

• 综 述 •

结核病诊断技术方法的选择及实验室诊断路径*

阳仕雄¹, 阳咏芳², 付汉东¹综述, 邢志芳^{3△}审校

(武汉科技大学附属孝感医院/孝感市中心医院: 1. 中心实验室; 2. 儿童注射室, 湖北孝感 432000;

3. 复旦大学附属闵行医院输血科, 上海 201199)

关键词: 结核病; 结核分枝杆菌; 实验室诊断

DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2017. 19. 026

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)19-2728-03

结核病是由结核分枝杆菌感染引发的全身多系统疾病, 是一种慢性传染病, 严重危害人类健康^[1]。目前, 结核病仍是发展中国家的主要健康问题, 被评为第一大感染性疾病。世界卫生组织(WHO)估计每年有 960 万例新发结核病病例, 全球每年死亡人数超过 150 万人。控制和及时管理结核病的最大障碍是缺乏快速、准确和具有成本效益的检测方法。在偏远地区, 结核病诊断依赖于临床样品中的抗酸杆菌(AFB)的微观观察或细菌培养分析^[2]。并且, 结核病疫情有增多趋势^[3]。所以急需一种快速、有效的诊断结核病的方法。目前, 结核病的诊断依赖于传统的结核分枝杆菌抗酸染色涂片和细菌培养^[4], 但这两种方法都不能满足临床需求。随着研究的不断深入, 结核病相关的实验室检测方法和诊断路径在不断完善。本文将重点介绍当前检测结核病的方法及其优缺点, 并对结核病的实验室诊断路径进行综述。

1 结核分枝杆菌感染与相关部位

1.1 肺结核 肺结核包括原发性肺结核、血型播散型肺结核和继发性肺结核, 目前诊断主要依靠影像学技术、显微镜诊断技术、结核分枝杆菌培养技术、活动性结核病和潜伏性结核感染的免疫学诊断技术, 以及分子生物学诊断技术^[5]。

1.2 肺外结核 肺外结核包括骨与关节结核、泌尿生殖系结核、肠结核、结核性脑膜炎和其他一些罕见的结核病(如食道结核)等。骨、关节结核在外科中较常见, 此类患者常见下腰疼, 可导致严重的神经损伤^[6], 而诊断脊柱结核主要依靠核磁共振^[7]。

2 结核病诊断检测方法

结核病的快速、准确诊断对于减少疾病发生、实现早期治疗至关重要, 同时, 也需要努力阻止结核分枝杆菌的传播和预防耐药菌株的出现。近几十年来, 出现了各种各样的检测方法, 现总结如下。见表 1。

2.1 传统涂片染色镜检 显微镜下痰涂片检测结核分枝杆菌仍然是确诊肺结核最特异的方法^[8]。涂片染色镜检寻找分枝杆菌的实验室诊断方法简单快捷、成本低, 主要采用萋-尼氏染色液染色镜检, 金胺 O-罗丹明等荧光染色涂片镜检和液基夹层杯法。此 3 种方法确诊肺结核的特异度高, 前两者为 WHO 推荐的检测结核分枝杆菌的方法。但是显微镜诊断技术灵敏度不高, 容易出现假阴性, 且不能区分结核分枝杆菌及非结核分枝杆菌, 且麻风杆菌抗酸染色也为阳性, 干扰对结核病的诊断^[9]。虽然近年来用荧光显微镜检测结核分枝杆菌在一定程度上提高了灵敏度, 如采用发光二极管荧光显微镜, 其使用寿命长, 价格低廉, 不需复杂的光路调节和暗室操作, 但其对光源

