

• 论 著 •

# 疑似中枢神经系统感染患者脑脊液病原体 多重 PCR 检测结果的研究\*

吴婷娜<sup>1</sup>, 王旻晋<sup>1</sup>, 钟方财<sup>2</sup>, 郭 硕<sup>1</sup>, 周妍冰<sup>1</sup>, 孟子芮<sup>1</sup>, 应斌武<sup>1△</sup>

1. 四川大学华西医院实验医学科, 四川成都 610041; 2. 四川省内江市第一人民医院检验科, 四川内江 641000

**摘要:**目的 分析脑膜炎/脑炎多重 PCR(MEMP-19)检测技术检测疑似中枢神经系统(CNS)感染患者脑脊液病原体的结果。方法 选取 2019 年 10—11 月于四川大学华西医院就诊的 208 例患者的脑脊液标本,提取核酸,使用 MEMP-19 技术进行检测并对结果进行分析,统计病历和临床治疗信息。结果 208 例脑脊液标本中,有 43 例检测出病原体,总检出率为 20.67%。疑似 CNS 感染组病原体检出率为 48.53%,其中 EB 病毒检出率最高(29.41%),新型隐球菌和结核分枝杆菌检出率分别为 17.65%和 10.29%。单一感染占 63.64%(21/33),双重感染占 30.30%(10/33),三重感染占 6.06%(2/33)。非 CNS 感染组病原体检出率为 7.14%,其中肠道病毒 6 例,EB 病毒 4 例,均为单一感染。疑似 CNS 感染组 MEMP-19 阳性和阴性患者临床症状和脑脊液相关指标比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。结论 MEMP-19 技术可以快速、准确地对脑脊液中的多种病原体进行筛查、检测,有助于实验室及时为临床提供 CNS 感染的病原学依据。

**关键词:**中枢神经系统感染; 脑膜炎/脑炎多重 PCR; 脑脊液

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.01.002

中图法分类号:R741.04

文章编号:1673-4130(2021)01-0008-04

文献标志码:A

## Analysis and study of multiple PCR results of cerebrospinal fluid pathogens in patients with suspected central nervous system infection\*

WU Tingna<sup>1</sup>, WANG Minjin<sup>1</sup>, ZHONG Fangcai<sup>2</sup>, GUO Shuo<sup>1</sup>, ZHOU Yanbing<sup>1</sup>,  
MENG Zirui<sup>1</sup>, YING Binwu<sup>1△</sup>

1. Department of Laboratory Medicine, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the First People's Hospital of Neijiang, Neijiang, Sichuan 641000, China

**Abstract:** **Objective** To analyze the results of meningitis/encephalitis multiple PCR (MEMP-19) in the detection of cerebrospinal fluid pathogens in patients with suspected central nervous system (CNS) infection. **Methods** The cerebrospinal fluid samples of 208 patients in West China Hospital of Sichuan University from October to November 2019 were selected, nucleic acid was extracted and detected by MEMP-19, and the results were analyzed, and the medical records and clinical treatment information were counted. **Results** Pathogens were detected in 43 out of 208 cerebrospinal fluid samples, with a total detection rate of 20.67%. The detection rate of pathogens in suspected CNS infection group was 48.53%, among which EB virus detection rate was the highest (29.41%), cryptococcus and mycobacterium tuberculosis detection rates were 17.65% and 10.29%, respectively. Single infection accounted for 63.64%(21/33), double infection accounted for 30.30%(10/33), triple infection accounted for 6.06%(2/33). The pathogen detection rate of non CNS infection group was 7.14%, including 6 cases of enterovirus and 4 cases of EB virus, all of which were single infection. There was no significant difference in clinical symptoms and cerebrospinal fluid related indexes between MEMP-19 positive and negative patients in suspected CNS infection group ( $P>0.05$ ). **Conclusion** MEMP-19 technology can quickly and accurately screen and detect a variety of pathogens in cerebrospinal fluid, which is helpful for the laboratory to provide etiological basis for central nervous system infection in time.

