



ISSN 1673-6990

CN 11-5437/R

The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease

国际结核病与肺部疾病杂志 中文版

The Official Journal of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease

2008年9月

第3卷

第3期

论著

- 93 1995—2004年芬兰耐药结核分枝杆菌分离株分子基因学分析
H. J. Marttila, J. Mäkinen, M. Marjamäki, P. Ruutu, H. Soini
- 99 地理距离对中国一个山区省结核病人延误的影响研究
X. Lin, V. Chongsuvivatwong, A. Geater, R. Lijuan
- 106 南非严重耐多药结核基因型的多样性
C. K. Mlambo, R. M. Warren, X. Poswa, T. C. Victor, A. G. Duse, E. Marais
- 112 化疗使得结核病疫情下降:摩洛哥案例分析
C. Dye, S. Ottmani, L. Laasri, N. Bencheikh

综述

- 119 核酸扩增试验诊断结核淋巴结炎:系统性回顾
P. Daley, S. Thomas, M. Pai

纪念罗伯特·科赫

- 130 罗伯特·科赫与结核杆菌的发现:125年后面临来自艾滋病和结核病的挑战
A. D. Harries

国际结核病与肺部疾病杂志

中文版

季刊

第3卷

第3期

2008年9月20日出版

目次

论著

- 93 1995—2004年芬兰耐药结核分枝杆菌分离株分子基因学分析
H. J. Marttila, J. Mäkinen, M. Marjamäki, P. Ruutu, H. Soini
- 99 地理距离对中国一个山区省结核病人延误的影响研究
X. Lin, V. Chongsuvivatwong, A. Geater, R. Lijuan
- 106 南非严重耐多药结核基因型的多样性
C. K. Mlambo, R. M. Warren, X. Poswa, T. C. Victor, A. G. Duse, E. Marais
- 112 化疗使得结核病疫情下降:摩洛哥案例分析
C. Dye, S. Ottmani, L. Laasri, N. Bencheikh

综述

- 119 核酸扩增试验诊断结核淋巴结炎:系统性回顾
P. Daley, S. Thomas, M. Pai

纪念罗伯特·科赫

- 130 罗伯特·科赫与结核杆菌的发现:125年后面临来自艾滋病和结核病的挑战
A. D. Harries

国际结核病与肺部疾病杂志

中文版

**The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease
(CHINESE VERSION)**

季刊 第 3 卷 第 3 期 2008 年 9 月 20 日出版
Quartly Volume 3 Number 3 September 20, 2008

主 管：中国科学技术协会
主 办：中国防痨协会
编 辑：国际结核病与肺部疾病杂志中文版
编辑委员会
100710，北京东四西大街 42 号
电话：(010) 65257475

主 编：王黎霞
出 版：国际结核病与肺部疾病杂志
中文版编辑部
100710，北京东四西大街 42 号
电话：(010) 65257509

广 告 代 理：中国防痨协会广告部
广告经营许可证：京东工商广字第 0339 号

印 刷：北京集惠印刷有限责任公司
发 行：中国防痨协会
定 价：每期 10 元，全年 40 元

中国标准连续出版物号：ISSN 1673-6990
CN 11-5437/R

本 期 编 辑：范永德

Responsible Institution

China Association for Science and Technology

Sponsor

Chinese Anti-Tuberculosis Association

Editing

Editorial Board of The International Journal of
Tuberculosis and Lung Disease (Chinese Version)
42, Dongsi Xidajie, Beijing, 100710, China
Tel: 0086-10-65257475

Editor-in-chief: Wang Lixia

Publishing

Editorial department of the International Journal
of Tuberculosis and Lung Disease (Chinese Version)
42, Dongsi Xidajie, Beijing 100710, China
Tel: 0086-10-65257509

Printing

Beijing Jihui Printing Co., Ltd.

CSN

ISSN 1673-6990

CN 11-5437/R

Editor: Fan Yongde

The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease

The Official Journal of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease

Editors-in-Chief Tuberculosis Nulda Beyers, University of Stellenbosch, Tygerberg, South Africa
Lung Disease Moira Chan-Yeung, University of Hong Kong, Hong Kong SAR, China

Associate Editors

NADIA AIT-KHALED (Algeria)	MICHAEL IADEMARCO (USA)	SHAMIM QAZI (Switzerland)
ISABELLA ANNESL-MAESANO (France)	CHRISTER JANSON (Sweden)	MARY REICHLER (USA)
HELEN AYLES (Zambia)	STEFAN KAUFMANN (Germany)	RENÉE RIDZON (USA)
MARGARET BECKLAKE (Canada)	SANG JAE KIM (Korea)	HANS L RIEDER (Switzerland)
MAARTEN BOSMAN (The Netherlands)	AFRANIO KRITSKI (Brazil)	I D RUSEN (Canada)
KEN CASTRO (USA)	WAH KIT LAM (Hong Kong)	AKIHIRO SEITA (Egypt)
PATRICK CHAULK (USA)	CHONG-KIN LIAM (Malaysia)	TOM SHINNICK (USA)
CHEN-YUAN CHIANG (Taiwan)	DAVID MANNINO (USA)	KAREN SLAMA (France)
HOOLEN COOVADIA (South Africa)	GUY MARKS (Australia)	PETER SMITH (South Africa)
BOB COWIE (Canada)	MARC MENDELSON (South Africa)	TIM STERLING (USA)
PETER D O DAVIES (UK)	LIZ MOLYNEUX (Malawi)	WAN CHENG TAN (Canada)
KEVIN M DE COCK (USA)	JOHN F MURRAY (USA)	JEAN-FRANÇOIS TESSIER (France)
HAZEL DOCKRELL (UK)	MEGAN MURRAY (USA)	SALLY THEOBALD (UK)
DONALD A ENARSON (Canada)	ALWYN MWINGA (Zambia)	CHARLES THOEN (USA)
MARCOS ESPINAL (Dominican Republic)	MELANIE NEWPORT (UK)	ARNAUD TRÉBUCQ (France)
ANNE FANNING (Canada)	ARIEL PABLOS-MENDEZ (Mexico)	MUKUND UPLEKAR (India)
VICTORINO FARGA (Chile)	MADHUKAR PAI (Canada)	MARIEKE VAN DER WERF (The Netherlands)
STEPHEN GILLESPIE (UK)	CHRISTIAN PERRONNE (France)	ANDREW VERNON (USA)
LEONID HEIFETS (USA)	RICCARDO PISTELLI (Italy)	PAN-CHYR YANG (Taiwan)

Expert statistical review panel Christopher Dye (Switzerland), Carle Lombard (South Africa), Larry Moulton (USA), Andrew Nunn (UK), Charalambos Sismanidis (UK), Brian Williams (Switzerland)

Ex-officio members (The Union) President of The Union, Union Director of Scientific Activities, Michael Iseman (Emeritus, USA)

Manuscripts and correspondence

MANAGING EDITOR	CLARE PIERARD	DIRECTOR OF PUBLICATIONS	NILS E BILLO
TECHNICAL EDITOR	IRENE ROY	MEMBERSHIP/SUBSCRIPTIONS	membership@iatld.org
EDITORIAL ASSISTANT	AURÉLIE PLAISANT		

EDITORIAL OFFICE The International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (The Union)
68 boulevard Saint Michel, 75006 Paris, France

Tel: (+33 1) 44 32 03 60 Fax: (+33 1) 43 29 90 83 e-mail: journal@iatld.org website: www. iatld. org

AIMS AND SCOPE. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* is the official journal of The Union. The Journal's main aim is the continuing education of physicians and other health personnel, and the dissemination of the most up-to-date information in the field of tuberculosis and lung health. It publishes original articles and commissioned reviews not only on the clinical and biological and epidemiological aspects, but also—and more importantly—on community aspects; fundamental research and the elaboration, implementation and assessment of field projects and action programmes for tuberculosis control and the promotion of lung health. The Journal welcomes articles submitted on all aspects of lung health, including public health-related issues such as training programmes, cost-benefit analysis, legislation, epidemiology, intervention studies and health systems research.

DISCLAIMER. Any opinions expressed or policies advocated do not necessarily reflect those of The Union.

SUBSCRIPTION INFORMATION. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* is published monthly by The Union. *Individual membership*: 240€. *Electronic membership*: low- and low-middle-income countries 20€; high-middle and high-income countries 65€. *Institutional subscriptions*: 300€. *All payments to*: Membership Services, The Union, 68 boulevard Saint Michel, 75006 Paris, France. e-mail: membership@iatld.org. *Sample copies (libraries), Missing issues, Address changes*: contact Membership Services.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS. Instructions on the submission of manuscripts can be obtained from the Editorial Office or the Union website www. iatld. org.

ADVERTISING SALES. Contact Clare Pierard, The Union, at journal@iatld.org.

EXCESS PAGE CHARGE. All articles over required length will be charged 100€ per excess page (see Instructions to authors).

FULL TEXT VERSION ONLINE. The full text version of the Journal is published online as of Volume 1, 1997. Free access to back issues. Access for 2007 is free to Union members and subscribers. Address: www. iatld. org (link) or www. ingentaconnect. com

INDEXING AND ABSTRACTING SERVICES. The Journal is indexed and/or abstracted in the following media: Index Medicus, Medline, Medlars, Excerpta Medica/EMBASE, SciSearch[®], Medical Documentation Service[®], ISI Alerting Services, Current Contents[®]/Clinical Medicine, the Science Citation Index[®], and the SIIC databases.

ISSN 1027–3719 Copyright © The Union 2007. All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording or otherwise, without the prior permission of The Union.

© This paper meets the requirements of ANSI/NISO Z39.48–1992 (Permanence of Paper)

1995—2004 年芬兰耐药结核分枝杆菌分离株分子基因学分析

Molecular genetics of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Finland, 1995—2004

H. J. Marttila, * J. Mäkinen, * M. Marjamäki, * P. Ruutu, † H. Soini *

* Mycobacterial Reference Laboratory, National Public Health Institute, Turku, † Department of Infectious Disease Epidemiology, National Public Health Institute, Helsinki, Finland

摘要

背景: 利用现代分子生物学来帮助我们理解结核分枝杆菌的传播和流行病学机理。

目的: 分析耐药结核分枝杆菌分子流行病学和 1995—2004 年芬兰耐异烟肼及利福平相关突变菌株。

设计: 对 3959 株新结核分枝杆菌菌株进行了药物敏感性试验, 如有必要, 所有的耐药性表型菌株都进行了 IS6110 限制性片段长度多态性和间隔寡核苷酸分型分析。对耐异烟肼及利福平菌株分别进行了 *katG* 315 位密码子和 *rpoB* 耐药基因测序。

结果: 在测试的 3 959 (92.4% 为培养阳性) 株分离株中, 183 个 (4.6%) 对至少一种一线抗

结核药耐药; 14 (0.4%) 株为耐多药。37 株 (20.4%) 耐性菌株属于 17 个簇, 其中最大的簇包括 4 个分离株。北京家族占有所有耐药菌株的 8.8% (16 株)。在异烟肼耐药菌株中, *katG* 的 Ser315Thr 突变占 46.7% (56 株); 在利福平耐药菌株中 *rpoB* 突变占 85.7% (18 株)。

结论: 耐药结核病在芬兰传染率很少, 尤其在本地和外来人口间。如果存在产生耐多药的危险因素, 筛查异烟肼和利福平耐药相关突变是可行的。

关键词: 分枝杆菌, 结核; 全国调查; 分子流行病学; 耐药; 突变

结核病的流行病学调查通常基于临床病例发现和表型药物敏感试验 (DST), 现代分子生物学开辟了结核分枝杆菌流行病学的新视野。一些新方法, 例如限制性片段长度多态性 (RFLP), 间隔寡核苷酸分型 (spligotyping) 和间隔重复序列 (MIRU) 等, 可以追踪社区感染的菌株源¹⁻³。在这 3 种方法中, IS6110 RFLP 是最古老的方法, 经常作为流行病学基因分型的参考方法。在大规模、长期流行病学监测, 或者是一些有限调查背景, 例如劳教所的局部流行调查时, 已经用 IS6110RFLP 开展了很多研究⁴⁻⁸。

在对结核菌分子生物学耐药机理日益深入了解的同时, 也产生了临床分离株耐药性快速诊断的多种方法。很多研究的热点都集中于导致异烟肼 (INH) 及利福平 (RMP) 耐药的突变基因, 因为

菌株如果至少对这两种药物同时耐药被定义为耐多药 (MDR-TB), 会引起公共卫生界的严重关注。尽管其他基因的突变也会导致 INH 耐药, 但是编码过氧化氢—过氧化物酶的 *katG* 基因突变, 尤其是 315 位核苷酸突变使编码的氨基酸由 Ser 变为 Thr, 是大多数 INH 耐药产生的主要原因⁹⁻¹²。编码依赖 DNA 的 RNA 聚合酶 β 亚单位的 *rpoB* 基因的突变, 会导致 RMP 耐药, 突变主要集中于此基因一段 81 个碱基对的短序列¹³⁻¹⁶。研究表明, *rpoB* 突变主要包括 Ser531Leu, His526Tyr, His526Asp, Asp516Val。但是在 4% 的利福平耐药株中, *rpoB* 热点区没有发生突变。

芬兰国家公共卫生学院分枝杆菌参比室 (MRL) 负责全国菌株的最后鉴定、人源性结核分枝杆菌药敏试验。1990 年, 在其他 2 个实验室也

开展 DST 实验, 但是到我们研究的后期阶段, DST 集中在 MRL 做, 从 2003 后, MRL 对所有新结核分枝杆菌分离株进行 DST (表 1)。我们分析了 MRL 10 年内收集的所有菌株, 此菌株的全国覆盖率很高, 研究目的在于: (1) 用 RFLP 和间隔寡核苷酸分型检测耐药结核传播的迹象; (2) 最常见的突变与 INH 或 RMP 耐药是否相关; (3) 利用突变结果分析, 探讨快速分子学方法在诊断 INH 和 RMP 耐药性的可行性。

材料与方法

国家监测系统

在芬兰自 1994 后, 除了临床医生的治疗, 临床微生物学实验室必须通知所有结核病人结果, 培养的结果由实验室计算机系统通过网络以加密的形式发放, 发放率已经由 20% 增加到 90%; 其余的以报告单形式发出。国家私人认证密码系统将诊断结果与国家传染病注册数据库连接, 用此认证密码也可以从公民信息系统中提取个人出生国家、现在国籍、居住地等信息。对此监测系统的评估也显示其高覆盖率¹⁷, 实际上, 在 2004 年形成法律条文前, 已经有相当高比例的菌株送到 MRL。

细菌分离株

我们的研究阶段里, 芬兰共报告 4 285 例阳性病例 (表 1), MRL 共对 3 959 例进行了药敏试验, 这构成我们的试验材料。如果一个病人有多个分离株, 则利用个人信息认证系统都整合到一个病例中去。

药物敏感性试验

用罗氏培养基分离培养细菌, 用 Middlebrook 7H10 琼脂培养基根据标准操作程序以洗脱平板的办法进行药敏操作¹⁸, 所用的药物浓度为 INH 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, RMP 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 链霉素 (SM) 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 乙胺丁醇 (EMB) 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

RFLP 和间隔寡核苷酸分型

按照标准进行 IS6110 RFLP 和间隔寡核苷酸分型进行分型^{1,3}, 用 BioNumerics v. 4.01 程序分析数据结果 (Applied Maths Inc., Sint-Martens-Latem, 比利时), 用不加权算术平均组对方法、dice 系数和 1% 的阳性容忍度做簇分析。簇的定义为: 至少包括 2 个分离株, IS6110 RFLP 图谱一致 (IS6110 拷贝数大于 5 个), 或 IS6110 拷贝数小于

4 个, 但 Spoligotyping 图谱一致。

焦磷酸测序法

所有 INH 耐药的分离株都对 *KatG* 315 位点进行焦磷酸测序, 对 RMP 耐药的菌株都进行 *rpoB* 测序, 另外, 以对此 2 药 1 个或 2 个都敏感的 20 个菌株进行测序作为比较标准。焦磷酸测序手册包括聚合酶链反应, 从 PCR 产物中提取单链 DNA, 测序的引物与模板接合, 焦磷酸实时测序等。首先扩增 127 bp 的 *katG* 和 176 bp 的 *rpoB*, 根据厂家的说明书 (Biotage AB, Uppsala, 瑞典), 用 PSQTM96SQA 试剂盒在 PSQTM96MA 96 孔焦磷酸测序仪上自动测序。一个特殊的核苷分布策略 (核苷附加序列) 和单核苷酸多态性软件, 分析 *katG* 315 焦磷酸测序结果, 主要是检测 SNP 和点突变。根据测序公司实验手册的修改版, 进行 *rpoB* 焦磷酸测序, 因为 *rpoB* 突变的数目比较多, 比如, 整个 81 bp 的热点区域, 所以用环核苷酸分布策略 15 \times (CTGA) 和序列分析软件 (SQA) 来分析 *rpoB* 测序结果, 为了能够测到整段序列, 在 96 孔板的 3 个相同的小池子里用 3 个测序引物分别进行反应, 结果可产生 3 段重叠序列。如果有需要, 本文作者可提供 PCR 的具体信息和测序手册。

本研究不涉及伦理问题。

结 果

芬兰结核发病率

1995—2004 年, 芬兰共报告 4 285 例培养阳性病例 (表 1), 而在我们的研究阶段, 发病率减少了 50%, 相比而言, 虽然外来人口结核病例整体数字没有明显增加, 但是, 发病的比例从 5.6% 上升到 11.6%, 外来人口发病的绝对数字从 1995 年的 37 例增加到 2001 年的 66 例, 在 2004 年底是 40 例。

表型敏感数据

在 4 285 株菌中, 3 959 株进行了药物敏感试验, DST 试验的比例从 1999 年的 82.5% 上升到 2003 和 2004 年的 100%。在测试的 3 539 分离株中, 183 例至少对一种药物耐药, 年耐药菌株数为 13~28, 在我们研究阶段, 年 MDR-TB 平均为 0~4 例。120 个分离株至少对 INH 耐药 (3.0%), 对 INH 单耐药是我们观察到的最普遍的现象 (占所有测试菌的 1.9%), SM 单耐药为其次

(0.8%),同时对INH和SM耐药是多耐药的首要原因(0.6%),对RMP单耐药是比较少见的,只有7例(0.2%),但是有14例为MDR(0.4%),

25例为EMB单耐药(0.6%),另外有12例多耐药菌株同时也对EMB耐药。

表1 芬兰1994—2005年感染的结核分枝杆菌的基本特征

	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	总计
所有结核病例	662	645	575	629	566	537	494	474	415	347	5344
发病率(1/10万)	12.9	12.5	11.2	12.2	11.1	10.4	9.5	9.1	8	6.6	10.35
总培养阳性病例	472	510	435	491	487	451	411	392	347	289	4285
培养阳性病例百分率%	71.3	79.1	75.7	78.1	86	84	83.2	82.7	83.6	83.5	80.2
外源病例	37	39	45	56	45	47	66	49	50	40	474
外源病例百分率%	5.6	6.1	7.8	8.9	8	8.4	13.4	10.3	12	11.6	8.9
药敏试验数	442	422	400	416	402	450	406	385	347	289	3959
做药敏试验的百分率,%	93.6	86.6	92.0	84.7	82.5	99.8	98.8	98.2	100	100	92.4
敏感病例	428	408	379	401	385	428	378	363	330	276	3776
至少一种耐药	14	14	21	15	17	22	28	22	17	13	183
INH	13	12	17	5	2	9	6	5	4	3	76
RMP	0	1	1	0	1	2	1	1	0	0	7
SM	0	1	1	3	2	5	6	4	7	2	31
EMB	0	0	0	1	9	0	5	6	1	3	25
耐一种药菌株的总数	13	14	19	9	14	16	18	16	12	8	139
INH + RMP	0	0	0	2	0	1	0	1	0	0	4
INH + RMP + SM	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	3
INH + RMP + EMB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
INH + RMP + EMB + SM	0	0	0	0	0	0	3	1	3	0	7
总耐多药数量	0	0	0	2	0	2	4	3	3	0	14
INH + SM	1	0	2	4	3	3	5	3	1	3	25
INH + EMB	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	2
INH + EMB + SM	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	3
RMP + SM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RMP + EMB + SM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SM + EMB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
除MDR外,其他多耐药	1	0	2	4	3	4	6	3	2	5	30

INH=异烟肼;RMP=利福平;SM=链霉素;EMB=乙胺丁醇;MDR=耐多药。

分子流行病学

在183例耐药菌株中,181例用IS6110RFLP进行指纹印迹分析,对于IS6110小于5个拷贝或者怀疑为北京家族的进一步用间隔寡核苷酸分型测序(39株):37株被分类为17个簇(其中2个菌株为4个病人共患),剩下的144株(79.6%)为单一模式。另外呈现了2个大的簇:其中一个为单耐RMP簇,包括4个芬兰人。另外1个为包括3个北京家族的MDR簇,MDR簇包括2个芬兰人和1个爱沙尼亚人。但是除了RFLP模式外,在

MDR-TB病人中没有流行病学关联。剩下的15个为小簇,每一个只包括2个分离株,其中9个只包括芬兰本地病例,5个只包括外来病例,1个包括一个非本地和本地病例。根据IS6110RFLP和间隔寡核苷酸分型,181株中的16个属于北京家族,其中5个为MDR。

突变分析

对120株耐INH菌株*KatG* ser315位点焦磷酸测序分析表明:Ser315突变率为46.7%(56个

菌株)。14 个 MDR 病例中, 9 个是 *KatG* ser315 突变。*KatG*315 最常见的突变为 AGC→ACC 点突变, 有 54 个菌株是此种突变。另外有 2 个是 *KatG* ser315AGC→ACA, 这种突变比较少见。这两菌株有相同的 IS6110 指纹印迹, 很有可能在这两个病人间发生传染。

21 个分离株发生 RMP 耐药。其中 7 个为单耐 RMP, 14 个为 MDR, 除了 3 个外, 其他皆为 *rpoB* 热点突变。最常见的突变为 Ser531Leu 氨基酸的转变, 这在 12 个菌株中发生。其他为 His526Tyr (4 个) 和 Asp516Val (1 个), 也有 1 例为 6-bp 碱基丢失, 相当丢失了氨基酸 517—518。在 MDR 菌株大多是 Ser531Leu 突变, 有 10 例发生此突变。

讨 论

大多数结核分枝杆菌耐药基因学或分子流行病学的可得的信息都是短时或者有空间限制的。在我们的研究中, 通过分析具有全国代表性的 10 年间的菌株, 表明在芬兰耐药结核的传染率很低。对突变结果的分析表明, *KatG* 基因突变导致 Ser315Thr 氨基酸的变化, *rpoB* 基因的突变, 分别占了 INH 和 RMP 耐药的大部分。Van Doorn 等人最近发表了一个相似的研究论文¹⁹: 荷兰 1993—2002 间 INH 耐药菌株中, 55% 都有 *katG*315 突变, 簇中突变的菌株和对 INH 敏感的菌株比例相当。

分析 1995 年到 2004 年所有初治病人的分离株, 4.6% 至少对 1 种药物耐药, INH 耐药占了所有测试菌株的 3.0%。与 2000—2004 年世界卫生组织欧洲区 (欧盟和西欧) 其他国家耐药数字相比, 芬兰的耐 INH 率是最低的²⁰, 在 10 年间, 原发 MDR (从来没有接受过结核治疗的新病人) 为 0.4%, 跟大多数发达国家 1% 的比例相比, 我们的数字偏低²¹, 所有这些数字, 再加上我们发病率不断减少的趋势都表明芬兰运行良好的结核病质量政策。但是, MDR-TB 病例却呈缓慢上升趋势: 在研究的第一个 5 年 (1995—1999) 只有 2 例 MDR-TB, 而在下一个 5 年, MDR-TB 病例增加到 12 个。14 例 MDR-TB 患者中, 只有 2 个为芬兰本地人, 而且他们他们的病源分别为爱沙尼亚和俄罗斯。

RFLP 分析到异源性, 这说明我们研究的菌株间的相关性很小。只有一个大的簇, 包括 4 个 RMP 单耐药的病例, 很可能他们之间是传染的结

果。在 2 个小的簇中, 包括芬兰本土和外来人, 但是 2 个簇间除了一个相同的 RFLP 图谱外, 没有任何其他流行病学相关性, 这说明在本地和外来人口之间耐药结核病传染机会很小, 另外, 在所有菌株中, 特征性的 RFLP 比例很大, 由此我们推断芬兰大多数结核病源于潜伏感染的复发, 而不是新感染的结果。

北京家族独特的基因特征与大规模的结核暴发、病菌毒性和 MDR 相关。在前苏联国家中, 尤其在囚犯中^{7,22,23}, 这个问题尤其严重。目前为止, 北京家族还没有传播到结核发生率低国家。Lillebaek 等人对丹麦 1992—2001 年间收集的 3844 个菌株进行了 RFLP 分析, 其中 97% 培养阳性, 北京家族占其中的 2.5%²⁴。以 2000—2001 为时间界限进行分析, 北京家族在芬兰 1 年的流行率为 1.1%²⁵, 因为我们的数据表明 8.8% 的耐药菌株为北京家族, 所以耐药菌株中北京家族的流行率比其在敏感菌株中流行率高 8 倍。分析结核分枝杆菌耐药相关基因标记集中在 *katG* 和 *rpoB* 基因上, 因为这些位点可以为临床医生快速诊断耐药提供最好的成本效益比, 尤其是在怀疑 MDR-TB 的时候, 而且也有价格合理的诊断它们的试验。我们在此研究中采用的是在诊断耐药上快速有效的焦磷酸微测序方法²⁶, 也可以采用其他的基于线性探针、基因芯片的方法^{27,28}。在 INH 耐药株中, 有 56 例为 (46.7%) Ser315Thr 氨基酸变化。近来的研究表明, 根据地理分布的不同, Ser315Thr 突变率在 32%~63% 间变化, 我们的研究也支持这个结论²⁹⁻³¹。但是在一些集中的区域, *katG*315 突变率就相对高些, 对俄罗斯一年内本地居民菌种的研究表明, *katG*315 突变占了 INH 耐药株的 98%。

