



临床检验通讯

2021 年第 3 期

2021 年 11 月 6 日

主办：检验科

主编：陈葳 副主编：王亚文

一、结核分枝杆菌感染的临床检测

分枝杆菌属（Mycobacterium）为放线菌门下的一个属，且为分枝杆菌科唯一的属。分枝杆菌为形状不规则的革兰阳性杆菌，不能游动，通常抗酸，无气生菌丝和孢子。该属细菌包括许多已知在哺乳类动物中造成严重疾病的病原菌，其中最重要的也是临床最常见的引起结核病的病原菌，结核分枝杆菌。

结核病（Tuberculosis, TB）是由结核分枝杆菌（Mycobacterium tuberculosis, MTB）复合群引起的慢性传染病。目前 TB 仍是全球 10 大死因之一，也超过 HIV 成为死亡人数最多的单一传染病，而中国是 TB、TB/HIV 双重感染、耐多药 TB 三种疫情兼具的 14 个高负担国家之一。要实现 WHO 终止 TB 的战略，隔离并治疗活动性结核（Active Tuberculosis, ATB）、预防性治疗高危人群中潜伏性结核（Latent Tuberculosis Infection, LTBI）是关键，实验室检测将发挥不可或缺的作用。

结核临床表现多样，除肺外还可累及全身各个系统，导致其诊断十分困难。目前，结核实验室检测技术包括三类：①病原微生物学：如涂片、培养；②分子生物学：如 Xpert MTB/RIF，线性探针，实时荧光定量 PCR，环介导等温扩增等；③免疫学：

如 γ 干扰素释放试验，结核菌素皮肤试验（TST），结核抗体。其中，病原微生物学、分子生物学作为病原体存在的直接证据应用于活动性结核诊断，免疫学作为间接证据应用于结核筛查及结核病辅助诊断。

（一）病原微生物学检测技术

1. 抗酸染色（Acid-fast stain）

抗酸生物，如分枝杆菌属中的生物体内包含大量被称为分枝菌酸的脂质，此物质具有抗酸性，染色时与石炭酸复红结合牢固，能抵抗酸性乙醇的脱色作用，因此当抗酸细菌被染色后会呈现亮红色。制作抗酸染色所使用的试剂包括：石炭酸复红（石炭酸和品红的混合物）、酸性乙醇和亚甲蓝。

临床应用：

①涂片抗酸染色镜检法可提供作为初步诊断结核分枝杆菌感染的参考。具有简单、快速、易行、省时、方便的优点。

局限性：

①抗酸染色阴性并不能排除结核分枝杆菌的感染。因为其结果收到采样质量、涂片质量及染色质量多重因素的影响；

②抗酸染色对分枝杆菌的检出率并不高，很少在单一标本中即发现病原菌，因此通常建议增加送检次

数来提高检出率；

③分枝杆菌包括结核分枝杆菌复合群、非结核分枝杆菌和麻风分枝杆菌三类，因此抗酸染色阳性，仅仅提示有分枝杆菌感染，并不一定是结核分枝杆菌感染，也可能是鸟分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌等，尤其是长期放化疗的肿瘤患者，由于其免疫力低下，容易发生非结核分枝杆菌感染。

标本类型：

痰液、腹透液、胸水、腹水、尿液及其它经无菌技术采集的标本。

结果报告：

以阴性、阳性方式报告。

(二) 分子生物学检测技术

1.Xpert®MTB/RIF 快速诊断结核分枝杆菌及利福平耐药

Xpert®MTB/RIF 是通过半巢式实时荧光定量 PCR 技术检测 rpoB 基因的利福平耐药核心区间 (Rifampin resistance determining region, RRDR) 81 bp 区域：5 个探针针对野生型设计；1 条探针检测样本处理质控-SPC(球芽孢杆菌)；每个探针分别用不同荧光染料标记，共有 6 种荧光染料同时检测，2h 即可快速完成诊断结核分枝杆菌及利福平耐药。

临床应用：

①Xpert MTB/RIF 的高敏感性、高特异性已在多个国家的多中心评价中获得验证。按 WHO 的分析，Xpert MTB/RIF 比抗酸镜检的敏感性提高了 40%。《新英格兰杂志》发表的数据显示：涂片阳性患者中，敏感性达到 98.2%，特异性达到 99.2%；在涂片阴性，培养阳性患者中，敏感性也达到 72.5%-90.2%。

②所有患者，包括儿童，当疑似肺结核并可咳痰，或有耐药结核的风险，或者合并 HIV 感染，或者病情严重时，应使用 Xpert MTB/RIF 做初始诊断 (WHO 推荐)；所有患者，包括儿童，怀疑有肺外结核时，应当采集相应的样本进行微生物学和组织学检查，优先推荐使用 Xpert MTB/RIF 做初始诊断 (WHO 推荐)；胸部影像学检查支持，结核分枝杆菌核酸检测阳性即可做为确诊病例。《新版肺结核诊断标准(WS288-2017)》。

③1-2 份痰液标本 Xpert MTB/RIF 阴性可作为疑似肺结核患者解除空气传播隔离决策的依据。

④结核分枝杆菌复合体检测阳性联合胸部影像学检查支持,即可做为确诊病例。

⑤利福平耐药性阴性可将利福平作为一线抗结核药物进行治疗并定期复查。

⑥利福平耐药性阳性：无论是否异烟肼耐药，都建议立即使用二线药物治疗。

局限性：

①需要与重点人群进行鉴别诊断：老年人群/糖尿病人群/肺部肿瘤及其它病原体感染患者，TB/HIV 双重感染患者。

标本类型：

类型	样本	采样标准	采样容器	运输条件
肺结核	痰液	1-4ml 痰液，取痰前清水漱口，避免唾液痰，食物残渣。	痰杯	35° 以下保存 3 天，2-8° 保存 10 天
	支气管吸出物	1-4ml 吸出痰	痰杯	35° 以下保存 3 天，2-8° 保存 10 天
	肺泡灌洗液	>3-5ml 肺泡灌洗液 (不少于 1ml)	带帽离心管/ 无菌容器	2-8 摄氏度保存 7 天

