

• 综 述 •

结核菌实验室诊断研究进展

吴 敏 综述, 张丽霞 审校

(天津市海河医院检验科, 天津 300350)

关键词: 诊断; 微生物学; 免疫学; 结核**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.04.037**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2016)04-0519-03

结核病是世界范围内发病率和病死率较高的一种疾病。据世界卫生组织 2013 年的调查研究数据表明, 2012 年估计全球结核病发病率总体上从南非的 1 000/10 万至美国和欧洲部分地区、日本、澳大利亚和新西兰等的 10/10 万。当年共发生结核病病例 860 万, 其中 13% (110 万) 是 HIV 阳性病例, 大约 75% 的新发病例出现在非洲地区。2012 年世界范围内的结核病病例主要集中在东南亚 (29%), 非洲 (27%) 和西太平洋 (19%) 地区, 印度和中国的结核病病例占病例总数的 26% 和 12%。大多数结核病患者和死亡病例发生在男性人群, 但该病仍是女性前三名的死因之一。在 2012 年, 全球共有 45 万病例发展为耐药结核, 因此死亡的患者达到 17 万人^[1]。

在临床实践中快速发现个体是否感染结核比较困难^[2], 只有 44% 的新发病例 (儿童中是 15%~20%^[3]) 可以通过痰标本的快速抗酸染色阳性发现^[1]。结核病诊断的金标准是标本中发现结核分枝杆菌。事实上, 最终诊断依据也是在人的样本中通过微生物培养方法检测到结核分枝杆菌。尽管如此, 平均需要花费至少 2 周或者数周的时间才能够培养出结核分枝杆菌。针对于一些临床上结核病的患者, 痰抗酸染色阴性无法早期使用抗结核治疗。临床上关于活动性结核病的诊断分类往往依据于不同的检测方法: 包括结核菌素实验, 胸部放射学检查, 结核分枝杆菌核酸检测和 (或) 生物样本病理学检查。在这篇文章中研究者综述了一些近期发展的针对于患者活动性肺结核早期快速诊断的一些方法。

1 传统微生物学检查

由于新的诊断技术发展不断, 已经取得了全球性可喜效果。尽管如此, 结核患者的诊断仍旧主要依赖痰涂片和痰培养, 影像学检查和临床症状, 并且全球 57% 的结核患者采用了细菌学诊断方法。因此, 仍有必要尽力改善现存方法的诊断质量。并且也已经取得了一些进展。

1.1 显微镜痰涂片检查 传统显微镜检查的一大进展就是荧光显微镜的出现, 相比传统的光学显微镜来说, 检测的敏感度大大提高, 特异度也不差^[4]。荧光显微镜在资源较富裕国家已经普遍运用, 效果远优于普通的光学显微镜。

为了提高痰涂片的敏感度, 需要做 3 次检测, 但是现在这个原则受到怀疑, 认为第 3 次的效果较前两次的结果并没有很明显的有效, 至少在质控较好的实验室是这样的^[5]。如果一个患者不能分泌痰, 必须采取一些方法使患者分泌痰。这些方法的应用, 大大提高了医疗资源缺乏国家痰涂片的阳性率, 因为对于他们来说, 获取支气管灌洗液较困难。

1.2 培养方法的进展 从 20 世纪 90 年代以来, 发明了很多方法, 利用液体培养基培养的方法来快速检测结核分枝杆菌。有文献表明, 利用液体培养基培养的方法的敏感度比固体培养基高^[6]。培养的平均时间, BACTEC MGIT960 是 12.9 d,

BACTEC 460 是 15.0 d, Lowenstein Jensen 固体培养基是 27.0 d。因此, 世界卫生组织推荐在资源缺乏的国家采用液体培养基的方法检测结核分枝杆菌和进行药敏试验^[7]。一些新的诊断方法, 利用分枝细菌噬菌体仅需要 2.0 d 或是更短的时间即可检测结核分枝杆菌, 具有较高的特异度 (83%~100%), 但是敏感度不高 (21%~88%), 和传统的培养方法相比^[8]。噬菌体检测的方法也用于快速检测结核分枝杆菌利福平耐药性。尽管如此, 这些分析方法的诊断准确性对于临床标本的直接运用是不足的。

