

加强结核病病理学诊断的临床应用与研究

陈文 李宁

【摘要】 结核病是一种由结核分枝杆菌复合群引起的传染性疾病,严重危害着人类的健康。国家卫生和计划生育委员会于 2017 年 11 月 9 日发布了《WS 196—2017 结核病分类》与《WS 288—2017 肺结核诊断》两项强制性卫生行业标准,并且于 2018 年 5 月 1 日起施行;同时废止《WS 196—2001 结核病分类》和《WS 288—2008 肺结核诊断》。在《WS 288—2017 肺结核诊断》标准中,显著提高了病理学诊断在肺结核诊断和精准治疗中的地位。病理学诊断阳性的患者即可确诊为肺结核;影像学检查结果支持肺结核的诊断,同时分子生物学检查阳性的患者也可以确诊为肺结核。多聚酶链反应(PCR)技术可以快速诊断结核分枝杆菌感染,核酸杂交技术可以快速检测基因的突变位点,判断结核分枝杆菌对抗结核药物的耐药种类和数量。深入学习与贯彻《WS 288—2017 肺结核诊断》标准,对于明确和了解病理学诊断在结核病临床诊断和精准治疗方面作用具有十分重要的意义。

【关键词】 结核; 病理学, 临床; 病理学, 分子; 分子生物学; 结核, 抗多种药物性

Clinical application and research on strengthening pathological diagnosis of tuberculosis CHEN Wen, LI Ning.
Department of Pathology, 309th Hospital of People's Liberation Army, Beijing 100091, China
Corresponding author: LI Ning, Email: davidlee65@163.com

【Abstract】 Tuberculosis is a kind of infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* complex group, which seriously endangers human health. On November 9, 2017, the National Health and Family Planning Commission issued the two mandatory health industry standards for *Classification of tuberculosis* (WS 196-2017) and *Diagnosis for pulmonary tuberculosis* (WS 288-2017), and will implement on May 1, 2018. At the same time, “*Classification of tuberculosis* (WS 196-2001)” and “*Diagnosis for pulmonary tuberculosis* (WS 288-2008)” will be abolished. In the standard of *Diagnosis for pulmonary tuberculosis* (WS 288-2017), the status of pathological diagnosis in tuberculosis diagnosis and precision treatment is significantly improved. Pulmonary tuberculosis can be diagnosed by pathological diagnosis. The findings of the imaging examination support the diagnosis of tuberculosis, while patients with positive molecular biology can also be diagnosed with tuberculosis. PCR technology can quickly diagnose *Mycobacterium tuberculosis* infection, the nucleic acid hybridization technique can quickly detect the mutation site of the gene and determine the type of drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. Further study and implementation of the standard of *Diagnosis for pulmonary tuberculosis* (WS 288-2017) is of great importance to clarify and understand the role of pathological diagnosis in the clinical diagnosis and precise treatment of tuberculosis.

【Key words】 Tuberculosis; Pathology, clinical; Pathology, molecular; Molecular biology; Tuberculosis, multidrug-resistant

结核病是全球死亡例数最多的传染性疾病,WHO 公布的数据显示,2016 年全球约有 1040 万例新发结核病患者,130 万例 HIV 检测阴性的结核病患者死亡。近几年,结核病的发病率和死亡率均呈下降趋势,然而耐药结核病发病率却显著增加,2016 年全球耐利福平结核病患者新发 60 万例,其中 49 万例为耐多药结核病^[1]。随着分子生物学技术的快速发展,结核病病理学诊断可以为临床提供

更为精准、明确的诊断,特别是结核病与非结核分枝杆菌病的鉴别诊断,耐药结核病的突变位点检测等。

国家卫生和计划生育委员会于 2017 年 11 月 9 日发布了《WS 196—2017 结核病分类》与《WS 288—2017 肺结核诊断》两项强制性卫生行业标准,并且于 2018 年 5 月 1 日起施行;同时废止《WS 196—2001 结核病分类》和《WS 288—2008 肺结核诊断》。在《WS 288—2017 肺结核诊断》标准(简称“新标准”)中,显著提高了病理学诊断在肺结核诊断和精准治疗中的地位,笔者就此结合参考文献进行解读,以利于新标准的正确实施,使大家进一步明确和了解病理学诊断对于结核病的早期诊断和精准治

疗所具有的重要意义。

结核病的分类及病理改变

结核病是由结核分枝杆菌复合群引起的传染性疾病,按照发病部位可分为肺结核与肺外结核。新标准将气管、支气管和胸膜结核均归类于肺结核。肺外结核多发生于淋巴结、骨与关节、皮肤和肠道等。