的严格要求限制了荧光显微镜的广泛应用。

2.2 结核分枝杆菌培养 分枝杆菌的培养仍然是结核分枝杆菌检测和药敏试验诊断的金标准^[10]。传统的固态培养法, 需要 4~6 周才能检测到结核分枝杆菌的生长, 而且阳性率只有 30%~40%, 特异度差, 各种分枝杆菌均可生长, 要确定是否为结核分枝杆菌, 需结合分枝杆菌菌种鉴定和药敏试验^[11]。液体培养目前主要有罗氏改良培养法, 培养周期约 5 周, 显然满足不了临床快速诊断的需求。液体培养系统, 如 BD 公司推出的 Bactectmmgittm960 全自动分枝杆菌培养、鉴定和药敏系统, 操作简便, 阳性标本检出时间平均为 9 d, 鉴定、药敏试验时间平均为 4 d, 阳性标本检出率比传统固体培养提高 10%左右。近年来, 最新技术主要有分枝杆菌生长指示管法和 TK SLC-L 结核分枝杆菌快速培养系统, 前者需 8 d 检测出结果, 可对链霉素、异烟肼、利福平和乙胺丁醇等药物进行药敏鉴定, 后者可将时间缩短至 4 d 左右, 且污染的风险较小。但是, 总的来说结核分枝杆菌培养时间长, 而且阳性率低, 不能满足临床快速诊断的需求。

2.3 体外释放酶联免疫法(TB-IGRA) TB-IGRA 是目前结核感染的主要诊断方法。该方法利用分枝杆菌特异蛋白质的多肽抗原^[12-13]。分枝杆菌特异蛋白质包括 ESAT-6、CFP-10 和 TB7.7(p4), 所有的 BCG 菌株及绝大部分的非结核分枝杆菌(牛分枝杆菌、结核分枝杆菌和麻风杆菌)不含有这 3 种蛋白质。分枝杆菌特异蛋白质的多肽抗原能刺激感染结核分枝杆菌者的 T 细胞产生干扰素 γ (IFN- γ)的反应, 它是衡量特异度抗原介导的细胞免疫反应强度, 通过结核分枝杆菌特异度重组抗原刺激结核分枝杆菌感染者特异度 T 淋巴细胞, 并使其增殖, 释放 IFN- γ , 从而判断其是否具有针对结核分枝杆菌特异度的 T 细胞免疫反应, 即结核感染 T 细胞检测。Yu 等^[14]详细分析了 IFN- γ 释放实验、抗酸染色及结核菌素试验(PPD)3 种检测方法的灵敏度和特异度, 灵敏度分别为 89.41%、63.53%和 72.94%, 特异度分别为 91.43%、100.0%和 62.86%。IFN- γ 释放实验诊断肺结核的灵敏度和特异度明显高于 PPD, 但此法有以下不足: (1)结核感染(潜伏感染或活动感染)的辅助诊断方法, 灵敏度不高, 其结果不能代替痰涂片、培养或影像学等其他较为经典的结核分枝杆菌感染的诊断方法, 亦无法作为临床诊断的唯一证据应用于临床。 (2)有出假阴性结果的可能。标本的不正确处理, 如剧烈操作导致细胞受损, 或受试者本身免疫系统功能缺陷, 如接受免疫抑制治疗或罹患艾滋病, 均可导致假阴性结果。 (3)理论上, 每位受试者都能对非特异性刺激抗原, 如植物血凝素(PHA)产生反应。 (4)

* 基金项目: 上海市卫生和计划生育委员会青年项目(20154Y0141); 上海市闵行区科委基金资助项目(2016MHZ01)。

△ 通信作者, E-mail: xzfisme@163. com。

TB-IGRA 反应阳性也可能因罕见分枝杆菌感染所致。(5)对标本要求较高,需要采集新鲜全血。(6)不易区分活动性结核病与潜伏性结核感染。(7)无法预测潜伏性感染者的活动风险。

2.4 分子生物学技术 核酸检测结核分枝杆菌是对结核分枝杆菌特异的核酸序列(DNA 或 RNA)进行检测,阳性结果提示标本有结核分枝杆菌的存在,在排除核酸污染的情况下可确定标本中存在结核分枝杆菌。针对结核分枝杆菌检测的目的基因片段较常采用的有 16SrRNA、IS6110、MBP64、rpoB、hsp65 等。目前主要采用的检测技术包括传统实时荧光定量 PCR 技术、半巢氏全自动实时荧光定量 PCR 技术、环介导等温扩增技术、实时荧光核酸恒温扩增技术、交叉引物恒温扩增技术和基因探针检测等。分子生物学技术的最新代表为 Xpert 技术,可在 2 h 内直接检测患者新鲜痰液或冻存痰液标本是否存在结核分枝杆菌及对利福平的耐药性,人工操作较少。Xpert MTB/RIF 已成为多个国家疑似结核分枝杆菌感染检测的初筛方法^[15-17]。