**Key words:** central nervous system infection; meningitis/encephalitis multiple PCR; cerebrospinal fluid

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(81672095)。

作者简介:吴婷娜,女,技师,主要从事感染性疾病的临床分子诊断相关研究。△ 通信作者, E-mail: binwuying@126.com。

本文引用格式:吴婷娜,王旻晋,钟方财,等.疑似中枢神经系统感染患者脑脊液病原体多重 PCR 检测结果的研究[J].国际检验医学杂志, 2021, 42(1): 8-11.

病原体侵入中枢神经系统(CNS)可引起感染性病变<sup>[1]</sup>,严重时可导致患者死亡。因此,早期、准确地诊断 CNS 感染是临床治疗的关键。目前,CNS 感染的病原体检测主要依靠脑脊液培养、涂片染色和特异性抗原抗体等方法,但检测的灵敏度和时效性较低。

分子生物学诊断技术可以对病原体进行快速、准确的检测,有利于 CNS 感染病原体的鉴别与诊断。脑膜炎/脑炎多重 PCR(MEMP-19)检测技术是将多重 PCR 扩增和毛细管电泳结合在一起的检测技术,能够针对 19 种临床常见的 CNS 感染病原体进行检测。与传统方法比较,有灵敏度、特异度、通量均高的优点<sup>[2-4]</sup>。本研究利用 MEMP-19 技术对疑似 CNS 感染患者的脑脊液病原体进行检测,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 根据纳入标准筛选后将拟研究病例分为疑似 CNS 感染组(A 组)与非 CNS 感染的其他神经系统病变组(B 组),见图 1。A 组 68 例,为疑似 CNS 感染入院治疗的患者,临床表现有疑似 CNS 感染的症状或体征,如发热、头痛、意识改变等,伴或不伴脑脊液异常,脑脊液白细胞数 $\geq 5 \times 10^6/L$ ,蛋白浓度 $>0.45 g/L$ ;B 组 140 例,包括颅内占位性病变、自体免疫性脑炎、神经系统退行性病变等临床诊断为非 CNS 感染性疾病的患者。所有患者入院时间为 2019 年 10—11 月。脑脊液标本收集纳入标准:(1)脑脊液标本量 $\geq 1 mL$ ,红细胞水平 $<10 \times 10^{12}/L$ ;(2)脑脊液应在抗菌治疗或免疫制剂治疗前采集;(3)收集患者临床信息。

1.2 仪器与试剂 Easy-MAG 核酸提取仪及其配套试剂购自上海梅里埃诊断产品有限公司;MEMP-19 及其配套试剂购自宁波海尔施基因科技有限公司;ABI3500 Genetic Analyzer、Applied Biosystems PCR 扩增仪均购自美国赛默飞世尔科技公司。

1.3 方法 使用 MEMP-19 技术对纳入病例的脑脊液标本进行检测,包括 19 种 CNS 感染常见病原体:脑膜炎奈瑟菌、结核分枝杆菌(MTB)、单核细胞增生李斯特菌(LM)、肺炎链球菌、肺炎支原体(MP)、无乳链球菌、流感嗜血杆菌(HI)、大肠杆菌 K1、肠道病毒(EVs)、人双埃可病毒、乙型脑炎病毒、水痘带状疱疹病毒、腮腺炎病毒、巨细胞病毒(HCMV)、单纯疱疹病毒(HSV)1 型、HSV-2、EB 病毒(EBV)、人类疱疹病毒 6 型及新型隐球菌(CN)。分析每种病原体的检出率,并分析患者的单一感染率和混合感染率。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理分析。计数资料以例数和百分率表示;组间比较采用四格表资料的 $\chi^2$ 检验进行分析;当理论频数 $<5$ 时,采用 Fisher 确切概率法进行分析;计量资

料符合正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用独立样本  $t$  检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

