

Research Progress in Detection Technology of *Mycobacterium tuberculosis*

Jinhong Ju

Fujian Province Fuqing 73301 Military Hospital, Fuqing

Email: ju868@163.com

Received: Aug. 6th, 2014; revised: Aug. 24th, 2014; accepted: Sep. 10th, 2014

Copyright © 2014 by author and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Tuberculosis (TB) is a notable disease as well as a major global health problem; it is also one of the major infectious diseases in our country. Early diagnosis and treatment is a key step in the process of stopping Tuberculosis. In recent years, with the development of biotechnology, the Tuberculosis diagnosis methods have been fully improved, more and more new detection methods are constantly emerging, especially the molecular biological techniques for timely diagnosis of Tuberculosis and pathological research is of great significance. This article summarizes the main domestic detection techniques from the traditional bacteriological, immunological and molecular biological detection aspects, to provide some suggestions and ideas for medical staff and researchers.

Keywords

Mycobacterium tuberculosis, Traditional Bacteriology Detection, Immunology Detection, Molecular Biology Detection

结核分枝杆菌检测技术研究进展

居金宏

福建省福清市73301部队医院, 福清

Email: ju868@163.com

收稿日期: 2014年8月6日; 修回日期: 2014年8月24日; 录用日期: 2014年9月10日

摘要

结核病是危害全球健康的一个重要的疾病，也是我国重大传染病之一，早期诊断和治疗是遏制结核病的关键环节。近年来随着生物技术的发展，结核病的诊断方法得到充分完善，新的检测技术不断涌现，特别是分子生物技术对于结核病的及时诊断以及病理研究具有重要意义。本文从传统细菌学检测、免疫学检测以及分子生物学检测三方面入手，对国内主要的检测技术作一综述，以期对医务人员以及研究着提供一些建议和思路。

关键词

结核分枝杆菌，传统细菌学检测，免疫学检测，分子生物学检测

1. 引言

结核病是继艾滋病之后人类第二大杀手，由经常感染肺部的单一传染性病原体(结核分枝杆菌)引起，是以呼吸系统感染为主的慢性传染病，被列为我国重大传染病之一。结核病通过空气在人与人之间传播。根据世界卫生组织的统计，我国是全球 22 个结核病流行严重的国家之一，同时也是全球 27 个耐多药结核病流行严重的国家之一。目前我国结核病年发病人数约为 130 万，占全球发病的 14.3%，位居全球第 2 位。近年来，每年报告的肺结核新发病人人数约为 100 万，位居甲乙类传染病前 2 名，仅次于乙肝。活动性肺结核的患病率为 459/10 万，其中涂阳肺结核患病率为 66/10 万、菌阳肺结核患病率 119/10 万[1]。

由于缺乏有效疫苗，缺乏高特异性和敏感性诊断试剂，以及耐药性结核病的不断涌现等原因，该病仍然是全球公共卫生的重大威胁，因此能够快速有效的诊断对于结核病的控制和传播至关重要。近年来结核病的诊断新技术不断涌现，现对实验室结核病诊断技术作如下综述。

2. 传统细菌学检测技术

2.1. 痰涂片镜检法

痰涂片镜检是结核分枝杆菌实验室检验最基本最直接的传统细菌学检测方法之一，也是目前许多国家尤其是发展中国家仍依赖使用的结核病诊断重要依据。作为结核病诊断的传统手段，涂片镜检操作简单、快速，成本低廉，在 2~4 h 即可获得诊断报告[2]。传统的萋尔-尼尔逊氏抗酸染色法灵敏度低，对于传染性较低病例样本中菌含量少于 10^3 条/mL 时检测结果呈现假阴性，易产生漏检[3]。近年来，荧光染色法、发光二极管、计算机识别法以及集菌痰涂片方法的应用较常规涂片镜检灵敏度有所提高[4] [5]。然而无法实现活菌死菌、耐药性菌及非结核分枝杆菌的区分仍是涂片镜检的一大缺陷。

2.2. 培养法

传统的固体培养法以改良罗氏培养基最为常见，其灵敏度高于涂片镜检。然而结核分枝杆菌生长缓慢，临床实验室报告时间可长达 8 周，漫长的检测周期限制了早期诊断，延迟了适当的治疗，难以满足临床需要。上世纪 70 年代快速培养概念的提出，半自动和全自动分枝杆菌培养系统迅速涌入市场。常见的 BACTEC 460 系统由 BectonDickenson 实验室研制，该系统采用放射性同位素液体培养法，检测培养过程中释放的 CO_2 ，操作简便，较固体培养检测周期短(通常在 2 周左右)，检测阳性率提高了 10% 左右[6]；此外该检测系统还可以进行分枝杆菌药敏试验及菌型鉴定，但微量放射性污染对操作人员及环境有一定影响。随后的 BACTECMGIT 960 系统保留 BACTEC 460 快速培养的优点得同时以荧光代替放射元素进