淋巴结核	淋巴结/淋巴抽吸液	穿刺取淋巴结组织	带帽离心管/无菌容器	2-8° 保存7天
结核性脑膜炎	脑脊液	1-5ml 脑脊液	带帽离心管/玻璃无菌管	2-8° 保存7天
骨结核	脓液	>1ml 骨关节脓液	带帽离心管/无菌管	2-8° 保存7天
多种结核	新鲜组织	穿刺新鲜组织/或不大于绿豆大小组织块	病理瓶或无菌管	2-8° 保存7天
儿童结核	洗胃液	5-20ml	带帽离心管	2-8° 保存7天
肾结核	尿液	>20ml 尿液	带帽离心管	2-8° 保存7天
肠结核/儿童结核	粪便	>0.6g 新鲜粪便	粪便采样盒	2-8° 保存7天
结核性胸膜炎/腹膜炎	胸膜组织、胸腹水	穿刺新鲜组织 / >20ml 胸腹水	50ml 离心管/避免凝固可加10ml EDTA 抗凝管 2管	2-8° 保存7天

结果报告:

以阴性、阳性方式报告。

2. 结核分枝杆菌核酸 PCR 检测

采用实时荧光 PCR 技术原理, 含有一对 PCR 引物和一个荧光双标记的探针, 该探针能与引物扩增区域中间的一段 DNA 模板发生特异性结合, 从而将 PCR 技术和荧光检测技术结合起来, 实现对 TB DNA 高自动化的检测。

临床应用:

①结核分枝杆菌因其培养周期长, 临床很难采用培养的方法进行快速检测, 而 PCR 技术可以做到这一点。通过对痰、血液、淋巴液、脑脊液、胸腹水等标本中的结核分枝杆菌进行 PCR 检测, 可快速诊断肺结核、结核杆菌血症、淋巴结核、结核性脑

膜炎、结核性胸腹膜炎。

②TB DNA 检测有助于感染早期的诊断, 尤其是菌量少或结核分枝杆菌发生 L 型变异时的诊断。因此, 一定比例的涂阴患者, 其 PCR 检测可为阳性。

③在抗结核治疗中, 采用 PCR 定期检测, 可用于抗结核药物治疗的疗效评价。

局限性:

①PCR 检测的是病原体 DNA, 因此不管是活菌或死菌, 均可经 PCR 检出, 因此在抗生素治疗一个疗程后, 建议两周后再做 PCR 检测, 避免临床假阳性的产生。

标本类型:

包括痰液、肺及支气管灌洗液、血液、淋巴液、脑脊液、胸腹水等。

结果报告:

以扩增产物浓度 (IU/ML) 报告。

(三) 结核免疫学检测技术

1. γ 干扰素释放试验 (Interferon-Gama Release Assays, IGRAs)

机体感染 MTB 后, T 细胞会长期保持抗原记忆。当血液、淋巴、组织液循环中再次接触 MTB 抗原时, 记忆细胞能活化为效应细胞并释放 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2 等细胞因子。IGRAs 采用差别区-1 (Region of Difference-1, RD-1) 编码的 CFP-10、ESAT-6 蛋白为刺激抗原, 通过检测外周血刺激后 IFN- γ 浓度或分泌 IFN- γ 的 T 淋巴细胞数量来辅助诊断结核感染。IGRAs 于 2001 年被美国 FDA 批准应用于 TB 筛查, 包括以基于 ELISA 的 QFT 和斑点法 ELISPOT 两类试剂。由于 IGRAs 与 BCG (卡介苗)、绝大多数非结核分枝杆菌无交叉反应, 目前已逐渐取代 TST 成为 TB 筛查最主要的免疫

学手段。

临床应用:

- ①活动性结核辅助诊断。
- ②高危人群潜伏性结核筛查。
- ③具有高灵敏特点,阴性常应用于排除活动性结核并与其他疾病鉴别。

局限性:

- ①阳性无法区分活动性结核与潜伏性结核。
- ②堪萨斯、苏尔加、海洋三种非结核分枝杆菌可导致假阳性。
- ③受细胞免疫低下、非特异性 IFN- γ 分泌、嗜异性抗体影响,可导致假阴性或不确定结果。

标本类型:

采用肝素锂抗凝(绿帽管),由于淋巴细胞活性会影响实验结果,样本采集后请常温、尽快送检验科。

结果报告:

以定量(IFN- γ 浓度或分泌 IFN- γ 的 T 淋巴细胞数量)和定性(阴性、阳性、不确定)两种方式同时报告。

2. 结核抗体检测

采用 ELISA、胶体金(渗滤法、层析法)、芯片技术等,优点在于操作简便、费用低、耗时短。该方法目前还不成熟,所用的抗原因菌种、纯化程度、抗原成分等方面的不同,导致其检测结果的差异性较大,敏感性低(20-40%)和特异性也不稳定。WHO 认为现有的血清学诊断试剂的敏感度和特异度都有待进一步提高,不推荐其在临床使用。

临床应用:

活动性结核辅助诊断,潜伏性结核筛查;

标本类型:

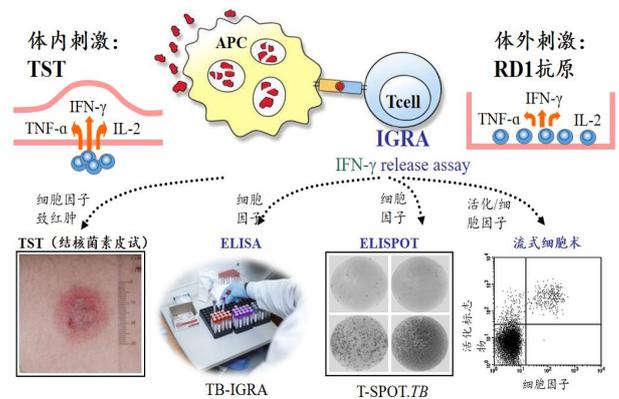
非抗凝血清样本(红帽管)。

结果报告:

