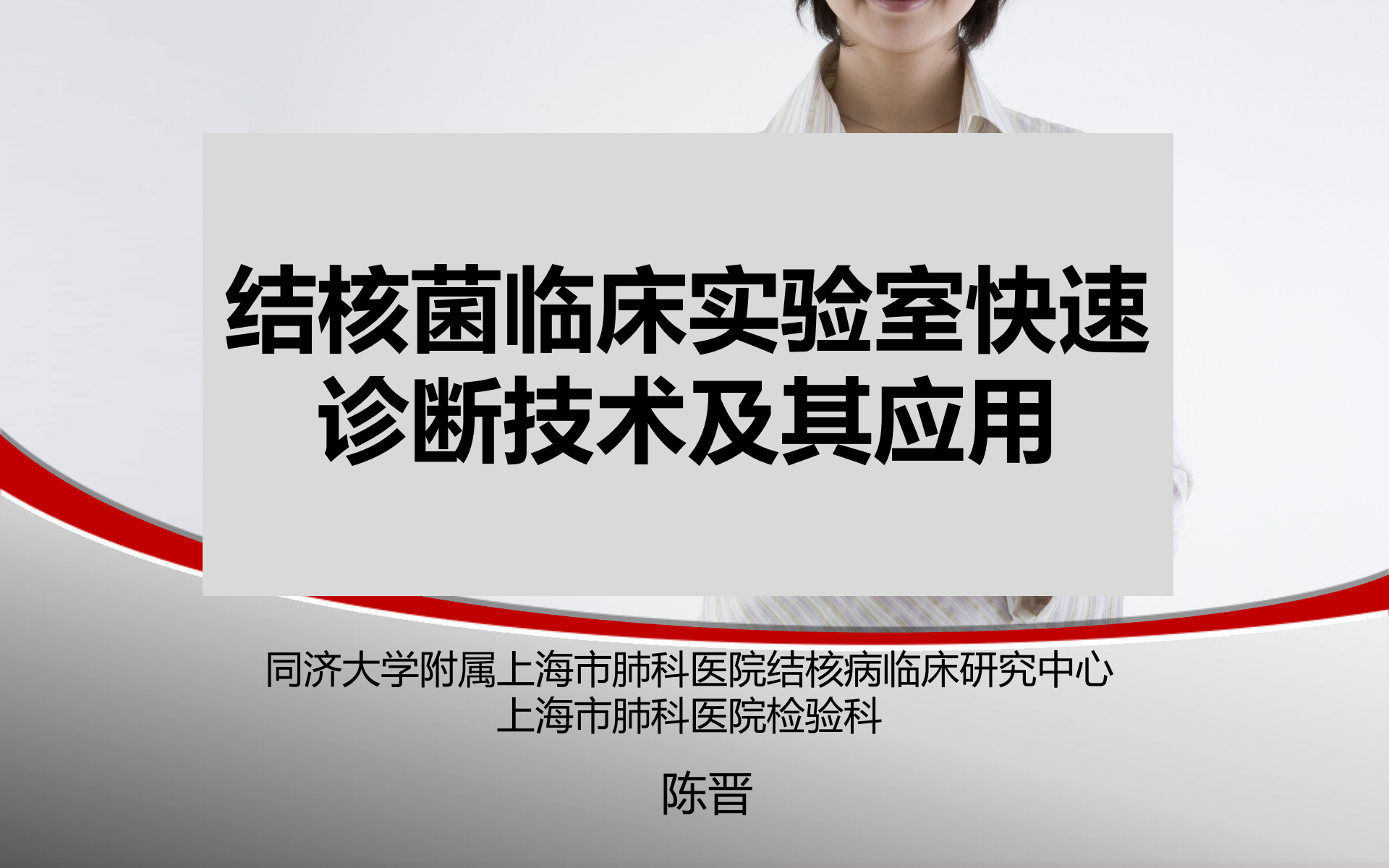




结核菌临床实验室快速 诊断技术及其应用

同济大学附属上海市肺科医院结核病临床研究中心
上海市肺科医院检验科

陈晋

目录 Contents

1 结核病的临床诊断方法

2 结核菌实验室诊断技术分类

3 常用的实验室快速诊断技术



结核病的临床诊断方法

(一)肺结核的临床表现

有下列表现应考虑肺结核的可能，应进一步做痰和胸部X线检查。应注意约有20%活动肺结核患者也可以无症状或仅有轻微症状。

1. 咳嗽、咳痰三周或以上，可伴有咯血、胸痛、呼吸困难等症状。
2. 发热(常午后低热)，可伴盗汗、乏力、食欲降低、体重减轻、月经失调。
3. 结核变态反应引起的过敏表现：结节性红斑、泡性结膜炎和结核风湿症

(Poncet病)等。

4. 结核菌素(PPD-C5TU)皮肤试验：我国是结核病高流行国家，儿童普种卡介苗，阳性对诊断结核病意义不大，但对未种卡介苗儿童则提示已受结核分枝杆菌(简称结核菌)感染或体内有活动性结核病。当呈现强阳性时表示机体处于超过敏状态，发病机率高，可做为临床诊断结核病的参考指征。

5. 患肺结核时，肺部体征常不明显。肺部病变较广泛时可有相应体征，有明显空洞或并发支气管扩张时可闻及中小水泡音。康尼峡缩小提示肺尖有病变。

结核病的临床诊断方法

(二)肺结核的影像诊断

细菌学检查是肺结核诊断的确切依据，但不是所有的肺结核都可得到细菌学证实。胸部X线检查也常是重要的。但是肺结核的胸部X线表现并无特征性改变，需注意与其他肺部疾病鉴别。

一般而言，肺结核胸部X线表现可有如下特点：

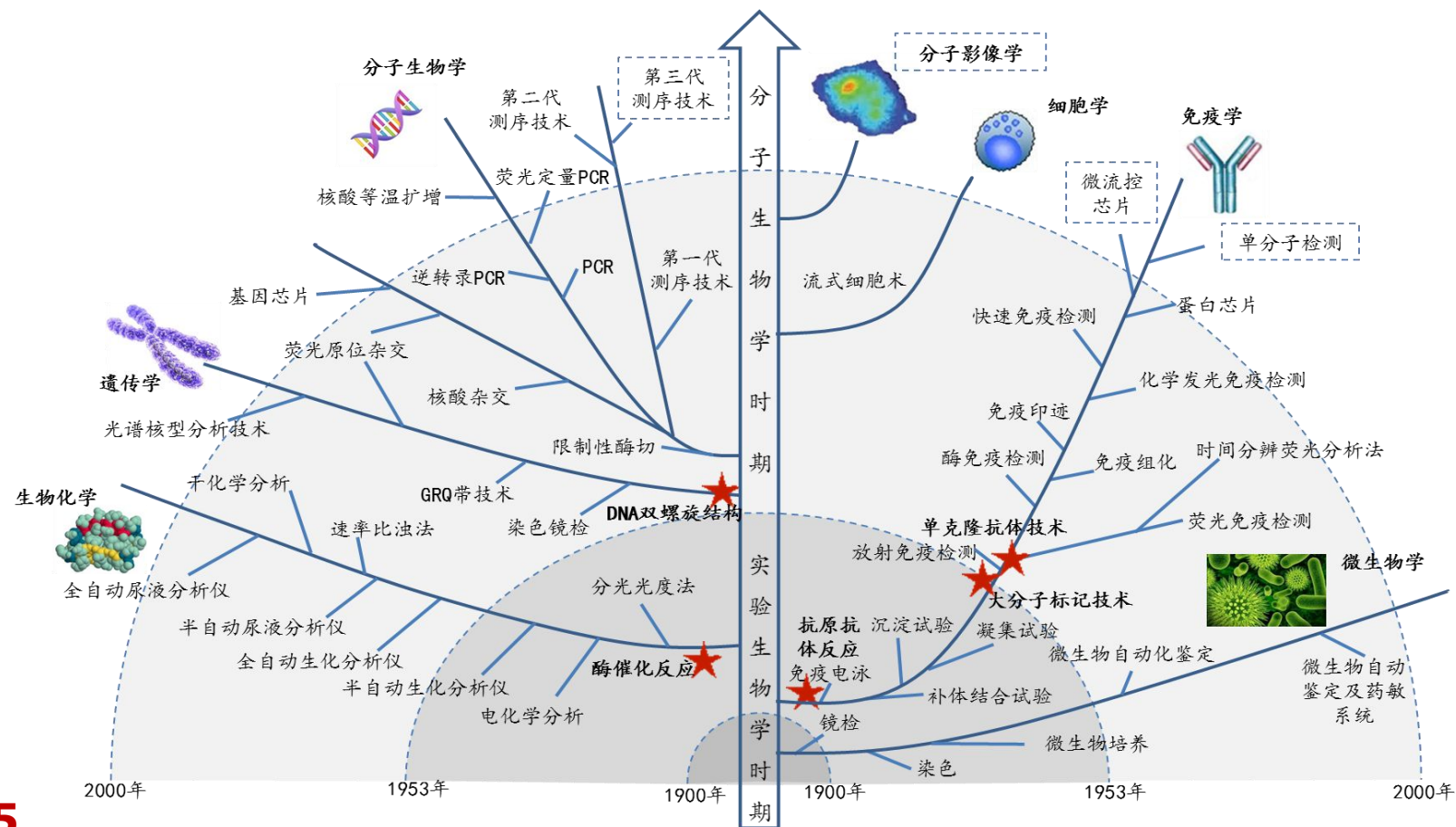
1. 多发生在肺上叶尖后段、肺下叶背段、后基底段。
2. 病变可局限也可多肺段侵犯。
3. X线影像可呈多形态表现(即同时呈现渗出、增殖、纤维和干酪性病变)，也可伴有钙化。
4. 易合并空洞。
5. 可伴有支气管播散灶。
6. 可伴胸腔积液、胸膜增厚与粘连。
7. 呈球形病灶时(结核球)直径多在3cm以内，周围可有卫星病灶，内侧端可有引流支气管征。
8. 病变吸收慢(一个月以内变化较小)。

胸部CT扫描对如下情况有补充性诊断价值：

1. 发现胸内隐匿部位病变，包括气管、支气管内的病变。
2. 早期发现肺内粟粒阴影。
3. 诊断有困难的肿块阴影、空洞、孤立结节和浸润阴影的鉴别诊断。
4. 了解肺门、纵隔淋巴结肿大情况，鉴别纵隔淋巴结结核与肿瘤。
5. 少量胸腔积液、包裹积液、叶间积液和其他胸膜病变的检出。
6. 囊肿与实体肿块的鉴别。