我们研究显示 RMP 耐药株最常见的突变为 Ser531Leu, 其他研究也有此结论^{30,33}。在 RMP 培养基上体外筛选 H₃₇Rv 突变株实验表明, Ser531Leu 突变也是最常见的 (60.9%)³⁴。对 *rpoB* 基因突变的 RMP 耐药株的适应性试验表明, Ser531Leu 的适应性代价相对低, 这就解释了它在 RMP 耐药株中发生率高的现象³⁵。

尽管耐药突变模式还没有与基因测序结果常规结合, 我们分析了 17 个簇中的 37 株分离株, 以观察结果的一致性。结果 6 个簇的 11 个分离株, 因 *katG* 和 *rpoB* 基因型的不同而区分开, 这样就减少了对所研究的菌株进行聚类分析。但是没有关于如何解释合并数据的既有指南, 我们暂时分开解释测序和基因分型的结果。

因此我们的结论是, 在我们的研究阶段, 芬兰的结核发生率降低, 耐药结核也不是严重的问题。尽管有个别病例发生, 但是同一耐药菌在人群中传播还是很罕见的现象。我们研究中观察到的突变发生的模式及 *katG*、*rpoB* 突变的频率、前述研究的结果, 都增加了我们将监测突变作为常规工作的动力, 尤其是监测那些暴露于 MDR-TB 危险因素的人群。

(尚美译 何广学校 王雪静 审)

References

- Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 907-914.
- Supply P, Allix C, Lesjean S, et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 4498-4510.
- van Embden J D, Cave M D, Crawford J T, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 406-409.
- Cox H S, Kubica T, Doshetov D, Kebede Y, Ruesch-Gerdes S, Niemann S. The Beijing genotype and drug resistant tuberculosis in the Aral Sea region of Central Asia. *Respir Res* 2005; 6:134.
- Herrera L, Jimenez S, Valverde A, Garcia-Aranda M A, Saez-Nieto J A. Molecular analysis of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Spain (1996-2001). Description of new mutations in the *rpoB* gene and review of the literature. *Int J Antimicrob Agents* 2003; 21: 403-408.
- Kubica T, Rüschi-Gerdes S, Niemann S. The Beijing genotype is emerging among multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Germany. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004; 8: 1107-1113.
- Pfyffer G E, Strassle A, van Gorkum T, et al. Multi-drug-resistant tuberculosis in prison inmates, Azerbaijan. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 855-861.
- van Soolingen D, Qian L, de Haas P E, et al. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 3234-3238.
- Marttila H J, Soini H, Eerola E, et al. A Ser315Thr substitution in *katG* is predominant in genetically heterogeneous multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates originating from the St. Petersburg area in Russia. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 2443-2445.
- Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, et al. *inbA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 1994; 263: 227-230.
- Ramaswamy S V, Reich R, Dou S J, et al. Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 1241-1250.
- Rattan A, Kalia A, Ahmad N. Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: molecular perspectives. *Emerg Infect Dis* 1998; 4: 195-209.
- Cooksey R C, Morlock G P, Glickman S, Crawford J T. Evaluation of a line probe assay kit for characterization of *rpoB* mutations in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from New York City. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1281-1283.
- De Beenhouwer H, Lhiang Z, Jannes G, et al. Rapid detection of rifampicin resistance in sputum and biopsy specimens from tuberculosis patients by PCR and line probe assay. *Tubercle Lung Dis* 1995; 76: 425-430.
- Miller L P, Crawford J T, Shinnick T M. The *rpoB* gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 805-811.
- Telenti A, Imboden P, Marchesi F, et al. Detection of rifampicin resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet* 1993; 341: 647-650.
- Kokki M, Holmström P, Ruutu P. High sensitivity for tuberculosis in a national integrated surveillance system in Finland. *Euro Surveill* 2005; 10: 90-93.
- Wayne L G, Krasnow I. Preparation of tuberculosis susceptibility testing mediums by means of impregnated disks. *Am J Clin Pathol* 1966; 45: 769-771.
- van Doorn H R, de Haas P E, Kremer K, Vandenbroecke-Grauls C M, Borgdorff M W, van Soolingen D. Public health impact of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains with a mutation at amino-acid position 315 of *katG*: a decade of experience in The Netherlands. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 769-775.
- Euro TB and the National Coordinators for Tuberculosis Surveillance in the WHO European Region. Surveillance of tuberculosis in Europe. Report on tuberculosis cases notified in 2004. Saint-Maurice, France: Institut de Veille Sanitaire, 2006.
- Espinal M A. The global situation of MDR-TB. *Tuberculosis* 2003; 83: 44-51.
- Toungousova O S, Sandven P, Mariandyshev A O, Nizovtseva N I, Bjune G, Caugant D A. Spread of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype in the Archangel oblast, Russia. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1930-1937.
- Kubica T, Agzamova R, Wright A, et al. The Beijing genotype is a major cause of drug-resistant tuberculosis in Kazakhstan. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005; 9: 646-653.
- Lillebaek T, Andersen A B, Dirksen A, Glynn J R, Kremer K. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 1553-1557.
- Puustinen K, Marjamaki M, Rastogi N, et al. Characterization of Finnish *Mycobacterium tuberculosis* isolates by spoligotyping. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1525-1528.
- Zhao J R, Bai Y J, Wang Y, Zhang Q H, Luo M, Yan X J. Development of a pyrosequencing approach for rapid screening of rifampicin, isoniazid and ethambutol-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005; 9: 328-332.
- Hillemann D, Weizenegger M, Kubica T, Richter E, Niemann S. Use of the GenoType MTBDR assay for rapid detection of rifampicin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 3699-3703.
- Rossau R, Traore H, De Beenhouwer H, et al. Evaluation of the INNO-LiPA Rif. TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampicin. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2093-2098.
- Rindi L, Bianchi L, Tortoli E, Lari N, Bonanni D, Garzelli C. Mutations responsible for *Mycobacterium tuberculosis* isoniazid resistance in Italy. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005; 9: 94-97.
- Hofling C C, Pavan E M, Giampaglia C M, et al. Prevalence of *katG* Ser315 substitution and *rpoB* mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005; 9: 87-93.
- Aktas E, Durmaz R, Yang D, Yang Z. Molecular characterization of isoniazid and rifampicin resistance of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Malarya, Turkey. *Microb Drug Resist* 2005; 11: 94-99.
- Shemyakin I G, Stepanshina V N, Ivanov I Y, et al.

- Characterization of drug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* derived from Russian inmates, *Int J Tuberc Lung Dis* 2004; 8: 1194–1203.
- 33 Hillemann D, Kubica T, Agzamova R, Venera B, Rüsç-Gerdes S, Niemann S. Rifampicin and isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from patients in Kazakhstan. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005; 9: 1161–1167.
- 34 Morlock G P, Plikaytis B B, Crawford J T. Characterization of spontaneous, in vitro-selected, rifampicin-resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* strain H₃₇Rv. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 3298–3301.
- 35 Mariam D H, Mengistu Y, Hoffner S E, Andersson D I. Effect of *rpoB* mutations conferring rifampicin resistance on fitness of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1289–1294.

地理距离对中国一个山区省结核病人延误的影响研究

The effect of geographical distance on TB patient delays in a mountainous province of China

X. Lin, * V. Chongsuvivatwong, † A. Geater, † R. Lijuan*

* Yunnan Provincial Centers for Disease Control and Prevention, Yunnan, China; † Epidemiology Unit, Medicine Faculty, Prince of Songkla University, Hat Yai, Thailand

摘要

背景: 中国一个山区省—云南的 129 个县。

目的: 说明病人延误与病人到当地县级结核病 (TB) 中心的距离之间的关系。

设计: 对 2005 年登记的 10 356 例新涂阳结核病人的电子病历进行研究。

结果: 总延误的中位数是 71 d (四分位数间距 (IQR) 为 38~128), 病人延误中位数为 60 d (IQR 为 28~111), 相对较短的医疗系统延误中位数为 4 d (IQR 为 2~138)。农民和经济状况差的年长者 (>40 岁) 与时间较长的病人延误明显相关。延误的风险随着地理距离的增加而增加, 对相对较短的病人延误的影响更强。以距离的第一四分位数为对

照组, 短期病人延误 (≤ 60 d) 后续的四分位数的风险比分别为 0.61 (0.57~0.65), 0.30 (0.28~0.33) 和 0.15 (0.14~0.17), 长期病人延误 (>60 d) 后续的四分位数的风险比分别为 1.04 (0.94~1.17), 0.69 (0.63~0.77) 和 0.43 (0.39~0.47)。

结论: 居住在边远地区的病人需要支持以克服地理距离带来的困难, 这个困难对疾病早期影响更大。

关键词: 结核; 延误; 地理距离; 山区; 中国

确定县级结核病 (TB) 中心的可及性如何限制中国南部的云南省结核病人的发现是比较困难的。由于云南省山区多、交通不便、经济欠发达, 因此上述问题受到了特别关注。

开始结核病治疗前长期延误对于结核病控制有负面影响, 由于这些病人病情进展迅速, 导致死亡率增加和在社区传播的危险性增加¹⁻⁶。已知的引起延误的因素包括年龄、性别、病人对于结核病的理解, 医疗服务的可及性, 经济状况和歧视⁷。

但是, 只有少数几个有关地理因素对结核病控制影响的研究。在加纳⁸、越南⁹ 和巴西¹⁰, 农村和城市居民的病人延误没有显著性差异, 而在冈比亚¹¹ 农村居民中病人延误时间较长。在坦桑尼亚¹² 和埃塞俄比亚¹³, 住所与医疗机构距离大于 10 km 的病人和在印度¹⁴ 住所与医疗机构距离大于 2 km

的病人, 其病人延误的平均数较长, 而在南非¹⁵, 住所与医疗机构距离大于 5 km 没有明显的影响。

为了避免非标准化诊断、治疗和随访, 自 2001 年开始实施的中国结核病防治规划 (NTP) 要求, 不管病人在哪里诊断, 所有结核病人均应转诊到县级结核病中心, 进行免费确诊和治疗^{16,17}。

这样管理的结果是在云南省 (面积为 39 400 km², 其中多于 94% 是山地) 只有 129 个县级结核病中心 (每县 1 个) 为全省 4 400 万人口服务。2005 年在结核病中心登记的新涂阳肺结核病人数为 11 232 例 (26/10 万)。1990 年流行病学调查显示涂阳结核病患率为 77.7/10 万, 虽然云南省实现了治愈率大于 85% 的目标, 但是病人发现率还是不令人满意^{17,18}。

在中国唯一一项关于地理距离对结核病治疗

延误的影响的研究显示,在山东省,一个平原地区,地理距离对结核病治疗延误的影响不明显¹⁹。与之前的研究相比,云南省现有的大量数据库资料能够提供一个全面的关于结核病病人延误本质的了解。

本研究的目的是阐明病人延误与住所到当地县级结核病中心距离之间的关系。

方 法

本研究得到云南省疾病预防控制中心(云南 CDC)云南结核病防治规划伦理委员会,PROC 和位于泰国合艾的宋卡王子大学医学院院长批准。在从数据库获得病人病历之前,研究人员和 129 个县级结核病中心都签署了一项对病人资料保密的协议。在资料管理前删除病人的姓名和编号,在资料分析后销毁所有原始的电子文件。

研究对象和资料收集

本研究是使用 2005 年云南省 129 个县级结核病中心登记的新涂阳结核病病人的信息的电子病历研究。

从 2004 年开始,结核病信息管理网络系统(TMIS)在云南充分发挥作用,并覆盖了 129 个县级结核病中心。县级结核病医生按照标准的操作指南每天登记和更新病人信息。当地市级卫生官员每个季度,省级卫生官员每半年在现场常规督导中对该系统和数据库进行评价。2005 年数据库的完整性为 95%,准确性为 97.6%。

资料包括病人基本信息,结核病症状出现的日期,出现症状后第 1 次到县级(或更高级)结核病中心/医院就诊的日期,首次诊断为结核病的日期和开始抗结核治疗的日期。

我们从每个县挑选 1 名经验丰富的卫生官员收集地理信息。提供一个所有入选病人的详细住址的列表,不包括姓名和其他识别信息。根据地址和当地地图,计算住所到当地县级结核病中心的距离。如果有必要的话,根据当地公共交通情况和步行,估算单程时间。

操作定义

由于云南省乡级卫生所通常没有执业医师,因此在电子资料中首次就诊的卫生服务机构是县级(或更高级)结核病中心/医院。

“病人延误”定义为从出现结核病症状到首次

到县级(或更高级)结核病中心/医院就诊之间的时间。“医疗系统延迟”定义为从病人首次到县级(或更高级)结核病中心/医院就诊到开始抗结核治疗的时间。从报告出现症状到开始治疗之间的总时间称为“总延迟”。

统计分析

病人延迟是主要的应变量;根据以前的文献,长期病人延迟定义为大于 60 d¹⁰。使用四分位数作为预测,将住所到县级结核病治疗中心的地理距离划分为 4 组。

本研究所用的描述性统计包括连续型变量(由于是非正态分布,表现为中位数或四分位数间距)和分类变量(以百分数表示)。

在单变量分析中使用 Kaplan-Meier 分析和 Log rank 检验比较各组之间的病人延误。在多变量分析中应用 Cox 比例风险模型评估不同变量对病人延误的单独影响。使用全球性检验验证对于比例风险假设的违背情况。如果有显著的违背,使用分层 Cox 回归和时变方法。使用 R 软件(2.5.0 版补丁)分析资料。在单变量分析中 P 值 ≤ 0.2 的变量进入多变量分析,根据连续模型对数拟然的变化用向后剔除法精简模型。最终显著性检验水准定为 0.05。

Cox 模型得出的风险比(HR)作为首次就诊的相对概率的指标。HR < 1 表示影响因素增加了延误的风险。

结 果

病人特征

在研究对象的 11 232 例涂阳肺结核病人中,876 例(7.8%)由于缺少清楚的地址、症状出现的时间或就医时间信息而排除在外,余下 10 356 例病人。66%的病人(研究中包括的和排除的)是男性。排除的病人比包含的病人稍年轻(中位数分别为 36 和 38 岁, $P < 0.001$)。表 1 列示了研究对象的背景特征和就医行为。

大多数病人(96.2%)首次诊断为结核病并报告到当地县级结核病治疗中心,26.4%的病人来自经济发达地区(根据 2005 年每县人均国内生产总值的三分位数分类)。只有 7.8%的病人住所距离结核病中心 2 km 内,50.1%病人住所距离结核病中心大于 40 km。35.8%病人单程耗时小于 1 h,而 52.1%病人到当地结核病中心需要 2 个多小时。

表 1 研究对象的背景和就医行为 (N=10356)

特征	中位数 (IQR)	n (%)
年龄, 岁	38 (27~54)	
性别		
男性		6784 (65.5)
女性		3572 (34.5)
职业		
农民		8820 (85.2)
学生		513 (4.9)
蓝领 ^{a)}		523 (5.1)
白领 ^{b)}		184 (1.7)
家庭主妇或无业者		316 (3.1)
到结核病治疗中心的距离, km	39 (13~70)	
到结核病诊断中心的时间, h	2 (0.75~4)	
根据各县居民人均 GDP 划分的经济状况 ^{c)}		
贫困		4004 (38.7)
中等		3622 (34.9)
良好		2730 (26.4)
病人延误, d	60 (28~111)	
医疗系统延误, d	4 (2~13)	
总延误, d	71 (38~128)	

a) 包括工厂工人、农民工、服务行业人员和司机。

b) 包括政府官员、公务员、教师、商人和医生。

c) 根据每县人均国内生产总值的三分位数分为三组。

IQR=四分位数间距; GDP=国内生产总值。

延误水平

总体上, 2708 例病人 (26.1%) 在发病一个月内寻求诊治。病人延误的中位数为 60 d (均数 78.5 d, 标准差 (SD) 为 67.3 d); 3467 例病人 (33.5%) 在发病 90 d 后寻求诊治, 18 例病人 (0.2%) 在发病超过 1 年后才寻求诊治。

医疗系统延误的中位数是 4 d (均数为 14.6 d, SD 为 29 d); 6502 例病人 (62.8%) 在 1 周内确诊并开始治疗, 1391 例 (13.4%) 在 60 d 后接受治疗。在病人延误和医疗系统延误之间有较弱的负相关 (Spearman 相关系数 = -0.11)。

总延误的中位数为 71 d (均数 93.1 d, SD 72.7 d)。1667 例病人 (16.1%) 的总延误小于 1 个月。由于医疗系统延误相对较短, 总延误受病人延误的影响更大。

与病人延误相关的因素

表 2 列示了单变量分析的结果。性别对病人延误没有影响。≤40 岁病人的病人延误的中位数较 >40 岁的短 (57 和 62 d, $P < 0.001$)。学生或白领比农民寻求诊治延误的可能性小 (38 和 63 d, $P < 0.001$)。经济状况良好也与病人延误短相关 (41 和 64 d, $P < 0.001$)。

表 2 单变量分析确定的病人延误的危险因素 (N=10356)

变 量	n	病人延误时期的中位数	P 值
		d (IQR)	
性别			0.57
男性	6784	61 (29~112)	
女性	3572	58 (28~110)	
年龄, 岁			<0.001
≤20	1159	54 (27~100)	
20~40	4499	58 (28~108)	
40~60	3094	66 (31~125)	
>60	1604	52 (24~100)	
职业			<0.001
农民	8820	63 (31~119)	
学生	513	39 (20~78)	
蓝领 ^{a)}	523	35 (17~66)	
白领 ^{b)}	184	34 (17~65)	
家庭主妇或无业者	316	31 (16~62)	
经济状况 ^{c)}			<0.001
贫困	4004	68 (34~129)	
中等	3622	61 (28~112)	

续表

变 量	n	病人延误时期的中位数		P 值
		d (IQR)		
良好	2730	41 (22~84)		
到 TB 治疗中心的距离, km				<0.001
≤13	2598	30 (15~51)		
13~39	2588	45 (23~77)		
>39~70	2585	73 (39~123)		
>70	2585	117 (66~181)		
到 TB 治疗中心的时间, h				<0.001
≤0.75	2663	31 (15~56)		
0.75~2	2737	44 (23~77)		
>2~4	2722	83 (45~139)		
>4	2234	108 (61~173)		

a) 包括工厂工人、农民工、服务行业人员和司机。
 b) 包括政府官员、公务员、教师、商人和医生。
 c) 根据每县人均国内生产总值的三分位数分为三组。
 IQR=四分位数间距; TB=结核病

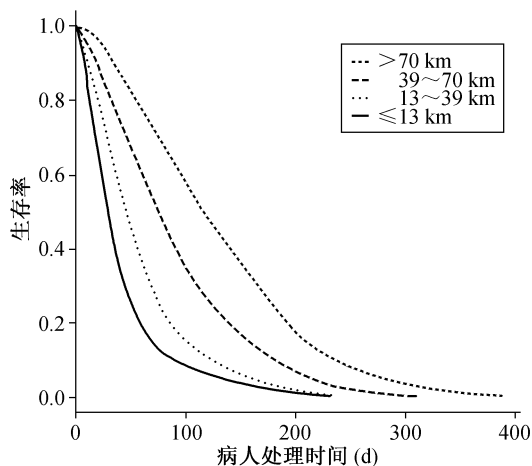


图 1 不同距离组的 Kaplan-Meier 生存曲线

附图显示了关于距离的 Kaplan-Meier 分析结果。居住在第 2、3、4 距离四分位数 (13~39 km,

>39~70 km、>70 km) 病人的病人延误中位数分别是居住在第一距离四分位数 (≤13 km) 病人的 1.5、2.4 和 3.9 倍。

出行时间与地理距离高度相关 (Spearman 相关系数为 0.88), 对病人延误的影响与地理距离对病人延误的影响相同。最短的延误中位数 (31 d) 与出行时间 ≤0.75 h 组相对应, 而最长的延误中位数 (108 d) 与出行时间 >4 h 组相对应。

表 3 列示了以距离作为时间变化协变量的多变量 Cox 回归的结果。最初的以地理距离为自变量的多变量 Cox 模型违反了比例风险假设。为了解决这个问题, 病人延误的时间被分为两部分, 以 60 d 为分界线 (本研究中病人延误中位数)。病人延误小于 60 d 的病人仅包含在第 1 延误时期内。病人延误 ≥60 d 考虑为在第 1 延误时期末检查, 但是事件 (就医) 发生在第 2 个时期。

表 3 用有时间变化协变量的 Cox 回归分析确定的病人延误独立危险因素 (n=10356)

变 量	调整 HR 值	95%CI	P 值	整个变量的 P 值
年龄, 岁				0.015
≤20	1			
20~40	0.96	0.88-1.03	0.26	
40~60	0.90	0.83-0.98	0.01	
>60	0.91	0.83-0.99	0.04	
职业				<0.001
白领 ^{a)}	1			
农民	0.78	0.67-0.90	<0.001	

续表

变 量	调整 HR 值	95%CI	P 值	整个变量的 P 值
学生	0.99	0.82—1.18	0.05	
蓝领 ^{b)}	0.84	0.71—1.00	0.05	
家庭主妇或无业者	0.90	0.75—1.08	0.24	
经济状况 ^{c)}				<0.001
贫困	1			
中等	0.93	0.88—0.98	<0.01	
良好	0.9	0.85—0.94	<0.001	
短期病人延误 (≤ 60 d) ^{d)} 的病人到县级 TB 中心的距离, km,				<0.001
≤ 13	1			
13~39	0.61	0.57—0.65	<0.001	
$>39\sim 70$	0.30	0.28—0.33	<0.001	
>70	0.15	0.14—0.17	<0.001	
长期病人延误 (>60 d) ^{d)} 的病人到县级 TB 中心的距离, km,				<0.001
≤ 13	1			
13~39	1.04	0.94—1.17	0.44	
$>39\sim 70$	0.69	0.63—0.77	<0.001	
>70	0.43	0.39—0.47	<0.001	

a) 包括工厂工人、农民工、服务行业人员和司机。

b) 包括政府官员、公务员、教师、商人和医生。

c) 根据每县人均国内生产总值的三分位数分为三组。

d) 到县级结核病中心的距离违背了 Cox 比例风险模型的假设, 因此距离作为时间变化协变量, 用病人延误中位数 (60 d) 作为分界点。最终的有时间变化协变量的 Cox 比例风险模型显示出距离对短期和长期病人延误的影响差异。

HR=风险比; CI=可信区间; TB=结核病。

为这两个时期建立两个虚拟的“距离”变量能够将距离在两个时期的效果包括在模型中, 因此符合比例风险假设。

年龄、职业和经济状况对病人延误的影响与单因素分析结果一致。延误的风险随着地理距离的增加而增加, 对短时病人延误的效果更强。对于 60 d 的延误, 长时延误的风险随着距离的增加而稳定增加。但是, 对于超过 60 d 的延误, 住所距离 13~39 km 延误的风险与对照 (≤ 13 km) 相比并未增加。只有距离更远的 (>39 km) 长时延误风险更大。在两个时期中, 风险比呈明显的线性趋势, 但是在早期延误时期的线性趋势的变化更强 (HR 为 0.54 和 0.71)。

讨 论

本研究证实了在中国南部在结核病防治规划中, 从结核病症状出现到治疗之间的确存在延误, 90% 的总延误是由病人延误引起的。年龄、职业和

社会经济状况与病人延误明显相关, 地理距离也同样相关。后者影响很强, 但是在较长的延误时期中减弱了。

本研究中病人延误的中位数是 60 d, 接近于尼日利亚报告的 56 d²⁰, 但是明显比冈比亚 (3 d)¹¹、越南 (7 d)⁹、印度 (20 d)¹⁴、泰国 (34 d)²¹、中国其他地区 (13 d)^{19,22} 和埃塞俄比亚 (30 d)¹³ 报告的病人延误中位数长。这可能在某种程度上与病人对结核病的理解、医疗系统和社会经济状况有关⁷, 或者因为病人延误的定义不同而造成的。

然而, 云南省医疗系统延误中位数 (4 d) 比尼日利亚 (7 d)²⁰, 南非 (7 d)¹⁵, 泰国 (20 d)²¹, 埃塞俄比亚 (21 d)¹³, 印度 (23 d)¹⁴, 越南 (28 d)⁹ 和冈比亚 (56 d)¹¹ 短, 和中国其他两个研究的结果 2 d 和 6 d²² 相近。由于本研究中少数病人 (3.8%) 在县级结核病中心以外的医疗机构首次诊断和报告, 因此医疗系统延误较短并不奇怪。

本研究显示病人延误与年龄大和经济状况差明

显相关, 此结果与坦桑尼亚¹²、埃塞俄比亚¹³和中国^{19,22}开展的其他研究结果一致, 可能与年老和/或贫困的人寻求诊治所遇到的困难关联更大。学生可能因为家庭和学校的关系, 对结核病的了解更多, 因此学生病人的延误较短。白领工作者的延误也较短, 可能是因为他们与农民相比, 他们的教育水平较高, 并且收入较多。

一如所料, 地理距离对病人延误的影响较社会经济状况更明显, 由于出行时间和地理距离之间强相关, 因此推断出行时间和地理距离的效果相同也是合理的。

然而, 地理距离的影响在延误的整个时期中并不一致。对于延误较短的病人, 较长延误的风险随距离增加而迅速增加。换句话说, 对于这类病人, 距离对病人延误有非常强的影响。这可能由于疾病仍处于初级阶段, 症状较轻。然而, 对于延误较长的病人, 距离对延误的影响较不明显。可能由于疾病非常严重, 必须要去看医生, 而不考虑距离远近。

如果所有的病人首诊都到乡卫生所由执业医师诊治, 而其他的影响变量都不变, Cox 模型预测的病人延误中位数为 30 d。由于缺乏经费、设备和人力, 乡卫生所提供结核病诊断和治疗服务还不可行, 但是应该开始考虑将中国的结核病治疗基础设施分散化, 以进一步改善医疗平等。分散化服务除了能够减少延误, 还可以增加医疗照顾不足的人群的结核病治疗的覆盖范围, 改进病人随访、结核病治疗依从性和接触者调查。

本研究中 50% 的病人住所距离结核病中心大于 40 km 或耗时超过 2 h 来看病。他们也许在结核病中心附近停留至少 1 个晚上, 需要 2 d 时间得到结核病诊断, 可能因为就诊的间接费用而增加病人的延误。这意味着针对改进医疗服务可及性的强化干预对病人及其家人可能具有强有力的经济效应。

我们的分析得益于相对大的样本量和高质量的资料, 因此有强大的效力来检验假设。然而, 由于大多数研究对象都是从结核病治疗中心获得的, 因此对于目前服务未覆盖的病人我们没有任何信息。此外, 与县级医疗人员第一接触点和关于人类免疫缺陷病毒与获得性免疫缺陷综合症 (HIV/AIDS) 信息的不可用性限制本研究的代表性。

(胡冬梅 译 何广学 审校)

Acknowledgements

The authors wish to thank all county TB centre doctors and

health officers of prefectures for assisting with geographical data collection. Financial support was provided by Yunnan CDC.

