



结核病实验室分子生物学检测

中国疾病预防控制中心结核病预防控制中心



主要目录

01 培训目标

02 职责分工

03 工作内容

04 知识要点



1

培训目标



结核病实验室分子生物学检测的意义

- 结核病防治关键措施包括，**早发现**、早报告、**早治疗**、早管理。
- 传统的细菌学检查如抗酸菌涂片检查敏感性低，其检测下限为5000-10000条菌/ml痰标本。
- 分枝杆菌培养及表型药敏试验结果报告周期长，固体培养一般需3-4周报告阳性结果（液体培养2周），8周报告阴性结果（液体培养6周）。药敏试验再额外增加4周（液体药敏2周）。
- 分子生物学检测较传统的涂片镜检有**更高的灵敏度**，较传统的培养和表型药敏实验**速度更快**，且检测结果具有**结核分体杆菌特异性**。
- 肺结核诊断标准WS 288—2017中增加了分子生物学作为病原学检查方法。



培训目标

- 了解推广使用分子生物学检测技术的背景和意义。
- 明确分子生物学检测技术在各级医疗机构和疾控机构的应用范围。
- 了解分子生物学检测技术的基本原理及优势和局限性。
- 熟悉常用的分子生物学检测技术特点。
- 掌握常用分子生物学检测结果的解读。
- 了解分子生物学实验基本流程，实验室分区的概念。



2

职责分工



结核病实验室分子生物学检测技术应用

定点医疗机构

- 诊断
 - 县区级至少使用分子生物学检测技术开展结核分枝杆菌核酸检测，如配备了多色巢式实时荧光定量扩增检测技术，可同时进行利福平耐药基因检测。
 - 地市级应至少使用分子生物学技术开展利福平耐药基因检测，并鼓励开展异烟肼、氟喹诺酮类相关耐药基因检测，并同时开展分枝杆菌菌种鉴定。
- 疫情处置
 - 病原学检测

疾控机构

- 疫情处置
 - 对疫情阳性培养物开展全基因组测序或基因分型，为疫情溯源和确定传播等工作提供依据。
- 耐药监测
 - 省级和国家级结核病控制机构可以利用分子生物学检测技术如全基因组测序、基因分型等开展分子流行病学监测，从而动态了解结核病的流行现状及变动趋势。



结核病实验室分子生物学检测技术应用

➤ 县区级和地市级工作的衔接

- 具备分子生物学核酸耐药检测技术（如多色巢式实时荧光定量PCR技术等）的县（区）级，应开展利福平耐药检测。
- 不具备分子生物学耐药检测技术的县（区）级，应将病原学阳性肺结核患者的痰标本或菌株送到地市级进行耐药检测。
- 县区级医疗机构需要将标本或菌株转运至上一级实验室进行耐药筛查时，应妥善保存标本或菌株，并即时转运，避免发生污染等。**建议每周至少运送两次**，若确实因距离遥远无法在一周内运送痰标本时应在采集痰标本后将痰标本放置于-20℃或-70℃冰箱保存直至运送至开展相关检测的实验室，但需注意的储存时间越长越会影响后续的检测结果。
- 建立有效的实验室检测结果反馈机制或系统。



3

工作内容



结核病病原学检测-结核分枝杆菌核酸检测

- **原理：**通过检测结核分枝杆菌特异的核酸序列（IS6110，16S rRNA、gyrB、rpoB、MPB64、Rv0069c、Rv3133c、hsp65 等），**阳性结果**提示标本中有结核分枝杆菌核酸目标片段，从而确定痰标本中**含有结核分枝杆菌**。
- **可用技术：**结核分枝杆菌环介导等温扩增检测、交叉引物等温扩增检测、结核分枝杆菌RNA实时荧光等温扩增技术、DNA实时荧光恒温扩增技术、恒温芯片检测技术、荧光探针法、实时荧光定量扩增检测、多色巢式实时荧光定量扩增检测（**可同时检测利福平耐药基因**）。
- **检测对象：**主要为痰标本，肺外标本灵敏度较痰标本降低。



