

• 临床研究 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2025.12.019

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20250916.1946.004\(2025-09-17\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20250916.1946.004(2025-09-17))

肺泡灌洗液免疫荧光染色法在肺结核中的诊断价值^{*}

傅应亚,唐李凤,徐红霞,宗开灿,陈恒屹[△]

(重庆理工大学附属中心医院/重庆市第七人民医院呼吸与危重症医学科,重庆 400054)

[摘要] **目的** 通过比较肺泡灌洗液免疫荧光染色法、抗酸染色法与靶向高通量测序(t-NGS)检测结核分枝杆菌的效能,评价肺泡灌洗液免疫荧光染色法在肺结核诊断中的应用价值。**方法** 回顾性分析 2023 年 12 月至 2024 年 12 月该院拟诊为肺部感染的 149 例患者临床资料。收集患者肺泡灌洗液,分别采用抗酸染色法、免疫荧光染色法、t-NGS 检测结核分枝杆菌。以 t-NGS 检测结果作为参考标准,比较抗酸染色法、免疫荧光染色法与 t-NGS 的一致性,以及抗酸染色法、免疫荧光染色法诊断结核分枝杆菌的准确率、灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值。**结果** 149 患者中确诊 71 例肺结核,免疫荧光染色法的阳性例数为 20 例,阳性率为 28.17%,抗酸染色法的阳性例数为 7 例,阳性率为 9.86%,二者阳性率比较差异有统计学意义($\chi^2=7.998$, $P=0.005$)。免疫荧光染色法与 t-NGS 检测结果比较差异有统计学意义($\chi^2=17.381$, $P<0.001$),一致性 Kappa 值为 74.15;抗酸染色法与 t-NGS 检测结果比较差异有统计学意义($\chi^2=5.382$, $P=0.028$),一致性 Kappa 值为 70.32。免疫荧光染色法检测结核分枝杆菌的灵敏度为 90.91%,优于抗酸染色法的灵敏度 87.50%($P<0.05$),但二者特异度无明显差异($P>0.05$)。**结论** 肺泡灌洗液免疫荧光染色法在辅助检测结核分枝杆菌方面优于抗酸染色法,在基层疑诊肺结核患者诊断中具有重要的临床意义。

[关键词] 肺结核;免疫荧光染色;靶向高通量测序;肺泡灌洗液;抗酸染色

[中图法分类号] R521 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2025)12-2832-04

Diagnostic value of immunofluorescence staining of bronchoalveolar lavage fluid in pulmonary tuberculosis^{*}

FU Yingya, TANG Lifeng, XU Hongxia, ZONG Kaican, CHEN Hengyi[△]

(Department of Respiratory and Critical Care Medicine, The Central Hospital

Affiliated to Chongqing University of Technology/The Seventh People's

Hospital of Chongqing, Chongqing 400054, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the diagnostic value of immunofluorescence staining for Mycobacterium tuberculosis in bronchoalveolar lavage fluid by comparing its performance with acid-fast staining and targeted next-generation sequencing (t-NGS). **Methods** A retrospective analysis was conducted on the clinical data of 149 patients diagnosed with pulmonary infection in the hospital from December 2023 to December 2024. Bronchoalveolar lavage fluid samples were collected and tested for Mycobacterium tuberculosis using acid-fast staining, immunofluorescence staining, and t-NGS. Using t-NGS results as the reference standard, the concordance between acid-fast staining, immunofluorescence staining, and t-NGS was compared. The accuracy, sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value of acid-fast staining and immunofluorescence staining for diagnosing Mycobacterium tuberculosis were analyzed. **Results** Among the 149 patients, 71 were diagnosed with pulmonary tuberculosis. Immunofluorescence staining detected 20 positive cases (positivity rate 28.17%), while acid-fast staining detected 7 positive cases (positivity rate 9.86%). The difference in positivity rates was statistically significant ($\chi^2=7.998$, $P=0.005$). The difference between immunofluorescence staining and t-NGS results was statistically significant ($\chi^2=17.381$, $P<0.001$), with a consistency Kappa value of 74.15. The difference between acid-fast staining and t-NGS results was also statistically significant ($\chi^2=5.382$, $P=0.028$), with a consistency Kappa value of 70.32. The sensitivity of immunofluorescence staining for diagnosing Mycobacterium tuberculosis was 90.91%, superior to the 87.50% sensitivity of acid-fast staining ($P<0.05$), but there was no significant difference in specificity between the two methods ($P>0.05$). **Conclusion** Immunofluorescence staining of bronchoalveolar lavage fluid is superior to acid-fast staining for

^{*} 基金项目:重庆市巴南区科卫联合医学科研项目(BNWJ202300126, BNWJ202300103)。 [△] 通信作者, E-mail: hilliry@126.com。

assisting in the diagnosis of Mycobacterium tuberculosis and holds significant clinical value for diagnosing suspected pulmonary tuberculosis in primary healthcare settings.

