

[30] Gomez CJ, Jabbar M, Saini N, et al. Severe hypoglycemia secondary to methimazole-induced insulin autoimmune syndrome in a 16 year old African-American male[J]. *Pediatr Diabetes*, 2012, 13(8):652-655.

[31] Qing Y, Zhou JG, Yuan G. Systemic lupus erythematosus presenting as hypoglycaemia with insulin receptor antibodies and insulin autoantibodies[J]. *Lupus*, 2009, 18(5):457-459.

[32] Segal T, Webb EA, Viner R, et al. Severe insulin resistance sec-

ondary to insulin antibodies; successful treatment with the immunosuppressant MMF[J]. *Pediatr Diabetes*, 2008, 9(3, 1):250-254.

[33] Greenfield JR, Tuthill A, Soos MA, et al. Severe insulin resistance due to anti-insulin antibodies; response to plasma exchange and immunosuppressive therapy[J]. *Diabet Med*, 2009, 26(1):79-82.

(收稿日期:2014-02-18)

• 综 述 •

## 儿童结核病的实验室检测进展

郭倩综述,朱朝敏<sup>△</sup>审校

(重庆医科大学附属儿童医院感染消化科,重庆 400014)

**关键词:**儿童; 结核分枝杆菌; 实验室检测

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2014.12.034

**文献标识码:**A

**文章编号:**1673-4130(2014)12-1602-03

在新诊结核病患者中,儿童患者占有较高比例,且多数生活在亚洲和非洲<sup>[1-2]</sup>,儿童结核病临床表现多样,使儿童结核病的诊断十分困难。而早期诊断和治疗,对儿童结核病的预后有着重要的意义,所以,人们一直在努力探索新的实验室检测方法用来快速、准确、方便地检测结核分枝杆菌。本文就结核分枝杆菌的细菌学检测、结核菌素皮肤试验(TST)、 $\gamma$ 干扰素释放试验(IGRA)、分子生物学检测的研究进展作一综述。

### 1 细菌学检测

抗酸染色镜检法和结核菌培养法是最传统的检测方法,但仍然是诊断结核病的金标准。由于儿童痰液标本难以收集、儿童结核病相对于成人排菌量低等原因,儿童结核病的结核分枝杆菌检出率低。幼儿往往不能自行咳出痰液,常将痰液咽下,所以采用清晨空腹抽取胃液作为标本,对于疑诊肺结核患儿,应连续取样 3 d 以提高检出率<sup>[3-4]</sup>。临床上还可用脑脊液、浆膜腔积液等体液本来检测结核分枝杆菌<sup>[5]</sup>,同时也用多种方法来获取含菌标本,其中,诱导痰(IS)用于儿童痰液标本的取材比较方便,研究证实诱导痰方法用于儿童是安全有效的,甚至 1 月龄的婴儿,相比清晨胃液可以提高 4.3% 的检出率<sup>[6-7]</sup>。纤维支气管镜在诊断儿童肺结核上的价值存在争议,曾有报道显示纤支镜灌洗液的培养阳性率低于连续 3 d 清晨抽取胃液。细菌性检测包括以下方法<sup>[8]</sup>。

#### 1.1 直接涂片法

**1.1.1 抗酸染色法** 最常用的萋尼氏染色(Z-N)法为经典方法,现在实验室广泛应用,方便、经济、快捷、特异性高,但敏感性低,无法鉴别死菌与活菌,无法鉴别结核分枝杆菌与非结核分枝杆菌,并且需要标本中抗酸杆菌的数量大于 10 000/mL。

**1.1.2 荧光染色法** 包括金胺“O”染色法和罗丹明 B 染色(SRB)法。与萋尼氏染色相比荧光染色法可提高镜检率,而且镜检所需时间也明显缩短,还能鉴别是否为活菌<sup>[9]</sup>。不足之处是荧光法成本较高,限制了其在基层的使用<sup>[10-11]</sup>。

#### 1.2 结核菌培养法

**1.2.1 改良罗氏(LJ)培养基** 是长期以来广泛使用的传统的结核菌固体培养基,含有促进结核分枝杆菌生长的甘油。该法经济、方便,但培养周期长,需要 4~8 周。

**1.2.2 BACTEC MGIT 960 液体培养基**作为一种新的细菌学检测方法,比固体培养基更灵敏、更快。其中,在 BACTEC 460 基础上发展起来的 BACTEC MGIT 960,是美国 BD 公司

生产的新一代分枝杆菌自动培养及药敏系统,已获得美国 FDA 的认证,其用于二线药物的敏感性诊断也被 WHO 认可。1 项多中心的研究显示,MGIT 960 对临床标本中的结核分枝杆菌进行直接药敏试验,需 6~10 d<sup>[12]</sup>,但实验所需的培养基、营养添加剂、杂菌抑制剂依赖进口,价格昂贵,需要专用的大型培养仪,存在一定的污染率<sup>[13]</sup>,以上均限制了在基层结核控制机构的应用。

