

## 结核性脑膜炎实验室诊断的研究进展

邱邦东, 刘青鹤, 余光开

(泸州医学院附属医院感染科, 四川 泸州 646000)

**【摘要】** 结核性脑膜炎(tuberculous meningitis, TBM)是由结核杆菌感染导致的中枢神经系统结核病,是病情最严重的肺外结核病,是结核病死亡的主要原因之一。由于TBM早期的临床表现及脑脊液改变均不典型,容易误诊,以至延误治疗。本文就对近年来在TBM的实验室诊断方面所取得的进展进行综述。

**【关键词】** 结核; 脑膜炎; 实验室; 诊断

**【中图分类号】** R 529.3

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1672-7193(2008)02-0111-02

目前由于大量的耐药菌株的出现,特别是耐多药结核病(multiple drug-resistant tuberculosis, MDR-TB)的发展,合并HIV感染,对结核患者监管不力和用于控制结核病的经费的消减,蓬勃发展的全球旅行和日益增多的移民等,这些都促使了结核病(tuberculosis, TB)的复活和发病率的增加。同样TBM作为主要的肺外结核病,它的发病率也明显回升。早期诊断和及时合理的抗结核治疗等处理对TBM的预后至关重要。

### 1 脑脊液(CSF)涂片及培养

CSF中找到结核杆菌是诊断TBM的直接依据。各种文献报道差异较大,一般认为涂片阳性率<10%,培养阳性率10%~40%。Jordan Jimenez A<sup>[1]</sup>等报道Zhiel-Nielsen涂片阳性率是3.5%,培养阳性率是32%。取足量CSF高速离心后取沉渣以及CSF静置24h后取纤维蛋白膜涂片可提高检出率。张茉莉等<sup>[2]</sup>报道采用离心集菌甩涂片法检测TBM患者CSF抗酸杆菌的敏感性可达66.4%,特异性为100%。最近用快速培养仪如BACTEC-MGIT960系统、ESP仪检测系统、快速液体分离培养基等,可以明显提高分离抗酸杆菌的阳性率和缩短培养时间,且操作简便,但试剂较昂贵,短期难于推广。

### 2 免疫学检查

2.1 细胞因子的测定 结核分枝杆菌感染主要的免疫保护机制是产生细胞免疫而不是体液免疫,而众多细胞因子在免疫反应中起着关键作用,其中 $\gamma$ -干扰素(INF- $\gamma$ )和 $\alpha$ -肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )的作用特别重要。因此,测定CSF中细胞因子的水平可反映机体受结核菌感染后的免疫应答状况,对TBM有临床诊断价值。黄建敏等<sup>[3]</sup>采用放射免疫法(radioimmunoassay, RIA)测定TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 在TBM患者CSF中的含量变化,结果TBM患者CSF中TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 在抗结核治疗前均较对照组显著升高,随着抗结核药物治疗的进行,患者病情逐步缓解,IL-1 $\beta$ 显著下降,而TNF- $\alpha$ 水平变化不明显。巫顺秀等<sup>[4]</sup>采用ELISA检测28例TBM患者和30例病毒性脑膜炎患者血清和CSF以及31例健康对照组血清的 $\gamma$ -干扰素水平,结果TBM

患者脑脊液 $\gamma$ -干扰素含量明显高于病毒性脑膜炎组,且重叠性很小,而两组血清含量很低并相近,与健康对照组比较无显著差异,因而得出用CSF中 $\gamma$ -干扰素诊断TBM的敏感性、特异性、准确性分别为100%、97.8%、98.5%。Juan RS等<sup>[5]</sup>采用放射免疫测定法(radioimmunoassay, RIA)测定CSF中INF- $\gamma$ 的含量,认为以INF- $\gamma$ >6.4U/ml诊断TBM时敏感性为70%,特异性为94%,而且合并IS6110 PCR测定时其敏感性为80%,特异性为92.6%。也有报道其它细胞因子如IL-10、IL-1、PLA2、PGE2、sTNFR等在TBM的CSF中亦明显增高,但都缺乏大样本的对比研究。

2.2 结核特异性抗体的测定 抗体检测不能区分是急性结核感染还是既往感染过结核,免疫力低下患者或使用免疫抑制剂等情况下,抗体可能会出现假阴性结果,而且还可以从其他颅内炎症、脑血管病以及颅内肿瘤患者的CSF中检测到。ELISA法最适合临床应用。敏感性和特异性各种报道不一。Bera S等<sup>[6]</sup>用结核杆菌分泌的一种丝氨酸蛋白酶(M.tb ES-31)作包被抗原,采用间接ELISA的方法来测定CSF和血清IgG抗体,结果在CSF中诊断TBM其敏感性和特异性分别是85%和96%,在血清中则是80%和94%。Kashyap RS等<sup>[7]</sup>采用抗体捕获ELISA的方法测定CSF中抗结核杆菌30KD蛋白抗原IgG抗体来诊断TBM,敏感性和特异性分别为80%和91%。