[Key words] pulmonary tuberculosis; immunofluorescence staining; targeted next-generation sequencing; bronchoalveolar lavage fluid; acid-fast staining

肺结核为危害人类健康的重大疾病之一,具有高发病率及高传染性,导致了较大的经济负担和社会负担,肺结核传染源主要来自菌阳患者,故如何早期、快速、准确识别菌阳患者,是减少肺结核传播的重要环节^[1]。肺结核以病原学或病理学结果作为确诊依据^[2]。传统的痰涂片抗酸染色检查方法虽然操作简单、快速,但阳性率低。结核分枝杆菌培养法虽然敏感性较高,但培养时间长、成本高,需要特殊设备,重复性差。随着实验室诊断技术的发展,结核分枝杆菌及利福平耐药情况快速检测(Xpert MTB/RIF Test, Xpert MTB/RIF)^[3]、宏基因组测序技术^[4]、靶向高通量测序(targeted next-generation sequencing, t-NGS)^[5]检测逐渐用于临床,其操作准确、快速、安全性高,可满足临床检验需求,但检验价格昂贵,许多基层医院的实验室不具备该检验设备。近年来逐渐有免疫荧光染色技术辅助诊断肺结核的研究,但主要集中在痰液标本、肺组织病理标本,在肺泡灌洗液中的检测报道较少。由于痰液标本易污染且部分患者无痰或少痰、组织标本多需要有创操作获取,因此,相较于痰标本、组织标本,肺泡灌洗液获取病原学进行检测更准确且基本无创伤。故本研究通过收集肺部感染者肺泡灌洗液行抗酸染色法、免疫荧光染色法与 t-NGS 进行检测,探讨肺泡灌洗液免疫荧光染色法在肺结核患者诊断中的应用价值,为临床快速、准确地获得肺结核检测结果提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

回顾性分析 2023 年 12 月至 2024 年 12 月本院临床疑似肺部感染 149 例患者临床资料。纳入标准:(1)有肺结核患者接触史;(2)咳嗽、咳痰≥2 周,或痰中带血或有咯血、发热、盗汗、纳差、乏力等症状;(3)胸部影像学提示浸润影、空洞、干酪性肺炎等结核表现,符合上述标准其中 1 条即可。排除标准:(1)不能耐受电子支气管镜检查者;(2)无法采集标本或标本采集量不足难以进行检测。本研究已通过本院伦理委员会批准[审批号:意见(2024)-0104],免除患者知情同意。

1.2 方法

患者均行电子支气管镜检查,结合胸部 CT,在最佳病变部位行生理盐水灌洗以获取肺泡灌洗液,灌洗液随机分为 3 份,分别采用免疫荧光染色法、抗酸染色法、t-NGS 进行检测。抗酸染色法:用无菌容器收集肺泡灌洗液,离心浓缩,沉淀物采用萋-尼法染色,载玻片干燥后油镜下(100×)观察结果^[6]。免疫荧光染色法:用无菌容器收集肺泡灌洗液,离心浓缩,取标本

放置在载玻片上,滴加 1 滴 A 液(荧光素、罗丹明 B、甘油、水),使液体完全覆盖整个标本上,染色 15 min。用清水冲洗标本,使 A 液被冲洗干净,再滴加 1 滴 B 液(盐酸、乙醇、水),使液体完全覆盖整个标本上,持续 1 min。用清水冲洗标本,盖上盖玻片,置于荧光显微镜下观察。t-NGS:用无菌容器收集肺泡灌洗液,按要求保存,送至专业的检验机构(广州金域医学检验集团股份有限公司)检测。