仍然有其他的依据表型分析的仪器研发, 主要运用于药物敏感性检测。有一种仪器是显微镜观察药物敏感性, 利用倒置显微镜观察结核分枝杆菌在孔内液体培养基中的生长形态。另外一种设备是, 细菌生长时, 通过培养基颜色的改变, 同时也有一些其他的颜色指示剂运用于检测结核分枝杆菌多耐药分析。这些 DST 方法可以运用于临床痰标本, 并且具有较好的应用性, 同遗传学方法相比, 敏感度和特异度较高, 平均时间是 21.0~23.0 d^[9]。

2 微生物分子生物学诊断方法

2.1 核酸扩增技术 (NAAT) 结核分枝杆菌特异性 NAAT 检测肺支气管样本是实验室常用的用于诊断肺结核的分子学方法。NAAT 结果在获取痰标本或是支气管灌洗液标本 1.0 d 之内得出, 并且汇报给临床医生, 对于患者病情诊疗具有很大的意义。不幸的是, NAAT 扩增的靶序列没有标准化, 诊断的准确性高度不均一。NAAT 应用于临床样本肺结核诊断的临床价值的 meta 分析表明^[10] 痰标本抗酸染色阳性的患者来说, NAAT 方法的敏感度高于 95%。NAAT 检测阴性的结果可以提示该患者没有结核分枝杆菌感染。相反的, 抗酸染色阴性结果的患者, NAAT 关于活动性肺结核诊断的敏感度高度不均一, 并且不持续, 准确性不够作为日常推荐诊断结核。一般来说, 巢式 NAAT 方法, 以 IS6110 作为靶序列, 具有较高的诊断准确性。

一个患者的痰涂片结果为阴性的话, 早期 meta 分析认为 NAAT 法诊断活动性肺结核的特异度是 97%, 而近期的研究^[10] 表明该方法的特异度为 98%。结核分枝杆菌特异的 NAAT 法的阳性结果可以高度提示肺结核。尽管如此, 远远少于 50% 的患者具有痰结核菌涂片阴性, 而痰标本或是灌洗液标本 NAAT 检测阳性, 有结核病病史的患者和支气管肉瘤的患者易出现假阳性的结果。

2.2 线性探针分析 线性探针分析是一种检测抗菌药物耐药性分析常见基因突变。简单地讲, 这个检测包括 DNA 提取, 核酸扩增, 固相杂交在膜, 检测耐药性突变。The Genotype MTBD Rplus 分析检测许多基因突变, 包括 rpoB, katG 基因和 inhA 基因启动子区域^[11]。通过 meta 分析, 利福平敏感度在临

床样本中和传统 DST 培养一致。同时可以检测其他基因突变,包括那些喹诺酮类和可注射的药物,如阿米卡星或是卡那霉素。

3 免疫学诊断

3.1 抗原抗体检测进展 利用血清学检测来诊断结核已经有较长的历史,因此,这种检测方法的改进特别需要。由于要在少菌阶段,包括成年人肺结核痰涂片阴性和肺外结核,儿童结核和共感染 HIV 的结核患者,早期诊断疾病的方法必须操作简便、快速,并且诊断的敏感度和特异度较高。有些时候,这些方法也用于检测近期结核感染、监测结核病治疗的进展。尽管如此,与其他急性细菌和病毒感染患者相比,运用血清学反应诊断结核具有更多阻碍,包括活动性疾病和先天性感染之间的区别;一个具有广泛空洞性损害的患者疾病不活动;微小的疾病;和与非结核分枝杆菌感染的区别。

近来,Steingart 等^[12]对该项技术进行 meta 分析,作者指出在痰涂片阴性的患者总结出没有一种抗原的敏感度高的足够可以代替显微镜痰涂片镜检,因此必须进行相关的研究,发现新的抗原。与此同时,新技术的质量也需要改进,包括有好的研究设计和好的效果指示剂设计敏感度和特异度,建立结核患者样本库。因此,现在有的血清学检测不推荐作为结核诊断的方法。

3.2 细胞免疫诊断的进展 结核菌素皮试(TST)和干扰素 γ 释放分析(IGRA)分别在体内和体外检测了持续性结核特异性 T 细胞反应性。它们是结核既往感染和现行感染的直接指示标志。TST 和 IGRA 单独在外周血中起作用,因此不能区分隐性结核感染、活动性结核和既往结核感染^[13]。