结核病的临床诊断方法

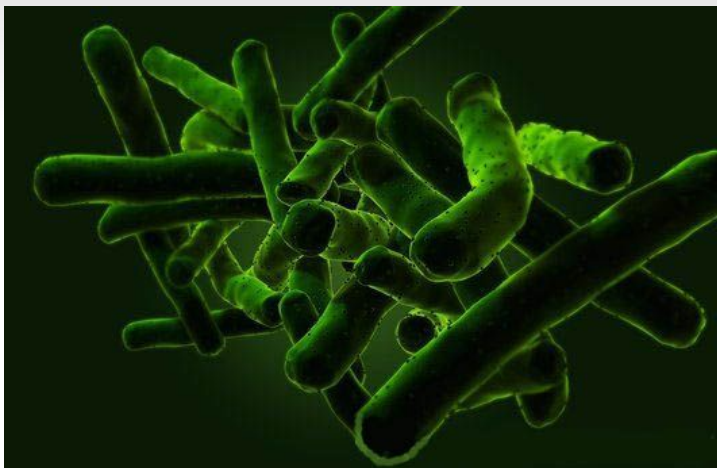
病原学诊断技术的发展简史



结核菌的特点

结核菌——最难鉴定的细菌之一：

- 生长缓慢；
- 脂质结构；
- 胞内生长；
- 抵抗力强；
- 有休眠（或静息）状态——影响抗痨药物发挥作用。

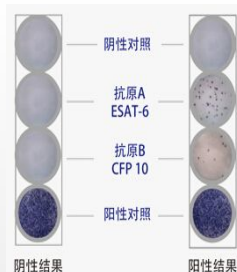


结核病快速准确病原学诊断是所有问题的核心和瓶颈！

结核病常用的诊断技术和存在问题

免疫学技术：间接证据

细胞免疫
检测方法：
如T-Spot



- ① 临床更愿意接受的方法（因胞内生长）；
- ② 国内仿制成功并获得SFDA批准，但可能存在知识产权争议；
- ③ 质量性能尚需行业评估。

细菌学技术：直接证据

抗酸染色
罗氏培养
——金标准



- ① 涂片：阳性率低，无法区分细菌死活、无法区分MTBC和NTM；
- ② 培养：阳性率50%—80%，培养耗时1—2个月。

核酸扩增技术：直接证据

Nucleus Acid
Amplification, NAA

病原诊断：
PCR、GenXpert、芯片、HRM等：SAT、CPA、LAMP等
耐药检测：
Hain、芯片等

结核菌实验室诊断按照循证医学的要求分为：

- 直接证据（针对病原体）：——首选

涂片、培养、**NAA (Nucleus Acid Amplification)**

公司：仁度（SAT）、优仕达（CPA）、
迪奥/华峰（LAMP）、
厦门至善（HRM）等

荧光定量PCR产品：

凯杰、达安、之江等

——高技术水平产品可数小时出报告，价格低廉，便于推广，利于结核防治工作开展；然而仍缺乏广泛整体的临床应用综合评价。

- 间接证据（免疫应答或其他非特异性反应指标）：
T-spot、TB-Ab、ADA等

NAA按用途分为：



NAA按扩增温度分为：



1.2 美国结核快速诊断的发展历程和认知

2008年

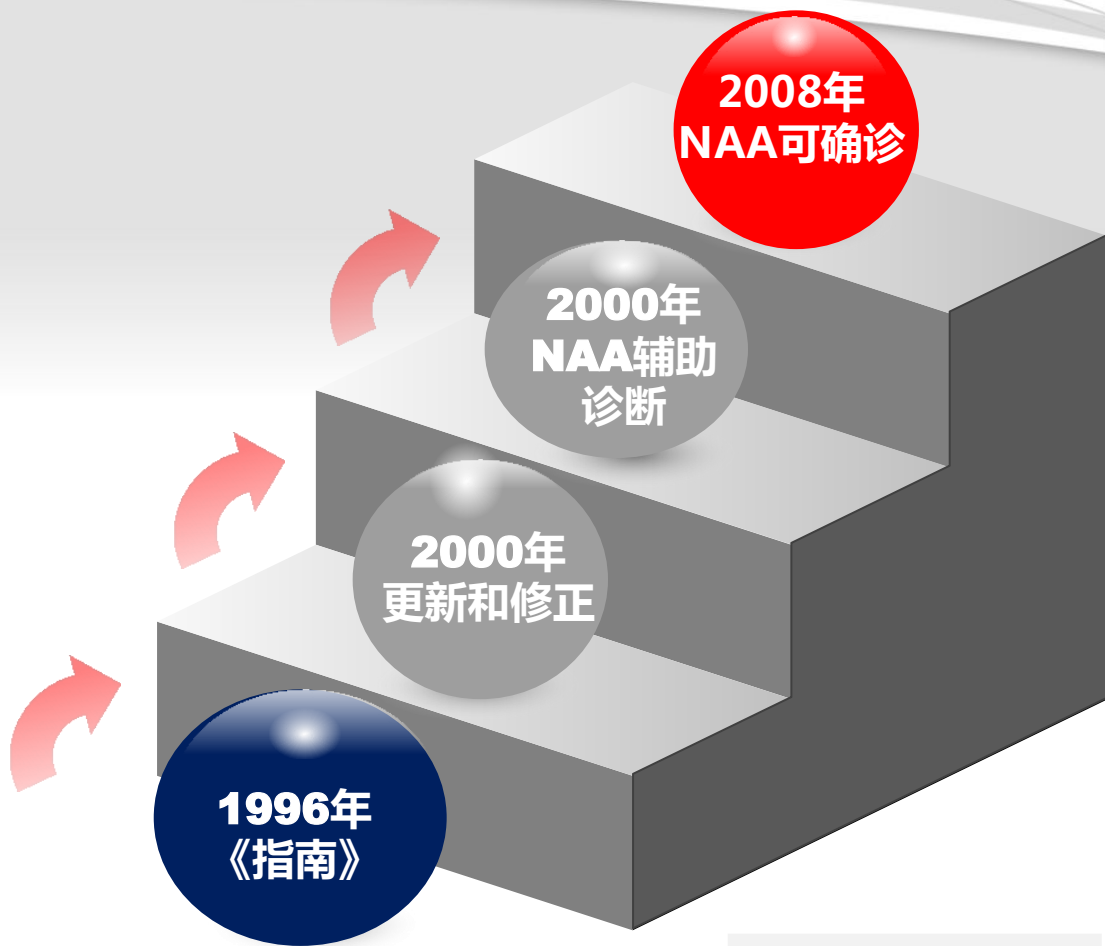
美国**CDC**和**APHL**再次对指南进行修订，并提出“**NAA实验可以作为结核确诊实验**”。

2000年

对指南加以更新和修订；并大量开展**NAA**技术辅助诊断结核。

1996年

制定《结核菌的核酸扩增检测试验指南》。



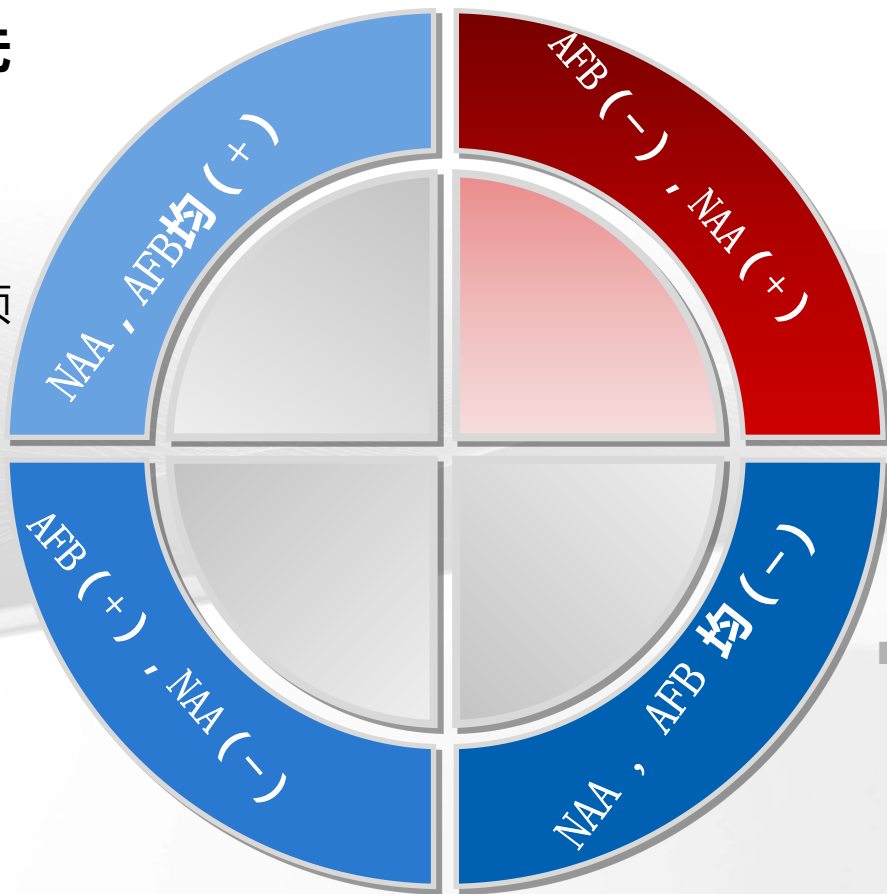
NAA配合涂片结果解释：

■ 可开展抗痨治疗，无
需等待培养结果，

(因FDA批准AFB阳性的
标本NAA实验阳性预
测值>95%。)

复查或抑制物检测：

◆ 若存在抑制物，**NAA
无意义**，考虑其他检
查，结合临床判断；
◆ 无抑制物，复查仍为
同一结果，**考虑非结
核。**



- 在等培养结果时，**结合临床决定是否治疗；**
- 或进行其他实验检测；
- 或考虑复查NAA。

- **结合临床，NAA尚
不是足够敏感。**

二、国内结核病诊断领域的产品现状

临床免疫学和分子生物学的出现给临床快速诊断带来了希望，T-Spot、GenXpert 和 hain（三种均为国外产品）已在一定程度上达到了快速诊断目的。

- ✓ **T-Spot**：可区分卡介苗接种和新近感染、费外结核病和潜伏感染诊断的目的；
- ✓ **GenXpert**：实现了完全自动化处理，还可检测利福平、异烟肼耐药基因；
- ✓ **Hain**：可检测多种耐药基因。