肺结核的病理改变主要包括渗出性病变、增生性病变和变质性病变。增生性病变是结核病病理形态学最有特征性的改变,显微镜下可见具有诊断价值的结核结节,由上皮样细胞、郎罕多核巨细胞,以及外周聚集的淋巴细胞和少量增生的成纤维细胞构成。典型者结节中央有干酪样坏死,多为灰黄色,质地细腻形似奶酪。典型结核(结核结节)的病理诊断较容易,而不具备典型结核病理变化的病例则常需要借助其他的检测方法^[2]。

肺结核的病理诊断方法

抗酸染色及结核分枝杆菌基因检测是查找结核病病原学证据的主要手段^[3]。新标准显著提高了病理学检测在肺结核诊断和精准治疗中的地位,结核病理学诊断阳性的患者即可确诊为肺结核;影像学检查结果支持肺结核的诊断,同时分子生物学检查阳性的患者也可以确诊为肺结核。

一、常规病理学诊断

常规病理标本的诊断主要包括大体检查和显微镜下检查两部分。典型患者大体检查可以看到有灰黄色,质地细腻形似奶酪的坏死组织(干酪样坏死),这对于结核病的诊断具有一定的提示作用;然而目前药物化疗仍然是结核病的主要治疗手段,手术治疗只有在很少的情况下进行,因此一般情况下很难获得完整的结核病灶组织。显微镜下检查主要是观察到典型的肉芽肿伴干酪样坏死病变^[4];应该注意的是,肉芽肿病变并非结核病所特有,亦可出现在霉菌病、结节病等其他病变中,因此常规的病理学诊断并非结核病诊断的金标准,在病理学诊断中应该结合其他检测手段。

二、特殊染色

诊断结核病变,需要在病变区找到结核病原菌,抗酸染色是最常用的特殊染色方法。切片染色后显

微镜下常常可以在坏死区中心或者坏死区与上皮样肉芽肿交界处查见红染的两端呈钝圆并稍弯曲的短棒状杆菌。在抗酸染色检测中应该注意除了结核分枝杆菌,麻风分枝杆菌和非结核分枝杆菌也是抗酸染色阳性杆菌,肉眼很难分辨,需要进一步鉴别;抗酸染色阳性率一般较低,抗酸染色阴性不应轻易否定结核分枝杆菌的存在。金胺 O 荧光染色与抗酸染色的原理类似,均是利用抗酸杆菌的嗜石炭酸性,在荧光显微镜下可以查见亮绿色荧光的杆菌,且在暗视野下较抗酸染色更醒目。陈顺平等^[5]采用金胺 O 荧光染色检测了 175 例临床确诊为结核病患者组织,发现金胺 O 荧光染色阳性率高达 68.6%,远远高于抗酸染色,但该方法需要紫外光源,且无法长期保存。此外,网状纤维染色、六胺银和过碘酸盐希夫染色均对结核病的诊断和鉴别诊断具有一定的价值^[6]。网状纤维染色能够辅助判断结核病的干酪样坏死,六胺银和过碘酸盐希夫染色对于结核病的直接诊断没有太大的价值,但可以有效地对真菌进行鉴别诊断。

三、分子生物学检查

近几年,基于基因检测的分子病理新技术飞速发展,在有效提高组织标本中结核分枝杆菌检出率的同时,还能鉴别结核分枝杆菌与非结核分枝杆菌,分析结核分枝杆菌对抗结核药物的耐药性和敏感性,为结核病早期诊断和精准治疗提供了更多的依据。实时荧光定量多聚酶链反应(RT-PCR)是目前临床应用最为广泛的分子病理学检测技术,具有操作简便、成本低廉和快速灵敏等优点^[7]。对于一些陈旧性结核病变,仅有凝固性坏死和纤维化病变,在抗酸染色未找到结核分枝杆菌的情况下,应用 PCR 对结核分枝杆菌 DNA 进行检测,敏感度和特异度高,对于结核病的确诊具有很好的帮助。插入序列 6110(IS6110)是结核分枝杆菌基因组中的一个保守片段,其由于拷贝数较多,在同一结核分枝杆菌基因组中十分稳定,因此成为了分子生物学检测结核病的首选和最常用的片段^[8]。然而并非所有的结核分枝杆菌均表达 IS6110;Rv0577 是 PCR 检测结核感染的另外一种常用片段^[9],IS6110 和 Rv0577 基因双重 PCR 可以显著地提高结核感染检测的特异度和敏感度。应该特别注意的是,基于 PCR 的分子病理检测方法敏感度很高,外源性 DNA 的污染很容

