

- [13] Eder AF,李喆.输血相关性急性肺损伤的监测(2003~2005 年)及美国红十字会男性供血者的血浆选择性使用的潜在用途[J].国际输血及血液学杂志,2007,30(4):290.
- [14] Popovsky MA,Chaplin HC Jr,Moore SB. Transfusion-related acute lung injury:a neglected,serious complication of hemotherapy[J]. Transfusion(Paris),1992,32(6):589-592.
- [15] Toy P,Gajic O. Transfusion-related acute lung injury[J]. Anesth Analg,2004,99(6):1623-1624.
- [16] 卢家凯,张京岚,卿恩明.输血相关急性肺损伤的研究进展[J].中华内科杂志,2007,46(5):423-425.
- [17] Nakagawa M,Toy P. Acute and transient decrease in neutrophil count in transfusion-related acute lung injury:cases at one hospital [J]. Transfusion,2004,44(12):1689-1694.
- [18] 廖莉.输血相关性急性肺损伤 1 例报告[J]. 重庆医学,2000,29(3):211.
- [19] Silliman CC,Curtis BR,Kopko PM,et al. Donor antibodies to HNA-3a implicated in TRALI reactions prime neutrophils and cause PMN-mediated damage to human pulmonary microvascular endothelial cells in a two-event in vitro model[J]. Blood,2007,109(4):1752-1755.
- [20] 赵凤绵,王毅,刘敬闪,等.输血相关急性肺损伤的预防[J]. 中国输血杂志,2009,22(9):776-779.
- [21] Toy P,Definition LT. Mechanisms,incidence and clinical relevance[J]. Best Pract Res Clin Anaesthesiol,2007,21(2):183-193.
- [22] Silliman CC. The two-event model of transfusion-related acute lung injury[J]. Crit Care Med,2006,34(Suppl 5):S124-131.
- [23] Duffett M,Choong K,Ng V,et al. Surfactant therapy for acute respiratory failure in children:a systematic review and meta-analysis [J]. Crit Care,2007,11(3):R66.
- [24] Lacroix J,Hébert PC,Hutchison JS,et al. Transfusion strategies for patients in pediatric intensive care units[J]. N Engl J Med,2007,356(16):1609-1619.
- [25] van Stein D,Beckers EA,Sintnicolaas K,et al. Transfusion-related acute lung injury reports in the Netherlands;an observational study[J]. Transfusion(Paris),2010,50(1):213-220.
- (收稿日期:2012-09-19)

• 综 述 •

## 结核分枝杆菌快速检测方法研究进展

陈 琪<sup>1△</sup>,张 轩<sup>2</sup>,许红芳<sup>1</sup>综述,殷 和<sup>3</sup>审校

(1. 中国人民解放军第十二中心医院检验科,新疆疏勒 844200;2. 重庆医科大学儿科学院,重庆 400331;  
3. 中国人民解放军第四医院检验科,青海西宁 810007)

**关键词:**分枝杆菌,结核; 快速检测; 综述

**DOI:**10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2013. 06. 031

**文献标识码:**A

**文章编号:**1673-4130(2013)06-0703-02

中国结核病发病人数居世界第二位,是 22 个结核病高负担国家之一<sup>[1]</sup>。结核分枝杆菌检测是结核病防治的重点和难点<sup>[2]</sup>,传统的检测方法如结核分枝杆菌培养法,虽然具有很高的特异性和准确性,但同时存在检测周期长,阳性率低等缺点而不能满足快速诊断的需要<sup>[3]</sup>。目前临床实验室关于结核菌的诊断方法主要包括全自动培养法、免疫学方法、分子生物学方法、基因芯片法等,本文将对以上结核分枝杆菌快速检测新技术进行综述。