3.3 TST TST 是由澳大利亚科学家发明的,作为一种检测儿童结核中的一种变应原测试。自 20 世纪初以来,它被认为是结核免疫诊断的金标准。尽管近代出现了 IGRA 技术,TST 仍然应用很广泛,作为一种筛查方法,鉴定患者对结核分枝杆菌的一种阳性免疫反应。

一个标准的纯化蛋白制备,结核分枝杆菌培养物上清的灭菌提取物,产生延迟超敏反应通过局部皮肤注射。为了检测结果的可靠性,TST 在人的反应是通过肿块的直径大小来反应,在皮下注射纯蛋白衍生物(PPD)后 48~72 h 观察结果。最近的 meta 分析^[14]指出 TST 检测活动性结核的敏感度是 77%,尽管如此,这项测试的敏感度可能被急剧降低,例如在新生儿和一些老年人;具有获得性免疫缺陷的患者(如 HIV 感染的患者);接受糖皮质激素治疗的患者;接受免疫抑制剂治疗的患者;患有急性肾衰的患者;营养不良的患者及肿瘤患者。TST 测试的特异度主要是依赖于 BCG 疫苗的状态和测试个体的免疫反应状态。抗原的交叉反应性在暴露于 NTM^[15]或是注射 BCG 疫苗以后可能导致 TST 测试阳性结果。TST 诱导反应超过 15 mm 的话,一般提示结核或是早期结核感染。近来,有皮肤测试一期临床实验利用重组早期分泌抗原靶标-6(ESAT-6)代替结核菌素安全性高^[16],培养滤过蛋白(CFP)-10 抗原结合可以提高诊断的敏感度。

3.4 IGRA IGRA 是 ESAT-6 和 CFP-10 抗原的耦合,这两种是结核分枝杆菌相对特异度较高的。主要包括两种商业系统,QuantiFERON-Gold (QFT-G)测量干扰素- γ 单位为 IU/mL,利用酶联免疫放射分析;以及 T-SPOT. TB 计数释放干扰素 γ 的细胞,可见通过酶联免疫印记(ELISPOT)。总结不同国家研究表明^[14,17],IGRA 最初是用于诊断隐性结核感染,但不是结核感染诊断的金标准,IGRA 的特异度一直很高,并且显然优于 TST,然而敏感度在不同的研究中是相当不同的。

这些可变性可以归咎于患者在不同结核病时期、年龄、划线的疾病下的免疫状态的特异度不同等。尽管如此,IGRA 的敏感度还是高于 TST。比较 QFT-G 和 T-SPOT. TB, T-SPOT. TB 的敏感度高于 QFT-G^[14]。

4 结核病状态和诊断的其他生物标志

4.1 荧光激活细胞分选 通过荧光激活细胞分选技术分选支气管细胞或是痰细胞进行抗原刺激的免疫分型,可以快速诊断痰涂片阴性的结核患者。然而多色流式细胞仪分析可以更好的分选细胞样本,在结核隐性感染的患者中,支气管细胞和痰 T 细胞被富集为 PPD 特异的淋巴细胞,并且流式细胞仪分析经过 PPD 刺激后不能区分活动性结核和隐性结核感染。尽管如此,如果需要的话,流式细胞仪分析法是推荐作为精确诊断痰抗酸染色阴性结核患者的局部免疫诊断分析方法^[18]。

4.2 结核诊断的其他可能方法 作为结构和功能蛋白的科学,蛋白组学已经鉴定蛋白标志物为诊断或是预后的标志物,或者是作为一些疾病治疗的靶标,包括结核病。Agranoff 等^[19]运用这种方法来分析血清蛋白指纹,或者是个体蛋白质文库,来鉴别个体是否感染结核。它的诊断有效性的敏感度(93.5%)和特异度(94.9%)都较高。

除了血清学诊断,脂质体被考虑作为一种激活的尿标志物在一种抗原捕获 ELISA 分析系统中运用于诊断结核。依据一种商业试剂盒评价,这种脂质体 ELISA 的敏感度很低^[20],但是有研究表明这种敏感度在 HIV 阳性的研究对象中有所提高^[21],因此推荐在 HIV 感染的患者中该方法同痰涂片检查联合使用。