**1.3 噬菌体生物扩增(PhaB)法** 是间接检测标本中结核分枝杆菌活菌的一种快速诊断技术。1997 年由 Wilson 等<sup>[14]</sup>建立,并用于利福平和异烟肼的耐药性测定。PhaB 法的敏感度和准确度均明显高于传统的罗氏培养法,在 2 d 内可得结果<sup>[15]</sup>,4 d 即可获得耐药性测定结果,而且只检测活的结核分枝杆菌,无需特殊的仪器设备,操作简单,非常适合基层推广使用。Minion 等<sup>[16]</sup>报道 PhaB 法诊断结核病的灵敏度为 81%~100%,特异度为 73%~100%。但该方法用于儿童时仍受小儿结核的带菌量少的影 响,细菌学检测方法不易检出。

#### 2 TST

结核菌素(PPD)是将结核分枝杆菌经培养、杀菌、过滤除去菌体后纯化的纯蛋白衍生物,感染过结核分枝杆菌的抗体再次接触到结核菌素中的抗原物质时发生的迟发型超敏反应。体内活化的 T 细胞聚集在注射局部并释放淋巴因子,使局部血管舒张、水肿、纤维素沉积,并使其他炎症细胞聚集,从而出现硬结。以皮肤注射局部硬结的大小作为判断指标。现世界上普遍的使用的有美国研制的 PPD-S 和丹麦研制的 PPD RT23。我国使用从卡介苗制成的卡介苗纯蛋白衍生物(HCG-PPD)和从人型结核杆菌制成的结核菌纯蛋白衍生物(TB-PPD),均采用 0.1 mL(5 TU)皮内注射,在注射后 48~72 h 通过测量注射处皮下结节的直径大小来判断试验结果。硬结平均直径 5~9 mm 为阳性反应(+),10~19 mm 为(++), $\geq 20$  mm 为(+++),如有双圈反应或水泡、淋巴管炎则数(++++)<sup>[5]</sup>。

而 TST 易出现假阳性和假阴性。除了对结果的判读错误外,WHO 认为假阴性包括以下情况:结核菌素失效、HIV 感染、病毒感染(如麻疹、水痘)、细菌感染(如伤寒、麻风病、百日咳)、接种活病毒疫苗(6 周内)、免疫抑制药物(例如皮质类固醇)、营养不良、低蛋白状态、新生儿患者、原发性免疫缺陷、淋巴组织疾病(如霍奇金病、淋巴瘤、白血病、结节病)、严重的结

作者简介:郭倩,女,硕士研究生在读,主要从事感染性疾病研究。

<sup>△</sup> 通讯作者,E-mail:zhuchaomin2013@163.com.

核病。这可能与这类患儿的年龄、体内的 CD4 细胞数量减少有关<sup>[17]</sup>。但一些学者认为患儿的营养状态并不影响 TST 的结果, Píneiro 等<sup>[18]</sup>采用 McLaren 分类方法对 1 074 名儿童进行营养分级, 结果证实营养状况与 TST 结果无相关性, 而 Píneiro 等<sup>[19]</sup>另一项研究表明寄生虫感染不影响 TST 结果。WTO 认为假阳性包括以下情况: 接种卡介苗、感染非结核分枝杆菌<sup>[17]</sup>。另一研究认为, 对在不同的年龄阶段接种卡介苗的儿童进行比较, 其中在婴儿期接种对 TST 结果的影响是最小的, 尤其是在儿童 10 岁之后, 婴儿期接种的卡介苗对 TST 结果的影响更是微小<sup>[20]</sup>。而在婴儿期之后接种卡介苗则常常会对孩子的 TST 结果产生较大的影响<sup>[21]</sup>。

