



全国高校教材学术著作出版审定委员会审定

SHIYAN JIEHE BING XUE

实验结核病学

胡忠义 主编



军事医学科学出版社

全国高校教材学术著作出版审定委员会审定

实验结核病学

胡忠义 主编

军事医学科学出版社

· 北 京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

实验结核病学/胡忠义主编. —北京: 军事医学科学出版社, 2013. 2

ISBN 978-7-5163-0104-3

I. ①实… II. ①胡… III. ①实验医学—结核病

IV. ①R-33②R520.4

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第 016581 号

出 版: 军事医学科学出版社

地 址: 北京市海淀区太平路 27 号

邮 编: 100850

联系电话: 发行部: (010) 66931051, 66931049, 81858195

编辑部: (010) 66931127, 66931039, 66931038,

86702759, 86703183

传 真: (010) 63801284

网 址: <http://www.mmsp.cn>

印 装: 北京长阳汇文印刷厂

发 行: 新华书店

开 本: 787mm × 1092mm 1/16

印 张: 37 (彩 1.5)

字 数: 900 千字

版 次: 2014 年 2 月第 1 版

印 次: 2014 年 2 月第 1 次

定 价: 120.00 元

本社图书凡缺、损、倒、脱页者, 本社发行部负责调换

内容简介

本书分为细菌实验篇、分子生物实验篇、免疫实验篇和实验室建设与安全篇等四大部分。全面介绍了与结核病相关的结核分枝杆菌的常规检验和分子生物学检验的相关内容，还介绍了结核病治疗的药物学研究、最新进展和结核病检验实验室的建设等内容。本书密切结合临床，适用于医学检验人员、临床医生、结核病防控工作者及从事结核病研究的科研人员参考，具有很强的实用价值。

《实验结核病学》

编委名单

主 编 胡忠义

编 委 (按姓氏笔画排序)

王 和 贵阳医学院

王 洁 同济大学附属上海市肺科医院

王国治 国家药品生物制品检定所

王洪海 复旦大学遗传所

冯永红 同济大学附属上海市肺科医院

毕爱笑 同济大学附属上海市肺科医院

朱道银 重庆医科大学

刘 军 加拿大多伦多大学

刘忠华 同济大学附属上海市肺科医院

杨 华 同济大学附属上海市肺科医院

杨 春 重庆医科大学

李国利 解放军 309 医院

吴长有 中山大学医学院

张宗德 北京市结核病胸部肿瘤研究所

陆俊梅 同济大学附属上海市肺科医院

陈 全 重庆医科大学

金瑞良 同济大学附属上海市肺科医院

周逸民 同济大学附属上海市肺科医院

郑瑞娟 同济大学附属上海市肺科医院

居金良 上海仁度生物科技有限公司
胡 屹 复旦大学公共卫生学院
胡忠义 同济大学附属上海市肺科医院
钟 敏 重庆市公共卫生救治中心
秦莲花 同济大学附属上海市肺科医院
徐 飏 复旦大学公共卫生学院
黄晓辰 同济大学附属上海市肺科医院
崔振玲 同济大学附属上海市肺科医院
谢建平 西南大学生命科学学院
雷建平 江西省胸科医院
裴秀英 宁夏医科大学

序



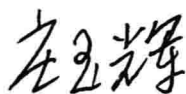
结核病是严重的公共卫生问题。据世界卫生组织报道，2011 年全球有约870 万新发病例，140 万人死于结核病，其发病率、死亡率一直居高不下。更严重的是，对利福平、异烟肼等一线抗结核药物产生多重耐药的耐多药结核病（MDR - TB）发病率持续攀升，广泛耐药结核病（XDR - TB）的出现更加重了结核病防控的负担。我国是结核病高负担国家之一，据世界卫生组织评估，目前我国结核病年发病人数约为 130 万，占全球发病人数的 14%，居全球第二位。近年来，我国每年报告肺结核发病人数约 100 万，始终位居全国甲乙类传染病的前列；耐多药肺结核危害日益凸显，未来数年内可能出现以耐药菌为主的结核病流行态势；结核菌/艾滋病病毒双重感染患者人数持续增加，防治工作亟待加强；中西部地区、农村地区结核病防治形势严峻。因此，结核病防治任务仍然十分艰巨，需要长期不懈地努力。