以阴性、阳性方式报告;

3. 结核菌素皮肤试验(Tuberculin Skin Test, TST)

TST 作为 TB 诊断方法已广泛应用超过一个世纪,其操作简便易行,成本低廉,检测原理与 IGRAs 类似。使用的纯化蛋白质衍生物(purified protein derivative, PPD)是 MTB 粗提的抗原混合物进行体内刺激,48-72h 后观察注射部位皮肤变化。



临床应用:

- ①活动性结核辅助诊断;
- ②高危人群潜伏性结核筛查;

局限性:

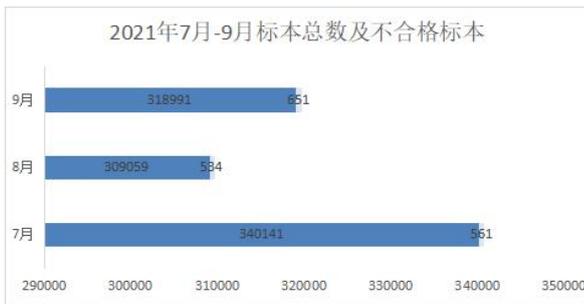
- ①阳性无法区分活动性结核与潜伏性结核;
- ②与牛结核分支杆菌减毒株卡介苗(bacillus Calmette-Guérin, BCG)和非结核分支杆菌

(Non-Mycobacterium tuberculosis, NTM) 的抗原成分存在交叉反应。我国是结核病高流行国家,BCG 接种较为普及,非结核分支杆菌感染率也较高,使 TST 出现了较高的假阳性率,诊断特异性较低;

- ③对于感染结核菌 2 周之内、近期免疫受抑制的病人,特别是合并 HIV 感染、重症疾病者、年幼儿童及营养不良、器官移植者灵敏度较低。

二、2021年第3季度不合格标本统计分析报告

1.检验科2021年第3季度总接收标本总数为968191份标本，不合格标本数为1746份标本，占总标本比率为0.18%，其中7月接收标本数为340141份标本，不合格标本数为561份标，占标本的比率为0.16%；8月接收标本数为309059份标本，不合格标本数为534份标，占标本的比率为0.17%；9月接收标本数为318991份标本，不合格标本数为651份标，占标本的比率为0.20%。



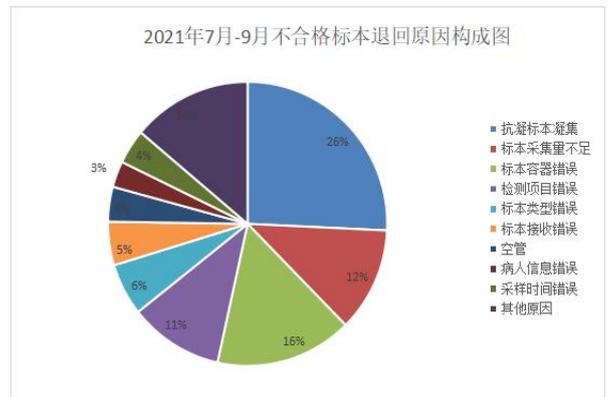
2021年7月-9月不合格标本率分别为0.16%，0.17%，0.20%。



2.不合格标本原因分析:

在所有不合格标本中，抗凝标本凝集446份占26%、标本量不足于检验需要量的标本209份占12%、容器错误的标本275份占16%、检验项目错误187份占11%、标本类型错误的标本107份占6%、标本接收错误84份占5%、空管64份占4%、病人信息错误58份占3%、采集时间错误70份占4%和其他不同原因的标本245份占14%

误187份占11%、标本类型错误的标本107份占6%、标本接收错误标本84分占5%、空管标本64份占4%、病人信息错误58份占3%、采集时间错误70份占4%和其他不同原因的标本245份占14%