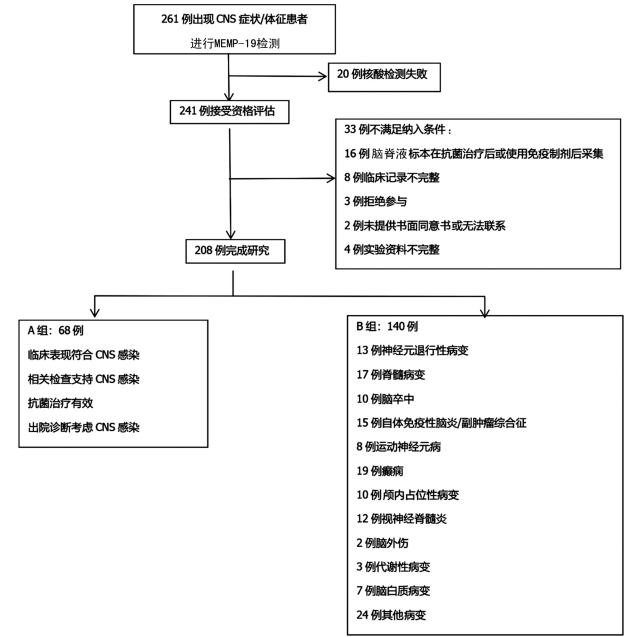


图 1 病例纳入流程图

2 结果

2.1 MEMP-19 总检出率 208 例患者脑脊液标本中有 43 例检出至少 1 种病原体,总检出率为 20.67%。EBV 检出率最高(11.54%),其次是 CN(5.77%)、MTB(3.37%)、EVs(3.37%)及 HCMV(1.44%),HI、HSV-2、LM 及 MP 的检出率均为 0.48%。见表 1。

表 1 208 例患者脑脊液标本病原体检出情况(%)

| 病原体种类 | <i>n</i> | 检出率   | 构成比   |
|-------|----------|-------|-------|
| EBV   | 24       | 11.54 | 42.11 |
| CN    | 12       | 5.77  | 21.05 |
| MTB   | 7        | 3.37  | 12.28 |
| EVs   | 7        | 3.37  | 12.28 |
| HCMV  | 3        | 1.44  | 5.26  |
| HI    | 1        | 0.48  | 1.75  |
| HSV-2 | 1        | 0.48  | 1.75  |
| LM    | 1        | 0.48  | 1.75  |
| MP    | 1        | 0.48  | 1.75  |

2.2 A 组、B 组检出率情况 A 组中有 33 例至少检出 1 种病原体,检出率为 48.53%。主要是 EBV(29.41%)、CN(17.65%)和 MTB(10.29%);B 组共检出 6 例 EVs 和 4 例 EBV,检出率为 7.14%。见表 2。

2.3 单一感染与混合感染结果 A 组的 33 例阳性标本中,单一感染 21 例(63.64%),双重感染 10 例(30.30%),三重感染 2 例(6.06%)。双重感染中,

EBV 与 CN 共感染 5 例、EBV 与 MTB 共感染 2 例、EBV 与 HCMV 共感染 1 例、MTB 与 HCMV 共感染 1 例、EVs 与 CN 共感染 1 例；三重感染中，EBV、MTB 及 HCMV 共感染 1 例，EBV、CN 及 MP 共感染 1 例；B 组 10 例均为单一感染。见表 3。

表 2 两组脑脊液病原体检出情况(%)

| 病原体种类 | n   |     | 检出率   |      | 构成比   |       |
|-------|-----|-----|-------|------|-------|-------|
|       | A 组 | B 组 | A 组   | B 组  | A 组   | B 组   |
| EBV   | 20  | 4   | 29.41 | 2.86 | 42.55 | 40.00 |
| CN    | 12  | 0   | 17.65 | 0.00 | 25.53 | 0.00  |
| MTB   | 7   | 0   | 10.29 | 0.00 | 14.89 | 0.00  |
| HCMV  | 3   | 0   | 4.41  | 0.00 | 6.38  | 0.00  |
| EVs   | 1   | 6   | 1.47  | 4.29 | 2.13  | 60.00 |
| HI    | 1   | 0   | 1.47  | 0.00 | 2.13  | 0.00  |
| HSV-2 | 1   | 0   | 1.47  | 0.00 | 2.13  | 0.00  |
| LM    | 1   | 0   | 1.47  | 0.00 | 2.13  | 0.00  |
| MP    | 1   | 0   | 1.47  | 0.00 | 2.13  | 0.00  |