1.3 观察指标

以 t-NGS 诊断结果为临床参考标准^[7],统计免疫荧光染色法、抗酸杆菌染色法检测结果,分析肺泡灌洗液免疫荧光染色法与抗酸染色法两种诊断方法的准确率、灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值。

1.4 统计学处理

采用 SPSS27.0 统计软件进行分析。计数资料以例数或百分比表示,组间比较采用 χ^2 检验;一致性比较采用 Kappa 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 基本情况

149 例患者中 71 例最终确诊为肺结核,另 78 例为其他肺部感染(包括 3 例非结核分枝杆菌感染,其余有肺真菌感染、一般细菌感染、病毒感染等)。71 例肺结核患者年龄(57.81 ± 19.63)岁,男 48 例,女 23 例;合并症:2 型糖尿病 21 例,慢性阻塞性肺疾病 14 例,高血压 13 例,冠心病 12 例,陈旧性结核 7 例,支气管扩张 6 例,慢性乙型肝炎 6 例,其他 8 例。

2.2 肺泡灌洗液不同检验方法检测结果

在确诊的 71 例肺结核患者中,免疫荧光染色法的阳性例数为 20 例,阳性率为 28.17%,抗酸染色法的阳性例数为 7 例,阳性率为 9.86%,二者阳性率比较差异有统计学意义($\chi^2=7.998, P=0.005$)。免疫荧光染色法与 t-NGS 检测结果比较差异有统计学意义($\chi^2=17.381, P<0.001$),一致性 Kappa 值为 74.15,见表 1。抗酸染色法与 t-NGS 检测结果比较差异有统计学意义($\chi^2=5.382, P=0.028$),一致性 Kappa 值为 70.32,见表 2。

表 1 免疫荧光染色法与 t-NGS 检测结果对比(n)

t-NGS	免疫荧光染色法		合计
	+	-	
+	20	51	71
-	2	76	78
合计	22	127	149

2.3 两种方法检测结核分枝杆菌的效能

免疫荧光染色法检测结核分枝杆菌的灵敏度为 90.91%，优于抗酸染色法的灵敏度 87.50% ($P < 0.05$), 但二者的特异度无明显差别 ($P > 0.05$), 见表 3。

表 2 抗酸染色法与 t-NGS 检测结果对比 (n)			
t-NGS	抗酸染色法		合计
	+	-	
+	7	64	71
-	1	77	78
合计	8	141	149

表 3 两种检查方法诊断肺结核的效能					
检测方法	灵敏度 (%)	特异度 (%)	阳性预测值 (%)	阴性预测值 (%)	Youden 指数
免疫荧光染色法	90.91	59.84	28.17	97.44	50.75
抗酸染色法	87.50	54.61	9.86	98.72	42.11

3 讨 论

据《2024 年全球结核病报告》,2023 年全球新增结核病患者 1 080 万例,中国新增 74.1 万例,在 30 个结核病高负担国家中排第 3 位。全球结核病死亡人数约 125 万例,中国结核病死亡数估算为 2.7 万例^[8]。目前,中国结核病负担重,故早诊早治非常重要,尤其在基层医院,因此本研究拟寻找一种相较于传统抗酸染色法更快、更准确的检测手段。

本研究结果显示,肺泡灌洗液免疫荧光染色法检测结核分枝杆菌的准确率、阳性率、灵敏度、Youden 指数均优于传统的抗酸染色法,但特异度无明显差别。从两种试验方法的操作原理分析,传染的抗酸染色法是在加热条件下,分枝杆菌细胞壁中的分枝菌酸与复红染料牢固结合成复合物,经盐酸乙醇处理后不脱色,再用亚甲蓝复染后分枝杆菌仍呈现为红色,进而与背景和其他杂菌呈现出的蓝色相区别。免疫荧光染色法是将荧光素与标本中抗酸分枝杆菌细胞壁相应抗原结合,在荧光显微镜激发光下呈亮黄色。因此,在操作流程上免疫荧光染色法较传统的抗酸染色法简便,免疫荧光染色过程可避免加热产生气溶胶,操作者不易被感染,安全性更高。免疫荧光染色法仅需 20×物镜观察,镜检速度快,而抗酸染色法需在 100×油镜下观察,视野小,镜检速度较慢^[9]。同时免疫荧光染色法在含菌量低时能够明显提高阳性的检出率,降低漏诊率,结果判读快速准确,可节省时间和精力^[10]。