### 1 全自动培养系统

全自动培养系统已进入临床应用,如 BACTEC MGIT960 系统、BACTEC9000 MB 系统、ESP 培养系统 II 和 MB/BacT 系统等。BACTEC MGIT960 系统具有大容量、安全、无交叉污染、无放射性污染、自动存储数据等优点。与之相比,BACTEC9000 MB 系统由于 MB 系统含有较多培养基而使标本稀释,因而使检出率大大降低。ESP II 培养系统检测耗时长,假阳性率高<sup>[4]</sup>。与传统培养法比,全自动培养系统提高了分枝杆菌的分离率,缩短了培养时间,但仍不能完全取代传统培养法,标本在首次分离中可以与传统培养法联合使用,以提高检出率。全自动培养系统具有无交叉污染,无放射性,连续监测标本,准确的数据处理系统等优点,是快速、敏感、高效的分离分枝杆菌的有效方法,但其仪器昂贵,成本高,短时间很难大范围推广,特别是基层医疗单位更难以推广。

### 2 免疫学新方法

**2.1 免疫金标技术** 该技术是 20 世纪 80 年代中后期发展起来的新型标记和检测技术。该技术以结核菌特异性外分泌蛋白 MPB64 为测定对象,操作简便,短时间获得结果。陈俊林等<sup>[5]</sup>试验报道利用此法检测结果与传统菌种鉴定实验的结果

符合性很高,敏感度为 99.1%,特异度为 100%。陈奎霖<sup>[6]</sup>应用胶体金法检测结核抗体阳性率为 82.0%,涂片阳性率为 35.6%;涂片阴性结核患者血清结核抗体阳性率 75.8%。胶体金法检测结核病患者血清中的结核抗体阳性率明显高于涂片法和培养法,尤其是在结核早期感染细菌量少或化疗后细菌变异、死亡难于培养时效果更明显。检测结核抗体阳性率为 82.0%与 ELISA 法检测结核抗体相关报道相一致。

胶体金法的优点是对结核分枝杆菌能进行快速的菌种鉴定,与传统的菌种鉴定方法相比,优点是操作简单,检测周期短,缺点是不能进一步区分结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌。该实验具有快速(3 min)、敏感、特异、简便的实验要求,具有一定的早期辅助诊断价值,对肺外结核也具有辅助诊断意义,利于基层医疗单位应用<sup>[6]</sup>。

**2.2 酶联免疫斑点试验** 酶联免疫斑点技术(ELISPOT)可以用来测定 T 细胞表面特异的早期分泌抗原-6(ESAT-6)和培养滤出液蛋白-10(CFP-10),从而提高了检测的敏感度和特异度。其缺点为很难自动化,因而不适合作为实验室常规诊断方法<sup>[7]</sup>。国外实验室已将 ELISPOT 作为常规检测结核病,尤其是早期和潜伏结核感染检测方法之一,但国内该方面的研究应用较少。该方法可以实现自动化,操作简单,检测结果更加客观可靠。ELISPOT 不仅具有检测敏感、特异、快速等优势,而且还能对结核潜伏感染病例进行及时的检测。检测过程中仅需 37℃ 体外培养箱、酶标仪等实验室常规设备,在大多数医疗卫生机构中都可以进行,是一种值得推广的检测方法<sup>[8]</sup>。

基于同样原理的体外酶联免疫斑点技术(T. SPOT)的主要优点是:(1)敏感度及特异度高,该方法能从 60 000 个分泌干扰素(INF)的细胞中检测出单个细胞,只有结核分枝杆菌和

极少数非结核分枝杆菌才会出现阳性反应,而 BCG 及环境中的多数非结核分枝杆菌却不分泌 ESAT-6 和 CFP-10 蛋白,因此本检测方法可区别 BCG 接种后出现的阳性反应。(2)应用范围广,在潜伏性结核感染、肺外结核、活动性肺结核和免疫抑制的结核患者均能检测。(3)早期快速诊断,但 T-SPOT. TB 存在实验条件要求高,检测步骤繁琐,所需试剂和仪器昂贵等缺点<sup>[7]</sup>。

