

结核病诊断研究

王洪海，张舒林

简介

结核病 (TB) 目前仍是当今全球范围对人类最具威胁性的感染性疾病之一。全球每年新发结核病患者约900万人，死亡160万人。我国现有肺结核病人约450万，其中传染性肺结核病人约150万。每年约有145万新发病例。由于抗生素滥用导致结核分枝杆菌 (MTB) 产生耐药、耐多药 (MDR)。尤其是极端耐药结核病，也称广谱耐药性结核病 (XDR) 的出现和流行，在可预期的10-20年内，结核病在世界各地发病率上升势头仍难以抑制。在新的结核病疫苗和药物开发并应用于临床之前，早期筛查和诊断技术和产品的研制以及快速药敏检测和快速分枝杆菌菌种鉴定技术的开发和应用是当前控制TB传播的最主要途径。因而加强针对结核病诊断、耐药性研究及产品开发，为结核病防治提供指导，刻不容缓。

免疫学诊断：在国际上首次报道了多个具有较强免疫原性和特异性的结核病诊断标志物。基于多表位融合蛋白构建和多抗原组合筛选，研制出一套初步结核抗体产品形式及试剂盒 CellPro™ (专利号: 201010171867.5)，经第三方验证，CellPro™ 试剂盒的准确度达到83.68%，高于目前国内使用的商业化试剂盒



CellPro™ 试剂盒初步产品形式

自主开发的结核抗体检测试剂盒CellPro™ 进行第三方临床评估

产品	TB		Control		Accuracy
	Positive	Sensitivity	Positive	Specificity	
CellPro™	25	72.00% (18/25)	2	95.35% (41/43)	83.68%
TB- DOT	70	51.70% (70/136)	15	73.90% (42/57)	62.80%
TB- Check-1	43	31.70% (40/136)	4	93.00% (53/57)	62.35%
Pathozyme TB Complex Plus	12	40.00% (12/30)	1	98.00% (49/50)	75.00%

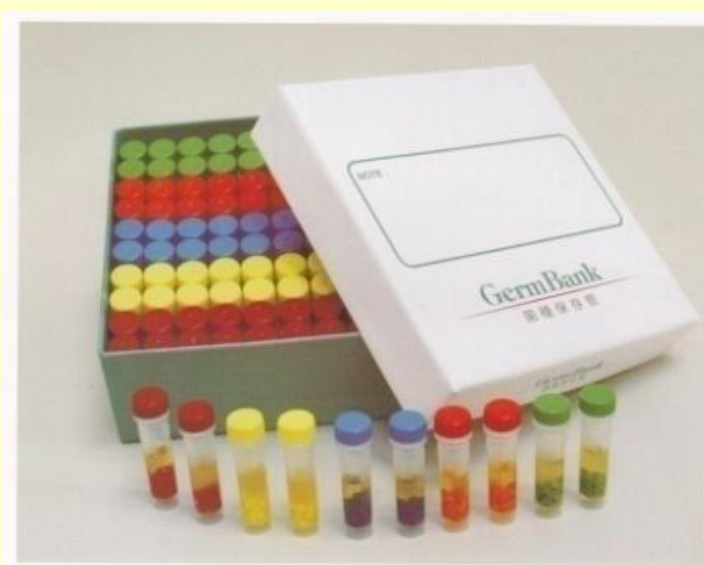
注:TB- DOT、TB- Check-1和Pathozyme TB Complex Plus 均为商业化结核抗体检测试剂盒

联系方式

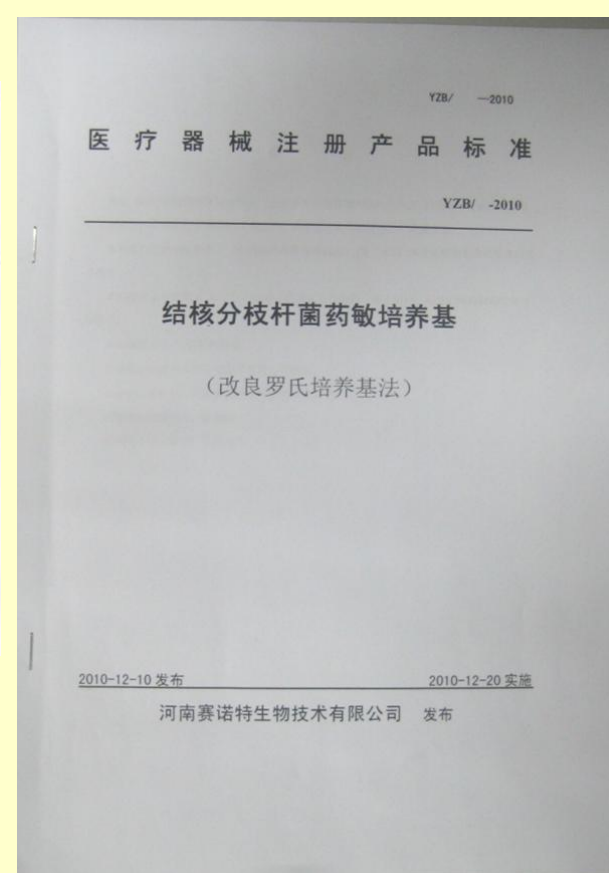
王洪海，教授
复旦大学遗传研究所
hhwang@fudan.edu.cn
021-55665073