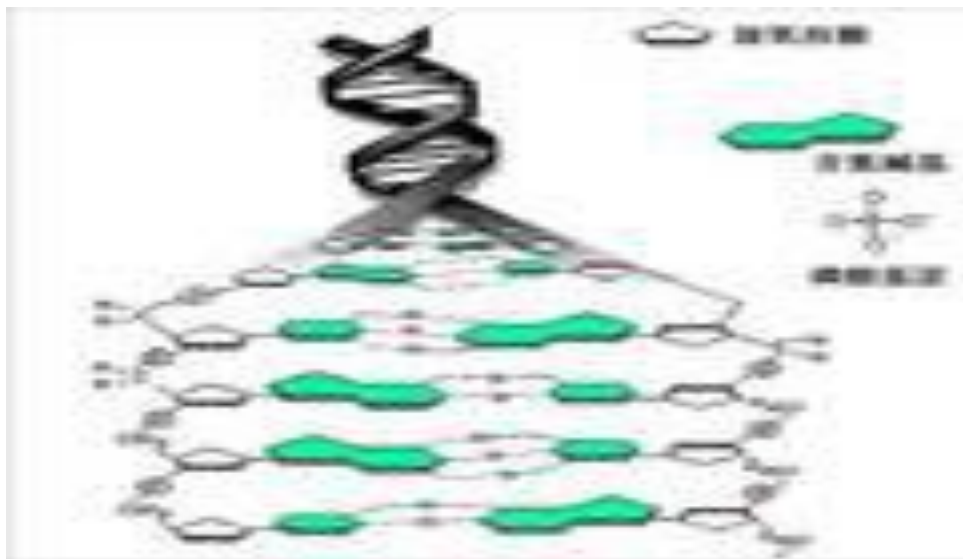
虽然，SFDA批准了国内一些仿制T-Spot的公司产品上市，但仍有知识产权争议风险。

临床检测项目基本要求

- 政策法规三证要求
 - 生产许可证（ GMP ）
 - 医疗器械注册证（ SFDA ）
 - 经营许可证
- 物价收费许可（ 发改委、物价局 ）
- 方法学要求：简单、准确、快速、价廉