结核分枝杆菌核酸检测技术选择-技术角度

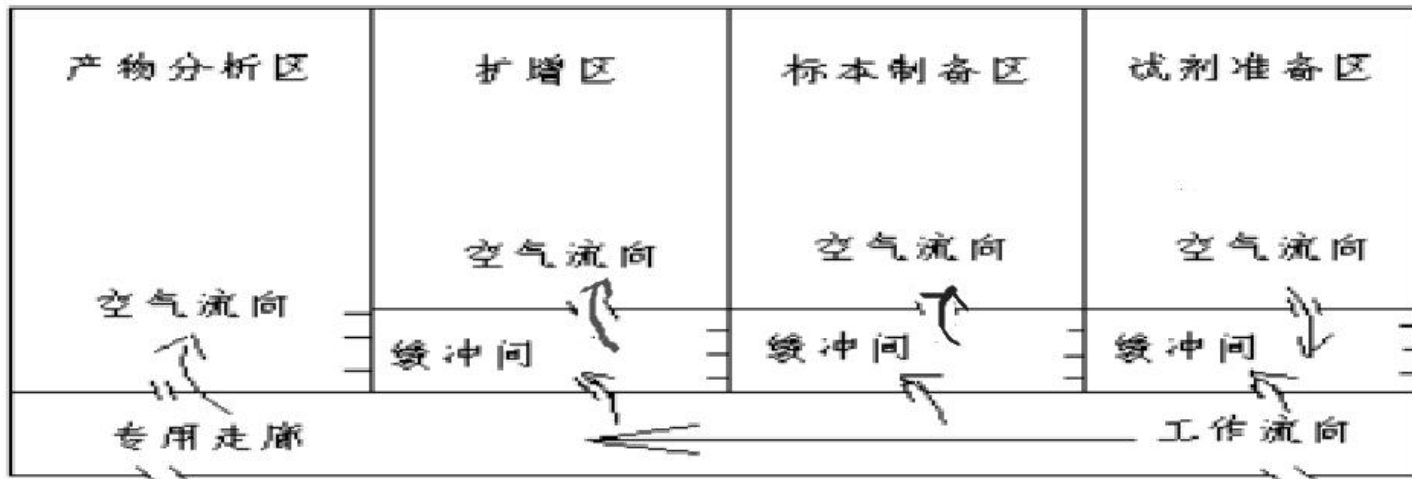
检测技术	操作步骤	分区要求	复杂程度
多色巢氏实时荧光定量扩增检测	1.样本处理 2.自动化核酸提取、扩增及检测 (无需配制试剂但试剂存储需要房间)	二区 (三区)	低
各种等温扩增检测	1.试剂配制 2.样本处理和核酸提取 3.扩增及检测	三区	中等
荧光探针法			
实时荧光定量扩增			

灵敏度、特异度有一定差异，操作繁琐程度不一。



结核分枝杆菌核酸检测技术实验室建设

- 分子检测方法一般需要试剂准备、标本制备包括前处理（液化）及DNA提取，扩增和产物分析共4个主要步骤。开展结核分枝杆菌分子生物学检测的实验室应按照《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》和《医疗机构临床基因扩增检验实验室工作导则》要求进行设置，实验室一般分为四个区，即试剂配制区、样本制备区、扩增检测区和产物分析区。**标本制备区需满足生物安全二级实验室要求。**





结核分枝杆菌核酸检测技术实验室建设

- 标准的分子检测流程为4个主要步骤，而多种分子生物学检测技术将扩增和产物分析和并为一个步骤，如多色半巢式实时荧光定量PCR检测更将标本前处理以外的步骤整合到1个反应盒中。
- 实验室可根据采用的方法、仪器的功能及具体操作等，在保证检测质量、不出现污染的情况下适当合并分区。
- 需要获取临床基因扩增实验室资质。
- 开展临床基因扩增试验的人员获得相关资质。



