

# 结核病病原学分子诊断专家共识

中华医学会结核病学分会临床检验专业委员会

结核病是威胁人类健康的重要公共卫生问题之一,据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)估计 2016 年全球约有 1 040 万例新发结核病患者,其中 167 万例死于结核病<sup>[1]</sup>。特别是 2018 年以来,伴随着耐多药结核病(multidrug-resistant tuberculosis, MDR)和广泛耐药结核病(extensively drug-resistant tuberculosis, XDR)患者的日益增多,结核病的防控工作面临前所未有的挑战<sup>[2,3]</sup>。我国是全球 30 个结核病高负担国之一,每年新发结核病患者 89.5 万例,位居世界第三位;耐多药结核病患者 5.8 万例,位居世界第二位<sup>[1]</sup>,因此,结核病成为制约我国社会经济发展的重大公共问题之一<sup>[4]</sup>。早诊断、早隔离、早治疗是减少肺结核发病和死亡的关键环节,诊断的滞后导致个体化治疗的延误和结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)的传播<sup>[5-6]</sup>。结核病实验室诊断是发现结核病患者的重要途径,痰涂片检查价格低廉、操作简便,但敏感度不高;痰培养敏感度较高,一直作为结核病实验室诊断的金标准,但因其检测周期过长,不能为临床提供时效性检测结果<sup>[7-9]</sup>。鉴于现有细菌学检测方法的诸多不足,WHO 于 2013 年修订了结核病的诊断标准<sup>[10]</sup>,将分子生物学方法检测阳性的患者纳入病原学阳性的范畴。我国也于 2017 年重新修订了肺结核诊断标准,此标准中将分子生物学诊断阳性作为病原学阳性的诊断依据<sup>[11]</sup>。虽然分子生物学诊断技术的时效性优于传统方法,但正确、全面地解读结核病分子生物学诊断报告,特别是当分子诊断技术与传统诊断技术结果存在不一致时,如何更好地利用分子生物学诊断报告服务临床诊断是困扰临床工作者的难题。为了更好地理解新版指南的诊断标准,提高结核病诊疗人员对分子生物学诊断技术实验室结果的解读能力,中华医学会结核病学分会临床检验专业委员会组织实验室和临床领域的专家对

分子生物学诊断技术领域的重要问题进行讨论,并撰写本共识。

## 一、结核病病原学分子生物学诊断技术简介

结核病病原学分子生物学诊断技术是以临床标本为检测对象,MTB 相关基因为诊断标志物,完成对标本中是否含有 MTB 核酸或耐药基因的一系列检测方法<sup>[12]</sup>,弥补了因 MTB 生长缓慢对检测周期的影响,同时对实验室的生物安全要求低于多种传统的细菌学诊断方法<sup>[7]</sup>。近年来,分子诊断技术日趋成熟,出现了一批敏感度高、特异性好,同时兼具高自动化等诸多优点的诊断方法<sup>[13-18]</sup>。

### (一)结核病病原学分子诊断技术的原理

根据诊断目的不同,分子生物学诊断技术主要包括三大类:MTB 病原学检测、耐药性诊断以及分枝杆菌菌种鉴定<sup>[7-8]</sup>。

1. MTB 病原学诊断的主要靶标为 MTB 基因组中特有保守的管家基因,常用的靶标基因包括 IS6110、16S 核糖体 RNA(16SrRNA)、gyrB 和 rpoB 基因等<sup>[19]</sup>,其中 16SrRNA、gyrB 和 rpoB 基因在 MTB 基因组中为单拷贝基因,IS6110 为多拷贝基因,通常情况下以单拷贝基因为检测靶标方法的敏感度低于以多拷贝基因为检测靶标方法的敏感度。需要注意的是,IS6110 并非存在于所有 MTB 中,极少部分 MTB 菌株中拷贝数较低甚至缺失,因此可能导致假阴性结果<sup>[20]</sup>。

2. MTB 的耐药主要是药物作用靶基因突变引起的<sup>[21-22]</sup>。根据耐药基因的功能不同,可分为药物靶标基因及参与药物活化的基因两种<sup>[22]</sup>;不同抗结核药物的耐药相关基因在耐药突变菌株中发生的频率差异较大,且引起的耐药水平差异也较大,基于目前 MTB 分子生物学研究进展,将不同药物的主要耐药相关基因、功能、耐药水平及突变频率进行了总结(表 1)<sup>[21]</sup>。

3. 分枝杆菌菌种鉴定的主要靶标为细菌中的管家基因,其中最重要的靶标为 16S rRNA 基因,同时也是细菌分类鉴定的金标准<sup>[23]</sup>。但由于分枝杆菌中部分复合群 16SrRNA 序列差异较小,因此无法

DOI: 10. 3760/cma. j. issn. 1001-0939. 2018. 09. 008

通信作者:谭耀驹,广州市胸科医院,Email:gzchtan@163.com;  
邓云峰,山东省胸科医院,Email:yfdeng@126.com;逢宇,首都医科大学附属北京胸科医院,Email:pangyupound@163.com

