

中枢神经系统病毒性感染的实验室诊断研究进展

高世超 曹敬荣 王培昌

【摘要】 病毒性脑炎(脑膜炎)是常见的中枢神经系统感染性疾病,人体感染后有较高的致死致残率。因临床表现的非特异性及传统病毒检测方法(如病毒分离培养及血清学诊断等)技术条件的局限性,临床早期病原体诊断较为困难。随着分子生物学检测技术及其他脑脊液实验室检查方法(如细胞学和炎性细胞因子检测)的不断发展,其在中枢神经系统病毒感染的病原诊断中越来越重要。本文就中枢神经系统病毒感染的流行病学及实验室诊断研究进展进行综述。

【关键词】 中枢神经系统感染;病毒;实验室诊断;分子生物学;脑脊液

Advances on laboratory diagnosis of viral infections of central nervous system Gao Shichao, Cao Jingrong, Wang Peichang. Department of Clinical Laboratory, Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Beijing 100053, China

Corresponding author: Wang Peichang, Email: pcw1905@126.com

【Abstract】 Viral encephalitis (meningitis) is a common disease of central nervous system infection (CNSI), with a high mortality rate. The clinical manifestations of CNSI are nonspecific and the traditional virus detection methods such as virus isolation and serological diagnosis, were limited by technical conditions, so it is difficult to make early diagnosis. Along with the development of molecular biology detection technology and other CSF laboratory examination methods, such as cytology and cytokine detections, the etiological diagnosis of viral infections of central nervous system is becoming more and more important. This article reviewed the research progress of epidemiology and laboratory diagnosis of the viral infection of central nervous system.

【Key words】 Central nervous system infections; Virus; Laboratory diagnosis; Molecular biology methods; Cerebrospinal fluid

病毒性脑炎(脑膜炎)是临床常见的中枢神经系统感染(central nervous system infection, CNSI)性疾病之一,目前国内文献报道的可引起CNSI的病毒超过100多种,且发病率呈上升趋势^[1]。中枢神经感染病毒后,患者的临床表现缺乏特异性,有些急发感染者病情危重且病死率较高,故单从临床表现很难确诊和治疗^[2]。另外,由于感染早期脑脊液(cerebrospinal fluid, CSF)中病毒含量较低及药物的应用等原因,脑脊液实验室检测亦无明显特异性改变,早期诊断困难。因此,对病毒性CNSI病原体的早期、快速及准确诊断对临床诊疗尤为重要^[3]。本文拟就病毒性CNSI的流行病学及实验室诊断研究进展作综述。

一、病毒性CNSI的流行病学特点

病毒感染导致的中枢神经系统炎症性损害病死率高,疾病预后不佳,且常伴严重后遗症。世界卫生组织

(WHO)最新数据^[4]显示,全球每年病毒性CNSI发病率约为3.5~7.4/10万人口。WHO每年收到约20万病毒性脑炎的病例报告,但全球未报告的病例估计远高于此。

目前已明确报道^[5]可引起病毒性CNSI的病毒有单纯疱疹病毒I型和II型(herpes simplex virus type I & II, HSV-1&2)、巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)、水痘-带状疱疹病毒、EB病毒、肠道病毒和腮腺炎病毒等10余种病毒及其亚型。国内多项研究数据显示^[6-8],病毒性脑炎(脑膜炎)主要发病人群是儿童,其中肠道病毒是首要病原体,其次为单纯疱疹病毒、腮腺炎病毒等;国外报道^[5]除肠道病毒、单纯疱疹病毒和腮腺炎病毒之外,巨细胞病毒、EB病毒和水痘-带状疱疹病毒等均是引起病毒性CNSI的重要病原体。其中单纯疱疹病毒性脑炎(herpes simplex virus encephalitis, HSE)是目前世界范围内导致病死率较高的疾病^[2],而HSV被公认为病毒性脑炎最主要病原体,两种亚型中I型较II型多见,且多发生在老人和儿童^[8]。巨细胞病毒引起的病毒性脑炎多发生在器官移植患者中,国外有文献^[9]报道249例器官移植患者感染率为27%。水痘-