This paper is published in partial fulfilment of the requirements of a PhD degree from the Epidemiology Programme at The Prince of Songkla University, Hat Yai, Thailand.

References

- 1 Yilmaz A, Bogi A S, Sulu E, et al. Delays in the diagnosis and treatment of hospitalized patients with smear-positive pulmonary tuberculosis. *Respir Med* 2001; 95: 802–805.
- 2 Maher D, Mikulencak M. What is DOTS? A guide to understanding the WHO-recommended TB control strategy known as DOTS. WHO/CDS/CPC/TB/99. 270. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1999.
- 3 Pablos-Mendez A, Sterling T R, Frieden T R. The relationship between delayed or incomplete treatment and all-cause mortality in patients with tuberculosis. *JAMA* 1996; 276: 1223–1226.
- 4 Bakhshi S S, Hawker J, Ali S. Tuberculosis mortality in notified cases from 1989–1995 in Birmingham. *Public Health* 1989; 112: 165–168.
- 5 Enarson D A, Grzybowski S, Dorken E. Failure of diagnosis as a factor in tuberculosis mortality. *Can Med Assoc J* 1978; 118: 1520–1522.
- 6 Katz I, Rosenthal T, Michaeli D. Undiagnosed tuberculosis in hospitalized patients. *Chest* 1985; 87: 770–774.
- 7 Pronyk R M, Makhubele M B, Hargreaves J R, Tollman S M, Hausler H P. Assessing health seeking behaviour among tuberculosis patients in rural South Africa. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001; 5: 619–627.
- 8 Lawn S D, Afful B, Acheampong J W. Pulmonary tuberculosis: diagnostic delay in Ghanaian adults. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998; 2: 635–640.
- 9 Lonroth K, Thuong L M, Linh P D, Diwan V K. Delay and discontinuity—a survey of TB patients' search of a diagnosis in a diversified health care system. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; 3: 992–1000.
- 10 dos Santos M A P S, Albuquerque M F P M, Ximenes R A A, et al. Risk factors for treatment delay in pulmonary tuberculosis in Recife, Brazil. *BMC Public Health* 2005; 5: 25.
- 11 Lienhardt C, Rowley J, Manneh K, et al. Factors affecting time delay to treatment in a tuberculosis control programme in a sub-Saharan African country: the experience of The Gambia. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001; 5: 233–239.
- 12 Wandwalo E R, Morkve O. Delay in tuberculosis case-finding and treatment in Mwanza, Tanzania. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4: 133–138.
- 13 Yimer S, Bjune G, Alene G. Diagnostic and treatment delay among pulmonary tuberculosis patients in Ethiopia: a cross-sectional study. *BMC Infect Dis* 2005; 5: 112.
- 14 Rajeswari R, Chandrasekaran V, Suhadev M, Sivasubramanian S, Sudha G, Renu G. Factors associated with patient and health system delays in the diagnosis of tuberculosis in South India. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002; 6: 789–795.
- 15 Pronyk R M, Makhubele M B, Hargreaves J R, Tollman S M, Hausler H P. Assessing health seeking behaviour among tuberculosis patients in rural South Africa. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001; 5: 619–627.
- 16 Qi X Q, Chen X Y, Wang L Y et al. National guidelines for China National TB Control Programme (2002–2010). Beijing, China: National Health Bureau of China, 2002; pp 21–26.
- 17 Yunnan Provincial TB Control Office. Yunnan Provincial TB Control Plan (2002–2010). Yunnan, China: Yun-

-
- nan Provincial Health Bureau, 2002: pp 10–15.
- 18 Yunnan Provincial TB Control Office. Yunnan Provincial TB Control Progress Report (2005). Yunnan, China; Yunnan Provincial Health Bureau, 2005.
 - 19 Cheng G, Tolhurst R, Li R Z, Meng Q Y, Tang S. Factors affecting delays in tuberculosis diagnosis in rural China; a case study in four counties in Shandong Province. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 2005; 99: 355–362.
 - 20 Odusanya O O, Babafemi J O. Patterns of delays amongst pulmonary tuberculosis patients in Lagos, Nigeria. *BMC Public Health* 2004; 4:18.
 - 21 Rojpiulstitt M, Kanjanakiritamrong J, Chongsuvivatwong V. Patient and health system delays in the diagnosis of tuberculosis in Southern Thailand after health care reform. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006; 10: 422–428.
 - 22 Xu B, Jiang Q W, Xiu Y, Diwan V K. Diagnostic delays in access to tuberculosis care in counties with or without the National Tuberculosis Control Programme in rural China. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005; 9: 784–790.

南非严重耐多药结核基因型的多样性

Genotypic diversity of extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB) in South Africa

C. K. Mlambo, * R. M. Warren, † X. Poswa, ‡ T. C. Victor, † A. G. Duse, * E. Marais *

* Clinical Microbiology and Infectious Disease, National Health Laboratory Services and University of the Witwatersrand, Johannesburg, Gauteng, † Department of Science and Technology/National Research Foundation Centre of Excellence in Biomedical Tuberculosis Research, Medical Research Centre (MRC) Centre for Molecular and Cellular Biology, Stellenbosch University, Western Cape, ‡ Tuberculosis Referral Laboratory, National Health Laboratory Services, Johannesburg, Gauteng, South Africa

摘要

背景: 严重耐多药结核 (XDR-TB) 已成为结核病控制的新威胁, 但对其流行病学尚不十分了解。

目的: 采用分子手段研究南非 XDR-TB 菌株基因型的人群结构组成, 从而确定 XDR-TB 主要是获得性还是原发感染。

方法: 收集耐多药结核 (MDR-TB) 患者的痰菌分离株, 送至国家参比实验室进行二线抗结核药物的药敏试验。对 XDR-TB 的分离株进行 Spoligotyping 分型, 并与该分离株的地理来源相匹配。

结果: 自 2005 年 6 月至 2006 年 12 月共获得 699 例 MDR-TB 患者的分离株, 其中 101 例

(17%) 菌株耐氧氟沙星 (OFX) 或卡那霉素 (KAN), 41 例 (6%) 对二者均耐药 (XDR-TB)。Spoligotyping 法将 XDR-TB 分离株共分为 17 个基因型。结果表现为高度的基因型多样性和地理分布多样性, 所以我们估计 63%~75% 的 XDR-TB 患者为获得性耐药。

结论: 获得性严重耐多药可能是导致南非 XDR-TB 流行的主要机制。因此结核病控制的迫切问题是必须致力于阻止这种潜在的不治之症的传播。

关键词: 分枝杆菌, 结核; MDR-TB; XDR-TB

日益严重的抗结核药物耐药问题已经成为结核病控制的重大威胁, 尤其在医疗资源短缺的发展中国家, 耐药菌株的传播更难得到控制。对耐多药 (MDR) 结核更是如此。MDR-TB 是由体外培养时对利福平和异烟肼两种药物耐药的结核分枝杆菌引起的结核病, 可以对其他抗结核药物耐药或不耐药。

南非是耐药结核的高负担国家之一, 估计年发病达 3 000 例¹。MDR-TB 的治疗是一个困难和长期的过程, 患者依从性差, 较易发展成对二线药物的耐药²。不恰当的治疗如单药治疗、药物不当组合、药物质量低劣、药物吸收不良等也会导致耐药。耐药的发展、社区及医院或其他医疗环境内菌

株的传播都可能成为疾病传播的重要方式³⁻⁵。

严重耐多药结核最初发现于 19 世纪 80 年代末及 90 年代。2004 年世界卫生组织 (WHO) 和美国疾病控制与预防中心挑选了部分国家参比实验室调查 XDR-TB 的比率⁶。2002—2004 年菌株的调查显示 20% 的菌株为 MDR-TB, MDR-TB 中 10% 为 XDR-TB (当时用的是 XDR-TB 的旧定义 (对二线药物六类中的三类耐药))。上述数据还显示全球不同地区的 XDR-TB 比率不同, 其中亚洲和东欧国家比率较高。然而, 由于鉴定 XDR-TB 的方法没有标准化, 调查也没有涵盖所有的国家, 所以真正的全球 XDR-TB 的比率尚不能确定。2006 年 10 月, WHO 重新定义了 XDR-TB, 即

MDR-TB 同时对氟喹诺酮类药物耐药, 并且至少对三种注射类二线抗结核药物 (卷曲霉素 (CPM)、卡那霉素 (KAN) 和阿米卡星 (AMK)) 之一耐药⁷。

2006 年一项以南非 KwaZulu-Natal 乡村医院患者菌株为对象的研究鉴定出 53 例 XDR-TB, 占 MDR-TB 病例的 24%⁸。如此高的 XDR-TB 现患率、如此多的患者数量, 而且研究中的 XDR-TB 患者从诊断到死亡的存活时间中位数只有 16 d, 故此事件引起了人们的巨大关注。XDR-TB 最初发现于无结核病史或结核病成功治愈的患者, 认为是院内传播导致。而该研究中病例的另一与众不同处是: 这些患者均为人类免疫缺陷病毒 (HIV) 阳性。上述报道只是一个局部地区事件, 南非 XDR-TB 的真正范围还不能确定。

随着分型方法的进步, 分子流行病学研究为药物敏感或耐药的结核病疾病动力学提供了新的研究方法⁹。到目前为止, XDR-TB 菌株的唯一分型信息是来自伊朗的 12 个患者的报告, 该报告清晰的显示了哈勒姆和中非印度-3 型菌株 (Haarlem and East African Indian-3) 的传播链条¹⁰。

本研究的目的是用分子流行病学方法研究南非 XDR-TB 结核分枝杆菌菌株的基因型多样性, 以确定 XDR-TB 主要是获得性 (继发耐药) 的, 还是传播性的 (原发耐药)。

材料和方法

选例

南非的国家政策是用涂片镜检作为结核病诊断和治疗监控的指标。只有对可能发展成为 MDR-TB 的高危患者 (如复治患者) 才采取分枝杆菌培养。而是否做一线和二线药物的药敏试验则根据主治医师的要求或某些特殊地方政策而定。

2005 年 6 月至 2006 年 12 月间的所有 MDR-TB 分离株均提交到约翰内斯堡的国家健康实验室服务部 (NHLS) 结核病参比实验室, 本研究中的样品即来源于此实验室。该实验室是南非能够检测二线耐药的政府设施。根据制造商的产品使用说明, 用 BACTEC 460 或 BACTEC 12B 培养基 (Becton Dickinson 诊断系统, Sparks, MD, USA) 的间接药敏实验程序作为二线药物耐药检测方法。二线药物耐药检测的药物为氧氟沙星 (OFX) (2.0 μg/ml), KAN (5.0 μg/ml) 和乙硫异烟胺 (ETH) (2.5 μg/ml)。因为 CPM 还未在南非国内应用, AMK 易与其他氨基糖甙类制剂

(如 KAN) 产生交叉耐药, 对氨基水杨酸的检测还没有统一的指南, 故 NHLS 没有检测所有的二线药物。由于南非回顾性资料收集非常困难, 所以获得的患者信息只有性别、年龄和样本来源的门诊部或医院。

本研究通过了 Witwatersrand 大学人类研究伦理委员会的伦理学审查。

间隔区寡核苷酸分型法 (Spoligotyping)

每一个 MDR-TB 分离株的热灭活的 BACTEC 460 或 BACTEC 12B 培养样品均由 NHLS 提供。只有第一份热灭活培养样品用于基因型分型; 其他所有后续的热灭活培养物均不用于分析。Spoligotyping 操作根据国际标准化程序进行¹¹。所用商品化试剂订自 Isogen 生物科学 BV 公司 (荷兰 Maarssen)。为评价实验室污染是否影响基因分型数据的解释, 随机抽取 13 个患者的连续分离株进行 Spoligotyping 分型, 同一患者结果均一致。

最终得到的 Spoligotype 分型结果用 SpolDB4^{*} 数据库进行基因型家族归类¹²。获得的样品量不足以进行限制性片段长度多态性分析。

结 果

来自南非 9 省中 7 省的 2005 年 6 月至 2006 年 12 月的 699 例患者中, 共获得 845 株分离株用于二线药物耐药检测 (图 1)。其中 146 例 (21%) 为单一二线药物耐药, 113 例 (16%) 为对两种或三种二线药物耐药 (图 2)。41 例对 KAN 和 OFX 耐药, 为 XDR-TB (图 2)。这些病例组成一个研究队列。XDR-TB 患者的平均年龄 37 岁 (中位数 36, 28~54); 66% 的患者为男性。

为确定 XDR-TB 的人群组成, 对上述 41 例 XDR-TB 分离株进行 Spoligotyping 分型。共分出 17 个 spoligotype 型别 (图 3)。其中 31 株 (76%) 与已知的 spoligotype 型相匹配, 为国际上已鉴定基因型家族中的 7 个 (图 3)。其中北京基因型家族有 14 株 (34%), 是最大的一型。其余菌株分别为拉丁美洲—美国—地中海 (LAM) 家族 (LAM4 和 LAM9 STs)、东非—印度 (EAI1) 家族 (EAI1_SOM ST48 和 EAI_SOM ST 806)、T 家族 (T1、T2 和 T3)、H 家族 (H1 和 H3) 以及 S 和 X3 家族 (图 3)。另有 10 株与 SpolDB4 数据库中储存的 spoligotype 型别均不匹配。

为确定 XDR-TB 是原发性感染还是获得性的, 分型的结果与每一个菌株的地理区域进行匹配。41



图1 南非地图。发现 XDR-TB 的南非省份及每个省发现的 XDR-TB 患者数和获得的 MDR-TB 分离株数。
XDR=严重耐多药; TB=结核; MDR=耐多药。

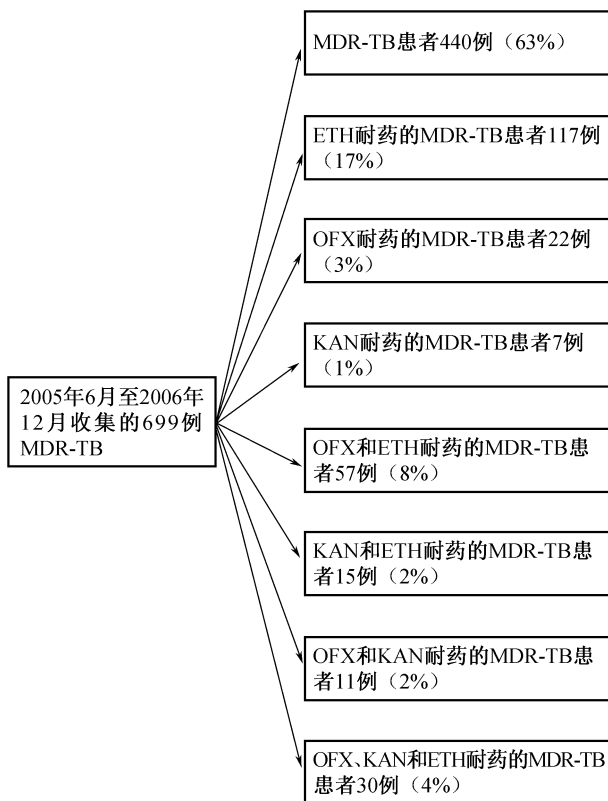


图2 699 例 MDR-TB 患者的二线药物药敏试验结果
MDR=耐多药; TB=结核; ETH=乙硫异烟胺; OFX=氧氟沙星; KAN=卡那霉素; XDR=严重耐多药; DST=药敏实验。

例 XDR-TB 患者来自 4 个省的 16 家医疗机构。这些医疗机构位于不同的地理位置，服务于其附近的患者。因此就诊于不同医疗机构的患者之间存在流行病学联系的可能性很小。所以 41 个患者中 26 人 (63%) 的菌株为来自不同地理区域的特有利型，推测为获得性严重耐多药 (图 3)。来自 5 个医疗机构的其余 15 人分型结果成簇，表明 XDR-TB 的传播 (图 3)。然而，假设每一簇病例的最初来源病例为获得性耐多药，那么推测研究队列中有 31 例 (75%) 患者为获得性 XDR-TB。

讨论

本研究第一次证明了南非 MDR-TB 病例中，XDR-TB 占有相当大的比例。由于本研究收集的大部分病例是在南非发现 XDR-TB 之前⁸，当时主治医师对严重耐多药缺少了解，可能不会对 MDR-TB 样本常规进行二线药物的药敏试验，故本文计算出的 XDR-TB 比例可能低于实际的比例。

本研究还加强了对高比例 MDR-TB (14%) 的关注，它们对 XDR-TB 的单一标志药物 (OFX 或 KAN) 耐药。结核杆菌的耐药是由于基因组中突变的积累造成的，所以这些“前 XDR-TB”菌株如果不被恰当的治疗，极易发展成为严重耐多药。

Spoligotype 家族	亚支/ST	n(%)	Spoligotype 型别	省份	分离株 n	医疗机构 n
Beijing	1	14(34)		N. Cape	5	4
				N. West	4	3
				Limpopo	3	1
				Gauteng	2	1
LAM	LAM4/60	3(7)		Gauteng	2	2
	LAM9/42	2(5)		Limpopo	1	1
EAI1	EAI1_SOM/48	2(5)		Gauteng	2	2
	EAI1_SOM/806	2(5)		Gauteng	2	2
T	T1/53	1(2)		N. West	1	1
	T2/52	1(2)		Limpopo	1	1
	T3/37	1(2)		Gauteng	1	1
H	H1/47	1(2)		N. West	1	1
	H3/50	1(2)		Gauteng	1	1
X	X3/92	1(2)		N. West	1	1
S	71	1(2)		N. West	1	1
不在 SpolDB4 数据库内	A 型, 可能 H 型	6(14)		N. West	6	1
		1(2)		Gauteng	1	1
		1(2)		Gauteng	1	1
	可能 LAM 型	1(2)		Limpopo	1	1
	可能 LAM 型	1(2)		Limpopo	1	1
合计		41			41	

XDR-TB=严重耐多药结核; ST=Spoligotype (间隔区寡核苷酸); N Cape=北开普敦省; N West=西北省; LAM=拉丁美洲地中海家族; EMI=东非印度

图 3 XDR-TB Spoligotype 家族列表, 显示在医疗机构确认的 Spoligotype 型别及数量

本研究发现 OFX 耐药比例较 KAN 耐药比例高, 因为氟喹诺酮类药物 (FQs) 广泛应用于治疗其他疾病 (如腹泻和尿路感染)¹³。相比较而言, 临床上应用 KAN 治疗其他感染有一定限制。

菌株的 Spoligotyping 分型显示大量不同菌株发展成为 XDR-TB。这些 XDR-TB 菌株至少涵盖了 7 个不同的基因型家族, 其中北京基因型占全部菌株的 34%。在以前的研究中, 北京基因型与耐药相关¹⁴, 且发现其在南非 Western Cape 的耐药结核病的儿童中比例过高¹⁵。所研究省市的北京家族在非 XDR-TB 中的流行尚不知晓, 但来自 Western Cape 一个市区研究组的资料显示为 17%¹⁶。因此本研究中 XDR-TB 人群中也有北京基因型的比例过高现象。

Spoligotyping 数据分析表明南非的多数 XDR-TB 病例 (63%) 为获得性严重耐多药, 因为特定的地理位置存在特有的 Spoligotype 型。假设每一簇 (在一个特定的地理背景下) 都来源于一个获得性严重耐多药的病例¹⁷, 那么估计获得性 XDR-TB 的比例应为 75%。如此高水平的获得性严重耐多药的一个原因可能是南非大量的 MDR-TB 患者缺少恰当的治疗。一份最近的研究显示 30% 的患者在治疗前 6 个月中不能得到正确的治疗, 而在后期治疗中这种现象更加普遍²。获得性耐药不利于国家结核病规划的顺利实施, 必须采取措施来阻止这一潜在难治性疾病的传播。

本研究也引起了对 XDR-TB 传播的关注, 发现它可能在社区和/或医疗机构中的患者之间传播。一个可能的传播例子是就诊于 North West 省同一家医院的 6 例 XDR-TB 患者的菌株为同一型结核菌株 (先前未描述的 Spoligotype 型 (A 型))。另一个可能的传播例子是来自 North West 省同一医疗机构的两个患者的分离株均为北京基因型。该省分析的所有 XDR-TB 菌株均来自金矿医院或矿区的医疗机构, 矿区典型的拥挤的工作和居住环境导致传播的危险性增高, 因此上述情况下, 传播可能起着更加重要的作用。另外还有 3 个可能的传播例子: 分离自两个或更多就诊于同一医疗机构的 XDR-TB 患者为同一菌株 (具有相同的 Spoligotype 型)。然而, Spoligotyping 的分辨率较低, 不能在所有情况下界定传播, 对于北京基因型菌株更是如此。在以后的研究中, 应用高分辨率的分型方法更加重要, 如 IS6110 DNA 指纹印记法或分枝杆菌散在重复单位分型法, 以便精确的量化 XDR-TB 流行在传播中的作用。

南非的第一例 MDR-TB 发现于 1985 年¹⁹。自那之后, 该国的 MDR-TB 的病例数就稳定增长¹。这种情况在 XDR-TB 应该尽量避免, 因为大约有 16.2% 的 15~49 岁之间的南非人是 HIV 阳性²⁰, 而 HIV 和 TB 的相伴流行将使 XDR-TB 成为国家乃至全球结核控制的潜在灾难。加强传染的控制对于限制耐药疾病的传播非常重要, 因为 MDR-TB 或 XDR-TB 患者经常需要返回医院延长治疗, 从而增加接触其他患者和医务工作者的机会, 例如发生在 KwaZulu Natal 的院内感染就是这种情况⁸。未确诊的耐药结核患者也对社区造成一定危险。快速诊断、标准化和精确的药敏试验、菌株的分子流行病学分析和对所有类型结核病的有效治疗对于战胜这一结核病新形式的流行都非常关键。

(郑晓静 张宗德 译 何广学 审校)

Acknowledgements

This work was supported by the South African Medical Research Council, the National Health Laboratory Services Research Trust and the University of the Witwatersrand Health Sciences Faculty Research Committee. The authors would like to thank the staff of the Tuberculosis Referral Laboratory, National Health Laboratory Services, Johannesburg, for their assistance.

References

- 1 World Health Organization, International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Geneva, Switzerland; WHO, 2004. http://www.who.int/tb/publications/who_hm_tb_2004_343/en/ Accessed August 2007.
- 2 Holtz T H, Lancaster J, Laserson K F, et al. Risk factors associated with default from multidrug-resistant tuberculosis treatment, South Africa, 1999–2001. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006; 10: 649–655.
- 3 Bifani P J, Mathema B, Liu Z, et al. Identification of a W variant outbreak of *Mycobacterium tuberculosis* via population-based molecular epidemiology. *JAMA* 1999; 282: 2321–2327.
- 4 van Rie A, Warren R M, Beyers N, et al. Transmission of a multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strain resembling ‘strain W’ among noninstitutionalized, human immunodeficiency virus-seronegative patients. *J Infect Dis* 1999; 180: 1608–1615.
- 5 Toungousova O S, Mariandyshev A, Bjune G, et al. Molecular epidemiology and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the Archangel prison in Russia: predominance of the W-Beijing clone family. *Clin Infect Dis* 2003; 37: 665–672.
- 6 Centers for Disease Control and Prevention. Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with extensive resistance to second-line drugs—worldwide, 2000–2004. *MMWR* 2006; 55: 301–305.
- 7 World Health Organization. WHO media report. WHO Global Task Force outlines measures to combat XDR-TB worldwide. Geneva, Switzerland; WHO, 2006. http://www.who.int/media_centre/news/notes/2006/np29/en/index.html Accessed August 2007.
- 8 Gandhi N R, Moll A, Sturm A W, et al. Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients

- co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. *Lancet* 2006; 368: 1575–1580.
- 9 Mathema B, Kurepina N E, Bifani P J, et al. Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 658–685.
 - 10 Masjedi M R, Farnia P, Sorooch S, et al. Extensively drugresistant tuberculosis: 2 years of surveillance in Iran. *Clin Infect Dis* 2006; 43: 841–847.
 - 11 Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 907–914.
 - 12 Brudey K, Driscoll J R, Rigouts L, et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol* 2006; 6: 23.
 - 13 Grimaldo E R, Tupasi T E, Rivera A B, et al. Increased resistance to ciprofloxacin and ofloxacin in multidrug-resistant mycobacterium tuberculosis isolates from patients seen at a tertiary hospital in the Philippines. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001; 5: 546–550.
 - 14 Centers for Disease Control and Prevention. European concerted action on new generation genetic markers and techniques for the epidemiology and control of tuberculosis. Beijing/W genotype *Mycobacterium tuberculosis* and drug resistance. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 736–743.
 - 15 Marais B J, Victor T C, Hesselning A C, et al. Beijing and Haarlem genotypes are overrepresented among children with drugresistant tuberculosis in the Western Cape Province of South Africa. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3539–3543.
 - 16 Richardson M, van Lill S W, van der Spuy G D, et al. Historic and recent events contribute to the disease dynamics of Beijing-like *Mycobacterium tuberculosis* isolates in a high incidence region. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002; 6: 1001–1011.
 - 17 Small P M, Hopewell P C, Singh S P, et al. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods. *N Engl J Med* 1994; 330: 1703–1709.
 - 18 van Rie A, Enarson D. XDR tuberculosis: an indicator of publichealth negligence. *Lancet* 2006; 368: 1554–1556.
 - 19 Weyer K, Groenewald P, Zwarenstein M, et al. Tuberculosis drug resistance in the Western Cape. *S Air Med J* 1995; 85: 499–504.
 - 20 Shisana O, Rehle T, Simbayi L C, et al. South African National HIV Prevalence, HIV Incidence, Behaviour and Communication Survey, 2005. Cape Town, South Africa; Human Sciences Research Council Press, 2005.

