

肺结核病原位病理检测技术的应用价值

李红娜 宋旭东

(华北理工大学 河北唐山 063000)

摘要：目前检测结核分枝杆菌常用的诊断方法主要包括细菌学检查、免疫学检查及分子生物学检查。但是，仍然有一些菌阴性肺结核病人漏诊。因此，为提高结核分枝杆菌检出率和减少漏诊，本研究主要讨论近几年常用的原位病理检测技术在早期肺结核病筛查中的诊断价值。

关键词：肺结核病；原位病理诊断技术；结核分枝杆菌

一、形态学诊断

结核病常规病理学诊断包括肉眼观察和显微镜下表现，肺结核病典型病变肉眼表现为肺组织切面呈灰黄色、质地细腻；镜下见病变中央伴干酪样坏死，周围为类上皮样细胞和多核巨细胞构成肉芽肿^[1]。虽然形态学诊断有一定的特异性，但是仍然无法准确鉴别肺结核病与肉芽肿性疾病。因此，结核病常规病理学诊断并不能作为该疾病诊断的金标准。

二、细菌学检查

1、抗酸染色

又称萋尼氏染色法 (Ziehl-Neelson)，其原理是石碳酸复红能够与抗酸杆菌体内的分枝菌酸结合形成复合物，使之不易被酸性溶液脱色，后经亚甲基蓝溶液复染，最终使抗酸杆菌染成紫红色^[2]。

抗酸染色既可用于痰标本，又可用于石蜡包埋组织标本检测 MTB。抗酸染色灵敏度较低，且需要使用 100 倍油镜观察 300 个视野，容易使病理医生造成视觉疲劳，进而漏诊。但又因其操作简便、耗时短、实验条件要求低、特异性较好等优点使其作为目前大多数医院检测 MTB 的主要方法。

国内有报道称利用改良抗酸染色法可提高组织标本中抗酸杆菌的阳性检出率^[3]，改良抗酸染色法主要对胞内抗酸杆菌进行染色，对于检测石蜡包埋组织中 MTB，改良抗酸染色法更优于传统萋尼氏染色法。

2、金胺 O 荧光染色

原理是利用荧光显色和 MTB 嗜石碳酸的特性^[4]，使抗酸杆菌着色，而背景细胞不着色。金胺 O 荧光染色可用于检测痰涂片和组织标本中的 MTB。Githui W 等^[5]利用抗酸染色检测痰涂片中抗酸杆菌阳性率为 65%，金胺 O 荧光染色阳性率为 80%。国内外大部分研究中，金胺 O 荧光染色的阳性率均明显高于抗酸染色法。

有学者发现，与传统抗酸染色检测 MTB 相比，金胺 O 荧光染色灵敏度和阳性率更高，检测时间和诊断时间更短。而且荧光显微镜在黑暗条件下，结核杆菌更易观察；但金胺 O 荧光染色的假阳性率略高于抗酸染色^[6]。

三、免疫学检查

目前常用的免疫学检查主要包括结核抗体血清学检测、 γ -干扰素释放试验、皮肤结核菌素试验 (PPD) 及免疫组化。结核抗体血清学检查灵敏度和特异性较低，对于少菌性肺结核病易被漏诊。

γ -干扰素体外释放试验对于结核病合并 HIV 或其他免疫缺陷病患者和儿童结核病中的敏感性较低^[7]。PPD 试验不能有效区分 MTB 的自然感染与卡介苗接种引起的免疫反应，并且容易出现假阴性结果^[8]。

1、免疫组化

石蜡包埋肺结核病组织中，传统萋尼氏染色法及抗酸杆菌荧光染色法都存在缺点，如假阴性率高，特异性较低等。因此，通过总结国内外文献发现了一种可弥补其他方法不足的工具——免疫组化检测肺结核病分泌性蛋白质。主要利用抗体检测 MTB 特异性抗原，例如 Mpt64、6-kDa 早期分泌的抗原靶标 (Esat6)、10-kDa 培养液蛋白 (Cfp10) 和抗原 85 (Ag85) 复合物等^[9]。