表 1 抗结核分枝杆菌一线和二线药物的耐药机制

药物(上市时间)	耐药相关基因	耐药机制	表型耐药水平	基因功能	药物作用	国际报道的突变频率 (%)	我国报道的突变频率 (%)
异烟肼(1952 年)	katG	药物活化	中到高水平耐药	过氧化氢酶还原酶	抑制分枝菌酸合成及其他多种作用	50~95	60
	inhA	药物靶标	大多数低水平耐药			8~43	15~20
	oxyR-ahpC	药物靶标	中等水平耐药			15	
吡嗪酰胺(1952 年)	pncA	药物活化	高水平耐药	烟草酰胺酶/吡嗪酰胺酶	抑制脂肪酸合成	72~99	70
	rpsA	药物靶标		核糖体 S1 蛋白	抑制蛋白质翻译		
	panD	药物靶标		天冬氨酸脱羧酶	抑制泛酸和辅酶 A 合成		
利福平(1966 年)	rpoB	药物靶标	通常高水平耐药,少数低水平耐药,与突变位点相关	RNA 聚合酶 β 亚基	抑制 RNA 合成	95	90~95
乙胺丁醇(1961 年)	embB	药物靶标	低水平到中等水平耐药	阿拉伯糖基转移酶,磷酸核糖转移酶	抑制阿拉伯半乳糖合成	47~65	60~70
	ubiA	药物靶标	低水平耐药				
链霉素(1943 年)	rpsL	药物靶标	高水平耐药	S12 核糖体蛋白	抑制蛋白质合成	52~59	65~80
	rrs	药物靶标	中等水平耐药	16S rRNA		8~21	
	gidB	药物靶标	低水平耐药	16S rRNA 甲基转移酶			
阿米卡星/卡那霉素(1957 年)	rrs	药物靶标	通常高水平耐药,少数低水平耐药合成	16S rRNA	抑制蛋白质合成	76	60
	eis	药物靶标		氨基糖苷类乙酰转移酶			
	whiB7	药物靶标		转录调控因子			
卷曲霉素(1960 年)	rrs	药物靶标	通常高水平耐药,少数低水平耐药	16S rRNA, 20-O-甲基转移酶	抑制蛋白质合成	85	75
	tlyA	药物靶标	低水平耐药				
喹诺酮类(1963 年)	gyrA	药物靶标	低水平至中等水平耐药	DNA 解旋酶亚基 A	抑制 DNA 合成	75~94	75~80
	gyrB	药物靶标	低水平耐药	DNA 解旋酶亚基 B			
乙硫异烟胺(1956 年)	etaA/ethA	药物活化	高水平耐药	黄素单氧合酶	抑制分枝菌酸合成	56	50
	ethR	药物靶标	低水平耐药	转录抑制子			
	inhA	药物靶标	低水平耐药	还原酶			
对氨基水杨酸(1946 年)	thyA	药物靶标	中等水平耐药	胸苷酸合成酶	抑制叶酸和胸腺嘧啶核苷酸的代谢	37	未报道
	dfrA	药物靶标		二氢叶酸还原酶			
	folC	药物靶标		二氢叶酸合成酶			
	ribD	药物靶标		核黄素生物合成酶			

有效区分部分亚种,因此,常引入 16S~23S 间隔区序列、rpoB 及 hsp65 基因以提高分辨率,其中 16S~23S 间区序列主要用于 MTB 复合群不同菌种的鉴定,rpoB 和 hsp65 主要用于脓肿分枝杆菌复合群和鸟胞内分枝杆菌复合群亚种的鉴定<sup>[24-26]</sup>。

### (二) 结核病分子生物学诊断技术

根据各种诊断技术的检测原理,将现有的结核病分子生物学技术分类如下(表 2)。

1. 实时荧光定量 PCR 技术:其主要原理是通过荧光基团标记的特异性探针(Taqman 探针或分子信标)对基因扩增产物进行标记跟踪,实时在线监

控反应过程,结合相应软件对产物进行分析<sup>[27]</sup>。目前,实时荧光定量 PCR 技术主要用于检测临床标本中是否存在 MTB 复合群及其对利福平的耐药性,检测的标本类型包括痰、胸腔积液及脑脊液等标本,检测结果阳性可视同标本中存在 MTB 复合群<sup>[28-30]</sup>。


2. 等温(恒温)扩增技术:是一类分子生物学诊断技术的简称,其特征为基因扩增过程不需要检测温度梯度的循环,仅需要在恒定温度下完成扩增,因此等温扩增技术对仪器设备的依赖性较低。等温扩增技术基于其独特的扩增原理,其敏感度高但特异性相对较低,对防污染措施要求严格,其自动化程度

表 2 各种结核分子生物学诊断技术的比较(以培养或表型药敏试验为金标准)