化疗使得结核病疫情下降：摩洛哥案例分析

The decline of tuberculosis epidemics under chemotherapy: a case study in Morocco

C. Dye, * S. Ottmani, * L. Laasri, † N. Bencheikh†

* World Health Organization, Geneva, Switzerland; † National Tuberculosis Control Programme, Direction de l'Epidémiologie et de Lutte Contre les Maladies, Division des Maladies Transmissibles Services des Maladies Respiratoires, Rabat, Morocco

摘要

背景：摩洛哥从 20 世纪 90 年代初期就开始实施世界卫生组织 (WHO) 推荐的 DOTS 策略，但在 1996—2005 年间结核病人报告率的年递减率仅为 3%~4%。以目前的疫情下降趋势，到 2050 年 (即实现全球消灭结核病的目标年)，摩洛哥仍将新发生 1 万例以上的结核病人。

方法：对 1996—2005 年间国家结核病控制规划报告的病人，按年龄、性别、临床分型和地区进行分析。以 4 个标准判断观察结果的准确性：统计学有效性、测量精度、生物学合理性，以及不同证据链显示的一致性和关联强度。

结果：城市地区的结核病发病 (病人数和发病

率) 高于农村，成年男性的发病率高于女性。男性结核病人中，痰涂片阳性 (最具传染性) 的比例高于女性。2005 年，在所有痰涂片阳性病人中，15~44 岁的男性占了近一半。男性的发病率下降速度低于平均水平，但女性发病率的下降速度也较预期的慢。

结论：在摩洛哥，城市男性人群是结核病防治的重点对象。就总体而言，应对常规监测数据进行深入研究，以发挥其对结核病控制活动的指导作用。

关键词：结核，肺；痰涂片阳性结核病；摩洛哥；千年发展目标；DOTS 策略

摩洛哥从 1991 年开始实施 WHO 的 DOTS 策略¹，国家结核病控制规划 (NTP) 常规报告的新发病人治愈率也超过了 WHO 提出的 85% 的目标²。从 1991 年开始，已经建立起更多的实验室 (尤其在农村地区)。同时，对诊断程序、处方管理和治疗方案 (短程化疗) 进行了标准化管理，还对药品供应进行了调节，对病人进行全疗程支持，对常规监测资料进行定期分析，并在公立和私立医疗机构之间形成了密切的联系^{1,3,4}。尽管从 90 年代初就加强了结核病控制的力度，但结核病发病率每年仅下降 3%~4%，而其理论预期值为 10%，这也是在欧洲和北美观察到的年递减率^{5,6}。结核病控制的努力与流行病学效果之间不相匹配的现象在印度、斯里兰卡和越南也出现过^{2,7}。为实现结核病控制的千年发展目标，NTP 需要设法提高结核病发

病率的下降速度，以实现到 2015 年结核病患病率和死亡率减半 (与 1990 年相比)，以及到本世纪中叶消灭结核病 (患病率 < 1/10 万人口) 的目标⁸。鉴于此，目前最重要的是要分析结核病控制的努力与流行病学效果之间不相匹配的现象是否真的存在，以及世界各地结核病发病下降缓慢是否有一致或特定的解释。

确定结核病高危人群和结核病人群分布的最好分析方法是实验性研究 (随机对照实验) 和有对照的观察性研究 (即病例对照研究和队列研究)^{9,10}。在本研究中，我们利用了一个不同以往的、几乎未被利用过的结核病流行病学和结核病控制信息资源：医疗机构的常规报告数据。需要注意的是，根据常规报告数据获得的推论可靠性较差，因为常常存在登记数据不完整，导致系统误差 (偏倚) 和随

机误差。但此类数据量庞大，例如 2005 年全球 199 个国家和地区卫生部共向 WHO 报告了 500 余万例结核病人。

因为是将摩洛哥作为一个案例进行分析，因此我们采用了描述性流行病学的标准程序，按地域（地区和省）、人口（年龄、性别、病人类型）和时间（年限）描述结核病人的分布^{9,10}。本研究中最核心的方法学问题是如何判断观察到的疾病分布是真实情况的反映，而不是由于报告偏移或随机误差造成的假象。为此，我们以 4 个标准来评价结论的准确性：满足这些标准，不是为了获得支持结论的证据，而是为了提出有关结核病患人群和患病原因的准确的、更容易测量地推测。根据这些标准，用新的信息，NTP 应当能够更有效地制定他们的结核病预防和控制活动；他们也应当设计更加针对流行病学的研究，来检验结核病控制中出现的问题。

方 法

NTP 收集了摩洛哥 16 个地区 55 个省（代表全部 73 个省）的结核病人和人口信息，并进行汇总编纂。结核病人可以分类为男性、女性，痰涂片阳性、阴性，居住在低人口密度区域（农村）、高人口密度区域（城区），并将结核病人分成 8 个年龄组（0~4, 5~9, 10~14, 15~24, 25~34, 45~54, 55~64 和 ≥65 岁）。前 3 个年龄组，即 0~14 岁组为儿童组。16 个地区中有 6 个地区被归类为城市：卡萨布兰卡（Casablanca），杜卡拉（Doukkala），非斯（Fes），西部地区（Gharb），拉巴特（Rabat）和丹吉尔（Tangiers）。本研究能够获得 1992—2005 年间各省上述每个组别的病人数。人口统计学数据包括 1992—2005 年间摩洛哥按年龄、性别统计的总人口数，以及到 2050 年间的人口数估算值；2004 年人口调查所获得的各地区按年龄、性别统计的人口数；各省和地区 2005 年的总人口数；1994—2004 年间城市和农村人口的增长速度等^{11,12}。此研究是对医疗机构就诊病人的回顾性研究，因而无需获得伦理委员会的同意。

我们根据现有数据，采用 4 个标准评估本研究所观察到的结核病分布的准确性。观察结果应该符合以下条件：（1）统计学有效性：即排除随机误差的影响；（2）测量值的精确性：测量过程标准化以控制系统误差或随机误差；（3）生物学合理性：与现有的关于结核病生物学及其自然史的知识相一致；（4）关联的一致性：有独立的证据可重复或进一步支持该关联，且未发现与之相左的冲突信息。

这种一致性越强越好。

通过对分组数据（根据病人数和人口数计算出来的结核病人报告率）的双变量 logistic 回归分析和对时间趋势的协方差（分类和连续变量）分析，来验证结核病分布的统计学有效性。

结 果

空间分布：结核病人的地区分布

1996—2005 年 10 年间，NTP 中共报告了 401433 例结核病人，其中 2005 年为 26269 例。在国家北部地区，特别是包括卡萨布兰卡（Casa-

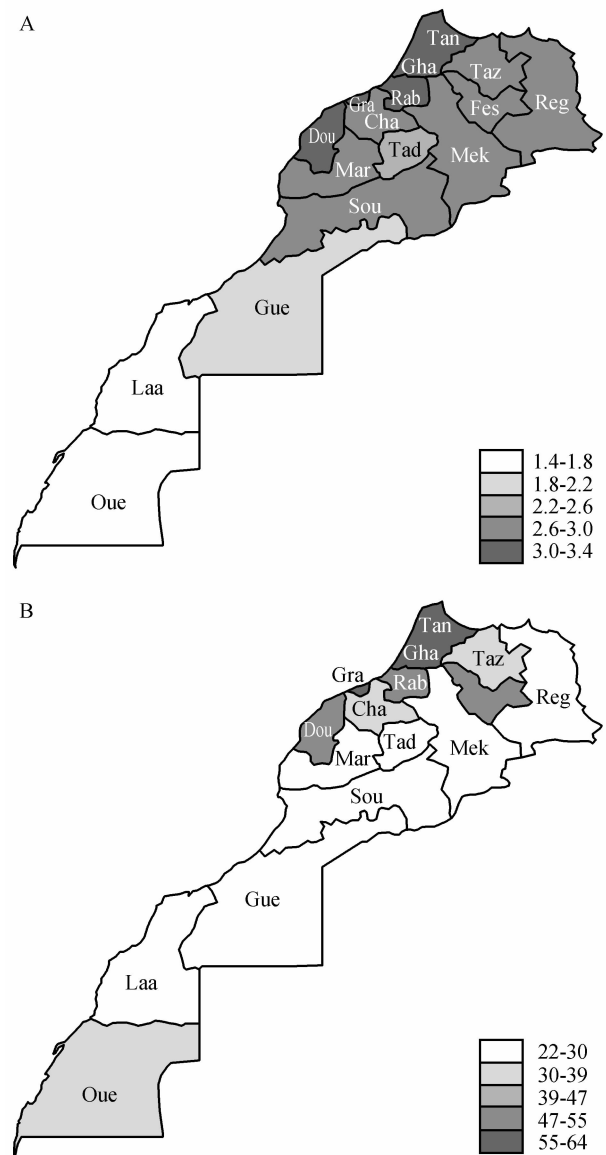


图 1 摩洛哥的 16 个地区地图，并显示以下信息：A) 报告结核病人数的对数值 (log)，B) 2005 年结核病报告率 (/10 万人口)。地区名称以前 3 个字母表示：Oued Ed-Dahab, Laayoune, Souss, Guelmime, Gharb, Chaouia, Marrakesh, Oriental, Grand Casablanca, Rabat, Doukkala, Tadla, Meknes, Fes, Taza, Tangiers。

blanca)、拉巴特 (Rabat) 和丹吉尔 (Tangiers) 等主要城市在内的西北沿海平原地区, 结核病人报告数 (图 1A) 和报告率 (图 1B) 相对较高。2005 年, 6 个城市的结核病 (包括所有类型) 报告率超过了 50/10 万人口; 而其他地区则低于 35/10 万人口 (图 2)。城市和农村地区的结核病报告率在年龄分布上存在差异, 但差异较小。城市地区的结核病报告率, 无论是未经标化的报告率还是年龄标化后的报告率, 均比农村地区高 50%~60%。2005

年 55 个省中有 12 个省的结核病报告率超过 120/10 万人口, 这些省的报告病人数均超过了 500 例。这 12 个省分别为: Al-Fida Derb-Sultan, Moulay Rachid, Ben-Msik, Sidi el-Bernoussi 和 Casa-Anfa (卡萨布兰卡, Casablanca 地区); Al Haouz 和 Essaouira (马拉喀什, Marrakech 地区); Khemiset 和 Sale (Rabat, 拉巴特地区); Fes (非斯, Fes 地区); Assilah 和 Tetouan (丹吉尔, Tangiers 地区)。

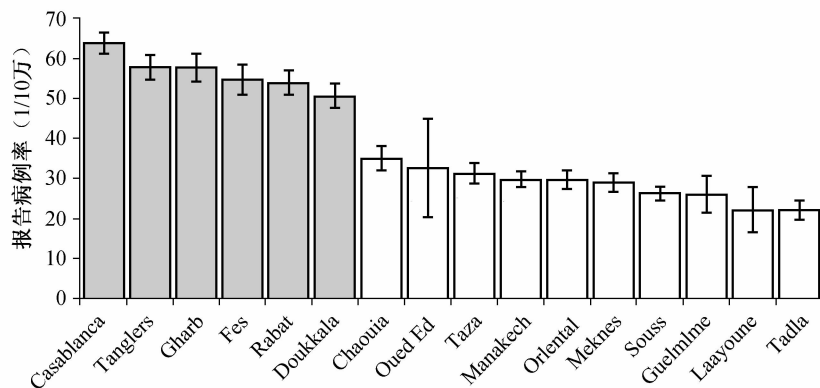


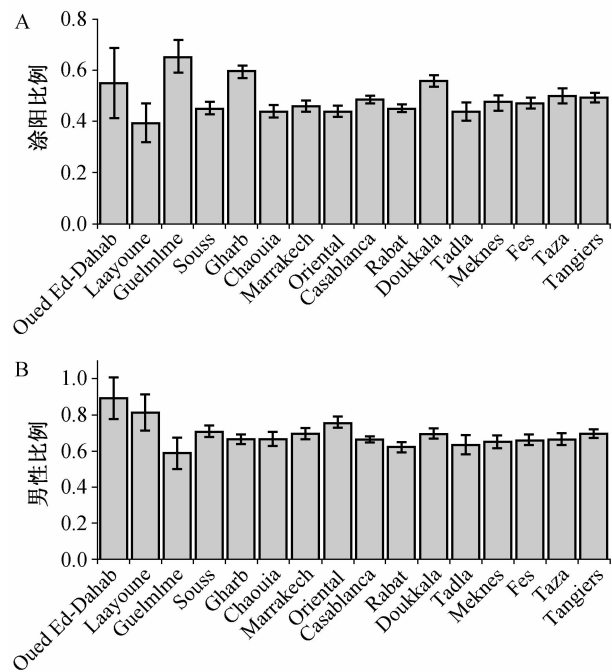
图 2 16 个地区的结核病报告率 (1/10 万人口, 95% 可信限)。灰色阴影条表示病人报告率 > 50/10 万人口 6 个城市地区

3 个证据共同提示, 图 1 真实地显示了摩洛哥的结核病分布情况, 而不是报告偏倚造成的假象。就统计学有效性而言, 随机误差解释不了各省间的分布差异: 各省报告率的 95% 可信限 (CLs) 范围远远小于各省报告率的差异 (图 2)。就测量的精确性和一致性而言, 16 个地区报告的结核病人中痰涂片阳性的比例非常相似 (接近 0.45 的期望值², 图 3A), 病人中的男性比例也很相似 (> 0.5, 图 3B)。就生物学合理性而言, 人口密度高的地区结核病报告率也相应高。人口密度高是一个促进结核病传播的因素 (图 2 中灰色阴影标记的 6 个城市的人口密度为 622 人/km², 而其他地区的人口密度则为 50 人/km²; 对 16 个地区分组数据的 logistic 回归分析, $Z=24$, $P<0.001$)。

人群分布: 结核病人的年龄、性别和病例类型分布

在 2005 年报告的所有结核病人中, 2/3 (67%) 为 15~44 岁年龄组的男性 (41%) 和女性 (26%), 该年龄组人口数约占总人口数的一半 (51%) (图 4A)。报告率最高 6 个省 (图 2) 的病人年龄分布和其他省没有差别 (未列示数据)。

从结核病流行病学来看, 在结核病持续高度传播的地区, 发病率最高的应为年轻人¹³。在摩



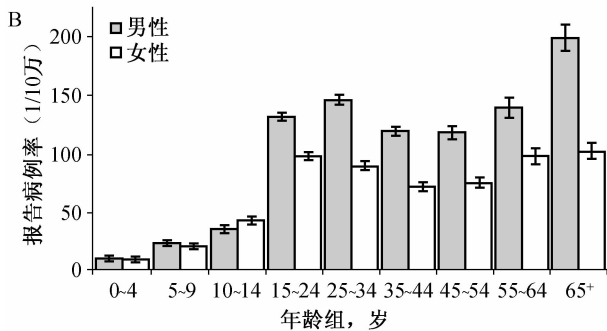
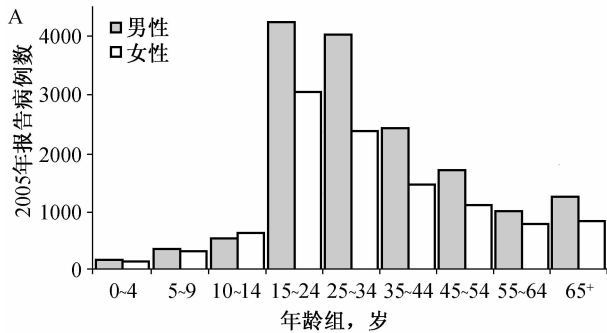
A) 新病人中的涂阳比例。

B) 病人中的男性比例。误差条表示 95% 可信限

图 3 2005 年摩洛哥 16 个地区结核病人诊断和报告的一致性

哥, 中年组 (≥ 55 岁) 和青年组 (15~34 岁, 图 4B) 的结核病报告率相似, 略高于老年组 (≥ 65

岁)。这种年龄分布提示，结核病传播在逐年下降(年轻人中的新感染者减少)。考虑到摩洛哥数十年来的社会经济发展，以及从 20 世纪 90 年代初期即开始大力推行 NTP，这种结果显然是合理的。



A) 病人数以及 B) 报告率来表示。
B 图中的误差条表示 95% 可信限。

图 4 2005 年新发结核病人的年龄分布，用各年龄组的

图 4 显示男性 (≥ 15 岁) 结核病(包括所有类型)报告率高于女性。而且男性病人中的痰涂片阳性比例 (59%, ≥ 15 岁) 也明显高于女性 (42%)。在 1992—2005 年的 14 年间，这种差异均明显存在 (logistic 回归分析, $Z = 96, P < 0.001$)。2005 年，尽管 15~44 岁年龄组的男性占总人口的 26%、其中的结核病人占有所有类型结核病人数的 41%，但结果是这个年龄组男性痰涂片阳性病人占 50%。

时间分布：结核病人报告率变化趋势

摩洛哥在 1991 年引入 DOTS 策略后，导致报告病人数持续上升。从 1996 年起，病人数才开始重现 1991 年以前的下降趋势 (图 5)。在 1996—2005 年的 10 年间，结核病人数的年递降率为 $1.9\% \pm 0.68\%$ (95% 可信限)，结核病报告率的年递降率为 $3.4\% \pm 0.67\%$ 。造成病人数下降和报告率下降差异的主要原因是这一时期每年 1.6% 的人口增长速率。涂阳病人报告率的年递降率为 $3.1\% \pm 0.47\%$ ，与结核病报告率相似。

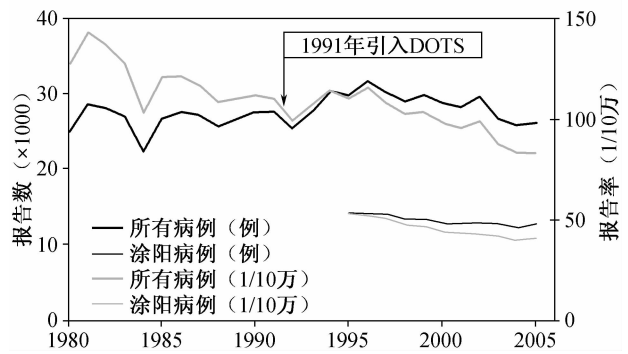
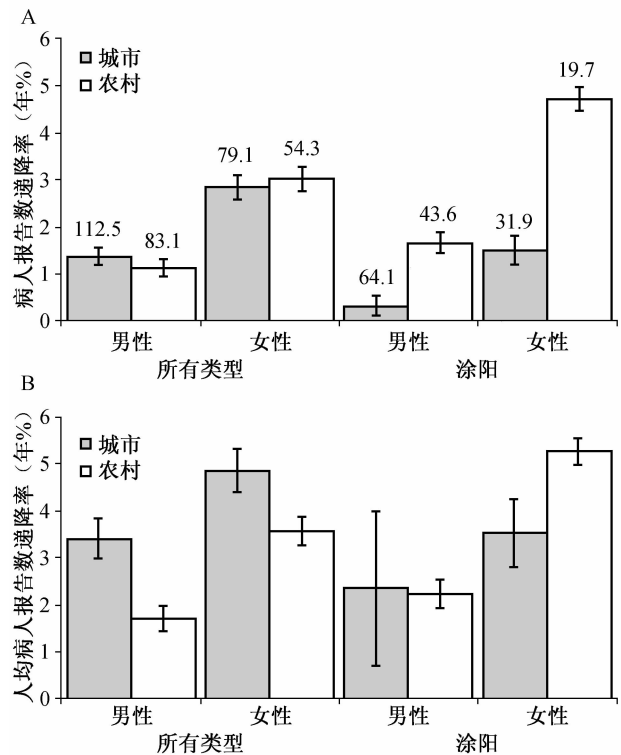


图 5 新发结核病人 (1980—2005) 和涂阳病人 (1995—2005) 报告数变化趋势，用病人数和报告率 (1/10 万人口) 来表示

女性病人数的下降速率较男性为快 (表格中的性别 \times 年龄交互项，图 6A)。这种现象是真实的，而且在成人中更为明显 (表格中结核病人和痰涂片阳性结核病人的性别 \times 年龄 \times 时间的交互项)，同时女童结核病人数的下降也比男童快 ($F = 3.52, P = 0.08$)。



A) 病人报告数，和 B) 报告率的年递降率。误差条形表示 95% 可信限。图 A 中条形上部数值为 2005 年各组别的结核病报告率 (1/10 万人口)

图 6 1996—2005 年所有类型、涂阳、男性和女性、城市和农村地区的结核病

就像预期的那样，儿童 (0~4 岁组) 报告结核病人数的年递降率 ($8.4\% \pm 0.6\%$) 高于成人

(≥ 15 岁组, $1.7\% \pm 0.2\%$), 特别是在城市地区更明显(表格中的城市 \times 年龄 \times 时间交互项)。因此, 1992—2005年间, 经人口统计学标化的病人平均年龄逐步增高(男性41.2~43.9岁, 女性39.0~41.0岁)。城市和农村地区的结核病人下降速率

并无差异($F=0.4$, $P>0.05$, 图6A), 但6个城市地区的痰涂片阳性病人下降速率比其他地区慢($F=28.1$, $P<0.001$, 见图6A和表)。男性痰涂片阳性病人下降速率更低, 每年只有 $0.27\% \pm 0.2\%$ 。

表 1996—2005年摩洛哥结核病人下降速率影响因素的协方差分析

变量来源	所有类型结核病人		涂阳结核病人	
	F 值	P 值	F 值	P 值
年	280.3	<0.001	38.2	<0.001
城市 \times 年	6.8	<0.05	6.5	<0.05
性别 \times 年	16.7	<0.001	0.0	无显著性
年龄 \times 年	24.4	<0.001	7.1	<0.01
城市 \times 年龄 \times 年	111.4	<0.001	0.0	无显著性
城市 \times 性别 \times 年	5.1	<0.05	0.5	无显著性
性别 \times 年龄 \times 年	265.3	<0.001	390.6	<0.001
城市 \times 性别 \times 年龄 \times 年	0.6	无显著性	1.0	无显著性

因变量为全部病人数的自然对数值和涂阳病人数的自然对数值。自变量(变量来源)为连续变量(年)或分类变量: 人口数(城市地区, 农村地区), 年龄(0~14岁, ≥ 15 岁)和性别。在自变量中, \times 表示交互项。为表示不同自变量的重要性, 统计学显著性以常用标准下的概率值表示。***表示 $P<0.001$, **表示 $P<0.01$, *表示 $P<0.05$, NS表示无显著性。F值为自由度为1的偏平方和。

对于城市地区痰涂片阳性病人下降速率相对较慢(图6A), 可以部分地解释为城市人口的快速增长(1994—2004年间, 城市人口增长率为2.1%, 农村地区则为0.6%¹²)。当采用报告率指标控制了人口增长的影响因素之后, 城市和农村地区的报告率下降速率差异在女性减小, 在男性则消失(图6B和图6A)。与之相反的是, 结核病报告率下降速率在城市为快(图6B)。

讨 论

本项关于摩洛哥结核病控制的研究是为了探索下面这个问题: 即从20世纪90年代初开始, 摩洛哥实施了良好的结核病控制规划, 而且综合评价和高治愈率数据也提示控制效果良好, 但病人下降缓慢^{1,2}。本研究在2个方面具有重要影响: 首先, 结核病控制努力和流行病学效果不相匹配的现象在其他国家也同样存在, 在亚洲尤为显著^{2,7}。因此, 就摩洛哥和其他地方而言, 人们可能高估了DOTS策略的预期效果。其次, 我们在利用常规监测数据获得有关结核病分布(如患病人群、发病时间、发病地点, 以及发病原因等)的准确结论方面进行了尝试。这些数据每个国家都有, 而且利用很少。上述结果说明, 到了采取行动的时候了: 按当前的疫情下降趋势, 到2050年, 即全球消灭结核病的目

标年, 摩洛哥仍将发生1万例以上的新病人, 摩洛哥该行动起来了^{8,14}。

摩洛哥的结核病人报告数据提示, 男性不但易患结核病, 而且传播程度也高: 2005年, 15~44岁年龄组男性占总人口数的四分之一, 但占到痰涂片阳性病人的一半, 而且主要居住在6个城市地区。1996—2005年间, 成年男性和男童的结核病人下降均很缓慢。就男性而言, 城市地区的痰涂片阳性病人下降速率比农村缓慢, 但这只能部分地解释为城市人口增长率高。事实上, 也有证据表明, 城市地区的结核病报告率下降速率比农村快, 儿童组尤为明显。这可能提示城市地区的结核病传播下降较快。

根据监测数据, 摩洛哥的男性结核病人多于女性, 这与其他国家的监测与调查结果很相似^{2,15,16}。本研究有2项结果为摩洛哥的新发现, 而且可能适用于其他地区: 即男性结核病人比女性更具传染性(痰涂片阳性); 与农村地区相比, 城市地区男性病人的痰涂片阳性率较高, 且下降更为缓慢。上述结果提示, 城市男性是结核病控制的重点目标人群, 应该采取主动的病人发现措施, 特别是在报告率较高(每年 $>1\%$)的社区更应如此¹⁷。需要开展进一步的研究, 以确定结核病高危人群(年龄, 性别, 居住地, 职业, 人均居住面积, 烟

酒史等), 以及这些因素是否会增加感染机会, 或增加感染者的发病机会。然而, 除居住环境因素外, 男性比女性易感可能还与其他因素有关。因为即使生活在同一环境中, 男童结核病人数量下降较女童为慢。这就提出了一个问题: 即性别相关的生理学因素是否也会影响发病。

城市男性还不是结核病控制的唯一难题。在我们所调查的人口亚群中, 结核病报告率的下降速率均比预期的缓慢。1996—2005 年间, 农村女性的结核病报告率下降最快, 但其年递降率也只有 5%。实现递降率翻番应该是可能的^{5,18}。一种尚在调查研究中的可能解释是: 在摩洛哥, 没有充分地做到及时诊断和治愈结核病人, 因而不能像预期的那样切断传播, 控制发病率。结核菌的持续传播与治疗失败和耐药有关, 我们知道摩洛哥存在数百例慢性病人 (主要是城市男性, 未发表的 NTP 数据)¹⁹⁻²¹。还需要对治疗转归按照年龄、性别、病例类型以及地区进行进一步分析。

由于本研究基于常规的结核病报告数据, 因此我们无法排除诊断和报告偏倚的影响^{22,23}。这些偏倚有时 (但不经常) 可能会有利于男性病人的纳入²⁴, 但我们已经试图以 4 个标准对观察结果的有效性进行评价——统计学有效性、测量精度、生物学合理性以及一致性或可重复性, 尽可能减少误判风险。男性痰涂片阳性病人数多于女性这一结果具有较高统计学显著性。如果在诊断过程中存在一种有利于男性而不利于女性的偏倚, 那么在全国 16 个地区同时发生这种偏倚就太令人惊奇了。这也从另一方面说明实验室诊断的高精准度和一致性。说到生物学合理性, 结核病诊断过程有利于男性的思想受到了以下结果的冲击: 即女性病人中有许多肺外结核病人¹, 而肺外结核的诊断难度要大; 在公立医院因呼吸道疾患就医的女性人数多于男性¹。此外, 考虑到公立医院和私立开业医生之间的密切合作¹, 监测报告中遗漏大量病人的可能性不大。然而, 采用这些有效性判断标准并不能提供新的证据, 更多的证据也仅仅是强化了假说。当根据这个最佳假说采取行动的时候, NTP 应不断检验证据的正确性。

(刘青译 贺晓新校 王雪静审)

Acknowledgements

The authors thank B Williams for providing the mapping software used to draw Figure 1 and K Lönnroth for comments on the manuscript. Financial support was provided by the WHO and the National Tuberculosis Control Programme

of Morocco.