5 结论

诊断和治疗很好的结合是控制结核病的最基本的元素,并且也会持续很久,直到出现新的疫苗或是可以有效防止结核病进展的药物,在 20 世纪中时代,结核病的治疗取得了革命性的进展,出现了一系列化疗的方法,然而在诊断方面却没有太大的进展变化。尽管如此,结核病控制不是可能的,如果活动性疾病患者的诊断被延迟的话,就会导致很多其他与之接触的人受到传染。另外,错误的阴性感染阳性诊断也会导致个体不必要的负担和医疗机构的负担。新的诊断技术的出现是急需的。据本文中总结的结核诊断相关技术,应该制订出针对不同的情况运用相应的技术,只有这样才能使患者和治疗机构很好的结合,更好地做到结核病控制。

参考文献

- [1] Harris JB, Gacic-Dobo M, Eggers R, et al. Global routine vaccination coverage, 2013[J]. MMWR, 2014, 63(46):1055-1058.
- [2] Pai M, O'Brien R. New diagnostics for latent and active tuberculosis: state of the art and future prospects[J]. Semin Respir Crit Care Med, 2008, 29(5):560-568.
- [3] Arora J, Sidiq Z, Sharma S, et al. Phylogenetic associations with drug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates in a paediatric population[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2014, 18(10):1172-1179.
- [4] Davis JL, Cattamanchi A, Cuevas LE, et al. See comment in PubMed Commons below Diagnostic accuracy of same-day microscopy versus standard microscopy for pulmonary tuberculosis: a systematic review and meta-analysis[J]. Lancet Infect Dis, 2013, 13(2):147-154.
- [5] Tuberculosis Coalition for Technical Assistance. International Standards for Tuberculosis Care (ISTC) [S]. Tuberculosis Coalition for Technical Assistance, The Hague, 2006.
- [6] Coban AY, Deveci A, Sunter AT, et al. Nitrate reductase assay for rapid detection of isoniazid, rifampin, ethambutol, and streptomycin

cin resistance in Mycobacterium tuberculosis; a systematic review and meta-analysis[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(1): 15-19.

[7] Torrea G, Coeck N, Desmaretz C, et al. Bedaquiline susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis in an automated liquid culture system[J]. J Antimicrob Chemother, 2015, 70(8): 2300-2305.

[8] Kalantri S, Pai M, Pascopella L, et al. Bacteriophage-based tests for the detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical specimens; a systematic review and meta-analysis[J]. BMC Infect Dis, 2005, 5(1): 59.

[9] Bwanga F, Hoffner S, Haile M, et al. Direct susceptibility testing for multi drug resistant tuberculosis; a meta-analysis[J]. BMC Infect Dis, 2009, 9(1): 67.

[10] Jafari C, Thijsen S, Sotgiu G, et al. Bronchoalveolar lavage enzyme-linked immunospot for a rapid diagnosis of tuberculosis: a TBNET study[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2009, 180(7): 666-673.

[11] Maschmann Rde A, Sá Spies F, Nunes Lde S, et al. Performance of the GenoType MTBDR plus assay directly on sputum specimens from Brazilian patients with tuberculosis treatment failure or relapse[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(5): 1606-1608.

[12] Steingart KR, Dendukuri N, Henry M, et al. Performance of purified antigens for serodiagnosis of pulmonary tuberculosis; a meta-analysis[J]. Clin. Vaccine Immunol, 2009, 16(1): 260-276.

[13] Lange C, Pai M, Drobniewski F, et al. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of active tuberculosis; sensible or silly? [J]. Eur Respir J, 2009, 33(6): 1250-1253.

[14] Pai M, Zwerling A, Menzies D. Systematic review: T-cell-based

assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection; an update [J]. Ann Intern Med, 2008, 149(3): 177-184.

[15] 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.

[16] Bergstedt W, Tingskov PN, Thierry-Carstensen B. First-in-man open clinical trial of a combined rESAT-6 and rCFP-10 tuberculosis specific skin test reagent[J]. PLoS One, 2010, 5(6): 11277.