比对内容	诊断技术									
	线性探针	基因芯片	GeneXpert MTB/RIF	MTB 复合群 核酸检测试剂盒(实时 荧光 PCR 法)	MTB 系列耐药 突变检测试 剂盒	交叉引物 扩增技术	MTB 复合群 核酸检测试 剂盒(恒温 扩增法)	RNA 恒温扩增 技术	MTB 复合群 核酸快速 检测系统	
检测原理	探针-反向杂 交技术	探针-反向杂 交技术	实 时 荧 光 PCR 技术	实 时 荧 光 PCR 技术	探针-熔解曲 线技术	等温扩增技 术	等温扩增技 术	等温扩增技 术	等温扩增技 术	
靶基因	rpoB, katG, inhA, 包括 野生型和突 变型	rpoB, katG, inhA, 包括 野生型和突 变型(耐药 检测); 16S rRNA(菌种 鉴定)	rpoB	IS6110	rpoB, katG, inhA, oxyR- abpC, gyrA	IS6110	IS6110	16 S rRNA	IS 6110 和 gyrB	
检测限值 (CFU/ml)	160	200	131	100	100	100	100	100	100	
是否 WHO 推荐	是	否	是	否	否	否	否	否	是	
检测目标	MTB 复合群 鉴定以及利 福平和异烟 肼耐药性检 测	MTB 复合群 鉴定以及利 福平和异烟 肼耐药性检 测	检测标本中 是否有对利 福平及耐 药性	检测标本中 是否有 MTB	利福平、异烟 肼、乙胺丁 醇和喹诺 酮耐药性 检测	检测标本中 是否有 MTB	检测标本中 是否有 MTB	检测标本中 是否有 MTB	检测标本中 是否有 MTB	
检测目标人群	疑似结核病 患者	涂阳结核病 患者	疑似肺结核 与肺外结核 的成人 与儿童	疑似结核病 患者	涂阳结核病 患者	疑似结核病 患者	疑似结核病 患者	疑似结核病 患者	疑似结核病 患者	
检测样本类型	涂阴痰标本、 涂阳痰标本、 固体培养 物和液体 培养物	涂阳痰标本、 固体培养 物和液体 培养物	痰、痰沉淀及 肺外结核 样本	痰标本	涂阳痰标本、 固体培养 物和液体 培养物	痰标本	痰标本	痰标本	痰标本	
样品前处理和 核酸提取	Ge noLyse 手 动 提 取 DNA 法	机械裂解和 热裂解,手 动提取	超声裂解,自 动提取	热裂解,手动 提取	热裂解,磁珠 法提取	热裂解,手动 提取	热裂解,手动 提取	超声裂解,免 提取	热裂解,吸附 提取	
国家“十三五” 推荐使用	是	是	是	否	是	是	是	是	是	
试剂运输储存 条件	冷藏运输,低 温保存	冷藏运输,低 温保存	常温运输和 保存	冷藏运输,低 温保存	冷藏运输,低 温保存	冷藏运输,低 温保存	冷藏运输,低 温保存	冷藏运输,低 温保存	常温运输,常 温保存	
报告时间(h)	6	6	2	2	2.5	2	1.5	2	2	
诊断敏感度 (%)	-	-	94.4	64.0~81.0	-	84.1	74.9	88.9	90.2	
诊断特异度 (%)	-	-	90.2	95.0~96.0	-	97.8	86.5	79.4	96.9	
耐药敏感度 (%)	利福平为 88.5,异 烟肼为 77.8	利福平为 87.6,异 烟肼为 80.3	利福平为 87.1	-	利福平为 94.2,异烟 肼为 84.9, 阿米卡星 为 75.0, 左氧氟沙 星为 83.3	-	-	-	-	
内部质量控制	有	有	有	无,需外部质 控	无,需外部质 控	有	无,需外部质 控	无,需外部质 控	无,需外部质 控	

注: -:不能开展相关检测项目

越高,检测结果可信度越高。目前,上述技术主要包括环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)<sup>[31]</sup>、交叉引物法检测技术(crossing priming amplification, CPA)<sup>[32]</sup>及实时荧光核酸恒温扩增检测技术(simultaneous amplification and testing, SAT)等<sup>[33]</sup>,其中 LAMP 和 CPA 是以脱

氧核糖核酸(DNA)为检测靶标,而 SAT 是糖核酸(RNA)为检测靶标。由于 SAT 扩增产物为 RNA, 在环境中极易降解,一般在排除样品留存环节的污染 RNA 后,检测结果阳性可视为标本中存在活菌<sup>[34]</sup>。目前,等温扩增技术主要用于检测临床标本中是否存在 MTB 复合群。

3. 探针-反向杂交技术:是利用特殊标记的探针(DNA 短片段)与特异性扩增 PCR 产物(靶 DNA 序列)在一定条件下按碱基互补原则,通过氢键作用形成双链分子,这种双链分子通过荧光基团或生物素标记后,可通过自显影或显色反应检出,上述通过已知的探针序列检测未知标本中靶基因序列的方法称为探针-反向杂交技术<sup>[35]</sup>。与实时荧光定量 PCR 技术相比,核酸杂交技术的检测通量更高,一次可完成对多个耐药相关基因位点的检测。杂交方法依赖于探针分子与靶标基因的相互结合过程,可能受到杂交温度、探针 GC 含量、金属离子浓度等多种因素的影响,因此杂交过程可能出现非特异性杂交,造成假阳性结果。目前,此技术包括线性探针及基因芯片等主要用于 MTB 对利福平和异烟肼耐药性的检测及分枝杆菌菌种的鉴定<sup>[35-37]</sup>。

4. 探针-溶解曲线技术:是基于对特异性扩增产物与探针形成双链的解链温度进行检测,从而完成对靶标基因的序列分析<sup>[38]</sup>。由于 DNA 双链的解链温度由核酸分子碱基长度或碱基组成等因素决定,通过对扩增产物溶解曲线的分析,判断序列中是否存在基因突变。溶解温度的降低提示检测序列中是否存在一个或多个基因突变,但不能确定基因突变的类型。该技术可有效鉴定多种基因型的存在,特别适于低丰度的异质性耐药检测,目前用于利福平、异烟肼、乙胺丁醇和喹诺酮类药物耐药性的检测<sup>[38]</sup>。

5. 基因测序技术:基因测序是通过对 MTB 靶标基因中基因序列的测定,并与国际核酸数据库中标准序列进行比对,实现对 MTB 及其耐药性的精确检测,目前主要用于分枝杆菌病原菌的耐药检测和菌种鉴定<sup>[39-40]</sup>。

