

· 论 著 ·

环介导等温扩增技术在结核性脑膜炎 早期诊断中的应用价值

刘权贤¹, 郭定涛², 陈玲¹, 陈镇永¹, 李娜娜¹, 兰远波¹

1. 遵义医科大学附属医院呼吸与危重症医学科结核病区, 贵州 遵义 563000;

2. 遵义医科大学附属医院康复科, 贵州 遵义 563000

摘要: **目的** 评估环介导等温扩增技术(LAMP)快速诊断结核性脑膜炎(TBM)的临床应用及其价值。**方法** 收集2019年10月至2020年11月于遵义医科大学附属医院就诊的可疑TBM患者脑脊液标本61例,其中23例在采集脑脊液前已行抗结核治疗。分别使用涂片抗酸染色法、罗氏固体培养法和LAMP法检测脑脊液标本中的结核分枝杆菌。计算三种检测技术对TBM的诊断效能。**结果** 涂片抗酸染色法、罗氏固体培养法、LAMP法检测所用时间一般分别为1 d、50 d及1 h。61例患者中46例临床诊断为TBM,涂片抗酸染色法、罗氏固体培养法和LAMP法对TBM诊断的敏感度分别为2.17%(1/46)、17.39%(8/46)和34.78%(16/46),三种方法比较差异有统计学意义($\chi^2=16.511$, $P<0.01$),LAMP法敏感度最高。LAMP技术诊断TBM的特异度为93.33%(14/15),其余2种检测方法均为100%(15/15)。涂片抗酸染色法、罗氏固体培养法和LAMP法对TBM诊断的准确率分别为26.23%(16/61)、37.70%(23/61)和49.18%(30/61),三种方法比较差异有统计学意义($\chi^2=6.840$, $P<0.05$),LAMP法准确率最高。**结论** LAMP法检测脑脊液标本中的结核分枝杆菌,具有快速、敏感度和特异度较高等优点,可提高脑脊液标本中结核分枝杆菌的检出率,可应用于TBM的早期快速诊断。

关键词: 结核性脑膜炎; 脑脊液; 结核分枝杆菌; 环介导等温扩增技术; 核酸扩增

中图分类号: R529.3 R446.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2021)12-1626-04

Loop-mediated isothermal amplification in the early diagnosis of tuberculous meningitis

LIU Quan-xian*, GUO Ding-tao, CHEN Ling, CHEN Zhen-yong, LI Na-na, LAN Yuan-bo

* Department of Respiratory and Critical Care Medicine (Tuberculosis Ward), Affiliated Hospital of

Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou 563000, China

Corresponding author: CHEN Ling, E-mail: lingjuncd@163.com

Abstract: Objective To evaluate the clinical value of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in rapid diagnosis of tuberculous meningitis (TBM). **Methods** Cerebrospinal fluid samples were collected from 61 patients with suspected TBM admitted to the Affiliated Hospital of Zunyi Medical University from October 2019 to November 2020, and anti-tuberculosis treatment was conducted in 23 cases before collecting cerebrospinal fluid. The mycobacterium tuberculosis in cerebrospinal fluid samples were detected by acid-fast smear staining, L-J medium culture and LAMP method, respectively. The diagnostic efficacy of three detection techniques for TBM was evaluated. **Results** Of 61 patients, 46 cases were clinically diagnosed as TBM. In the diagnosis of TBM, the sensitivities of smear acid-fast staining, L-J medium culture and LAMP were 2.17% (1/46), 17.39% (8/46) and 34.78% (16/46), respectively, and there was a significant difference in it among three methods ($\chi^2=16.511$, $P<0.01$). The specificities of LAMP, acid-fast staining and L-J medium culture were 93.33% (14/15), 100% (15/15) and 100% (15/15), respectively. The diagnostic accuracies of acid-fast staining, L-J medium culture and LAMP were 26.23% (16/61), 37.70% (23/61) and 49.18% (30/61), respectively, and there was a significant difference in it among three methods ($\chi^2=$

DOI: 10.13429/j.cnki.cjcr.2021.12.006

基金项目: 贵州省科技计划项目(黔科合成果[2020]4Y015); 贵州省卫生健康委科学技术基金项目(gzwhkj2019-1-085)

通信作者: 陈玲, E-mail: lingjuncd@163.com

6.840, $P < 0.05$). The sensitivity and accuracy of LAMP were the highest among three methods. **Conclusion** LAMP detection for TBM in cerebrospinal fluid specimens has the advantages of high speed, sensitivity and specificity and can improve the detection rate of TBM, which can be applied in the early and rapid diagnosis of TBM.