Ag85 复合物主要是通过阻止巨噬细胞吞噬溶酶体的形成来逃避宿主的免疫反应，其中 Ag85B 是 MTB 分泌最多的蛋白，占总分泌蛋白的 6%^[10]，在 MTB 致病过程中起至关重要的作用。2016 年车南颖团队^[11]报道利用自制多克隆抗体 Ag85B 检测淋巴结结核组织中的阳性信号来证实 MTB 的存在。免疫组化虽然可提高 MTB 检测的敏感性、并且定位 MTB；但其阳性信号微弱时无法与背景染色和粉尘颗粒相鉴别，因此造成假阴性的结果。

4 分子病理学检查

4.1 原位杂交技术

原位杂交 (in situ hybridization, ISH) 技术是一种快速、准确、经济的检测结核分枝杆菌复合体的方法，它允许寡核苷酸探针在组织和培养物中鉴定结核分枝杆菌，并且允许在病理组织学背景下直接观察细菌分布和形态^[12]。它具有很高的敏感性，可用于多种不同的标本中检测 MTB。而且具有特异性高、操作简单、速度快等优点，并且可准确定位 MTB 分布。

并且有研究表明寡核苷酸探针在合适的体系中将作为一种更优选的探针替代核酸探针检测 MTB，并且该方法适用性强，可极大的帮助病理医生快速、准确诊断早期肺结核病。

4.2 RNAscope 原位杂交技术

RNAscope 技术是一种新颖的 RNA 原位杂交技术，具有独特的探针设计，可同时进行信号放大和背景抑制，实现对单个细胞 mRNA 水平进行检测，同时保留组织形态，并且该技术主要用于福尔马林固定、石蜡包埋的组织标本^[13]。RNAscope 原位杂交技术可在放大背景的目标特定信号，比起原位杂交技术和传统 PCR 技术，

RNAscope 原位杂交技术更能显著提高信噪比。

RNAscope 探针还可用于人乳头瘤病毒、EB 病毒、巨细胞病毒等^[14-16]多种病毒 RNA 的检测。有实验表明利用 RNAscope 原位杂交技术可检测小鼠呼吸道中共生细菌 mRNA^[17]。综合以上文献,利用 RNAscope 原位杂交技术检测肺结核病组织中的 MTB 似乎成为一种可能的想法。

4.3 原位聚合酶链反应

原位 PCR 技术 (In situ polymerase chain reaction, IS PCR) 是将原位杂交与 PCR 技术相结合,在原位基础上扩增目的 DNA 片段和基因产物。它可直接对组织或细胞内的 mRNA 进行定位,在兼顾原位杂交和传统聚合酶链反应两大技术的优点的同时,不改变细胞和组织的完整形态^[18]。

与传统 PCR 技术相比,原位 PCR 技术可在不破坏组织和细胞完整形态的情况下,与组织中的结核杆菌特异性多拷贝基因序列 IS6110 基因组结合,最终达到检测结核分枝杆菌的目的。该技术敏感性和特异性较高,但对于细菌量少的石蜡组织,无法准确判断其准确性。

5 总结

近年来,分子生物学技术的蓬勃发展,使肺结核病的诊断越来越容易,如实时荧光定量聚合酶链反应、Xpert MTB/RIF 检测等,但由于菌阴性肺结核病和耐药肺结核病人大幅度增加,一些传统检测手段已无法满足临床需要。因此,我们主要采用几种常用的原位病理诊断技术对早期肺结核病进行快速、准确的筛查,为临床和病理医生诊断肺结核病找到最优辅助工具,更好的阻断肺结核病的传播。

参考文献:

[1]刘彤华. 诊断病理学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013:241-256.