结果

细菌学检查：自主研发化学成分明确的结核杆菌快速培养体系 (专利号: 200910194901.8)；制定MIC浓度梯度标准，经评估使之上升为行业标准和国家标准。

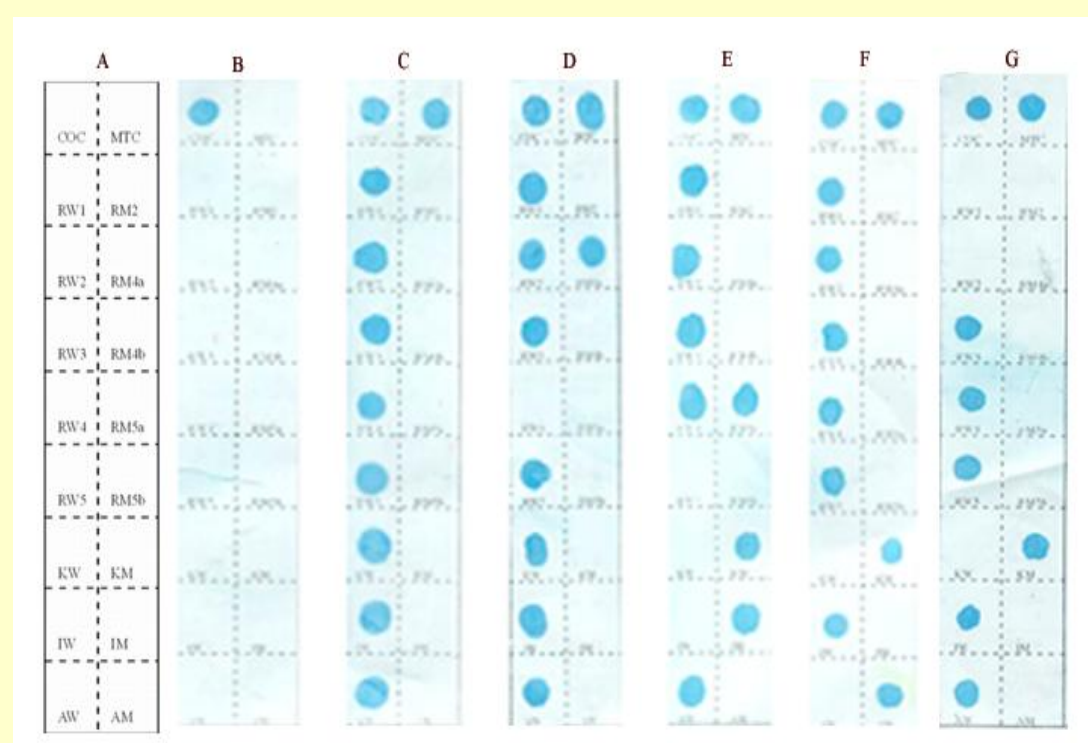


冻存培养基

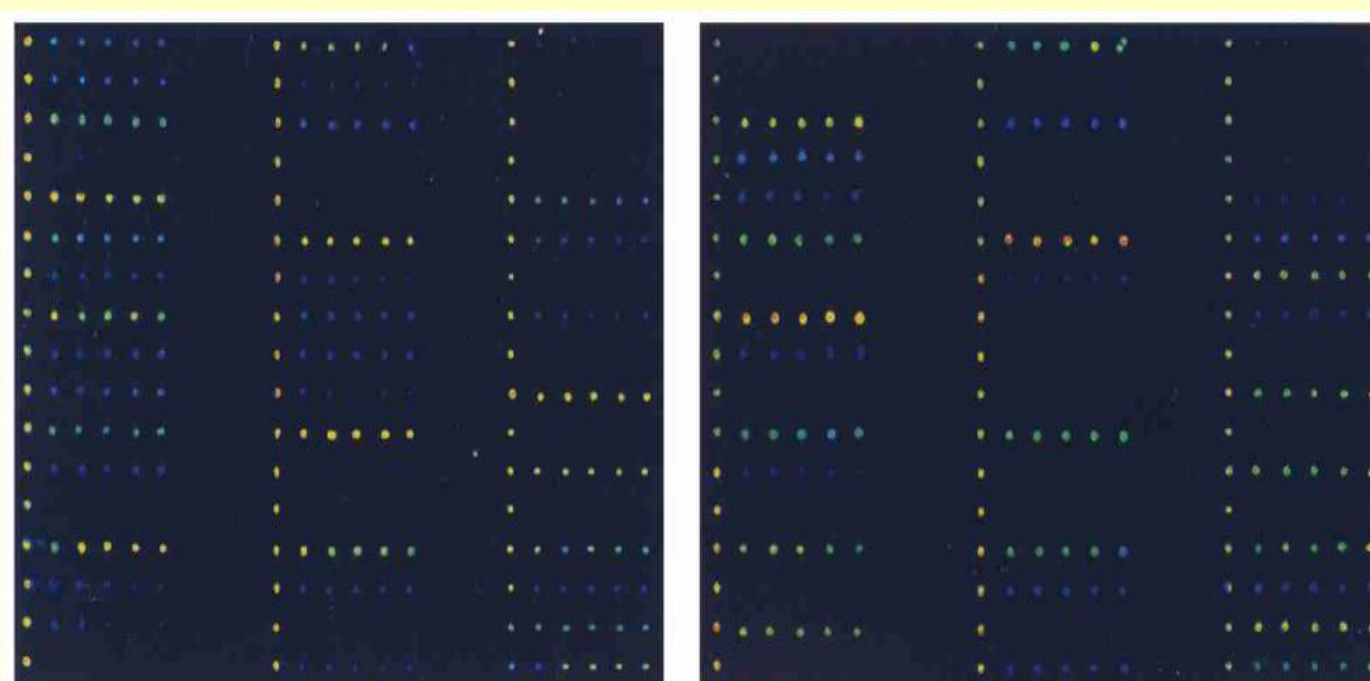


制定行业标准和国家标准

基因诊断：1、建立了新型膜芯片技术和基因芯片技术，可以对结核分枝杆菌RFP、INH耐药基因进行快速检测 (1-2天)；
2、首次报道了国内部分分枝杆菌新的16S-23S rRNA ITS序列型，并应用新型膜芯片技术在检测耐药基因的同时进行快速菌种鉴定，显示了良好应用前景；
3、建立了基因芯片技术，可以对结核分枝杆菌RFP耐药基因进行快速检测 (1天)；
4、建立了基于PCR-ELISA技术，可对临床标本直接进行结核分枝杆菌快速 (6个小时) 药敏检测的探针阵列，具有较高的药物敏感性检出率和100%的特异性 (专利号: 201010541361.9)。



检测rpoB、katG、inhA和ahpC基因突变的反向系列探针阵列



检测rpoB基因突变的寡核苷酸基因芯片

讨论

迄今为止，抗酸染色和细菌分离培养，仍然是最常用的结核病实验室诊断技术。现有结核病临床检验和现场筛查的主要实验室技术存在着检测灵敏度低、通量小、速度慢或仪器设备要求高、价格昂贵等缺点，不适用于基层医疗机构推广，也难以及时应对新发、突发传染病事件。此外，长期以来结核分枝杆菌药敏试验一直是结核病细菌学诊断中至关重要的技术。但传统的结核病药敏检测方法为表型耐药检测方法，其建立在结核分枝杆菌的培养基础之上，由于结核分枝杆菌生长缓慢，在得到分离培养物后仍需1-2个月培养方能获得结果，所以远不能满足临床治疗的需要。因此，多年来国内外学者和产业界也一直将探索快速、准确的结核病耐药性测定方法做为一个重点关注的课题。基于本课题组多年的研究成果和临床实践，我们开展了下述诊断技术开发和产品研制。

首先开展了分枝杆菌MIC浓度梯度标准的制定，这对于建立抗结核药物是否对菌株敏感的判断标准是非常重要的。

其次筛查新的免疫诊断标志物并建立结核病快速诊断技术。揭示了CFP-10—ESAT-6—Rv3425多表位融合蛋白和Rv3425、38kDa、LAM的组合抗原以及Rv3391对于结核病血清学诊断和活性结核病的筛查具有潜在应用价值。