Keywords: Tuberculous meningitis; Cerebrospinal fluid; *Mycobacterium tuberculosis*; Loop-mediated isothermal amplification; Nucleic acid amplification

Fund program: Guizhou Science and Technology Program (Qiankehe Achievement [2020] 4Y015); Science and Technology Fund Project of Guizhou Health Commission (gzwjkj2019-1-085)

结核性脑膜炎 (tuberculous meningitis, TBM) 是由结核分枝杆菌侵犯脑膜引起的非化脓性炎性疾病。是最为严重的肺外结核病和最常见的大脑神经系统结核病^[1-2], 占神经系统结核病的 70% 左右, 死亡率可高达 44%~69%^[3], 20%~30% 的 TBM 患者遗留永久性中枢神经系统后遗症^[4], 研究表明, 降低 TBM 患者病死率和致残率的关键措施是早期正确诊断并予以有效抗结核等综合治疗。目前, TBM 的诊断, 主要是通过临床症状、体征、影像学表现及脑脊液检查等进行综合诊断。然而, TBM 临床症状、体征、影像学表现不典型且缺乏特异性, 通过上述手段早期快速正确诊断 TBM 极其困难, 但随着对结核病发病机制研究的深入, 目前结核的诊断技术有了快速发展^[5]。脑脊液实验室检查中, 脑脊液生化指标如腺苷脱氨酶 (ADA) 诊断价值有限, 不能准确鉴别细菌性脑膜炎和 TBM^[6]; TBM 的免疫学诊断方法如 γ -干扰素释放试验 (IGRA)、结核感染 T 淋巴细胞斑点试验 (T cells spot test of tuberculosis infection, T-SPOT.TB) 主要用于潜伏性结核感染 (latent tuberculosis infection, LTBI) 的诊断, 对活动性结核的诊断价值存在一定争议; 细菌学方面的抗酸染色检查阳性率极低 (小于 10%)^[7]、敏感度低; 结核菌培养耗时长, 不能满足早期快速诊断的需求。分子生物学方法如 GeneXpert, 需要精密仪器, 检测费用昂贵^[8]; 而环介导等温扩增 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 技术是一种灵敏度和特异度显著提高的核酸扩增方法, 其具有快速性, 并不需要昂贵的试剂或仪器^[9-10]。本研究采用 LAMP 技术检测脑脊液标本中结核分枝杆菌, 比较脑脊液结核分枝杆菌涂片法、罗氏固体培养法及 LAMP 技术在 TBM 患者脑脊液标本中结核分枝杆菌的阳性检出率, 探讨 LAMP 技术对 TBM 的早期快速诊断价值。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选取 2019 年 10 月至 2020 年 11 月于遵义医科大学附属医院就诊的可疑 TBM 患者 61

例。参照国际 TBM 协作组制定的 TBM 诊断标准^[11], 最终临床诊断为 TBM 患者 (TBM 组) 46 例, 其中男性 29 例 (63.04%), 女性 17 例 (36.96%); 年龄 15~72 (41.0±17.1) 岁; 病程 1~365 d; 23 例 (50.00%) 在采集脑脊液标本前未抗结核治疗, 余 23 例 (50.00%) 在采集脑脊液前已抗结核治疗, 抗结核治疗时间 0~365 d。排除 TBM 的患者 15 例 (非 TBM 组), 其中男性 12 例 (80.00%), 女性 3 例 (20.00%); 年龄 13~64 (42.7±16.1) 岁; 病毒性脑膜炎 9 例、细菌性脑膜炎 5 例、肺癌脑转移 1 例; 其病程 1~60 d; 采集脑脊液前无抗结核治疗。对两组 61 例患者均行腰椎穿刺术, 每例患者采集脑脊液标本 15 ml, 均分为三等份, 每份 5 ml, 分别进行涂片抗酸染色、罗氏固体培养和 LAMP 检测。研究经医院伦理委员会同意, 所有患者均同意收集其脑脊液标本用于本次临床研究并签署知情同意书。课题组成员已接受 LAMP 操作专业培训。

