

• 综 述 •

肠结核实验室检查的临床应用进展*

梅 玫 综述, 罗 雁, 刘会领 审校

(天津市海河医院 300350)

关键词: 肠结核; 实验室检查; 临床应用**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.18.031**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2016)18-2587-03

随着人类免疫缺陷病毒感染和免疫抑制剂的使用,结核感染的范围日趋扩大,肠结核(ITB)也日趋频繁,ITB是重要的肺外结核之一,占结核病的1%~3%^[1]。它是由结核分枝杆菌侵袭肠道引起的慢性特异性感染,主要影响回肠和结肠,回肠末端病变最为常见,导致胃肠道症状如腹痛、腹泻、便秘等临床表现。ITB的诊断依据为肠道病变组织中发现结核分枝杆菌、典型的干酪样坏死表现及抗结核治疗有效。由于内镜下取材的局限性及患者合并免疫性疾病的原因,组织病理表现不典型,试验性抗结核治疗耗时较长,临床上ITB的诊断仍依赖于病原学及实验室检查。本文对ITB的实验室检查进展综述如下。

1 病原学检查

1.1 常规细菌学诊断方法: 抗酸染色及结核杆菌培养 结核杆菌涂片是指对黏膜组织进行研磨处理成液体标本,涂在新载玻片上,参照《全国临床检验操作规程》对涂片进行抗酸染色,显微镜下观察。研究报道ITB中抗酸染色阳性率低,程洁等^[2]对67例肠结核患者进行肠镜检查发现结核杆菌9例,阳性率为13.4%,为了提高涂片的阳性率,临床上出现了一些改良涂片方法,如夹层杯法、沉淀集菌法、改良萋-纳染色法。王鼎鑫等^[3]对16例ITB活检组织进行改良萋-纳染色法,12例找到结核分枝杆菌,该方法简单易行,2~3 h出结果。抗酸染色检查临床中常规使用,但阳性率偏低,不同研究阳性率变异较大,且不能区分结核分枝杆菌及非结核分枝杆菌,不能区分是否具有活力的分枝杆菌。虽然特异性较高,仍有研究显示,克隆恩肠病肠黏膜中偶有抗酸染色阳性,后经培养证实为非结核分枝杆菌,因此对结核病的诊断有一定的局限性。

结核杆菌培养是指病变肠黏膜组织液于罗氏培养基上孵育,观察结核杆菌存活情况,可反映结核杆菌的存活能力,且可在培养的基础上进一步做菌种鉴定和药敏试验。其阳性率较单纯抗酸染色高,提高了对ITB的敏感性和特异性。Sekine等^[4]对50例肠结核,138例非结核性肠道疾病患者进行内镜下黏膜活检并行结核杆菌相关检查,肠结核组肠黏膜抗酸染色阳性率为38%,培养为50%,非肠结核组阳性率为0,但该检查耗时较长,平均2~8周。因此结核杆菌培养在ITB快速诊断中价值受到一定限制。

1.2 分子生物学诊断方法

1.2.1 聚合酶链反应(PCR) PCR技术用于检测标本中结核杆菌DNA的含量,采用PCR技术原理和结核杆菌特异性引物,模拟复制过程并进行体外核酸扩增,以确定患者感染结核杆菌。可使很微量的靶DNA在短时间内扩增至106倍以上,是目前检测最灵敏的方法之一。本方法可在1 d内完成,具有快速、高效、特异性强、敏感性高的优点。Epstein等^[5]报道该

技术在活检组织检测敏感性为22%~75%,假阳性率为0%~5%,甘华田等^[6]报道,PCR检测肠黏膜组织结核杆菌DNA阳性率为71.4%。局限性在于只能定性检测,无法提示标本中结核杆菌的具体水平且不能进行药物敏感试验,而且对标本质量、实验室的设备、环境要求较高,若临床操作不规范或设备不完善均可能造成假阳性。