NAA三个步骤

- 样品提取
- 扩增
- 检测

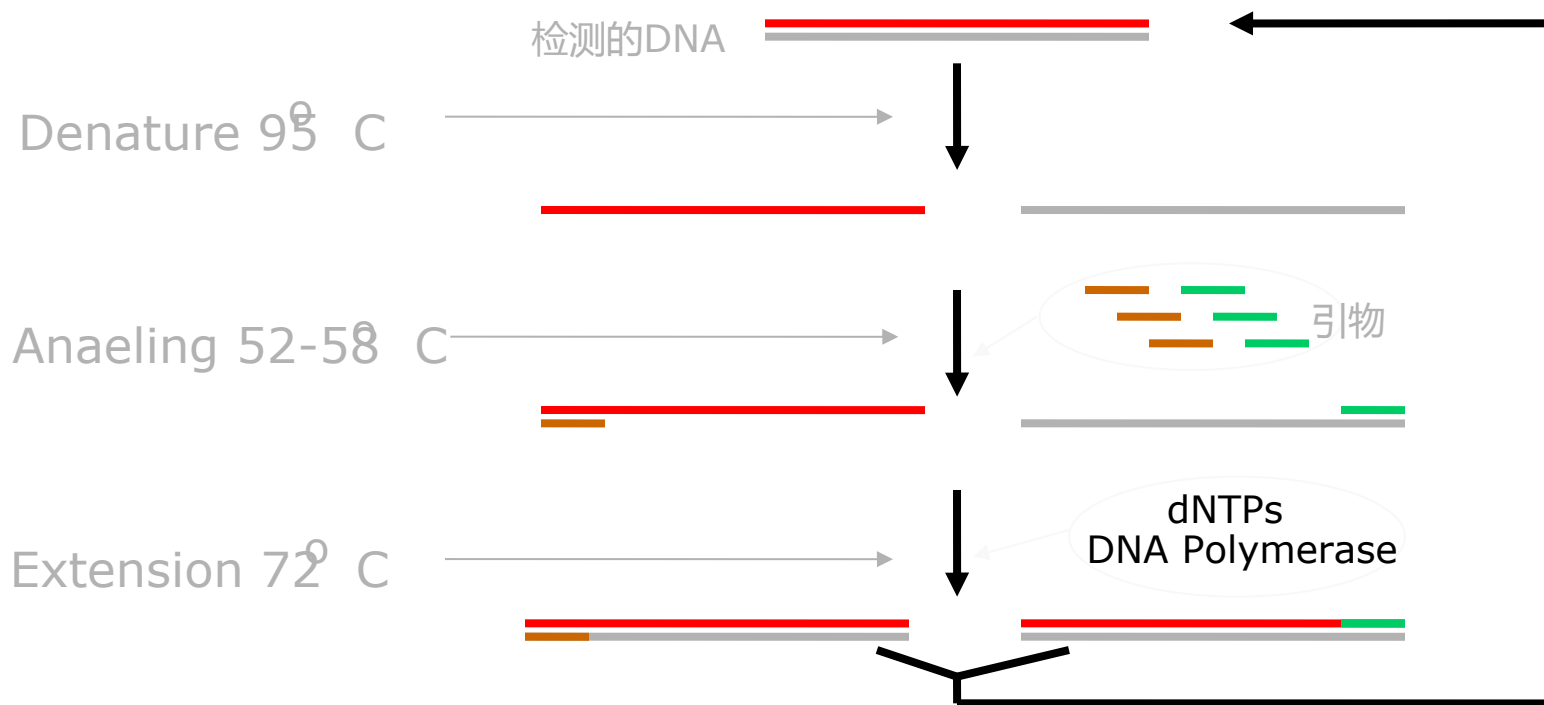


核酸提取方法

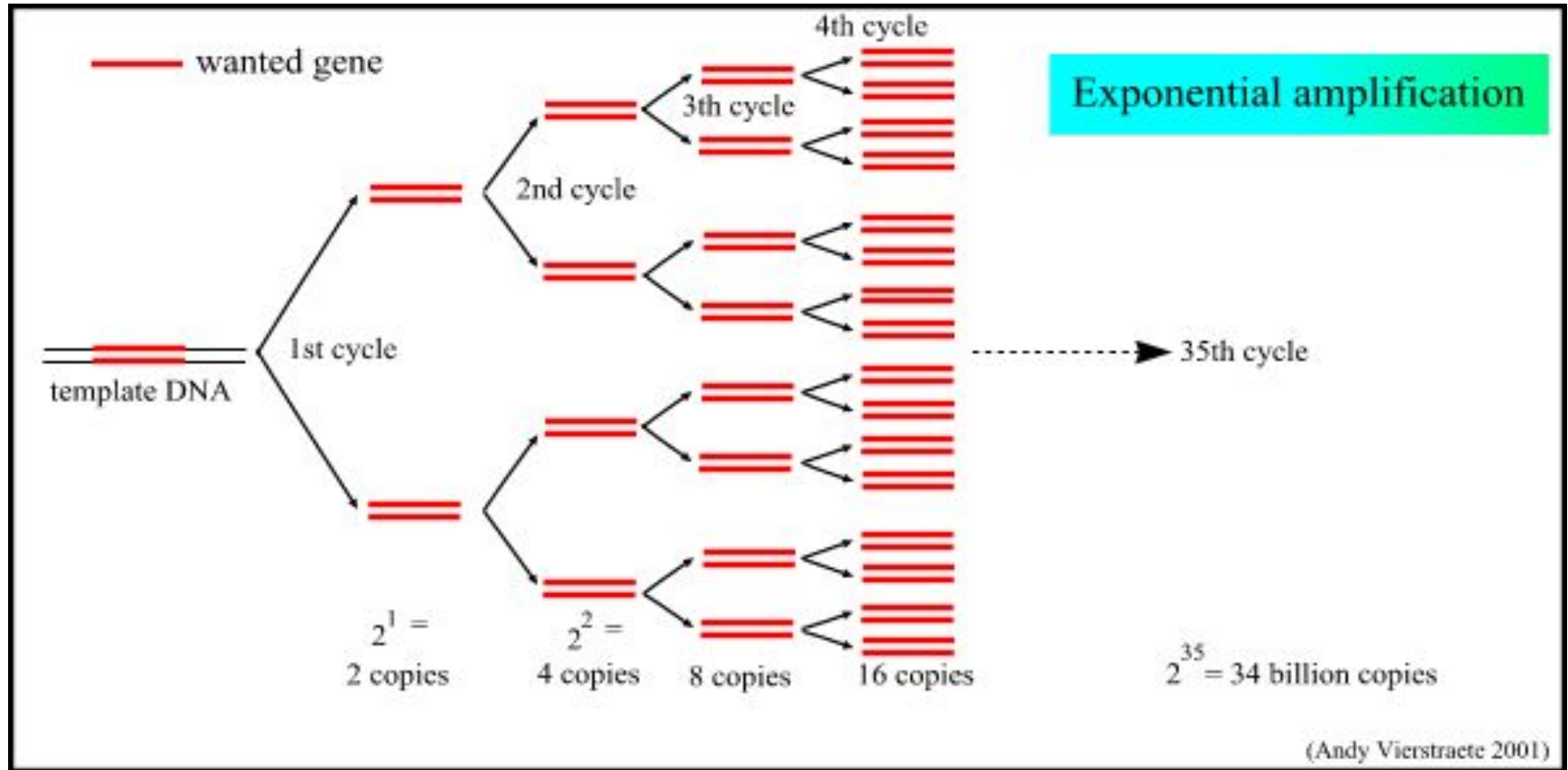
- 煮沸法
- 离心柱
- 磁珠法

PCR扩增原理

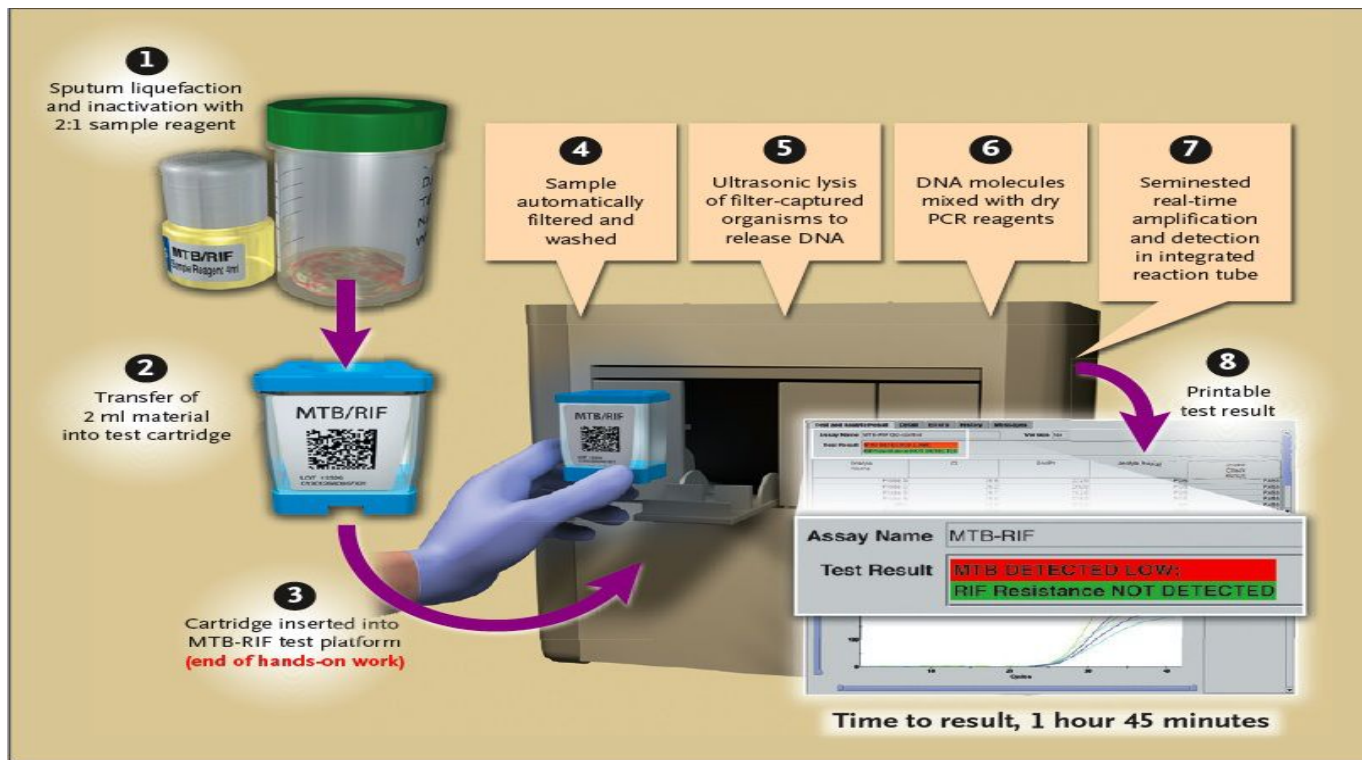
PCR的成分：靶分子、引物、dNTP、酶、缓冲液、镁离子



PCR扩增原理

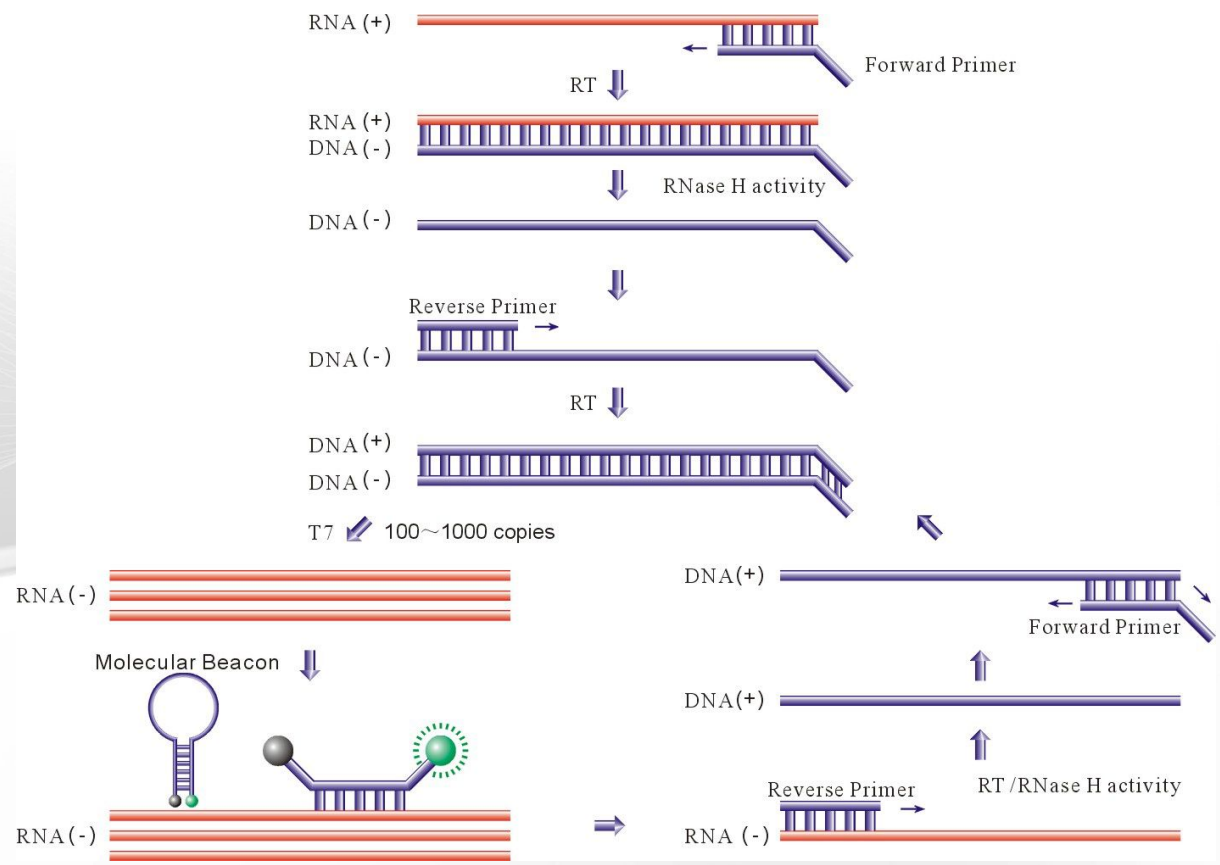


Xpert MTB/RIF



基因水平-PCR技术

SAT基本原理：



RNA作为临床分子诊断靶标的优点

➤ RNA 拷贝数 $\geq$ DNA拷贝数

➤ 更具临床意义

生命力旺盛的病原体RNA转录活跃

➤ RNA远不如DNA稳定

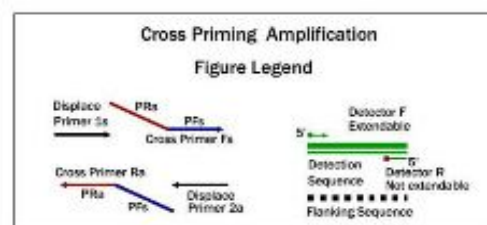
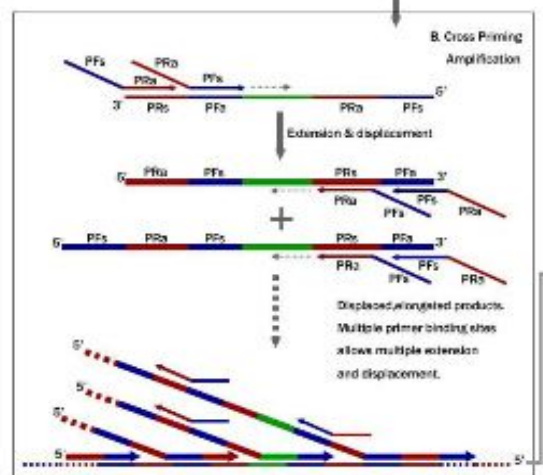
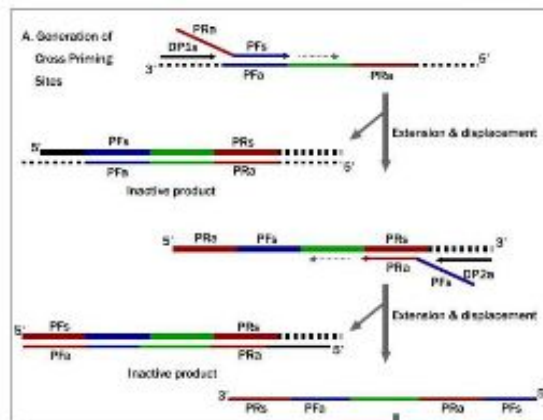
➤ 病原体死亡，RNA很快降解

1.交叉污染少

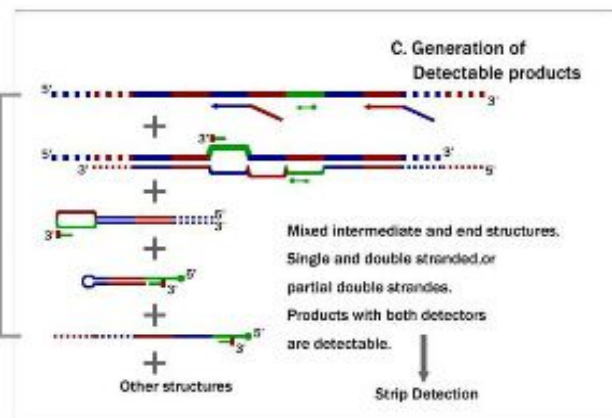
2.较好的愈后指标

恒温扩增-SAT技术

CPA技术原理：



Abbreviations
 PFs = cross Primer Forward sense
 PRa = cross Primer Reverse anti-sense
 DP1s = Displace Primer 1 sense
 DP2s = Displace Primer 2 anti-sense
 Detector F = Detector forward, 5' labeled, extendable
 Detector R = Detector Reverse, 3' labeled, not extendable