(三)WHO 对结核病病原学分子诊断技术应用的建议

WHO 通过对每年发表的大量有关新的诊断技术评估的文章进行荟萃分析,基于已有证据为如何使用分子生物学方法检测 MTB 提供了指导性意见。2008 年,WHO 推荐线性探针产品用于耐多药结核病(multidrug-resistant tuberculosis, MDR)的诊断<sup>[41]</sup>,并于 2016 年推荐二代产品用于 MDR 或利福平耐药结核病患者对喹诺酮类药物及二线注射类药物的耐药性检测<sup>[42]</sup>。2011 年 WHO 推荐 GeneXpert MTB/RIF(简称 GeneXpert)用于 MDR 或艾滋病合并结核病(human immunodeficiency virus/tuberculosis, HIV/TB)高风险人群的 MTB 感染的早期检测,同时推荐其与涂片或胸部 X 线检查结合用

于其他疑似结核病人的诊断<sup>[43]</sup>;2014 年 WHO 进一步拓展了 GeneXpert 的使用范围,推荐其用于儿童结核病的早期诊断,同时推荐其替代涂片、培养等技术用于肺外结核的快速诊断<sup>[44]</sup>。2016 年 WHO 推荐 TB-LAMP 作为痰涂片显微镜镜检的替代方法,用于疑似结核病人的诊断,同时在经济条件有限的地区可作为具有肺结核症状和体征的成人痰涂片显微镜检的后继检测,尤其是痰涂片阴性的标本,需要进一步检测时有必要使用<sup>[45]</sup>。

(四)国内卫生行政机构对结核病病原学分子生物学诊断技术应用的建议

我国 2017 年颁布的“十三五”全国结核病防治规划中明确指出,国内所有地、市级定点医疗机构应具备开展药敏试验、菌种鉴定和结核病分子生物学诊断的能力<sup>[46]</sup>,东中部地区和西部地区应有 80% 和 70% 的县(市、区)具备开展结核病分子生物学诊断的能力。国家卫生健康委员会建议各地要结合实际,因地制宜推广新的诊断技术,其中推荐县级机构在交叉引物法、等温扩增和多色巢式荧光 PCR 中选择一种或多种;地、市级单位应至少开展一种耐药分子生物学诊断技术。

二、结核病病原学分子生物学诊断技术规范及质量控制

1. 结核病分子生物学检测实验室的总体设计与要求应参考“医疗机构临床基因扩增检验实验室工作导则”<sup>[47]</sup>和“人间传染的病原微生物名录”进行<sup>[48]</sup>。

2. 应制定基因检测过程中的质量控制流程,可参照“临床实验室定量测定室内质量控制指南”<sup>[49]</sup>。质量控制流程中应有针对核酸检测时防污染的具体措施。

3. 结核病病原学分子生物学诊断技术质量控制的关键环节:痰液是结核病实验室检测的常见标本。痰液中最黏稠的部分(如浓痰、干酪样痰)DNA 提取最困难,但其含菌量较高,可达其他部分痰液的数十倍,因此,痰标本进行分子生物学检测时,为了提高阳性检出率,应尽量挑取痰标本中的黏稠部分<sup>[50]</sup>。

样本处理是结核病分子生物学诊断的关键,因为大多数应用于临床的产品均需要独立的样本制备步骤和手动添加试剂。常用 N-乙酰半胱氨酸-NaOH 和异丙醇等化学物可使样品均质化。为了裂解 MTB,用加热、酶(如溶菌酶和蛋白酶 K)、化学物质(如苯酚)或机械(如超声处理或珠击处理)方法组

合处理细胞。目前,尚无提取痰液中分枝杆菌核酸不同方法的系统研究,但使用小玻璃(0.2 mm)或氧化锆(0.1 mm)的珠子被认为最有效<sup>[51]</sup>,这种方法涉及 MTB 细胞的破碎,同时将核酸捕获到固体支持物上再进行洗涤和洗脱,同时应避免使用在样品处理和 DNA 提取过程中引入的 DNA 扩增和检测抑制剂。研究结果显示,等温扩增技术受抑制物的影响较小<sup>[51]</sup>。

胸腔积液、腹水或脑脊液等体液性样本,因其含菌量较低,样本量应增加,并进行离心富集,以提高检测的敏感度;胸腔积液和腹水的标本量应为 50 ml 或以上,并用乙二酸四乙酸盐抗凝后送检<sup>[52]</sup>。

### 三、结核分子生物学诊断结果的解读

根据国家 2017 年修订的“肺结核诊断 W5288-2017”<sup>[11]</sup>,经国家食品药品监督管理总局批准的结核病分子诊断产品的检测结果可作为肺结核的诊断依据,批准的耐药结核病分子诊断产品的检测结果可作为耐药结核的诊断依据;且分子诊断技术应与细菌学检测技术同时用于患者的发现和耐药患者的筛查。由于分子诊断产品检测周期较短,其检测结果往往早于细菌学检测结果;另外,临床上也常遇到多种检测结果不一致的情况。对于结核病病原学分子诊断结果,临床医生应基于以下原则进行判断<sup>[53]</sup>。

1. MTB 复合群未检出:当分子生物学检测方法在标本中未检出 MTB 复合群时,应继续等待传统细菌学检测方法(如培养)的结果;建议再次收集标本重复检测,或用敏感度更高的分子生物学方法进行检测;同时基于已有的实验室检测结果结合患者的临床表现综合判断,对于临床诊断的结核病患者应进行抗结核治疗。