实时荧光定量聚合酶链反应技术(FQ-PCR)对结核检测敏感性及特异性明显提高。FQ-PCR技术融汇了PCR技术的核酸高效扩增、探针技术的高特异性、光谱技术的高敏感性和高精确定量的优点,直接探测PCR过程中荧光信号的变化以获得定量的结果。FQ-PCR技术使PCR扩增、荧光探针杂交及信号检测在单一管内完成,既简化了操作步骤,又消除了非特异性扩增和产物污染,大大减少了假阳性的出现。崔金环等^[7]对233例石蜡包埋组织进行该项检测,发现其在结核组织中的敏感性高达82.95%,远远高于抗酸染色及病理阳性结果,特异度为98.08%,高于单纯PCR技术。顾清等^[8]对36例ITB内镜活检标本进行FQ-PCR检测(其中部分为蜡块固定标本),23例结果阳性,对ITB诊断的敏感性为63.89%,特异性83.33%。FQ-PCR检测TB-DNA是1种快速有效的ITB诊断方法,其定量范围广,检测敏感性高。对活检组织少、病理改变不典型、抗酸染色阴性组织的诊断和鉴别诊断尤有意义,适用于肠结核的早期诊治。

1.2.2 Xpert MTB/RIF 检测 近年出现1种新型分子生物学诊断方法Xpert MTB/RIF检测,它是以半巢式实时荧光定量PCR技术为基础,以结核分枝杆菌利福平耐药决定区rpoB基因为靶基因,设定引物、探针,并进行扩增检测,整个过程只需把处理好的检测标本放入试剂盒中,系统会自动运行并检测标本是否含有结核分枝杆菌及对利福平耐药与否^[9]。Xpert MTB/RIF试验诊断肺结核的敏感性和特异性分别为90%和98%,可较好筛查和排除肺结核,敏感性与结核杆菌快速培养基本一致,且大大缩短诊断时间,因此应用广泛^[10]。

肺外结核中,多项研究显示有较高的临床价值,有学者对761例肺外结核(其中48例为ITB,取病变肠黏膜组织为标本)分析发现,Xpert MTB/RIF诊断肺外结核敏感性高达90.68%,特异性99.62%^[11]。贾留群等^[12]对8篇有关Xpert MTB/RIF试验在肺外结核诊断中应用的研究进行Meta分析,结果显示其对肺外结核汇总的敏感性为0.78(95%CI: 0.75~0.81)、特异性为0.99(95%CI: 0.99~1.00)。通过亚组分析发现其在诊断不同器官的肺外结核中具有不同诊断价值,且差异较大,这可能与肺外结核患者的不同部位标本中包含结核菌数量不同有关。考虑到不同的体液标本或者组织标本在Xpert MTB/RIF试验中阳性率有所差异,Xpert MTB/RIF

* 基金项目:天津市卫生和计划生育委员会科技基金项目(2015KZ047)。

RIF 试验的诊断价值可根据不同类型的肺外结核病或者不同的标本做进一步的研究,有关 Xpert MTB/RIF 试验在 ITB 中应用的研究报道较少,特别是肠黏膜病变组织中的检测。国内未见肠黏膜组织行 Xpert MTB/RIF 检查的相关报道。目前 ITB 病原学诊断还没有理想的检测方法,可以将 Xpert MTB/RIF 检查应用于 ITB 的诊断,并作进一步临床观察。

Xpert MTB/RIF 试验除了用于结核杆菌的感染还可以检测结核杆菌对利福平耐药情况。张治国等^[10] 研究显示,以比例法药敏试验为金标准,Xpert MTB/RIF 检测 MTB 对利福平的敏感性和特异性分别为 89.1%、96.3%,杨蕴华等^[13] 对 1 128 例结核患者研究发现以传统药敏方法为标准,Xpert MTB/RIF 检测利福平耐药性的敏感性 89.5%,特异性为 97.6%,Xpert MTB/RIF 检测可以很好地诊断初诊患者是否对利福平耐药,对抗结核治疗提供参考,理论上对肠结核的早期诊治有一定的辅助作用,但还需要进一步大样本研究。

2 免疫学诊断方法

2.1 结核抗体(TB-Ab)的检测

结核病是 1 种以细胞免疫为主的疾病,阿拉伯甘露聚糖(LAM)是结核杆菌细胞壁的主要组成成分之一,具有较强的免疫原性,特异性较强,可作为结核病抗体检测的特异性抗原。临床中检测结核分枝杆菌特异性膜蛋白抗体(TB-Ab)作为诊断结核的 1 个特异性的病因学检测指标,在结核病的诊断中具有一定的临床价值。其阳性率相对较高,在未对样本进行选择的情况下阳性率仍高达 52.45%^[14]。文献显示,结核患者血清结核抗体敏感性为 71.5%,特异性为 90.5%,其不仅在血清中存在,在病变的胸腔积液、腹腔积液、尿液、脑脊液中阳性率更高,特异性更强,是肺外结核诊断的重要辅助指标^[15]。