国务院 2011 年发布的全国结核病防治规划（2011 ~ 2015 年）中明确指出，要“加强科学研究，提供技术支撑”。要进一步加强结核病防治科研工作，重点开展结核病发病机理、流行危险因素、新药品以及新型疫苗等领域的研究工作。研究结核病实验室快速诊断和耐药性测定新技术，开展新技术、新方法的应用评估，推动基础研究和应用研究紧密结合，加快科技成果转化。加强对国外研发的新技术、新方法的客观评估，筛选出适合我国应用的诊断新技术进行推广。为全面提升结核病防治水平提供有力的技术支撑。

《实验结核病学》一书的出版，正是响应国务院的这一号召，将近年来结核病实验室基础研究和技术研发的新进展、新成果进行总结，由国内数十位结核病领域的专家、教授共同参与，就结核病基础理论研究、实验室诊断和药敏检测新技术以及结核疫苗研究等诸多领域的最新进展进行全面系统的介绍，为结核病实验室研究

开拓思路，为实验室新技术、新方法的应用指出前景。该书密切结合临床，适用于医学检验人员、临床医生、结核病控制工作者及从事结核病研究的科研人员，是各级结核病防控人员工作中的良师益友，具有很强的实用价值。相信该书的出版将会受到广大读者的欢迎，同时期望本书抛砖引玉，启发读者新的思维，引发更多新的成果。

解放军 309 医院结核病研究中心



2013 年 11 月

目 录



第一篇 细菌实验篇

第一章 结核分枝杆菌与结核病	2
第一节 结核分枝杆菌主要生物学性状	2
第二节 结核分枝杆菌的致病性	3
第三节 结核分枝杆菌感染的免疫性	4
第四节 结核分枝杆菌感染的实验室检查	5
第五节 分枝杆菌菌种初步鉴定	11
第六节 结核分枝杆菌药物敏感性试验	12
附 录	15
参考文献	17
第二章 分枝杆菌快速培养基的研制及其应用	18
第一节 快速培养基的研制	18
第二节 快速培养基的使用	19
第三节 新型培养基的应用	21
参考文献	24
第三章 结核分枝杆菌 L 型检查研究	26
第一节 结核分枝杆菌 L 型的形成	26
第二节 结核分枝杆菌 L 型的形态	32
第三节 结核分枝杆菌 L 型的生物学特性	34
第四节 结核分枝杆菌 L 型的药物敏感性	35
第五节 结核分枝杆菌 L 型的致病性	44
第六节 结核分枝杆菌 L 型的免疫性	45
第七节 结核分枝杆菌 L 型感染的诊断	46
第八节 L 型实验室检查的临床意义与质量控制	50
附 录 L 型培养基	54
参考文献	59

第四章 噬菌体法快速检测结核分枝杆菌及其耐药性	61
第一节 噬菌体法快速检测结核分枝杆菌	61
第二节 噬菌体法快速检测结核分枝杆菌耐药性	72
参考文献	83
第五章 显微镜观察药敏技术及其应用	86
第一节 背景及原理	86
第二节 检测方法	87
第三节 应用情况	88
第四节 MODS 技术的评价与展望	94
参考文献	95
第六章 纳米技术快速检测结核分枝杆菌实验研究	97
第一节 技术原理	97
第二节 技术流程	98
第三节 应用情况	103
第四节 方法学评价和展望	105
参考文献	105
第七章 结核分枝杆菌药物依赖性研究	107
第一节 结核分枝杆菌生长的药物依赖性变异	107
第二节 结核分枝杆菌生长的药物依赖性变异的发生情况	108
第三节 药物依赖性变异结核分枝杆菌肺结核的临床特征	109
第四节 药物依赖性变异结核分枝杆菌的生物学特性及实验室诊断	110
参考文献	114
第八章 结核分枝杆菌感染对肺癌发生及预后的影响	116
第一节 肺结核是肺癌发生的高危因素	116
第二节 肺结核对肺癌预后的影响	117
第三节 基础研究有待深入问题	120
参考文献	121