**2.3 干扰素释放试验** 干扰素释放试验 (IGRA) 就是利用 MTB 抗原于可疑感染者全血或单个核细胞体外 37 ℃ 孵育过夜,测定致敏 T 细胞受抗原刺激后 IFN- $\alpha$  释放水平,从而判断是否有 MTB 感染。IGRA 的刺激抗原通常分为特异 MTB 和 PPD 抗原两类。多项研究表明,MTB 特异抗原可区分活化感染和潜伏感染以及判定疗效等。其中,MPB64 抗原被发现只存在于 MTB 培养滤液中,在 BCG 培养滤液中缺乏。ESAT-6 和 CFP-10 基因仅存在于 MTB 中。IGRA 除特异度较高外,还具有结果客观,24~48 h 可完成检测,不会激发记忆性免疫反应等优点,但其最大的缺点是价格贵,短时间内难以普遍推广<sup>[9]</sup>。

### 3 分子生物学方法

**3.1 核酸探针检测法** 迄今为止,DNA 探针直接检测临床标本的敏感度并不理想,多数探针只能检出  $10^6$  CFU/L 以上的标本,需依赖培养扩增,因此其临床应用受到了很大的限制。有研究显示,DNA 探针直接检测 TB 患者痰标本的阳性率为 22.2%,低于涂片抗酸染色检查。近年来,在基因探针的基础上研发了一种荧光染料标记肽核酸(PNA)的原位杂交方法,可直接用于临床标本的检测<sup>[10]</sup>。有学者在实验中与探针杂交的靶序列选择多拷贝的 IS6110 插入序列,比单拷贝的靶基因更容易检出,其显色方法应用了化学发光法,由此提高了核酸探针检测的敏感度。而且该检测方法具有操作简便、结果直观易判定等特点,适用于常规结核分枝杆菌检测<sup>[11]</sup>。

**3.2 PCR 检测法** 有研究显示 PCR 扩增结核分枝杆菌 DNA 应用于结核病诊断的准确性为 98.8%,特异度为 100.0%,敏感度为 74.1%,且其敏感度明显高于培养法(43.9%)与涂片法(24.9%),而且 PCR 检测结核分枝杆菌 DNA 仅需 6~8 h。另外,PCR 检测不但可以扩增能着色的活菌,还可以扩增已死亡的、但 DNA 尚未降解的细菌<sup>[12]</sup>。然而该技术存在假阴性、假阳性和污染等问题,随着 PCR 技术的不断改进和完善,新的 PCR 及其衍生技术不断建立,在一定程度上提高了 PCR 方法的敏感度和特异度<sup>[11]</sup>。

**3.3 基因芯片检测** 有试验结果显示基因芯片法的特异度为 100.0%,明显高于金标法(DICA)法和结核菌素纯蛋白衍生物皮试(PPD)法。敏感度方面基因芯片法灵敏度为 81.6%,明显高于其他方法。其试验中使用的基因芯片集芯片技术与 PCR 技术为一体,具有较好的灵敏度和特异度,而且芯片背景干净清晰,能特异性地鉴别 17 种结核分枝杆菌,检测过程仅需 6 h 即可完成,有效解决了传统基因芯片应用过程中,需要大型检测设备、不利于临床推广应用的瓶颈问题,是一种可靠的新型结核分枝杆菌检测技术<sup>[13]</sup>。

另外,同属基因芯片范畴的蛋白芯片也有着广泛的应用。杨新军和樊宇<sup>[14]</sup>利用微数组技术将纯化的结核分枝杆菌脂阿拉伯甘露糖(LAM)、基因工程生产并纯化的结核分枝杆菌蛋白  $16 \times 10^3$  和  $38 \times 10^3$  三种抗原固定在同一膜上,以免疫金为标记物在膜上直接显色,通过芯片识别和分析。其研究结果显示结核分枝杆菌蛋白芯片检测肺结核有较高的灵敏度和特异度,误诊率和漏诊率较低,是结核病辅助诊断的好方法,值得推广。崔鲂等<sup>[15]</sup>首先将检测菌的 DNA 提取出来,对样品中的靶

