剂盒购自美国 BD 公司);GeneXpert 设备和试剂盒购自美国赛沛公司。

3. 确诊时间定义:综合医院患者确诊为肺结核后即应办理出院,转诊至结核病定点防治机构,因此,病原学阳性患者的确诊时间定义为病原学阳性结果回报时间与入院时间之差;临床诊断患者的确诊时间为出院时间与入院时间之差(即住院时间);出院后分枝杆菌培养回报阳性者以住院时间为确诊时间。

4. 统计学处理:采用 SPSS 19.0 软件分析数据。计量资料为偏态分布,采用“中位数(四分位数) [M(Q₁, Q₃)]”表示,组间差异的比较采用 Wilcoxon 秩和检验;计数资料采用“构成比或率(%)”表示,组间差异的比较采用 χ^2 检验;均以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 病原学阳性患者诊断情况:2014 年本院肺结核患者病原学检测阳性率仅为 19.83%,2018 年升至 53.89%,见表 1。分子生物学检测及液体培养法开展前(2014—2016 年)及开展后(2017—2018 年),肺结核患者病原学检测阳性率分别为 22.68% (132/582)和 49.65% (425/856),差异有统计学意义($\chi^2 = 106.184, P = 0.000$)。

2. 耐药结核病患者诊断情况:开展 GeneXpert 检测后(2017—2018 年),本院经检测确诊的肺结核患者中利福平耐药比例分别为 11.51% (16/139)和 5.06% (12/237),合计为 7.45% (28/376)。而在开展 GeneXpert 检测前,本院无耐药结核病诊断能力。

3. 肺结核确诊时间情况:开展分子生物学检测和液体培养法后(2017—2018 年),856 例肺结核患者确诊时间为 7.00 (3.00, 12.00) d;开展之前(2014—2016 年),582 例肺结核患者确诊时间为 10.00 (6.00, 14.00) d;开展后确诊时间明显缩短,差异有统计学意义($Z = -7.815, P = 0.000$)。

2017—2018 年,856 例肺结核患者中, MGIT 960 液体培养和 GeneXpert 检测同时阳性者 198 例 (23.13%),均阴性者 461 例 (53.85%),仅 1 项阳性者 197 例 (23.01%)。217 例肺结核患者 MGIT 960

液体培养阳性时间为患者入院后的 18.43 (13.62, 23.68) d。

讨 论

我国结核病防治体系有其独特的特点,由综合医院发现和转诊,结核病防治机构及定点医院治疗、管理、督导^[13]。然而,综合医院因不承担结核病的治疗和管理工作,其结核病发现能力亦出现“废用性萎缩”^[14]。在现有的结核病防治体系下,利用现实可及的技术手段,提高综合医院结核病发现能力是控制结核病疫情的关键。笔者对某大型三级甲等综合医院开展分子诊断技术及分枝杆菌液体培养技术前后的肺结核诊断能力进行比较,发现前述两种技术手段的开展,使得该院肺结核诊断例数逐步上升,且病原学诊断比例明显升高。目前,我国 60% 的区(县)具备分子生物学检测能力,但大部分并未开展该项检测工作^[2],且分子生物学检测的设备多投放在结核病防治机构而非综合医院。鼓励综合医院开展 MTB 核酸检测,将病原学诊断提前至综合医院,而非转诊至结核病防治机构后再重复送检,有助于患者的早期发现,且无论从传染病控制角度还是经济学指标考量均有益。

MTB 的传统药物敏感性试验(简称“药敏试验”)对生物安全性要求较高,多数综合医疗机构无条件开展,且此项检测耗时较长。GeneXpert 检测降低了生物安全需求,可快速获得利福平耐药信息,且与传统药敏试验结果一致性较高。本研究结果显示,开展 GeneXpert 检测后,本院具备了初步的快速耐药结核病诊断能力,但 GeneXpert 仅能检测利福平单耐药情况。已有研究表明,通过 DNA 测序鉴定与耐药相关的突变以预测 MTB 对一线抗结核

表 1 2014—2018 年某综合医院肺结核患者病原学诊断情况

年份	肺结核患者 (例)	病原学阳性 [例(阳性率, %)]	涂阳 [例(阳性率, %)]	培阳 [例(阳性率, %)]	GeneXpert 检测 [例(阳性率, %)]
2014 年 ^a	121	24(19.83)	22(18.18)	3(2.48)	—
2015 年	188	40(21.28)	40(21.28)	2(1.06)	—
2016 年	273	68(24.91)	61(22.34)	3(1.10)	—
2017 年	381	169(44.36)	92(24.15)	48(12.60)	139(36.48)
2018 年	475	256(53.89)	96(20.21)	169(35.58)	237(49.89)
合计	1438	557(38.73)	311(21.63)	225(15.65)	386(26.84)

