

实验室检测技术在肺结核活动性判断中的创新应用研究

张亮亮*

(渭南市临渭区疾病预防控制中心, 渭南 714000)

摘要: 肺结核活动性的准确判定是临床诊疗的关键, 但现有的实验室检测技术仍存在诸多局限。本文分析了痰液涂片镜检灵敏度不足、结核菌培养周期冗长、核酸扩增特异性不高、免疫学方法难以区分感染与活动性等问题, 并从痰液处理与染色、培养基质与条件优化、核酸扩增引物设计与反应体系改进、特异性细胞因子或生物标志物探索等方面, 提出了相应的创新策略, 为肺结核活动性判定提供了新的思路和方法。

关键词: 肺结核; 活动性; 实验室检测; 医学诊疗

0 引言

肺结核是严重危害人民健康的重大传染病之一。准确判断肺结核活动性对临床治疗和控制疾病传播至关重要。

《“十四五”全国结核病防治规划》提出要加强实验室检测能力建设, 推广新的诊断技术^[1-2]。然而, 现有的痰涂片、结核菌培养等常规方法仍存在灵敏度低、周期长等局限性。近年来, 核酸扩增、特异性免疫检测等新技术为肺结核活动性判定提供了新思路, 具有快速、灵敏、特异等优势。本文将围绕实验室检测技术在肺结核活动性判定中的应用进展展开论述, 重点分析现有方法的不足, 并提出相应的创新策略, 以期对肺结核的精准诊断和规范化治疗提供新的理论依据。

1 活动性肺结核的定义及特点

活动性肺结核是一种由结核分枝杆菌引起的慢性传染性疾病, 其定义和特点与实验室检测技术密切相关。从病原学特点来看, 活动性肺结核患者痰液中可检出大量结核分枝杆菌, 提示其具有较强的致病力和传染性。实验室常用痰液涂片镜检和结核菌培养等方法来检测结核分枝杆菌。痰液涂片镜检通过抗酸染色鉴别结核分枝杆菌, 而结核菌培养则利用特殊的培养基和最适宜的培养条件来分离和鉴定结核分枝杆菌。此外, 核酸扩增技术如聚合酶链式反应(PCR)可快速、灵敏地检测痰液标本中结核分枝杆菌的特异性核酸片段。从组织病理学特点来看, 活动性肺结核可引起以干酪样坏死为特征的肉芽肿性炎症。医学影像学技术如CT平扫+增强扫描可清晰显示肺内病灶的位置、大小、形态和密度, 为活动性肺结核的诊断提供重要线索。从免疫学特点来看, 活动性肺结核患者的特异性细胞因子水平往往显著升高。实验室通过酶联免疫斑点法等技术检

测外周血单个核细胞分泌的 γ -干扰素水平, 可用于辅助诊断活动性肺结核。总之, 活动性肺结核的定义和特点涉及病原学、组织病理学和免疫学等多个方面, 与痰液涂片镜检、结核菌培养、核酸扩增、医学影像和细胞因子检测等实验室检测技术密切相关。综合应用这些技术可为活动性肺结核的精准诊断提供有力支持。

2 运用实验室检测技术评估肺结核活动性面临的难题

2.1 痰液涂片镜检灵敏度不足

痰液涂片镜检作为肺结核诊断的常规方法之一, 虽然操作简便、经济快速, 但其灵敏度远未达到理想水平, 这主要源于痰标本中结核分枝杆菌含量较低, 常需多次采集和重复涂片才能提高检出率, 而患者的依从性往往难以保证。此外, 即使痰标本质量合格, 涂片染色后在显微镜下识别抗酸杆菌也存在诸多挑战。一方面, 痰标本中存在大量的皮屑细胞、碎屑等杂质, 易干扰镜检结果; 另一方面, 结核分枝杆菌与非结核分枝杆菌在形态学上难以区分, 容易导致假阳性。有研究统计^[3], 痰涂片镜检对肺结核的总体灵敏度仅为22%~43%, 漏诊率达57%~78%, 而痰标本抗酸杆菌涂片阳性的结核病人中, 仅60%~70%最终被证实为活动性肺结核, 提示镜检特异度同样不容乐观。

2.2 结核菌培养周期冗长

作为诊断肺结核的金标准, 结核菌培养具有特异性强、灵敏度高的优势, 但其周期之长、程序之繁复极大地限制了其临床应用价值^[4]。传统的结核菌培养基, 如洛文斯坦-詹森培养基, 需要6~8周的培养期才能明确诊断, 而新开发的Middlebrook 7H9液体培养基虽可缩短至3~4周, 但仍难以满足早期诊断和及时治疗的需求^[5]。此外, 结核分枝杆菌生长缓

