

· 综 述 ·

# 结核病实验室检测技术进展\*

张俊才<sup>1</sup>综述,冯英凯<sup>1△</sup>,王引虎<sup>1</sup>,刘友生<sup>2</sup>审校

(1. 解放军第十八医院,新疆叶城 844900;2. 第三军医大学西南医院病理科,重庆 400038)

**关键词:**结核菌素;结核菌素试验;蛋白质阵列分析

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.22.034

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)22-2265-03

世界卫生组织 2009 年全球结核病控制报告显示,全球结核病患病率仍呈上升趋势,每年新增患者数达 927 万;全球 80% 的结核病患者分布在 22 个结核病高负担国家,中国作为 22 个结核病高负担国家之一,结核病患者人数仅次于印度居世界第 2 位,每年因结核病死亡达 20 万人,防控形势仍然很严峻<sup>[1-5]</sup>。

早期确诊和提高治愈率是控制结核病的现实目标。结核病患者的发现率基本反映结核病发病趋势,而诊断技术决定了结核病患者的发现率水平。当前对结核病的诊断主要依赖于患者的临床表现、影像学、病原学、血清抗体检测等技术。近十余年来,结核病实验室诊断技术发展突飞猛进,其中一些技术已经通过临床验证并获得一些权威机构的认证。据《全球控制结核计划(2006~2015)》估计,目前有 27 种新药物、15 种诊断技术方法和 8 种疫苗正处于产品研发的不同阶段,部分已通过临床验证并应用于结核病的诊断和治疗<sup>[6-9]</sup>。现将近年来结核病实验室检测技术的进展情况综述如下。

## 1 病原学检测技术

### 1.1 抗酸杆菌涂片镜检

**1.1.1 萋-尼氏抗酸染色涂片** 目前萋-尼氏抗酸染色涂片镜检仍是我国传染性结核病患者的主要发现手段,但其灵敏度仅为 40%~60%,且方法繁琐,假阳性率和假阴性率较高。张立群等<sup>[10]</sup>对 4 种不同结核分支杆菌检测方法进行了对比,抗酸染色涂片镜检的阳性率和灵敏度分别为 75.6% 和 88.2%。

**1.1.2 荧光染色法** 以金胺 O、罗丹明 B+金胺 O 染色法为代表的荧光染色提高了镜检的灵敏度,缩短了读片时间,明显降低了假阳性和假阴性<sup>[7]</sup>,但由于荧光显微镜价格昂贵,不适宜基层应用。

最新的 LED 显微镜是将低廉的发光二极管与显微镜相结合,其价格低于现有的光学显微镜,寿命长,可电池供能,可靠性更强,诊断性能优于标准荧光显微镜。多项研究经 Meta 分析显示,LED 检查的敏感性比传统镜检高约 10%<sup>[11]</sup>,同时具备荧光染色的优点,且花费低,可实施性强,可更广泛地常规使用。中国卫生部-盖茨基金会和中国卫生部-法国梅里埃基金会结核病防治项目已准备将 LED 显微镜在我国基层实验室推广。

**1.2 分支杆菌培养技术** 结核杆菌培养是诊断结核病的金标准<sup>[12]</sup>。在此不再赘述。

**1.2.1 传统培养技术** 改良罗氏培养基由国际防痨和肺部联合会推荐,是长期以来广泛使用的传统分支杆菌固体培养基。还有一些改进的培养技术只是改变了培养基的成分或培养方式,如采用丙酮酸钠培养基、液体培养基(Sauton、Dubos 和 Middlebrook 7H9)、琼脂培养基(Middlebrook 7H10 和 7H11)