表 3 A 组单一感染与混合感染的脑脊液病原体分布(n)

| 病原体种类 | 单一感染 | 双重感染 | 三重感染 | 总计 |
|-------|------|------|------|----|
| EBV   | 10   | 8    | 2    | 20 |
| CN    | 5    | 6    | 1    | 12 |
| MTB   | 3    | 3    | 1    | 7  |
| HCMV  | 0    | 2    | 1    | 3  |
| EVs   | 0    | 1    | 0    | 1  |
| HI    | 1    | 0    | 0    | 1  |
| HSV-2 | 1    | 0    | 0    | 1  |
| LM    | 1    | 0    | 0    | 1  |
| MP    | 0    | 0    | 1    | 1  |

2.4 A 组 MEMP-19 检测阳性和阴性患者的临床表现及脑脊液指标比较 A 组 MEMP-19 检测阳性和阴性患者在发热、头痛、恶心呕吐、意识改变、抽搐和脑膜刺激征方面比较，差异均无统计学意义( $P>0.05$ )，在脑脊液有核细胞计数及脑脊液总蛋白水平比较，差异亦无统计学意义( $P>0.05$ )。见表 4。

表 4 A 组 MEMP-19 检测阳性和阴性患者的临床表现及脑脊液指标情况

| 项目         | 阳性(n=33) | 阴性(n=35) | $\chi^2/t$ | P     |
|------------|----------|----------|------------|-------|
| 症状和体征      |          |          |            |       |
| 发热[n(%)]   | 21(63.6) | 22(62.9) | 0.004      | 0.947 |
| 头痛[n(%)]   | 22(66.7) | 23(65.7) | 0.007      | 0.934 |
| 恶心呕吐[n(%)] | 7(21.2)  | 11(31.4) | 0.911      | 0.340 |
| 意识改变[n(%)] | 12(36.4) | 6(17.1)  | 3.224      | 0.073 |
| 抽搐[n(%)]   | 4(12.1)  | 2(5.7)   | —          | 0.421 |

续表 4 A 组 MEMP-19 检测阳性和阴性患者的临床表现及脑脊液指标情况

| 临床表现                                  | 阳性(n=33)           | 阴性(n=35)         | $\chi^2/t$ | P     |
|---------------------------------------|--------------------|------------------|------------|-------|
| 脑膜刺激征[n(%)]                           | 11(33.3)           | 11(31.4)         | 0.028      | 0.867 |
| 脑脊液指标                                 |                    |                  |            |       |
| 有核细胞( $\bar{x}\pm s, \times 10^6/L$ ) | 130.73 $\pm$ 38.87 | 46.86 $\pm$ 8.50 | 1.368      | 0.179 |
| 总蛋白( $\bar{x}\pm s, g/L$ )            | 1.25 $\pm$ 0.31    | 0.79 $\pm$ 0.06  | 1.634      | 0.107 |

注：—为此项无数据。

3 讨 论

CNS 感染是一种常见的感染性疾病，起病急、病情重且进展迅速<sup>[5]</sup>。常规实验室检查或临床症状分析，难以准确诊断 CNS 感染的病原体。当前，分子生物学诊断技术正快速发展并应用于 CNS 感染病原体的实验室检测中，但仍存在诸多不足。实时荧光定量 PCR 可在较短时间内对一种或几种已知病原体进行快速定性检测，但无法用于病原体的高通量筛查；而基于新一代高通量测序技术的病原体检测，可大幅提高对病原体的筛查、检测能力<sup>[6]</sup>，但其需要专业的检测平台和人员<sup>[7]</sup>，且价格较为昂贵。本研究首次利用 MEMP-19 试剂盒对四川大学华西医院 208 例患者的脑脊液标本进行了病原体检测，在疑似 CNS 感染组中有 48.53% 的患者检出病原体，并发现共感染情况。

