

- [22] 张玉云,吴金英,范小莉,等.多药耐药铜绿假单胞菌消毒剂-磺胺耐药基因检测与临床意义[J].中国感染控制杂志,2009,8(1):7-9.
- [23] Soumet C,Fourreau E,Legrandois P,et al. Resistance to phenicol compounds following adaptation to quaternary ammonium compounds in *Escherichia coli*[J]. Vet Microbiol, 2012, 158(1/2):

147-152.

- [24] Wyllie D, Paul J, Crook D. Waves of trouble: MRSA strain dynamics and assessment of the impact of infection control[J]. J Antimicrob Chemother, 2011, 66(12):2685-2688.

(收稿日期:2013-12-04)

• 综 述 •

结核高负担地区结核分枝杆菌快速诊断方法的研究进展

王晓玮 综述,徐元宏[△]审校

(安徽医科大学第一附属医院检验科,安徽合肥 230022)

关键词:结核分枝杆菌; 培养; 核酸扩增技术; 抗原; 诊断

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.09.031

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)09-1161-03

人类患结核病的历史悠久,18 世纪科学家分离出结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB),随后抗结核药物的使用使结核病得到有效控制。但 20 世纪 80 年代后期,世界结核病疫情又开始回升,且日趋严重。根据最新统计,目前全球每年约新增 870 万人感染活动性结核菌[13% 的患者同时感染人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)];每年约有 140 万人死于结核病。在结核病患病率增高的同时,多重耐药也成为抗结核治疗的一大难题。至 2011 年,全球共报道 31 万多重耐药结核病病例。其中有 60% 以上发生在中国、印度、南非等发展中国家^[1-2]。实现早期结核病治疗的基础是早期快速诊断,结核病的确诊主要依据细菌学检测。目前实验室对结核病诊断时间较长,这成为这些结核高负担国家结核病控制的瓶颈之一,因此,快速、准确、灵敏、价格低廉的结核病实验室诊断方法对结核病控制有着极为重要的意义。以下将从直接诊断和间接诊断两方面简要介绍近几年结核病高负担地区结核病实验室快速诊断的发展情况。

1 MTB 的染色涂片检测

目前在结核病高负担国家,采用萋尼抗酸染色,通过普通光学显微镜直接检测(镜检)痰标本中的 MTB,具有操作简单、染液成本低、对显微镜要求低等特点,是诊断肺结核的常规方法之一。但普通抗酸染色敏感性不高,这一困扰基层结核病防治工作者^[3-4]。荧光(金胺 O)染色的操作较抗酸染色更简便,且敏感性大幅提高,为结核涂片镜检的发展提供了新的方向,但由于荧光显微镜价格昂贵,限制了金胺 O 染色的应用。随着发光二极管(light emitting diode, LED)技术的快速发展,LED 显微镜被用于痰涂片的 MTB 检测。有研究表明,该法的敏感性较普通抗酸染色提高 10% 以上^[5],且 LED 光线稳定、价格低、寿命长、不产生紫外线和热量,无需暗室观察及其他特殊设备,具有较大的实用价值^[6],但其阳性率较低,仍需结合其他检测方法进一步确证。标本预处理的改进对提高结核病患者的检出率有重要的意义,如免疫磁珠捕获法可通过磁珠及特异性结核抗体吸附 MTB,从而提高痰涂片阴性的结核病诊断效率,该法还具有特异性高、敏感性强的特点,无需昂贵的仪器设备,适合基层检验机构使用^[7]。

2 MTB 的快速培养

MTB 的分离培养作为结核诊断的“金标准”在临床中应用广泛,但使用传统改良罗氏固体培养基培养操作繁琐、费时,影响因素多,不能满足快速诊断的要求;而液体培养技术简便、快捷、商业化程度较高,弥补了这些缺陷。据报道全自动

BACTEC MGIT 960 培养系统(美国 BD 公司)、BacT/Alen 3D 全自动血培养仪(法国生物梅里埃公司)等依赖一种氧敏感荧光化合物检测 MTB 的生长,无放射性污染,可将敏感性提升至 88%,若同时用痰涂片检测 MTB,可提高至 92%。液体培养在提高检出率的同时,对微生物敏感性试验的报告时间比传统培养基缩短 10 d 以上,且具有更高的阳性检出率^[8]。目前,WHO 已推荐在部分地区(主要为低收入国家)实行液体培养基技术。