* 通信作者: 张亮亮, 主管检验师, 研究方向为检验检测。E-mail: 121560487@qq.com

慢、营养要求苛刻，对外界环境的适应性差，导致其在标本采集、运输和处理过程中极易丢失活性，使得最终的培养阳性率往往不尽如人意，即使培养出阳性菌落，后续还需进行耐药性鉴定，这无疑延长了诊疗进程，加重了患者的医疗负担^[6]。种种因素叠加，使得结核菌培养在很多基层医疗机构难以开展，即使在订有生物安全防护的专业实验室，其开展率和及时率也亟待提高。

2.3 核酸扩增特异性有待提高

核酸扩增技术以其快速、灵敏的特点，为肺结核的实验室诊断带来了革命性变革，但其特异性问题却始终困扰着临床工作者。目前常用的核酸扩增方法，如聚合酶链式反应、链霉菌素烯醇核苷酸介导的扩增等，虽然能够在痰标本中直接检测出结核分枝杆菌的特异性基因片段，但假阳性率却不容忽视^[7]。这主要源于两方面原因：一是不同结核分枝杆菌株及其近缘菌种之间存在同源性较高的保守基因序列，难以实现精准区分；二是痰液标本中残留的宿主 DNA、PCR 抑制物等易于干扰扩增反应，降低检测的特异性^[8]。此外，由于结核分枝杆菌基因组高度同源，设计针对突变位点的特异引物和探针面临诸多技术障碍，导致利用核酸扩增鉴定结核分枝杆菌耐药谱的方法学研究进展缓慢。疾病早期或治疗过程中，痰标本中游离 DNA 含量极低，也限制了核酸扩增技术的临床应用范围。

2.4 免疫学方法难以准确区分感染与活动性

近年来，基于 T 细胞免疫反应的结核感染诊断方法，如结核感染 T 细胞斑点试验 (T-SPOT.TB) 等，因其操作简便、无需鉴别接种史而备受青睐^[2]。然而，这类方法在活动性肺结核诊断中的应用价值却备受质疑。研究表明，T-SPOT.TB 对活动性肺结核的诊断灵敏度虽可达 80% 以上，但其对结核感染和活动性肺结核的区分能力有限，容易导致过度诊断和不必要的抗结核治疗^[9]，这主要是由于现有的 T 细胞免疫检测方法大多基于早期分泌抗原靶标 (ESAT-6) 和培养滤液蛋白 10 (CFP-10) 等结核分枝杆菌特异性抗原。这些抗原在潜伏感染和活动性疾病状态下均能激发机体产生强烈的 T 细胞免疫应答，难以据此进行有效鉴别^[10]。此外，宿主免疫状态、年龄、营养状况等因素也会影响检测结果的准确性和可重复性。流式细胞术、酶联免疫斑点法等技术平台操作复杂、成本较高，进一步限制了 T 细胞免疫检测在结核病疫区的推广应用^[11]。

3 优化肺结核活动性判定的实验室检测技术创新策略

3.1 开发高灵敏度痰液处理与染色方法

针对痰液涂片镜检灵敏度不足这一难题，开发高灵敏度的痰液处理与染色方法无疑是一个极具前景的突破口。传统的痰液处理方法，如直接涂片法、沉淀涂片法等，虽然操作简便，但标本浓缩倍数低，细菌回收率差，严重影响了镜检的灵敏度^[12]。为此，可以借鉴分子生物学的理念，利用磁珠包被特异性捕获探针，从痰液标本中富集结核分枝杆菌，再经过高速离心和酶解处理，最终制备成高浓度的涂片标本。这种创新的痰

液处理方法有望将结核分枝杆菌的检出率提高数倍，使得镜检阳性率大幅提升^[13]。与此同时，针对抗酸染色这一关键环节，可以适当改良。传统的抗酸染色法，如 Ziehl-Neelsen 染色，虽然能够清晰地区分抗酸杆菌和非抗酸杆菌，但对结核分枝杆菌的特异性不足。因此，可以尝试引入荧光素标记的结核分枝杆菌特异性单克隆抗体，与抗酸染色联合应用，形成“抗酸-荧光双染”新方法，这不仅能在普通光学显微镜下观察到细菌的形态学特征，还能在荧光显微镜下准确判读结核分枝杆菌的特异性染色结果，真正实现“形态+特异性”双重辨识，大大提高镜检的特异度^[14]。