等。这些培养技术均需要较长时间培养方能检测到结核菌的生长,不能快速、及时得出检测报告。

**1.2.2 快速培养技术和菌种鉴定** BACTEC-TB460/MGIT960、BacT/ALERT 3D、MB-Bact 等全自动分支杆菌培养、鉴定、药敏检测系统操作简便、阳性率高(比传统培养方法提高 10.77%),检测时间也大大缩短,平均 2~4 d。但由于价格昂贵,仅在部分发达地区的大型实验室开始应用。白广红等<sup>[13]</sup>采用 BACTEC-MGIT960 结核菌快速培养仪对 330 例临床标本总的分离阳性率为 48.1%(159/330),采用改良罗氏法对 182 例临床标本进行分离,总的分离率为 18.1%(33/182);对 114 例患者的痰标本用传统的改良罗氏培养基和结核菌快速培养仪进行平行接种(接种前对同一份标本按各自标本处理程序进行),结果传统的改良罗氏培养的阳性率为 13.2%(15/114),结核菌快速培养仪培养分离的阳性率为 41.2%(47/114)。改良罗氏法阳性结果出现时间最早者为 18 d,平均 23.5 d,结核菌快速培养仪最早 4 d 报告结果,平均 9 d。

## 2 免疫学检测技术

### 2.1 结核菌素试验及血清学检测技术

**2.1.1 OT/PPD 皮试试验** 包括旧结核菌素(old tuberculin, OT)试验和结核菌素纯蛋白衍生物(purified protein derivative, PPD)试验。优点是简便、快速、成本低,但假阳性率高,极不易标准化,且难以鉴别卡介苗接种引起的免疫反应,尤其在合并人类免疫缺陷病毒感染时,更不易鉴别诊断<sup>[10]</sup>。

**2.1.2 血清学检测技术** 血清学方法为结核病的快速、准确诊断提供了广阔前景,而寻找敏感性和特异性均高的单体蛋白作为血清学检测结核病的特异性抗原是血清学诊断的重要研究方向。众多研究已证实,结核病患者的免疫规律为:病变重、受损范围大者细胞免疫功能弱,抗体产生多,即细胞免疫随病情加重而减弱,体液免疫随病情加重而增强,明显表现为细胞免疫与体液免疫分离的现象。因此,从 20 世纪 70 年代建立了酶联免疫吸附法后,形成了很多以检测结核抗体为主的免疫血清学检测方法,在现代结核病的快速诊断中发挥着重要作用。主要包括以下几种:酶联免疫吸附法、结明实验(Mycodot)、ICT-TB 卡、免疫胶体金标记技术、重氮乳凝法等。这些方法都具有简便、快速、准确、成本低廉的优点,但在检测阳性率和特异性方面略显不足<sup>[14]</sup>。

**2.2 细胞因子检测** 结核分支杆菌感染人体后,刺激免疫细胞产生保护性细胞因子,其中最主要的是 T 细胞亚群、IFN- $\gamma$ 、IL-2 及 SIL-2R。通过检测细胞因子水平可对结核分支杆菌感染及结核病的诊断提供参考。目前这项技术应用也极为广泛<sup>[15-17]</sup>。孙道芳等<sup>[18]</sup>通过监测活动期结核病患者血清中的 T

细胞亚群和 SIL-2R 水平变化,提示检测 T 细胞亚群和 SIL-2R 水平变化可作为结核病病情监测及预后估计的参考指标。

### 3 分子生物学检测技术

分子生物学技术的迅猛发展为疾病的诊断和治疗提供了广阔的应用前景。

**3.1 核酸检测技术** 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)、核酸探针技术(DNA probe)、DNA 指纹技术等分子生物学技术的特点是检测敏感性高、特异性强、简便、快速。但因需要专门的仪器设备和复杂的技术支撑,在应用范围上受到了极大限制<sup>[19-23]</sup>。程刚等<sup>[24]</sup>开发研制了结核分支杆菌荧光 PCR 试剂盒,经临床试验,检测阳性率为 49.1%,灵敏性达 89.2%,特异性达 98.8%,符合率达 93.6%,在灵敏性上显著优于培养法和涂片法等传统方法,可以反映结核菌的真实感染情况,对于临床诊断和疗效考察有一定的指导意义。

