

恒温扩增实时荧光检测快速诊断结核性脑膜炎的临床价值

欧维正, 秦 万, 王 琼, 王明栋, 张 娟, 徐 勇, 张廷梅

(贵阳市公共卫生救治中心, 贵州 贵阳 550003)

摘要: **目的** 探讨恒温扩增实时荧光检测 (SAT) 快速诊断结核性脑膜炎 (TBM) 的临床价值。**方法** 选取疑似中枢神经系统感染患者 496 例, 其中 328 例最终临床诊断为 TBM (TBM 组), 另外 168 例经临床鉴别诊断排除 TBM (对照组)。分别采用培养法、聚合酶链反应 (PCR) 和 SAT 同时检测 2 组患者脑脊液样本, 比较 3 种方法检测结核分枝杆菌 (MTB) 的效能。**结果** 以临床诊断 TBM 为标准, SAT 检测脑脊液样本 MTB 的敏感性 (15.24%) 高于培养法 (11.28%) ($\chi^2=2.24, P>0.05$) 和 PCR (6.71%) ($\chi^2=12.23, P<0.05$); 特异性 (99.40%) 略低于培养法和 PCR (均为 100%) ($\chi^2=1.00, P>0.05$)。以培养法为标准, TBM 组 SAT 检测脑脊液 MTB 的敏感性 (37.84%) 高于 PCR (21.62%), 特异性 (87.63%) 和符合率 (82.01%) 低于 PCR (95.19% 和 86.89%)。培养法与 SAT 比较, MTB 阳性检出率差异无统计学意义 ($\chi^2=2.24, P>0.05$); 与 PCR 比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2=4.19, P<0.05$)。**结论** SAT 可快速检测脑脊液中的 MTB, 敏感性高于培养法和 PCR, 有助于 TBM 的早期诊断。3 种方法联合检测可提高脑脊液 MTB 的阳性检出率。

关键词: 核酸扩增技术; 结核分枝杆菌; 结核性脑膜炎; 评价研究

Clinical role of SAT in the diagnosis of tubercular meningitis OU Weizheng, QIN Wan, WANG Qiong, WANG Mingdong, ZHANG Juan, XU Yong, ZHANG Tingmei. (Guiyang Public Health Treatment Center, Guiyang 550003, Guizhou, China)

Abstract: Objective To investigate the clinical role of simultaneous amplification and testing (SAT) in the diagnosis of tubercular meningitis (TBM). **Methods** A total of 496 suspected patients diagnosed central nervous system infection were enrolled. Among them, 328 patients who were clinically diagnosed as TBM were enrolled as TBM group, while the remaining 168 patients who were clinically excluded were enrolled as control group. The cerebrospinal fluid specimens were collected and analyzed by L-J culture method, nucleic acid polymerase chain reaction (PCR) and SAT. The efficiencies of the 3 methods in detecting *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) were compared. **Results** Taking the clinical diagnosis of TBM as gold standards, the sensitivity and specificity of SAT in detecting MTB were 15.24% and 99.40%, respectively, the sensitivity of SAT was higher than those of L-J culture method (11.28%) ($\chi^2=2.24, P>0.05$) and PCR (6.71%) ($\chi^2=12.23, P<0.05$). The specificity of SAT was lower than those of L-J culture method and PCR (100%) ($\chi^2=1.00, P>0.05$). Taking L-J culture method as gold standards, in TBM group, the sensitivity, specificity and consistency rate of SAT were 37.84%, 87.63% and 82.01%, respectively. The sensitivity of SAT was higher than that of PCR (21.62%), while the specificity and consistency rate were lower than those of PCR (95.19% and 86.89%). The MTB positive detection rate of L-J culture method had no statistical significance with that of SAT ($\chi^2=2.24, P>0.05$), but had statistical significance with that of PCR ($\chi^2=4.19, P<0.05$). **Conclusions** SAT can rapidly detect MTB in cerebrospinal fluid, its sensitivity is higher than those of L-J culture method and PCR and it can provide a reference for the early diagnosis of TBM. The combined detection of the 3 methods can improve the positive detection rate of MTB in cerebrospinal fluid specimens.