结核分枝杆菌核酸检测技术临床应用

- 结核分枝杆菌核酸检测作为一种病原学检测方法，用于活动性结核病的诊断。
- 结核分枝杆菌核酸检测结果阳性表示标本中检出结核分枝杆菌复合群。
- 但注意无法区分死菌或活菌，接受治疗或治愈的患者仍有可能为阳性，因此目前的结核分枝杆菌核酸检测方法仅能用于结核病的诊断，**不能用于临床疗效的监测。**



结核分枝杆菌核酸检测技术临床应用-结果解读

结核分枝杆菌核酸阴性、涂片和/或培养阳性

- 可能为NTM；
- 分子检测未检出可能由于标本中存在扩增抑制物等。由于分子生物学检测灵敏度较高，对样本稀释后，可降低抑制物的影响，但标本内仍含有一定量得DNA模板，可再次扩增检测。

结核分枝杆菌核酸阳性、培养阴性

- 尤其是分子检测阳性级别很低时，考虑有无用药史影响培养结果，如标本采集前接受过氟喹诺酮类药物治疗，，必要时重复标本检测；
- 患者在2-3年内甚至5年内是否曾被诊断为结核病并接受治疗，由于DNA长时间存在可能造成假阳性。



结核分枝杆菌耐药基因检测

- **原理：**耐药相关基因序列的突变会导致结核分枝杆菌对抗结核药物产生耐药性，通过检测耐药相关基因（**rpoB**，**KatG**、**inhA**、**ahpC**，**gyrA**，**gyrB**等）是否发生突变或野生型缺失，可以判断相应的抗结核药物的耐药性。耐药基因检测可以快速提供结果，且对利福平、异烟肼、喹诺酮类药物耐药性的检测准确性较好，可作为首选方法。
- **可用技术：**多色巢式实时荧光定量扩增检测、线性探针、基因芯片、熔解曲线、反向点杂交利福平耐药检测、基因测序（缺少商品化产品）等方法。
- **检测对象：**多色巢式实时荧光定量扩增技术及线性探针（Version2）可针对所有痰标本检测，其他技术涂阳标本（病原学阳性）或菌株，但注意在细菌载量低时可能造成无法判读结果的比例升高。



结核分枝杆菌耐药基因检测技术选择-技术角度

➤ 常用耐药基因检测方法检测不同药物敏感性及其特点如下：

检测技术	检测药物	技术特点
多色巢氏实时荧光定量扩增检测	利福平	自动化程度最高，只需一部人工操作，DNA提取、扩增、检测整合到一个反应盒中。同时提供痰标本中结核分枝杆菌检测和利福平耐药相关基因检测，适用于区县级实验室开展结核分枝杆菌检测和利福平耐药筛查。
熔解曲线技术	利福平 异烟肼 氟喹诺酮类 链霉素 乙胺丁醇	提供多种药物耐药基因检测
基因芯片技术	利福平 异烟肼	与其他方法相比操作最复杂，但可提供耐药基因具体突变位点信息
线性探针技术		
反向点杂交技术		



结核分枝杆菌耐药基因检测技术选择-技术角度

检测技术	操作步骤	分区要求	复杂程度
熔解曲线技术	1.试剂配制 2.样本处理和核酸提取 3.扩增及检测	三区	中等
基因芯片技术	1.试剂储存和配制 2.样本处理和核酸提取 3.扩增 4.杂交及检测	四区	高
线性探针技术			
反向点杂交技术			

每种技术的检测流程的复杂程度有所差异，现行多色巢式实时荧光定量扩增检测手工步骤最少，其次为熔解曲线技术。线性探针、基因芯片和反向点杂交耐药检测方法手工操作步骤较多。基因测序检测耐药目前尚无商品化产品，且缺少标准并广泛公认的生物信息分析流程。