3.2 优化结核菌快速培养基与条件

结核菌培养的周期冗长一直是制约肺结核实验室诊断的瓶颈。为了攻克这一难题，优化结核菌快速培养基与条件无疑是一个值得探索的方向。传统的结核菌培养基，如 Löwenstein-Jensen 培养基，虽然成分经典，但其凝固不透明的特点却不利于菌落的早期观察^[15]。为此，可以在基础配方中适当调整琼脂的比例，制备出半透明的固体培养基，使得结核分枝杆菌的生长情况一目了然^[3]。同时，可添加一些特殊的生长促进剂，如胰岛素、铁载体蛋白等，为结核分枝杆菌的快速繁殖创造理想的营养环境^[16]。对于液体培养基，如 Middlebrook 7H9，除优化碳源、氮源的比例以促进细菌生长外，引入同位素标记技术或荧光标记技术或许是一个颇具创新性的思路。通过在培养基中加入放射性碳源底物或荧光底物，结核分枝杆菌在代谢过程中释放出标记物质，从而实现菌落的快速定量检测，有望将传统的 3~4 周培养周期缩短至 1~2 周。当然，培养条件的优化也不容忽视。例如，精确调控培养温度和 pH 值，动态平衡二氧化碳和氧气浓度，模拟结核病灶微环境，这都有可能大幅度缩短结核菌的生长周期。此外，借助现代化的微生物培养设备，实现高通量、自动化的结核菌培养和药敏试验，也是提高检测效率的有效途径。

3.3 改进核酸扩增检测引物设计与反应体系

核酸扩增检测因其快速、灵敏的特点而备受青睐，但其特异性问题一直困扰着临床工作者。为了攻克这一难题，可以积极改进核酸扩增检测引物设计与反应体系。传统的引物设计策略，主要针对结核分枝杆菌的保守基因序列，如 IS6110、16S rRNA 等，虽然能够实现较高的检出率，但难以避免与非结核分枝杆菌产生交叉反应^[17]。因此，可以利用生物信息学手段，在结核分枝杆菌基因组中筛选出特异性更强、变异性更小的核心基因，如 RD1 区、DevR/DosR 等，作为新的扩增靶标，以期最大限度地提高检测的特异性。同时，针对这些新靶标，还可以设计出梯度引物和探针，覆盖不同的突变位点，形成一套完整的“分子探针库”，用于精准鉴别结核分枝杆菌的不同基因型别^[18]。在扩增反应体系的优化方面，不妨借鉴数字 PCR、环介导等温扩增等新技术的理念，将传统的三步法 PCR 反应简化为恒温扩增，不仅能够缩短检测周期，还能有效降低非特异性扩增的风险。此外，在反应液中加入特异性的核酸内切酶和核

酸外切酶, 实现对扩增产物的原位消化和纯化, 也是一个创新思路, 这不仅能够去除反应体系中残留的引物二聚体和非特异性产物, 还能避免扩增产物的交叉污染, 从而最大限度地保证检测结果的准确性^[19]。通过改进核酸扩增检测引物设计和反应体系, 将为结核病的早期诊断和治疗提供有力的技术支持。

3.4 探索特异性细胞因子或生物标志物

免疫学方法在结核感染的诊断中虽然备受青睐, 但在区分感染与活动性疾病方面却存在明显短板, 突破这一瓶颈, 可以探索特异性细胞因子或生物标志物。目前, 结核感染 T 细胞斑点试验等常用方法主要检测 γ -干扰素等经典的 Th1 型细胞因子, 虽然灵敏度较高, 但特异性欠佳。因此, 可以利用高通量测序技术, 在结核分枝杆菌感染者和活动性肺结核患者中进行转录组和蛋白组的差异分析, 筛选出一批能够有效区分两种状态的特异性生物标志物。例如, 前期研究表明, IL-2、IP-10 等细胞因子在活动性肺结核患者体内表达显著升高, 而记忆性 T 细胞表面的 PD-1、Tim-3 等分子则明显下调, 这为构建新的免疫学诊断模型提供了重要线索^[20]。此外, 还可以利用单细胞测序技术, 对结核分枝杆菌特异性 T 细胞进行精细解剖, 深入分析其表型和功能特征的动态变化, 有望发现更多具有诊断价值的细胞亚群标志物。在此基础上, 结合新型的免疫检测平台, 如 CyTOF 质谱流式细胞术、MICSSED 芯片等, 可以实现对标志物的精准定量分析, 建立起一套行之有效的免疫学诊断方案。同时, 结核分枝杆菌抗原的创新性研究也不容忽视。传统的 ESAT-6、CFP-10 等抗原组分虽然特异性强, 但仍不能有效区分感染和活动性疾病, 因此急需在结核分枝杆菌分泌蛋白、膜蛋白等方面发掘出新的候选抗原, 并优化其提取纯化工艺, 最终研制出特异性更强、适用性更广的诊断试剂盒。