Key words: Nucleic acid amplification technique; *Mycobacterium tuberculosis*; Tubercular meningitis; Efficiency evaluation

基金项目: 贵阳市科技计划项目 (筑科合同 [2018] 1-41 号)

作者简介: 欧维正, 男, 1969 年生, 学生, 主任技师, 主要从事结核病实验室诊断工作。

通信作者: 张廷梅, 联系电话: 0851-85955670。

结核性脑膜炎 (tuberculous meningitis, TBM) 是由结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 引起的最严重的肺外结核病, 占有肺外结核病的 5%~10%^[1], 发病率高, 病死率可达 15%~30%^[2]。目前, 诊断 TBM 主要依据临床症状和脑脊液检测, 其中病原学检测是诊断的金标准。脑脊液样本中 MTB 载量低, 导致抗酸染色法敏感性差, 且不能区分 MTB 和非结核分枝杆菌 (nontuberculous *Mycobacterium*, NTM); 培养法虽然结果精确、可靠, 但培养周期为 6~8 周, 易延误治疗。MTB 核酸检测技术分为 2 类: 一类是以 RNA 扩增为基础、以 DNA 为检测靶标的核酸检测技术, 如荧光探针聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR), 目前国内外商品化的 MTB 核酸试剂多基于此类技术; 一类是以 RNA 扩增为基础、以为检测靶标的核酸检测技术, 如恒温扩增实时荧光检测 (simultaneous amplification and testing, SAT)。MTB 核酸检测技术敏感性高、速度快, 目前已被广泛应用于临床。本研究通过比较培养法、PCR 和 SAT 检测脑脊液样本中 MTB 的效能, 评价 SAT 在 TBM 诊断中的应用价值。

1 材料和方法

1.1 研究对象

选取 2017 年 6 月—2018 年 9 月贵阳市公共卫生救治中心疑似中枢神经系统感染的患者 496 例, 其中 328 例最终临床诊断为 TBM (TBM 组) [男 197 例、女 131 例, 年龄 (33.5±18.7) 岁]; 另外 168 例经临床鉴别诊断排除 TBM (对照组) [男 100 例、女 68 例, 年龄 (40.8±20.5) 岁]。

1.2 主要仪器和试剂

ABI 7300 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司)、Extractor 36 核酸快速提取仪 (北京博奥生物有限公司)、TL988 实时荧光定量 PCR 仪 (西安天隆科技有限公司)、FZP-1 核酸提纯仪 (上海仁度生物科技有限公司)、K30 干式恒温器 (上海之信仪器有限公司) 等; 罗氏固体培养基和对硝基苯甲酸 (p-Nitrobenzoic acid, PNB) 培养基 (珠海银科医学工程有限公司)、分枝杆菌核酸检测 (PCR-荧光探针法) 试剂盒 (北京博奥生物有限公司)、结核分枝

杆菌核酸检测 (RNA 恒温扩增法) 试剂盒 (上海仁度生物科技有限公司)。

1.3 方法

采集所有患者脑脊液样本约 6 mL, 分 2 管送检, 1 管 (约 2 mL) 用于细菌培养, 1 管 (约 4 mL) 用于 PCR 和 SAT。

1.3.1 细菌培养 将脑脊液样本直接接种于罗氏固体培养基上, 若满 8 周仍无细菌生长, 即报告培养阴性。分离到的菌株参照文献 [3] 进行 PNB 试验, 如菌株在 PNB 培养基上生长, 则鉴定为 NTM, 反之鉴定为 MTB。

1.3.2 PCR 将约 2 mL 脑脊液样本按工作手册^[4]进行 PCR。样本 MTB 扩增曲线呈 S 型, 且循环阈值 (cycle threshold, Ct) < 36 判定为 MTB-DNA 阳性; 样本 NTM 扩增曲线呈 S 型, 且 Ct 值 < 40 判定为 NTM-DNA 阳性; MTB-DNA 和 NTM-DNA 均为阳性时, 判为 MTB-DNA 阳性; MTB-DNA 和 NTM-DNA 均为阴性时, 判为无分枝杆菌检出。以试剂盒自带的阴性、阳性对照作为质控。

1.3.3 SAT 将约 1.5 mL 脑脊液样本加入 1.5 mL 离心管中, 14 170×g 离心 5 min, 弃上清; 加入 50 μL MTB-RNA 稀释液, 充分震荡后悬浮, 制成待测样本。将待测样本和 50 μL 阴性对照放入 FZP-1 核酸提纯仪内 (液体要浸在水面以下), 超声处理 15 min 后取出, 再 14 170×g 离心 5 min, 上清即为提取的 RNA。取 2 μL 提取好的 RNA 加入含 30 μL 扩增检测液的洁净微量反应管中, 于 K30 干式恒温器内 60 °C 放置 10 min, 再 42 °C 放置 5 min, 之后保持在 42 °C, 加入 10 μL SAT 酶; 采用 TL988 实时荧光定量 PCR 仪进行扩增 (42 °C 1 min, 40 个循环, 每分钟采 1 次荧光, 选取 FAM 通道)。结果判断: Ct 值 < 40 判定为 MTB-RNA 阳性, Ct 值 ≥ 40 判定为 MTB-RNA 阴性。以试剂盒自带的阴、阳性对照作为质控。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。计数资料以例或率表示, 组间比较采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TBM 组和对照组 3 种方法检测结果

