

factors including CD10 expression; multivariate analysis of clinicopathological and immunohistochemical factors [J]. *Oncol Rep*, 2007, 17(3): 525-530.

[19] 冯俊, 吴云飞, 徐惠绵. EGFR、VEGF 表达与大肠癌淋巴结及肝转移的相关性[J]. *现代肿瘤医学*, 2008, 16(3): 388-390.

[20] Bazan V, Migliavacca M, Zanna I, et al. Specific codon 13 K-ras mutations are predictive of clinical outcome in colorectal cancer patients, whereas codon 12 K-ras mutations are associated with mucinous histotype[J]. *Ann Oncol*, 2002, 13(9): 1438-1446.

[21] Modest DP, Stintzing S, Laubender RP, et al. Clinical characterization of patients with metastatic colorectal cancer depending on the KRAS status[J]. *Anticancer Drugs*, 2011, 22(9): 913-918.

[22] Douillard JY, Siena S, Cassidy JA, et al. Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study[J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(31): 4697-4705.

[23] 吴文辉, 肖隆斌, 杨世斌, 等. 结直肠癌原发灶、相应肝转移灶 K-ras 基因状态的研究[J]. *消化肿瘤杂志*, 2011, 3(2): 91-95.

[24] 梁立, 韦焯, 钟芸诗, 等. K-ras 基因突变与结直肠癌肝转移及其预后关系的研究[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2012, 15(11): 1156-1161.

[25] Kioi M, Yamamoto K, Higashi S, et al. Matrilysin (MMP-7) induces homotypic adhesion of human colon Cancer cells and enhances their metastatic potential in nude mouse mode[J]. *Oncogene*, 2003, 22(54): 8662-70.

[26] Lee SK, Han YM, Yun J, et al. Phosphatase of regenerating liver-3 promotes migration and invasion by upregulating matrix metalloproteinases-7 in human colorectal cancer cells[J]. *Int J Cancer*, 2012, 131(3): 190-203.

[27] Motovali M, Hojati Z, Hajihoseiny S, et al. The stromelysin-15A/

5A genotype enhances colorectal cancer cell invasion in Iranian population[J]. *J Res Med Sci*, 2012, 17(10): 962-966.

[28] Sébastien Lenglet FM, Montecucco F. Matrix metalloproteinase-9; a deleterious Link between hepatic ischemia-reperfusion and colorectal cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(48): 7131-7133.

[29] Yamada T, Oshima T, Yoshihara K, et al. Overexpression of MMP-13 gene in colorectal cancer with liver metastasis[J]. *Anticancer Res*, 2010, 30(7): 2693-2699.

[30] Burdick RC, Hu WS, Pathak VK. Nuclear import of APOBEC3F-labeled HIV-1 preintegration complexes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(49): 4780-4789.

[31] Ding QQ, Chang CJ, Xie XM, et al. APOBEC3G promotes liver metastasis in an orthotopic mouse model of colorectal cancer and predicts human hepatic metastasis[J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(11): 4526-4536.

[32] Josep M, Modolo MM, Fuster J, et al. Prognostic factors and time-related changes influence results of colorectal liver metastases surgical treatment: a single-center analysis[J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(21): 2587-2594.

[33] Suzuki M, Mose ES, Montel V, et al. Dormant cancer cells retrieved from metastasis-free organs regain tumorigenic and metastatic potency[J]. *Am J Pathol*, 2006, 169(2): 673-681.

[34] 陈小兵, 曹新广, 李宁, 等. 结直肠癌组织 FasL 与患者血清 sFas 表达与术后肝转移的相关性分析[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2009, 16(15): 1163-1165.

[35] Imano M, Okuno K, Itoh T, et al. Osteopontin induced by macrophages contribute to metachronous liver metastases in colorectal cancer[J]. *Am Surg*, 2011, 77(11): 1515-1520.

(收稿日期: 2015-03-08)

• 综 述 •

结核分枝杆菌的快速检测和药敏试验

邹立新 综述, 陈 兰 审校

(达州市中心医院检验科, 四川达州 635000)

关键词: 结核分枝杆菌; 快速检测; 药敏试验

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2015. 11. 056

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)11-1607-03

由结核分枝杆菌(MTB)引起的结核病是全球最重要的公共卫生问题之一,据世界卫生组织统计,自 1882 年德国科学家柯霍发现 MTB 以来,全世界将近 20 亿人被 MTB 感染,每年又有将近 800 万 MTB 新感染者,并且 300 多万人死亡,其中大约 25 万死于耐多药 MTB 和广泛耐药 MTB,而 MTB 耐药主要是由临床用药不规范引起^[1-2]。因此,只有准确、快速检测,及时做抗结核药物药敏试验(DST),正确用药,才能有效控制和治疗结核病。尽管 MTB 的诊断技术不断更新,新的诊断试剂盒和检测方法相继出现,但它们都有不足,很难完全满足临床诊断的需求。本文主要总结 MTB 的检测和药敏试验的有关知识。