易引起假阳性的出现,因此分子病理检测需在符合国家标准的临床基因扩增实验室中,由受过专门培训的专业人员按照规范化操作规程进行,以保证检测结果的准确性。

利福平和异烟肼是目前的一线抗结核化疗药物,近年来耐药结核病患者发生率越来越高,分析结核分枝杆菌的耐药性对于结核病的精准治疗具有重要的意义。核酸杂交技术在分枝杆菌菌种鉴定,以及耐药结核病的诊断中具有很强的优势。此外,该技术还可以实现一次实验中检测结核分枝杆菌对多种抗结核药物耐药的相关基因突变。结核分枝杆菌 *rpoB* 基因突变是导致耐利福平的主要机制之一,*katG*、*inhA* 基因突变则在结核分枝杆菌对异烟肼耐药中发挥着重要作用,利用 PCR 和核酸杂交技术可以快速检测这些基因的突变位点,判断结核分枝杆菌的耐受种类和数量,为下一步的精准治疗提供指导^[10-12]。

四、免疫组织化学染色

免疫组织化学具有操作简便、敏感性高、可长期保存等优势,在疾病的诊断,特别是肿瘤的确诊和分型中被广泛应用。然而,目前尚无可应用于临床诊断的针对结核分枝杆菌特异抗原的抗体,因此新标准中也没有涉及免疫组织化学在结核病诊断中的应用的内容。结核病免疫组织化学染色主要使用两种类型的抗体。第一种类型是针对不同细胞类型的抗体。如抗 CD68 抗体可以帮助区分类上皮细胞与上皮来源细胞,有助于确认肉芽肿结构,但对于结核病的诊断没有很大帮助。第二种类型是针对结核分枝杆菌特异抗原的抗体。这类抗体可以在组织切片中显示结核分枝杆菌蛋白的表达,对协助结核病诊断很有帮助。目前,报道的抗体主要识别 BCG 成分、MPT64、PstS1、Ag85B 等抗原^[13-14]。Ag85B 抗原是结核分枝杆菌最主要的分泌蛋白,在结核病的发生和发展中发挥着重要作用。有研究报道,Ag85B 免疫组织化学检测结核感染的敏感度为 53.8%,远远高于抗酸染色(34.4%)。Che 等^[15]报道了一种新的抗酸染色-免疫组织化学(Z-C)染色法,通过同时进行抗酸染色和检测 Ag85B 抗原,其敏感度达到了 65.6%,优于单独的抗酸染色和免疫组织化学检测结果。适配体是一种能够特异性结合蛋白、细胞和细菌的核酸序列,Thakur 等^[16]基于 MPT64 抗

原,设计了一段核酸适配体,能够有效地检测结核分枝杆菌感染,特异度和敏感度均很高。结核分枝杆菌特异性抗体的研发和临床转化可能是未来结核病诊断和治疗的一个热点。

肺结核的鉴别诊断

非结核分枝杆菌是分枝杆菌属中除结核分枝杆菌复合群和麻风分枝杆菌以外其他分枝杆菌的统称^[17]。非结核分枝杆菌肺病临床表现酷似肺结核,多继发于慢性肺病或者免疫缺陷疾病。其组织病理学基本改变类似于结核病,抗酸染色均为阳性,形态也非常相似。但非结核分枝杆菌肺病的组织学改变以类上皮细胞肉芽肿改变多见,无明显干酪样坏死。胶原纤维增生且多呈玻璃样变,这是与结核病组织学改变区别的主要特点。如要明确分枝杆菌的类型,需要进行分子病理学检测或新鲜组织培养。

真菌病是除了分枝杆菌病以外最为常见的感染性肉芽肿疾病,HE 常规切片结合特殊染色可以进行很好的鉴别。寄生虫感染也可引起肉芽肿病变,但是病原虫体积大,不需要特殊染色,在 HE 常规切片中就可以清楚识别。麻风分枝杆菌可形成肉芽肿,亦可形成结核样结节,结节中心可见坏死。抗酸染色可在瘤型和界线型麻风病变中查见大量麻风分枝杆菌;但在结核型和未定型麻风病变中麻风分枝杆菌非常少,明确诊断需通过基因检测进行菌种鉴定。其他一些非感染性肉芽肿疾病,如结节病、肉芽肿性血管炎和嗜酸性肉芽肿血管炎等,均可通过抗酸染色及结核分枝杆菌 DNA 检测加以鉴别^[18-20]。应该引起注意的是,肺结核常常并发肺部肿瘤,在肺结核发病的基础上,肺癌的诊治平均延误时间为 3~18 个月,此时应该综合影像学和病理学方法进行甄别,以免延误肿瘤的治疗^[21]。

展 望

近年来,结核病的发病特点和流行趋势均发生了很大的变化,耐多药和广泛耐药结核分枝杆菌的出现使全球抗结核的防治形势日益严峻。结核病的早期诊断和精准治疗至关重要,病理学诊断在这个过程中发挥着越来越重要的作用。肺结核诊断新标准中显著提高了病理学检测在肺结核诊断和治疗中的地位,采用分子病理学技术可以快速诊断结核分