A:引入交叉引物位点

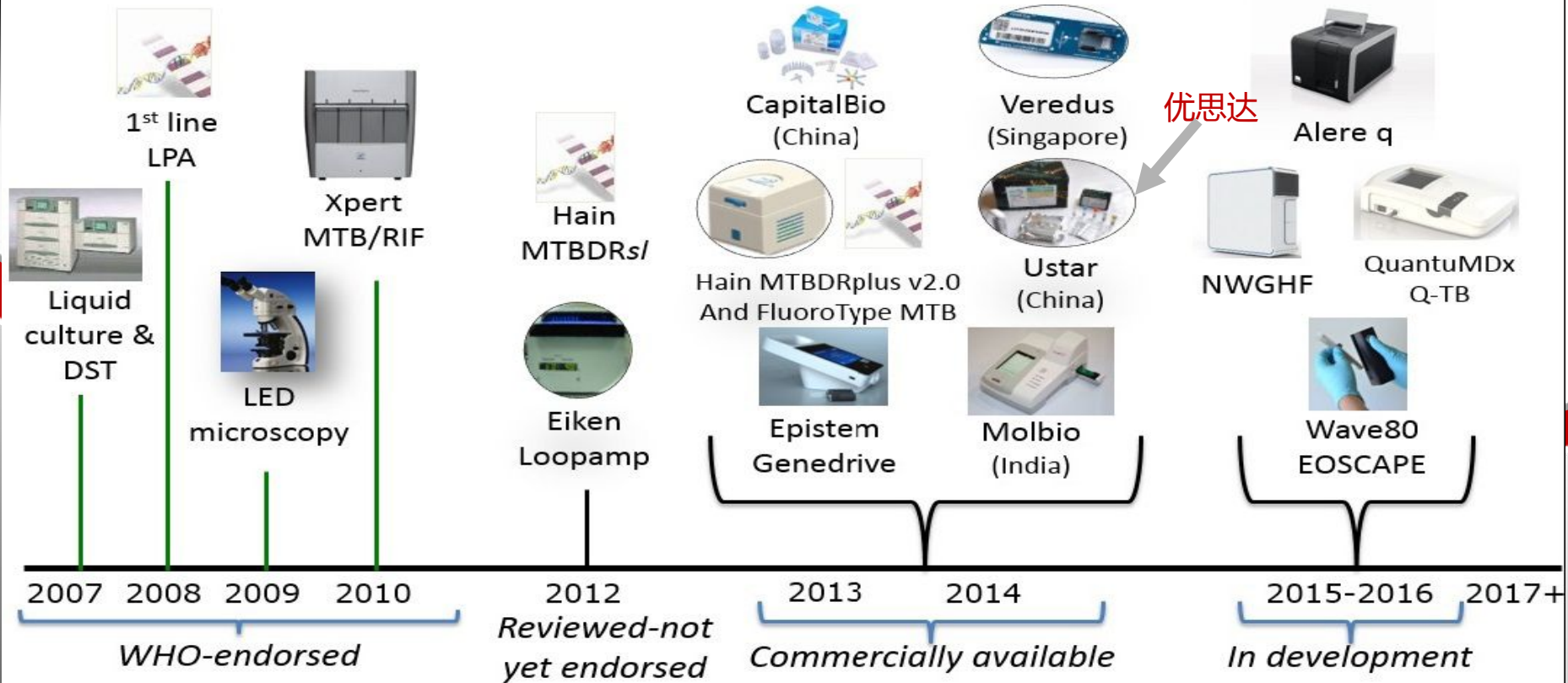
B:交叉引物扩增

C:检测产物

CPA产品被列入联合国推荐采购名录

Commercial TB products & development pipeline*

New and emerging technologies in an increasingly competitive market



全自动仪器

Workflow: Self contained cartridge – just add sample

GeneXpert

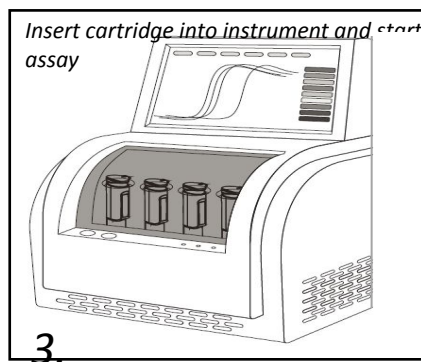
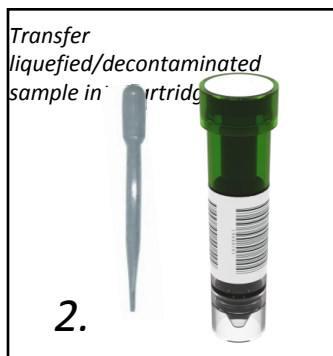
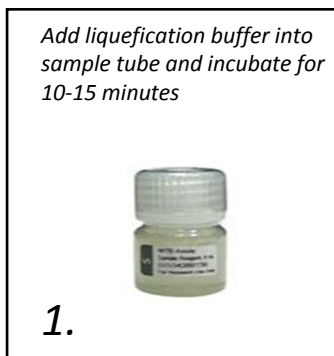


External Computer



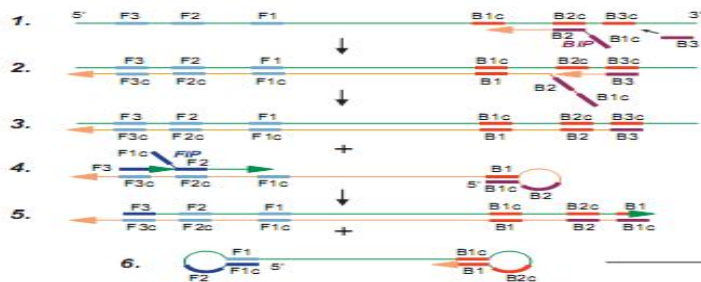
TOTAL HANDS-ON TIME = 2 MINUTES

CPA 2nd
G



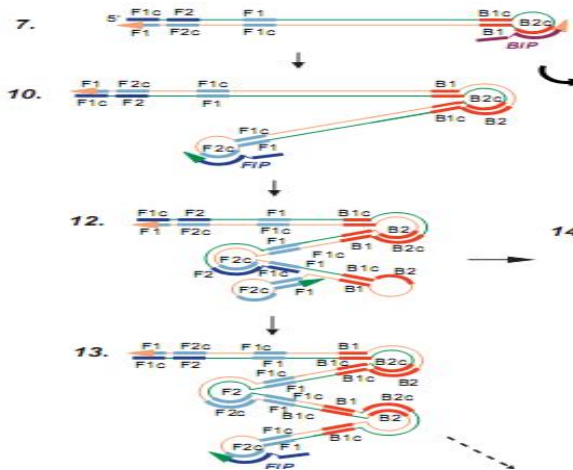
结核分枝杆菌核酸环介导恒温扩增检测法

Starting material producing step

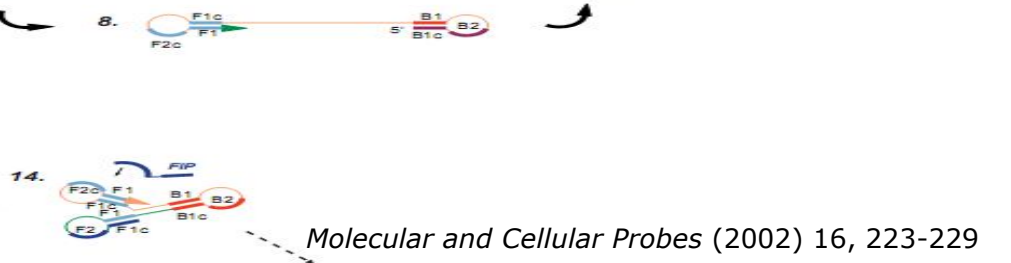


1. Primer extension from BIP.
2. Strand displacement extension by B3.
4. In the displaced strand, the extension from F1P and then the displacement by F3.
6. The displaced single strand forms "dumbbell-like structure".

Elongation step



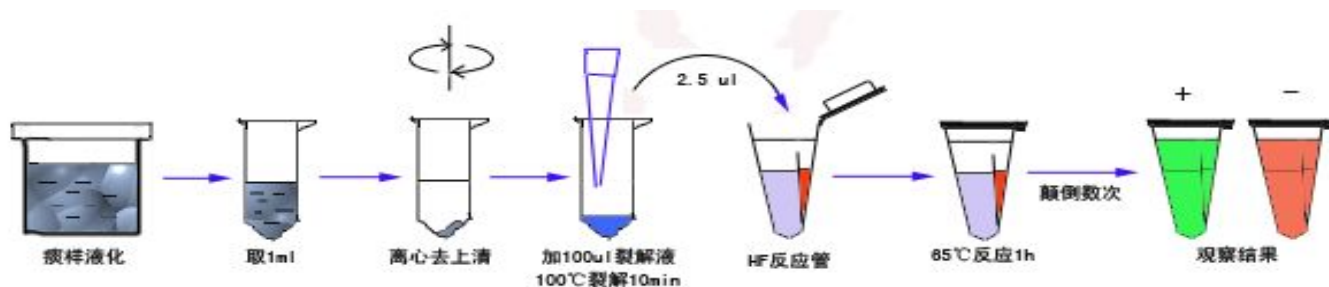
Cycling amplification step



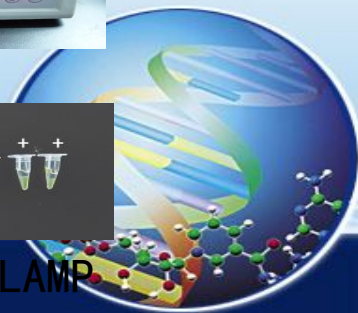
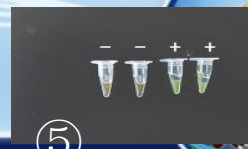
Molecular and Cellular Probes (2002) 16, 223-229