1 非分子学方法

1.1 传统的实验室检测技术 患者痰液或支气管灌洗液等标本的抗酸染色是结核病诊断的金标准,但阳性率较低(约 30%)。虽然离心、NaOH 预处理、热染技术等标本处理可在一定程度上提高 MTB 的检出率,但依然存在 MTB 和非 MTB 鉴

别能力低的缺点。MTB 分离培养阳性可鉴别菌种,但培养周期长(4~8 月),且检出率小于 50%。菌种鉴定和 DST 存在操作繁琐,难标准化等优点。近年来,以 BACTEC MGIT 960 为代表的 MTB 全自动液体培养系统已被许多专家推荐用于 MTB 检测;尽管此系统较传统的罗氏固体(LJ)培养具有检测率高、培养时间短等优点,且同时可完成 DST,但阳性检出周期仍需 8~14 d^[3]。

1.2 显微镜观察药物敏感性检测技术 Elinav 等^[4]通过大量实验发现,MTB 在液体培养基中生长速度较固体培养基中快,且液体培养基中有特征性索状结构出现,该索状结构易在显微镜下观察到。根据这一特性,Elinav 等^[4]建立了显微镜观察药物敏感性检测技术(MODS)。MODS 是一种对 MTB 进行形态学显微镜观察与药敏试验的一种液态培养方法。在进行 MODS 检测时,将 MTB 加入含 10% 营养添加剂 OADC 的 Middlebrook 7H9 培养基的 24 孔板中培养(有一孔加生理盐水作为空白对照),然后加入不同浓度的抗结核药物(链霉素、异

烟肼、利福平和乙胺丁醇),并留 1 孔作对照。在倒置显微镜下观察到特征性索状结构,说明有 MTB 生长,反之为 MTB 培养阴性。虽然 MODS 已被评估比其他非分子学检测方法快速,但没有被广泛使用,原因是该方法尚未完全标准化,并且要求足够的医疗基础设施和受过良好培训的技术人员。

1.3 发光二极管荧光显微镜技术 与普通光学显微镜相比,荧光显微镜最大的优势是可以低倍物镜观察,大大缩短了工作人员观察同样多视野所用的时间,其染色也比抗酸染色简单。发光二极管荧光显微镜(LED)是将发光二极管灯泡和荧光显微镜相结合的一种技术,与荧光显微镜相比,它发光谱窄,镜下杂光较少,在对周围的环境上,LED 没有光线或暗室的要求;在发生光源上,LED 的蓝光柔和,背景与目标对比鲜明,视觉不易疲劳;使用 LED 无需提前打开光源预热,并且在读片的过程中显微镜没有热量产生;在费用上,LED 价格实惠,荧光显微镜使用的汞气发生灯泡昂贵,并且对操作人员身体有伤害,还需定期检验紫外光源的功率^[5-6]。世界卫生组织已经认可这种技术,但 LED 得到普及需要大量的资金。

1.4 显色观察药物敏感性检测技术 将含有 1 个麦克拉法浓度的 MTB 加入 96 孔板中,然后,不同浓度的抗结核药物也加入其中,每板上有不含抗菌药的生长对照孔和蒸馏水对照孔各一个,37 °C 孵育。1 周后,将 10 μL 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2 (MTT)溶液(5 mg/mL)加入每孔中,然后再孵育 12 h,如果有紫色沉淀出现,就在该孔中加入黄色溶液 SDS-DMF 50 μL,然后再孵育 3 h。如果黄色溶液变为紫色即预示有细菌生长。MIC 被定义为阻止这种颜色变化的最低药物浓度。显色观察药物敏感性检测技术检测 MTB 所用时间约为 8 d,尽管与 BACTECTB-460 所用的时间相差不大,但比传统比例法的 1 个月要少许多;但 BACTECTB-460 最大的不足就是它是一个放射源,要求特殊处理条件和接种针,还有仪器和培养瓶的价格比较高等缺点,限制了其在发展中国家的广泛使用^[7]。