枝杆菌感染和检测其耐药性。然而目前仍存在许多问题,比如临床上仍没有敏感度与特异度十分满意的可用于结核感染检测的特异性抗体。相信随着分子生物学的进一步发展,将会给结核病病理学诊断带来新的契机。

参 考 文 献

- [1] Pai M, Correa N, Mistry N, et al. Reducing global tuberculosis deaths-time for India to step up. *Lancet*, 2017, 389(10075): 1174-1176.
- [2] Dheda K, Barry CE 3rd, Maartens G. Tuberculosis. *Lancet*, 2016, 387(10024):1211-1226.
- [3] McNerney R, Maeurer M, Abubakar I, et al. Tuberculosis diagnostics and biomarkers: needs, challenges, recent advances, and opportunities. *J Infect Dis*, 2012, 205 Suppl 2: S147-158.
- [4] Kunst H, Khan KS. New tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection. *Ann Intern Med*, 2007, 147 (9): 672-673.
- [5] 陈顺平, 陈伟德, 吴文乔, 等. 金胺 O 荧光染色在结核病病理诊断中的应用价值. *临床与实验病理学杂志*, 2016, 32(2): 229-230.
- [6] 张海青, 车南颖. 我国结核病病理学诊断和研究的现状与展望. *中国防痨杂志*, 2014, 36(9):793-797.
- [7] Molina-Moya B, Lacoma A, Prat C, et al. Diagnostic accuracy study of multiplex PCR for detecting tuberculosis drug resistance. *J Infect*, 2015, 71(2):220-230.
- [8] McEvoy CR, Falmer AA, Gey van Pittius NC, et al. The role of IS6110 in the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*, 2007, 87(5):393-404.
- [9] Buchko GW, Echols N, Flynn EM, et al. Structural and biophysical characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* protein Rv0577, a protein associated with neutral red staining of virulent tuberculosis strains and homologue of the streptomyces coelicolor protein KbpA. *Biochemistry*, 2017, 56 (30): 4015-4027.
- [10] Nusrath Unissa A, Hassan S, Indira Kumari V, et al. Insights into *rpoB* clinical mutants in mediating rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Mol Graph Model*, 2016, 67: 20-32.
- [11] Meftahi N, Namouchi A, Mhenni B, et al. Evidence for the critical role of a secondary site *rpoB* mutation in the compensatory evolution and successful transmission of an MDR tuberculosis outbreak strain. *J Antimicrob Chemother*, 2016, 71(2): 324-332.
- [12] Haldal E. A *katG* 315 mutation alone should not lead to exclusion of isoniazid in treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Eur Respir J*, 2017, 50(4). pii:1701696.
- [13] Purohit MR, Mustafa T, Wiker HG, et al. Immunohistochemical diagnosis of abdominal and lymph node tuberculosis by detecting *Mycobacterium tuberculosis* complex specific antigen MPT64. *Diagn Pathol*, 2007, 2:36.
- [14] Ihama Y, Hokama A, Hibiya K, et al. Diagnosis of intestinal tuberculosis using a monoclonal antibody to *Mycobacterium tuberculosis*. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(47):6974-6980.
- [15] 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 Clin Pathol*, 2016, 69(7): 600-606.
- [16] Thakur H, Kaur N, Sabherwal P, et al. Aptamer based voltammetric biosensor for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* antigen MPT64. *Microchim Acta*, 2017, 184:1915-1922.
- [17] Taiwo B, Glassroth J. Nontuberculous mycobacterial lung diseases. *Infect Dis Clin North Am*, 2010, 24(3):769-789.
- [18] Lee YJ, Yang SK, Byeon JS, et al. Analysis of colonoscopic findings in the differential diagnosis between intestinal tuberculosis and Crohn's disease. *Endoscopy*, 2006, 38 (6): 592-597.
- [19] Pretell EJ, Martinot C Jr, Garcia HH, et al. Differential diagnosis between cerebral tuberculosis and neurocysticercosis by magnetic resonance spectroscopy. *J Comput Assist Tomogr*, 2005, 29(1):112-114.
- [20] 张登才, 刘斌, 张丽华, 等. 抗酸染色在结核病病理诊断中的价值. *中国防痨杂志*, 2014, 36(4):274-278.
- [21] 李成海, 邱万成, 周新华, 等. 71 例肺结核并发肺癌患者的 CT 表现特征及临床病理分析. *中国防痨杂志*, 2017, 39(6): 576-580.

(收稿日期:2018-02-07)

(本文编辑:薛爱华)