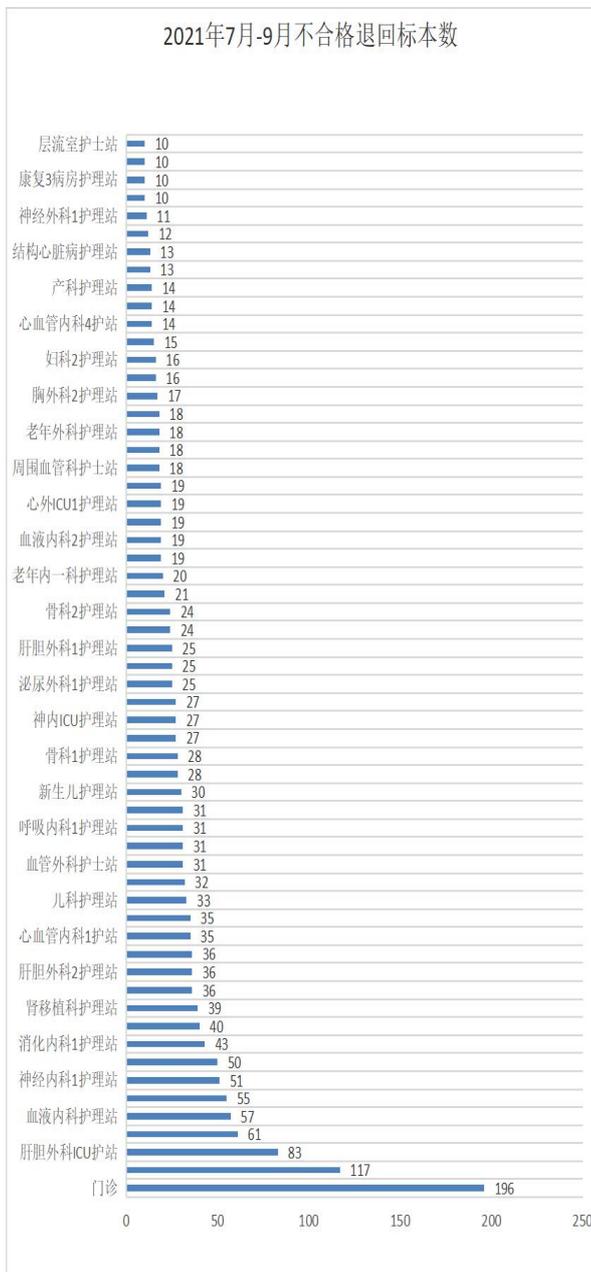


3.根据2021年7-9月份分析图，不合格标本与标本不合格率大致成正比，都有所下降。





4.退回不合格标本前五位科室为门诊，肝胆外科ICU，血液内科护理站，神经内科1护理站和消化内科1护理站。



三、2021年第3季度细菌耐药监测

(一) 细菌分布

2021年第3季度我院共送检26289份标本，分离出病原菌4161株，非重复性病原菌2463株，分离率9.36%，其中肠杆菌科细菌845株，占34.30%，非发酵菌402株，占16.32%，葡萄球菌362株，占14.69%，肠球菌312株，占12.66%，链球菌81株，占3.28%，念珠菌214株，占8.68%，其他247株，占10.02%，其中分离数量位于前十位的细菌为大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌肺炎亚种、屎肠球菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、鲍曼不动杆菌、白色假丝酵母、表皮葡萄球菌、粪肠球菌、产酸克雷伯菌。细菌分布与上季度相比，大肠埃希菌依然位于首位，产酸克雷伯菌进入前十，其余细菌分布变化不大，具体分布见下表。