1.5 噬菌体裂解技术 噬菌体在 20 世纪 50 年代就被发现,但用它检测 MTB 还是一个新技术,其基本原理是:噬菌体只能感染活的 MTB,侵入活的 MTB 后,在宿主中进行子代增殖,未感染宿主的噬菌体则被随后加入的噬菌体灭活剂所灭活,一段时间之后,大量子代噬菌体产生,并通过裂解菌体释放出来,而后可感染和裂解随后加入的指示菌(耻垢分枝杆菌),在琼脂平板上表现为透亮的噬菌斑,由于噬菌斑数量与活宿主菌数呈正相关。该法可鉴别死、活菌,因此可用于 DST。且该方法简捷、快速,整个实验仅需要 2 d,且检测仪器要求低、成本低廉,易于普及^[8]。

2 分子学方法

2.1 核酸探针法 该方法已有 15 年的历史,目前很少用于临床,其原因在于直接检测临床标本的灵敏度较低且自动化程度不高,但它是一项很有前景的检测技术,其优点是特异性强、技术简单、不需要尖端的实验设备,其操作流程是:(1)从待查样品中提取 DNA;(2)使用聚合酶链反应(PCR)技术扩增 DNA 序列;(3)将扩增的 DNA 序列与已知的寡核酸探针杂交;(4)显色^[9-10]。

2.2 PCR 技术 1989 年 Hance 等^[11]首次将 PCR 技术用于 MTB 的检测。实验表明,PCR 是一种简捷、灵敏、特异的分子诊断技术,比常规培养方法的灵敏度高,且能够快速从患者标本中检测 MTB,还适用于因排 MTB 少或发生 L 型变异而易被漏诊的早期发现、鉴别诊断及治疗效果的观察,且患者标本处理也简单,因此有很高的临床诊断价值。但 PCR 技术易引起交叉污染,导致结果出现假阳性。为了消除 PCR 的这种缺点,科研工作者对其进行不断改进,新的 PCR 及其衍生技术不

断出现,如 1993 年, Higuchi 等^[12]报告提出了实时荧光定量 PCR(RT-PCR),但它也存在一些问题,在标准曲线定量中,由于无统一标准品,导致各个实验室的结果缺乏可比性;在相对定量中,是在假设内源控制物不受实验条件影响的前提下得出的结果,但实验人员并不知内源控制物是否受到影响;2007 年, Agacayak 等^[13]研究报道了 PCR-限制性片段长度多态性分析(RFLP),此诊断方法可以从分枝杆菌种中鉴定出 MTB,比形态学和生理、生化特征等检测方法更简捷、准确;此外还有 PCR-单链构象多态性分析(PCR-SSCP)技术、定量巢氏 PCR 方法、多重 PCR 和多重巢式 PCR 等^[14]。尽管这些技术具有许多优点,但也难避免假阳性或假阴性,且不能区分 MTB 有无活性。

2.3 DNA 序列测定 20 世纪 70 年代 DNA 序列测定被发现,后来该技术用于耐药 MTB 的检测,就是用 PCR 方法扩增待测样品中的目的基因,然后测序 PCR 产物并与已知序列进行比对。不合理用药可使 MTB 染色体的基因发生变异从而导致 MTB 耐药的出现。该技术不仅能够检测出发生突变的基因,而且能够确定突变发生的部位和性质,是检测不同 DNA 分子差异性的最好技术。虽然 DNA 测序技术操作复杂,费用昂贵,但近年来由于该技术的自动化及成本的降低,许多研究机构都能对不同物种的基因序列进行研究^[15]。

2.4 基因芯片技术 科研工作者在 80 年代就提出基因芯片这个概念,就是将已知核酸序列 DNA 固定在一块基片表面上,然后与有荧光标记的样品分子按照碱基互补原则进行杂交,通过检测杂交分子荧光强度获取样品分子的数量和序列信息。在 MTB 耐药性检测方面,所有突变的探针可固定到一张芯片上,因此只需进行一次杂交就可得到某一菌株的所有耐药基因,因而对指导医生合理用药很有帮助^[16-17]。基因芯片正以检测效率高、自动化程度高、准确率高的优势,在 MTB 菌种鉴定、耐药性监测、基因表达谱测定及突变检测等方面发挥着重要的作用,但由于仪器昂贵和制备芯片成本偏高等因素限制了其普及。

2.5 环介导等温扩增技术 在 20 世纪末发现了环介导等温扩增技术(LAMP),此技术比传统的 PCR 反应所需时间少,主要是 LAMP 在具有置换活性的 DNA 聚合酶作用下,利用特别设计的 4 段引物识别靶基因的 6 个区域,实现对核酸的恒温扩增,从而节省了反复升降温的时间^[18]。而判断靶基因是否存在是根据副产物白色沉淀焦磷酸镁的有无或荧光染料是否变色来进行判断。与常规 PCR 和 RT-PCR 相比,该检测方法不需要昂贵的仪器和经过专业培训的技术人员,而且操作简便,特异度好、灵敏度高,适合基层快速诊断。LAMP 技术往往一次仅能检测一种细菌,但近年来有学者一次扩增了多种致病菌并保持了 LAMP 的优良特性。因而 LAMP 技术在临床得到越来越广泛的应用。