References

- Ottmani S, Laasri L, Chaulet P, et al. La tuberculose et la lutte antituberculeuse au Maroc de 1980 à 1998. Direction de l'Epidémiologie et de la Lutte Contre les Maladies. Bulletin Epidémiologique 1998; 35: 2-12.
- World Health Organization. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. Geneva, Switzerland: WHO, 2007.
- Murray J F, Pio A, Ottmani S. PAL: a new and practical approach to lung health. Int J Tuberc Lung Dis 2006; 10: 1188-1191.
- World Health Organization. Respiratory care in primary care services—a survey in 9 countries. WHO/HTM/TB/2004.333. Geneva, Switzerland: WHO, 2004.
- Styblo K. Epidemiology of tuberculosis. 2nd ed. The Hague, The Netherlands: KNCV Tuberculosis Foundation, 1991.
- Dye C, Garnett G P, Sleeman K, Williams B G. Prospects for worldwide tuberculosis control under the WHO DOTS strategy. Directly observed short-course therapy. Lancet 1998; 352: 1886-1891.
- Vree M, Duong B D, Sy D N, Co N V, Borgdorff M W, Cobelens F G J. Tuberculosis trends, Vietnam. Emerg Infect Dis 2007; 13: 332-333.
- Dye C, Maher D, Weil D, Espinal M, Raviglione M. Targets for global tuberculosis control. Int J Tuberc Lung Dis 2006; 10: 460-462.
- Bonita R, Beaglehole R, Kjellstrom T. Basic epidemiology. 2nd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2006.
- Streiner D L, Norman G R, Blum H M. PDQ epidemiology. Toronto, ON, Canada: B. C. Decker, 1989.
- United Nations Population Division. World population prospects: the 2002 revision. New York, NY, USA: UN, 2003.
- Haut Commissariat au Plan, Royaume du Maroc. Publication des résultats démographiques et socio-économiques du recensement général de la population et de l'habitat 2004. Rabat, Maroc: Haut Commissariat au Plan, 2004. <http://www.hcp.ma> Accessed June 2007.
- Rieder H L. Epidemiologic basis of tuberculosis control. 1st ed. Paris, France: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, 1999.
- Stop TB Partnership/World Health Organization. The global plan to stop TB, 2006-2015. Geneva, Switzerland: Stop TB Partnership, 2006.
- Borgdorff M W, Nagelkerke N J, Dye C, Nunn P. Gender and tuberculosis: a comparison of prevalence surveys with notification data to explore sex differences in case detection. Int J Tuberc Lung Dis 2000; 4: 123-132.
- Long N H, Diwan V K, Winkvist A. Difference in symptoms suggesting pulmonary tuberculosis among men and women. J Clin Epidemiol 2002; 55: 115-120.
- Golub J E, Mohan C I, Comstock G W, Chaisson R E. Active case finding of tuberculosis: historical perspective and future prospects, Int J Tuberc Lung Dis 2005; 9: 1183-1203.
- Dye C. Epidemiology. In: Davies P D O, ed. Clinical tuberculosis. 3rd ed. London, UK: Arnold, 2003.
- World Health Organization. Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Report no. 2. Geneva, Switzerland: WHO, 2000.
- El Baghdadi J, Remus N, Laaboudi L, Benslimane A. Chronic cases of tuberculosis in Casablanca, Morocco. Int J Tuberc Lung Dis 2003; 7: 660-664.
- Ottmani S E, Zignol M, Bencheikh N, Laasri L, Chaouki N, Mahjour J. Results of cohort analysis by category of tuberculosis retreatment cases in Morocco from 1996

- to 2003. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006; 10: 1367–1372.
- 22 Khan M S, Dar O, Sismanidis C, Shah K, Godfrey-Faussett P. Improvement of tuberculosis case detection and reduction of discrepancies between men and women by simple sputum submission instructions: a pragmatic randomised controlled trial. *Lancet* 2007; 369: 1955–1960.
- 23 Thorson A, Hoa N P, Long N H, Allebeck P, Diwan V K. Do women with tuberculosis have a lower likelihood of getting diagnosed? Prevalence and case detection of sputum smear positive pulmonary TB, a population-based study from Vietnam. *J Clin Epidemiol* 2004; 57: 398–402.
- 24 Balasubramanian R, Garg R, Santha T, et al. Gender disparities in tuberculosis: report from a rural DOTS programme in South India. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004; 8: 323–332.

核酸扩增试验诊断结核淋巴结炎：系统性回顾

Nucleic acid amplification tests for the diagnosis of tuberculous lymphadenitis: a systematic review

P. Daley, * S. Thomas, * M. Pai†

* Christian Medical College, Vellore, India; † McGill University, Montreal, Quebec, Canada

摘要

资料背景：淋巴结炎是结核病最常见的肺外表现。常规诊断方法，例如涂片镜检和培养，对于结核性淋巴结炎的诊断都不是非常精确。核酸扩增试验（NAAT）可以提供有益的辅助诊断。

目的：通过系统回顾，评价 NAAT 方法诊断结核性淋巴结炎的实际效果。

实验设计：我们进行了文献检索，发现 36 篇文章中包含了 49 个 NAAT 与结核性淋巴结炎参比标准的比较研究。每一个研究估计的灵敏度和特异性均采用树状图和概括性接收器工作特性曲线（SROC）来体现。

结果：所有研究的质量大致相当，但很多研究的报告质量较差。各研究估计的 NAAT 的灵敏度（2%~100%）和特异性（28%~100%）差异很

大，可能是由于研究的人群、质量和检测技术不同所致。商业化的 NAAT 试验应用 20 μ l 以上的模板，包含差异分析的报告提供了较高的诊断精确性。双盲、模板体积和差异分析可能解释一些结果不同的原因。

结论：检测结核性淋巴结炎的 NAAT 研究所获得的结果高度可变，而且不一致，不可能成为临床确诊的指标。研究报告未标准化，而且通常包含的信息量不足。由于可能存在假阳性和假阴性结果，因此 NAAT 方法需与常规的方法联合应用，对临床可疑病例需依具体情况判断。

关键词：结核；淋巴结炎；核酸；扩增技术；NAAT；PCR

淋巴结炎是结核病的最常见肺外表现¹。随着有证据表明短程化疗可治愈结核病²患者、间歇疗法也是有效的³，目前关注的焦点已经转移到如何有效地诊断和病例发现的难题上。

在大多数结核病流行的国家，结核性淋巴结炎主要依靠临床诊断，其原因是缺乏有效的实验室检测方法，特别是分枝杆菌培养未广泛开展。患有淋巴结炎的患者由于所处环境和人群的不同，预测结核病的可能性有相当大的差异。临床表现是非特异的，尤其在 HIV 感染者中，诊断可能是错误的。由于结果中可能错误地包含了其他感染性疾病引起的淋巴结炎，导致结核性淋巴结炎的研究结果可能产生偏差。

目前临床病例是根据胸部 X 线检查异常或临床评分系统诊断结核性淋巴结炎⁴。然而，诊断原则复杂，而且需要重复进行淋巴结取样⁵。

传统的实验室技术，例如涂片显微镜检查，对于结核性淋巴结炎的诊断通常没有帮助。例如，对来自 106 例通过临床表现、放射检查和微生物学方法诊断为结核性淋巴结炎的患者 120 份样本进行抗酸染色检查，结果显示齐-尼氏染色法的灵敏度为 34%，荧光染色法的灵敏度仅为 23%。

在治疗期间，淋巴结的表现使诊断进一步复杂化。在一篇有关结核病治疗的文献综述中提到，7%的结核病患者持续存在淋巴结肿大，7%的患者出现短暂的淋巴结肿大，14%的患者在治疗过程中

出现新的淋巴结肿大，21%的患者在治疗完成后仍遗留有淋巴结肿大²。109例 HIV 阴性的结核性淋巴结炎病例中，有25例显示在治疗过程中出现异常的恶化现象⁶。

核酸扩增技术 (NAAT) 在结核病诊断方面的准确度和作用已被广泛地评论⁷⁻⁹。由于每个基因组中存在许多拷贝的靶基因，NAAT 方法应当具有很高的灵敏度；由于设计的引物是针对特异的靶序列，该方法也应具有高度的特异性。NAAT 试验只需一天时间就可以得到结果。基于以上原因，可以认为 NAAT 显著改进了目前诊断技术的不足。我们对 NAAT 方法诊断结核性淋巴结炎的准确率进行系统地评价以指导其在临床上的意义和应用。

方 法

搜索策略和选择标准

下列为诊断试验评价的标准方法^{10,11}：应用 NAAT 对结核病进行诊断的系统综述^{7,12}的文章数据库是由一个作者 (MP) 完成。数据库包含 369 篇文章，搜索的电子数据库包括：Medline (1985—2002)，EMBase (1988—2002)，Web of Science (1990—2002)，BIOSIS (1993—2002)，Cochrane Library (2002) 和 LILACS (1990—2002)。搜集的文章时间是到 2002 年 8 月。在 Medline 中的搜索字符串是：(结核病 (MESH) 或结核病 (tw) 或结核分枝杆菌 (MESH) 或结核分枝杆菌 (tw)) 和 (核酸扩增技术 (MESH) 或扩增 (tw) 或扩增 (tw) 或聚合酶链反应 (MESH) 或 PCR (tw) 或连接酶链反应 (MESH) 或扩增产物 (tw) 或 Roche (tw) 或 Gen-Probe (tw) 或 LCx (tw) 或 Abbott (tw) 或 BDProbeTec (tw) 或分子诊断技术 (MESH)) 和 ((灵敏度 and 特异性 (MESH)) 或灵敏度 (tw) 或诊断 (SH) 或诊断应用 (SH) 或特异性 (tw) 或准确度 (tw) 或预示值 (tw)) 不包括 (动物 (MESH) 不包括人 (MESH)) 也不包括 (病例 (ti) 或报告 (ti))。

作为搜索的主要部分，还包括：专家咨询，所列参考文献的搜集、研究，以及公司未发表的商业测试数据。

作为主要搜索的补充，将 ‘diagnosis’ 和 ‘broad/sensitive’ 关键词应用临床查询过滤程序，在 Medline 中从 2002 年 8 月到 2007 年 7 月进行补充搜索。补充的关键词：和 (‘淋巴结炎’ (MeSH) 或 ‘淋巴结’ (MESH) 或 ‘淋巴疾病’

(MeSH))。此外，对 1990 年到 2006 年的《印度结核病杂志》进行手工检索。只搜索英文文献。

纳入标准如下：

- 从疑似结核性淋巴结炎患者获得淋巴结样品进行检测的研究。
- 对 NAAT (无论是商业试剂盒还是自制试剂盒) 和参考标准 (后面有定义) 进行比较的研究。
- 对 10 个或 10 个以上的标本进行数据分析的研究。

未满足上述标准的文献被去除。

数据提取

建立数据提取的形式，在亚组水平对鉴定的研究进行分析。数据提取是由两个人 (PD 和 ST) 独立完成的。观测者之间数据提取的不同处被记录，并通过讨论达成一致 (文章中未显示)。包括一个以上的 NAAT 与参考标准的比较研究，或者包括一种以上标本类型的研究被分开研究。抑制结果被认为是无效，而不是阴性。一项研究被排除¹³，以为它将参考标准定义为对治疗的反应，但并不是所有病人都接受了治疗。一项研究比较了细针抽吸和活组织检查，但只报告了四个活检标本¹⁴。当结果同时有患者和样本报告时，只提取了样本数据，因为大多数研究报告的数据都是样本而不是患者。

两个作者依据所用的 NAAT 类型、人群抽样、纳入标准、研究方法、参考标准、实验室操作和结果 (灵敏度和特异性，对每个比较进行了计算) 独立地提取信息。

研究质量的评价

应用诊断试验评价工具 QUADAS 对每项研究的质量进行评价。QUADAS 工具评价诊断准确性研究的质量已经得到证实¹⁵。这一评价工具包含 14 个问题，回答为是、否、不清楚。其中的 11 个标准被认为与这个综述有关，被包含在数据提取表中。

数据综合方法

各研究的设计、患者纳入的标准、参考标准和应用的 NAAT 不同。为了阐述不同研究中参考标准的差异，按照有效性建立如下参考标准：

培养→涂片→组织学检查→对治疗的反应

使用多个参考标准的研究只应用最有效的参考

标准进行报告。三项只有临床诊断的研究被排除，因为与实验室为基础的参考标准不好比较¹⁶⁻¹⁸。

以参考标准为对照，NAAT 的灵敏度（真阳性率）定义为真阳性（可分为真阳性和假阴性），特异性（1-假阳性率）定义为真阴性（可分为真阴性和假阳性）。

研究报道的灵敏度和特异性包括 95% 的置信区间（CI），都用树状图表示。研究中所有准确率估计值的不均一性应用 I^2 统计方法进行评价。这种统计方法描述了由于不均一性而不是样本错误（机率）造成的估计值差异性的百分率¹⁹，比值 >50% 可以认为不均一性是真实的。

诊断的优势比（DOR）是评价检测价值的一种方法，其定义是患病个体中阳性检出的几率（可与无病个体中阴性检出几率相区别）²⁰。应用 Der-Simonian-Laird 随机效应 meta 分析计算研究的 DOR。应用 Meta-DiSc 软件 1.4 版本²¹ 进行数据总结。

在总结性操作曲线上（SROC）也总结了灵敏度和特异性的估计值，其纵轴为每个研究的灵敏度，横轴为 1-特异性。全球性评价证明该技术的诊断表现在灵敏度和特异性之间达到了某种平衡。对称曲线提示研究之间的准确率的差异是由于研究开始时所采用的方法不同所致。在该曲线 1.0（100%）以下的面积表示完全鉴别的能力。

应用 I^2 测量法评价研究的不均一性²³。既然期望得到实际的不均一性数值，我们依照以下预定义的特性进行亚组分析：参考标准的类型（包括培养或不培养），研究设计（横断面研究或病例对照研究），NAAT 和参考标准结果的双盲判定（是或否），所用 NAAT 的类型（商品化试剂盒或自制的试剂盒），所测的样本（细针抽吸或活组织检查），在 NAAT 中应用的模板量（ ≥ 20 或 $< 20 \mu\text{l}$ ），差异分析的应用和 IS6110 作为扩增靶序列。

伦理规范

由于此科研项目不牵涉受试人，因此不需要伦理委员会批准。

结 果

所包括研究的介绍

图 1 显示了研究选择的过程。总体上，综述中包括了 36 篇文章，从中获取 49 套数据（以下称为‘研究’）。49 个研究报道了灵敏度，42 个研究报道了特异性。20 个研究应用商品化 NAAT 试剂盒，

而 29 个应用自制的 NAAT 试剂盒（主要是聚合酶链反应（PCR））。这些研究平均含有 56 份样本（标准差（SD）7，范围 10~286）。表 1 和 2 中显示了每个研究的详细信息。

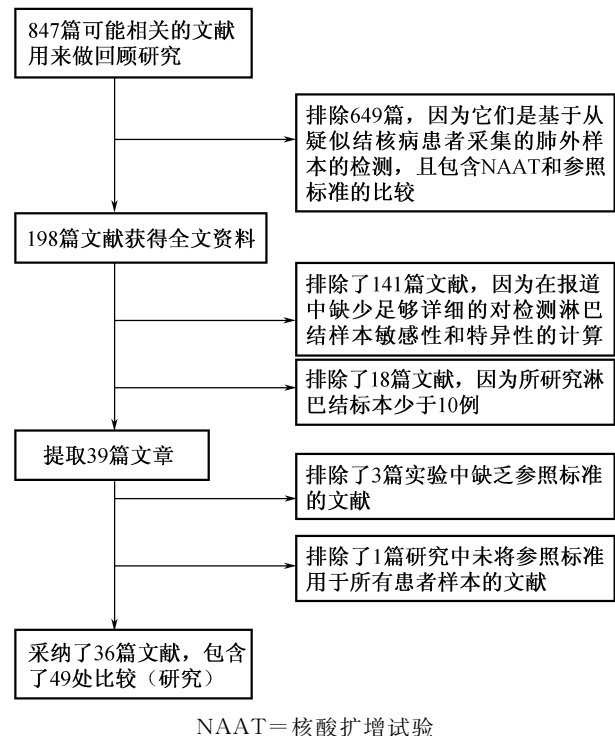


图 1 研究选择的流程图

总的来说，研究是在来自第三保健中心的人群中进行的。80% 的研究采用严格的横断面研究设计，测试的患者具有某些特征（连续地或随机抽样）；另一种研究设计是选择确诊的结核性淋巴结炎病例和健康对照（即一种病例对照方法，能够显示偏倚）。

各研究纳入标准的描述有所不同，一些研究报道仅用‘临床诊断’或者‘淋巴结病’，未详细定义这些术语。

全部研究的质量大致相当，QUADAS 分数为 3~10（平均值 6.13，标准差 0.208，满分为 11）。大多数研究的报告质量较差，对几个关键部分的报告不完整，包括所涵盖的人群，NAAT 和参照标准双盲结果的判定，以及有用信息的矛盾。有经细针抽吸、活组织检查和石蜡包埋检查方法获得的样本，尽管有几个研究没有提供对这些样本分别进行分析的足够信息。

在很多研究中，实验室技术未被很好地报道。例如，仅有 65% 的研究提供足够的信息介绍 NAAT 技术确切的重复性。样本收集至 NAAT 扩增的时间间隔可能影响实验结果，因为核酸易降

Table 1 NAAT 诊断淋巴结核研究的比较

作者、年、国家、参考文献	研究方法	NAAT 类型	报告数 n	敏感度(95%CI)	特异度(95%CI)	QUADAS rating/11
Osores, 2006, Peru ²⁴	Prospective cross-sectional	Roche Amplicor	154	0.58 (0.44-0.71)	0.94 (0.87-0.98)	10
Therese, 2005, India ²⁵	Prospective case control	In-house PCR	44	0.80 (0.28-0.99)	0.62 (0.45-0.77)	4
Schultz, 2005, Germany ²⁶	Retrospective	In-house PCR	53	0.65 (0.49-0.78)	*	5
Pahwa, 2005, India ²⁷	Prospective cross-sectional	In-house PCR	55	0.89 (0.67-0.99)	0.85 (0.65-0.95)	8
Jain, 2005, India ²⁸	Prospective cross-sectional	In-house PCR	98	0.89 (0.83-0.93)	1.0 (0.90-1.0)	5
Chakravorty, 2005, India ²⁹	Prospective cross-sectional	In-house PCR	19	IS6110: 0.60 (0.32-0.84) DevR: 0.47 (0.21-0.73) Combined: 0.67 (0.38-0.88)	IS6110: 0.75 (0.19-0.99) Dev r: 0.67 (0.09-0.99) Combined: 0.75 (0.19-0.99)	8
Leon-Muinos, 2004, Spain ³⁰	Prospective cross-sectional	Abbott LCx ^t	101	0.70 (0.46-0.88)	0.86 (0.77-0.93)	4
Selva, 2004, France ³¹	Retrospective	In-house PCR	49	0.92 (0.80-0.98)	*	8
Kerleguer, 2004, Djibouti ³²	Prospective cross-sectional	Gen probe MTDI	197	0.93 (0.88-0.97)	1.0 (0.95-1.0)	5
Johansen, 2004, Denmark ³³	Prospective and retrospective	BD Probe Tec	32	0.71 (0.44-0.90)	*	7
Yassin, 2003, Ethiopia ³⁴	Prospective cross-sectional	In-house PCR	71	0.71 (0.56-0.83)	0.35 (0.16-0.57)	6
Jonsson, 2003, Sweden ³⁵	Retrospective	Roche Amplicor	31	0.63 (0.24-0.91)	1.0 (0.85-1.0)	7
Tiwari, 2003, India ¹⁴	Prospective cross-sectional	In-house PCR	46 (42 FNA)	FNA 0.71 (0.42-0.92)	*	7
Mert, 2003, India ³⁶	Study design not recorded	In-house PCR	23	0.30 (0.15-0.53)	*	5
Rimek, 2002, Germany and India ³⁷	Prospective cross-sectional	In-house PCR and Roche Amplicor	17	In-house PCR 0.93 (0.66-1.0) Roche without NaLC 0.44 (0.14-0.79) Roche with NaLC 0.10 (0-0.45)	In-house PCR 0.67 (0.09-0.99) Roche without NaLC 0.67 (0.09-0.99) Roche with NaLC 1.00 (0.03-1.0)	5/4
Kidane, 2002, Ethiopia ³⁸	Prospective cross-sectional	In-house PCR	40	0.88 (0.73-0.96)	*	7
Hirunwiwatkul, 2002, Thailand ³⁹	Retrospective	In-house PCR	60	0.43 (0.25-0.63)	1.00 (0.88-1.0)	8
Gong, 2002, Korea ⁴⁰	Prospective case control	In-house PCR	63	0.78 (0.66-0.87)	1.00 (0.94-1.0)	5
Gunisha, 2001, India ⁴¹	Cross-sectional	In-house PCR	10	0.33 (0.01-0.91)	1.00 (0.59-1.0)	6
Goel, 2001, India ⁴²	Prospective case control	In-house PCR	52	0.95 (0.83-0.99)	0.92 (0.64-1.0)	7
Singh, 2000, India ⁴³	Cross-sectional	In-house PCR	90	0.61 (0.45-0.76)	0.77 (0.63-0.88)	6
Narayanan, 2000, India ⁴⁴	Prospective and retrospective	In-house PCR	95	IS6110 0.69 (0.55-0.82) Trc4 0.78 (0.63-0.88)	IS6110 0.46 (0.31-0.61) Trc4 0.41 (0.27-0.57)	8
Kwon, 2000, Korea ⁴⁵	Retrospective	In-house PCR	17	0.35 (0.15-0.59)	*	7
Baek, 2000, Korea ⁴⁶	Prospective cross-sectional	Roche Amplicor	29	0.76 (0.50-0.93)	1.00 (0.74-1.0)	6
Manitchopisit, 1999, Thailand ⁴⁷	Prospective cross-sectional	In-house PCR	33	0.84 (0.64-0.95)	0.75 (0.35-0.97)	6
Shah, 1998, Jamaica ⁴⁸	Prospective cross-sectional	Roche Amplicor	45	0.90 (0.55-1.0)	1.0 (0.9-1.0)	5
Gamboia, March 1998, Spain ⁴⁹	Prospective cross-sectional	Gen probe MTDI	38	MTDT 1 0.89 (0.65-0.99) MTDT 2 0.78 (0.52-0.94)	1.0 (0.83-1.0)	6
Gamboia, May 1998, Spain ⁵⁰	Prospective cross-sectional	Abbott LCx ^t	62	0.84 (0.60-0.97)	0.91 (0.78-0.97)	5
Ersöz, 1998, Turkey ⁵¹	Prospective cross-sectional	In-house PCR	23	After resolved discrepancies: 0.87 (0.66-0.97)	After resolved discrepancies: 1.0 (0.83-1.0)	3
Gamboia, January 1997, Spain ⁵²	Prospective cross-sectional	Gen probe MTDI	28	0.83 (0.61-0.95)	*	5
Gamboia, August 1997, Colombia and Spain ⁵³	Prospective cross-sectional	Gen probe MTDI	35	0.82 (0.57-0.96)	0.64 (0.31-0.89) 0.78 (0.52-0.94)	6
Durmaz, 1997, Turkey ⁵⁴	Retrospective	In-house PCR	14	After resolved discrepancies: 0.86 (0.64-0.97) After PCR repeat: 0.95 (0.76-1.0)	After resolved discrepancies: 1.0 (0.77-1.0) After PCR repeat: 1.0 (0.77-1.0)	7
Totsch, 1996, Austria ⁵⁵	Retrospective	In-house PCR	18	0.86 (0.57-0.98) IS6110 0.58 (0.43-0.72) 65 kDa 0.02 (0.01-0.11)	1.0 (0.69-1.0) IS6110 0.28 (0.15-0.44) 65 kDa 0.98 (0.87-1.0)	5
Pfhyffer, 1996, Switzerland ⁵⁶	Prospective cross-sectional	Gen probe MTDI	46	Nested PCR 389bp 0.50 (0.36-0.64) 1.00 (0.74-1.0)	Nested PCR 389 bp 0.65 (0.48-0.79) 0.79 (0.62-0.91)	6
Kim, 1996, Korea ⁵⁷	Prospective case control	In-house PCR	31	After resolved discrepancies: 1.00 (0.81-1.0) Versus culture: 0.67 (0.22-0.96)	After resolved discrepancies: 1.00 (0.87-1.0) Versus culture: 0.40 (0.21-0.61)	8/7
Vlasplolder, 1995, the Netherlands ⁵⁸	Prospective cross-sectional	Gen probe MTDI	10	Versus cytology: 0.61 (0.42-0.78) 1.00 (0.40-1.00)	Versus cytology: 1.00 (0.93-1.00) 0.86 (0.42-1.00)	7