1.2 TBM 诊断参照标准 参照 2010 年国际 TBM 协作组制定的 TBM 诊断标准, 评分标准见表 1。(1) 确诊的 TBM 患者: 有脑膜炎的症状和体征, 且脑脊液涂片抗酸染色镜检发现抗酸杆菌, 或脑脊液罗氏固体培养发现结核分枝杆菌, 或脑脊液结核分枝杆菌核酸扩增检测 (GeneXpert 检测) 发现结核分枝杆菌复合群阳性。(2) 很可能的 TBM 患者: 当有神经系统影像检查时评分 ≥ 12 分, 或当无神经系统影像检查时评分 ≥ 10 分; 脑脊液检查或影像检查至少评分 2 分。(3) 可能的 TBM 患者: 当有神经系统影像检查时评分 6~11 分, 或当无神经系统影像检查时评分 6~9 分。

1.3 研究方法

1.3.1 涂片抗酸染色及镜检 取脑脊液标本 5 ml, 抗凝后离心 10 min, 丢弃上清, 取沉渣均匀涂抹于玻片 2/3 处, 将玻片置于染色架上, 用火焰固定, 滴加苯酚复红染液, 盖满玻片, 加热至出现蒸汽后脱离火焰, 保持 5 min, 轻缓冲洗, 沥水, 滴加脱色液, 保持 1 min, 再滴加亚甲蓝溶液染色 30 s, 最后水洗干燥后进行镜

检,用显微镜读片观察 300 个视野后报告结果。

1.3.2 罗氏结核分枝杆菌培养 取脑脊液 5 ml,抗凝后离心 10 min,丢弃上清,取 4 倍体积的 4% NaOH 溶于离心后的脑脊液沉渣标本中,震荡摇匀,并静置 15 min;用一次性无菌吸管分别取 2~3 滴均匀分布于两管酸性培养基斜面的上、中、下部,盖紧盖子,将接种标本的培养基管斜放入 37 °C 培养箱中,分别在第 3 天和第 7 天各观察 1 次,此后每周观察 1 次,并记录结果。至第 8 周无菌落生长则报告为阴性。当结果为阳性时,再采用对硝基苯甲酸鉴定菌落为结核分枝杆菌或非结核分枝杆菌。

1.3.3 LAMP 法检测结核分枝杆菌复合群 取脑脊液 5 ml,离心后取 60 μl 加入样本处理试管中,参照《结核分枝杆菌复合群(DNA)检测试剂盒(TB-LAMP 法)使用说明书》提取脑脊液结核分枝杆菌 DNA 进行 LAMP 反应,于 67 °C 反应 40 min。然后放入恒温荧光核酸扩增 LF-160 的荧光目视检测单元。通过紫外线激发荧光观察反应结果。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件进行数据分析。计数资料以例(%)表述,组间比较采用 χ^2 检验;计算三种检测方法对 TBM 的诊断效能(敏感度、特异度、准确率)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三种检测方法对脑脊液结核分枝杆菌的阳性检出率及检测所用时间 在 61 例疑似 TBM 患者中,涂片抗酸染色镜检、罗氏固体培养和 LAMP 对脑脊液标本中结核分枝杆菌的阳性检出分别为 1 例(1.64%)、8 例(13.11%)和 17 例(27.87%),以 LAMP 方法检出率最高;其中除 LAMP 检出 1 例阳性者临床诊断为非 TBM(即假阳性)外,其余三种方法诊断阳性者均为 TBM 患者,与临床诊断符合。检测所用时间涂片抗酸染色镜检一般为 1 d、罗氏固体培养法一般为 50 d,LAMP 法一般为 1 h,LAMP 检测所用时间最短。

2.2 三种检测方法对 TBM 的诊断效能 本研究的 61 例患者中,涂片抗酸染色法诊断 TBM 的敏感度为 2.17%(1/46)、特异度为 100.00%(15/15)、准确率为 26.23%(16/61)。罗氏固体培养法诊断 TBM 的敏感度为 17.39%(8/46)、特异度为 100.00%(15/15)、准确率为 37.70%(23/61)。LAMP 法诊断 TBM 的敏感度为 34.78%(16/46)、特异度为 93.33%(14/15)、准确率为 49.18%(30/61)。三种方法对 TBM 的诊断敏感度($\chi^2 = 16.511, P < 0.01$)和准确率($\chi^2 = 6.840, P <$