2. MTB 复合群阳性且利福平耐药:当分子生物学检测方法在标本中检出 MTB 复合群且对利福平耐药时,应评价患者是否属于耐药高危人群(包括慢性排菌或复治失败、密切接触耐药肺结核患者的涂阳肺结核患者、初治失败、复发与返回、治疗 2 个月或 3 个月末痰涂片仍阳性的初治涂阳患者)。当患者为耐药高危人群时,应同时进行传统的药敏试验,并采用二线抗结核药物治疗;当患者不属于耐药高危人群时,应重新收集患者的标本再次重复用分子生物学方法检测,当再次检出利福平耐药时,应同时进行传统的药敏试验并采用二线抗结核药物治疗;当发现患者再次检出 MTB 复合群但利福平敏感时,应采用一线抗结核药物治疗;当患者第 2 份标本

未发现 MTB 复合群时,应继续等待传统的细菌学检测方法(如培养)的结果;同时建议再次收集标本重复检测或用敏感度更高的分子生物学方法进行检测;基于已有的实验室检测结果并结合患者的临床表现综合判断,对于临床诊断的结核病患者应进行抗结核治疗。

3. MTB 复合群阳性、利福平和异烟肼敏感:当分子生物学检测方法在标本中检出 MTB 复合群且利福平和异烟肼均敏感时,应采用一线抗结核药物治疗。

4. MTB 复合群阳性、利福平敏感、异烟肼耐药:当分子生物学检测方法在标本中检出 MTB 复合群且利福平敏感而异烟肼耐药时,应评估患者是否属于耐药高危人群。当患者属于耐药高危人群时,应进行传统的药敏试验并将治疗方案中的异烟肼调整为一种二线药物(喹诺酮或二线注射类药物);当患者不属于耐药高危人群时,重新收集标本,再次重复分子生物学检测,当再次检出异烟肼耐药时,应进行传统的药敏试验,同时用二线抗结核药物治疗;当再次检出 MTB 复合群但异烟肼敏感时,应采用一线抗结核药物治疗;当第 2 份标本未发现 MTB 复合群时,应继续等待传统细菌学检测方法(如培养)的结果;对于有条件的患者建议再次收集标本,用敏感度更高的分子生物学方法检测;同时应基于已有的实验室检测结果并结合患者的临床表现综合判断,对于临床诊断的结核病患者应进行抗结核治疗。

5. MTB 复合群核酸检测与传统细菌学检测方法的比较:目前已有的结核病实验室诊断技术中,不同检测技术的最低检出限值存在较大差异:GeneXpert 方法为 131 CFU/ml<sup>[54]</sup>,MTB 培养为 100 CFU/ml<sup>[55]</sup>,其他分子生物学检测方法为  $10^1 \sim 10^3$  CFU/ml<sup>[56]</sup>,临床标本涂片为  $10^3 \sim 10^4$  CFU/ml<sup>[57]</sup>。因此,临床检测标本时,任何一种分子生物学检测方法结果阳性、细菌学检测方法阴性时,应以分子生物学检测结果为准,视为 MTB 阳性;当涂片阳性、核酸检测阴性时,应分析核酸扩增是否正确(或内对照是否阳性),在正确的情况下:(1)如出现阳性,可考虑为非结核分枝杆菌;(2)如出现阴性,应视为核酸检验结果为假阴性,应重新检测。当核酸检验结果为弱阳性(如 GeneXpert 检测结果为低度阳性或极低度阳性)时,要结合临床表现进行分析,必要时重新检测;如 2 次均为弱阳性,应高度怀疑为活动性结核病;如检测标本为无菌性样本,阳性、弱阳性均可作为病原学诊断的依据。

6. 耐药基因检测与传统药敏试验结果比较:目前,分子生物学检测技术检测耐药结核病的敏感度尚未达到 100%,如利福平和异烟肼的敏感度仅为 95% 和 85%<sup>[21]</sup>;此外,分子生物学检测方法通常标本中耐药 MTB 含量高于 20% 以上时才能检出,因此造成部分耐药 MTB 的漏检<sup>[58]</sup>。当分子生物学方法检测敏感而传统细菌学检测耐药时,应以传统细菌学检测结果为准,视标本中含有耐药 MTB。研究表明,如果分子生物学方法检测耐药而传统细菌学检测敏感时,再次重复检测,通常为传统细菌学检测结果错误<sup>[59]</sup>。因此,当分子生物学方法检测结果为耐药而传统细菌学检测结果为敏感时,排除标本中耐药 MTB 含量较低的情况后,应以分子生物学检测方法的结果为准,视为标本中含有耐药 MTB。对含菌量较少的标本,建议再次收集痰标本进行检测,当 2 份独立检测报告均证明标本中含有耐药 MTB 时,可视为标本中含有耐药 MTB。目前表型药敏试验均使用间接法,即在对标本进行分离培养获得阳性培养物的基础上完成药敏试验<sup>[60]</sup>。通常敏感菌株生长速度比耐药菌株快,因此对于敏感菌和耐药菌混合感染的标本,培养过程中可能出现敏感菌优势生长的现象,导致培养物中耐药菌株的比例降低,甚至低于传统药敏试验的最低检出限值,出现表型药敏试验假阴性结果<sup>[61]</sup>。基于上述情况,在检测异烟肼和利福平耐药时,无论是何种方法提示耐药,均要给予足够的重视,必要时调整治疗方案。

总之,结核病临床基因检验诊断结果的解释应考虑分子生物学检测技术的优势和局限性。目前检测的靶标主要为 DNA,无法区分病原体的死活,而且经治疗后部分患者体内的 MTB 核酸持续存在,故应明确 DNA 检测只能用于结核病的诊断和鉴别诊断,不能作为疗效评估的指标<sup>[62]</sup>。DNA 检验结果的解读应密切结合临床。随着核酸检验技术自动化程度的不断提高,自动化程度高的检验方法受外部条件影响的可能性较低,其阳性检验结果的可信度越高。