表 2 NAAT 特征研究

研究特点	商品化 试剂盒 (n=29)%	自制 试剂盒 (n=29)%	总计 (N=49)%	研究特点	商品 试剂盒 (n=20)%	自制 试剂盒 (n=29)%	总计 (N=49)%
研究对象				标本类型			
首诊	0	7	4	细针抽吸	10	38	25
转诊	85	65	72	活组织检查	15	17	16
未知	15	28	23	石蜡包埋组织	5	31	20
人群的年龄、性别、治疗				联合采用	25	14	21
结核病史, 严重性,				报道不清楚	50	0	18
合并 HIV 感染	0	0	0	报道了 PCR 的时间	5	6	6
研究设计				报道了金标准与 PCR			
横断面研究	1000	66	80	之间的时间	0	14	8
病例对照研究	0	34	20	报道了去污染技术	85	38	57
参照标准验证的 NAAT				报道了 DNA 提取方法	90	86	88
全部	100	86	92	扩增靶序列			
部分	0	14	8	IS6110	0	54	33
包括在参照标准中的				其他靶标	5	43	30
NAAT	5	0	2	未报道	85	3	37
厂商赞助	25	0	10	报道了引物序列的衍生物	0	0	0
无赞助	75	100	90	报道了 DNA 提取方法	90	86	88
报道的双盲研究				扩增靶序列			
任何形式	5	17	12	IS6110	0	54	33
未报道	95	83	88	其他靶标	5	43	30
病人选择				未报道	85	3	37
连续性	15	21	18	报道了引物序列的衍生物	0	0	0
非连续性或者未报道	85	79	82	适当描述了 PCR	35	83	63
数据收集				的细节便于重复	35	83	63
前瞻性	95	52	69	多重 PCR	0	17	10
回顾性	0	27	16	巢式 PCR	0	21	12
二者兼有	5	7	6	报道了每管都有内部扩增对照	15	10	12
未报道	0	14	9	报道有去除抑制因子措施	45	7	22
应用的标本				报道的模板量	65	52	55
只是非呼吸道的标本	50	83	69	≤10 μl	0	46	25
二者均有	50	17	31	10~20 μl	0	3	2
涂片检查结果				>20 ul	65	3	2
阴性和阳性都有	95	86	90	报道有避免污染措施	10	41	29
				每次操作都设有阴性和阳性对照	75	48	60
				报道了检测限制	0	10	6

NAAT=核酸扩增试验; TB=结核病; HIV=人免疫缺陷病毒; FNA=细针抽吸; PCR=聚合酶链式反应。

解,特别是 RNA 靶序列。仅有少数的研究提到了这个时间间隔。10%的研究报道在每个扩增管内设置内部扩增对照,仅有 29%的研究报道采取措施阻止实验交叉污染。

在 7 个研究中,应用差异分析技术从 9 处进行比较^{26,32,35,49,50,53,56}。当 NAAT 和对照实验结果不

一致时,进一步收集临床或实验室信息。应用该技术获取真实的结果,因为附加的信息对于一些患者的判断是有用的。差异分析可指出存在的潜在偏差⁵⁹。尽管所有的分析中包括了差异分析的研究,但它们也被作为一个亚组分别进行了分析。

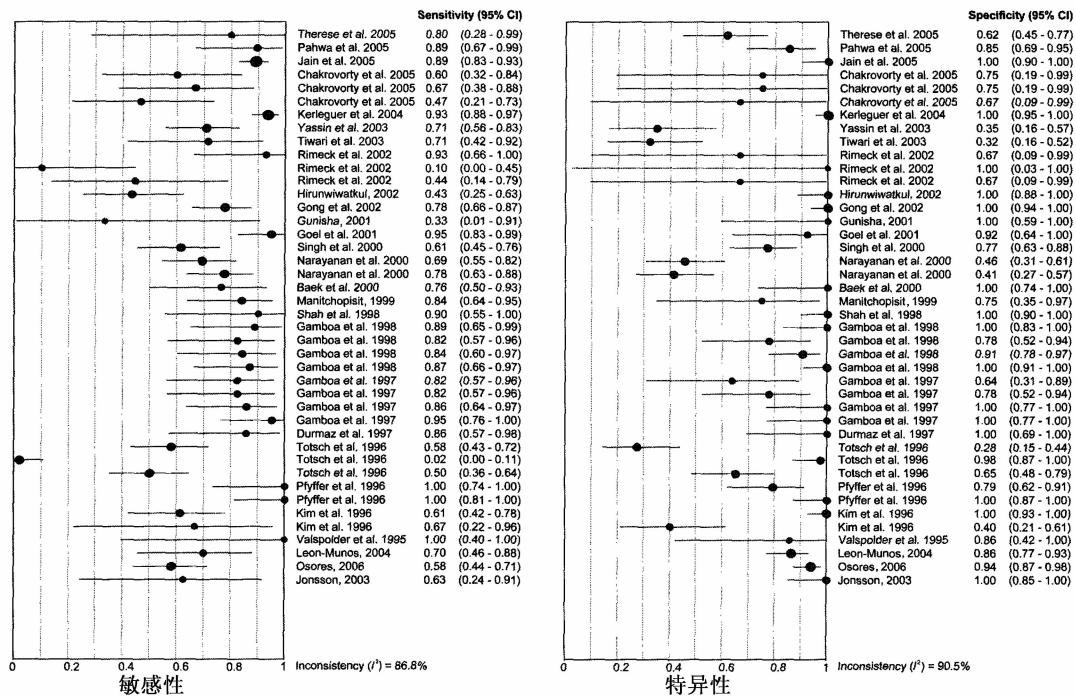


图2 NAAT研究报告的敏感性(左)和特异性(右)的效果图
 固定曲线显示每个研究获得的敏感性估计值所代表的坐标点值。实线表示95%的置信区间。
 NAAT=核算扩增试验; CI=置信区间。

主要发现

图2是报道NAAT准确率研究的树状图。灵敏度估计值的变动范围在2%和100%之间,特异性估计值的范围在28%和100%之间。灵敏度和特异性的估计值具有高度不均一性(灵敏度的I²值为86.8%,特异性的I²值为90.5%),提示研究在方法和结果方面不具有相似性。这种显著的不均一性限制了该方法的临床应用,以及对其灵敏度和特异性的概括性估计。图3和4显示总DOR为16.92,在SROC曲线下的面积为0.839, Q*指数(在SROC曲线上灵敏度和特异性相同的点)是0.77。这些数据提示NAAT可能具有一定的鉴别能力,但在统计学上其研究结果存在很大的变化而无法总结。

亚组分析

在42个包含了灵敏度和特异性信息的研究中,分析了8个预定义的亚组(表3)。按照惯例,所有单元都加上1/2值包含0,以避免被0除。

表3显示亚组分析的结果。培养被认为是最有效的参照标准,但是以培养法作为部分参照标准的31个研究并未显示比11个未设培养的研究具有更高的DOR。11个横断面的研究没有报道其DORs高于31个病例对照研究。仅有6个研究是双盲的,

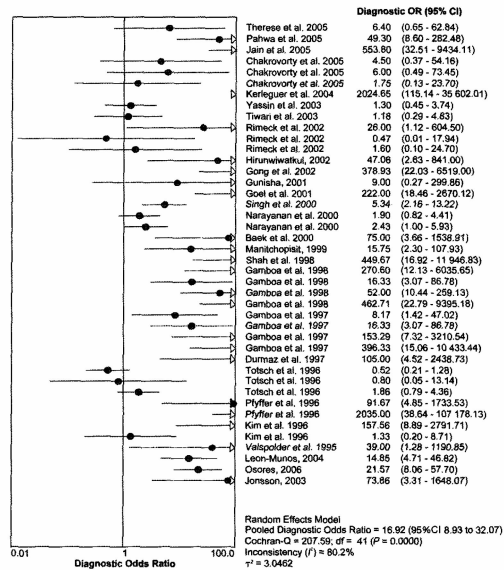


图3 NAAT研究报告的敏感性(左)和特异性(右)的效果图

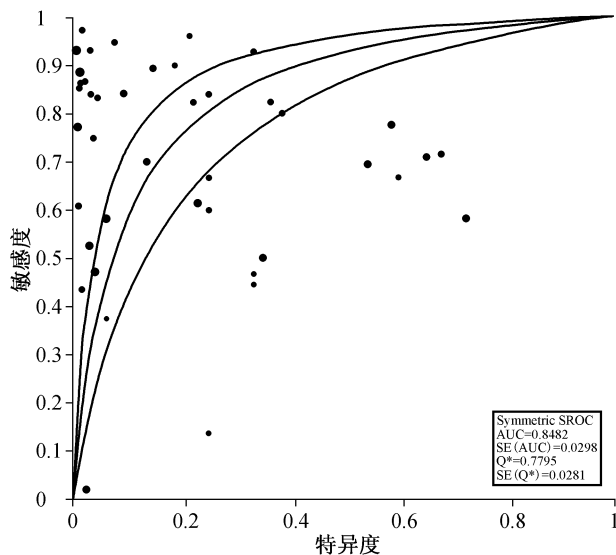
固定曲线显示每个研究获得的诊断优势比估计值所代表的坐标点值。实线表示95%的置信区间。NAAT=核算扩增试验; DOR=诊断优势比; CI=置信区间。

但这并未显著改变其表现。13个研究采用淋巴结活组织检查标本,11个研究采用细针抽吸标本,5个研究采用石蜡包埋组织。在以上这些组中,总的DORs没有差别。11个研究以IS6110为扩增靶序

列, 结果表明 IS6110 与其他靶序列的表现并没有显著差异。以前的报道已经提示 IS6110 序列并不存在于所有结核分枝杆菌菌株中^{60,61}。

19 个使用 NAAT 商品化试剂盒的研究比 23 个使用 NAAT 自制试剂盒研究的准确率高 (DOR 分别为 45.53 (95%可信区间 20.47—101.25) 和 7.16 (95%可信区间 3.40—15.051))。13 个模板量 >20 μl 的研究的准确率高 于 29 个模板量 <20 μl 的研究 (DOR 分别为 63.04 (95%可信区间 26.6—149.39) 和 9.02 (95%可信区间 4.42—18.43))。8 个采用差异分析的研究的准确率高 于 34 个对所有标本应用常规分析的研究 (DOR 分别为 212.61 (95%可信区间 52.54—860.30) 和 9.86 (95%可信区间 5.26—18.44))。

与此同时, 也研究了亚组对总的不均一性的影响, 证明在 3 个方面有显著影响: 双盲性 ($P=0.091$), 模板量 >20 μl ($P=0.104$), 以及差异分析的应用 ($P=0.069$) 具有较低的不均一性。提示这些因素有助于解释研究的总体不均一性。



曲线是概括所有诊断准确率的回归线。Q* 指数的定义是 SROC 曲线上敏感性和特异性数值相等的点的代表值, 位于 ROC 空间最接近左上角的点。NAAT=核酸扩增试验; SROC=概括接收操作曲线; AUC=曲线下的区域; SE(AUC)=AUC 的标准误差; SE(Q*)=Q* 指数的标准误差。

图 4 NAAT 研究报告敏感性和特异性的效果图

讨 论

尽管各报道呈现不均一性而在统计学上难以总结, 但我们的系统回顾提示: 与已发表的常规方法的表现相比, NAAT 具有较高的诊断准确率。

表 3 亚组分析

亚组 (报道的研究数)	DOR (95%CI) ^{a)}	%	P value+
参照标准			
包含培养(31)	16.27(7.96—33.35)	80.5	0.000
不包含培养(11)	19.82(4.15—94.73)	81.5	0.000
研究设计			
横断面研究(11)	12.46(3.07—50.51)	86.6	0.000
病例对照研究(31)	19.05(9.27—31.12)	76.6	0.000
双盲研究			
任何双盲技术(6)	15.55(4.58—52.82)	47.3	0.091
无双盲(36)	17.56(863—3574)	81.8	0.000
应用的 NAAT			
商品化试剂盒(19)	45.53(20.47—101.25)	56.8	0.001
自制的试剂盒(23)	7.16(3.40—15.05)	78.4	0.000
标本			
仅活组织检查(13)	4.67(1.59—13.72)	67.7	0.000
仅细针抽吸(11)	44.96(8.71—232.26)	84.6	0.000
仅石蜡包埋组织(5)	3.33(0.66—16.81)	79.8	0.001
模板量			
≥20 μl(13)	63.04(26.6—149.39)	34.8	0.104
<20 μl(29)	9.02(4.42—18.43)	81.0	0.000
偏差分析			
包括(8)	212.61(52.54—860.30)	46.7	0.069
不包括(34)	9.86(5.26—18.44)	77.5	0.000
IS6110 模板			
IS6110(11)	8.92(2.34—34.0)	66.3	0.000
其他模板(31)	20.98(10.60—41.55)	74.0	0.000

a) 总 DOR (随机效应模型)

+ χ^2 检验不均一性的 P 值

DOR=诊断优势比; CI=置信区间; NAAT=核酸扩增试验; FNA=细针抽吸。

NAAT 方法诊断结核病的分析已经表明具有不同的表现, 特别是那些采用自制试剂盒的研究⁸。因为 NAAT 实验很容易设计, 所以很多实验室应用此方法。这些报道中很多都缺少重要的质量指示剂, 并且不能控制交叉污染 (扩增的核酸进入临近的扩增管导致假阳性结果) 和抑制因素 (临床标本中的抑制因子抑制扩增导致假阴性结果) 的影响。

因为 NAAT 加样时只需要很少量的标本, 加样误差普遍存在, 模板量的多少就可能影响灵敏度。加样时采用大量的提取的核酸可能比少量的模板的扩增率更大, 新近的报道加样量一般为 100 μl⁶²。我们的数据提示加样量至少为 20 μl。

有两个研究报道将患者作为分析单位而不是标本^{42,46}, 这可能会人为地夸大了这些报道的效果。

从每位患者获取的几份标本可能均已被测试过。

临床意义

在解释检测效果时，读者应该注意到将 NAAT 和结核分枝杆菌培养比较，尽管从理论上讲 NAAT 的灵敏度和特异性可能更高，但 NAAT 是不可能优于这个标准对照的。活检组织培养的灵敏度约为 71%，细针抽吸组织培养的灵敏度约为 62%⁵。因此，采用一个不合适的参照标准可能导致检测效果被低估⁶³。

如果将 NAAT 应用于临床，那么应该是在已有临床和放射学资料、涂片和组织学检查结果的情况下应用，NAAT 可以为患者在早期检查中提供补充的信息。在已经具有其他有用信息的情况下，NAAT 的应用价值较小。在某种意义上，正确地评价检测效果将提高诊断的效益。遗憾的是，大多数研究没有报道 NAAT 提高诊断效益的数据，未报道其效益超过传统的检测方法。未来的研究应该阐述这个问题。

实验室意义

商品化试剂盒检测的总准确率高于自制试剂盒。这可能是由于商品化试剂盒经过了更严格的认证和优化，试剂质量和试验方法的标准化，或者包括了适当的对照。在检查商品化试剂盒的报告中很可能会提出在诊断参考标准的定义中应是多方面的、避免应用新的实验。

NAAT 操作必须在尽量避免交叉污染的环境中进行。检测须设置适当的质控对照（包括扩增平行对照）以获得有效的结果。由于很多报告没有介绍他们的方法，无法很好地评价他们的研究结果。商品化的 NAAT 试剂盒由于其成本高和技术较复杂而难以在大多数结核病高负担国家推广应用。私立中心应用自己建立的方法，通常缺乏完整的认证、适当的人员培训或者与外部参照标准比较。由于大多数研究未提供成本信息，我们无法用我们的数据估算相关的成本。我们的数据能够给正在考虑开展 NAAT 检测结核性淋巴结炎的实验室提供一些指导。应用商品化试剂盒诊断的准确率高于自行测定方法，Gen-Probe AMTD（美国基因探针公司）的诊断准确率要高于 Roche Amplicor 试剂盒（美国罗氏诊断公司）或者 Abbott LCx（连接酶链反应）试剂盒（美国 Abbott 实验室）（数据未显示）。Abbott 试剂盒不再用于结核病检测。

回顾的优势

我们的研究包括几个数据库和资源，我们应用一个系统性的、预定的方案来开展这次回顾性研究。应用 QUADAS（一个经过认证的评价工具）评价每个研究的质量。两位作者相互独立地进行总结分析和提取数据资料。由于各研究结果存在不均一性，我们避免直接应用灵敏度和特异性，而是采用亚组，分析研究不均一性的来源。

回顾的局限性

其中几篇论文只关注方法学，参照标准不理想，应用过时的技术⁶³。根据其他关于 NAAT 检测结核病的 meta 分析结果⁷，有关 NAAT 效果的报道的质量普遍偏低，而不均一性程度高。在这种情况下，我们不能强力推荐 NAAT 在临床应用。这是因为 NAAT 的快速发展和普及缺乏标准化所致。NAAT 技术的改进能够提高 DNA 提取的效率和 NAAT 的可靠性，缩短检测时间，降低成本。例如，简化的 NAAT 像环介导的等温扩增方法（LAMP）检测效果较理想，但需要进一步评价⁶⁴。

研究对象的纳入标准不统一。很少有研究报道合并 HIV 感染率。在 HIV 感染的后期阶段，结核病的肺外症状和分枝杆菌少的现象很普遍⁶⁵，这是由于缺乏细胞介导的免疫应答可能延迟临床表现、影响诊断和预后⁶⁶。参比标准差异很大而可能导致不均一性显著。对于结核性淋巴结炎理想的参比标准尚未制定，但是应当包含临床表现、微生物学检查、放射显影和治疗效果。

最后，任何系统性回顾总是会存在文献的偏差。尽管我们搜索了几个文献数据库，但是肯定有一些研究还是会被遗漏。遗憾的是目前尚无有效的方法探索在进行诊断 meta 分析时可能存在的文献偏差。例如漏斗图和回归不对称检验方法被用于评价在进行随机对照试验的 meta 分析时可能存在的文献偏差。他们不适于探索诊断综述时存在的文献偏差⁶⁷。的确，如果进行试验准确率的 meta 分析时，目前应用的优势比标准差检验可能很容易令人误解⁶⁸。

进一步研究的方向

今后我们的系统性回顾明确了在几个方面应继续努力。例如，需进一步研究确定通过改变标本类型和模板量是否能够提高 NAAT 的效益。临床医生倾向于使用细针抽吸而不是整个淋巴结切除，这主要考虑难易程度和患者的不适感。我们的亚组分

析结果显示用细针抽吸代替活组织检查方法可以增加诊断优势比,但在给临床建议避免应用活组织检查之前需要进一步地研究。

在此领域进行深入研究将需要更加清晰地定义参比标准和 NAAT 的实验室标准化方案。必需建立合适的对照,包括内部扩增对照,以及防止扩增抑制的技术和措施。

‘实时’NAAT 和等温扩增技术是令人寄以希望的方法,比传统的凝胶电泳检测具有重要的优势。未来的研究方向是应用这些方法诊断结核性淋巴结炎,同样也需要评价更新、更简单的 NAAT 方法,例如 LAMP 和链置换方法。

诊断报告中应用的差异分析是有争议的。我们发现使用差异分析和未使用差异分析的报告存在显著区别,这可能提示偏向于较好的表现。方法学研究必需阐明差异分析对评价技术(如 NAAT)的潜在影响,特别是在金标准尚不完善的情况下。

结 论

我们的系统性回顾显示每个 NAAT 检测结核性淋巴结炎的研究结果是高度可变的、不一致的,而不可能确定临床有意义的准确率估计值。研究报道不是很规范,而且经常未提供足够的信息。由于可能出现假阳性和假阴性结果,NAAT 方法需要和常规方法联合应用,并结合临床资料判定结果。

(王博译 吴雪琼校 王雪静审)

Acknowledgements

The authors thank G Salanti for assistance with statistical methods and the South Asian Cochrane Center for finding full text references. P Daley defined the question, performed the search, tested the data extraction form, extracted the data, performed the analysis and wrote the manuscript. S Thomas extracted the data and assisted in the analysis. M Pai assisted with identifying literature, advised on statistical methods and edited the manuscript.

References

- Golden M P, Vikram H R. Extrapulmonary tuberculosis: an overview. *Am Fam Physician* 2005; 72: 1761–1768.
- McMaster P, Isaacs D. Critical review of evidence for short course therapy for tuberculous adenitis in children. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19: 401–404.
- Jawahar M S, Rajaram K, Sivasubramanian S, et al. Treatment of lymph node tuberculosis—a randomized clinical trial of two 6-month regimens. *Trop Med Int Health* 2005; 10: 1090–1098.
- van Beekhuizen H. Tuberculosis score chart in children in Aitape, Papua New Guinea. *Trop Doct* 1998; 28: 155–160.
- Polesky A, Grove W, Bhatia G. Peripheral tuberculous lymphadenitis: epidemiology, diagnosis, treatment, and outcome. *Medicine [Baltimore]* 2005; 84: 350–362.
- Hawkey C R, Yap T, Pereira J, et al. Characterization and management of paradoxical upgrading reactions in HIV-uninfected patients with lymph node tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 1368–1371.
- Pai M. The accuracy and reliability of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis. *Natl Med J India* 2004; 17: 233–236.
- Pai M, Flores L L, Pai N, Hubbard A, Riley L W, Colford J M Jr. Diagnostic accuracy of nucleic acid amplification tests for tuberculous meningitis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 633–643.
- Greco S, Girardi E, Navarra A, Saltini C. The current evidence on diagnostic accuracy of commercial based nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Thorax* 2006; 61: 783–790.
- Pai M, McCulloch M, Gorman J D, et al. Systematic reviews and meta-analyses; an illustrated, step-by-step guide. *Natl Med J India* 2004; 17: 86–95.
- Pai M, McCulloch M, Enanoria W, Colford J M Jr. Systematic reviews of diagnostic test evaluations; what’s behind the scenes? *ACP J Club* 2004; 141: A11–A13.
- Flores L L, Pai M, Colford J M Jr, Riley L W. In-house nucleic acid amplification tests for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens: meta-analysis and meta-regression. *BMC Microbiol* 2005; 5: 55.
- Aljafari A S, Khalil E A, Elsiddig K E, et al. Diagnosis of tuberculous lymphadenitis by FNAC, microbiological methods and PCR: a comparative study. *Cytopathology* 2004; 15: 44–48.
- Tiwari V, Jain A, Verma R K. Application of enzyme amplified mycobacterial DNA detection in the diagnosis of pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis. *Indian J Med Res* 2003; 118:224–228.
- Whiting P F, Weswood M E, Rutjes A W, Reitsma J B, Bossuyt P N, Kleijnen J. Evaluation of QUADAS, a tool for the quality assessment of diagnostic accuracy studies. *BMC Med Res Methodol* 2006; 6: 9.
- Mirza S, Restrepo B I, McCormick J B, Fisher-Hoch S P. Diagnosis of tuberculosis lymphadenitis using a polymerase chain reaction on peripheral blood mononuclear cells. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 69: 461–465.
- Ehlers S, Ignatius R, Regnath T, Hahn H. Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by Gen-Probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2275–2279.
- Cataloluk O, Karsligil T, Bayazit N. Evaluation of a polymerase chain reaction amplification method for *Mycobacterium tuberculosis* complex on samples from different sources. *Scand J Infect Dis* 2003; 35: 329–331.
- Higgins J P, Thompson S G, Deeks J J, Altman D G. Measuring inconsistency in meta-analyses. *BMJ* 2003; 327: 557–560.
- Glas A. The diagnostic odds ratio: a single indicator of test performance. *J Clin Epidemiol* 2003; 56: 1129–1135.
- Zamora J, Abaira V, Muriel A, Khan K, Coomarasamy A. Meta-DiSc: a software for meta-analysis of test accuracy data. *BMC Med Res Methodol* 2006; 6: 31.
- Irwig L, Macaskill P, Glasziou P, Fahey M. Meta-analytic methods for diagnostic test accuracy. *J Clin Epidemiol* 1995; 48: 119–130; discussion 31–32.
- Higgins J P, Thompson S G. Quantifying heterogeneity in a meta-analysis. *Stat Med* 2002; 21: 1539–1558.
- Osores F, Nolasco O, Verdonck K, et al. Clinical evaluation of a 16S ribosomal RNA polymerase chain reaction test for the diagnosis of lymph node tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2006; 43: 855–859.
- Therese K L, Jayanthi U, Madhavan H N. Application of nested polymerase chain reaction (nPCR) using MPB 64 gene primers to detect *Mycobacterium tuberculosis* DNA in clinical specimens from extrapulmonary tuberculosis