### 3.2 生物芯片技术

**3.2.1 基因芯片技术** 基因芯片按其性能和用途分为多种类型,主要应用于分支杆菌的菌种鉴定和耐药性检测等方面。与传统检测方法相比,基因芯片在感染性疾病、遗传性疾病和肿瘤等疾病的临床诊断方面具有独特的优势,它可以用 1 张芯片同时对多个患者进行多种疾病的检测;无需机体免疫应答反应,能及早诊断;待测样品用量小;能检测病原微生物的耐药性、病原微生物的亚型;该技术具有检测效率高、自动化程度高、检测靶分子种类多、结果可靠性高等优势,利于大规模推广应用。但仍然存在着许多难以解决的问题如技术复杂、成本昂贵、检测灵敏度较低、重复性差、分析范围较狭窄等问题,有待于进一步改进和完善。黄明翔等<sup>[25]</sup>以 BACTEC MGIT 960 收集了结核病患者分离到的分支杆菌阳性培养物,以传统分支杆菌菌种鉴定方法为对照,应用 DNA 芯片技术进行菌种鉴定。结果两种方法鉴定结果一致和基本一致共 112 株,吻合率为 83.6%(112/134),提示 DNA 芯片检测技术可以简便、快速、灵敏、特异地将大多数分支杆菌鉴定到种,但有待进一步完善。

**3.2.2 蛋白芯片技术** 1998 年,美国开发成功世界上第一块蛋白质芯片。2001 年,我国上海数康生物科技有限公司成功开发了多肿瘤标志物蛋白芯片检测系统。2003 年,我国南京大渊生物技术工程责任公司开发了大渊蛋白芯片检测系统。在医学实验室诊断领域,蛋白芯片有助于对疾病的发病机制的研究,以寻找疾病诊断和治疗的靶分子。蛋白芯片技术是一种高通量、高灵敏度、高特异性且微型化的蛋白质分析技术,是近年来蛋白组学研究中兴起的一种新方法<sup>[23-26]</sup>。

结核蛋白芯片系统的基本原理是以微孔滤膜为载体,利用微阵列技术将纯化的结核菌脂阿拉伯甘露糖(LAM)、蛋白相对分子质量  $16 \times 10^3$  (rTPA16) 和  $38 \times 10^3$  (rTPA38) 等 3 种抗原固相于同一膜片上,并利用微孔滤膜的渗滤、浓缩凝集作用,使抗原-抗体反应在固相膜上快速进行,再以免疫金作为标记物而直接在膜上显色。显色后的芯片放入芯片阅读仪,在专门软件的支持下对不同抗原点阵的灰度值进行分析,整个过程不超过 30 min。诸多临床评价和实验表明,该技术为临床诊断结核病起到了积极的作用<sup>[26]</sup>。

结核蛋白芯片的特点是对多种结核分支杆菌抗原/抗体进行同时筛查,简便、快速、准确而又有较高的特异性与敏感性以及检测成本低,在临床上已得到广泛应用,对于痰涂片检查阴性、无痰、肺外结核患者的检出更显示其优越性<sup>[27]</sup>。

### 4 结语与展望

近年来结核病实验室诊断技术发展呈现如下特点<sup>[28]</sup>:多

种检测方法联合应用,以期优势互补,提高检出率;对原有检测方法进行改进、拓宽;寻找特异性、敏感性高的包被抗原;免疫检测指标的不断丰富;结合其他学科技术的发展,20 世纪 90 年代末,结核分支杆菌全部基因组测序工作已完成。进入 21 世纪,医学界有学者大胆推测,医学将进入分子基因时代,而基因研究将进入后基因时代,充分利用基因组丰富的信息,运用一切分子生物学技术,有望找到新的结核病诊断方法。