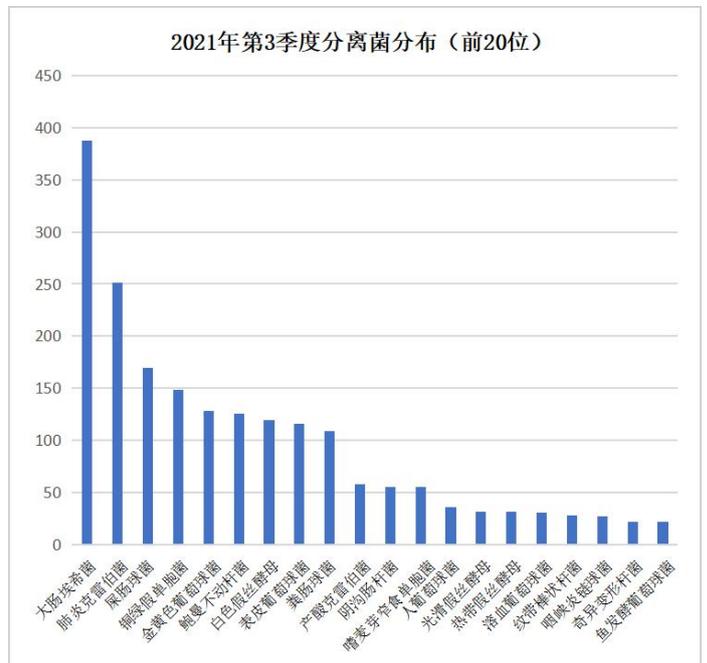


图1 2021年第3季度分离菌分布（前20）

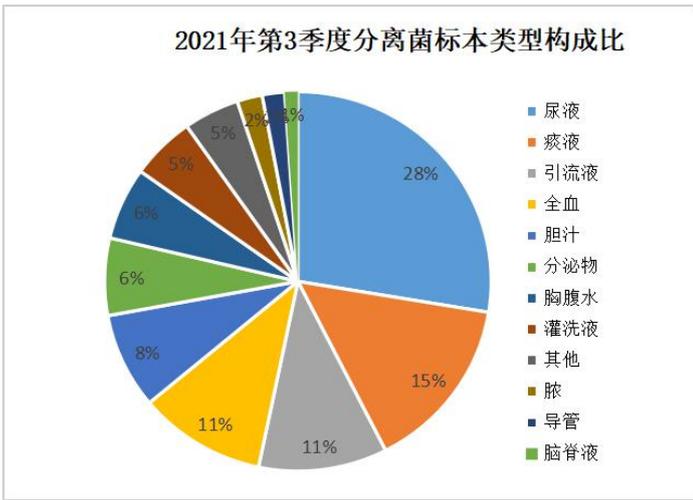


图2 2021年第三季度分离菌标本类型构成比

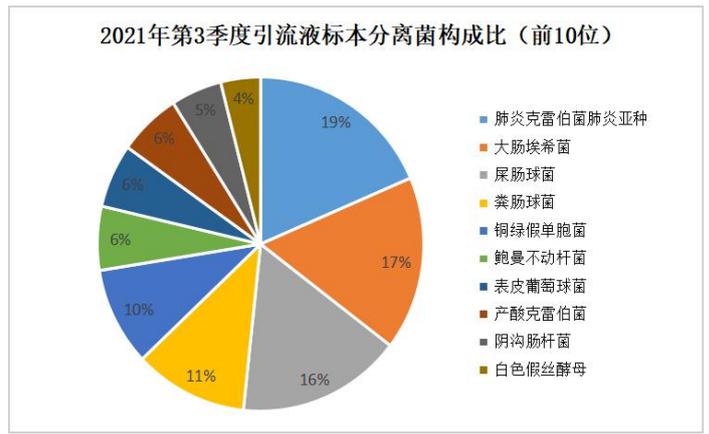


图5 2021年第三季度引流液标本分离菌构成比

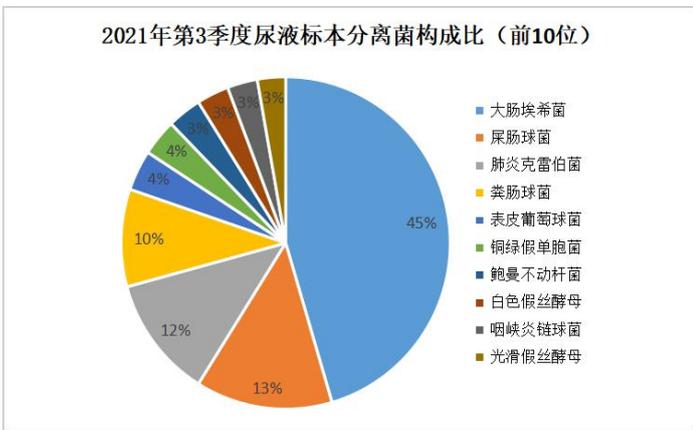


图3 2021年第三季度尿液标本分离菌构成比

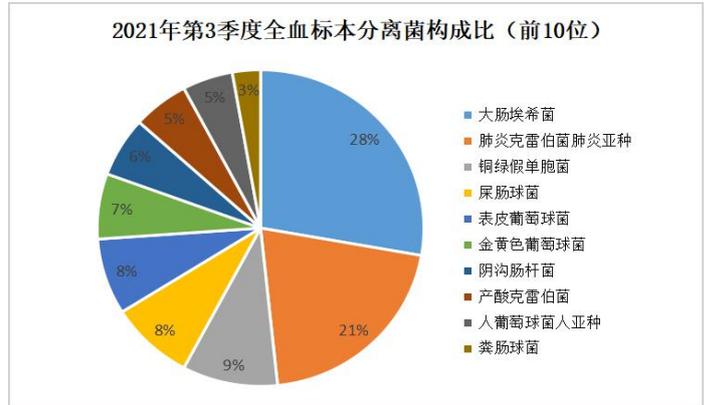


图6 2021年第三季度全血标本分离菌构成比

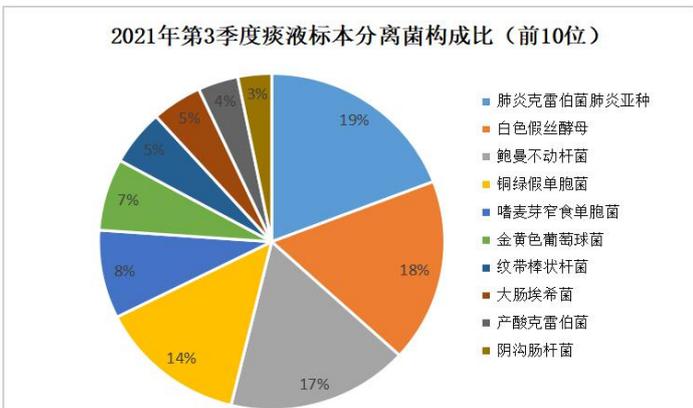


图4 2021年第三季度痰液标本分离菌构成比

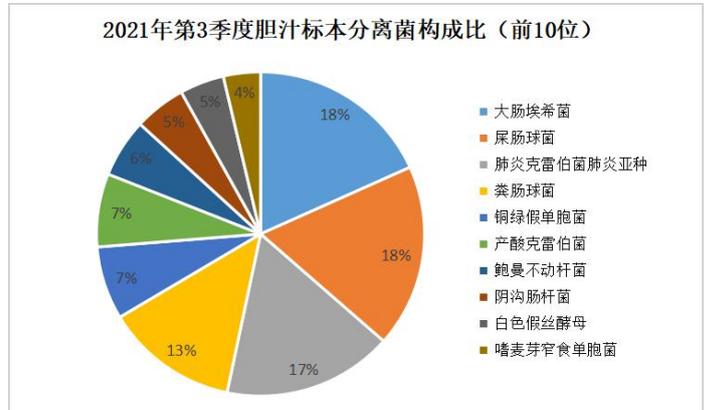


图7 2021年第三季度胆汁标本分离菌构成比

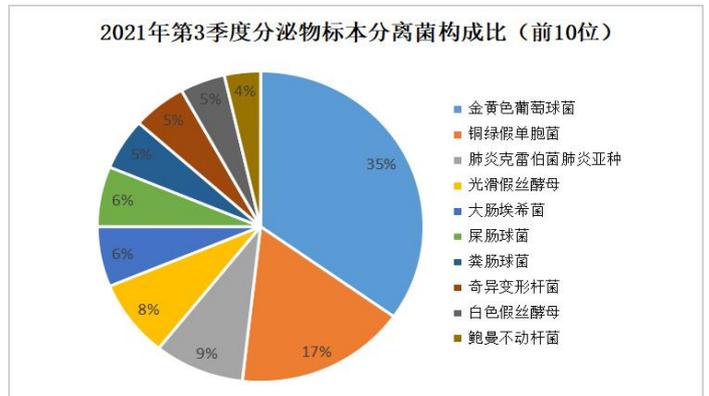


图 8 2021 年第 3 季度分泌物标本分离菌构成比

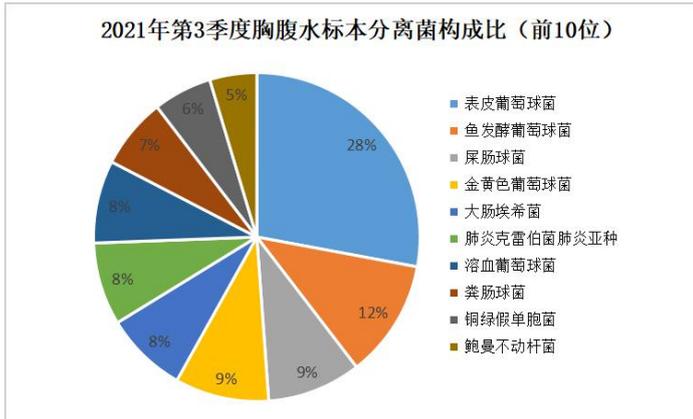


图 9 2021 年第 3 季度胸腹水标本分离菌构成比

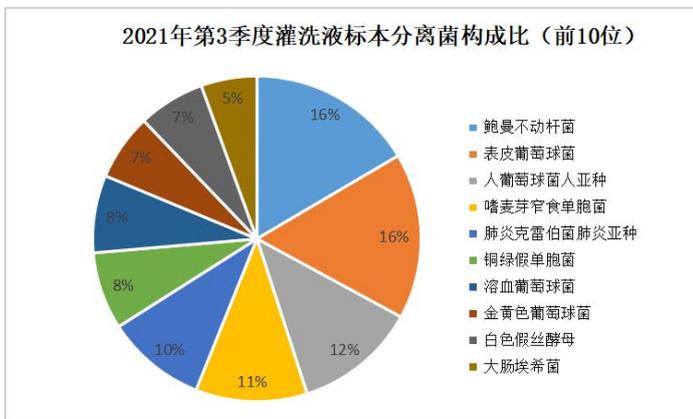


图 10 2021 年第 3 季度灌洗液标本分离菌构成比

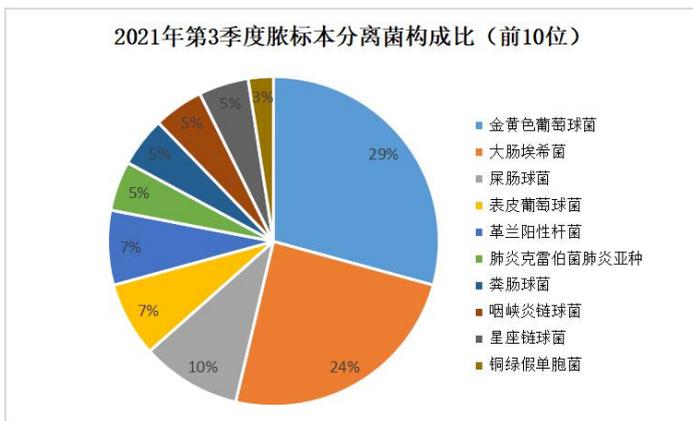