基因进行扩增和荧光标记,将扩增并荧光标记的基因与芯片上的探针进行杂交反应,最后芯片扫描成像,用配套软件进行判读,可在 6 h 内得出鉴定结果。其试验结果具有良好的特异度和灵敏度。张立群等<sup>[16]</sup>利用痰液、骨髓、胸腹水、脑脊液等标本的研究发现标本灭活后的液化对检出率有一定的影响,液化对提高检出率和检测结果的准确性至关重要。而 PCR 扩增对保证结核分枝杆菌的检出尤为重要,经过 PCR 扩增后,即使原标本的结核分枝杆菌含量极其微小,也能够用基因芯片法检出。

### 4 结 语

综上所述,结核分枝杆菌感染诊断方法很多,但各有利弊。全自动培养系统仪器昂贵,成本高,检测周期相对较长。PCR 技术及基因诊断方法作为临床诊断需要特殊的仪器设备,技术相对复杂,对实验条件和操作人员的要求较高,短期很难大范围推广。相信新的实验诊断技术会不断出现,正在研究和应用的免疫学和基因芯片诊断技术将会克服现有不足,在灵敏度、特异度、简便、快速、标准化等方面满足结核分枝杆菌快速准确诊断的需求。作为医学检验工作者要充分掌握新知识、新技术,在实践中灵活运用,优势互补,找到准确度高、特异性好、敏感度高、简便快捷、经济的结核分枝杆菌检测新方法。

### 参考文献

- [1] 朱翠云. 结核病流行及其耐药现状[J]. 上海医药, 2009, 30(1): 11-13.
- [2] 陆学东, 周一平, 杨来智, 等. 多种呼吸道病原微生物快速筛查技术的建立[J]. 中华医院感染学杂志, 2008, 18(1): 140-143.
- [3] 罗招凡, 林向华, 李竞. 蛋白芯片法与金标法及抗酸染色法诊断结核病的比较[J]. 现代检验医学杂志, 2007, 22(2): 52-54.
- [4] 谢爱蓉, 赵晓春. 结核分枝杆菌快速培养法的进展[J]. 检验医学, 2010, 25(4): 327-329.
- [5] 陈俊林, 顾欣荣, 顾德林, 等. 结核分枝杆菌胶体金法对分枝杆菌菌型快速鉴别价值探讨[J]. 医学综述, 2009, 15(18): 2847-2848.
- [6] 陈奎霖. 结核抗体在诊断结核病中的意义[J]. 中国热带医学, 2008, 8(9): 1608-1608.
- [7] 霍霏霏, 刘晓清. 核病免疫学诊断新进展-T-SPOT. TB [J]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2010, 4(2): 48-50.
- [8] 柳红梅. 一种新型结核杆菌感染快速检测方法的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(3): 572-573.
- [9] 石榴, 黄文杰. 结核病实验室诊断技术新进展[J]. 广东医学, 2008, 29(11): 1770-1771.
- [10] 李俊明, 万腊根. 结核病分子生物学诊断研究进展[J]. 江西医学检验, 2007, 25(6): 601-604.
- [11] 林青, 朱玲. 结核分枝杆菌分子生物学检测方法新进展[J]. 国际呼吸杂志, 2007, 27(5): 345-349.
- [12] 彭志文. 聚合酶链反应检测结核分枝杆菌的临床应用价值[J]. 检验医学与临床, 2010, 07(14): 1490-1491.
- [13] 张立群, 王云霞, 周敏, 等. 4 种不同结核分枝杆菌检测方法对结核病的诊断价值比较[J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 20(11): 1633-1635.
- [14] 杨新军, 樊宇. 结核杆菌蛋白芯片检测在肺结核诊断中的价值[J]. 临床肺科杂志, 2010, 15(2): 255-256.
- [15] 崔鲂, 夏云, 张莉萍, 等. 生物芯片法在结核分支杆菌检测中的应用价值探讨[J]. 重庆医学, 2009, 38(19): 2411-2412.
- [16] 张立群, 王云霞, 姚春艳, 等. 高特异性基因芯片法检测结核分枝杆菌的临床应用评价[J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 20(11): 1505-1508.