恒温扩增-LAMP

环介导恒温扩增法操作步骤



- ①样品及试剂准备
- ②加样
- ③65°C 反应60 min
- ④颠倒数次
- ⑤观察结果

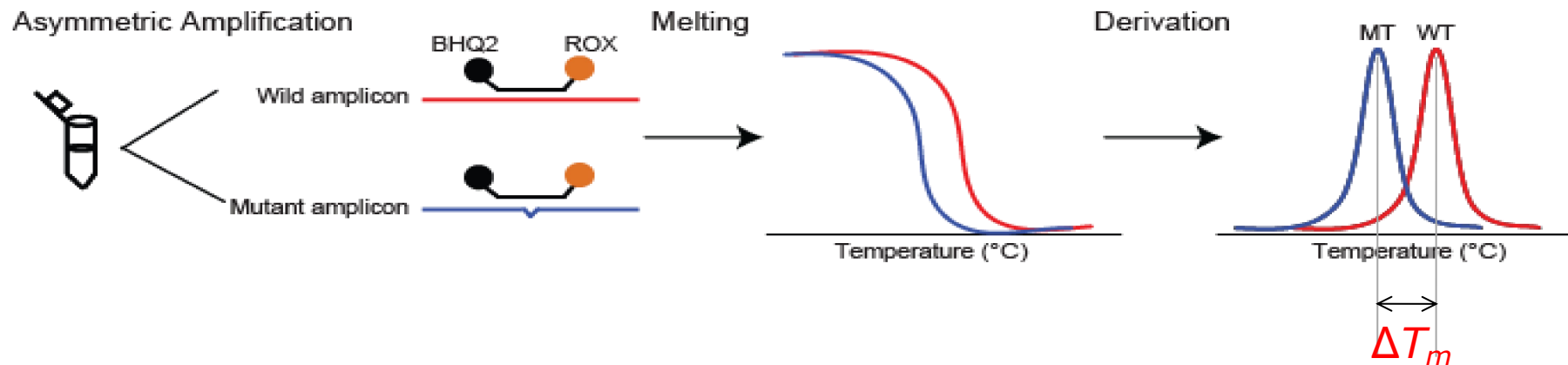


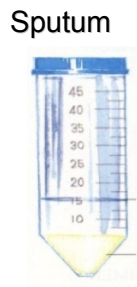
操作简便、无需开盖、结果直观。

恒温扩增-LAMP

探针熔解曲线工作原理

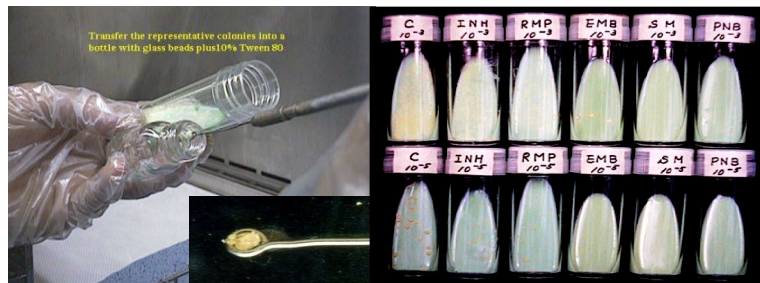
在一定环境下，DNA双链在其长度和序列一定时， T_m 值也一定，是其固有性质，当发生错配时， T_m 值下降，下降的幅度与发生错配的碱基数目、类型和位置有关。





涂片

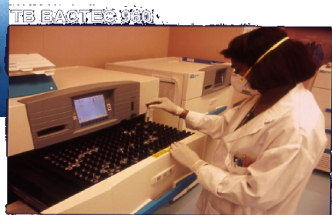
培养—孵育8周
(阳性)



药敏试验—观察 孵
育4周观察生长情况

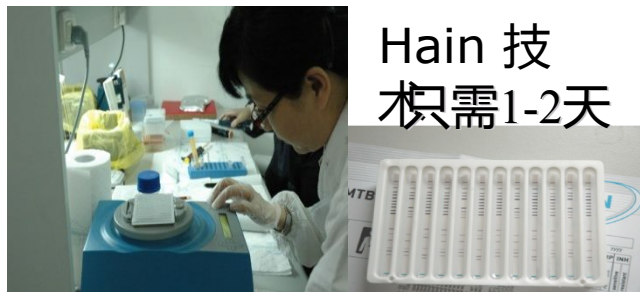
平均时间2-3个月

液体培养及药敏试验
平均时间20天



涂片
(阳性)

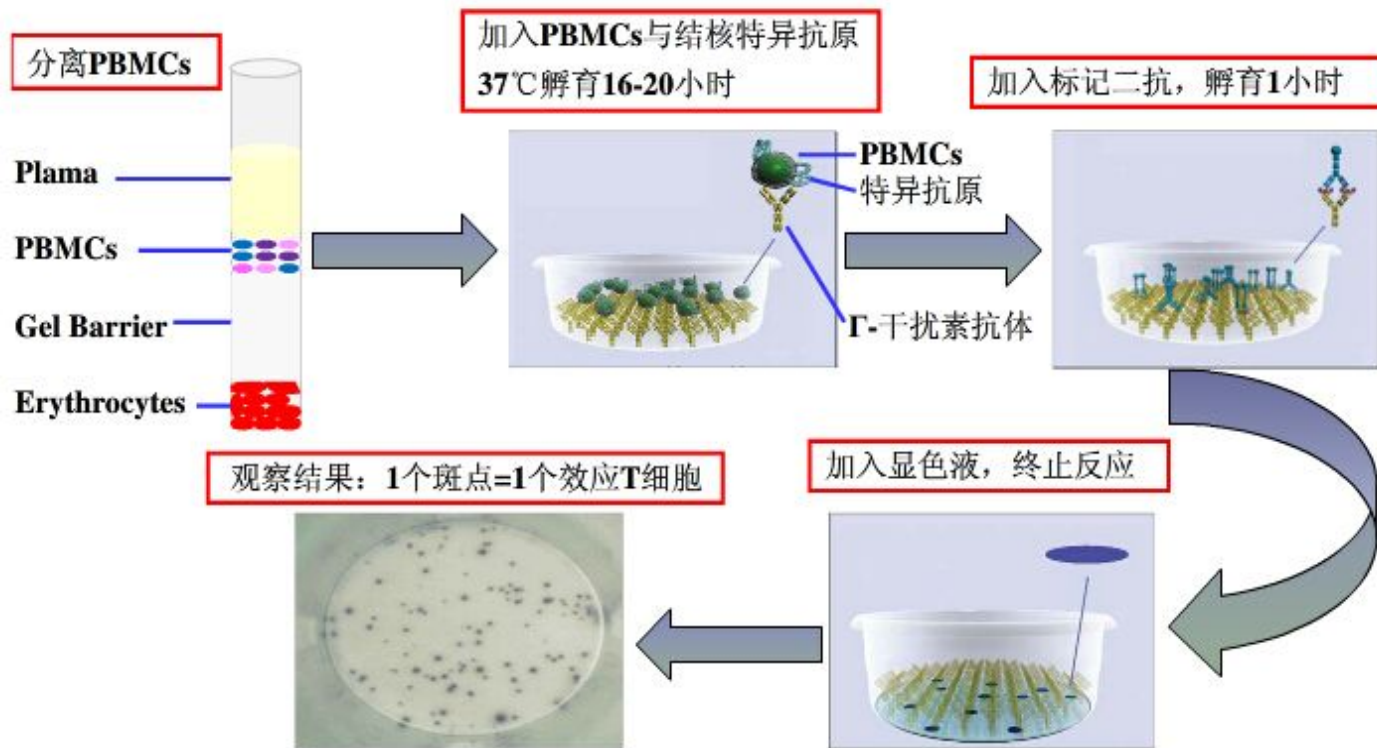
Hain 技
术 只需1-2天



免疫学诊断技术

T-spot: γ -干扰素释放实验 (IGRA)