4 结束语

本文深入探讨了实验室检测技术在肺结核活动性判定中的应用, 指出了现行技术的不足并提出了创新策略。痰液涂片镜检、结核菌培养、核酸扩增和免疫学方法各有局限, 如灵敏度低、周期长、特异性不足等。为此, 文章提出了高灵敏度痰液处理、优化培养条件、改进核酸扩增技术及探索特异性生物标志物等策略。这些创新方法有望提高肺结核活动性判定的准确性和效率, 对临床诊疗具有重要的意义。未来, 随着技术的不断进步, 有望克服这些挑战, 为肺结核的诊断和治疗提供更有力的支持。

参考文献

[1] 魏靖入, 陈卉, 成君. 高中学生肺结核筛查和预防性治疗研究进展[J]. 结核与肺部疾病杂志, 2024, 5(04): 358-363.
[2] 赵君, 杨红雨, 康雄. 肺结核患者病耻感影响因素及干预策略研究进展[J]. 结核与肺部疾病杂志, 2024, 5(04): 364-369.

[3] 伍迪, 李萌, 严磊, 等. 健脾润肺愈癆汤联合抗结核四联对肺结核患者的临床疗效[J]. 中成药, 2024, 46(08): 2826-2829.
[4] 扶伟. 清肺养阴方联合抗结核药物治疗初治敏感肺结核的研究[J]. 中医研究, 2024, 37(08): 37-41.
[5] 李晓阳, 王霞, 赵桂增. 优福宁胶囊联合 2HRZE/4HR 方案治疗新发活动性肺结核临床研究[J]. 新中医, 2024, 56(15): 67-71.
[6] 王连菊, 夏青青, 杨菲. 综合护理干预对肺结核患者治疗依从性的影响[J]. 中国医药指南, 2024, 22(22): 18-21.
[7] 王治国, 李建军, 焦亚洲. 初治涂阳肺结核患者预后不良的影响因素[J]. 中国民康医学, 2024, 36(15): 1-5.
[8] 徐春华, 朱士玉, 胡屹, 等. 重组结核杆菌融合蛋白在肺结核密切接触患者中筛查结核分枝杆菌感染效果分析[J]. 中国防痨杂志, 2024, 46(08): 897-902.
[9] 蒋云龙, 吴志超, 张迅夫, 等. 临床常用指标在肺结核高发地区对结核性及恶性孤立性肺结节的鉴别诊断效能评价[J]. 黑龙江医药科学, 2024, 47(04): 33-37.
[10] 向长港, 孙曼, 童胜兰, 等. 曲霉菌特异性 IgM 和 IgG 抗体水平对肺结核患者并发慢性肺曲霉菌病的诊断价值[J]. 山东医药, 2024, 64(22): 5-9.
[11] 胡鹏, 吴成璧. 耐药肺结核患者治疗结局及费用补偿影响因素分析[J]. 卫生经济研究, 2024, 41(08): 41-44.
[12] 刘年强, 王森路, 王乐, 等. 新疆维吾尔自治区“十三五”结核病防治规划实施效果评价[J]. 热带医学杂志, 2024, 24(07): 1026-1030.
[13] 叶瑞英. 急救护理在肺结核伴大咯血患者中的应用效果[J]. 中国药物经济学, 2024, 19(S1): 133-135+138.
[14] 吴艳红, 陈晓婷, 黄晓伟. 肺结核患者结核分枝杆菌耐药的影响因素[J]. 中国民康医学, 2024, 36(14): 7-10.
[15] 朱世军, 户万永. 介入栓塞治疗复杂性肺结核大咯血的临床研究[J]. 航空航天医学杂志, 2024, 35(07): 822-824.
[16] 林芳. 耐药肺结核患者社会疏离感状况及影响因素分析[J]. 航空航天医学杂志, 2024, 35(07): 871-873.
[17] 国美峰, 李继翰, 倪磊磊, 等. 隔蒜灸配合中药治疗气阴两虚型耐多药肺结核的疗效观察[J]. 上海针灸杂志, 2024, 43(07): 763-768.
[18] 江燕, 王荣, 杨晨, 等. 南京市 2015—2022 年肺结核合并糖尿病患者的流行特征和时间趋势[J]. 中国热带医学, 2024, 24(07): 846-850.
[19] 杨新华, 张丹红. 支气管肺泡灌洗液 Xpert MTB/RIF 检测在肺结核早期诊断中的应用价值[J]. 临床医学研究与实践, 2024, 9(21): 99-102.
[20] 巴红珍, 来坤, 阮梦雨, 等. 基于定量 CT 对浸润性肺结核病变临床评估的价值分析[J]. 中国临床医学影像杂志, 2024, 35(07): 471-475.