#### 四、展望

MTB 分子生物学诊断技术是现代分子生物学与检验医学结合取得巨大进步的结晶,也是在人们对 MTB 基因功能、调控等生命本质问题的认识日益加深的基础上产生的。本共识聚焦结核病实验室诊断的重大需求,立足国家最新颁布的结核病诊断标准,利用中华医学会结核病学分会检验专业委员会在临床检验领域中的丰富经验,充分阐述了结核病

分子生物学诊断技术的发展现状,特别是围绕不同检测手段结果不一致的问题,突出本共识的专业性和实用性,为全国不同层级结核病临床实验室更好的应用分子生物学检测技术提供了重要的技术指导。伴随着材料科学和检测手段的不断发展,可以预期结核病分子生物学检测领域在未来的几年内将陆续涌现出多种新型分子生物学检测技术,如二代基因组测序技术及液相芯片等。检验专业委员会也将继续致力于结核病新型诊断技术的应用,将及时对本共识进行补充或修订,以满足临床医生对结核病实验室诊断技术的需求。

编写组专家(排名不分先后) 谭耀驹、刘健雄、谭守勇、蔡杏姝、苏碧仪(广州市胸科医院);邓云峰、秦敬民、李学政(山东省胸科医院);逢宇、马琦、唐神结、高微微、高孟秋、黄海荣、姜广路、杜建、李亮、许绍发(首都医科大学附属北京胸科医院);赵雁林(中国疾病预防控制中心);李君莲(新疆维吾尔自治区胸科医院);任易(武汉市肺科医院);侯艳杰(黑龙江省传染病院);乐军、胡忠义(上海市肺科医院);高谦(上海复旦大学);孙炳奇(沈阳市胸科医院);同重湘(兰州市肺科医院);马晓莉(青海省第四人民医院);李晓非(昆明市第三医院);张丽霞(天津市海河医院);刘敏(辽宁省疾病预防控制中心);吴蓓蓓(浙江省疾病预防控制中心);王心静(解放军第三〇九医院);王静(重庆市公共卫生救助中心);孙雪娟(长春市传染病医院);谭云洪(湖南省胸科医院);白广红、邹远妩(陕西省结核病防治院);廖光付(广西壮族自治区龙潭医院);苏云开(内蒙古自治区第四医院);施旭东(南京市第二医院);张治国(昌平区结核病防治所);张丹(重庆医科大学附属永川医院);崔晓利(西安市胸科医院);包训迪(安徽胸科医院);肖慧霞(宁夏回族自治区第四人民医院);李青峰(成都公共卫生医疗中心);于永敏(郑州市第六医院);张建武(河北省胸科医院);林雨亭(烟台北海医院);嵇种康(浙江大学附属第一医院);鲁洁(首都医科大学附属北京儿童医院);徐邦牢(广州市第一人民医院);袁宇容(南方医科大学南方医院)

#### 参 考 文 献

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2017 [M]. Geneva: World Health Organization, 2017.
- [2] Falzon D, Schünemann HJ, Harausz E, et al. World Health Organization treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis, 2016 update [J]. Eur Respir J, 2017, 49(3): 1602308. DOI: 10.1183/13993003.02308-2016.
- [3] Mariandyshev A, Eliseev P. Drug-resistant tuberculosis threatens WHO's End-TB strategy [J]. Lancet Infect Dis, 2017, 17(7): 674-675. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30246-3.
- [4] Wang L, Zhang H, Ruan Y, et al. Tuberculosis prevalence in China, 1990—2010; a longitudinal analysis of national survey data [J]. Lancet, 2014, 383(9934): 2057-2064. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)62639-2.
- [5] Golub JE, Bur S, Cronin WA, et al. Delayed tuberculosis diagnosis