除此之外,目前还可将 MPT64 的分泌作为 MTB 的生长指标,通过采用商品化试纸检测液体培养基中的 MPT64 间接检测 MTB^[9]。该方法具有高敏感性、高专一性,但其易被污染的缺点有待改进。

对于多药耐药结核病(multi-drug resistance tuberculosis, MDR-TB)、广泛耐药结核病(extensively drug resistant tuberculosis, XDR-TB)的检测,可用倒置显微镜观察薄层琼脂法,成本较低,在 10 d 内观察生长情况的同时,还可根据特定的杆状表型初步鉴别 MTB;与其他液体培养基比较,降低了潜在气溶胶的危险性,为医用资源有限、不能应用复杂技术的国家提供了一种合适的方法^[10]。

3 MTB 的分子生物学检测

对 MTB 核酸的检测已在文献中广泛报道,主要分为 2 类。一类以聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增技术为基础,检测靶标为 DNA 的核酸检测技术。Meta 分析显示,PCR 技术将总敏感性和总特异性分别提升至 85% 和 97%,但这些研究结果的差异较大,提示不同地区的 PCR 仪器及技术水平影响较大^[11]。

近几年,通过引物设计的发展和多重 PCR 检测方法的改进,出现了一些自动化程度高且操作简单的 PCR 产物检测技术平台,提高了 PCR 检测试剂的商业化程度,也降低了结果的差异性。如 Luminex xMAP 技术的新型生物芯片技术平台,该平台主要利用液相芯片技术(又称为微球体悬浮芯片),是最早通过美国食品和药物管理局(food and drug administration, FDA)认证的可用于临床诊断的生物芯片技术,与同类型固体芯片技术比较,具有操作简单、成本低、杂交快、应用灵活等优点。研究表明,该法的检测周期为 2 h,还可同时检测其他呼吸道传染病。但其作为开放平台,在提高仪器利用率的同时,也易造成污染^[12]。此外, Bergval 等^[13]报道的多重连接探针扩增技术(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)也已被应用于肺结核及肺外结核的诊断,该法针对待检 DNA

片段进行定性和半定量分析,在检测中通过连接反应确保结果的高度特异性,从而鉴定 MTB 的感染,并获得准确的 MTB 分型,筛查潜在的耐药菌株。分子信标(molecular beacon, MB)是基于 PCR 技术的快速耐药检测技术,在近几年的结核诊断领域发展迅速,其原理是两端分别共价结合含荧光基团和猝灭基团的 DNA 探针,呈茎环结构,导致两基团靠近而不发出荧光,当其互补序列杂交时,茎环结构被破坏,荧光基团与猝灭基团分离而发出可见荧光。目前,美国 Cepheid 公司利用 MB 技术研发了基于实时 PCR 检测的试剂盒-Xpert MTB,该方法中每一标本在核酸提取、PCR 扩增、结果检测过程中均在一个独立密封的容器中,降低了标本间的交叉污染。研究表明,对于痰涂片阴性的结核病患者,多次 Xpert MTB 检测可大幅度提高检测的准确性^[14]。据报道,对于肺外结核感染的诊断,Xpert MTB 检测的敏感性为 81%,特异性为 99.6%,同时该法对 HIV 患者及儿童患者 MTB 感染的诊断也具有较高的参考意义^[15-17]。

另一类 MTB 核酸检测以 RNA 扩增技术为基础,是检测靶标为 RNA 的核酸检测技术。MTB 实时荧光核酸恒温扩增检测(simultaneous amplification and testing for detection of MTB, SAT-TB)技术利用 MTB 特异的 16S rRNA 为检测靶标,经过恒温 RNA 扩增技术扩增靶标片段,使荧光标记的探针与靶标片段的扩增产物杂交后释放荧光信号,并实时检测荧光信号,以快速、准确判断待检样本中是否存在 MTB,是否存在耐药基因。SAT-TB 以 RNA 为检测靶标,克服了 PCR 检测易污染问题,在检测中不需特殊仪器,在一般实验室用常规配备的实时定量 PCR 仪即可进行检测,检测时间仅需 1 h,操作简单,但需全程注意避免 RNA 酶的污染^[18-19]。