496 例脑脊液样本中, 培养法分离到 37 株

(7.46%) 菌株, 经 PNB 试验鉴定均为 MTB。SAT 检出 MTB-RNA 阳性 51 例 (10.28%)。见 PCR 检测检出 MTB-DNA 阳性 22 例 (4.44%), 表 1。

表 1 TBM 组与对照组 3 种方法检测结果

组别	培养法		PCR		SAT	
	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性
TBM 组	37	291	22	306	50	278
对照组	0	168	0	168	1	167

2.2 以临床诊断 TBM 为金标准, TBM 组和对照组 3 种方法 MTB 检测效能比较

SAT 检测 MTB 的敏感性最高 (15.24%), 与培养法比较, 差异无统计学意义 ($\chi^2=2.24$, $P>0.05$); 与 RCR 比较, 差异有统计学意义

($\chi^2=12.23$, $P<0.05$)。培养法和 PCR 检测 MTB 的特异性均为 100%, 但与 SAT (特异性为 99.40%) 比较, 差异无统计学意义 ($\chi^2=1.00$, $P>0.05$)。见表 2。

表 2 3 种方法 MTB 检测效能

方法	敏感性/%	特异性/%	符合率/%	误诊率/%	漏诊率/%	Youden 指数	阳性预测值/%	阴性预测值/%
培养法	11.28	100	41.33	0	88.72	11.28	100	36.60
PCR	6.71*	100	38.31	0	93.29	6.71	100	35.44
SAT	15.24	99.40	43.75	0.60	84.76	14.65	98.04	37.53

注: 与 SAT 比较, $P<0.05$

2.3 以培养法为标准, TBM 组 3 种方法 MTB 检测结果比较

TBM 组 328 例脑脊液样本中, 77 例 (23.48%) 检测到 MTB。以培养法为标准, SAT 的符合率为 82.01%, 敏感性为 37.84%, 特异性为 87.6%。PCR 的符合率为 86.89%、敏感性为 21.62%、特异性为 95.19%。见表 3。

表 3 TBM 组 3 种方法 MTB 检测结果比较

培养法	PCR*		SAT	
	阳性	阴性	阳性	阴性
阳性	8	29	14	23
阴性	14	277	36	255

注: 与培养法 MTB 阳性比较, * $P<0.05$

3 讨论

TBM 属于重症结核病, 是结核病患者死亡的主要原因之一。对 TBM 患者进行早期诊断、规范治疗, 可显著降低其致残率、致死率^[5]。由于 TBM 患者病情轻重程度不同、就诊阶段不同、临床表现多样, 加之脑脊液实验室检查特征性结果较少, 导致确诊 TBM 的难度较大, 但检出脑脊液样本中的 MTB 仍然是确诊 TBM 的金标准。

SAT 方法是基于转录介导扩增 (transcription mediated amplification, TMA) 和恒温扩增技术

发展起来的一项新的核酸检测技术, 其原理是通过设计特异性的 MTB 核糖体 RNA 扩增引物及优化探针技术, 使用 M-MLV 反转录酶及极高转录活性的 T7 RNA 多聚酶同时实现核酸恒温扩增和实时荧光检测, 能够快速、直观地反映样本中有无 MTB。与传统的基于 DNA 模板的核酸扩增技术相比, 其优点为^[6]: (1) 对仪器的要求低, 操作简便, 稳定性和结果准确性高; (2) 起始靶标为环境中极易降解的 RNA, 可有效避免污染; (3) 因 RNA 只在活菌中存在, SAT 还可监测疾病活动性及药物疗效; (4) RNA 拷贝数比 DNA 的拷贝数高, 并且荧光标记的 RNA 探针可同步检测扩增信号, 提高检测敏感性。

本研究采用培养法、PCR 和 SAT 对脑脊液样本进行同步检测, 比较 3 种方法检测结果, 以评估 SAT 快速检测脑脊液样本中 MTB 的效能, 结果显示, 以临床诊断 TBM 作为标准, SAT 检测 MTB 的敏感性为 15.24%, 与培养法 (11.28%) 比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 与 PCR (6.71%) 比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 与张海晴等^[7]的研究结果一致。目前, 关于 SAT 检测脑脊液样本的研究较少, 而对其检测痰液、支气管肺泡灌洗液、胸腔积液等样本的研究^[8-9]较多, 结果均显示 SAT 对这些样本中的 MTB 有较高的检测敏感性, 并优于培养

法。本研究采用的3种方法在操作上均无需对脑脊液样本进行前处理,保证了3种方法检测前样本的一致性,增加了检测结果的可比性。但因脑脊液载菌量低、取样量少,抗结核药物治疗后脑脊液细菌负荷量迅速下降^[10]等因素,往往导致MTB检测敏感性不高。2009年,英国感染学会建议TBM患者在抗结核药物治疗前留取不少于6 mL的脑脊液进行细菌学检查,并且在检测前将脑脊液样本3 000×g离心至少20 min^[11]。