0.05)比较差异均有统计学意义,均以 LAMP 法最高。见表 2。

表 1 TBM 诊断标准

诊断标准	评分
临床标准(最高评分=6分)	
TBM 症状(发热、头痛、呕吐)持续超过 5 d	4
症状提示结核病(至少 1 项):体重下降、盗汗或持续咳嗽超过 2 周	2
近期有肺结核患者密切接触史,或 IGRA 阳性/结核菌素试验(TST)强阳性	2
局灶神经损害(偏瘫、截瘫等)	1
颅神经麻痹	1
意识障碍	1
脑脊液标准(最高评分=4分)	
外观清亮	1
细胞数:10~500 个/ μ l	1
淋巴细胞为主(>50%)	1
蛋白含量>1 g/L	1
脑脊液与血浆葡萄糖比例<50%或脑脊液葡萄糖浓度<2.2 mmol/L	1
颅脑影像检查标准(最高评分=6分)	
脑积水(CT 或 MRI)	1
基底脑膜强化(CT 或 MRI)	2
结核球(CT 或 MRI)	2
脑梗死(CT 或 MRI)	1
增强前基底池高密度(CT)	2
其他部位的结核病证据(最高评分=4分)	
胸部影像检查提示活动性肺结核(除粟粒性结核病)	2
胸部影像检查提示粟粒性结核病	4
影像或超声检查提示中枢神经系统结核病外的结核病	2
从其他部位发现抗酸杆菌或培养发现分枝杆菌(如痰、淋巴结、胃液、尿和血等)	4
从神经系统外的标本结核分枝杆菌(GeneXpert)检测结核分枝杆菌复合群阳性	4

表 2 三种检测方法对 TBM 的诊断效能

检测方法	临床诊断(例)		敏感度 (%)	特异度 (%)	准确率 (%)
	TBM (n=46)	非 TBM (n=15)			
涂片抗酸染色					
阳性	1	0	2.17	100.00	26.23
阴性	45	15			
罗氏培养法					
阳性	8	0	17.39	100.00	37.70
阴性	38	15			
LAMP 法					
阳性	16	1	34.78	93.33	49.18
阴性	30	14			
χ^2 值			16.511	2.045	6.840
P 值			<0.01	>0.05	<0.05

3 讨论

TBM 是一种严重的肺外结核病,发病率、致残率

及死亡率高^[12-13],其预后与早期快速诊断密切相关。但 TBM 临床表现不典型,现有检查手段不能满足快速、准确、价廉的早期快速诊断要求。因此,如何在 TBM 早期诊断中提高病原学诊断效率具有重要意义。LAMP 技术是近年来兴起的一种新型分子生物学检测技术,主要是针对结核分枝杆菌 DNA 上的六个区段设计四个不同的引物,利用链置换反应,对目标 DNA 进行大量扩增。具有快速、准确、价廉的特点。2016年7月,WHO 推荐将 LAMP 检测技术用于肺结核诊断,但其对肺外结核,包括 TBM 的诊断价值研究还很少。本研究对临床疑诊 TBM 患者的脑脊液标本进行三种检测方法的比较,发现诊断 TBM 的敏感度、准确率,涂片抗酸染色法为 2.27%、26.23%,罗氏固体培养法为 17.39%、37.70%,LAMP 法的敏感度(34.78%)最高,准确率(49.18%)也最高。鉴于罗氏固体培养耗时长(平均约需 50 d),抗酸染色法需 1 d,而 LAMP 法检测仅需 1 h,提示 LAMP 法在 TBM 的早期诊断中具有较高的临床价值,可替代涂片抗酸染色。Bhasin 等^[14]发现,LAMP 法检测 TBM 脑脊液标本的敏感度和特异度分别为 75.6%、98%。孙雯雯等^[15]采用涂片法、MGIT 960 培养法、实时荧光定量聚合酶链反应法和 LAMP 技术检测抗结核治疗前疑诊 TBM 患者的脑脊液标本,结果表明 LAMP 检测技术诊断 TBM 的敏感度为 43.02%,特异度为 92.86%。本研究结果中 LAMP 法对 TBM 的敏感度(34.78%)低于上述国内外同类研究,特异度与孙雯雯等^[15]研究结果一致。考虑原因可能与本研究在采集脑脊液前 TBM 患者中已有 50.00%接受抗结核治疗有关,抗结核治疗导致脑脊液标本中结核分枝杆菌载量减少从而影响研究结果。