### 参考文献:

- [1] 刘剑君,姜世闻,成诗明. 中国结核病控制现状分析及对策[J]. 中国防痨杂志,2003,25(3):129-131.
- [2] 全国结核病流行病学抽样调查技术指导组. 第 4 次全国结核病流行病学抽样调查报告[J]. 中华结核和呼吸杂志,2002,25(1):3-7.
- [3] Jiao WW, Mokrousov I, Sun GZ, et al. Molecular characteristics of rifampin and isoniazid resistant Mycobacterium tuberculosis strains from Beijing, China[J]. Chin Med J (Engl), 2007, 120(9):814-819.
- [4] 吴刚,齐麟,安建荣,等. 新疆结核病控制项目各地区患者发现不均衡因素评析[J]. 地方病通报,2005,20(1):83-84.
- [5] Keeler E, Perkins MD, Small P, et al. Reducing the global burden of tuberculosis: the contribution of improved diagnostics[J]. Nature, 2006, 444(Suppl 1):S49-57.
- [6] 王长军,张锦海,顾海涛,等. 结核病实验室诊断技术研发进展[J]. 临床肺科杂志,2010,11(11):1607-1609.
- [7] 赵群莉. 常见实验室结核菌检测的方法及进展[J]. 医学综述,2010,16(13):2051-2052.
- [8] 彭丽,罗永艾. 结核病的实验室快速诊断[J]. 新医学,2005,36(6):359-361.
- [9] Moore DA, Evans CA, Gilman RH, et al. Microscopic observation drug susceptibility assay for the diagnosis of TB[J]. N Engl J Med, 2006, 355(15):1539-1550.
- [10] 张立群,王云霞,周敏,等. 4 种不同结核分支杆菌检测方法对结核病的诊断价值比较[J]. 中华医院感染学杂志,2010,20(11):1633-1635.
- [11] Steingart KR, Henry M, Ng V, et al. Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review[J]. Lancet Infect Dis, 2006, 6(9):570-581.
- [12] 中华医学会结核病学分会. 肺结核诊断和治疗指南[J]. 内科急危重症杂志,2002,8(4):225-229.
- [13] 白广红,梁雅萍,朱蕾. BACTECMGIT960system 快速分离结核杆菌的效果评价[J]. 实用医技杂志,2006,13(18):3187-3188.
- [14] Mazurek GH, Jereb J, Lobue P, et al. Guidelines for using the QuantiFERON-TB Gold test for detecting Mycobacterium tuberculosis infection, United States[J]. MMWR Recomm Rep, 2005, 54(15):49-55.
- [15] Bwanga F, Hoffner S, Haile M, et al. Direct susceptibility testing for multi drug resistant tuberculosis: a meta-analysis[J]. BMC Infect Dis, 2009, 9:67.
- [16] Pai M, Zwerling A, Menzies D. Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infec-

- tion; an update[J]. *Ann Intern Med*, 2008, 149(3): 177-184.
- [17] Dheda K, Smit RZ, Badri M, et al. T-cell interferon-gamma release assays for the rapid immunodiagnosis of tuberculosis: clinical utility in high-burden vs low-burden settings[J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2009, 15(3): 188-200.
- [18] 孙道芳, 陈延芳, 蒋保云, 等. 血清 T 细胞亚群 SIL-2R 水平测定对肺结核的诊断价值[J]. *预防医学论坛*, 2006, 12(1): 67-68.
- [19] Lacoma A, Garcia-Sierra N, Prat C, et al. GenoType MT-BDR plus assay for molecular detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical samples[J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(11): 3660-3667.
- [20] Ling DI, Flores LL, Riley LW, et al. Commercial nucleic acid amplification tests for diagnosis of pulmonary tuberculosis in respiratory specimens: meta-analysis and meta-regression[J]. *PLOS ONE*, 2008, 3(2): e1536.
- [21] Tomita N, Mori Y, Kanda H, et al. Loop-mediated isothermal amplification(LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products[J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(5): 877-882.
- [22] Pandey BD, Poudel A, Yoda T, et al. Development of an in-house loop-mediated isothermal amplification(LAMP) assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and evaluation in sputum samples of Nepalese patients[J]. *J Med Microbiol*, 2008, 57(Pt 4): 439-443.
- [23] Hillemann D, Galh J, Vollmer E, et al. Real-time PCR assay for improved detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin-embedded tissues[J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2006, 10(3): 340-342.
- [24] 程刚, 何蕴韶, 周新宇, 等. 结核分支杆菌荧光 PCR 试剂盒的研制及临床试验[J]. *第一军医大学学报*, 2002, 22(6): 533-535.
- [25] 黄明翔, 王琳, 张丽水, 等. DNA 芯片鉴定分支杆菌的研究[J]. *中国人兽共患病学报*, 2010, 26(6): 555-557.
- [26] 何启军, 姚敏, 吴多荣. 蛋白芯片法诊断结核病的评价[J]. *中国热带医学*, 2010, 10(5): 523-524.
- [27] 沈云华. 蛋白芯片技术快速诊断结核病的临床应用[J]. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2009, 15(34): 87-88.
- [28] 彭超, 王洪海. 结核分支杆菌潜伏感染诊断方法的新进展[J]. *生物技术通讯*, 2010, 21(1): 107-111.