本方法简单快捷,对结核病诊断和鉴别诊断起到重要辅助作用。但在免疫功能低下患者中,或处于临床感染初期,即处于感染窗口期患者中可能出现假阴性情况,人自然感染结核后存在一定水平抗体,打过卡介苗或得过结核已经钙化的患者中仍可检测到阳性结果,故存在假阳性情况,不能对结核活动做出判断,故临床上多与其他检测结果联合使用。

2.2 腺苷脱氨酶(ADA)检测

ADA 是 1 种核酸分解的代谢酶类,可特异性催化腺嘌呤核苷产生不可逆脱氨反应,参与前 T 细胞分化为淋巴细胞的过程,与淋巴细胞激活与分化有关,故肺外结核时,相应部位的积液中 ADA 含量更高。研究显示,结核性胸腔积液进行 ADA 检测,其敏感性为 88.7%,特异性为 93.3%,准确性为 90.2%。重症肺结核患者血清 ADA 活性升高,但血液病、肝硬化、SLE、糖尿病肾病,ADA 的活性也升高^[16]。且试验易受溶血等因素的影响,其特异性不强。但胸腔积液、腹腔积液等的 ADA 检测可作为结核性胸膜炎等肺外结核病的辅助诊断指标之一^[17]。因为检测血、积液中的结核菌抗体、ADA 的生化指标简单、经济、快速,一些研究显示将这些指标进行计算,联合能提高疾病诊断的敏感性及特异性。

2.3 T-SPOT 试验

T-SPOT 试验是用 ELISA 从单细胞水平检测细胞因子的 1 种细胞免疫学技术。研究发现,结核杆菌中产生 RD1 编码的培养滤过蛋白 10(CFP-10)及早期分泌的抗原靶点 6(ESAT-6)两种蛋白多肽,为结核菌所特有。T-SPOT 中,结核感染者外周血 T 淋巴细胞被 ESAT-6 和 CFP-10 两种优化的结核分枝杆菌特异性抗原活化后分泌 IFN- γ ,后者与微孔板上 IFN- γ 抗体结合,显色形成色素沉淀斑点,从而诊断结核感染^[18]。健康者及非结核感染者外周血 T 淋巴细胞不会产生 IFN- γ ,理论上而言 T-SPOT 对结核感染应具有一定的特异性,在肠结核的诊断及鉴别诊断中有重要作用。1 篇包

括 12 项研究的 Meta 分析显示,T-SPOT 鉴别 CD、ITB 总的敏感性和特异性分别为 82.8%(95%CI,78.4%~86.6%)和 86.7%(95%CI,83.2%~89.6%)^[19]。雷少妮等^[20] 研究显示,T-SPOT 检测 ITB 时敏感性及特异性分别为 85.7%(12/14)和 93.3%(14/15),有助于与肠道 Crohn 病相鉴别。总之,T-SPOT 试验可提高结核感染诊断效率,尤其适合肠结核的快速诊断及鉴别诊断。

综上所述,目前各项诊断技术在肠结核的诊断中都有其临床价值,单一的检查项目影响因素较多,已有相关研究将以上多项指标联合起来,甚至做成预测模型用于肠结核的诊断,提高疾病的诊断率^[21]。由于肠结核诊断困难,快速而准确的诊断疾病是实验室发展的迫切需求,新的诊断技术的出现是急需的。本文中总结的结核诊断相关技术有些在肠结核的诊断中应用观察较少,有些研究纳入病例数较少,临床中缺少大规模多中心随机对照研究,因此各项检查在肠结核诊治中的详细作用仍需进一步观察总结。