此外，建立了系列结核病快速耐药检测技术。基于新型膜芯片技术的病原体诊断及耐药分型的诊断方法一次检测能同时满足多种应用需求，具备检测敏感性高、所需设备简单、检测速度快和成本低的优点。具有良好应用前景，值得进一步研究，并最终实施产业化。PCR-ELISA技术可对临床标本直接进行结核杆菌快速药敏检测 (6个小时)，无需贵重仪器，可以在大多数临床实验室进行推广应用，从而真正可能起到个体化治疗，具有快速、灵敏、特异、可批量检测的优点，其顺利实施必将有助于耐多药结核病的防治，为降低我国结核病发生率、死亡率提供新型而有效的手段，是一项非常适合在发展中国家临床实验室开展使用的新型耐药基因快速检测技术。

参考文献

- Zhang SL, Zhao JW, Wang HH, et al. Development and evaluation of a novel multiple-antigen ELISA for serodiagnosis of tuberculosis. *Tuberculosis*, 2009, 89 (4): 278-284
- Zhang HM, Wang J, Wang HH, et al. PPE protein (Rv3425) from DNA segment RD11 of *Mycobacterium tuberculosis*: a potential B-cell antigen used for serological diagnosis to distinguish vaccinated controls from tuberculosis patients. *Clin Microbiol Infect*, 2007, 13 (2): 139-145
- Zhang SL, Shen JG, Sun Q, et al. A novel genotypic test for rapid detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates by a multiplex probe array. *J Appl Microbiol*, 2007, 103 (4): 1262-1271