结核分枝杆菌核酸检测可采用痰液、血液、胸膜积液等临床标本,能在 3~6 h 内报告结果,具有较高的特异度,对于涂片阳性标本的检测具有较高的灵敏度,但对于涂片阴性标本的

灵敏度不佳。同时,该检测方法对实验室设备和检验人员的能力有一定要求,且针对 DNA 的检测不能区分结核分枝杆菌存活与否^[18-19]。

2.5 影像学技术 胸片检查目前仍旧被 WHO 推荐为疑似结核感染的筛查方法^[20]。胸片检查能显示人体组织的细微结构,显示透视所不易发现的病变。此外,所获得的影像学资料可以永久保存以利于复查时对比。由于肺部含有大量空气形成自然对比,所拍摄的胸片影像信息丰富,清晰度高,尤其是高千伏摄影(胸部摄影电压>125 kV)。因此,胸部 X 线摄影是诊断肺结核病的一种常用方法,而且费用低,特别适用于低收入人群和条件受限制的地区^[21]。随着医学技术的发展,影像学技术诊断结核病也快速发展,特别是数字化 X 线摄影的出现,有研究者开发出了一套 CAD4TB 系统,此系统为全自动的检测系统,主要检测方式是对胸片图像中的可疑病灶进行扫描,如肺部阴影、肺部畸变和空洞等,然后与系统中大数据库图像进行对比和计算,判断是否感染结核分枝杆菌^[22]。它的主要优点是能对图像自动分析,1 min 内即可得出结果;与人工阅片相比,判断结果没有明显差异;可移动进行检查;对操作人员技术要求不高,可减少人工成本。

表 1 结核分枝杆菌检测方法的优点和缺点

方法	优点	缺点
涂片染色镜检	特异度最高,操作简单快捷,成本低。荧光显微镜发光二极管使用寿命长,价格低,不需要复杂的光路调节和暗室操作。	灵敏度不高,容易出现假阴性。不能区分结核分枝杆菌与非结核分枝杆菌,不能区分活菌和死菌,麻风杆菌可干扰抗酸染色诊断结果。荧光显微镜对光源有严格要求,易损坏,耗电量。肺外结核患者取样困难。
结核分枝杆菌培养	结核分枝杆菌检测和药敏试验诊断“金标准”;固体培养污染少,易于进行菌落形态观察;液体培养菌体与培养基充分接触,生长迅速。	培养时间过长(2~6 周),阳性率低,重复性尚差,不能满足临床需求。缺陷的活菌无法培养。肺外结核患者取样困难。易受到污染。
TB-IGRA	不受卡介苗及其他常见致病性非结核分枝杆菌的干扰 ^[23] 。为体外实验,安全,速度较快(1 d);对肺外结核及涂片阴性患者诊断优势突出。能较好地临床服务,简便、快捷,特异度和灵敏度均较高,特异度高达 97%~100% ^[24] ,是临床应用较广泛的结核病重要的辅助检查手段之一。	只是辅助诊断方法。存在出现假阴性结果的可能。对标本要求高,需要新鲜全血标本,标本如剧烈震荡,细胞易受损,影响检测结果。易受免疫系统功能影响。易发生交叉反应,不易区分活动性结核病与潜伏性结核感染,无法预测潜伏性感染者的活动风险 ^[25] 。
分子生物学技术	速度快,特异度高,对涂片阳性标本检测有较高的灵敏度。	目前仍无统一的检测方法。提取 DNA 不足可导致灵敏度降低。成本高且操作复杂。对实验条件及操作人员技术水平要求高。对 DNA 的检测不能区分结核分枝杆菌存活与否。
影像学技术	WHO 推荐筛查方法。可用于任何部位,而且能显示人体细微的结构,能发现透视不易显示的病变。影像学资料可以永久保存,获取的信息量大,清晰度高,费用低。	有放射性,对身体有伤害。不易发现早期病变。属非特异性检测,单独应用于结核诊断会导致阳性预测值偏低。个体差异大。结果判断受主观因素影响较大。