参考文献

- [1] Aston NO. Abdominal tuberculosis[J]. World Journal of Surgery, 1997, 21: 492-499.
- [2] 程洁, 张晓微, 周瑛, 等. 94 例肠结核诊断和治疗的临床分析[J]. 临床肺科杂志, 2012, 17(3): 463-465.
- [3] 王鼎鑫, 张月寒, 樊建平, 等. 内镜下活组织结核杆菌检测对回盲部良性溃疡的诊断价值[J]. 临床荟萃, 2009, 24(15): 1340-1341.
- [4] Sekine K, Nagata N, Shindo T, et al. Combined identifying granuloma and biopsy culture is useful for diagnosing intestinal tuberculosis[J]. Int J Colorectal Dis, 2015, 30(7): 939-945.
- [5] Epstein D, Watermeyer G, Kirsch R. Review article: the diagnosis and management of Crohn's disease in populations with high-risk rates for tuberculosis [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2007, 25(12): 1373-1388.
- [6] 甘华田, 欧阳钦, 步宏, 等. 结核杆菌 DNA 检测在肠结核与克罗恩病鉴别诊断中的价值[J]. 中华消化杂志, 2001, 21(4): 215-218.
- [7] 崔金环, 杨光, 苏锡康, 等. 荧光定量 PCR 技术检测石蜡包埋组织结核杆菌 DNA 的应用评价[J]. 广东医学, 2011, 32(20): 2695-2697.
- [8] 顾清, 欧阳钦, 夏庆杰. FQ-PCR 检测肠黏膜结核杆菌 DNA 对肠结核的诊断价值[J]. 中国实验诊断学, 2009, 13(6): 741-744.
- [9] 杨顺利. Xpert MTB/RIF 检测方法的探讨[J]. 山西医药杂志, 2015, 44(12): 1437-1438.
- [10] 张治国, 欧喜超, 孙倩, 等. 利福平耐药实时荧光定量核酸扩增技术检测痰标本中结核分枝杆菌及其耐药性的研究[J]. 中国防痨杂志, 2013, 35(1): 13-16.
- [11] Singh UB, Pandey P, Mehta G, et al. Genotypic, phenotypic and clinical validation of GeneXpert in Extra-Pulmonary and pulmonary tuberculosis in India[J]. PLoS One, 2016, 11(2): e0149258.
- [12] 贾留群, 龙虹羽, 胡倩婧, 等. Xpert MTB/RIF 试验对肺外结核诊断价值的 Meta 分析[J/CD]. 中华临床医师杂志(电子版), 2013, 7(6): 2587-2591.
- [13] 杨蕴华, 韩中波. Xpert Mtb/RIF 技术在结核病诊断及耐

- 药检测中的应用[J]. 中国实用医药, 2015, 10(7): 195-196.
- [14] 邹自英, 朱冰, 汤雪晴, 等. 结核杆菌的细菌学、分子生物学和免疫学检测方法评价[J]. 四川医学, 2011, 32(5): 756-758.
- [15] 刘倩颖, 王心静, 林明贵. 血清结核杆菌抗体检测在结核病的临床意义[J]. 中国实验诊断学, 2014, 18(7): 1105-1107.
- [16] Van Maaren PJ. Fighting the tuberculosis epidemic in the Western Pacific region: current situation and challenges ahead[J]. Kekkaku, 2010, 85(1): 9-16.
- [17] 李晓月, 安军, 李琦. 痰聚合酶链反应和血清结核抗体检测等指标在菌阴性肺结核诊断中的临床意义[J]. 临床肺科杂志, 2012, 17(3): 543-544.
- [18] Bae W, Park KU, Song EY, et al. Comparison of the sensitivity of QuantiFERON-TB Gold In-Tube and T-SPOT. TB according to patient age[J]. PLoS One, 2016, 11(6): e0156917.
- [19] Xu H, Li Y, Qian JM. A meta-analysis of the accuracy of interferon- γ release assays in differentiating intestinal tuberculosis from Crohn's disease in Asia[J]. Zhonghua Neike Zazhi, 2016, 55(7): 535-540.
- [20] 雷少妮, 刘家云, 梁洁, 等. 结核杆菌 T 细胞斑点试验在克罗恩病与肠结核鉴别诊断中的应用价值[J]. 中华消化杂志, 2011, 31(10): 677-680.
- [21] 刘小伟, 李学锋, 邹益友, 等. Logistic 回归分析对克罗恩病和肠结核鉴别指标的筛选[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(6): 621-627.