3 展 望

随着科学的发展,MTB 的检测方法以及耐药试验技术得到了不断地发展和创新,很多性能更好、更加有助于临床诊断的产品相继出现,但由于 MTB 变异的多样性和多耐药 MTB 的出现,有时很难用一种技术检测或鉴定出所有的菌株,因此还得根据几种技术的优缺点进行联合使用。另外,目前全球尚无一种诊断技术或产品可区分潜伏性感染和活动性结核,因此,世界各国相关领域的科研工作者们仍然要进行进一步探索。

参考文献

- [1] Wilson ML. Rapid diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection and drug susceptibility testing[J]. Arch Pathol Lab Med,

2013,137(6):812-819.

[2] Francis JR, Blyth CC, Colby S, et al. Multidrug-resistant Tuberculosis in Western Australia, 1998-2012[J]. Med J Aust, 2014, 200(6):328-332.

[3] Zhao LL, Xia Q, Lin N, et al. Evaluation of BACTEC MGIT 960 system for the second-line drugs susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis in China[J]. J Microbiol Methods, 2012, 91(1):212-214.

[4] Elinav H, Kalter HD, Caviedes L, et al. Training laboratory technicians from the Ethiopian periphery in the MODS technique enables rapid and Low-Cost diagnosis of mycobacterium Tuberculosis infection[J]. Am J Trop Med Hyg, 2012, 86(4):683-689.

[5] Khatun Z, Kamal M, Roy CK, et al. Usefulness of light emitting diode(LED) fluorescent microscopy as a tool for rapid and effective method for the diagnosis of pulmonary Tuberculosis[J]. Bangladesh Med Res Counc Bull, 2011, 37(1):7-10.

[6] 邵燕, 朱永东, 陶友爱, 等. 发光二极管荧光显微镜检测结核分枝杆菌的临床应用评价[J]. 中国防痨杂志, 2011, 33(9):588-591.

[7] Zhou M, Geng XE, Chen J, et al. Rapid colorimetric testing for pyrazinamide susceptibility of M. tuberculosis by a PCR-Based In-Vitro synthesized pyrazinamidase method[J]. PLoS One, 2011, 6(11):27654.

[8] 丰玫玫, 苏文琴. 结核分枝杆菌诊断技术的发展及目前临床应用的新型诊断技术产品分析[J]. 中国医药科学, 2012, 2(12):26-28.

[9] 刘靖元, 李仁龙, 徐亚军. 应用单链探针反向杂交试验检测结核分枝杆菌耐药性分析[J]. 中国医药科学, 2012, 2(13):26-28.

[10] Raizada N, Sachdeva KS, Chauhan DS, et al. A Multi-Site validation in India of the line probe assay for the rapid diagnosis of multi-drug resistant Tuberculosis directly from sputum specimens

[J]. PLoS One, 2014, 9(2):88626.

[11] Hance AJ, Grandchamp B, Lévy-Frèbault V, et al. Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA[J]. Mol Microbiol, 1989, 3(7):843-849.

[12] Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions[J]. Biotechnology (N Y), 1993, 11(9):1026-1030.

[13] Agacayak A, Bulut Y, Seyrek A. Detection of mycobacterium species distribution in the sputum samples of Tuberculosis patients by PCR-RFLP method in elazig province[J]. Mikrobiyol Bul, 2007, 41(2):203-209.

[14] Song EY, Chung HY, Joo SY, et al. Detection of HLA-DRB1 microchimerism using nested polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis[J]. Hum Immunol, 2012, 73(3):291-297.

[15] Koeser CU, Bryant JM, Becq JA, et al. Whole-Genome sequencing for rapid susceptibility testing of m-Tuberculosis[J]. N Engl J Med, 2013, 369(3):290-292.

[16] Pang Y, Li Q, Ou XC, et al. Cost-Effectiveness comparison of genechip and conventional drug susceptibility test for detecting multidrug-resistant Tuberculosis in China[J]. PLoS One, 2013, 8(7):69267.

[17] 姚春艳, 张立群, 府伟灵. 应用基因芯片技术检测结核分枝杆菌耐药基因[J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 20(11):1501-1504.