第二篇 分子生物实验篇

第九章 结核分枝杆菌分子生物学研究进展	124
第一节 结核分枝杆菌分子研究进展	124
第二节 分子生物学技术的未来发展及其应用前景	130
参考文献	131
第十章 结核病分子生物学研究常用技术	134
第一节 DNA 凝胶电泳技术	134
第二节 核酸分子杂交技术	138

第三节 基因芯片技术·····	160
第四节 DNA 测序技术 ·····	166
第五节 DNA 指纹图谱技术 ·····	191
参考文献·····	196
第十一章 结核分枝杆菌核酸扩增技术及其应用 ·····	199
第一节 结核分枝杆菌核酸扩增技术·····	199
第二节 结核分枝杆菌 RNA 扩增技术 ·····	215
第三节 环介导恒温扩增技术·····	220
参考文献·····	225
第十二章 SAT 恒温扩增技术在病原体诊断研究中的应用 ·····	228
第一节 SAT 技术原理·····	228
第二节 SAT 技术要点·····	229
第三节 SAT 技术特点·····	230
第四节 SAT 应用·····	231
参考文献·····	233
第十三章 SELEX 技术及其在结核病检测中的应用 ·····	234
第一节 SELEX 技术原理、特点及其基本技术路线 ·····	234
第二节 SELEX 技术在结核分枝杆菌研究中的应用 ·····	237
第三节 用 SELEX 技术筛选结核分枝杆菌适配子的实验方案 ·····	238
参考文献·····	247
第十四章 焦磷酸测序技术快速检测结核分枝杆菌耐药性 ·····	249
第一节 检测原理·····	249
第二节 检测方法·····	252
参考文献·····	256
第十五章 变性高效液相色谱在结核分枝杆菌研究中的应用 ·····	258
第一节 变性高效液相色谱及其应用概况·····	258
第二节 变性高效液相色谱检测结核分枝杆菌耐药性·····	260
参考文献·····	264
第十六章 结核病分子流行病学研究 ·····	266
第一节 结核分枝杆菌基因分型相关分子生物学技术·····	267
第二节 以结核分枝杆菌基因分型为基础的分子流行病学研究设计·····	276
第三节 结核分枝杆菌基因分型在分子流行病学中的应用·····	279
参考文献·····	284
第十七章 非结核分枝杆菌的分子菌种鉴定 ·····	293
第一节 分枝杆菌菌种鉴定的主要靶基因序列·····	294
第二节 非结核分枝杆菌分子生物学鉴定方法·····	296
参考文献·····	303

第三篇 免疫实验篇

第十八章 结核病细胞免疫学研究进展	308
第一节 结核分枝杆菌的化学结构及其抗原	308
第二节 结核病免疫细胞	309
第三节 结核病免疫细胞因子	314
第四节 结核病免疫力评价	318
第五节 抗结核保护性免疫治疗	324
参考文献	338
第十九章 结核感染的特异性细胞免疫检测	342
第一节 检测原理	342
第二节 检测方法	343
第三节 应用评价及存在的问题	348
参考文献	349
第二十章 结核分枝杆菌抗原抗体检测研究	351
第一节 概述	351
第二节 结核分枝杆菌抗原检测	351
第三节 结核分枝杆菌抗体检测	352
第四节 结核抗原和抗体检测的临床应用	359
第五节 方法学评价和展望	365
参考文献	369
第二十一章 结核分枝杆菌蛋白抗原及其制备	374
第一节 结核分枝杆菌的蛋白抗原应用	374
第二节 结核分枝杆菌抗原的制备	377
参考文献	387
第二十二章 重组结核分枝杆菌 CFP10 - ESAT6 融合蛋白的研究	388
第一节 结核病免疫学诊断用抗原的研究概况	388
第二节 结核分枝杆菌 1hp - esat6 融合基因原核表达载体的构建及表达	390
第三节 重组结核分枝杆菌 CFP10 - ESAT6 融合蛋白在豚鼠感染模型的应用	396
参考文献	401
第二十三章 结核分枝杆菌 TB - SA 蛋白抗原的诊断应用	403
第一节 TB - SA 蛋白抗原实验研究	403
第二节 试剂盒生产和质量研究	408
第三节 临床应用研究	411
参考文献	413