吴殿水等^[11]研究发现,在痰液结核分枝杆菌检测中免疫荧光染色法的阳性率、灵敏度、特异度、准确率均明显高于抗酸染色法。赵慧等^[9]研究结果表明,免疫荧光染色法镜检的灵敏度比抗酸染色法镜检提高 15%,特异度并没有明显降低。练亿香等^[12]研究显示,免疫荧光染色法与结核分枝杆菌 DNA 检测法检

测结果一致性高,其灵敏度、阴性预测值均优于传统的抗酸染色法。痰液极易污染,在部分痰少或无痰的患者诊断应用上有缺陷,肺组织多需要通过有创操作获取,安全性不如支气管肺泡灌洗。多项研究^[13-16]已经证实,肺泡灌洗液相比于痰液,抗酸杆菌的检出率明显升高。本研究选择肺泡灌洗液,最终得出的试验结论与上述结论一致。

本研究有 3 例诊断为非结核分枝杆菌,其中 2 例免疫荧光染色阳性或抗酸染色阳性。抗酸分枝杆菌包括结核分枝杆菌、非结核分枝杆菌、奴卡菌,结核分枝杆菌占比最高。结核和非结核分枝杆菌为同属,有很多共同抗原或二者之间的抗原结构相似度高,比如细胞壁成分中脂阿拉伯甘露聚糖、热休克蛋白,故导致抗体无法准确区分^[6]。这是免疫荧光染色技术在肺结核诊断中的局限性,因此临床上需要结合其他更为靶向的方法作为补充以提高其鉴别性,比如结核菌培养^[17]、宏基因组测序^[18]、靶向测序^[19]。从 3 种技术方法的试验原理来分析,抗酸染色法基于细胞壁结构,免疫荧光染色法基于抗原,t-NGS 基于结核基因片段,三者都不依赖细菌的活性,所以均无法区分死菌和活菌。故临床上,需密切结合患者症状、胸部影像学等最终进行决策。本研究中有 7 例 t-NGS 阳性患者既往有肺结核病史,最终结合症状、胸部影像学考虑为结核复发。对该 7 例患者临床资料进行分析发现男性占比高,且大多合并易导致免疫功能减退的基础疾病。虽本试验收集到的数据量少,但仍与其他研究结果一致^[20-25]。因此,对于肺结核初治的患者,需重视健康教育及合并症,尤其是糖尿病的控制,以及加强营养支持,以预防肺结核的复发。

在肺结核诊断中肺泡灌洗液免疫荧光染色技术诊断效能总的来说优于传统的抗酸染色,但仍存在一定的局限性,如不能区分结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌、活菌和死菌。但对于一些需要快速做出决策的场所,如重症监护室、急诊病房,且一些因患方因素拒绝行分子检测,免疫荧光染色技术是一项快速有效、经济实惠的检测方式。但在临床中,呼吸科医生需建立“免疫荧光染色-分子验证-临床决策”三位一体的诊断体系,避免误诊、过度诊断的发生。后续可将肺泡灌洗液与痰液免疫荧光染色法进行分组对比,以验证肺泡灌洗液检测结核分枝杆菌优于痰液,当然需要更大的样本量及多中心的研究来进一步验证。

参考文献

[1] 吴惠忠, 胡锦涛. 结核病传播研究进展[J]. 实用医学杂志, 2023, 39(19): 2424-2427.

[2] 中华医学会结核病学分会, 结核病病理学诊断专家共识编写组. 中国结核病病理学诊断专家共识[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2017, 40(6): 419-425.