- and tuberculosis transmission [J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2006, 10(1): 24-30.
- [6] Sreeramareddy CT, Panduru KV, Menten J, et al. Time delays in diagnosis of pulmonary tuberculosis: a systematic review of literature [J]. *BMC Infect Dis*, 2009, 9(1): 91. DOI: 10.1186/1471-2334-9-91.
- [7] Pai M, Schito M. Tuberculosis diagnostics in 2015: landscape, priorities, needs, and prospects [J]. *J Infect Dis*, 2015, 211 (Suppl 2): S21-S28. DOI: 10.1093/infdis/jiu803.
- [8] Denkinger CM, Kik SV, Cirillo DM, et al. Defining the needs for next generation assays for tuberculosis [J]. *J Infect Dis*, 2015, 211 (Suppl 2): S29-S38. DOI: 10.1093/infdis/jiu821.
- [9] 朱长太, 胡忠义. 结核分枝杆菌耐药性检测技术进展 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2011, 34(10): 768-770. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-0939.
- [10] World Health Organization. Definitions and reporting framework for tuberculosis [M]. Geneva: World Health Organization, 2013.
- [11] WS 288-2017 肺结核诊断 [S]. 2017.
- [12] Nurwidya F, Handayani D, Burhan E, et al. Molecular Diagnosis of Tuberculosis [J]. *Chonnam Med J*, 2018, 54(1): 1-9. DOI: 10.4068/cmj.2018.54.1.1.
- [13] Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance [J]. *N Engl J Med*, 2010, 363(11): 1005-1015. DOI: 10.1056/NEJMoa0907847.
- [14] Ling DI, Zwerling AA, Pai M. GenoType MTBDR assays for the diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis: a meta-analysis [J]. *Eur Respir J*, 2008, 32(5): 1165-1174. DOI: 10.1183/09031936.00061808.
- [15] Notomi T, Mori Y, Tomita N, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects [J]. *J Microbiol*, 2015, 53(1): 1-5. DOI: 10.1007/s12275-015-4656-9.
- [16] Guo Y, Zhou Y, Wang C, et al. Rapid, accurate determination of multidrug resistance in *M. tuberculosis* isolates and sputum using a biochip system [J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2009, 13(7): 914-920.
- [17] Hu S, Li G, Li H, et al. Rapid detection of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates by use of real-time-PCR-based melting curve analysis [J]. *J Clin Microbiol*, 2014, 52(5): 1644-1652. DOI: 10.1128/JCM.03395-13.
- [18] Fang R, Li X, Hu L, et al. Cross-priming amplification for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens [J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(3): 845-847. DOI: 10.1128/JCM.01528-08.
- [19] Neonakis IK, Gitti Z, Krambovitis E, et al. Molecular diagnostic tools in mycobacteriology [J]. *J Microbiol Methods*, 2008, 75(1): 1-11. DOI: 10.1016/j.mimet.2008.05.023.
- [20] McEvoy CRE, van Pittius NCG, Victor TC, et al. The role of IS6110 in the evolution of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Tuberculosis*, 2007, 87(5): 393-404. DOI: 10.1016/j.tube.2007.05.010.
- [21] Zhang Y, Yew WW. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: update 2015 [J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2015, 19(11): 1276-1289. DOI: 10.5588/ijtld.15.0389.
- [22] 李勤静, 焦伟伟, 申阿东. 耐药结核病发病机制的研究进展 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2015, 38(9): 691-694. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-0939.2015.09.016.
- [23] Clarridge JE. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2004, 17(4): 840-862. DOI: 10.1128/CMR.17.4.840-862.2004.
- [24] Roth A, Reischl U, Streubel A, et al. Novel diagnostic algorithm for identification of mycobacteria using genus-specific amplification of the 16S-23S rRNA gene spacer and restriction endonucleases [J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(3): 1094-1104.
- [25] Kim BJ, Lee SH, Lyu MA, et al. Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*) [J]. *J Clin Microbiol*, 1999, 37(6): 1714-1720.
- [26] Ringuet H, Akoua-Koffi C, Honore S, et al. *hsp65* sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria [J]. *J Clin Microbiol*, 1999, 37(3): 852-857.
- [27] 李国利. 实时荧光定量 PCR 技术及在结核病诊断实验室的研究和应用 [J]. *临床肺科杂志*, 2008, 13(10): 1315-1317. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6663.2008.10.037.
- [28] 黄芳, 党丽云, 孙惠平, 等. 三种分子生物学诊断技术对结核病诊断价值的比较 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2015, 38(9): 680-685. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-0939.2015.09.013.
- [29] 张晶, 邓群益, 高扬, 等. 实时荧光定量聚合酶链反应检测支气管肺泡灌洗液中结核分枝杆菌 DNA 对肺结核的诊断价值 [J]. *临床肺科杂志*, 2009, 14(3): 336-337. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6663.2009.03.027.
- [30] 戴佩佩, 裴晓乐. 三种检测方法对活动性结核病的临床诊断价值 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2011, 21(7): 1748-1749.
- [31] Ou X, Li Q, Xia H, et al. Diagnostic accuracy of the PURE-LAMP test for pulmonary tuberculosis at the county-level laboratory in China [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e94544. DOI: 10.1371/journal.pone.0094544. eCollection 2014.
- [32] Ou X, Song Y, Zhao B, et al. A multicenter study of cross-priming amplification for tuberculosis diagnosis at peripheral level in China [J]. *Tuberculosis*, 2014, 94(4): 428-433. DOI: 10.1016/j.tube.2014.04.006.
- [33] 崔振玲, 沙巍, 黄晓辰, 等. RNA 恒温扩增技术快速检测痰标本中结核分枝杆菌的研究 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2011, 34(12): 894-897. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-0939.2011.12.005.
- [34] Li L, Mahan CS, Palaci M, et al. Sputum *Mycobacterium tuberculosis* mRNA as a marker of bacteriologic clearance in response to antituberculosis therapy [J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(1): 46-51. DOI: 10.1128/JCM.01526-09.
- [35] Li Q, Dong HY, Pang Y, et al. Multicenter Evaluation of the Molecular Line Probe Assay for Multidrug Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Detection in China [J]. *Biomed Environ Sci*, 2015, 28(6): 461-467. DOI: 10.3967/bes2015.066.
- [36] Pang Y, Xia H, Zhang Z, et al. Multicenter evaluation of genechip for detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(6): 1707-1713. DOI: 10.1128/JCM.03436-12.
- [37] Pang Y, Zhou Y, Wang S, et al. Rapid molecular identification of mycobacterial species in positive culture isolates using the biochip test [J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2011, 15(12): 1680-1685. DOI: 10.5588/ijtld.11.0061.
- [38] Pang Y, Dong H, Tan Y, et al. Rapid diagnosis of MDR and XDR tuberculosis with the MeltPro TB assay in China [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 25330. DOI: 10.1038/srep25330.
- [39] Halse TA, Edwards J, Cunningham PL, et al. Combined real-time PCR and *rpoB* gene pyrosequencing for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* and determination of rifampin resistance directly in clinical specimens [J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(4): 1182-1188. DOI: 10.1128/JCM.02149-09.
- [40] Head SR, Parikh K, Rogers YH, et al. Solid-phase sequence scanning for drug resistance detection in tuberculosis [J]. *Mol Cell Probes*, 1999, 13(2): 81-87. DOI: 10.1006/mcpr.1998.0212.
- [41] World Health Organization. Molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) [M]. Geneva: World Health Organization, 2008.
- [42] World Health Organization. The use of molecular line probe assays for the detection of resistance to second-line anti-tuberculosis