第二十四章	噬菌体展示技术在结核病免疫学检测中的应用	415
第一节	技术原理	415
第二节	技术流程	416
第三节	应用情况	423
第四节	方法学评价和展望	425
	参考文献	426
第二十五章	结核分枝杆菌蛋白质组学研究	428
第一节	蛋白质组研究概况	428
第二节	结核分枝杆菌全细胞蛋白质组和亚细胞蛋白质组学研究	429
第三节	结核分枝杆菌及其他分枝杆菌的比较蛋白质组学研究	435
第四节	蛋白质组学研究在结核分枝杆菌致病机理的应用	436
第五节	药物蛋白质组学研究	438
第六节	结核分枝杆菌蛋白质组学在疫苗研究中的应用	439
第七节	结核分枝杆菌蛋白质组学研究的新发展	439
	参考文献	445
第二十六章	结核病 DNA 疫苗的研究	451
第一节	结核病 DNA 疫苗的研究概况	451
第二节	<i>ag85b</i> 、 <i>mpt64</i> 、 <i>ag85b - mpt64</i> 真核表达质粒的构建及表达研究	453
第三节	<i>ag85b</i> 、 <i>mpt64</i> 和 AM 真核表达质粒诱导小鼠特异性免疫应答的研究	458
第四节	<i>ag85b</i> 、 <i>mpt64</i> 及 AM DNA 疫苗对小鼠结核感染的免疫保护作用	462
第五节	基因疫苗对结核的免疫治疗作用的研究	470
	参考文献	475
第二十七章	10 - 23 脱氧核酶抗结核分枝杆菌感染的实验研究	478
第一节	结核分枝杆菌的潜伏感染与脱氧核酶	478
第二节	重组结核分枝杆菌异柠檬酸裂合酶及其抗体的制备	480
第三节	MTB 10 - 23 DRz 的设计及其在无细胞体系中切割活性的鉴定	485
第四节	10 - 23 DRz 对 MTB ICL 表达及其在巨噬细胞中存活的影响	489
第五节	10 - 23 DRz 对 MTB 感染小鼠的影响	495
	参考文献	499
第二十八章	颗粒溶素/IL - 12 重组耻垢杆菌治疗小鼠结核病研究	501
第一节	颗粒溶素、IL - 12 和耻垢分枝杆菌	501
第二节	携带人 <i>glx</i> 和鼠单链 IL - 12 基因的真核共表达质粒 pZM03 的构建和鉴定	503
第三节	靶向递送 pZM03 重组耻垢分枝杆菌的构建及其功能的鉴定	513
第四节	颗粒溶素/IL - 12 重组耻垢分枝杆菌对小鼠结核病治疗作用的实验研究	520
	参考文献	525

第四篇 实验室建设与安全篇

第二十九章 结核分枝杆菌实验危害程度风险评估探讨·····	528
第一节 危害程度分类·····	528
第二节 背景资料·····	529
第三节 实验室实验活动及其危险性与预防措施·····	534
第四节 工作人员素质·····	540
参考文献·····	540
第三十章 结核病实验室基本设施建设·····	541
第一节 基础实验室的实验设备配置和实验室布局·····	541
第二节 高级实验室的实验设备配置和实验室布局·····	541
第三节 结核病实验室的生物安全性·····	542
第三十一章 结核病实验研究设备及网站简介·····	547
第一节 结核病实验研究常用设备介绍·····	547
第二节 结核病研究有关的网络资源·····	551
图版·····	(1-24)