2.3 结核特异性抗原的测定 对高度特异性的结核抗原检测可以作为结核杆菌是否存在的重要证据,抗原检测对TBM的诊断和预后价值均优于抗体检测。通过对结核杆菌基因组的研究寻找高度特异性的抗原来制作单克隆抗体,并用在免疫试验中检测结核抗原,这样可以提高结核病诊断的敏感性与特异性。Mudaliar AV等<sup>[8]</sup>采用间接ELISA的方法并且使用单克隆抗体来测定160份CSF标本中的65KD热休克蛋白抗原来诊断TBM,其敏感性为84%,特异性为90%。Kashyap RS等<sup>[9]</sup>用斑点-EI ISA来测定H37Rv抗原,比较了56例TBM患者与100例对照患者CSF中结核杆菌H37Rv抗原水平,结果56例TBM中48例阳性(阳性率86%),100例对照中仅5例阳性(阳性率5%)。由于结核杆菌为胞内寄生菌,主要寄生于单核巨噬细胞

[14] 韩德五. 肠源性内毒素血症与肝病-肝衰竭的IETM学说[M]. 北京: 中国科学技术出版社出版, 2004, 1(3), 119-126.

[15] Ju C, Reilly TP, Bourdi M, Radonovich MF, Brady JN, George JW, Pohl LR. Protective role of Kupffer cells in acetaminophen-induced hepatic injury in mice[J]. Chem Res Toxicol 2002, 15: 1504-1513.

[16] Maso H, Morimoto Y, Ozaki M, Haga S, Shinoura S, et al. Protective effects of nafamostat mesilate on liver injury induced by lipopolysaccharide

in rats possible involvement of CD14 and TLR-4 downregulation on kupffer cells[J]. Dig Dis Sci 2006 Nov; 51(11): 2007-2012.

[17] Uta Klöcker, Ursula Schultz, Heinz Schaller, Ulrike Protzer. Endotoxin Stimulates Liver Macrophages To Release Mediators That Inhibit an Early Step in Hepadnavirus Replication [J]. Virol. 2000 June; 74(12): 5525-5533.

(收稿日期: 2008-01-03)

内,因此检测 CSF 中单核巨噬细胞内结核抗原将明显会提高诊断的敏感性和特异性。何俊瑛等<sup>[10]</sup>将 30 例 TBM 患者与 30 例对照组进行 CSF 常规、生化、细胞学检查,同时用免疫荧光法检测 CSF 中单核巨噬细胞内的结核抗原,结果在 30 例 TBM 患者中 25 例显示阳性,而对照组无一例阳性,敏感性为 83.3%,特异性为 100%;动态观察显示,最早可在发病第 7 天检出胞内抗原,而且多次检测可持续阳性,但随病程延长敏感性下降。

2.4 特异性 T 淋巴细胞的测定 现已证实结核病免疫是 T 细胞介导的细胞免疫,因此检测特异性 T 细胞对结核病的诊断可能有重要作用。国内外不少文章报道了结核感染患者的外周血或体液抗原特异性 CD4<sup>+</sup>T、CD8<sup>+</sup>T、 $\gamma\delta$ T 细胞都有明显增殖,但注意它与机体免疫水平、抗原种类、病情严重程度以及发病阶段等密切相关。酶联免疫斑点法(ELISPOT)作为一种新型的免疫酶技术以探测结核感染者的特异性 T 细胞来诊断结核病(包括 TBM),其敏感性和特异性均显著高于传统的结核菌素皮肤试验,而且操作简便,所需时间少,国外报道较多,国内很少见。孟成艳等<sup>[11]</sup>采用 ELISPOT 探测患者外周血特异性 T 细胞来诊断 TBM,认为敏感性和特异性均较高,对早期及鉴别诊断意义重大。Aiken AM 等<sup>[12]</sup>分别用 ESAT-6、CFP-10、PPD 作为诱导抗原,采用 ELISAPOT 计数特异性 T 淋巴细胞,发现阳性率分别是 82%、82%、90%,跟踪观察得出成功的治疗常伴随着特异性结核杆菌抗原 ELISAPOT 淋巴细胞计数的下降。随着结核杆菌特异性抗原研究的不断进展,抗原特异性 T 细胞检测的敏感性与特异性也将会不断提高。

### 3 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)

PCR 即体外基因扩增法,是对结核杆菌 DNA 的选择性片段进行扩增,具有敏感,快速,特异,高效等优点。近年来用 PCR 检测 CSF 中结核杆菌 DNA 来诊断 TBM 已经作为一种更快速、敏感、特异的方法被广泛使用,国内外报道很多,但结果差异较大。Rafi W<sup>[13]</sup>等分别采用 IS6110 PCR、MPB-64 PCR、65 kDa PCR 来分析 176 份 CSF 标本,结果显示这三种 PCR 方法诊断 TBM 的敏感性和特异性分别是 98% 和 100%, 91% 和 91%, 51% 和 92%。Desai D<sup>[14]</sup>等分别采用涂片、培养、CT 和 PCR 四种方法分析 57 份 CSF 标本,结果阳性率分别是 3.3%、26.7%、60.0% 和 66.7%,而且在培养阳性标本中 PCR 均为阳性。Takahashi T 等<sup>[15]</sup>采用定量嵌套的实时 PCR (quantitative nested real-time PCR, QNRT-PCR)分析了 43 例可疑 TBM 患者 CSF 标本得出阳性率为 55.8%,并且经过标准抗结核治疗后,随着患者病情的改善结核杆菌细胞数也逐渐下降,因此也认为这种方法是估计 TBM 患者临床病程的非常有用和先进的技术。但目前 PCR 技术尚不完善,方法也未规范化,在不同实验室其结果可以差别很大,对 TBM 诊断的研究还不是很成熟,而且实验条件的要求也较高,会出现较高的假阳性和假阴性,因此其对 TBM 的诊断价值还有待于进一步评价。