结合上述情况, 不同国家和组织根据当地的卡介苗接种情况、高危因素等制订了不同的儿童 TST 阳性标准。其中, WTO 指南对阳性的定义为: 用 0.1 mL PPD 皮内注射(含 5 TU PPD-S 或者 2 TU PPD RT23)后观察结果, 在 HIV 阳性或严重营养不良(有临床证据)的儿童, PPD 直径大于或等于 5 cm 即为阳性; 其余儿童 PPD 直径大于或等于 10 cm 为阳性(无论是否接种卡介苗)<sup>[17]</sup>。我国对阳性的定义与 WHO 基本相同: 在原发或继发免疫功能低下、营养不良、重症结核病的儿童, PPD 直径大于或等于 5 cm, 而其他一般人群 PPD 直径大于或等于 10 cm, 同时能够除外卡介苗接种后的免疫反应, 是临床诊断儿童肺结核的重要依据<sup>[5]</sup>。

### 3 IGRA

结核感染后, 患者体内长期存在抗原特异性的记忆 T 细胞, 当再次遇到结核特异性抗原(常用抗原为 ESAT-6 和 CFP10)刺激时, 记忆 T 细胞能迅速活化增值为效应 T 细胞, 释放干扰素, 整个过程类似于 TST 在体外完成。不同的是, 卡介苗株以及非结核杆菌不具有编码 ESAT-6、CFP10 的 RD1 区基因<sup>[22]</sup>, 所以 IGRA 与 TST 相比, 能避免卡介苗和非结核杆菌的影响。所以在接种过卡介苗的人群中, IGRA 比 TST 的特异性高。并且 IGRA 可在 24 h 内出结果, 可大大减少了诊断时间。但 IGRA 同样不能区分潜伏结核感染和活动性结核病<sup>[23]</sup>。

目前有澳大利亚 Cellestis 公司生产的 QuantiFERON-TB Gold In-Tube (QFT-GIT) 和英国 Immunotec 公司生产的 T SPOT-TB 两种商业化的检测试剂盒。前者使用 ELISA 来检测  $\gamma$  干扰素的量, 后者使用酶联免疫斑点技术(ELISPOT)检测。美国 FDA 已批准两种试剂盒用于检测临床标本。Detjen 等<sup>[24]</sup>研究显示: QFT-IT 和 T SPOT-TB 的特异度分别为 100% 和 98%, 敏感度均为 93%; 而 TST 的特异度为 58%, 敏感度为 100%。此外, 1 项 Meta 分析显示, QFT-IT 和 T SPOT-TB 的敏感度为 81% 和 88%, 而联合 TST 检测时, 敏感度升至 84% 和 89%, 特异度分别为 99% 和 86% (TST 的特异度为 70%), 故 IGRA 较 TST 有更高的特异性<sup>[25]</sup>。但以上研究均是在结核感染率比较低的发达国家进行的, 这些国家已经把 IGRA 纳入结核诊断指南<sup>[26]</sup>。然而, 中低收入国家比高收入国家的结核感染率高, 在结核及 HIV 发病率高的地区 IGRA 的敏感性较低, 所以 WHO 现不支持 IGRA 在中低收入国家用于常规检测结核感染<sup>[27]</sup>。在儿童结核病检测方面, 关于 IGRA 的研究很少, 尚没有与儿童年龄相关性的研究, 特别是在婴幼儿和有免疫缺陷的儿童的诊断价值有待进一步研究。另一项对 237 名儿童的研究显示, IGRA 对年幼的儿童及有免疫缺陷者的测试结果并不确定<sup>[28]</sup>。此外, IGRA 对成本和技术的要求高, 也限制了其在发展中国家的广泛应用, 现在尚不推荐用 IGRA 替代 TST 作为常规检测方法<sup>[29]</sup>。

### 4 分子生物学检测

PCR 技术在儿童结核培养阳性的病例中阳性率为 95%~

100%, 而在结核培养阴性的病例中阳性率 50%~60%。但儿童痰液标本中含菌量少这一特点也限制了 PCR 的阳性率, 同样 PCR 技术不能分辨出活菌和死菌, 在有效的抗结核治疗后仍会持续阳性<sup>[30]</sup>。

**4.1 实时荧光定量技术** 这项技术越来越多用于临床, 不仅有低的交叉污染, 而且可以用于利福平耐药的鉴定。研究最多的 Xpert MTB/RIF 检测试剂盒是采用荧光定量 PCR 技术对患者的新鲜痰液进行结核杆菌的检测和结核分枝杆菌的耐药性检测。该试剂盒为自动操作, 检测时间小于 2 h。在 1 项成人的大型研究中, Xpert MTB/RIF 检测利福平耐药的敏感度为 98%<sup>[31]</sup>。这项技术用于儿童的敏感度较成人低, 但较细菌涂片和培养相比仍有较高的阳性率<sup>[32]</sup>。Rachow 等<sup>[33]</sup>对 164 例疑似结核儿童进行研究, 结果显示 Xpert 技术显示出与结核菌培养相似的准确度, 并且 HIV 感染不会影响到 Xpert 诊断的准确度。