第一章

结核分枝杆菌与结核病

结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 包括 5 种, 结核分枝杆菌、牛分枝杆菌、卡介苗 (BCG)、非洲分枝杆菌和田鼠分枝杆菌。由于该类细菌抗原结构相似, 不易区分, 因此统称为结核分枝杆菌复合群 (*Mycobacterium tuberculosis complex*)。本菌是一类细长或略弯曲的杆菌, 繁殖时有分枝生长的趋势, 故称分枝杆菌。一般不易着色, 经加温或延长染色时间才能着色, 一旦着色, 能抵抗盐酸、酒精的脱色, 故又称为抗酸杆菌。

本菌是结核病的病原菌, 可侵犯全身各器官, 但以肺结核最多见。世界卫生组织估计, 目前世界人口中约有 1/3 的人感染了结核分枝杆菌。结核病已成为全球重大的公共卫生问题。

第一节 结核分枝杆菌主要生物学性状

一、形态与染色

结核分枝杆菌细长或略弯曲, 长 $0.4 \sim 1 \mu\text{m}$, 宽 $0.3 \sim 0.6 \mu\text{m}$ 。革兰染色阳性, 但一般不易着色。常用抗酸染色法, 染色后结核分枝杆菌呈红色, 而其他非抗酸菌及背景呈蓝色。细菌呈单个、平行或分枝状排列, 无鞭毛、芽孢, 有荚膜, 但一般不易看到。

二、培养特性

本菌为专性需氧菌, 最适生长温度 37°C , 最适 pH $6.5 \sim 6.8$, 营养要求高, 常用罗氏固体培养基, 内含马铃薯、卵黄、甘油、天门冬素、无机盐及孔雀绿等物质。生长缓慢, 一般需 18~24 小时繁殖一代, 培养 3~6 周才出现菌落。菌落为乳白色或米黄色, 不透明, 表面粗糙呈颗粒、结节或菜花状。

三、抵抗力

本菌对干燥、化学消毒剂、酸、碱及某些燃料有较强的抵抗力。在干燥的痰中可存活 6~8 个月, 在 3% 盐酸或 4% 氢氧化钠中 20 分钟活性不受影响。但对乙醇、湿热及紫外线敏感, 75% 乙醇作用数分钟, 或 60°C 加热半小时, 或日光直接照射 2~7 小时均可杀死细菌。

四、变异性

结核分枝杆菌可发生形态、菌落、毒力及耐药性的变异。将有毒的牛分枝杆菌培养于含甘油、胆汁、马铃薯的培养基中，经 13 年 230 次传代，使其毒力发生变异，成为减毒的活菌苗，称为卡介苗（BCG）。目前广泛用于人类结核病的预防。

本菌对抗结核药物较易产生耐药性。近年来，耐药结核分枝杆菌的流行与传播加剧了结核病疫情。

第二节 结核分枝杆菌的致病性

结核分枝杆菌是人和动物患结核病的病原菌。肺结核是最常见的结核病，肺以外的组织器官结核病统称为肺外结核病。

一、致病物质

（一）脂质

包括：①索状因子：能破坏细胞线粒体膜、影响细胞呼吸、抑制白细胞游走和引起慢性肉芽肿。②磷脂：能促使单核细胞增生，并使炎症灶中的巨噬细胞转变为类上皮细胞，从而形成结核结节。③硫酸脑苷脂：可抑制吞噬细胞中吞噬体与溶酶体的结合，使结核分枝杆菌能在吞噬细胞中长期存活。④蜡质 D：是一种肽糖脂和分枝菌酸的复合物，可从有毒株或卡介苗中用甲醇提出，具有佐剂作用，可激发机体产生迟发型超敏反应。