(收稿日期: 2016-04-29 修回日期: 2016-07-07)

• 综 述 •

硫嘌呤甲基转移酶检测在临床个体化治疗中的意义和研究进展*

江 雪 综述, 钱思宇, 史丙俊, 刁庆春 审核

(重庆市皮肤病研究所/重庆市中医院/重庆市第一人民医院皮肤科 400011)

关键词: 硫嘌呤甲基转移酶; 精准医疗; 基因检测**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.18.032**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2016)18-2589-03

硫嘌呤甲基转移酶(TPMT)是存在于人体内的 1 种非金属胞质酶,能催化体内芳烃和杂环含巯基化合物上的 S-甲基,这类化合物包括 6-巯基嘌呤(6-MP)、硫唑嘌呤(AZA)和 6-硫鸟嘌呤(6-TG)^[1]。TPMT 活性受多因素影响,导致酶活性基因型和表现型不能完全统一。TPMT 遗传具有单基因共显性遗传特征,目前发现的突变类型超过 35 种,由专门的 TPMT 命名委员会进行命名^[2]。常见类型为: TPMT * 2、TPMT * 3A、TPMT * 3B、TPMT * 3C(占总突变的 95%以上)^[3]。

目前, TPMT 检测作为实验室的常规检测项目被广泛运用。早在 2005 年 FDA 已将给药前的 TPMT 基因型检测列入 AZA/6-MP 的药品说明书中^[4]。在欧洲,硫嘌呤类药物处方前的 TPMT 检测已成为常规临床辅助手段^[5-6]。英国国家药典建议在使用巯基嘌呤类药物前应进行 TPMT 检测。英国的 1 份调查显示, 67% 的英国临床医生会在开出硫唑嘌呤前进行 TPMT 的检测^[7]。在这项检测推行的初期, 皮肤科医生很快地接受了 TPMT 检测, 而胃肠科医生却并没有特别的推荐这项筛查。但在随后的临床实践中, TPMT 检测逐渐受到胃肠科医生重视, 大量临床相关文献都指出 TPMT 监测在炎症肠炎中的重要性。并且 TPMT 检测还作为儿童白血病服用 6-MP 前的强制性检查。

1 TPMT 在临床上的影响

硫嘌呤类药物在临床上主要作为抗癌药用于急性白血病的化疗,或免疫抑制剂用于器官移植,以及风湿病、克隆病、炎症性肠病等疾病的免疫抑制治疗。也作为皮肤科慢性日光性皮炎、天疱疮、类天疱疮等疾病的特殊用药。包括抗肿瘤药物 6-巯基嘌呤和 6-硫鸟嘌呤,和免疫抑制剂硫唑嘌呤,这类药物已知有确切的骨髓抑制作用。

TPMT 催化芳香环巯基复合物上的 S-甲基,是肝外药酶之一,在硫嘌呤类药物的体内代谢中起着关键作用。硫嘌呤类药物在体内有 3 条代谢途径,分别是:(1)黄嘌呤氧化酶(XO)途径,通过黄嘌呤氧化酶催化 6-MP 氧化成尿酸,最终形成尿酸排出体外;(2)次黄嘌呤磷酸核糖转移酶(HPRT)途径,催化初级形式的核苷酸;(3)TPMT 途径,利用 S-腺苷-L 甲硫氨酸(SAM)特异性催化杂环和芳香环巯基的甲基化反应。这 3 条代谢途径是竞争关系, TPMT 活性与 TGNs 产物浓度相关^[8]。TPMT 的缺失使鸟嘌呤核苷酸(TGNs)产物堆积过剩,进入细胞内 DNA 引发 DNA、RNA 损伤,细胞凋亡^[8-9]。因此, TPMT 活性水平与药物疗效及不良反应密切相关。

大多数抗肿瘤药的治疗指数低,药代动力学在患者个体间存在较大的差异,且具有较高毒性。TPMT 具有遗传多态性,活性水平与药物的疗效、不良反应密切相关,且个体代谢差异很大。在临床运用中,给予常规剂量的硫唑嘌呤后,部分 TPMT 缺乏的患者会出现不同程度的骨髓抑制,肝功能损害、感染、药疹甚至机体死亡等不良反应,而部分 TPMT 活性高的患者则会出现疗效低,维持治疗期间会导致疾病复发。即使是中等活性 TPMT(杂合子)在服用标准剂量的 6-MP 时也可能出现骨髓毒性。TPMT 的个体差异严重影响了临床医生对安全、有效治疗方案的制订。

近年来,药物遗传学和药物基因组学研究的迅速发展,使临床医生更加重视个体化用药治疗方案。TPMT 活性和遗传多态性与硫嘌呤类药物药效及不良反应间的密切联系已被证实。TPMT 活性和基因型的检测在国外已逐渐作为硫嘌呤类药物使用前的常规检查,而在国外皮肤科医生中这种检测的利用率更高^[1,10]。

* 基金项目:重庆市中医院院内项目(2209014313)。