**4.2 线性探针检测(LiPAs)** 作为另一种 PCR 技术, 可以同时检测结核感染和耐药扩增片段, 此方法可同时检测结核杆菌与利福平、异烟肼、链霉素、乙胺丁醇的耐药相关的 *ropB*、*katG*、*rpsL*、*rrs*、*embB* 基因。WHO 推荐 LiPAs 可在结核高负担国家作为一项快速诊断耐多药结核的检测<sup>[34]</sup>。

### 5 小 结

为了更快、更准确地诊断儿童结核感染, 人们一方面对传统的诊断方法进一步的解读和优化, 另一反面也在努力探索新的诊断手段, 取得了一定的成效。但由于儿童结核病的体液和组织中带菌量少, 诊断起来仍然十分困难。很多研究表明多种方法联合应用可提高检测的阳性率, 但会造成诊断所需费用的增加。我国作为一个结核病高负担的发展中国家, 找到一种快速、准确、经济、方便的诊断方法十分必要。

### 参考文献

- [1] Nelson LJ, Wells CD. Global epidemiology of childhood tuberculosis[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2004, 8(5): 636-647.
- [2] World Health Organization. Global tuberculosis control: WHO report 2010[M]. World Health Organization, 2010.
- [3] Shingadia D, Novelli V. Diagnosis and treatment of tuberculosis in children[J]. Lancet Infect Dis, 2003, 3(10): 624-632.
- [4] Marais BJ, Gie RP, Hesselning AC, et al. A refined symptom-based approach to diagnose pulmonary tuberculosis in children[J]. Pediatrics, 2006, 118(5): e1350-e1359.
- [5] 江载芳, 赵顺英. 儿童肺结核的临床诊断标准和治疗方案(试行)[J]. 中华儿科杂志, 2006, 44(4): 249-251.
- [6] Zar H, Tannenbaum E, Apolles P, et al. Sputum induction for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in infants and young children in an urban setting in South Africa[J]. Arch Dis Child, 2000, 82(4): 305-308.
- [7] Jiménez MR, Martín SG, Tato LMP, et al. Induced sputum versus gastric lavage for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in children[J]. BMC Infect Dis, 2013, 13(1): 1-6.
- [8] Abadco DL, Steiner P. Gastric lavage is better than bronchoalveolar lavage for isolation of Mycobacterium tuberculosis in childhood pulmonary tuberculosis[J]. Paediatr Infect Dis J, 1993, 11(9): 735-738.
- [9] Ba F, Rieder H. A comparison of fluorescence microscopy with the Ziehl-Neelsen technique in the examination of sputum for acid-fast bacilli[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 1999, 3(12): 1101-1105.
- [10] Bonnet M, Gagnidze L, Githui W, et al. Performance of LED-Based fluorescence microscopy to diagnose tuberculosis in a peripheral health centre in Nairobi[J]. PLoS One, 2011, 6(2): e17214.

[11] Marais BJ, Brittle W, Painczyk K, et al. Use of light-emitting diode fluorescence microscopy to detect acid-fast bacilli in sputum [J]. Clin Infect Dis, 2008, 47(2): 203-207.

[12] Aziz MA, Wright A. Epidemiology of anti-tuberculosis drug resistance (the Global Project on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance): an updated analysis [J]. Lancet, 2006, 368(9553): 2142-2154.

[13] Siddiqi S, Ahmed A, Asif S, et al. Direct drug susceptibility testing of mycobacterium tuberculosis for rapid detection of multidrug resistance using the bactec MGIT 960 system: a multicenter study [J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(2): 435-440.

[14] Wilson SM, Al-Suwaidi Z, McNerney R, et al. Evaluation of a new rapid bacteriophage-based method for the drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis [J]. Nat Med, 1997, 3(4): 465-468.

[15] Zhu CT, Cui ZL, Zheng RJ, et al. A multi-center study to evaluate the performance of phage amplified biologically assay for detecting TB in sputum in the pulmonary TB patients [J]. PLoS One, 2011, 6(9): e24435.

[16] Minion J, Pai M. Bacteriophage assays for rifampicin resistance detection in Mycobacterium tuberculosis: updated meta-analysis [J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2010, 14(8): 941-951.