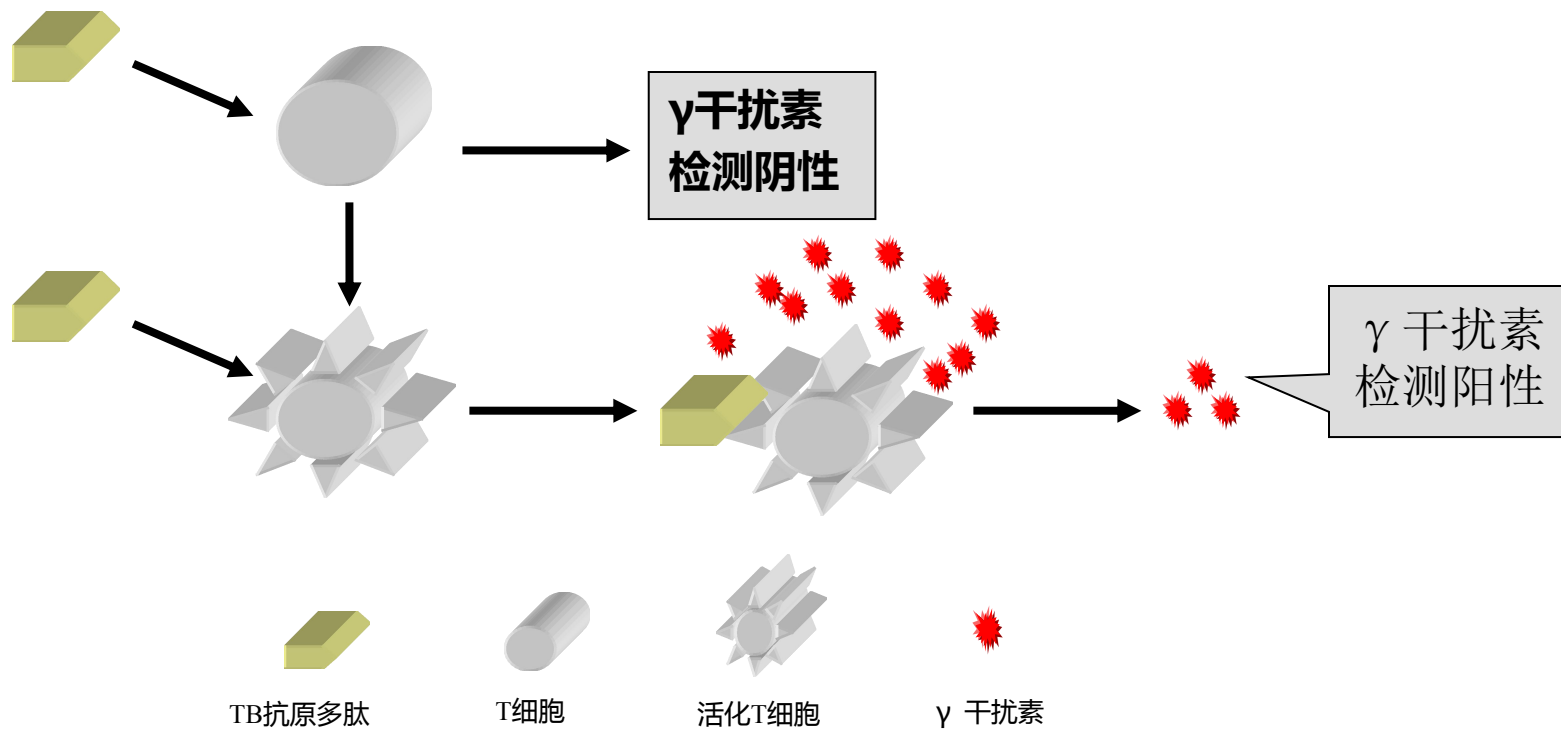
T-Spot 检测过程：



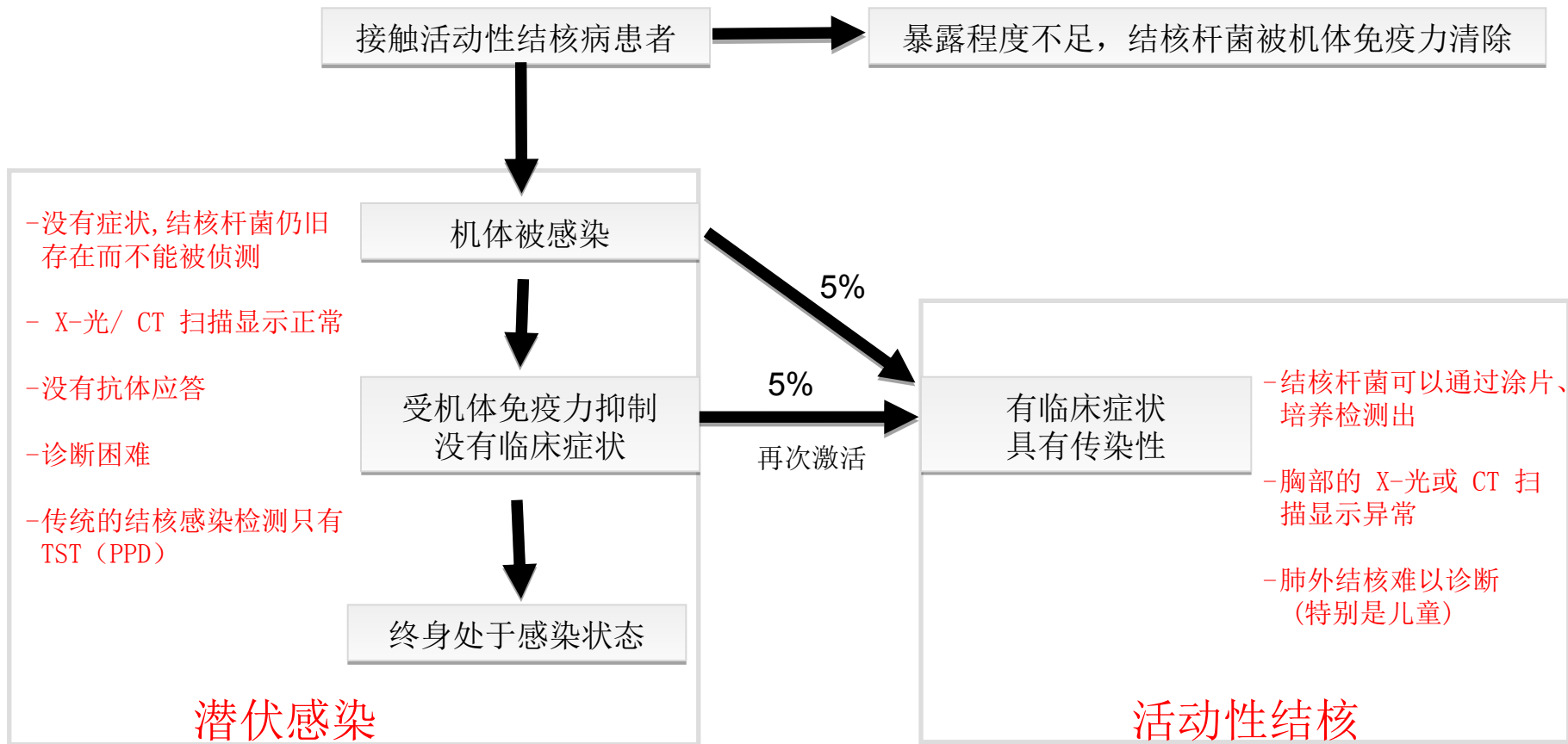
γ -干扰素释放实验（IGRA）

- 结核感染者体内存在特异的效应T淋巴细胞，效应T淋巴细胞再次受到结核抗原刺激时会分泌多种细胞因子（ $\text{IFN-}\gamma$ ）。因此，检测效应T淋巴细胞可用于结核病或结核潜伏感染者的诊断。
- 由于效应T细胞存活时间很短，而且具有特异性，因此可以作为机体是否正处于被感染的指标，无论是否有临床症状。
- 基于IGRA原理的产品目前已被美国、加拿大、英国、德国、意大利、瑞士、法国、荷兰、日本等二十余个国家写入本国的结核诊疗指南中

γ -干扰素释放实验 (IGRA)



活动性结核与潜伏感染



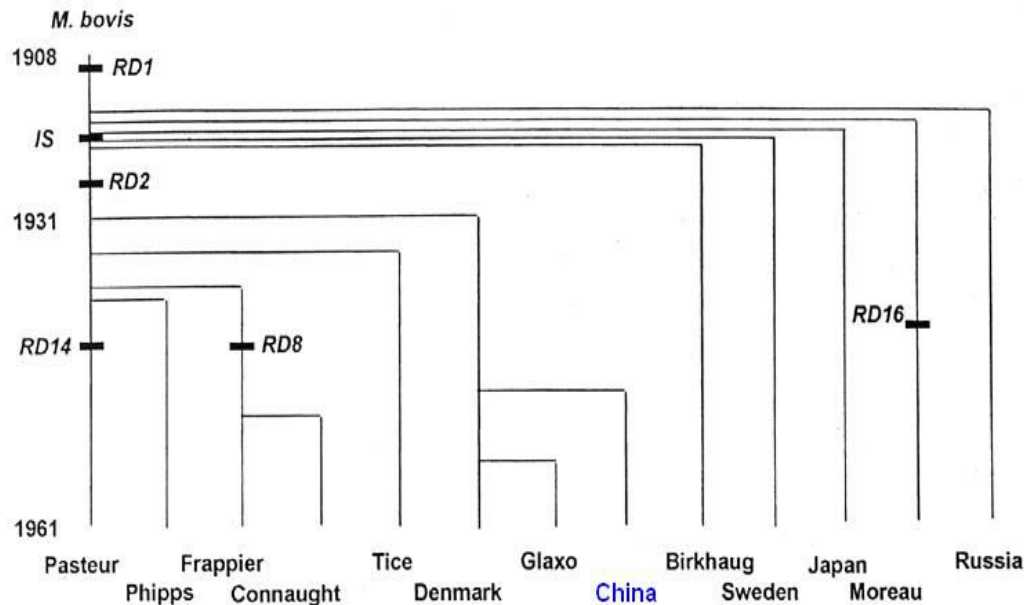
技术背景

- γ -干扰素释放实验
(IGRA, interferon- gamma release assay)
- 酶联免疫斑点技术
(ELISPOT, Enzyme-Linked ImmunoSpot assay)
- 结核杆菌特异抗原
早期抗原靶6 (ESAT-6)
early secreted antigenic target 6
培养滤液蛋白10 (CFP 10)
culture filtrate protein 10)