行检测[7]。

法国生物梅里埃公司研制的 BacT/Alert 3D 全自动快速结核分枝杆菌培养检测系统, 根据培养管中 CO₂ 变化导致的 pH 改变, 设计可以随着 pH 改变发生颜色改变的传感器进行检测[8]。该系统简便、快速, 同时也可用于普通细菌培养、药敏试验和初步菌种鉴定。虽然全自动培养系统无交叉污染, 可连续检测, 简单快速, 但价格昂贵, 所需试剂依靠进口, 成本高难以在临床得到广泛推广。

3. 免疫学检查

Nassau 等首次利用了酶联免疫吸附试验在结核患者血清检测到结核抗体, 随后 Grange 等进一步证明该结核特异性抗体为 IgG 类[9] [10], 由此开启了结核免疫学检测的新纪元, 结核病免疫学检测成为结核病辅助检测重要手段之一。

3.1. 抗体检测

目前结核病抗体检测技术日益成熟, 检测方法也不断获得改进和优化, 常见的有酶联免疫吸附试验(ELISA)、斑点免疫渗滤试验(DIGFA)、斑点免疫层析试验(DICA)及免疫印迹试验(Western blot)[11]。ELISA 是测定结核抗体研究和使用的最多的技术之一, 相对于传统检测方法其快速、简便 2~3 h 即可完成[12]。20 世纪末建立的 DIGFA 和 DICA 全程只需 15~30 分钟, 且结果肉眼可见, 但检测费用较 ELISA 略高[13]。免疫印迹试验在 ELISA 的基础上检测灵敏度和特异性都有极大提高。抗体检测常用的抗体种类主要包括 IgG 类、IgM、IgA、IgE。IgM 在免疫两周后初次出现, 而 IgG 则在免疫第 8 周后开始明显升高, 且持续时间很长。抗体免疫反应的延迟性导致早期结核病诊断结果易产生假阴性, 同时共同抗原导致的交叉反应以及不能区分非结核分枝杆菌都会导致假阳性患者接受不必要的治疗, 耽误了真正治疗时机[3] [9]。

3.2. 抗原检测

机体受到感染后, 首先出现的是结核抗原, 因此从理论上讲对结核抗原的检测比抗体的检测更适合于早期诊断。目前结核检测抗原种类繁多, 足有 20 多种, 包括脂阿拉伯甘露糖、Ag85、ESAT-65、A60 等[14]。双抗体夹心 ELISA 法是目前进行抗原检测的常用方法, 利用吸附在固相介质上的结核抗原与待测标本中的结核抗体, 以及酶标抗体复合物结合, 形成抗原-抗体-酶标抗体复合物, 经底物显色反应进行结果判别[10] [14]。尽管抗原检测具有早期诊断价值, 但高活性的特异性结合抗体难制备, 限制了其在临床的应用。

3.3. 细胞因子检测

细胞免疫是非活动性结核病筛查的重要方法, 主要由 T 细胞介导, 机体首次受到感染后产生的记忆 T 淋巴细胞, 经抗原再次刺激后增殖成效应 T 细胞, 分泌细胞因子[15]。目前细胞免疫检测主要对 T 细胞数目、细胞因子等进行检测, 国内主要产品是 T-SPOT。该方法通过酶联免疫斑点技术(ELISPOT)检测释放细胞因子 γ -干扰素的外周血单个核细胞的数量[16]。较其他免疫方法 T-SPOT 灵敏度更高, 可以迅速捕获细胞因子, 可在单细胞水平上进行检测, 相对而言 ELISA 则需要至少 4000 个 T 细胞才能检测到[17]。尽管 T-SPOT 在结核接触者调查、早期感染以及潜伏感染具有很大优势, 但繁琐的检测步骤、高的试剂及仪器费用不适合临床大规模使用。