[17] World Health Organization. Guidance for national tuberculosis programmes on the management of tuberculosis in children. Chapter 1: introduction and diagnosis of tuberculosis in children [J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2006, 10(10): 1091-1097.

[18] Piñero R, Cilleruelo MJ, García-Hortelano M, et al. Effect of nutritional status on tuberculin skin testing [J]. Indian J Pediatr, 2013, 80(4): 271-275.

[19] Piñero R, Mellado MJ, Cilleruelo MJ, et al. Tuberculin skin test in bacille Calmette-Guérin-vaccinated children: how should we interpret the results? [J]. Eur J Pediatr, 2012, 171(11): 1625-1632.

[20] Piñero-Pérez R, García-Hortelano M, José Mellado M, et al. Is there interference in the interpretation of the tuberculin skin test in children with intestinal parasitic infestation? [J]. Pathog Glob Health, 2012, 106(3): 172-176.

[21] Farhat M, Greenaway C, Pai M, et al. False-positive tuberculin skin tests: what is the absolute effect of BCG and non-tuberculous mycobacteria? [J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2006, 10(11): 1192-1204.

[22] Andersen P, Munk ME, Pollock JM, et al. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis [J]. Lancet, 2000, 356(9235): 1099-1104.

[23] Arend SM, Thijsen SFT, Leyten EMS, et al. Comparison of two interferon- $\gamma$  assays and tuberculin skin test for tracing tuberculosis contacts [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2007, 175(6): 618-627.

[24] Detjen AK, Keil T, Roll S, et al. Interferon-gamma release assays improve the diagnosis of tuberculosis and nontuberculous mycobacterial disease in children in a country with a low incidence of tuberculosis [J]. Clin Infect Dis, 2007, 45(3): 322-328.

[25] Diel R, Lodenkemper R, Nienhaus A. Evidence-based comparison of commercial interferon-gamma release assays for detecting active TB: a metaanalysis [J]. Chest, 2010, 137(4): 952-968.

[26] Denkinger CM, Dheda K, Pai M. Guidelines on interferon- $\gamma$  release assays for tuberculosis infection: concordance, discordance or confusion? [J]. Clin Microbiol Infect, 2011, 17(6): 806-814.

[27] World Health Organization. Use of tuberculosis interferon-gamma release assays (IGRAs) in low-and middle-income countries: policy statement [M]. Geneva, Switzerland; World Health Organization, 2011.

[28] Rangaka MX, Wilkinson KA, Seldon R, et al. Effect of HIV-1 infection on T-cell-based and skin test detection of tuberculosis infection [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2007, 175(5): 514-520.

[29] Hausteiner T, Ridout DA, Hartley JC, et al. The likelihood of an indeterminate test result from a whole-blood interferon-gamma release assay for the diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection in children correlates with age and immune status [J]. Pediatr Infect Dis J, 2009, 28(8): 669-673.

[30] Papaventsis D, Ioannidis P, Karabela S, et al. Impact of the Gen-Probe Amplified MTD Test on tuberculosis diagnosis in children [J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2012, 16(3): 384-390.

[31] Cordova J, Shiloh R, Gilman RH, et al. Evaluation of molecular tools for detection and drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis in stool specimens from patients with pulmonary tuberculosis [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(5): 1820-1826.

[32] 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.

[33] Rachow A, Clowes P, Saathoff E, et al. Increased and expedited case detection by Xpert MTB/RIF assay in childhood tuberculosis: a prospective cohort study [J]. Clin Infect Dis, 2012, 54(10): 1388-1396.

[34] World Health Organization. Molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) [M]. Geneva, Switzerland; World Health Organization, 2008.

(收稿日期: 2014-03-01)

• 综 述 •

## 慢性病贫血与铁调素、Neogenin 的相关性

史玉娟<sup>1</sup>综述, 潘湘涛<sup>2△</sup>审校

(1. 苏州大学医学部, 江苏苏州 215000; 2. 苏州大学附属太仓医院, 江苏太仓 215400)

**关键词:** 慢性病性贫血; 铁代谢; 铁调素; Neogenin

**DOI:** 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2014. 12. 035

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1673-4130(2014)12-1604-03

慢性病性贫血(ACD)又称为炎症性贫血, 多为慢性感染、炎症、恶性肿瘤、自身免疫性疾病或者创伤等疾病所引起。ACD

的发病与铁代谢异常有着密切的关系, 主要为网状内皮系统铁异常增高, 临床上表现为血清铁和总铁结合力降低, 血清铁蛋