结核分枝杆菌耐药基因检测实验室建设

➤ 按照临床基因扩增实验室建设要求



结核分枝杆菌耐药基因检测技术临床应用

- 通过耐药基因是野生型和突变型推断是敏感或耐药。
- 目前商品化技术检测针对利福平、异烟肼、氟喹诺酮类、乙胺丁醇、链霉素耐药，对于其他药物如贝达喹啉等无法提供检测。
- 针对不同药物的基因型检测方法的灵敏度存在差异，其中利福平表型和基因型一致性最好。
- 不同耐药突变位点提示不同耐药水平，如异烟肼耐药相关基因`inhA`基因突变提示低水平耐药，而`katG`基因突变提示高水平耐药。
- 通过耐药基因检测结果判断的耐药结果与通过传统方法获得的表型药敏试验结果有时并非完全一致，或者两种耐药基因检测方法的检测结果有时也存在差异。
- 异烟肼，氟喹诺酮类耐药基因检测方法未检测到耐药，而临床考虑可能耐药时可进一步开展表型药敏试验。



结核分枝杆菌耐药基因检测技术临床应用-结果解读

耐药基因检测敏感、表型药敏试验耐药

- 检测的耐药基因不能覆盖所有表型耐药的机制，如检测利福平耐药的rpoB 基因，灵敏度可达90-95%，异烟肼耐药相关基因检测灵敏度约为80-85%。
- 分子生物学检测方法通常要求标本中耐药菌含量高于20%以上时才能检出（表型药敏实验耐药菌高于1%即判定为耐药），因此耐药基因检测敏感时需结合临床治疗效果，若治疗效果不好，建议进一步等待表型药敏试验进行已有治疗方案的调整。
- 由于用于检测基因突变的探针不能覆盖耐药相关基因全长，若突变位点在检测区域之外则耐药基因检测显示敏感结果。

耐药基因检测耐药、表型药敏试验敏感

- 某些突变相对应的MIC值低于表型药敏试验方法的临界浓度，但与临床治疗效果较差相关，因此使用现有的固体比例法或液体法定性检测耐药性结果可能导致不一致。如利福平液体药敏临界浓度为1.0ug/ml。
- 某些位点发生沉默（同义）突变，这种突变并不改变表型。因此虽然分子生物学检测到基因突变，但表型药敏试验结果敏感。



结核分枝杆菌耐药基因检测技术临床应用-结果解读

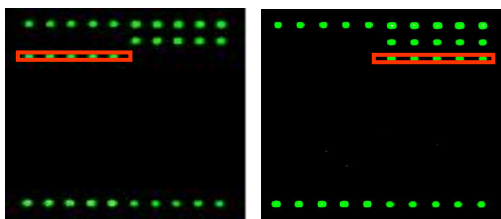
不同分子生物学检测技术耐药基因检测结果不一致的分析

- 由于不同检测技术对于耐药相关基因检测区域或覆盖长度有差别，因此在这些区域发生的突变时有可能引起不同检测方法间结果的差异。例如多色半巢式实时荧光定量PCR与线性探针检测技术对于利福平耐药相关基因rpoB 533位点 (L533P)，线性探针方法提供该位点的检测，而多色半巢式实时荧光定量PCR检测未覆盖该位点。
- 由于标本中存在异质性耐药，即同时存在敏感菌和耐药菌株。线性探针方法同时提供检测野生型（敏感）探针条带和某个突变探针条带，而多色半巢式实时荧光定量PCR仅能检测到敏感或耐药占比高的类型的菌，因此与线性探针相比，多色半巢式实时荧光定量PCR更容易报告敏感。