图 11 2021 年第 3 季度脓液标本分离菌构成比

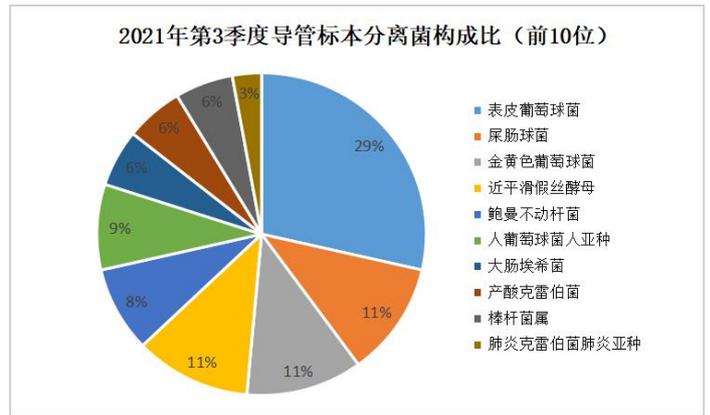


图 12 2021 年第 3 季度导管标本分离菌构成比

（二）耐药性分析

1. 2021 年第 3 季度主要分离菌的耐药性分析

肠杆菌科细菌中主要以大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌为主，敏感性较好的抗生素是碳青霉烯类、替卡西林/克拉维酸、头孢替坦和阿米卡星；非发酵菌中主要以鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌为主，鲍曼不动杆菌对替卡西林/克拉维酸耐药率最低（0%），其次是米诺环素（2.8%），替加环素（5.9%），对其他常用抗生素耐药率大多在 50-83%；铜绿假单胞菌对替卡西林/克拉维酸耐药率最高（40.5%），对其他抗生素耐药率均小于 18.1%；葡萄球菌中以金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌为主，未发现耐万古霉素的金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌及耐利奈唑胺的金黄色葡萄球菌，耐利奈唑胺的表皮葡萄球菌检出率（0.9%）；肠球菌中以屎肠球菌和粪肠球菌为主，耐万古霉素屎肠球菌检出率（1.8%）、粪肠球菌（0%），耐利奈唑胺屎肠球菌检出率（0.6%）、粪肠球菌检出率（7.3%），均比上季度有所上升；各分离菌耐药率见下图。