(收稿日期: 2011-01-04 修回日期: 2011-07-20)

· 综 述 ·

## 封闭负压引流对改善糖尿病足溃疡微循环的研究进展

刘锡松 综述, 简华刚 审校

(重庆医科大学附属第二医院创伤烧伤科 400010)

**关键词:** 糖尿病足; 微循环; 引流术

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2011.22.035

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1671-8348(2011)22-2267-03

糖尿病足溃疡是糖尿病微循环病变常见的慢性并发症之一, 其创面的治疗是临床上最为棘手的难题之一, 封闭负压引流技术经过近十年的发展, 在临床治疗糖尿病足溃疡中有较明显的疗效。但是封闭负压引流的机制还远没有揭示清楚, 现将其对改善糖尿病足溃疡微循环, 从而促进糖尿病足溃疡创面愈合的作用综述如下。

### 1 概 述

**1.1 糖尿病足(diabetic foot, DF)** DF是由于糖尿病血管、神经病变引起的下肢病变的总称, 是指糖尿病患者由于合并神经病变及各种不同程度末梢血管病变而导致下肢感染、溃疡形成和(或)深部组织的破坏<sup>[1]</sup>, 是以糖代谢紊乱为前提的综合因素作用的结果。其发生过程主要经过下列环节: 糖尿病-代谢异常-神经、血管病变-感染、坏死、溃烂。糖尿病代谢异常引起的高血糖、高血脂及其所产生的代谢产物, 一方面可致神经轴突、鞘膜及雪旺细胞变性致使感觉、运动、自主神经功能障碍, 导致感觉缺失、皮肤干裂、组织抵抗力降低易并发感染坏疽; 另一方面可使血小板聚集力增强, 血液黏稠度增加, 促进动脉粥样硬化及血栓形成, 使血管腔狭窄或闭塞, 即糖尿病外周动脉病变(peripheral arterial disease, PAD), 导致肢端缺血、坏死、溃烂。有研究发现约 11.6% 糖尿病患者存在 PAD<sup>[2]</sup>。缺血及神经损伤又使局部组织愈合、抗感染能力降低因而伤口不易愈合。糖尿病足溃疡是糖尿病的严重并发症及糖尿病患者致残、致死的

重要原因之一, 有研究发现约 10% 的糖尿病患者患有糖尿病足溃疡, 15% 以上将在其生活的某一时间发生足溃疡或坏疽<sup>[3]</sup>。14%~24% 的糖尿病足溃疡患者需要截肢。在非外伤性下肢截肢患者中, 糖尿病足溃疡在许多国家已是截肢的首位原因<sup>[4]</sup>, 美国每年糖尿病的医疗费用中 1/5 用在了糖尿病足病的治疗上<sup>[5]</sup>。

**1.2 微循环** 微循环是组织器官内微动脉与微静脉之间的血液循环, 它和微淋巴管一起组成微循环功能单元, 由细动脉、终末细动脉、毛细血管、细静脉和神经纤维等组成。其中皮肤微循环还可细分为具有特征性营养毛细血管的非常浅表的薄层(距皮肤表面 0.01~0.05 mm)和具有温度调节血管的深层(0.05~2.00 mm)<sup>[6]</sup>。微循环承担血液与组织液之间氧、营养、必需物质和代谢产物的交换, 能量、信息传输, 承担血液流通、分配、组织灌注, 以及一系列反馈调节、内环境稳定机制。因此, 微循环不仅是整体循环系统的末梢部分, 也是许多器官中独立的功能单位。它在保持人体正常生理功能, 各种疾病的发生、发展和药物作用机制中均占有突出地位。

**1.3 封闭负压引流** 负压创面疗法(negative pressure wound therapy, NPWT)是利用负压吸引装置与特殊创面敷料连接, 间歇地或持续地在创面处产生低于大气压的压力, 并通过引流管达到全创面引流, 使创面渗出物及时被清除。持续负压有促进创面血液循环、减轻组织水肿、机械牵拉等作用。封闭敷料