3 结核病的诊断路径

结核病的诊断路径参照原卫生部《肺结核门诊诊疗规范》^[26]。(1)对具有结核中毒症状(低热、乏力、盗汗等)或伴呼吸道症状者(咳嗽、咳痰 2 周以上,或伴咯血),或通过健康体检发现的肺部阴影疑似肺结核者,需进行痰抗酸杆菌涂片镜检 3 次;痰分枝杆菌培养及菌种鉴定;胸片;必要时行肺 CT 检查。(2)根据病史、检查结果可分为疑似病例、临床病例和确诊病例。(3)具有痰菌阳性等上述“金标准”者立即可诊断为确诊病例;在痰涂片阴性(3 次)情况下,胸部 X 线片见活动性肺结核相符病变,如咳嗽、TB-IGRA 阳性、PPD 强阳性、结核抗体阳性、证实有肺外结核和经过诊断性治疗等,可诊断为临床病例;

具体实验室的诊断路径如下:当患者具有结核中毒症状,如低热、乏力、盗汗、伴呼吸道症状者(咳嗽、咳痰 2 周以上或伴血),可对患者进行涂片抗酸染色镜检检查,如果检测阳性,则可进行核物质检测,然后针对检测结果进行药敏试验;如果检测阴性,可收集痰液进行液体培养检查,细菌培养再发现是阳性,可进行痰结核分枝杆菌定量 PCR 或免疫学试验再次定位感染类型,进一步进行药敏试验;细菌培养结果阴性,则可结合患者症状和其他检测手段,确定患者无结核分枝杆菌感染。

4 结 论

结核分枝杆菌感染严重影响人们的正常生活,而且会产生严重后果。虽然早在 1882 年德国细菌学家柯赫就已证明结核

分枝杆菌是结核病的病原菌,但研究发展至今,结核病疫情仍不容乐观,仍然存在感染率高、耐药率高及结核病发现率低的现象。我国政府历来高度重视结核病防治工作,《全国结核病防治规划(2011—2015)》鼓励应用新技术、新方法,提高诊断水平,要求有针对性地开展对结核病密切接触者、艾滋病病毒感染者、羁押人群等高危人群以及老年人、学生、流动人口等重点人群的结核病筛查工作,尽早发现结核病患者。

近年来,随着抗菌药物的广泛应用,出现了耐药肺结核和广泛耐药肺结核的流行和传播。今后的治疗中需要更加重视耐药的质控分析和地方传染病流行病学研究,减少耐药的发生。同时,需要不断统计、分析大数据,寻求新的快速、准确和有效的方法,早发现、早预防和早治疗。