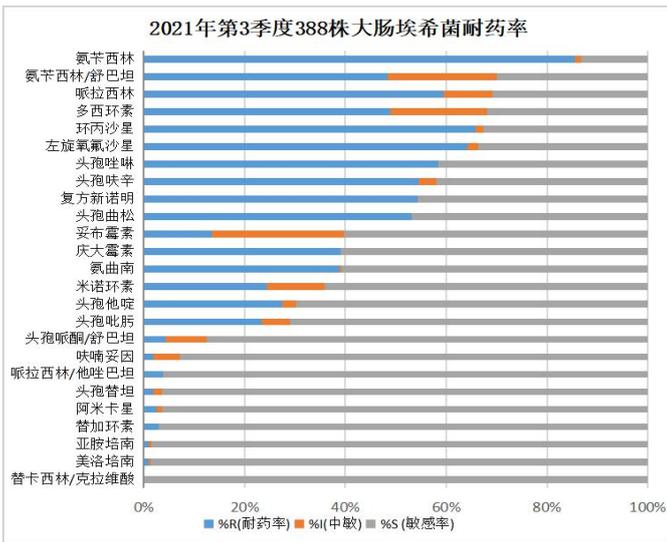


图 13 2021 年第 3 季度大肠埃希菌耐药率

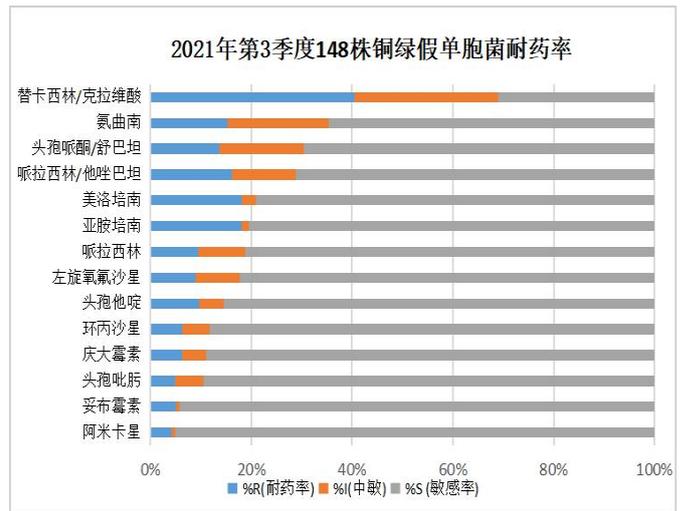


图 16 2021 年第 3 季度铜绿假单胞菌耐药率

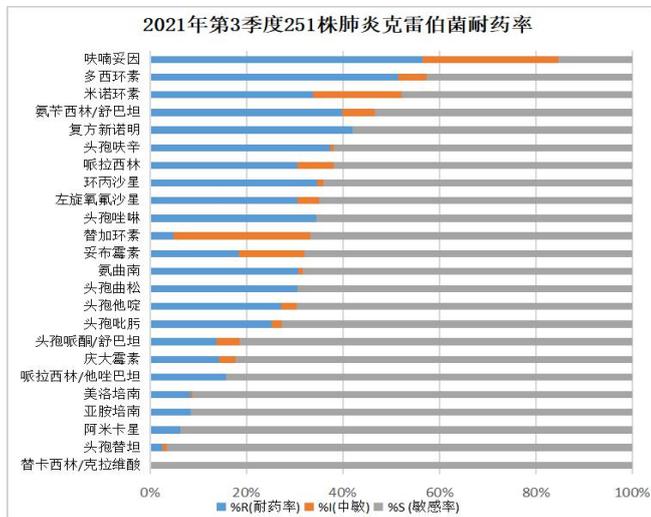


图 14 2021 年第 3 季度肺炎克雷伯菌耐药率

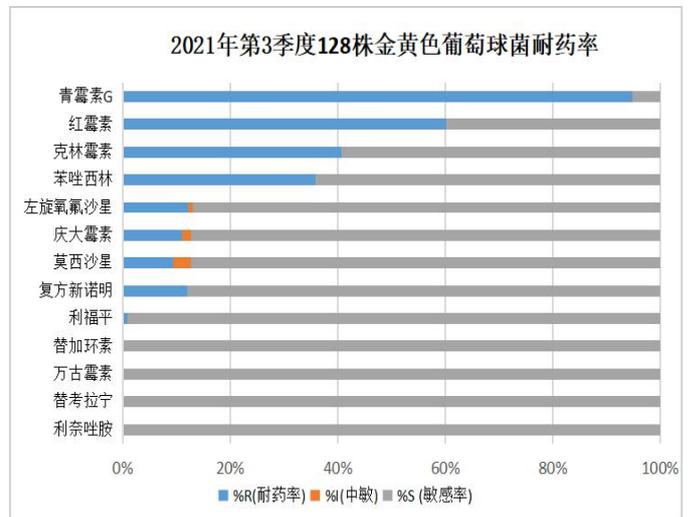


图 17 2021 年第 3 季度金黄色葡萄球菌耐药率

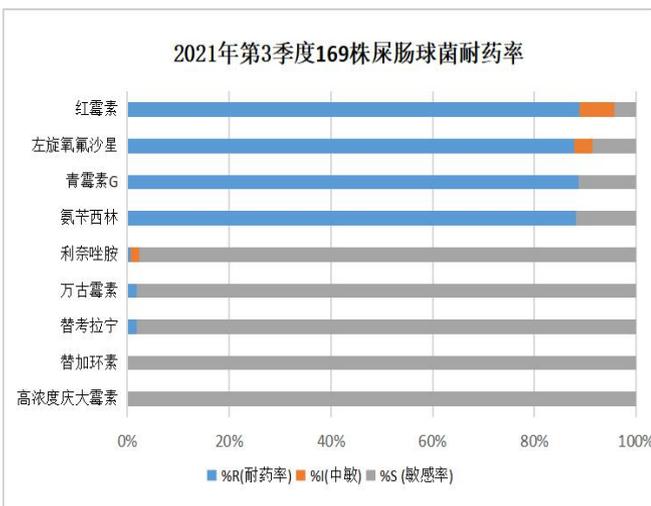


图 15 2021 年第 3 季度屎肠球菌耐药率

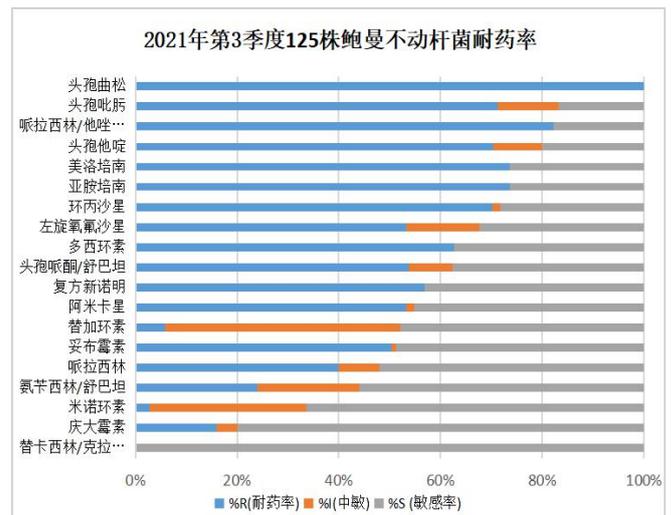


图 18 2021 年第 3 季度鲍曼不动杆菌耐药率

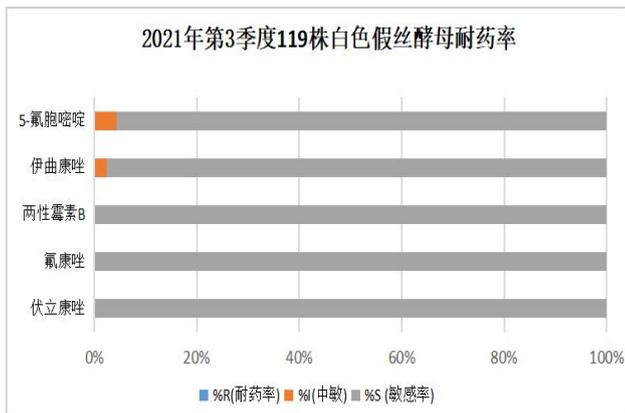


图 19 2021 年第 3 季度白色假丝酵母菌耐药率

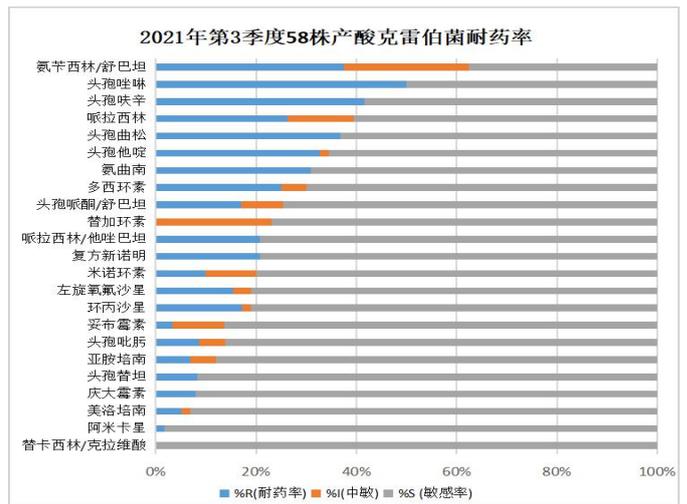


图 22 2021 年第 3 季度产酸克雷伯菌耐药率

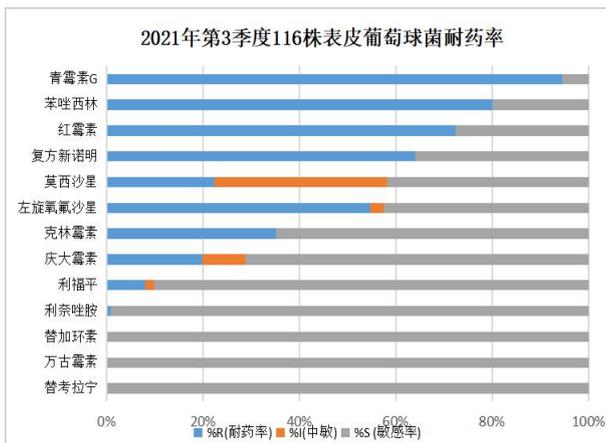


图 20 2021 年第 3 季度表皮葡萄球菌耐药率

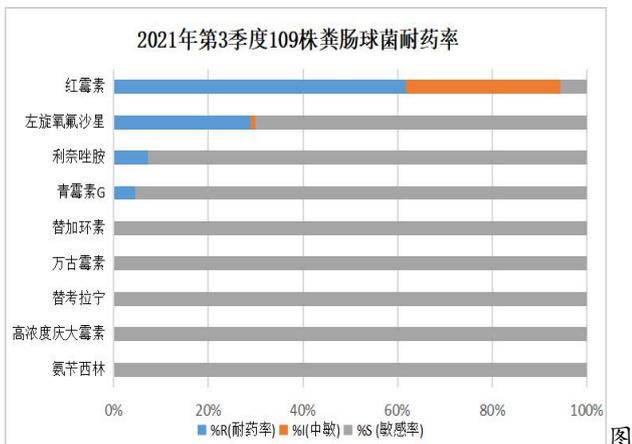


图 21 2021 年第 3 季度粪肠球菌耐药率