本研究结果显示,SAT检测MTB的特异性为99.40%,略低于培养法和PCR(100%),但差异均无统计学意义($P>0.05$)。SAT和PCR同属于分子生物学检测方法,控制实验室污染是检测成功的关键。2000年,BARAN等^[12]指出,SAT虽然具有一定的检测效率,但仍然存在一定的假阳性率与假阴性率。尽管SAT检测的RNA易降解,但操作不当仍然可能会造成污染。本研究SAT检测出现1例假阳性,提示该技术在操作过程中应严格遵守各项规范,避免人为因素降低其检测效能。

本研究结果表明,培养法MTB阳性检出率与SAT差异无统计学意义,与PCR差异有统计学意义。SAT对脑脊液MTB的检测效果更接近培养法,优于PCR和SAT,有明显的快检优势。

RNA降解快,如果患者的脑脊液含菌量不多,而SAT操作时间控制不当,如放在核酸提纯仪中超声处理留置时间过长,也可能造成SAT对MTB的检出率下降^[13];另外,若样本中或容器内存在核酸扩增抑制剂,检测出现假阴性的可能性会增加^[14]。这些均可能导致部分结果培养法为阳性,而SAT检测阴性。

本研究结果表明,3种方法脑脊液MTB阳性总检出率为23.48%,优于单一使用任一方法。目前,尚无一种可快速、准确地诊断结核病的方法,采用SAT、PCR等快速分子诊断技术联合传统的培养方法,不仅可以提高诊断率,还可以缩短诊断周期,为临床对结核病的诊治提供更准确、更快速的依据。

综上所述,SAT能快速检测脑脊液中的MTB,敏感性较高,可用于对TBM患者进行早

期诊断。3种方法联合检测可提高脑脊液MTB的阳性检出率。

参考文献

- [1] MODI M, SHARMA K, PRABHAKAR S, et al. Clinical and radiological predictors of outcome in tubercular meningitis: a prospective study of 209 patients[J]. Clin Neurol Neurosurg, 2017, 161: 29-34.
- [2] 崔中锋,刘春礼,李格,等. T-SOPT.TB在结核性脑膜炎早期诊断中的价值[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2016, 19(16): 97-98.
- [3] 王魁民,朱建华,张立兴. 结核病诊断实验室检验规程[M]. 北京: 中国教育文化出版社, 2006.
- [4] 袁薇,雷世光. 实用结核病实验室工作手册[M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2015.
- [5] BAHN N C, MARAIS S, CAWS M, et al. GeneXpert MTB/Rif to diagnose tuberculous meningitis: perhaps the first test but not the last[J]. Clin Infect Dis, 2016, 62(9): 1133-1135.
- [6] 沙巍,何娅,蒋瑞华,等. 实时荧光核酸恒温放大检测(SAT)法对肺结核诊断价值的研究[J]. 中国防痨杂志, 2012, 34(6): 377-379.
- [7] 张海晴,黄海滨,王春颖,等. RNA恒温扩增实时荧光检测技术在检测脑脊液中结核分枝杆菌的应用[J]. 广东医学, 2017, 38(11): 1715-1716.
- [8] 王静,刘立宾,岳永宁,等. TB-SAT检测支气管肺泡灌洗液诊断肺结核的价值研究[J]. 预防医学, 2018, 30(4): 429-431.
- [9] 廖鲁燕,赵明伟,杨国峰. RNA恒温扩增实时荧光检测技术对结核性胸腔积液的诊断价值[J]. 中国防痨杂志, 2018, 40(1): 84-86.
- [10] 段鸿飞. 重视结核性脑膜炎的诊断和治疗[J]. 中国防痨杂志, 2019, 41(1): 14-17.
- [11] THWAITES G, FISHER M, HEMINGWAY C, et al. British Infection Society guidelines for the diagnosis and treatment of tuberculosis of the central nervous system in adults and children[J]. J Infect, 2009, 59(3): 167-187.
- [12] BARAN J Jr, RIEDERER K M, KHATIB R. Limits of detection of *Mycobacterium tuberculosis* in spiked cerebrospinal fluid using the polymerase chain reaction in tuberculous meningitis[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2000, 19(1): 47-50.
- [13] 许蕴怡,蔡杏珊,谭耀驹,等. SAT-TB检测支气管肺泡灌洗液对涂阴肺结核的快速临床诊断价值[J]. 现代医院, 2018, 18(2): 298-300.
- [14] 陈军,卢洪洲. 结核分枝杆菌核酸检测的临床应用[J]. 诊断学理论与实践, 2015, 14(1): 10-12.

(收稿日期: 2019-04-21)

(本文编辑: 李欣)