- patients. *Indian J Med Res* 2005; 122: 165–170.
- 26 Schulz S, Cabras A D, Kremer M, et al. Species identification of mycobacteria in paraffin-embedded tissues: frequent detection of nontuberculous mycobacteria. *Mod Pathol* 2005; 18: 274–282.
- 27 Pahwa R, Hedau S, Jain S, et al. Assessment of possible tuberculous lymphadenopathy by PCR compared to non-molecular methods. *J Med Microbiol* 2005; 54: 873–878.
- 28 Jain A, Verma R K, Tiwari V, Goel M M. Dot-ELISA vs. PCR of fine needle aspirates of tuberculous lymphadenitis; a prospective study in India. *Acta Cytol* 2005; 49: 17–21.
- 29 Chakravorty S, Sen M K, Tyagi J S. Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by smear, culture, and PCR using universal sample processing technology. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4357–4362.
- 30 Leon Muinos E, Perez Del Molino M L, Lado Lado F L, Pazo Nunez M, Pardo F. Use of ligase chain reaction for the rapid diagnosis of lymph node tuberculosis. *Scand J Infect Dis* 2004; 36: 724–726.
- 31 Selva E, Hofman V, Berto F, et al. The value of polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium tuberculosis* in granulomas isolated by laser capture microdissection. *Pathology* 2004; 36: 77–81.
- 32 Kerleguer A, Fabre M, Bernatas J J, et al. Clinical evaluation of the gen-probe amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test for rapid diagnosis of tuberculosis lymphadenitis. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5921–5922.
- 33 Johansen I S, Thomsen V O, Forsgren A, Hansen B F, Lundgren B. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens with necrotizing granulomatous inflammation by strand displacement amplification. *J Mol Diagn* 2004; 6: 231–236.
- 34 Yassin M A, Olobo J O, Kidane D, et al. Diagnosis of tuberculous lymphadenitis in Butajira, rural Ethiopia. *Scand J Infect Dis* 2003; 35: 240–243.
- 35 Jonsson B, Ridell M. The Cobas Amplicor MTB test for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex from respiratory and non-respiratory clinical specimens. *Scand J Infect Dis* 2003; 35: 372–377.
- 36 Mert A, Ozaras R, Bilir M, Tabak F, Aki H, Ozturk R. Ziehl-Neelsen staining and polymerase chain reaction study of tissue from tuberculous granulomas. *Respirology* 2003; 8: 548.
- 37 Rimek D, Tyagi S, Kappe R. Performance of an IS6110-based PCR assay and the COBAS AMPLICOR MTB PCR system for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA in human lymph node samples. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3089–3092.
- 38 Kidane D, Olobo J O, Habte A, et al. Identification of the causative organism of tuberculous lymphadenitis in Ethiopia by PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4230–4234.
- 39 Hirunwiwatkul P, Tumwasorn S, Chantranuwat C, Sirichai U. A comparative study of diagnostic tests for tuberculous lymphadenitis; polymerase chain reaction vs histopathology and clinical diagnosis. *J Med Assoc Thai* 2002; 85: 320–326.
- 40 Gong G, Lee H, Kang G H, Shim Y H, Huh J, Khang S K. Nested PCR for diagnosis of tuberculous lymphadenitis and PCR-SSCP for identification of rifampicin resistance in fineneedle aspirates. *Diagn Cytopathol* 2002; 26: 228–231.
- 41 Gunisha P, Madhavan H N, Jayanthi U, Therese K L. Polymerase chain reaction using IS6110 primer to detect *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples. *Indian J Pathol Microbiol* 2001; 44: 97–102.
- 42 Goel M M, Ranjan V, Dhole T N, et al. Polymerase chain reaction vs. conventional diagnosis in fine needle aspirates of tuberculous lymph nodes. *Acta Cytol* 2001; 45: 333–340.
- 43 Singh K K, Muralidhar M, Kumar A, et al. Comparison of in house polymerase chain reaction with conventional techniques for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in granulomatous lymphadenopathy. *J Clin Pathol* 2000; 53: 355–361.
- 44 Narayanan S, Parandaman V, Rehman F, et al. Comparative evaluation of PCR using IS6110 and a new target in the detection of tuberculous lymphadenitis. *Current Science* 2000; 78: 1367–1370.
- 45 Kwon K S, Oh C K, Jang H S, Lee C W, Jun E S. Detection of mycobacterial DNA in cervical granulomatous lymphadenopathy from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue by PCR. *J Dermatol* 2000; 27: 355–360.
- 46 Baek C H, Kim S I, Ko Y H, Chu K C. Polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium tuberculosis* from fine-needle aspirate for the diagnosis of cervical tuberculous lymphadenitis. *Laryngoscope* 2000; 110: 30–34.
- 47 Manitchotpisit B, Kunachak S, Kulapraditharom B, Sura T. Combined use of fine needle aspiration cytology and polymerase chain reaction in the diagnosis of cervical tuberculous lymphadenitis. *J Med Assoc Thai* 1999; 82: 363–368.
- 48 Shah S, Miller A, Mastellone A, et al. Rapid diagnosis of tuberculosis in various biopsy and body fluid specimens by the AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* polymerase chain reaction test. *Chest* 1998; 113: 1190–1194.
- 49 Gamboa F, Fernandez G, Padilla E, et al. Comparative evaluation of initial and new versions of the Gen-Probe Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory and nonrespiratory specimens. *J Clin Microbiol* 1998; 35: 684–689.
- 50 Gamboa F, Dominguez J, Padilla E, et al. Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by ligase chain reaction amplification. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1324–1329.
- 51 Ersoz C, Polar A, Serin M S, Soyul L, Demircan O. Fine needle aspiration (FNA) cytology in tuberculous lymphadenitis. *Cytopathology* 1998; 9: 201–207.
- 52 Gamboa F, Manterola J M, Vinado B, et al. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in nonrespiratory specimens by Gen-Probe Amplified *Mycobacterium Tuberculosis* Direct Test. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 307–310.
- 53 Gamboa F, Manterola J M, Lonca J, et al. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens, blood and other non-respiratory specimens by amplification of rRNA. *Int J Tuberc Lung Dis* 1997; 1: 542–555.
- 54 Durmaz R, Aydin A, Durmaz B, Aydin N E, Akbasak B S, Gunal S. Sensitivity of two-stage PCR amplification for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in paraffin-embedded tissues. *J Microbiol Methods* 1997; 29: 69–75.
- 55 Totsch M, Bocker W, Brommelkamp E, et al. Diagnostic value of different PCR assays for the detection of mycobacterial DNA in granulomatous lymphadenopathy. *J Pathol* 1996; 178: 221–226.
- 56 Pfyffer G E, Kissling P, Jahn E M, Welscher H M, Salfinger M, Weber R. Diagnostic performance of amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test with cerebrospinal fluid, other nonrespiratory, and respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 834–841.
- 57 Kim S S, Chung S M, Kim J N, Lee M A, Ha E H. Application of PCR from the fine needle aspirates for the diagnosis of cervical tuberculous lymphadenitis. *J Korean Med Sci* 1996; 11: 127–132.
- 58 Vlaspolder F, Singer P, Roggeveen C. Diagnostic value of an amplification method (Gen-Probe) compared with that of culture for diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2699–2703.
- 59 Hadgu A. Discrepant analysis is an inappropriate and unscientific method. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4301–

- 4302.
- 60 Yuen L K, Ross B C, Jackson K M, Dwyer B. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Vietnamese patients by Southern blot hybridization. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1615–1618.
- 61 Das S P C, Lowrie D B, Prabhakar R. IS6110 restriction fragment length polymorphism typing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from patients with pulmonary tuberculosis in Madras, South India. *Tubercle Lung Dis* 1995; 76: 550–554.
- 62 Burggraf S, Reischl U, Malik N, Bollwein M, Naumann L, Olgemoller B. Comparison of an internally controlled, largevolume LightCycler assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples with the COBAS AMPLICOR assay. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 1564–1569.
- 63 Pal M, O'Brien R. Tuberculosis diagnostics trials; do they lack methodological rigor? *Expert Rev Mol Diagn* 2006; 6: 509–514.
- 64 Boehme C C, Nabeta P, Henostroza G, et al. Operational feasibility of using loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of pulmonary tuberculosis in microscopy centers of developing countries. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 1936–1940.
- 65 Havlir D V, Barnes P F. Tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1999; 340: 367–373.
- 66 Maher D, Harries A, Getahun H. Tuberculosis and HIV interaction in sub-Saharan Africa: impact on patients and programmes; implications for policies. *Trop Med Int Health* 2005; 10: 734–742.
- 67 Tatsioni A, Zarin D A, Aronson N, et al. Challenges in systematic reviews of diagnostic technologies. *Ann Intern Med* 2005; 142: 1048–1055.
- 68 Deeks J J, Macaskill P, Irwig L. The performance of tests of publication bias and other sample size effects in systematic reviews of diagnostic test accuracy was assessed. *J Clin Epidemiol* 2005; 58: 882–893.
- 69 Hadgu A, Dendukuri N, Hilden J. Evaluation of nucleic acid amplification tests in the absence of a perfect gold-standard test: a review of the statistical and epidemiologic issues. *Epidemiology* 2005; 16: 604–612.

· 纪念罗伯特·科赫 ·

罗伯特·科赫与结核杆菌的发现：125 年后面临来自艾滋病和结核病的挑战

第 38 届国际肺部疾病联盟肺部健康大会纪念罗伯特·科赫的报告，南非开普敦，2007 年 11 月 8—12 日

Robert Koch and the discovery of the tubercle bacillus: the challenge of HIV and tuberculosis 125 years later

Robert Koch Memorial Lecture given during the 38th Union World Lung Conference on Lung Health, Cape Town, South Africa, 8—12 November 2007

A. D. Harries

HIV Unit, Ministry of Health, Lilongwe, Malawi; Family Health International, Arlington, Virginia, USA; London School of Hygiene & Tropical Medicine, London, UK

这个伟大的人物是谁（图 1）？罗伯特·科赫 1843 年出生于德国一个贫穷的矿工家庭。5 岁时他借助报纸学会了阅读，这件事让他的父母大吃一惊。而他的这一才能预示着他以后的一些特点——智慧和坚韧不拔。他获得了行医资格，成为一名地区医学官员，被评为卫生学教授，并在 20 年后的 1905 年，被授予至高的荣誉——诺贝尔生理学或医学奖^{1,2}。1910 年，在德国的巴登—巴登，这位伟人的心脏停止了跳动，离开了人世，享年 66 岁。我们怀念他，因为他毫无疑问是我们称之为“微生物发现者”的那一代新兴科学家的鼻祖。科赫发现了炭疽病、结核病（TB）和霍乱的病因。科赫法则证明了特定的病原菌引起特定疾病，至今仍向每一代医学生传授着。

为了更好地了解科赫发现结核分枝杆菌的意义，我们必须将这一事件放在时代运行的轨道中，追溯到科赫本人的那个时代。结核病可以追溯到大约公元前 6000 年。17 世纪，John Bunyan 曾经将



图 1 晚年的罗伯特·科赫。照片在德国柏林 Humboldt 大学肖像收集处友情许可下复制

结核病称为“所有死亡者的统帅”。在古埃及人、古希腊人、中世纪和工业革命前，都发现结核病的存在，当时被称为“肺结核”、“淋巴结核”、“消耗性疾病”等不同名字。然而，直到工业革命时期，尤其在欧洲，结核病发病率才达到了与当今标准相比高得惊人的水平。在那时，结核病被称作“白色

关键词：TB；HIV/AIDS；罗伯特·科赫；结核病控制

瘟疫”。³ 在化疗时代之前，采用古老的方式治疗和宣布治愈。从静脉放血、蚂蟥吸血法和希波克拉底时代的应用催吐剂和引发水疱的药物，到君主触摸淋巴结和在中世纪 Laennec 的海苔包裹病人法，再到 19 世纪的新鲜空气、营养饮食、休息和定量运动疗法。尽管有以上的诸多疗法，还是有一半的结核病人死亡。早逝的人中既有普通人，也有名人。著名作家勃郎宁三姊妹，都在 40 岁以前死于结核病。绝大多数受害者都悲哀地知晓自己患了绝症。英国最受爱戴的诗人之一济慈，曾经说过一段著名的话，“我能尝到我嘴里的血腥味，这种血腥味意味着我的死亡”。在他 26 岁时，他的这段话得到证实。

在那个时代，大多人数认为结核病是一种家族遗传病，或者是因为空气不好。所以，当 1882 年科赫向世界宣称他发现了引发结核病的细菌时，成为爆炸性新闻。同一年，鲍·俄里奇，以及之后的斐尔和尼尔森发明了一种染色方法，这种方法直到现在仍被很多发展中国家作为结核病诊断的基石。科赫接下来 20 年的工作提出了正确的主张：肺结核具有传染性，结核分枝杆菌可以被日光杀死，应发现病人，结核菌素试验有助于诊断。令人遗憾的是，科赫提出了一个错误的观点，并且直到死他仍坚持这个观点，即结核菌素可以治愈结核病。直到 1944 年，伴随着链霉素的问世，结核病的治疗才获得了重大突破。在随后的 25 年间，目前应用的所有一线抗结核药物相继问世，并投入使用。20 世纪 60 年代，英国医学研究委员会在东非、东南亚和印度组织开展了缜密的临床试验研究，第一次提出了标准联合化疗，在 70 年代提出短程联合化疗，均可以治愈大多数结核病人。

20 世纪 70 年代末和 80 年代初，随着结核病化疗方案的广泛使用和工业化国家结核病发病率的降低，很多人认为结核病是一种已被征服的疾病，这种疾病将来肯定只能在历史书中才会出现。这是一个多么幼稚的错误啊。20 世纪 80 年代，四个主要原因导致全球结核病人数量快速增长⁴。首先，结核病在发展中国家流行，但由于结核病控制已被包含在基础医疗服务中而失去了可见性，使得没有人知道正在发生什么；第二，所有地方都忽视结核病控制，因为它是一种已被“征服”的疾病；第三，苏联解体，以及东欧地区卫生服务系统的崩溃，使得该地区的结核病，尤其是耐药结核病泛滥；第四，人类免疫缺陷病毒（HIV）和艾滋病（AIDS）的出现。

HIV 和 AIDS

实际上，四五十年前 HIV 感染首次发生在人类。在 20 世纪 30 年代，来自黑猩猩的猿免疫缺陷病毒（SIV）实现了跳跃到人类的种的演变，产生了 HIV-1。20 世纪 40 年代，来自黑白眉猴的 SIV 实现了到人类宿主的种的演变，产生了 HIV-2。这两种病毒最初在人类引发不能确诊的、散发的病例⁵。然而，20 世纪 70 年代，这两种病毒在敏感人群中找到了强有力的立足点，发生了流行性传播。1981 年 6 月 5 日，美国疾病预防控制中心的杂志 MMWR 发表了一篇报道，洛杉矶 5 名男同性恋者患间质性浆细胞肺炎，同时伴有严重的免疫缺陷：艾滋病的流行正式开始⁶。在当时，很多人，包括我本人，都认为这可能只是一种罕见的疾病。但我们全都错了。25 年后，是残酷的统计数据：2 500 万人死于艾滋病，4 000 万 HIV 感染者和艾滋病病人，每年 500 万人新感染 HIV，300 万人死于艾滋病⁷。撒哈拉南部非洲拥有全球 10% 的人口，占有了全球 65% 的艾滋病病人和全球 80% 的每年艾滋病死亡人数。

为什么一个病毒会如此成功？有 4 个重要原因：病毒主要通过性传播，而大多数人都有性行为；从感染到发病有很长的潜伏期，使疾病在不知情的情况下造成人与人之间的传播；人体主要免疫细胞（CD4 淋巴细胞）是病毒攻击的主要目标，因此病毒破坏了宿主旨在清除病毒的免疫机制；病毒每天可以复制十亿个拷贝，而且发生变异，使得病毒能够逃避药物和 HIV 疫苗的作用。在 HIV/AIDS 的 26 年历史中，重要事件的年份见表 1，⁸ 与前面看到的结核病形成了一个清晰的、完全不公平的对照：在艾滋病被确定为一种临床疾病的 2 年后，病因被查明；3 年后，诊断方法被开发出来；6 年后，第一种治疗药物问世。在 15 年内，工业化国家已经有了非常有效的抗逆转录病毒疗法（HAART）。随着逆转录酶抑制剂和蛋白酶抑制剂这一基础核心的建立，目前关于治疗的选择有无数个系列。2~3 年前又在这基础上增加了整合酶抑制剂、融合抑制剂、CCR5 受体拮抗剂，以及最近增加的病毒成熟抑制剂⁹。虽然这些药物能够把病毒载量降低到不能被检测出的程度，但目前仍然不能根除病毒，因此也不能治愈 HIV。

TB 和 HIV 的相互作用

TB 和 HIV 相互作用的前提是：感染结核菌

的人群必须同时也感染了 HIV，反过来也一样，也就是说两种病原微生物必须交叉。全球大约 20 亿人感染了结核分枝杆菌¹⁰，如果没有感染 HIV，其一生发展为活动性结核病的几率是 5%~15%，且在感染结核菌的第一年发生结核病的可能性最高¹¹；如果感染了 HIV，其发展为活动性结核的危险大大增加，每年的几率为 5%~15%，感染 HIV 后第一年内发生结核病的几率增加两倍¹²，此后随着 CD4 淋巴细胞数目（目前最好的测定细胞免疫的方法）的减少发病的危险增加。目前，全球大约有 1400 万人为 HIV 和结核菌（HIV/TB）双重感染者，其中 1100 万人（80%）居住于撒哈拉南部非洲¹³。这就是为何在这一地区，尤其是在非洲的东部和南部，结核病人登记数在过去的 20 年间呈螺旋式上升的主要原因。世界地图的横断面显示，TB/HIV 双重感染主要集中在撒哈拉南部非洲，在那里 35% 的结核病人血清学检查为 HIV 阳性；在非洲的南部地区（例如马拉维、赞比亚、津巴布韦、博斯瓦纳、纳米比亚和南非等国家），60%~80% 的结核病人血清学检查为 HIV 阳性。¹⁴ 虽然 TB-HIV 双重感染问题在东欧和亚洲、美国的部分地区也很严重，尤其是对静脉吸毒人群，但本文讨论的主要焦点将围绕撒哈拉南部非洲地区 TB/HIV 双重感染的问题。

表 1 HIV/AIDS 的 26 年历史中重要事件年份表

年份	主要事件
1981	艾滋病首次被确定为是一种临床疾病
1983	人类免疫缺陷病毒（HIV）被确定为艾滋病的发病原因
1984	开发出 HIV 抗体检测，获得了诊断 HIV 感染的方法
1986	获得第一个抗逆转录药物——齐多夫定
1996	获得高效的抗逆转录病毒疗法（HAART）
2007	获得不同种类的抗逆转录病毒治疗药物：逆转录酶抑制剂、蛋白酶抑制剂、整合酶抑制剂、融合抑制剂、CCR5 受体抑制剂、病毒成熟抑制剂

HIV=人类免疫缺陷病毒；AIDS=获得性免疫缺陷综合征；ART=抗逆转录病毒治疗

结核病控制，1990—2005

现在，我们来看一看从 1990 年到 2005 年结核病控制所做的努力，并解释这些努力如何产生效力，然后分析 HIV 如何影响了这些努力的效果。1990 年，全球报告发生结核病 800 万例，每年有 100 万~200 万人死于结核病¹⁵。1993 年，世界卫生组织（WHO）遏制结核病组负责人 Arata Kochi 博士果断地宣布了结核病全球紧急状态。之后

WHO 采取了行动，制定了一个结核病控制框架，即现代结核病控制策略（“DOTS”策略），它包含 5 项重要政策（见表 2）。¹⁶ 在此我们必须感谢已故的 Karyl Styblo 博士所做的卓越贡献，他那时任国际防痨和肺部疾病联盟的主席。19 世纪 80 年代，他阐明了 DOTS 的基本原则，并进行实践。在资源匮乏的国家（例如马拉维、莫桑比克和坦桑尼亚），他率先实施 DOTS。

在资源匮乏的状况下，DOTS 实施包括：以被动病人发现方式发现肺结核可疑者，并收集痰标本，送实验室进行涂片镜检。使用萋尼氏染色或荧光染色制备痰涂片，实验室工作人员使用光学显微镜寻找抗酸杆菌。发现抗酸杆菌即可将病人诊断为涂阳肺结核病人。对于涂片阴性的病人，可以遵循简单的流程诊断为涂阴肺结核或肺外结核。一旦确诊，病人应尽早登记治疗，其中一个重要的治疗原则是在直接面视下（DOT）尽可能给予病人利福平治疗。针对新发病例和复治病例，有不同的标准化化疗方案，这些方案中一条关键的原则是在强化期给予 3~5 种药物，在巩固期初治病人一般应用 2 种药物¹⁷。建立一个完善的系统，使病人获得不间断的药物供应。使用结核病人登记本和结核病人治疗卡，建立一个标准化的监控、登记和报告系统，重点是每季度的病例发现和疗程结束后的转归。最后，建立由国家或/或省级机构对所有结核病登记中心的季度督导系统，收集全国的数据，并向世界卫生组织遏制结核病组报告数据。

表 2 结核病控制政策组件

- 持续的政治承诺
- 采用被动病人发现方式、使用涂片镜检方法发现病人
- 至少对所有确诊的涂阳结核病人，在适当的管理条件下应用标准短程化疗方案
- 建立可靠的药物供应系统
- 建立和维持一个监控与评估系统

在这个框架内，确定了结核病控制的目标。确定的 2000 年目标由于没有实现，而被推迟到 2005 年¹⁸。这些目标只是发现 70% 的估计的涂阳肺结核病人，并将这些发现了的病人中的 85% 治愈。从流行病学角度上说，在没有 HIV 因素影响的情况下，这些目标能够实现。而且这些目标的实现应减少 40% 的接触感染者，结核病发病率的年递降率为 5%~10%¹⁹。

从全球来看，结核病控制取得了很大进展。1995 年，DOTS 策略在全球启动；到 2005 年，189 个国家采用了 DOTS 策略，2600 万结核病人

在 DOTS 策略下得到治疗，全球结核病发病率第一次趋于平稳，全球结核病发现率从 15% 上升到 62%，治疗成功率从 77% 上升到 84%¹⁴。虽然全球的目标没有实现，但只有一点差距。这一成绩应归功于遏制结核病伙伴（一个目前超过 500 个机构、捐赠人、国家和个人的网络），当然还有负责向实施机构推行结核病控制策略的国家规划人员。然而，在撒哈拉南部非洲地区进展情况并不好。到 2005 年，病人发现率是 51%，病人治疗成功率只有 74%。为了了解在非洲地区失败的原因，重要的是了解 HIV 对结核病控制已经造成的、且还在继续的负面影响。

HIV 对结核病控制的负面影响

HIV 对结核病控制规划的执行和病人的管理造成困难，从而对结核病控制产生负面影响（表 3）。

表 3 HIV 对结核病控制的负面影响

对结核病控制规划执行的影响	对病人管理的影响
• 结核病例登记数增加	• 结核病传染的危险人群
• 耻辱感	• 医务人员的患病与死亡
• 诊断更困难	• 发病率和死亡率增高
• 结核病的复发率增高	• 助长耐药结核病的传播

HIV=人类免疫缺陷病毒；TB=结核病

规划的执行

图 2 显示了在过去 20 多年间马拉维结核病例的登记情况：从 1985 年的 5 000 例增加到 2005 年的约 27 000 例，且涂阴结核病例的增加尤为明显。1985 年，结核病人的 HIV 感染率为 26%，10~15 年后约为 70%~75%，并基本稳定。这一图形说明了三个重要问题。首先，成人 HIV 流行加剧与结核病病例数增加之间有一个滞后期。马拉维的数据充分说明了这一点（图 3）：20 世纪 90 年代中期，成人 HIV 感染率上升，且稳定在 14% 的水平；而结核病人登记数持续增长，在 7~8 年后的 2003 年才到达一个稳定的水平。这一现象的原因是：大多数 HIV 感染者最初的 CD4 细胞计数为 1 000 个/ml，随后以每年 100~120 个/ml 的速度下降，直至下降到 180 个/ml。这个数值是艾滋病病人发生结核病的 CD4 细胞计数的中位数²⁰。也就是说，如果 HIV 感染被控制，HIV 感染率下降，那么大约 7~8 年后，结核病人的登记数才能产生同样的下降。第二，随着 HIV 感染率的增加，女性

结核病人的数目也会增加（尤其是年轻女性）⁴。20 世纪 90 年代，在马拉维，结核病人的强化期治疗为住院治疗。当时，女性结核病病房爆满。这就是为什么马拉维开始将强化期治疗从医院分散到社区的重要原因之一。第三，结核病人数量的增加必定意味着结核病可疑者数量的增加，这就会导致诊断质量下降：不遵循程序而采取捷径；由于供应不能跟上需求，痰盒出现短缺；需要制备和检查更多的涂片，这可能会导致痰涂片假阴性率升高。因此，与结核病人数量增加相反，涂阳肺结核病人的发现率可能会降低。

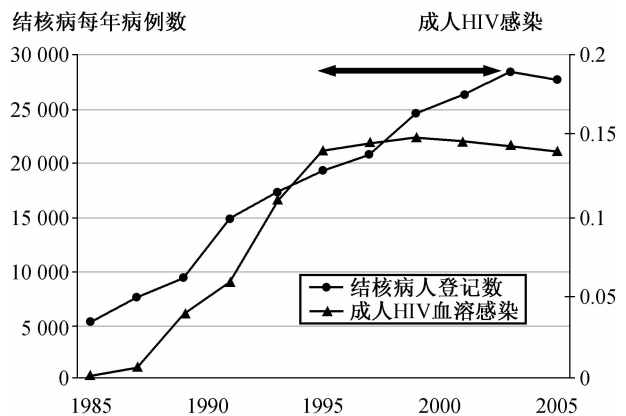


图 3 马拉维的结核病例登记和全国成人 HIV 感染情况

在监狱、难民营、寄宿学校、医疗机构，当然还有涂阳肺结核病人的家里，更容易发生结核病的传播，为结核病传播的“热点”地方。这些“热点”地方对已经失控的结核病流行推波助澜。而疾病带来的羞耻感也起了不好的作用，如果病人同时感染了 HIV 和结核，病人可能不愿意去就诊，从而导致诊断延误、治疗效果欠佳和感染的传播。

由于医务人员患病或忙于参加葬礼，而不能很好地提供医疗服务。医务人员的死亡也很严重。在一项对马拉维 40 家医院的临床医生和护理人员为期一年的死亡情况调查中，2% 的工作人员在一年内死亡，主要死于艾滋病或结核病²¹。对于在基层执行结核病控制规划起到至关重要作用的县（区）级结核病工作人员，也不能幸免于难。在马拉维开展的另外一项研究，核定了年初在册的结核病工作人员及到年底死亡的人数。1998 年，几乎 10% 的马拉维结核病工作人员死亡，其中 10 人里有 4 人死于慢性疾病（例如艾滋病），1 人则因公出差而死于交通事故²²。