结核杆菌特异抗原

ESAT-6与CFP 10抗原

- 由结核杆菌基因组**RD1**区相同的操纵子编码的蛋白
- 所有的卡介苗（**BCG**）均丢失该基因序列
- 绝大多数环境分枝杆菌也不存在**RD1**区



T-SPOT. *TB* 特点

- 特异性好，不受卡介苗（BCG）接种和环境分枝杆菌影响
- 灵敏度高，在免疫力低下/受抑制人群中有很高的检出率
- 快速，24小时报告结果

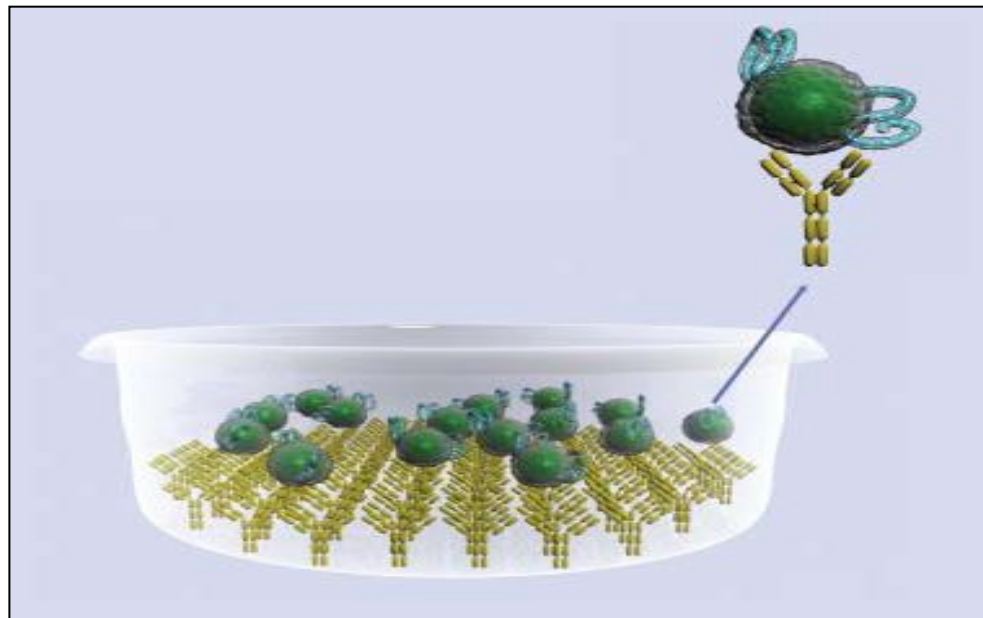
检测过程

- 采集样本（外周抗凝全血）
- 密度梯度离心分离外周血
单个核细胞（PBMCs）
- 洗涤PBMCs



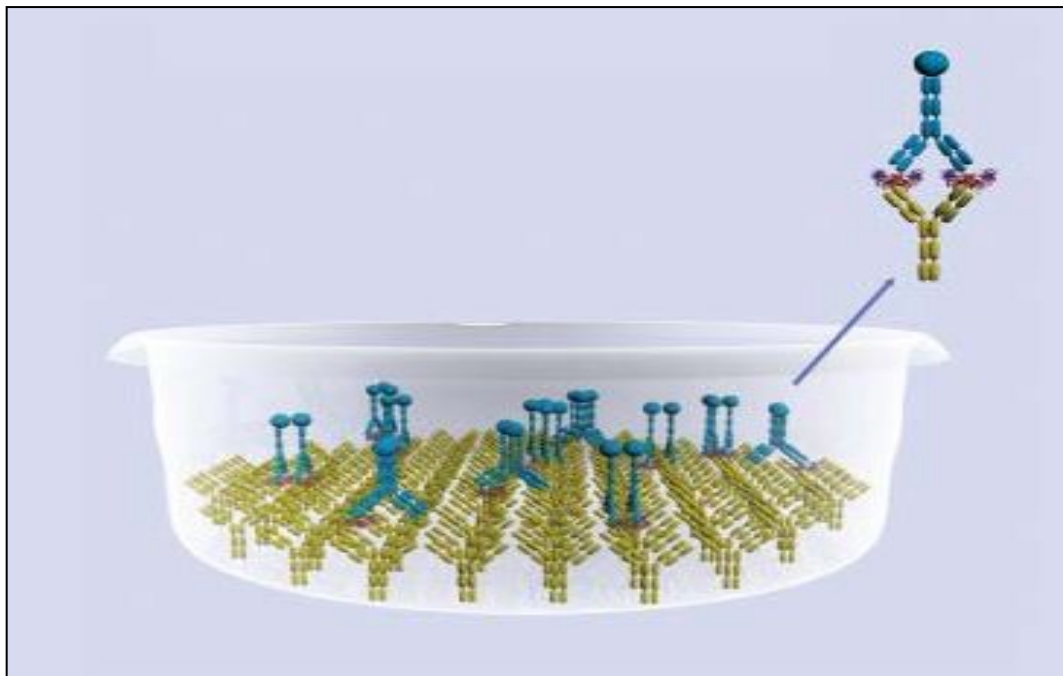
检测过程

- 把PBMCs与结核特异抗原一同加入到预包被抗 γ -干扰素抗体的培养孔中
- 37℃孵育16-20小时



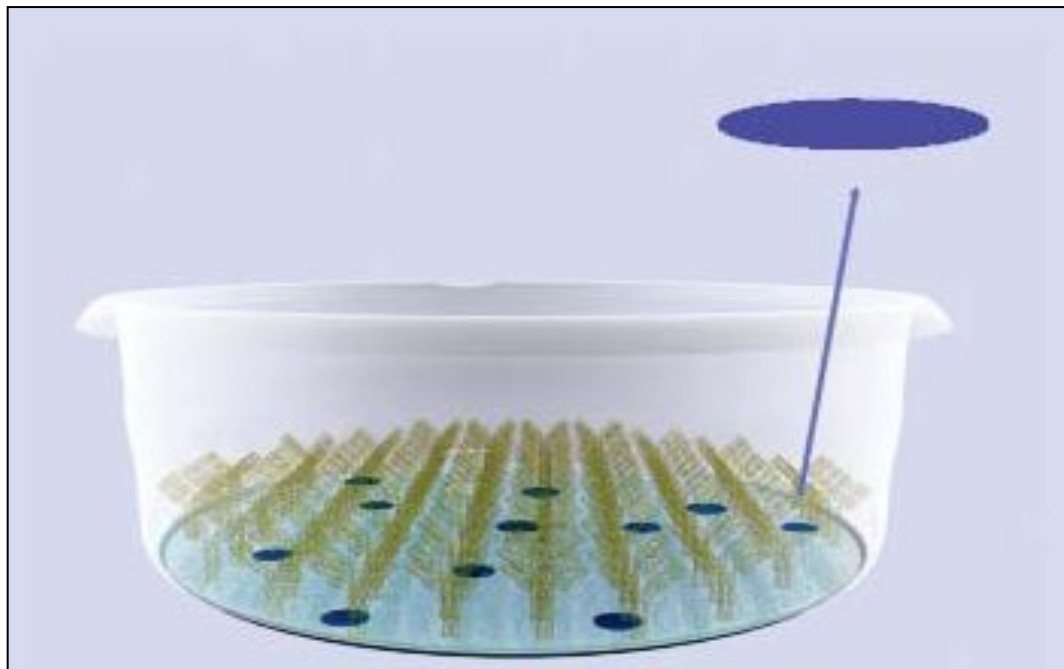
检测过程

- 洗涤培养孔
- 加标记二抗
- 孵育1小时



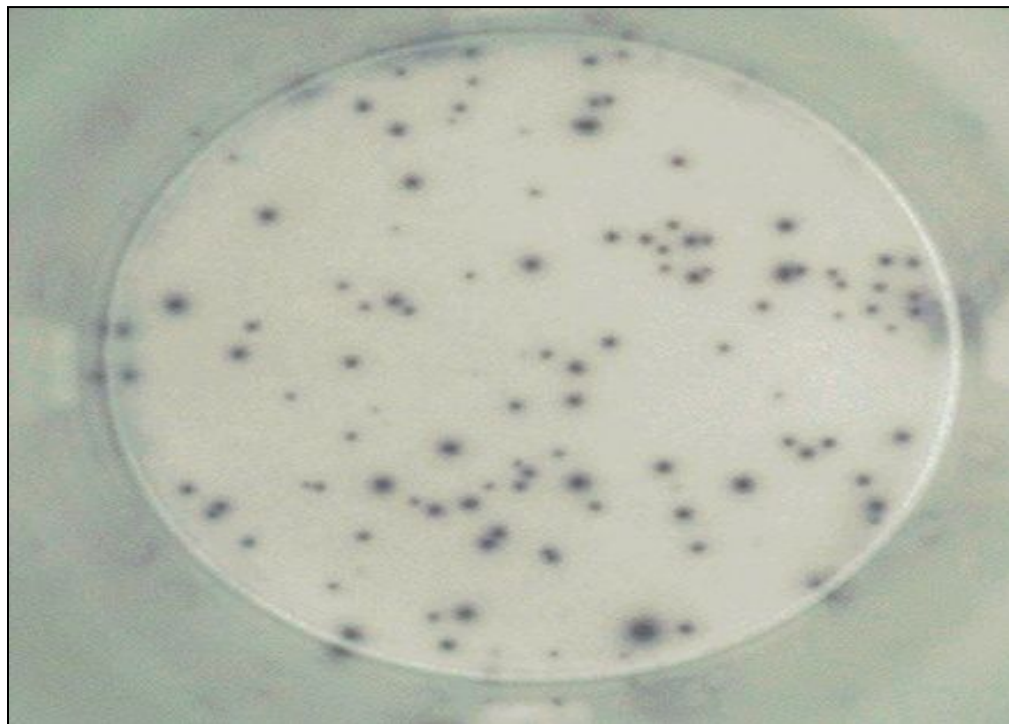
检测过程

- 洗涤培养孔
- 加显色液
- 用蒸馏水终止反应

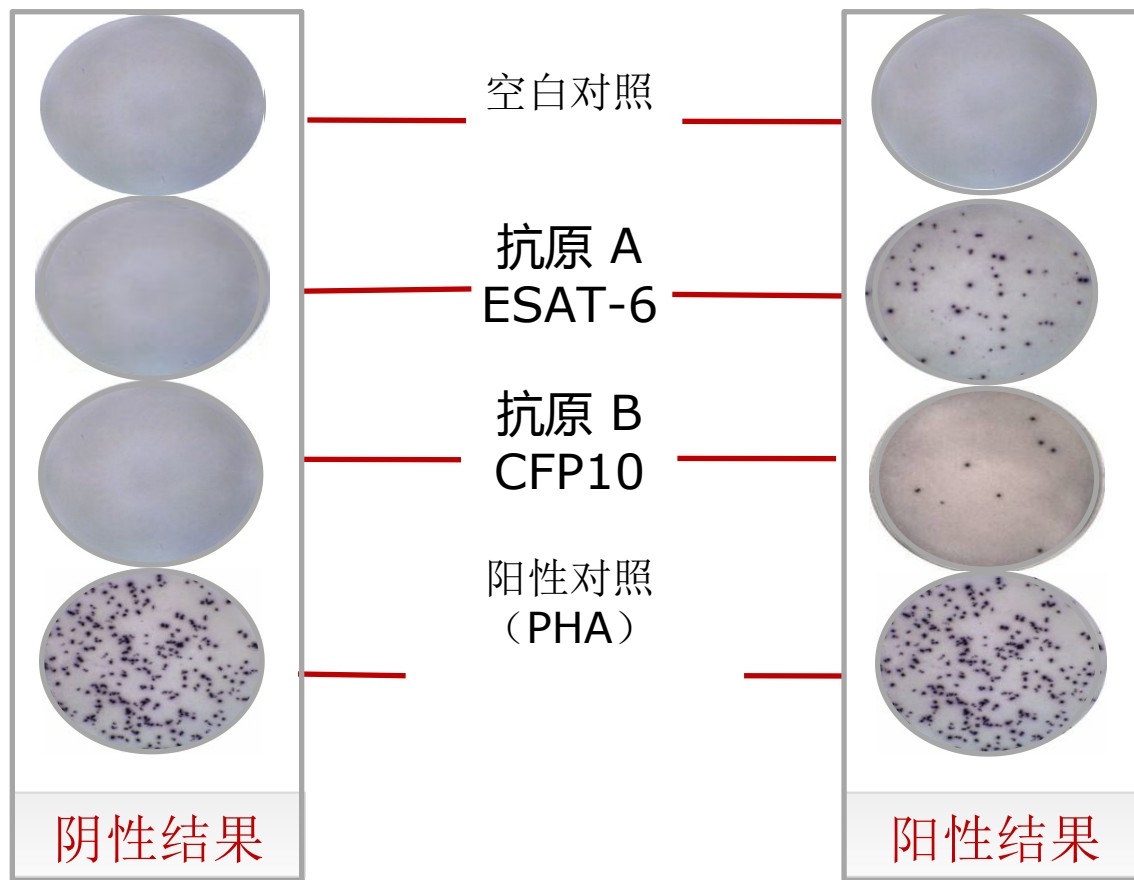


检测过程

1个斑点=1个效应T细胞



实际效果图



临床性能指标

- 美国FDA认证临床实验数据
- 经培养确诊的结核病患者样本183例
- 灵敏度95.6%(175/183)
- 306例入伍新兵
- 特异性97.1%(297/306)

小结：（国内结核病诊断领域的产品研发现状）

上述产品中，

- 有的已获中国SFDA的批准，有的正在申请中；
- 有的只能进行结核鉴定，有点可做耐药基因检测；
- 有的还有后续改进型产品即将申报上市。
- 均能数小时出结果。

——相对而言，我们更需要评估一些有**自主知识产权的产品**加以扶持和评估。

*Thank
You!*



The End