4 MTB 特异性抗原的检测

现阶段,实验室结核诊断技术主要分为细菌学、分子生物学、免疫学 3 种。免疫学诊断又包括 2 种:一是依据机体对 MTB 诱发的免疫应答反应进行检测,分为体液、细胞免疫检测;另一个是针对 MTB 的特异性抗原进行检测。机体受到 MTB 感染后,体内首先出现 MTB 特异性抗原,这些抗原的检测可作为 MTB 感染存在的直接证据,避免了由于结核病患者免疫应答低下导致的体液免疫检测或细胞免疫检测的假阴性,因此,检测 MTB 特异性抗原可作为结核病早期、快速、敏感、特异的诊断方法。

MTB 自身抗原主要可分为 2 种:一种是 MTB 菌体的抗原物质,如脂阿拉伯甘露聚糖(lipoarabinomannan, LAM)是一类存在于分枝杆菌表面的糖脂,作为构成分枝杆菌细胞壁的主要成分,是结核感染过程中重要的免疫反应调节因子,同时也是目前应用最广泛的结核特异性抗原之一^[20],主要原因在于该法检测的标本来源广,在血清、尿液、痰液、脑脊液等标本中通过检测 LAM,对结核病的诊断均获得理想结果,特别是痰和尿标本^[21-23]。Lawn 等^[24]开发出一种酶联免疫吸附试纸以检测尿液标本中 MTB 的特异性成分抗原 TB-LAM,即 TB-LAM 试纸。通过试纸进行的一项描述性研究显示其具有较高的敏感性,适合筛查 CD4 偏低的 HIV 感染患者是否感染 MTB。TB-LAM 试纸在 30 min 内可显示结果,具有操作简单、高效、成本低的优点,适于大范围筛查。另一种 MTB 自身抗原为 MTB 分泌蛋白,是 MTB 在对数生长早、中期分泌并释放于菌体外的一组蛋白,主要游离于培养基或存在于感染细胞的吞噬小体内,可诱发机体保护性细胞免疫应答。目前常用于临床的 MTB 分泌蛋白主要包括 MTB 早期分泌性抗原靶 6(early secretory antigenic target 6, ESAT6)、培养滤液蛋白 10(culture filtrate protein 10, CFP10)、微量转铁蛋白(micro-

transferrinuria, MTF)63、MPT64、Ag85 复合物等。多抗原联合检测可在保持检测方法特异性基础上进一步提高血清诊断学敏感性,竺澎波等^[25]报道多种抗原联合检测的阳性率较痰培养高。多抗原联合检测有望成为今后血清学检测的主要发展方向之一。

机体感染 MTB 后主要依靠细胞免疫抵抗感染,所以研究 MTB 分泌蛋白对预防和诊断结核病具有重要意义。酶联免疫斑点法(enzyme-linked immunosorbent spot, ELISPOT)是在单细胞水平检测分泌抗体或细胞因子的细胞的一种免疫学技术,该方法所使用的特异性分泌蛋白 ESAT6 及 CFP10 由卡介苗菌株及非致病性分枝杆菌基因组均缺乏的 RD1 区 Rv3875 和 Rv3874 编码^[26],因此,不受卡介苗和非 MTB 的影响,在诊断结核潜伏性感染(latent tuberculosis infection, LTBI)较传统结核菌素皮肤试验(Tuberculin skin test, TST)有更高的敏感性和特异性。T 淋巴细胞斑点法对 MTB 感染的检测(T-SPOT test for MTB infection, T-SPOT. TB)在定性的同时还可以定量,Zhang 等^[27]报道在抗结核治疗 1、3、6 个月, T-SPOT. TB 阳性率逐月降低,分别为 94.4%(51/54)、86.4%(19/22)及 61.5%(8/13),监测效果明显。除了外周血单个核细胞,支气管肺泡灌洗液、浆膜腔积液也可提取单个核细胞行 T-SPOT. TB。另一项基于 ESAT6、CFP10 刺激单个核细胞释放干扰素 γ (interferon γ , IFN- γ)的检测方法是 QuantiFERON -TB Gold Test(QFT-G),该法通过刺激外周全血,其分泌的 IFN-1 释放入血,然后收集血浆进行全血酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)。目前,结核病高负担地区的结核病防治难题之一是存在大量 LTBI 患者,美国疾病控制与预防中心(Centers for Disease Control and Prevention, CDC)已将 QFT-G 定为 LTBI 的重要辅助指标以诊断 LTBI,并对其进行选择性预防治疗,从而合理运用资源以及减少患者的负担和痛苦,Brodie 等^[28]对此进行了相关的阐述与研究。MTB 抗原在人体内表达的种类、数量常随个体免疫背景及身体状况的不同而有差异,这仍需进一步改进。