本研究中 A 组检出的病原体以 EBV(29.41%) 和 HCMV(4.41%) 较为常见，且存在单一感染和共感染并存的情况，这与既往 CNS 共感染相关研究一致<sup>[8-10]</sup>。此外，有研究显示，EBV 和 HCMV 是常见的机会性感染病原体<sup>[11-12]</sup>，可累及多器官系统出现临床症状和持续感染，免疫力低下患者，尤其是合并人类免疫缺陷病毒感染的患者，应考虑 EBV 和 HCMV 潜伏感染的可能<sup>[13-14]</sup>。故仅脑脊液 EBV 和 HCMV 检测阳性并不能诊断 CNS 感染，必须结合临床症状综合考虑。

此外，A 组 CN 检出率为 17.65%，12 例检出 CN 的患者中，5 例单一感染，7 例共感染。CN 为条件致病性真菌，是免疫功能低下患者 CNS 感染常见的病原体<sup>[15]</sup>，在免疫功能低下患者出现 CNS 感染症状时，应考虑隐球菌性脑膜炎的可能。

结核性脑膜炎是最严重的肺外 MTB 感染所致的疾病之一<sup>[16]</sup>。本研究中 A 组共检出 7 例 MTB，检出率为 10.29%，它们的常规脑脊液培养和抗酸染色检测结果为阴性。由于结核性脑膜炎的非特异性临床表现增加了临床诊疗难度，因此病原学检测对结核性脑膜炎的临床诊断非常重要，而传统的 MTB 检测主要是抗酸染色镜检及培养，检出率低且培养耗时。因此，MEMP-19 检测非常适用于 MTB 的临床快速筛查和检测。

除此之外, A 组还检出 HI、LM、MP 等病原体, 但常规脑脊液培养均为阴性。结合临床症状及随访治疗效果进行分析, 确认 MEMP-19 的检测结果可信。这充分证明了 MEMP-19 相比传统的实验室检测方法, 能够更加准确地对疑似 CNS 感染病例的脑脊液病原体进行检测。结合临床信息进行分析发现, A 组 MEMP-19 阳性和阴性的患者在临床症状和体征, 以及脑脊液生化指标方面比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 这与伊洁等<sup>[17]</sup>报道的结果一致, 提示 MEMP-19 检测结果与患者的临床表现没有相关性, 而可能与感染病原体毒力和机体免疫力有关。

值得注意的是, 本研究中 B 组检出 EVs 及 EBV。研究显示, EVs 等嗜神经性病毒可建立 CNS 持续性感染, 如脊髓灰质炎病毒 RNA 在感染数年后仍能在脑脊液中检测到<sup>[18]</sup>。最近一项研究证明在 CNS 感染中持续检测到 EVs 序列与肌萎缩侧索硬化的恶性发展相关<sup>[19]</sup>。也有报道显示, EBV 在其原发感染后即建立终身潜伏感染并潜伏于 B 淋巴细胞, 由此可在无 CNS 感染临床症状时检测到<sup>[20]</sup>。因此, 临床需重视病原体在 CNS 中的潜伏感染和引起相关并发症的情况。

本研究显示, MEMP-19 对脑脊液病原体有较好的检出效果, 其耗时短、特异性强且能同时检测多种病原体, 因而可为临床提供早期、快速、可靠并且更加全面的病原学检测结果, 可提高 CNS 感染的临床诊断效能。与传统的病原体检测手段比较, MEMP-19 检测 CNS 感染为实验室诊断提供了新思路。