4. 分子生物学方法

1998 年结核分枝杆菌全基因组测序工作的完成, 给结核病诊断带来全新观念[18]。快速基因诊断技

术的初步成功,对结核病的治疗和控制带来革命性变化,展示出广阔的前景[19]。

4.1. 荧光定量 PCR

聚合酶链式反应(PCR)自上世纪 80 年代问世以来在整个生物学领域得到广泛应用,尤其上世纪 90 年代 Hance 利用 PCR 技术检测结核分枝杆菌,更是给结核病的临床诊断带来了革命性突破[20]。高灵敏度和特异性,快的检测速度,使其在结核病诊断方面显现出巨大潜力,尤其对于含菌量少、菌发生 L 型变异而被漏诊样本的诊断具有更高价值[21] [22]。交叉污染、假阳性以及致癌物溴化乙锭的使用等问题使常规 PCR 不断被质疑[23]。在此基础上,通过技术改进实时荧光定量 PCR 在一定程度上弥补了常规 PCR 检测的不足。通过利用特异性引物和荧光探针,实时监测整个 PCR 进程并用标准曲线对结果进行定量分析,荧光定量 PCR 使整个检测过程变得更加简单快速、安全可靠[24]。然而无论常规的 PCR 还是实时荧光定量 PCR 都以 DNA 为模板,DNA 的稳定性使 PCR 检测结果不能辨别无活性菌及非结核分枝杆菌[23] [25]。同时 PCR 扩增产物为 DNA 存在交叉污染,由于样本中抑制物的抑制作用对检测结果的稳定性具有很大影响[26] [27]。

4.2. 环介导等温扩增技术(LAMP)

LAMP 技术是 2000 年日本学者 Notomi 开发的一项可取代 PCR 的新 DNA 扩增检测技术[28]。该技术利用在恒温条件下,通过 Bst DNA 多聚酶作用进行链置换后获得模板进行扩增,扩增产物可直接在紫外灯下判别或加入染料反应液可发出绿色荧光,使反应管呈肉眼可见的绿色[28]-[30]。该检测技术在 1 h 内即可完成检测,特异性和敏感性高,4 种根据 6 个区域设计的并具有 3 个串联序列的特异性引物[31]。扩增过程不需要改变温度,不依赖任何专门的仪器设备,直接用肉眼进行结果判定,简单高效成本低,在一定程度上避免了实验室的交叉污染。但由于其检测靶目标仍是 DNA,往往由于不能辨别死菌活菌而产生假阳性[32]。

4.3. 实时荧光核酸恒温扩增检测技术(SAT)

基于 DNA 的体外扩增其模板既可以来自于活菌也可来自死菌,不能作为结核分枝杆菌活菌的诊断。RNA 由于其为单链结构,容易降解,在死菌中不易被检测到同时也不宜造成污染。由美国 Gen-Probe 公司开发的 TMA 技术是逆转录酶介导的体外特异性扩增 rRNA 直接进行检测一项新的检测技术[33]。rRNA 即核糖体 RNA,是细菌核糖体的主要成分,在每个原核生物中存在约 $10^3\sim 10^4$ 个拷贝。

国内 SAT 技术在 TMA 技术进行进一步改良。其基本原理如下: SAT 技术以 rRNA 为靶标,在 M-MLV 反转录酶作用下产生一条 cDNA 链, M-MLV 反转录酶的 RNase H 酶活性将杂合的 RNA/DNA 中 RNA 降解,再经 M-MLV 反转录酶作用产生一个 cDNA 拷贝,随后 T7 RNA 多聚酶以反转录的 DNA 为模板扩增产生 100~1000 个 RNA 拷贝,每一个 RNA 拷贝从反转录开始再一次进入扩增循环,同时扩增产生的 RNA 拷贝与优化的探针特异结合产生荧光信号,由荧光检测仪捕获荧光信号进行分析[34]。SAT 技术在恒温 42℃ 经 40~60 钟即可获得理想的实验结果。由于扩增产物为 RNA,减少了 PCR 过程中对实验仪器和环境造成的污染,避免了交叉污染及假阳性。此外为了减少样本的抑制反应, SAT 对于样本的制备采用磁珠吸附法,特异性捕获靶标确保了高特异性的提取,通过水相洗涤最大程度地去除各种杂质,进而避免了假阴性结果的出现。SAT 扩增效率极高,30 min 即可获得 10^9 倍的扩增,再通过实时检测,2.5 h 即可完成诊断,提高了检测的灵敏度。同时特异性提取、特异性引物以及特异性探针保证了检测结果的高特异性和准确性。该技术敏感性好、特异性高、操作简便,在实验室污染控制方面与各项 DNA 分子诊断技术相比,有其独特的优势;其与目前使用的传统痰涂片抗酸染色检测方法,传统的改良罗氏培养法及液

体培养法比较,能显著提高结核分枝杆菌的阳性检出率,对早期发现传染性肺结核患者,控制结核病传染源都有重要意义。作为一项成熟的检测技术,SAT目前已成功地应用于结核分枝杆菌、肠道病毒以及性病等临床检测[35][36]。