5 结 语

随着分子生物学、免疫学及仪器学等的快速发展,更多新技术被应用于 MTB 感染的诊断。在进行痰涂片及常规培养等的同时,核酸及特异性抗体的快速检测逐渐成为全球,特别是结核高负担地区的重要诊断依据。在今后的研究中,可通过更多特异性抗原的结合使用,进一步提高该方法的准确性,避免假阴性的出现;同时还可结合纳米技术^[29],提高抗体与 MTB 的亲合性,从而提高检测的敏感性与特异性。现阶段使用的检测技术一般为定性或半定量试验,随着电化学方法的飞速发展,可将该方法与结核的诊断技术相结合,为临床诊断提供更加快速、准确、细致的结果,指导临床治疗,从而缓解结核高负担地区的结核诊治压力。

参考文献

- [1] 石俊仕,张慧敏,徐博,等.肺结核病人发现的历史沿革研究[J]. 中国热带医学,2008,8(4):606-608.
- [2] Zignol M, van Gemert W, Falzon D, et al. Surveillance of anti-tuberculosis drug resistance in the world: an updated analysis, 2007-2010[J]. Bull World Health Organ, 2012, 90(2):111-119.
- [3] Steingart KR, Henry M, Ng V, et al. Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review[J]. Lancet Infect Dis, 2006, 6(9):570-581.
- [4] 樊学军,孙敏.结核病实验室诊断技术的比较研究[J]. 中国国境卫生检疫杂志,2005,28(3):160-162.
- [5] Shenai S, Minion J, Vadwai V, et al. Evaluation of light emitting