本研究中,有 1 例患者脑脊液标本使用 LAMP 法检测阳性,但采用罗氏培养法及涂片抗酸染色法检测均为阴性,最终通过疗效反应及追踪观察排除 TBM,提示 LAMP 检测可能存在一定的假阳性,原因可能是 LAMP 反应的高敏感性极易使样本与反应体系发生污染;同时,也容易受到含高拷贝数阳性 DNA 的阳性对照样品的污染。因此,为了防止假阳性结果的出现,操作者应严格按照操作规程进行操作,应该在除阳性对照用的反应试管以外的所有反应试管的盖子

都关上后,最后再添加阳性对照。

综上所述,LAMP 技术在对 TBM 的诊断中,较涂片抗酸染色法、罗氏固体培养法有更高的敏感度和准确率,且特异度与该二者相仿,因其简便、快速、准确,可替代涂片抗酸染色法用于 TBM 的快速诊断。

参考文献

- [1] Donovan J, Figaji A, Imran D, et al. The neurocritical care of tuberculous meningitis [J]. *Lancet Neurol*, 2019, 18(8): 771-783.
- [2] 张莉, 马雪娇, 李家斌. 42 例结核性脑膜炎临床特征及预后影响因素分析 [J]. *热带医学杂志*, 2020, 20(5): 103-106.
- [3] 吴怡, 许红梅. TBM 免疫学及分子生物学诊断的新进展 [J]. *儿科药理学杂志*, 2012, 18(6): 60-65.
- [4] 邹月丽, 孙伟, 郭力, 等. Xpert MTB/RIF 对结核性脑膜炎的早期诊断价值 [J]. *中国综合临床*, 2015, 31(9): 782-784.
- [5] 李忠奇, 吴冰心, 刘巧, 等. 结核病实验室诊断技术研究进展 [J]. *中国热带医学*, 2020, 20(4): 381-384.
- [6] Tuon FF, Higashino HR, Lopes MI, et al. Adenosine deaminase and tuberculous meningitis a systematic review with meta-analysis [J]. *Scand J Infect Dis*, 2010, 42: 198-207.
- [7] 李堃毅, 曾可斌. 脑脊液在 TBM 诊断中的应用进展 [J]. *现代医药卫生*, 2017, 33(10): 1490-1494.
- [8] Metiana T, Soria J, Montano SM, et al. Evaluation of the GeneXpert MTB/RIF in patients with presumptive tuberculous meningitis [J]. *PLoS One*, 2018, 13(6): e0198695.
- [9] Kashir J, Yaqinuddin A. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) assays as a rapid diagnostic for COVID-19 [J]. *Med Hypotheses*, 2020, 141: 109786.
- [10] Modi M, Sharma K, Sharma M, et al. Multitargeted loop-mediated isothermal amplification for rapid diagnosis of tuberculous meningitis [J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2016, 20(5): 625-630.
- [11] Marais S, Thwaites G, Schoeman JF, et al. Tuberculous meningitis; a uniform case definition for use in clinical research [J]. *Lancet Infect Dis*, 2010, 10(11): 803-812.
- [12] Sasikumar C, Barve K, Desai U, et al. Role of GeneXpert in the diagnosis of mycobacterium tuberculosis [J]. *Adv Respir Med*, 2020, 88: 184-188.
- [13] Khan MK, Islam MN, Ferdous J, et al. An overview on epidemiology of tuberculosis [J]. *Mymensingh Med J*, 2019, 28(1): 259-266.
- [14] Bhasin H, Goyal M, Sharma S. Advances in the diagnosis and management of tubercular meningitis in children [J]. *Indian J Pediatr*, 2020, 87(1): 26-33.
- [15] 孙雯雯, 肖和平. 环介导等温扩增技术早期诊断结核性脑膜炎的研究 [J]. *中国防痨杂志*, 2016, 38(12): 1102-1108.

收稿日期: 2021-05-21 修回日期: 2021-07-28 编辑: 石嘉莹