[18] Moradi A, Almasi M, Jafari H, et al. A novel and rapid loop-mediated isothermal amplification assay for the specific detection of verticillium dahliae[J]. J Appl Microbiol, 2014, 116(4):942-954.

(收稿日期:2015-02-22)

(上接第 1598 页)

数据显示, LP 感染在人群中的发生率达 12/1 000, 而欧洲 LP 感染的发生率甚至达 45/1000, 但 LP 感染性呼吸系统疾病缺乏临床特异性, 容易导致临床漏诊和误诊的出现^[10]。另一方面, 在亚洲国家, CPN 感染性呼吸道疾病的流行病学数据显示, CPN 占成人感染病原菌的 6%, 且 10% 肺炎由 CPN 感染引起^[11]。本研究发现, 单项呼吸道病原感染占 44.61%, 2 项及其以上呼吸道病原抗体感染占 7.81%, 与相关文献报道提及的多项病原抗体检测阳性率 10.00% 的结果基本一致^[12]。本研究以急性 MP 感染性气管-支气管炎居多, 占 30% 左右, 与近期研究报道保持一致^[13]。不同年龄段抗体阳性率比较显示 1~4 岁组, >4 岁组, 2~12 月组患儿呼吸道病原抗体阳性率比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。本研究结果揭示了 9 项呼吸道病原抗体联合检测在呼吸道感染病原学的流行病学规律和特征。

61 例 MP、11 例 LP 和 5 例 Q 热立克次感染患儿均应用阿奇霉素, 临床治疗均有效, 选取有意义的 MP、IBV 和 CPN 进一步研究病原菌对气管-支气管炎的诊断效能发现, MP 对气管-支气管炎的诊断价值较高, 气管-支气管炎患儿感染 MP 可能性较大。因此, 9 项呼吸道病原抗体联合检测在急性气管-支气管炎病原学诊断、流行病学监测和指导抗菌药物治疗中具有重要的价值。

综上所述, 9 项呼吸道病原抗体检测在急性气管-支气管炎患儿诊断阳性率较高, 在辅助急性气管-支气管炎辅助诊断和指导抗菌药物应用中具有重要意义。

参考文献

[1] 王丽. 儿童血清 IgM 抗体检测在呼吸道感染病原诊断中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(23):3245-3246.

[2] 贺占国, 王曼, 白云, 等. IgM 抗体检测任儿科呼吸道感染性疾病诊断中的应用[J]. 临床误诊误治, 2012, 25(6):63-65.

[3] Chen ZR, Ji W, Wang YQ, et al. Etiology of acute bronchiolitis and the relationship with meteorological conditions in hospitalized infants in China[J]. J Formos Med Assoc, 2014, 113(7):463-469.

[4] 刘基铎, 陈少艳, 肖明锋, 等. 儿童肺炎支原体感染临床及实验室结果分析[J]. 中外妇儿健康, 2011, 19(9):148.

[5] 周金德. 小儿急性呼吸道感染支原体抗体的检测[J]. 中外医疗, 2012, 31(1):168.

[6] 孔东辉, 贾芳岩, 邓芳, 等. MP-IgM、CRP、Mon、Hct 检测在儿童感染性疾病诊断中的应用价值[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(2):202.

[7] 徐培林. 婴幼儿急性下呼吸道感染和支气管哮喘抗肺炎支原体、肺炎衣原体及 RSV 抗体检测分析[J]. 中国现代医生, 2011, 49(6):25-26.

[8] 韩玉芳, 冯艳广, 宋予娟, 等. 九项呼吸道感染病原体 IgM 检测结果分析[J]. 中国微生态学杂志, 2013, 25(7):824-825.

[9] 苏文, 胡爱霞, 徐辉浦, 等. 肺炎支原体感染的检测分析(附 15514 例报告)[J]. 中华科技大学学报:医学版, 2009, 38(6):853-855.

[10] Kroening-Roche JC, Soroudi A, Castillo EM, et al. Antibiotic and bronchodilator prescribing for acute bronchitis in the emergency department[J]. J Emerg Med, 2012, 43(2):221-227.

[11] 崔京涛, 闫文娟, 倪安平, 等. 五年间肺炎衣原体血清抗体检测及流行病学分析[J]. 中华医学杂志, 2014, 94(12):919-923.

[12] 王芳. 儿童肺炎支原体肺炎 86 例临床分析[J]. 中国妇幼保健, 2014, 29(17):2720-2721.

[13] 冯伟静, 熊常海, 李玉红. 儿童重症肺炎支原体肺炎临床特点分析[J]. 现代中西医结合杂志, 2014, 23(17):1857-1859.

(收稿日期:2015-02-10)