- diode-based fluorescence microscopy for the detection of mycobacteria in a tuberculosis-endemic region[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2011, 15(4): 483-488.
- [6] 田斌,刘庆华,张才,等. 发光二极管荧光显微镜在基层实验室诊断结核分枝杆菌的应用评价[J]. 实用预防医学, 2012, 19(10): 1448-1451.
- [7] 杨江华,王文杰,何自芳,等. 免疫磁珠捕获法分离抗酸杆菌的实验研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2011, 6(3): 168-169, 156.
- [8] Rodrigues C, Jani J, Shenai S, et al. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against second-line drugs using the Bactec MGIT 960 System[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2008, 12(12): 1449-1455.
- [9] Yin X, Zheng L, Lin L, et al. Commercial MPT64-based tests for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex: a meta-analysis[J]. J Infect, 2013, 67(5): 369-377.
- [10] Martin A, Paasch F, Von Groll A, et al. Thin-layer agar for detection of resistance to rifampicin, ofloxacin and kanamycin in *Mycobacterium tuberculosis* isolates[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2009, 13(10): 1301-1304.
- [11] Ling DI, Flores LL, Riley LW, et al. Commercial nucleic-acid amplification tests for diagnosis of pulmonary tuberculosis in respiratory specimens: meta-analysis and meta-regression[J]. PLoS One, 2008, 3(2): e1536.
- [12] 陈茹,毕英佐,刘志玲,等. 建立液相芯片方法检测鉴别结核分枝杆菌复合群、鸟分枝杆菌与副结核分枝杆菌[J]. 微生物学通报, 2011, 38(6): 908-915.
- [13] Bergval I, Sengstake S, Brankova N, et al. Combined species identification, genotyping, and drug resistance detection of *Mycobacterium tuberculosis* cultures by MLPA on a bead-based array[J]. PLoS One, 2012, 7(8): e43240.
- [14] Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance[J]. N Engl J Med, 2010, 363(11): 1005-1015.
- [15] Vadwai V, Boehme C, Nabeta P, et al. Xpert MTB/RIF: a new pillar in diagnosis of extrapulmonary tuberculosis [J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(7): 2540-2545.
- [16] Theron G, Peter J, van Zyl-Smit R, et al. Evaluation of the xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in a high HIV prevalence setting[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2011, 184(1): 132-140.
- [17] Nicol MP, Workman L, Isaacs W, et al. Accuracy of the xpert MTB/RIF test for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in children admitted to hospital in Cape Town, South Africa: a descriptive study[J]. Lancet Infect Dis, 2011, 11(11): 819-824.
- [18] Cui Z, Wang Y, Fang L, et al. Novel real-time simultaneous amplification and testing method to accurately and rapidly detect *Mycobacterium tuberculosis* complex[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(3): 646-650.
- [19] 崔振玲,沙巍,黄晓辰,等. RNA 恒温扩增技术快速检测痰标本中结核分枝杆菌的研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2011, 34(12): 894-897.
- [20] Flores LL, Steingart KR, Dendukuri N, et al. Systematic review and meta-analysis of antigen detection tests for the diagnosis of tuberculosis[J]. Clin Vaccine Immunol, 2011, 18(10): 1616-1627.
- [21] Sada E, Aguilar D, Torres M, et al. Detection of lipoarabinomannan as a diagnostic test for tuberculosis[J]. J Clin Microbiol, 1992, 30(9): 2415-2418.
- [22] Wallis RS, Pai M, Menzies D, et al. Biomarkers and diagnostics for tuberculosis: progress, needs, and translation into practice[J]. Lancet, 2010, 375(9729): 1920-1937.
- [23] Pereira Arias-Bouda LM, Nguyen LN, Ho LM, et al. Development of antigen detection assay for diagnosis of tuberculosis using sputum samples[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(6): 2278-2283.
- [24] Lawn SD, Kerkhoff AD, Vogt M, et al. Diagnostic accuracy of a low-cost, urine antigen, point-of-care screening assay for HIV-associated pulmonary tuberculosis before antiretroviral therapy: a descriptive study[J]. Lancet Infect Dis, 2012, 12(3): 201-209.
- [25] 竺澎波,陈虹,高鸣. 结核蛋白芯片在肺结核诊断中的应用价值[J]. 实用医学杂志, 2012, 28(15): 2593-2595.
- [26] Harboe M, Oettinger T, Wiker HG, et al. Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG[J]. Infect Immun, 1996, 64(1): 16-22.
- [27] Zhang S, Shao L, Mo L, et al. Evaluation of gamma interferon release assays using *Mycobacterium tuberculosis* antigens for diagnosis of latent and active tuberculosis in *Mycobacterium bovis* BCG-vaccinated populations[J]. Clin Vaccine Immunol, 2010, 17(12): 1985-1990.
- [28] Brodie D, Lederer DJ, Gallardo JS, et al. Use of an interferon-gamma release assay to diagnose latent tuberculosis infection in foreign-born patients[J]. Chest, 2008, 133(4): 869-874.
- [29] Liandris E, Gazouli M, Andreadou M, et al. Detection of pathogenic mycobacteria based on functionalized quantum dots coupled with immunomagnetic separation[J]. PLoS One, 2011, 6(5): e20026.

(收稿日期: 2013-12-08)

(上接第 1144 页)

氏不动杆菌菌血症治疗困难,患者病死率上升^[4]。

目前,采用 K-B 法检测不动杆菌属对替加环素的敏感性不是最佳选择,也无批准折点,本研究参照美国 FDA 的判断标准。K-B 法检测 87 株鲍氏不动杆菌对替加环素的敏感性显示:敏感率为 2.4%,中介率为 40.5%,耐药率为 57.1%。MIC 法与 K-B 法比较,检测结果完全相反, MIC 法的敏感率为 57.1%,而 K-B 法的耐药率为 2.4%。考虑该结果与检测方法、药物自身特性、培养基、菌种(不动杆菌、黏质沙雷菌、肺炎链球菌、化脓性链球菌等易受外界因素影响)、折点判定、结果判读等有关。总之,以 MIC 法的参考结果较 K-B 法具有较好的准确性。

参考文献

- [1] 汪复,朱德妹,胡付品,等. 2008 年中国 CHINET 细菌耐药性监测

[J]. 中国感染与化疗杂志, 2009, 9(5): 321-329.

- [2] 孙谦,周宏伟,胡燕燕,等. 多重耐药鲍曼不动杆菌对替加环素耐药状况分析[J]. 中华检验医学杂志, 2011, 34(4): 358-362.
- [3] 王辉,倪语星,陈民钧,等. 新型甘氨酸环素类抗菌药物替加环素的体外药敏试验操作规程[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(11): 1208-1213.
- [4] Cisneros JM, Reyes MJ, Pachón J, et al. Bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical findings, and prognostic features[J]. Clin Infect Dis, 1996, 22(6): 1026-1032.

(收稿日期: 2014-02-23)