5. 展望

结核病一直是困扰整个人类的严重问题,近几年其死亡率和发病率一直居高不下,尤其伴随着耐药性结核分枝杆菌的出现,结核病的防治变得十分艰巨。这也促进了结核病实验室诊断的快速发展,大量基础研究及成品试剂盒不断应用于临床应用研究。传统的细菌学检测被认为是结核病诊断的金标准然而由于其灵敏度低,培养周期长都不利于结核病的及时诊断;抗体免疫反应的延迟性在一定程度上也限制了免疫学检测;分子诊断技术的作为一项简单、快捷、高效廉价的检测技术受到越来越多的青睐,开启了全球结核病诊断和治疗方面的一个新里程碑,为面临罹患结核病和耐药疾病最高危险的数百万人带来了福音。尤其是以RNA为靶标的恒温扩增检测技术更有可能在结核病诊断、菌种鉴定、耐药检测及机理研究等结核病流行病学方面获得巨大成功。

参考文献 (References)

- [1] 王宇 (2011) 全国第五次结核病流行病学抽样调查资料汇编. 军事医学科学出版社, 北京.
- [2] 路超, 刘义庆, 王长印, 卢志明 (2011) 结核病的分子生物学诊断技术研究进展. 山东医药, **31**, 112-114.
- [3] Loto, O.M. and Awowole, I. (2012) Tuberculosis in pregnancy: A review. *Journal of Pregnancy*, **2012**, 1-7.
- [4] Steingart, K.R., Henry, M., Hopewell, P.C., Ramsay, A., Cunningham, J., Urbanazik, R., Perkins, M.D., Aziz, M.A. and Pai, M. (2006) Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: A systematic review. *The Lancet Infectious Diseases*, **6**, 570-581.
- [5] Mase, S.R., Ramsay, A., Henry, M., Hopewell, P.C., Cunningham, J., Urbanazik, R., Perkins, M.D., Aziz, M.A. and Pai, M. (2007) Yield of serial sputum specimen examinations in the diagnosis of pulmonary tuberculosis: A systematic review. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, **11**, 485-495.
- [6] Shah, S.R., Shenai, S., Desai, D.C., Joshi, A., Abraham, P. and Rodrigues, C. (2010) Comparison of *Mycobacterium tuberculosis* culture using liquid culture medium and Lowenstein Jensen medium in abdominal tuberculosis. *Indian Journal of Gastroenterology*, **29**, 237-239.
- [7] Cruciani, M., Scarparo, C., Malena, M., Bosco, O., Serpelloni, G. and Mengoli, C. (2004) Meta-analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without solid media, for detection of Mycobacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, **42**, 2321-2325.
- [8] Singh, P., Wesley, C., Jadaun, G.P.S., Malonia, S.K., Das, R., Upadhyay, P., Faujdar, J., Sharma, P., Gupta, P., Mishra, A.K., Singh, K., Chauhan, D.S., Sharma, V.D., Gupta, U.D., Venkatesan, K. and Katoch, V.M. (2007) Comparative evaluation of Lowenstein-Jensen proportion method, BacT/ALERT 3D System, and enzymatic Pyrazinamidase assay for Pyrazinamide susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, **45**, 76-80.
- [9] Nassau, E., Parsons, E.R. and Johnson, G.D. (1976) The detection of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* by microplate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Tubercle*, **57**, 67-70.
- [10] Grange, J.M., Gibson, J., Nassau, E. and Kardjito, T. (1980) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): A study of antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* in the IgG, IgA and IgM classes in tuberculosis, sarcoidosis and Crohn's disease. *Tubercle*, **61**, 145-152.
- [11] 戴振华, 郭兰芹, 张贺秋, 冯晓燕 (2013) 结核分枝杆菌抗原检测研究进展. *生物技术通讯*, **5**, 732-735.
- [12] Nath, S.S., Nathiya, K., Dhanabalan, R., Angayarkanni, J. and Palaniswamy, M. (2011) Detection of mycobacterial antibodies in serum samples by enzyme linked immunosorbent assay. *African Journal of Biotechnology*, **10**, 16012-16015.
- [13] 付晓燕, 王学军, 刘石泉, 王升启 (2009) 结核分枝杆菌诊断技术研究进展. *生物技术通讯*, **2**, 249-252.
- [14] Chan, E.D., Heifets, L. and Iseman, M.D. (2000) Immunologic diagnosis of tuberculosis: A review. *Tubercle and Lung Disease*, **80**, 131-140.
- [15] Ottenhoff, T.H.M., Verreck, F.A.W., Hoeve, M.A. and van de Vosse, E. (2005) Control of human host immunity to mycobacteria. *Tuberculosis*, **85**, 53-64.