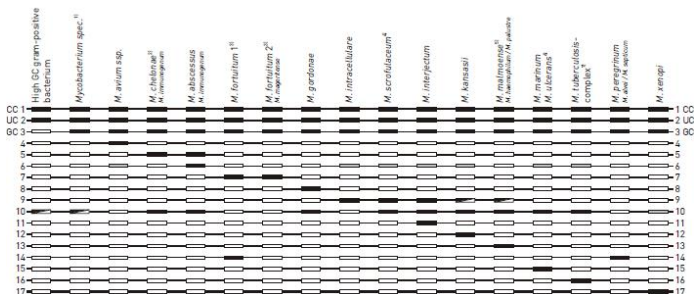
分枝杆菌菌种分子生物学鉴定技术

- 分枝杆菌种类繁多，除结核分枝杆菌和麻风分枝杆菌外，其它的分枝杆菌统称为非结核分枝杆菌。由于不同的分枝杆菌病其生物学特性、致病性、免疫学和对药物的敏感性不尽相同，因此菌种鉴定对于后续研究、预防和治疗均具有十分重要的意义。
- 实验室常用的对硝基苯甲酸(PNB)培养基鉴定方法仅能区别结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌，而不能鉴定到种。而传统的生化鉴定方法操作复杂耗时较长。而分子生物学方法可提供快速的菌种鉴定结果。其原理是对标本中提取的核酸进行扩增后，使用特异性的核酸探针对某些管家基因（**16S rRNA, 16S~23S间隔区、rpoB及hsp65**等）扩增产物进行检测，从对标本中的分枝杆菌进行菌种鉴定。
- 常用的分子生物学分枝杆菌鉴定方法有，基因芯片、线性探针、反向点杂交技术等，最多可鉴定二十余种分枝杆菌种或群。



结核

胞内





基因分型技术

- **基因组测序技术(分辨率高, 生信分析难度大)**
- **MIRU-VNTR (分辨率较基因组测序低, 操作简便, 实验室人员可自行分析结果)**
- **检测对象: 分离培养阳性经鉴定为结核分枝杆菌的菌株**
- **应用: 聚集性疫情处置, 监测菌株的流行和传播**



4

知识要点



知识要点

- 分子生物学检测技术主要分为结核分枝杆菌核酸检测技术、耐药相关基因检测技术、菌种鉴定及基因分型技术。
- 分子检测技术主要流程有试剂准备、标本前处理（液化）及DNA提取，扩增和产物分析实验室按照相关规定应分为4区设置，可根据不同技术合并、减少部分分区。
- 分子生物学检查技术依据操作繁琐程度分为高、中、低复杂度三类。各地选取适宜的技术。
- 分子生物学检测方法较传统的涂片镜检技术**更高**的检测灵敏度，较传统的培养和药敏实验**更快**的检测速度并具有结核分枝杆菌**特异性**。医疗机构可使用分子生物学检查技术进行患者诊断、耐药筛查，**但不能用于疗效监测**。
- 疾控机构可利用分子生物学检测技术开展疫情处置、日常监测等工作。



知识要点

- 核酸检测的结果具有结核分枝杆菌特异性，因此在实际应用过程中存在与传统的细菌学检测方法结果不一致的情况。
- 由于方法的局限以及沉默突变、某些争议突变和异质耐药的情况，在判断药敏结果时针对不同技术、不同抗结核药物需合理判断结果。
- 分子生物学方法在某些方面不能完全替代细菌学方法，与传统细菌学方法互为补充。



习题

- 习题1 下列哪个工作不适用分子生物学检测技术?
 - A 患者诊断 B 疗效评价 C 疫情处置 D 分子流行病学监测
- 习题2 下列哪些是分子生物学检测的工作内容?
 - A 结核分枝杆菌核酸检测 B 分枝杆菌菌种鉴定 C 结核分枝杆菌耐药基因检测 D 结核菌潜伏感染
- 习题3 简述造成结核分枝杆菌核酸检测阳性，涂片镜检和分枝杆菌培养阴性的原因。



The clock is ticking



《中国结核病

2021

3/24

世界防治结核病日

终结结核流行
自由健康呼吸



肺结核是
呼吸道传染病，
人人都有可能被感染。



勤开窗通风，
加强营养，适度运动，
提高身体抵抗力，
有助于预防肺结核。



不随地吐痰，
咳嗽、打喷嚏时
避开他人、掩住口鼻，
可减少肺结核传播。



国家卫生健康委员会疾病预防控制中心
中国健康教育中心 中国疾病预防控制中心