[17] Mori T. Usefulness of interferon-gamma release assays for diagnosing TB infection and problems with these assays[J]. J Infect Chemother, 2009, 15(3): 143-155.

[18] Nemeth J, Winkler HM, Zwick RH, et al. Recruitment of Mycobacterium tuberculosis specific CD4+ T cells to the site of infection for diagnosis of active tuberculosis[J]. J Intern Med, 2009, 265(1): 163-168.

[19] Agranoff D, Fernandez-Reyes D, Papadopoulos MC, et al. Identification of diagnostic markers for tuberculosis by proteomic fingerprinting of serum[J]. Lancet, 2006, 368(9540): 1012-1021.

[20] Daley P, Michael JS, Hmar P, et al. Blinded evaluation of commercial urinary lipoarabinomannan for active tuberculosis; a pilot study[J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2009, 13(8): 989-995.

[21] Shah M, Variava E, Holmes CB, et al. Diagnostic accuracy of a urine lipoarabinomannan test for tuberculosis in hospitalized patients in a high HIV prevalence setting[J]. J Acquir Immune Defic Syndr, 2009, 52(2): 145-151.

(收稿日期: 2015-10-28)

• 综 述 •

B 族链球菌感染、预防及检测研究进展

王 欣¹, 韩渊明²综述, 魏超君^{1△} 审校

(1. 甘肃省人民医院临床检验中心, 甘肃兰州 730000;

2. 甘肃省兰州市第一人民医院泌尿外科, 甘肃兰州 730050)

关键词: B 族链球菌; 感染; 预防; 疫苗

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2016. 04. 038

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)04-0521-03

B 族链球菌 (GBS) 即无乳链球菌感染是造成孕产妇生殖道感染的重要原因, 严重时更可引起如泌尿系感染、绒毛膜羊膜炎、产褥感染等。早产、胎膜早破和新生儿败血症等均与其感染有密切关系^[1]。王兆莉等^[2]的研究发现未发生胎膜早破的正常产妇其生殖道中 GBS 感染率远低于发生胎膜早破的产妇。孙瑜等^[3]研究认为阴道感染 GBS 后, 该菌可继续上行造成宫腔内感染, 引起绒毛膜羊膜炎, 甚至造成胎儿死亡。

1 GBS 对孕产妇的影响

1.1 GBS 与胎膜早破 (PROM) 临床研究证实, 泌尿生殖道的 GBS 感染可引起 PROM、早产、绒毛膜羊膜炎^[4-5], 且由于 PRDM 而引起早产的孕妇组 GBS 感染率明显高于足月产的孕妇组^[6]。

1.2 GBS 与早产 当 GBS 数量多且毒力强、孕妇免疫力低下或引起阴道炎的 GBS 上行造成 PROM 时, 机体释放的磷脂酶 A2 可刺激羊膜等组织产生细胞因子及前列腺素, 它们引起子宫收缩导致早产发生^[7-9]。Klebanoff 等^[10]研究表明, 感染

GBS 的孕妇较健康孕妇发生早产的可能性增加 20%~60%, 且其分娩的胎儿为低或极低出生体质量儿的概率也相应增加。

1.3 GBS 与羊膜腔感染 孕妇患细菌性阴道炎等疾病后致病菌上行造成胎盘、胎膜及羊水等感染即为羊膜腔感染。由于 GBS 对绒毛膜的穿透能力远大于其他可引起生殖道感染的致病菌如大肠埃希菌等, 故由 GBS 造成的羊膜腔感染病情也更严重。

2 GBS 与新生儿及婴儿感染

目前普遍以患儿发病时间及临床表现的差异为分类依据, 将新生儿和婴儿 GBS 感染分为两型。(1) 早发型感染: 患儿出生后 7 d 内发生且以出生后 24 h 内发生多见, 主要临床表现为肺炎和败血症, 其中 GBS 肺炎可有发绀、呼吸暂停及呼吸窘迫等严重症状。(2) 晚发型感染: 患儿出生 7 d 后至出生后 3 个月发生, 多见于足月儿, 常呈隐匿性发病, 主要临床表现为发热、嗜睡和颅内高压等, 若伴发败血症则预后较差。

3 GBS 的检测

3.1 微生物学检验方法 GBS 培养是检测 GBS 感染的重要