病人管理

HIV 使得结核病的诊断更加困难。由于免疫

系统受到抑制,肉芽肿形成减少,而结核病的症状从典型的涂片阳性、空洞、上肺叶病变转变为非典型的涂片阴性、浸润性、下肺叶病变或肺外播散性疾病。在资源贫乏的机构,对成人和儿童菌阴肺结核的诊断尤其困难²³。很多临床医生和一线工作人员根据以下参数诊断结核:咳嗽超过3周,抗生素治疗无效,3次查痰阴性,胸部X线检查支持结核病。对于HIV感染者而言,胸部X线检查结果就会出现异常,由于CD4淋巴细胞计数降低,使得胸部X线表现变得不典型。有四分之一涂片阴性、培养阳性的肺结核病人胸部X线表现完全正常^{24,25}。Lucas和De Cock对被称为“消瘦病”或HIV消耗综合症的病人进行常规尸检研究发现,40%的病人在生前未被发现患有结核,但尸检显示有播散性结核病²⁶。

随着结核病人中HIV感染率的升高,病人的死亡率升高²⁷。例如在马拉维,1995—2002年间,全国新发涂阳肺结核病人的死亡率从5%增加到超过20%。涂阴肺结核病人或肺外结核病人的死亡率高于涂阳肺结核病人,主要是因为这些病人常伴随着更为严重的HIV相关的免疫抑制。病例早期死亡的发生率也很高,几项研究表明50%或更多的病人在接受抗结核治疗后的2个月内死亡²⁷。

当一个结核病人令人满意地完成治疗后,HIV阳性者结核病的复发率远高于HIV阴性者²⁸。这对结核病控制产生负面影响。额外增加的病人加重了结核病的负担,对病人的管理更加复杂且费用更高,因为很多病人需要应用复治方案进行治疗。

最后,HIV促使耐药结核病的传播。2006年曾报道的南非Kwa-zulu Natal地区广泛耐药结核病(XDR-TB)就是一个很好的例子²⁹。58例广泛耐药结核病人中的绝大多数病人很可能是在之前的住院治疗时被感染的。所有这些病人均为HIV感染者,除1例病人外其他病人全都死亡,死亡时间的中位数为15天。

总之,HIV消减了结核病控制规划实现结核病控制目标的能力。虽然结核病负担加重,但相反的是病人发现率降低;而且由于死亡率增加,使得结核治疗成功率下降。

结核病与千年发展目标

现在是对结核病的现状和未来进行思考的时候了。2000年,联合国大会制定了千年发展目标(MDGs)。在结核病控制方面有两个具体目标³⁰:千年发展目标的第6个和第8个目标是到2015年

停止结核发病率的上升且逆转为逐步下降。对艾滋病和疟疾也有同样的目标。对于结核病,这个目标可能已经实现了。然而,成立6年的遏制结核病合作伙伴有更高的目标,即到2015年,将结核病患病率和死亡率在1990年的基础上降低50%;到2050年,消除结核病,使之不再是一个公共卫生问题。到2015年,实现遏制结核病合作伙伴的目标可能吗?采用老的DOTS策略,结合目前的进展,大多数专家认为答案是否定的。有两个原因与这种可能的失败有关,即非洲的艾滋病,以及东欧、中国和印度的耐药结核病。

我们所有人都希望实现2015年的目标,为了这一目标,通过遏制结核病合作伙伴的努力,现在已经制定了一个新的遏制结核病十年计划(2006—2015)^{30,31}。这一计划包含6个主题(表4),其中第二条是针对HIV-TB的管理。全部计划的经费预算为560亿美元,其中67亿美元专门用于应对HIV-TB。如果这一计划设立的目标能够实现,那么遏制结核病合作伙伴的目标在2015年也应当能够实现。

表4 遏制结核病合作伙伴的遏制结核病全球计划,2006—2015

- 寻求高质量DOTS的扩展和加强,采取有效的以病人为中心的方法提高病人发现和治愈,为所有的病人(尤其是穷人)提供服务
- 应对TB-HIV、耐多药和其他挑战,扩展TB-HIV联合活动、DOTS-plus和其他相关措施
- 为加强卫生系统做出贡献,与其他卫生规划和公共服务合作。例如,为规划的实施和效果评价动员必要的人力和财力资源,共同分享和使用结核病控制的成果
- 吸纳所有的卫生服务提供者,公立的、非政府和私人的,扩展基于公立—私立合作(PPM)的方法,确保符合国际结核病关怀标准
- 赋予结核病人和社区对需求、贡献和提供有效关怀的权利。包括扩展社区结核病关怀;通过有针对性的倡导、交流和社会动员,提出需求;支持制定有关结核病社区的病人宪章
- 培养和提高研究能力,以开发出新药、新诊断技术和新疫苗。为提高规划的执行能力,也需要开展研究

降低结核与艾滋病的联合负担

首先,最首要的任务是预防HIV感染,由此降低HIV的流行。但是,在过去的25年间,全球在这方面所做出的努力并不成功。即使HIV流行情况得到改善,仍然需要7~8年时间结核病登记率才能获得类似的下降。因此,必须现在就采取行动。为此,由WHO牵头,制定了一个TB-HIV

过渡政策，这个政策包含了为降低 TB/HIV 双重感染负担所需要采取的行动（表 5）³²。

表 5 降低 TB/HIV 双重感染负担的联合行动

在 HIV 感染者中预防结核病
<ul style="list-style-type: none"> • 结核病感染控制 • 加强结核病人发现 • 异烟肼预防性治疗 • 扩大抗逆转录病毒治疗规模
在结核病人中应对 HIV
<ul style="list-style-type: none"> • HIV 检测与咨询 • 复方新诺明预防性治疗 • 抗逆转录病毒治疗
在艾滋病规划与结核病规划之间建立联系
<ul style="list-style-type: none"> • 联合计划、资源动员、培训、督导、监控与评估

在 HIV 感染者中预防结核病

在结核病人和 HIV 感染者同时存在的医疗机构和人群密集处，结核菌感染控制能够减少结核病的发生。在医疗机构降低结核杆菌传播的措施包括：管理措施，主要是早期发现和隔离传染性结核病人；环境措施，即减少空气中有传染性的液滴核数量；以及针对工作人员和病人的个人防护措施³³。最重要的是，已经感染 HIV 的医务人员不应在结核病传播危险性非常高的病房里工作。

在 HIV 感染者聚集的地方，例如 HIV 检测和咨询点³⁴、涂阳肺结核病人家、容易发生传播的“热点”地方和抗逆转录病毒治疗（ART）门诊，可以通过结核病症状和体征筛查，加强活动性结核病人的发现。抗逆转录病毒治疗门诊需要特别关注。在资源贫乏的国家（如马拉维），超过 30% 的病人或因无法解释的体重下降（WHO 分类为临床三期）和无法解释的慢性发热（WHO 分类为临床三期），或因 HIV 消耗综合征，例如无法解释的体重下降和发热（WHO 分类为临床四期）而开始接受 ART。在 HIV 感染者中发现结核病人有 3 个问题：（1）有多少结核病人没有被发现？（2）这能够解释我们看到的在 ART 治疗的最初 6 个月，结核发病率高的现象吗？³⁵（3）对结核病的延误诊断是造成非洲国家在 ART 规划中呈现的早期死亡率高的原因吗^{36,37}？要回答这些问题，需要开展很好的临床和实施性研究。

结合 HIV 咨询和检测的异烟肼预防治疗（IPT）用来预防潜伏结核感染发展为活动性结核病。十几项随机对照实验已经明确地显示：异烟肼

预防治疗可以将未患结核病的 HIV 感染者发生结核病的几率降低 40%³⁸；而另外两项研究表明：对于患有结核病的 HIV 感染者，在已经成功地完成抗结核治疗疗程后，异烟肼预防治疗可以将其结核病复发率降低 50%~80%^{39,40}。应用异烟肼预防治疗的益处是很明显的，然而只有一个国家努力推行这项干预措施，那就是博茨瓦纳。⁴¹为什么这一干预措施没有得到扩展呢？可能有三个原因：第一，在国家级和规划的层面，人们不知道如何去执行这一措施，也不知道应该由谁来负责建立异烟肼预防治疗门诊（结核病规划或艾滋病规划？）。第二，执行者过于关注他们在 HIV 感染者中排除结核病人将要面临的困难。第三，担心对未能被诊断出的结核病人单用异烟肼治疗，导致异烟肼耐药。这些问题都需要被讨论。

就 ART 本身而言，是一项很好的预防性干预措施。随着 ART 使用的大规模扩展，应该能够降低结核病的发病率和流行。在南非开普敦进行的研究发现：首先，接受 ART 的 HIV 阳性病人比不接受 ART 的 HIV 阳性病人的结核病发病率明显降低⁴²；其次，病人接受有效的 ART 时间越长，每年发展成活动性结核的可能性就越低。⁴³最近来自巴西的数据证实了 ART 本身和 IPT 本身的益处，但更重要的是显示了 ART 和 IPT 一起应用能够大大降低患活动性结核病的危险性。⁴⁴执行者需要在如何最好地将 ART 和 IPT 联合应用，以获得最大的效益和最小不良反应方面做更多的工作。

在结核病人中应对 HIV

从理论上讲，对结核病人的 HIV 管理非常简单：一旦病人被确诊为结核病，并接受抗结核治疗，他们均应得到由医务人员主动提供的 HIV 检测与咨询。如果检测结果为 HIV 阳性，病人就应开始复方新诺明预防治疗（CPT）和 ART。开展这一系列关怀服务的门槛是 HIV 检测。2005 年，全球只有 7% 的结核病人进行了 HIV 检测；撒哈拉南部非洲地区也只有 10% 的病人进行了检测¹⁴。然而，现在的情况开始改善——2006 年，在马拉维和肯尼亚，2/3 的结核病人进行了 HIV 检测；2007 年，在卢旺达，超过 80% 的结核病人接受了 HIV 检测。然而，即使像马拉维这样的结核病人的 HIV 检测工作已经开展得很好的国家，了解为什么还有 1/3 的结核病人没有接受 HIV 检测仍然很重要。原因通常与我们卫生服务系统的后勤保障有关——HIV 检测试剂盒断货、HIV 咨询员“临时

外出”、医务人员忘记转诊病人做 HIV 检测、医务人员忘记询问病人既往 HIV 检测史，当然还有病人拒绝接受 HIV 检测。

对于 HIV 阳性的结核病人，重要的是尽可能早地开始 CPT。这一辅助治疗廉价、安全、且能够有效地降低死亡率和发病率；它不会引起人群广泛的抗生素耐药，而且看起来也不会影响周效磺胺治疗恶性疟疾的疗效⁴⁵。

HIV 阳性的结核病人也应该考虑 ART。拉米夫定、司他夫定、奈韦拉平的普通固定剂量复合剂是非洲应用最为广泛的一线方案⁴⁶。这对结核病是个明显的机会和潜在的益处。按照 WHO 临床分期的原则，所有感染 HIV 的结核病人是符合 ART 的⁴⁷。从理论上讲，ART 能够降低结核病的死亡率和复发率。然而，同时应用 ART 和抗结核治疗并非易事⁴⁸，具体实施过程中的一些问题见表 6。对三个重要问题简单讨论如下：第一个问题是关于在结核病治疗过程中，应何时开始 ART。如果病人的 CD4 淋巴细胞数目 < 200 个/毫升，则建议在治疗的前两周内即开始 ART⁴⁷；如果病人的 CD4 淋巴细胞数目 > 200 个/毫升，则建议在治疗的两个月后，即抗结核治疗的巩固期开始 ART⁴⁷。两种方法各有利弊。然而，实际上在非洲的大多数地区，绝大多数病人不能做 CD4 淋巴细胞计数检测。对于这样的病人，建议在治疗的两个月后，即抗结核治疗的巩固期开始 ART。然而，在马拉维 Thyolo 地区的一项实施性研究非常清楚地显示：这一方法对结核病例的死亡率没有影响⁴⁹。这个问题需要再讨论。第二是应选择哪个非核苷类逆转录酶抑制剂（奈韦拉平还是依法维伦）与利福平同时使用的问题⁵⁰。两种药物各有优缺点，在这一问题上同样没有明确的结论。第三是在哪里提供双重治疗的问题。在像马拉维这样的国家，可能在许多发展中国家的卫生机构中都存在类似情况：病人在 ART 门诊接受 ART，然后在结核门诊排队接受抗结核治疗。如果能在一个地方接受所有治疗情况就好多了。例如一个让病人可以同时接受两种治疗的门诊；或者在 ART 门诊向病人提供抗结核治疗，或者在结核门诊向病人提供 ART。这两种可能的解决方案都存在各自的问题，但重要的是：大约在明年将开始尝试不同的方法，以确定哪一个更有效、更安全。在执行情况良好的国家（例如马拉维、肯尼亚和卢旺达），其底线是：不到三分之一的感染 HIV 的结核病人正在接受 ART¹⁴。因此，目前我们拒绝了大量病人对这种可能挽救生命的药

物治疗的需求。

表 6 对 HIV 感染的结核病人应用抗结核和抗逆转录联合治疗的实施问题

• 与抗结核治疗相关的抗逆转录病毒治疗时机
• 抗结核药物与抗逆转录病毒治疗药物的副反应累加效应
• 药物与药物之间的相互作用，尤其是利福平与非核苷类逆转录酶抑制剂和蛋白酶抑制剂之间的相互作用
• 服药的负担和治疗的依从性
• 免疫重建综合症的发生
• 在哪里为双重感染的病人提供抗逆转录病毒治疗和抗结核治疗—在不同的门诊还是同一个门诊？
• 对附加的磺胺甲噁唑（复方新诺明）预防性治疗和/或异烟肼预防性治疗的需求

全球在降低 TB/HIV 双重感染负担行动方面的进展

我们取得进展了吗？目前回答这个问题可能还为时尚早。表 7 展示了与 2006 年设立的目标相关的 4 个关键活动至 2005 年底的进展情况（2006 年的数据尚未获得）¹⁴。从所有的活动来看，2006 年的目标可能无法实现。因此，我们需要比现在做得更好。从全球来看，遏制结核病合作伙伴计划存在巨大的资金缺口，达到 300 亿美元³⁰；必须找到足够的资金。从国家来看，至关重要的是立即启动和执行 TB/HIV 干预措施。如果结核病和艾滋病两个领域要有所改变，以实现患病率和死亡率降低一半的 2015 年目标，那么有 5 个关键步骤必须完成。第一，必须找到额外的资金，但或许更重要的是在执行和机构建设中更为有效地使用资金：目前，资金在各级的流转缓慢、繁琐、低效。第二，所有发展中国家，特别是撒哈拉以南非洲地区，医疗卫生部门非常缺乏技术人力资源⁵¹。因此，急需执行 WHO 有关“分析、培训、复训和任务转换”的新的人力资源计划。第三，必须有定期的督导、监控、登记和报告。对所有应报告的活动均应报告—正如 Virginia Woolf（英国伟大的小说家）曾经指出的：“如果不记录下来，那么任何事情都没有发生过”。第四，在全球、国家、地区、机构和社区层面，都需要强有力的、高效的领导。第五，需要特别关注的、相关的研究和成果。其中提高 TB/HIV 关怀水平的两个优先领域是：开发简单的、针对性的结核病快速检测方法（类似于 HIV 检测方法）和需要对感染 HIV 的结核病人更好地、更早地应用 ART。

表7 全球均以遏制结核病全球计划, 2006—2015 中的 TB-HIV 活动为目标吗?¹⁴

活 动	截至 2005 年底 的国家报告	截至 2006 年底 的全球计划目标
主动接受结核病筛查的 HIV 感染者人数	180 000	11 000 000
符合条件并接受异烟肼预防治疗的 HIV 感染者人数	26 000	1 200 000
接受 HIV 检测和咨询的结核病人人数	220 000	1 600 000
接受抗逆转录病毒治疗的感染 HIV 的结核病人人数	25 000	220 000

结 论

如果我们追溯历史, 评定哪位伟人对历史产生了重要的影响, 那么罗伯特·科赫应当算是一个。我们现在能记住他们, 不是因为他们是什么样的人, 不是因为他们说过什么话, 也不是因为他们获得过什么头衔、奖章或荣誉。我们之所以能记住他们, 是因为他们所做的工作。罗伯特·科赫真正将科学引入了结核病领域, 他的成就将随时间延续下去。只要人类仍然生存于这个星球, 这种成就将一直延续到永远。遏制结核病合作伙伴由一个有影响的群体组成, 他们专业水平高超, 制定计划的经验丰富, 并且能够管理大规模的资源。这样的能力就产生的责任: 对贫困人群和世界不足之处的责任。因此, 结核病和艾滋病领域有责任确保全球结核病计划(2006—2015)的实现, 确保 TB/HIV 活动的执行, 以及确保到 2015 年让这个世界成为孩子们成长更安全的地方。历史将评判我们, 不是通过我们所说的, 也不是通过我们所计划的, 而是像它评判罗伯特·科赫一样, 通过我们的行动, 通过我们是否做了工作。

(黄海荣 译 王雪静 审校)

References

- Daniel T M. Robert Koch and the pathogenesis of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005; 9: 1181—1182.
- Kaufmann S H E. Robert Koch, the Nobel Prize, and the ongoing threat of tuberculosis. *N Engl J Med* 2005; 353: 2423—2428.
- Roberts C A, Buikstra J E. The history of tuberculosis from earliest times to the development of drugs. In: Davies P D O, ed. *Clinical tuberculosis*. 3rd ed. London, UK: Arnold, 2003.
- Harries A D, Dye C. Tuberculosis. *Ann Trop Med Parasitology* 2006; 100: 415—431.
- Epstein H. *The invisible cure. Africa, the West, and the fight against AIDS*. New York, NY, USA: Farrar,

- Strauss and Giroux, 2007.
- Pneumocystis pneumonia—Los Angeles*. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1981; 30: 250—252.
- UNAIDS and the World Health Organization. *AIDS epidemic update*. December 2006. UNAIDS/WHO, 2006.
- Merson M H. The HIV-AIDS pandemic at 25—the global response. *N Engl J Med* 2006; 354: 2414—2417.
- Bean P. New drug targets for HIV. *Clin Infect Dis* 2005; 41 (Suppl): S96—S100.
- Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione M C. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence and mortality by country. *JAMA* 1999; 282: 677—686.
- Sutherland I. Recent studies in the epidemiology of tuberculosis, based on the risk of being infected with tubercle bacilli. *Adv Tuberc Res* 1976; 19: 1—63.
- Sonnenberg P, Glynn J R, Fielding K, Murray J, Godfrey-Faussett P, Shearer S. How soon after infection with HIV does the risk of tuberculosis start to increase? A retrospective cohort study in South African gold miners. *J Infect Dis* 2005; 191: 150—158.
- Corbett E L, Watt C J, Walker N, et al. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Arch Int Med* 2003; 163: 1009—1021.
- World Health Organization. *Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing*. WHO report 2007. WHO/HTM/TB/2007. 376. Geneva, Switzerland: WHO, 2007.
- Kochi A. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. *Tubercle* 1991; 72:1—6.
- World Health Organization. *Global tuberculosis programme. Framework for effective tuberculosis control*. WHO/TB/94.179. Geneva, Switzerland: WHO, 1994.
- World Health Organization. *Treatment of tuberculosis. Guidelines for national programmes*. WHO/CDS/TB 2003. 313. Geneva, Switzerland: WHO, 2003.
- World Health Organization. *Fifty-third World Health Assembly. Stop TB Initiative, report by the director-general*. A53/5, 5 May 2000. Resolution WHA53.1. Geneva, Switzerland: WHO, 2000.
- Styblo K, Bumgarner J R. Tuberculosis can be controlled with existing technologies: evidence. *TSRU Progress Report* 1991; 2: 60—72.
- Nunn P, Williams B, Floyd K, Dye C, Elzinga G, Raviglione M. Tuberculosis control in the era of HIV. *Nature Rev* 2005; 5: 819—826.
- Harries A D, Hargreaves N J, Gausi F, Kwanjana J H, Salaniponi F M. High death rates in health care workers and teachers in Malawi. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 2002; 96: 34—37.
- Salaniponi F M L, Kwanjana J, Nyasulu I, et al. Loss of tuberculosis officers from a national tuberculosis programme: the Malawi experience. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; 3: 174—175.
- Colebunders R, Bastian I. A review of the diagnosis and treatment of smear-negative pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4: 97—107.
- Greenberg S D, Frager D, Suster B, Walker S, Stavropoulos C, Rothpearl A. Active pulmonary tuberculosis in patients with AIDS: spectrum of radiographic findings (including a normal appearance). *Radiology* 1994; 193: 115—119.
- Hargreaves N J, Kadzakuanja O, Phiri S, et al. What causes smear-negative pulmonary tuberculosis in Malawi, an area of high HIV seroprevalence? *Int J Tuberc Lung Dis* 2001; 5: 113—122.
- Lucas S B, de Cock K M, Hounnou A, et al. Contribution of tuberculosis to slim disease in Africa. *BMJ* 1994; 308: 1531—1533.
- Harries A D, Hargreaves N J, Kemp J, et al. Deaths

- from tuberculosis in sub-Saharan African countries with a high prevalence of HIV-1. *Lancet* 2001; 357: 1519–1523.
- 28 Korenromp E L, Scano F, Williams B G, Dye C, Nunn P. Effects of human immunodeficiency virus infection on recurrence of tuberculosis after rifampicin-based treatment: an analytic review. *Clin Infect Dis* 2003; 37: 101–112.
- 29 Gandhi N R, Moll A, Sturm W, et al. Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. *Lancet* 2006; 368: 1575–1580.
- 30 Raviglione M C. The Global Plan to Stop TB, 2006–2015. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006; 10: 238–239.
- 31 World Health Organization Stop TB Partnership. The Global Plan to Stop TB 2006–2015. Geneva, Switzerland; WHO, 2006.
- 32 World Health Organization. Interim policy on collaborative TB/HIV activities. Stop TB Department and Department of HIV/AIDS. WHO/HTM/TB/2004.330. Geneva, Switzerland; WHO, 2004.
- 33 World Health Organization. Guidelines for the prevention of tuberculosis in health care facilities in resource-limited settings. WHO/TB/99.269. Geneva, Switzerland; WHO, 1999.
- 34 World Health Organization. Report of a ‘lessons learnt’ workshop on the six PROTEST pilot projects in Malawi, South Africa and Zambia. WHO/HTM/TB/2004.336. Geneva, Switzerland; WHO, 2004.
- 35 Lawn S D, Badri M, Wood R. Tuberculosis among HIV-infected patients receiving HAART: long term incidence and risk factors in a South African cohort. *AIDS* 2005; 19: 2109–2116.
- 36 The Antiretroviral Therapy in Lower Income Countries (ART-LINC) Collaboration and ART Cohort Collaboration (ART-CC) groups. Mortality of HIV-1-infected patients in the first year of antiretroviral therapy: comparison between low-income and high-income countries. *Lancet* 2006; 367: 817–824.
- 37 Lawn S D, Myer L, Orrell C, Bekker L-G, Wood R. Early mortality among adults accessing a community-based antiretroviral service in South Africa: implications for programme design. *AIDS* 2005; 19: 2141–2148.
- 38 Wilkinson D, Squire S B, Garner P. Effect of preventive treatment for tuberculosis in adults infected with HIV: systematic review of randomised placebo controlled trials. *BMJ* 1998; 317: 625–629.
- 39 Fitzgerald D W, Desvarieux M, Severe P, Joseph P, Johnson W D, Pape J W. Effect of post-treatment isoniazid on prevention of recurrent tuberculosis in HIV-1-infected individuals: a randomised trial. *Lancet* 2000; 356: 1470–1474.
- 40 Churchyard G J, Fielding K, Charalambous S, et al. Efficacy of secondary isoniazid preventive therapy among HIV-infected southern Africans: time to change policy? *AIDS* 2003; 17: 1–8.
- 41 World Health Organization. TB-HIV update, November 2007. Geneva, Switzerland; WHO, 2007.
- 42 Badri M, Wilson D, Wood R. Effect of highly active antiretroviral therapy on incidence of tuberculosis in South Africa: a cohort study. *Lancet* 2002; 359: 2059–2064.
- 43 Lawn S D, Badri M, Wood R. Tuberculosis among HIV-infected patients receiving HAART: long term incidence and risk factors in a South African cohort. *AIDS* 2005; 19: 2109–2116.
- 44 Golub J E, Saraceni V, Cavalcante S C, et al. The impact of antiretroviral therapy and isoniazid preventive therapy on tuberculosis incidence in HIV-infected patients in Rio de Janeiro, Brazil. *AIDS* 2007; 21: 1441–1448.
- 45 Zachariah R, Massaquoi M. Cotrimoxazole prophylaxis for HIV-positive TB patients in developing countries. *Trop Doct* 2006; 36: 79–82.
- 46 Renaud-Thery F, Nguimfack B D, Vitoria M, et al. Use of antiretroviral therapy in resource-limited countries in 2006: distribution and uptake of first-and second-line regimens. *AIDS* 2007; 21 (Suppl 4): S89–S95.
- 47 World Health Organization. Antiretroviral therapy of HIV infection in adults and adolescents in resource-limited settings, towards universal access. Recommendations for a public health approach. Geneva, Switzerland; WHO, 2006.
- 48 Swaminathan S, Luetkemeyer A, Srikantiah P, Lin R, Havlir D. Antiretroviral therapy and TB. *Trop Doct* 2006; 36: 73–79.
- 49 Zachariah R, Fitzgerald M, Massaquoi M, et al. Does antiretroviral treatment reduce case fatality among HIV-positive patients with tuberculosis in Malawi? *Int J Tuberc Lung Dis* 2007; 11: 848–853.
- 50 Harries A D, Chimzizi R, Zachariah R. Safety, effectiveness, and outcomes of concomitant use of highly active antiretroviral therapy with drugs for tuberculosis in resource-poor settings. *Lancet* 2006; 367: 944–945.
- 51 Chen L, Evans T, Anand S, et al. Human resources for health: overcoming the crisis. *Lancet* 2004; 364: 1984–1990.