2.多重耐药分析

根据监测数据：大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌 ESBLs 的检出率分别为 53.1%和 30.5%，大肠 ESBLs 和肺克 ESBLs 检出率均比上季度有所下降；CRE 检出率分别 1%和 8.4%，CRE 大肠比上季度下降 1.3%，CRE 肺克比上季度下降 12.7%，第 3 季度检出 CRE48 株，以肺炎克雷伯菌为主；耐碳青霉烯类 CR-AB 和 CR-PA 检出率分别为 73.6%和 18.1%，CR-AB 比上季度下降 2.5%，CR-PA 比上季度上升 3.4%，金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌 MRS 检出率分别 35.9%和 80%，金葡 MRS 检出率比上季度上升 2.9%，表葡 MRS 检出率比上季度下降 4.5%。多重耐药菌检出率见下表。

时间 耐药类型	2021年第3 季度检出 率% (本季度)	2021年第2 季度检出 率% (上季度)	2020年第3季 度检出率% (去年同季 度)
CRE (大肠埃希菌)	1	2.3	1.7
CRE (肺炎克雷伯菌)	8.4	21.1	15.3
CR-PA	18.1	14.7	15.2
CR-AB	73.6	76.1	70.4
MRSA	35.9	33	28.6
VRE	1.8 (尿肠) 0 (粪肠)	0 (尿肠) 0 (粪肠)	0 (尿肠) 0 (粪肠)

责任编辑：曾晓艳

不合格标本分析：雷静晶

细菌耐药监测统计分析：李雯

细菌耐药监测审核：曾晓艳