- [16] Lee, L.N., Chou, C.H., Wang, J.Y., Hsu, H.L., Tsai, T.H., Jan, I.S., Hsueh, P.R. and Yang, P.C. (2009) Enzyme-linked immunospot assay for interferon-gamma in the diagnosis of tuberculous pleurisy. *Clinical Microbiology and Infection*, **15**, 173-179.
- [17] Pai, M., Zwerling, A. and Menzies, D. (2008) Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: An update. *Annals of Internal Medicine*, **149**, 177-184.
- [18] Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., *et al.* (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, **393**, 537-544.
- [19] Neonakis, I.K., Gitti, Z., Krambovitis, E. and Spandidos, D.A. (2008) Molecular diagnostic tools in mycobacteriology. *Journal of Microbiological Methods*, **75**, 1-11.
- [20] Hance, A.J., Grandchamp, B., Lévy-Frébault, V., Lecossier, D., Raugier, J., Bocart, D. and Gicquel, B. (1989) Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. *Molecular Microbiology*, **3**, 843-849.
- [21] Nagdev, K.J., Kashyap, R.S., Deshpande, P.S., Purohit, H.J., Taori, G.M. and Dagainawala, H.F. (2010) Comparative evaluation of a PCR assay with an in-house ELISA method for diagnosis of Tuberculous meningitis. *Medical Science Monitor*, **16**, 289-295.
- [22] Kox, L.F.F., Rhienthong, D., Miranda, A.M., Udomsantisuk, N., Ellis, K., van Leeuwen, J., van Heusden, S., Kuijper, S. and Kolk, A.H. (1994) A more reliable PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, **32**, 672-678.
- [23] 张捷, 李小英 (1998) PCR 方法检测结核杆菌在实验中存在的问题的探讨. *中国实验临床免疫学杂志*, **4**, 17-19.
- [24] 吕中全, 张明新, 张慧 (2011) 荧光定量聚合酶链反应检测结核分枝杆菌的价值. *新乡医学院学报*, **4**, 435-436.
- [25] 陆宇, 朱莉贞, 段连山 (2005) 结核分枝杆菌活菌检测方法及应用. *结核病与胸部肿瘤*, **1**, 66-71.
- [26] 欧阳晖 (2011) 痰的质量对 PCR 诊断肺结核的影响. *实用预防医学*, **5**, 925-926.
- [27] 郑玉群, 许卫国, 陆伟, 焦永军, 肖占沛 (2010) 免疫磁珠分离涂片和 PCR 检测痰内结核分枝杆菌的诊断价值研究. *江苏预防医学*, **2**, 14-17.
- [28] Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. and Hase, T. (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, **28**, e63.
- [29] Zhu, R.Y., Zhang, K.X., Zhao, M.Q., Liu, Y.H., Xu, Y.Y., Ju, C.M., Li, B. and Chen, J.D. (2009) Use of visual loop-mediated isothermal amplification of rimM sequence for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. *Journal of Microbiological Methods*, **78**, 339-343.
- [30] Tomita, N., Mori, Y., Kanda, H. and Notomi, T. (2008) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols*, **3**, 877-882.
- [31] Neonakis, I.K., Spandidos, D.A. and Petinaki, E. (2011) Use of loop-mediated isothermal amplification of DNA for the rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **30**, 937-942.
- [32] 谌秋华, 杜朝阳 (2013) 环介导等温扩增技术的研究进展. *南昌大学学报*, **1**, 93-95.
- [33] 高闪电, 常惠芸, 独军政, 丛国正, 邵军军, 林彤 (2010) 转录介导的扩增技术及其在诊断中的应用. *中国生物工程杂志*, **4**, 120-124.
- [34] Cui, Z.L., Wang, Y.Z., Fang, L., Zheng, R.J., Huang, X.C., Liu, X.Q., Zhang, G., Rui, D.M., Ju, J.L. and Hu, Z.Y. (2012) Novel real-time simultaneous amplification and testing method to accurately and rapidly detect *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of Clinical Microbiology*, **50**, 646-650.
- [35] 崔振玲, 沙巍, 黄晓辰, 郑瑞娟, 居金良, 胡忠义 (2011) RNA 恒温扩增技术快速检测痰标本中结核分枝杆菌的研究. *中华结核和呼吸杂志*, **12**, 894-897.
- [36] 张津萍, 龚匡隆, 尤永燕, 沙仲, 孙厚华, 王千秋 (2010) 实时荧光核酸恒温扩增法检测泌尿生殖道淋球菌感染. *国际皮肤性病杂志*, **3**, 137-139.