# 参考文献

- [1] GIOVANE R A, DRAKE L P. Central nervous system infections[J]. Primary Care, 2018, 45(3): 505-518.
- [2] 汪一萍, 袁松波, 俞燕红, 等. 多重荧光聚合酶链式反应法在血流感染诊断中的应用评价[J]. 中华检验医学杂志, 2019, 42(2): 123-127.
- [3] MORGENSTERN C, CABRIC S, PERKA C, et al. Synovial fluid multiplex PCR is superior to culture for detection of low-virulent pathogens causing periprosthetic joint infection[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2018, 90(2): 115-119.
- [4] EICHINGER A, HAGEN A, MEYER-BÜHN M, et al. Clinical benefits of introducing real-time multiplex PCR for cerebrospinal fluid as routine diagnostic at a tertiary care pediatric center[J]. Infection, 2019, 47(1): 51-58.
- [5] 王俊, 文建国. 儿童中枢神经系统感染脑脊液病原菌分布及耐药性分析[J]. 新乡医学院学报, 2019, 36(4): 384-388.
- [6] GWINN M, MACCANNELL D, ARMSTRONG G L. Next-

generation sequencing of infectious pathogens[J]. Jama, 2019, 321(9): 893-894.

- [7] MILLER S, CHIU C, RODINO K G, et al. Should we be performing metagenomic next-generation sequencing for infectious disease diagnosis in the clinical laboratory[J]. J Clin Microbio, 2020, 58(3): 9-19.
- [8] LIU D, WANG X, WANG Y S, et al. Detection of EBV and HHV6 in the brain tissue of patients with rasmussen's encephalitis[J]. Virol Sin, 2018, 33(5): 402-409.
- [9] 于盼辉, 王佶, 李静洁, 等. 2015—2016 年石家庄地区儿童病毒性脑炎病原学研究[J]. 病毒学报, 2017, 33(2): 180-184.
- [10] 杜文胜, 赵德华, 胡珏辉, 等. 住院儿童 682 例病毒感染情况分析[J]. 贵州医药, 2017, 41(9): 981-982.
- [11] LUPIA T, MILIA M G, ATZORI C, et al. Presence of Epstein-Barr virus DNA in cerebrospinal fluid is associated with greater HIV RNA and inflammation[J]. Aids, 2020, 34(3): 373-380.
- [12] MARRA C M. Other central nervous system infections: cytomegalovirus, Mycobacterium tuberculosis, and treponema pallidum[J]. Handb Clin Neurol, 2018, 152: 151-166.
- [13] MCHUGH D, MYBURGH R, CADUFF N, et al. EBV renders B cells susceptible to HIV-1 in humanized mice [J]. L Life Sci Alliance, 2020, 3(8): e202000640.
- [14] 张志辉, 刘晓, 蒙觉, 等. 非免疫抑制重症患者巨细胞病毒感染诊治研究进展[J]. 中华危重症医学杂志, 2019, 12(2): 62-66.
- [15] RAJASINGHAM R, SMITH R M, PARK B J, et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis[J]. Lancet Infect Dis, 2017, 17(8): 873-881.
- [16] BERWAL A, CHAWLA K, VISHWANATH S, et al. Role of multiplex polymerase chain reaction in diagnosing tubercular meningitis[J]. J Lab Physicians, 2017, 9(2): 145-147.
- [17] 伊洁, 关鸿志, 倪安平, 等. 成人疑似病毒性脑炎, 脑膜炎患者 xTAG 脑脊液病毒多重检测结果分析[J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(1): 14-16.
- [18] JULIEN J, LEPARC-GOFFART I, LINA B, et al. Post-polio syndrome: poliovirus persistence is involved in the pathogenesis[J]. J Neurol, 1999, 246(6): 472-476.
- [19] WO X M, YUAN Y, XU Y, et al. TAR DNA-binding protein 43 is cleaved by the protease 3C of enterovirus A71[J]. Virol Sin, 2020, 27(3): 1-9.
- [20] 柯鹏, 马骁, 鲍协炳, 等. 异基因造血干细胞移植后 EB 病毒脑炎七例临床分析[J]. 中华血液学杂志, 2017, 38(8): 685-689.