[2]中华医学会结核病学分会, 结核病病理学诊断专家共识编写组. 中国结核病病理学诊断专家共识[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2017, 40(06):419-425.

[3]Heemskerk A D, Donovan J, Thu D, et al. Improving the microbiological diagnosis of tuberculous meningitis: A prospective, international, multicentre comparison of conventional and modified Ziehl-Neelsen stain, GeneXpert, and culture of cerebrospinal fluid[J]. J Infect, 2018, 77(6):509-515.

[4]齐兴峰, 郑智勇. 结核分枝杆菌检测技术的研究进展[J]. 临床与实验病理学杂志, 2016, 32(11):1263-1266.

[5]Githui W, Kitui F, Juma E S, et al. A comparative study on the reliability of the fluorescence microscopy and Ziehl-Neelsen method in the diagnosis of pulmonary tuberculosis[J]. East Afr Med J, 1993, 70: 263-266.

[6]Laifangham S, Singh H L, Singh N B, et al. A comparative study of fluorescent microscopy with Ziehl-Neelsen staining and culture for the

diagnosis of pulmonary tuberculosis[J]. Kathmandu Univ Med J (KUMJ), 2009, 7(27):226-230.

[7]Santin M, Munoz L, Rigau D. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of tuberculosis and tuberculosis infection in HIV-infected adults: a systematic review and meta-analysis[J]. PLoS One, 2012, 7(3):32482.

[8]金淑芳. 结核病实验室诊断方法的研究进展[J]. 医学理论与实践, 2014, 27(7):874-876. [9] Wu R I, Mark E J, Hunt J L. Staining for acid-fast bacilli in surgical pathology: practice patterns and variations[J]. Hum Pathol, 2012, 43(11): 1845-1851.

[10]Malen H, Softeland T, Wiker H G. Antigen analysis of Mycobacterium tuberculosis H37Rv culture filtrate proteins[J]. Scand J Immunol, 2008,67(3):245-252.

[11]Che N, Qu Y, Zhang C, et al. Double staining of bacilli and antigen Ag85B improves the accuracy of the pathological diagnosis of pulmonary tuberculosis[J]. J Clin Pathol, 2016, 69(7):600-606.

[12]Rodriguez-Nunez J, Avelar F J, Marquez F, et al. Mycobacterium tuberculosis complex detected by modified fluorescent in situ hybridization in lymph nodes of clinical samples[J]. J Infect Dev Ctries, 2012, 6(1):58-66.

[13]Wang F, Flanagan J, Su N, et al. RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues[J]. J Mol Diagn, 2012, 14(1):22-29.

[14]Wang H, Wang M X, Su N, et al. RNAscope for in situ detection of transcriptionally active human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma[J]. J Vis Exp, 2014(85).

[15]Roe C J, Siddiqui M T, Lawson D, et al. RNA In Situ Hybridization for Epstein-Barr Virus and Cytomegalovirus: Comparison With In Situ Hybridization and Immunohistochemistry[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2019, 27(2):155-159.

[16]Cai Y, Wang D, Zhou L, et al. Application of RNAscope technology to studying the infection dynamics of a Chinese porcine epidemic diarrhea virus variant strain BJ2011C in neonatal piglets[J]. Vet Microbiol, 2019, 235:220-228.

[17]Bonifacio J, Schmolke M. Visualization of Respiratory Commensal Bacteria in Context of Their Natural Host Environment[J]. Front Microbiol, 2021, 12:678389.

[18]Lossi L, Gambino G, Salio C, et al. Direct in situ rt-PCR[J]. Methods Mol Biol, 2011, 789:111-126.

作者简介: 第一作者: 李红娜 (1995-03-01), 女, 河北省唐山市, 在读研究生, 主要从事临床病理诊断

通讯作者: 宋旭东, 男, 河北省唐山市, 主任医师/教授, 硕士生导师, 主要从事胸部肿瘤病理诊断