- drugs: policy guidance[M]. Geneva: World Health Organization, 2016.
- [43] World Health Organization. Automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary TB in adults and children: policy update [M]. Geneva: World Health Organization, 2011.
- [44] World Health Organization. Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary TB in adults and children: policy update [M]. Geneva: World Health Organization, 2013.
- [45] World Health Organization. The use of loop-mediated isothermal amplification (TB-LAMP) for the diagnosis of pulmonary tuberculosis: policy guidance [M]. Geneva: World Health Organization, 2016.
- [46] 国务院办公厅. “十三五”全国结核病防治规划[Z]. 国务院办公厅, 2017.
- [47] 中华人民共和国卫生部. 医疗机构临床基因扩增检验实验室工作导则[Z]. 中华人民共和国卫生部, 2010.
- [48] 中华人民共和国卫生部. 人间传染的病原微生物名录[Z]. 中华人民共和国卫生部, 2006.
- [49] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 20468-2006 临床实验室定量测定室内质量控制指南[M]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- [50] Havlik D, Woods GL. Screening sputum specimens for mycobacterial culture[J]. Lab Med, 1995, 26(6): 411-413.
- [51] Leung ET, Zheng L, Wong RY, et al. Rapid and simultaneous detection of Mycobacterium tuberculosis complex and Beijing/W genotype in sputum by an optimized DNA extraction protocol and a novel multiplex real-time PCR [J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(7): 2509-2515. DOI:10.1128/JCM.00108-11.
- [52] Theron G, Peter J, Calligaro G, et al. Determinants of PCR performance (Xpert MTB/RIF), including bacterial load and inhibition, for TB diagnosis using specimens from different body compartments [J]. Sci Rep, 2014, 4: 5658. DOI:10.1038/srep05658.
- [53] World Health Organization. Companion handbook to the WHO guideline for the programmatic of drug-resistant tuberculosis[M]. Geneva: World Health Organization, 2014.
- [54] Marlowe EM, Novak-Weekley SM, Cumpio J, et al. Evaluation of the Cepheid Xpert MTB/RIF assay for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex in respiratory specimens [J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(4): 1621-1623. DOI:10.1128/JCM.02214-10.
- [55] American Thoracic Society. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2000, 161: 1376-1395. DOI: 10.1164/ajrccm.161.4.16141.
- [56] Singh A, Kashyap VK. Specific and rapid detection of Mycobacterium tuberculosis complex in clinical samples by polymerase chain reaction [J]. Interdiscip Perspect Infect Dis, 2012, 2012. DOI:10.1155/2012/654694.
- [57] Yeager Jr H, Lacy J, Smith LR, et al. Quantitative studies of mycobacterial populations in sputum and saliva [J]. Am Rev Respir Dis, 1967, 95(6): 998-1004. DOI:10.1164/arrd.1967.95.6.998.
- [58] Pang Y, Liu G, Wang Y, et al. Combining COLD-PCR and high-resolution melt analysis for rapid detection of low-level, rifampin-resistant mutations in Mycobacterium tuberculosis [J]. J Microbiol Methods, 2013, 93(1): 32-36. DOI:10.1016/j.mimet.2013.01.008.
- [59] 田际云, 武洁, 李静, 等. 熔解曲线法在结核分枝杆菌药敏试验质量评估中的应用 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2015, 38(2): 105-109. DOI:10.3760/cma.j.issn.100143939.2015.02.009.
- [60] Kim SJ. Drug-susceptibility testing in tuberculosis: methods and reliability of results [J]. Eur Respir J, 2005, 25(3): 564-569. DOI:10.1183/09031936.05.00111304.
- [61] Zhang Z, Wang Y, Pang Y, et al. Comparison of different drug susceptibility test methods to detect rifampin heteroresistance in Mycobacterium tuberculosis [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(9): 5632-5635. DOI:10.1128/AAC.02778-14.
- [62] Nikolayevskyy V, Miotto P, Pimkina E, et al. Utility of propidium monoazide viability assay as a biomarker for a tuberculosis disease [J]. Tuberculosis, 2015, 95(2): 179-185. DOI:10.1016/j.tube.2014.11.005.

(收稿日期: 2018-06-27)

(本文编辑: 李文慧)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 本刊“读片园地”栏目征稿

胸部影像学对呼吸系统疾病的诊断、临床治疗效果及预后的判断均有重要意义,是呼吸专业医生的基本功。因此本刊特设立“读片园地”栏目,主要征集对临床有借鉴意义的诊断明确、胸部影像学资料完整、清晰、典型的病例。

稿件写作要求:(1)病例诊断明确,一般需要有病理诊断;(2)病例资料的交代要尽量简明扼要;(3)胸部影像学图片要清晰、典型、丰富,每张图片要注明图题、图说明及检测日期;(4)讨论部分尽量简明扼要,一般不进行文献复习,说明本例特点即可;(5)可以标注少量必要的参考文献;(6)不必提供中英文摘要。