总之,TBM 的诊断主要基于流行病学资料、临床特征、CSF 测定以及影像学改变等,CSF 涂片发现抗酸杆菌或培养出结核

分支杆菌是诊断 TBM 的金标准,免疫学检查由于使用不同来源的抗原和免疫方法,以及宿主免疫反映的差别等导致了结果的差异,而理想的分子诊断技术应该是快速的、有成本效益的、敏感的和特异的方法。我们有理由相信随着微生物学、免疫学、现代分子生物学以及影像学等研究的不断深入,对 TBM 的诊断水平也将会不断提高,以更好地达到早期诊断的目的。

### 参考文献:

- [1] Jordan Jimenez A, Tagarro Garcia A, Baquero Artigao F, et al. Tuberculous meningitis: a review of 27 years[J]. *An Pediatr (Bare)*, 2005, 62(3): 215 - 220.
- [2] 张茉莉, 韦小民, 薛承岩. 离心集菌甩片法提高脑脊液抗酸杆菌的检出率[J]. *检验医学*, 2006, 21(2): 175 - 177.
- [3] 黄建敏, 黄瑞雅, 李雪斌. 结核性脑膜炎脑脊液的 TNF- $\alpha$  与 IL-1 $\beta$  动态变化及其临床意义[J]. *右江医学*, 2005, 33(5): 453 - 454.
- [4] 巫顺秀, 陈显光, 李森美等. 脑脊液  $\gamma$ -干扰素检测对结核性脑膜炎诊断价值的探讨[J]. *华中医学杂志*, 2006, 30(1): 41 - 42.
- [5] Juan RS, Sanchez-Suarez C, Rebollo MJ, et al. Interferon gamma quantification in cerebrospinal fluid compared with PCR for the diagnosis of tuberculous meningitis[J]. *J Neurol*, 2006, 253(10): 1323 - 1330.
- [6] Bera S, Shende N, Kumar S, et al. Detection of antigen and antibody in childhood tuberculous meningitis[J]. *Indian J Pediatr*, 2006, 73(8): 675 - 679.
- [7] Kashyap RS, Kainthla RP, Satpute RM, et al. Demonstration of IgG antibodies to 30 Kd protein antigen in CSF for diagnosis of tuberculous meningitis by antibody - capturing ELISA[J]. *Neurol India*, 2004, 52(3): 359 - 362.
- [8] Mudaliar AV, Kashyap RS, Purohit HJ, et al. Detection of 65 kD heat shock protein in cerebrospinal fluid of tuberculous meningitis patients[J]. *BMC Neurol*, 2006, 6: 34.
- [9] Kashyap RS, Kainthla RP, Biswas SK, et al. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis using the Simple Dot ELISA method[J]. *Med Sci Monit*, 2003, 9(11): MT123 - 126.
- [10] 何俊瑛, 黄庆生, 卜晖. 脑脊液单核细胞内结核抗原检测对结核早期诊断的意义[J]. *脑与神经疾病杂志*, 2005, 13(3): 204 - 206.
- [11] 孟成艳, 金嘉琳, 张文宏. 酶联免疫斑点法在结核性脑膜炎诊断中的应用[J]. *中华传染病杂志*, 2006, 24(4): 276 - 277.
- [12] Aiken AM, Hill PC, Fox A, et al. Reversion of the ELISPOT test after treatment in Gambian tuberculosis cases[J]. *BMC Infect Dis*, 2006, 6: 66.
- [13] Rafi W, Venkataswamy MM, Ravi V, et al. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis: a comparative evaluation of in-house PCR assays involving three mycobacterial DNA sequences, IS6110, MPB-64 and 65 kDa antigen [J]. *J Neurol Sci*, 2007, 252(2): 163 - 168.
- [14] Desai D, Nataraj G, Kulkarni S, et al. Utility of the polymerase chain reaction in the diagnosis of tuberculous meningitis[J]. *Res Microbiol*, 2006, 157(10): 967 - 970.
- [15] Takahashi T, Tamura M, Takahashi SN, et al. Quantitative nested real-time PCR assay for assessing the clinical course of tuberculous meningitis [J]. *Res Microbiol*, 2006, 157(10): 967 - 970.

(收稿日期: 2007 - 12 - 28)