参考文献

- [1] Jie L, Jun L, Li J, et al. Genotypic diversity of mycobacterium tuberculosis clinical isolates in the multiethnic area of the xinjiang uyghur autonomous region in china[J]. Biomed Res Int, 2017, 2017:3179535.
- [2] Singh A, Kumar Gupta A, Gopinath K, et al. Evaluation of 5 Novel protein biomarkers for the rapid diagnosis of pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis: preliminary results[J]. Sci Rep, 2017, 7:44121.
- [3] Schito M, Hanna D, Zumla A. Tuberculosis eradication versus control[J]. Int J Infect Dis, 2017, 56:10-13.
- [4] 杨永辉,朱桂云,陈宁. 结核分枝杆菌分子病理学诊断技术进展[J]. 临床荟萃, 2016, 31(10):1063-1066.
- [5] 王森,张文宏. 结核病诊断技术新进展[J]. 微生物与感染, 2016, 11(3):188-192.
- [6] 姚晓伟,董昭良,贾晨光,等. 脊柱结核合并神经损伤患者围术期评估及并发症防治策略[J]. 临床误诊误治, 2017, 30(1):10-13.
- [7] Madhok R, Sachdeva P. Evaluation of apparent diffusion coefficient values in spinal tuberculosis by MRI[J]. J Clin Diagn Res, 2016, 10(8):19-23.
- [8] World Health Organization. Fluorescent light-emitting diode (LED) microscopy for diagnosis of tuberculosis: Policy statement[M/OL]. Geneva: World Health Organization, 2011: 12-15. <http://www.who.int/tb/publications/2011/led-microscopy-diagnosis-9789241501613/en>.
- [9] Liu C, Zhao Z, Fan J, et al. Quantification of circulating Mycobacterium tuberculosis antigen peptides allows rapid diagnosis of active disease and treatment monitoring[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, 114(15):3969-3974.
- [10] Qiftci IH, Karakece E. Comparative evaluation of TK SLC-L, a rapid Liquid mycobacterial culture medium, with the MGIT system[J]. BMC Infect Dis, 2014, 14:130.
- [11] 张洁,邢青,易俊莉,等. 传统培养法与 PCR-荧光探针法鉴定分枝杆菌的对比研究[J]. 中国防痨杂志, 2015, 37(3):291-294.
- [12] 汪金云,周东枝,徐亚丽. 体外释放酶免疫技术检测结核分枝杆菌的临床应用[J]. 现代实用医学, 2016, 28(1):32-33.
- [13] Abate G, Spencer CT, Hamzabegovic F, et al. Mycobacterium-specific $\gamma\delta$ T cells mediate both pathogen-inhibitory and cD40 ligand-dependent antigen presentation effects important for tuberculosis immunity[J]. Infect Immun, 2015, 84(2):580-589.
- [14] Yu SF, Wang XZ. Diagnostic value of T-SPOT in tuberculosis[J]. J Clin Pulm Med, 2015, 20(7):1237-1240.
- [15] 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.
- [16] Steingart KR, Sohn H, Schiller I, et al. Xpert[®] MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2014, 17(1):9593.
- [17] World Health Organization. Automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance. Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary TB in adults and children: policy update [M]. Geneva: World Health Organization, 2013:10-17.
- [18] Reed JL, Walker ZJ, Basu D, et al. Highly sensitive sequence specific qPCR detection of Mycobacterium tuberculosis complex in respiratory specimens[J]. Tuberculosis (Edinb), 2016, 101:114-124.
- [19] 欧喜超,夏辉,李强,等. 快速核酸提取环介导等温扩增检测技术在肺结核诊断中的应用评价[J]. 中国防痨杂志, 2016, 38(5):393-397.
- [20] Breuninger M, van Ginneken B, Philipsen RH, et al. Diagnostic accuracy of computer-aided detection of pulmonary tuberculosis in chest radiographs: a validation study from sub-Saharan Africa[J]. PLoS One, 2014, 9(9):e106381.
- [21] Maduskar P, Muyoyeta M, Ayles H, et al. Detection of tuberculosis using digital chest radiography: automated reading vs. interpretation by clinical officers[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2013, 17(12):1613-1620.
- [22] Philipsen RH, Sanchez CI, Maduskar P, et al. Automated chest-radiography as a triage for Xpert testing in resource-constrained settings: a prospective study of diagnostic accuracy and costs[J]. Sci Rep, 2015, 5:12215.
- [23] Arenas MM, Hidalgo-Tenorio C, Jimenez-Gamiz P, et al. Diagnosis of latent tuberculosis in patients with systemic lupus erythematosus: T. SPOT. TB versus tuberculin skin test[J]. Biomed Res Int, 2014, 2014:291031.
- [24] Marino A, Chiappini E, Cimaz R, et al. Prebiologic therapy tuberculosis screening experience in a pediatric rheumatology center: TST and IGRA are both necessary[J]. Pediatr Infect Dis J, 2017, 36(4):440-441.
- [25] Hadizadeh TA, Yari S, Ghanei M, et al. T cell cytokine responses in peripheral blood mononuclear cells from patients with multidrug-resistant tuberculosis following stimulation with proteins purified from Mycobacterium tuberculosis MDR clinical isolates[J]. Int J Mycobacteriol, 2016, 5 (Suppl 1): S132-133.
- [26] 中华人民共和国卫生部. 肺结核门临床诊疗规范(2012年版)[J/CD]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2013, 5(3):73-75.