注 ^a: 为 2014 年 3—12 月数据;“—”表示未开展此项检测

药品的敏感性和耐药性,与分离菌株表型药敏检测结果一致性较高,总体准确率为 89.5%^[15],对培养阳性物进行分子生物学耐药性检测有助于短时间内获得准确的耐药信息。GeneXpert 检测开展后,住院患者的肺结核诊断中位时间较前缩短 3 d,这大大降低了肺结核患者在综合医院内滞留的时间,减少了 MTB 院内传播的风险。分枝杆菌液体培养法较固体培养法分离阳性时间缩短,且分离阳性率不低于固体培养基。本研究中患者液体培养阳性中位时间为入院后第 18.43 d,与文献中分离阳性时间(11 d)有差距^[10],考虑与患者住院后多次留痰或支气管肺泡灌洗液等标本,以及含病原体的高质量标本送检时间较入院时间延迟有关。另外,分枝杆菌液体培养法与 GeneXpert 检测可起到互补作用,增加患者病原学阳性诊断比例,且有助于非结核分枝杆菌的诊断。

综上所述,分子生物学检测和液体培养法可提高综合医院肺结核诊断能力,缩短住院患者肺结核确诊时间,降低 MTB 院内传播风险,早期发现耐药结核病患者以及时转诊至有条件的结核病防治机构或定点专科医院。综合医院应积极开展 MTB 分子生物学检测及液体培养技术,这将整体提升我国结核病防控能力。本研究为探索综合医院结核病诊治能力提升措施提供了依据,为强化综合医院在我国新型结核病防控体系建设中的作用提供了数据参考。

参 考 文 献

- [1] Cheng J, Wang L, Zhang H, et al. Diagnostic value of symptom screening for pulmonary tuberculosis in China. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0127725. doi:10.1371/journal.pone.0127725.
- [2] 姜世闻. 采取综合措施提高肺结核患者病原学检出率. *中国防痨杂志*, 2019, 41(5): 477-479. doi:10.3969/j.issn.1000-6621.2019.05.001.
- [3] 全国第五次结核病流行病学抽样调查技术指导组, 全国第五次结核病流行病学抽样调查办公室. 2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告. *中国防痨杂志*, 2012, 34(8): 485-508.
- [4] World Health Organization. *Global tuberculosis report 2020*. Geneva: World Health Organization, 2020.
- [5] Cheng S, Chen W, Yang Y, et al. Effect of diagnostic and treatment delay on the risk of tuberculosis transmission in Shenzhen, China; an observational cohort study, 1993—2010. *PLoS One*, 2013, 8(6): e67516. doi:10.1371/journal.pone.0067516.
- [6] Martinez L, Xu L, Chen C, et al. Delays and pathways to final tuberculosis diagnosis in patients from a referral hospital in urban China. *Am J Trop Med Hyg*, 2017, 96(5):1060-1065. doi:10.4269/ajtmh.16-0358.
- [7] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. WS 288—2017 肺结核诊断. 2017-11-09.
- [8] Sharma SK, Kohli M, Yadav RN, et al. Evaluating the diagnostic accuracy of Xpert MTB/RIF assay in pulmonary tuberculosis. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0141011. doi:10.1371/journal.pone.0141011.
- [9] Policy Statement: Automated Real-Time Nucleic Acid Amplification Technology for Rapid and Simultaneous Detection of Tuberculosis and Rifampicin Resistance: Xpert MTB/RIF System. Geneva: World Health Organization, 2011.
- [10] 李静, 桂晓红, 孙丕, 等. MGIT 液体培养基检测分枝杆菌效果的评价. *中华检验医学杂志*, 2011, 34(2): 111-114. doi:10.3760/cma.j.issn.1009-9158.2011.02.004.
- [11] 朱丽娜, 雷永良, 俞凯狄, 等. 液体快速培养在结核分枝杆菌分离培养中的应用. *中国卫生检验杂志*, 2015, 25(13): 2112-2114.
- [12] 温贵华, 刘晋洪, 刘婷, 等. 结核分枝杆菌快速培养基临床应用研究. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(5):526-527. doi:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.05.007.
- [13] 李亮, 刘宇红, 马艳, 等. 我国结核病防治服务体系的演变和思考. *中国防痨杂志*, 2016, 38(11): 904-907. doi:10.3969/j.issn.1000-6621.2016.11.002.
- [14] 王辰, 刘春涛. 为结核病历史性地回归呼吸病学而奋斗. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2016, 15(1): 1. doi:10.7507/1671-6205.2016001.
- [15] CRyPTIC Consortium and the 100,000 Genomes Project, Allix-Béguec C, Arandjelovic I, et al. Prediction of susceptibility to first-line tuberculosis drugs by DNA sequencing. *N Engl J Med*, 2018, 379(15):1403-1415. doi:10.1056/NEJMoa1800474.

(收稿日期:2020-08-19)

(本文编辑:李敬文)