（二）蛋白质

具有抗原性。与蜡质 D 结合后能使机体发生超敏反应，引起组织坏死和全身中毒症状，并在形成结核结节中发挥一定作用。

（三）多糖

有研究发现，该菌细胞壁表面的多糖物质类似荚膜，能够抵抗吞噬细胞的吞噬。

二、致病机理

结核分枝杆菌既不产生内毒素，也不产生外毒素和侵袭性酶，其致病作用可能与细菌在组织细胞内大量增殖引起的炎症反应、菌体成分的毒性作用以及机体对某些菌体成分产生的超敏反应有关。

三、所致疾病

（一）肺结核

结核分枝杆菌可经呼吸道、消化道、破损的皮肤黏膜等多种途径进入机体，侵犯多种组织器官，引起相应的结核病，最易通过吸入含菌的飞沫微粒或尘埃进入肺泡，故结核病以肺结核最为多见。肺结核又分原发感染和原发后感染两种。

1. 原发感染

结核分枝杆菌初次感染而在肺内发生的病变，称为原发性肺结核，多发生于儿童。原发感染 90% 以上可经纤维化和钙化自愈。但原发灶内常仍有一定量的结核分枝杆菌

长期潜伏，机体处于带菌状态，能刺激机体产生免疫反应，称为潜伏感染。一旦免疫力下降，潜伏的结核分枝杆菌大量繁殖，结核复发，成为日后内源性感染的来源。少数患者因免疫力低下，结核分枝杆菌可经血和淋巴系统播散至骨、关节、肾、脑膜及其他部位，引起相应部位的结核病。

2. 原发后感染

多为原发感染的再活化，也可由外界的结核分枝杆菌再次侵入引起外源性再感染，或在原发感染的基础上再感染新结核分枝杆菌发生重叠感染。原发后感染多发生于成年人，病灶以肺部为多见，也可发生于肺外组织。由于原发感染后机体已建立了对结核分枝杆菌的特异性免疫应答的能力，因此病灶多局限，一般不累及邻近淋巴结。呈慢性组织损害，易发生结核结节、干酪样坏死和纤维化。被纤维素包围的干酪样坏死灶可钙化而痊愈。若干酪样结节溃破，排入邻近支气管，则可形成空洞并释放大量结核分枝杆菌至痰中，称为开放性肺结核。部分患者结核分枝杆菌可进入血液循环引起肺内播散，形成血行播散型肺结核。

(二) 肺外结核

结核分枝杆菌在体内主要通过淋巴管道、血液、支气管和消化道扩散。初次感染时，细菌通过淋巴管进入局部淋巴结，如进一步扩散至血液，则导致多器官感染。细菌亦可从支气管内坏死组织直接扩散至静脉血液，也可直接侵袭其他正常肺组织。当结核分枝杆菌进入血液循环引起肺外播散时，可导致肺外结核病，如脑、肾、骨、关节、生殖系统等组织器官的结核病。

四、临床表现

肺结核患者主要有咳嗽、咳痰3周或以上，可伴有咯血、胸痛、呼吸困难等症状。另外有发热（常为午后低热），伴盗汗、乏力、食欲降低、体重减轻、月经失调等症状。但应注意约有20%的活动性肺结核患者无症状或仅有轻微症状。

第三节 结核分枝杆菌感染的免疫性

一、免疫性

人群结核分枝杆菌感染率很高，但发病率较低，表明人体对结核分枝杆菌有较强的抵抗力。感染结核分枝杆菌或接种卡介苗后，机体可对该菌产生特异性免疫力，因结核分枝杆菌是胞内感染菌，因此主要以细胞免疫为主。此种免疫力的维持依赖于结核分枝杆菌在体内的存在，这种免疫称感染免疫或有菌免疫，一旦体内结核分枝杆菌或其组分全部消失，免疫力也随之消失。被结核分枝杆菌致敏的T淋巴细胞再次接触该菌的相应抗原时，可释放多种细胞因子，如IL-2、TNF- α 和IFN- γ 等，吸引NK细胞、T细胞、巨噬细胞等聚集于炎症部位，并增强这些细胞直接或间接的杀菌活性。

机体感染结核分枝杆菌后，可产生特异性抗体，但其对机体的免疫保护作用机制尚不明确。