- [3] SUN Y,ZHANG Q,LIU C,et al. Diagnostic efficacy of Xpert MTB/RIF assay in bronchoalveolar lavage fluid for tracheobronchial tuberculosis: a retrospective analysis [J]. *Front Med (Lausanne)*,2021,8:682107.
- [4] GAO J,ZHAO L,CHEN G,et al. The value of metagenomic next-generation sequencing for the diagnosis of pulmonary tuberculosis using bronchoalveolar lavage fluid [J]. *Lab Med*,2024,55(1):96-102.
- [5] SCHWAB T C,PERRIG L,GÖLLER P C,et al. Targeted next-generation sequencing to diagnose drug-resistant tuberculosis:a systematic review and meta-analysis [J]. *Lancet Infect Dis*,2024,24(10):1162-1176.
- [6] 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.
- [7] 中国医疗保健国际交流促进会临床微生物学分会. 靶向高通量测序在感染性疾病中应用与实践专家共识[J]. *中华医学杂志*,2024,104(48):4375-4383.
- [8] 胡鑫洋,高静韬. 世界卫生组织《2024 年全球结核病报告》解读[J]. *结核与肺部疾病杂志*,2024,5(6):500-504.
- [9] 赵慧,王春花,孙蕊,等. 萋-尼氏抗酸染色法和金胺 O 荧光染色法在结核分枝杆菌痰涂片检测中的对比[J]. *天津医科大学学报*,2018,24(4):357-360.
- [10] 彭凤,何金,李琼琼,等. 抗酸分枝杆菌荧光染色与 Ziehl-Neelsen 法在抗酸分枝杆菌检测中的应用比较[J]. *临床与实验病理学杂志*,2022,38(8):1013-1015.
- [11] 吴殿水,王新芳,朱妍妍,等. 免疫磁珠荧光染色法在痰液结核分枝杆菌检测中的应用[J]. *现代检验医学杂志*,2023,38(2):96-101.
- [12] 练亿香,罗海军,蒋莎莉. 免疫荧光染色法在基层医院诊断肺结核中的应用价值分析[J]. *当代医药论丛*,2023,21(10):5-8.
- [13] 缪星国,叶慧,余小添. 肺泡灌洗液 Xpert、抗酸杆菌涂片、分枝杆菌培养对痰液 Xpert 阴性肺结核的诊断价值[J]. *温州医科大学学报*,2025,55(1):41-45.
- [14] 虞忻,吴海燕,赵静,等. 支气管肺泡灌洗液 GeneXpert-MTB/RIF 检测在活动性肺结核诊断中的效能[J]. *临床肺科杂志*,2021,26(6):820-824.
- [15] SHI C L,HAN P,TANG P J,et al. Clinical metagenomic sequencing for diagnosis of pulmonary tuberculosis[J]. *J Infect*,2020,81(4):567-574.
- [16] BADR O I,ELREFAEY W A,SHABRAWI-SHI M,et al. Diagnostic accuracy of different bronchoscopic specimens in sputum Xpert MBT/RIF-negative pulmonary TB patients [J]. *Multidiscip Respir Med*,2022,17(1):872.
- [17] OU X C,LI H,LIU D X,et al. Comparison of Xpert MTB/RIF, RealAmp, and CPA Tests in detecting *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Biomed Environ Sci*,2019,32(3):215-219.
- [18] XU P,YANG K,YANG L,et al. Next-generation metagenome sequencing shows superior diagnostic performance in acid-fast staining sputum smear-negative pulmonary tuberculosis and non-tuberculous *Mycobacterial* pulmonary disease[J]. *Front Microbiol*,2022,13:898195.
- [19] HE Y,GONG Z,ZHAO X,et al. Comprehensive determination of *Mycobacterium tuberculosis* and nontuberculous *Mycobacteria* from targeted capture sequencing[J]. *Front Cell Infect Microbiol*,2020,10:449.
- [20] 钟倩红,马晓慧,钟永辉,等. 2014—2018 年佛山市肺结核患者复发情况及影响因素分析[J]. *中国防痨杂志*,2022,44(7):690-697.
- [21] 孙国强. 血糖、血清前白蛋白水平与 2 型糖尿病合并初治肺结核患者治疗后复发的关系[J]. *实用临床医学*,2024,25(1):15-18.
- [22] 张屹立,郑晓宇,吴悦. 某市 2008—2017 年结核患者复发因素调查研究[J]. *中国医药指南*,2021,19(11):121-122.
- [23] 戴志松,陈堃,林淑芳,等. 福建省成功治疗的肺结核患者 10 年复发情况及影响因素分析[J]. *疾病监测*,2021,36(11):1152-1158.
- [24] 李晨,洪忻,刘巧,等. 血糖控制与结核病风险:基于人群队列研究[J]. *中华疾病控制杂志*,2022,26(11):1241-1247.
- [25] FANG X E,CHEN D P,TANG L L,et al. Association between depression and malnutrition in pulmonary tuberculosis patients:a cross-sectional study[J]. *World J Clin Cases*,2022,10(14):4395-4403.