带状疱疹病毒引起的病毒性脑炎也很常见,仅在美国每年大约有100万新发病例^[2]。此外,在病毒性脑炎流行病学研究中尚有约25%病例的病原体无明确诊断^[10]。

二、脑脊液实验室检查

1. 脑脊液常规、生化检测:脑脊液常规和脑脊液生化检测是临床上对怀疑病毒性CNSI患者常规检查,脑脊液细胞学改变具有一定特征性,可提高早期诊断率。若脑脊液有以下改变^[11],则提示可能为病毒感染:脑脊液压力增高,外观清晰透明;脑脊液涂片、细菌培养均阴性;白细胞 $> 10 \times 10^6/L$,以淋巴细胞为主;脑脊液蛋白质含量 $> 50 \text{ mg/dl}$,糖和氯化物水平均无明显改变。

2. 血清免疫学检测:运用酶联免疫吸附试验(ELISA)的方法检测患者血清或脑脊液中病毒特异性IgG或IgM抗体^[12]是实验室检测病毒的重要手段之一,可在早期病毒滴度较低的情况下检测出病毒。某院检验科神经特检室已将基于ELISA方法的TORCH系列检测^[13]作为神经系统感染的筛查,目前已对7 000余例脑脊液标本进行检测。

检测病毒特异性IgM抗体水平对于病毒诊断非常重要,若脑脊液中检测出特异性IgM抗体,则表明脑部发生感染或者血脑屏障受到破坏,严重程度较高^[14]。另外,病毒特异性IgM检测的判定结果必须结合临床资料^[12]。鞘内合成的特异性IgG抗体通过CSF和血清中IgG总值的比值进行评价,比值 > 1.5 是特异性抗体鞘内合成的证据^[14]。

Bhullar等^[15]建立了一种基于蛋白A的ELISA方法用于检测血清和脑脊液中的HSV特异性抗体,当脑脊液中病毒特异性IgM抗体的含量较少时也可以检出,具有很高的灵敏度和特异性,提高了HSE的诊断。

脑脊液寡克隆区带(oligoclonal bands, OCB)可以协助诊断中枢神经系统感染性疾病^[16],国内有文献报道^[17],42例病毒性脑炎患者OCB阳性率为24%,可辅助诊断病毒性脑炎。

3. 脑脊液细胞因子、酶学及其他指标检测:正常情况下,脑脊液中胆碱酯酶(cholinesterase, CHE)含量很少,感染时增高明显,可用于病毒性脑炎(脑膜炎)感染程度及疗效观察^[18]。病毒性脑膜炎患者脑脊液NSE水平最高,可作为评价病情严重程度的一项指标^[19]。肌酸激酶(creatin kinase, CK)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)在病毒性CNSI发生时具有明显升高,且与病情严重程度呈正相关^[20]。

发生病毒性CNSI时:TNF- α 含量正常,细菌性CNSI含量升高,用于两者的鉴别诊断;IL-6 $> 4.0 \mu\text{g/L}$,且与病情严重程度相关;IL-8 $> 1.2 \mu\text{g/L}$,可用于细菌性与非细菌性鉴别诊断;INF- γ 在病毒性脑炎患儿脑脊液中显著增高,可达28.7 pg/ml;另外IL-10、IL-12和IL-1 β 等细胞因子

的检测^[18,21]在一定程度上有助于病毒性CNSI的诊断。

病毒感染时降钙素原(procalcitonin, PCT)正常或轻微升高,细菌感染时则PCT大幅升高,但目前研究缺少大规模样本验证^[18];病毒性脑炎患儿脑脊液尿酸(uric acid, UA)含量显著增高,且UA水平与病情严重程度相关^[22],可用于辅助诊断;病毒性脑膜炎时C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)升高仅见于脑脊液中,血清升高不明显;细菌性脑膜炎时乳酸(lactic acid, LA)早期升高,病毒性脑炎无明显改变,因此,LA对颅内感染具有重要的诊断价值^[18]。

4. 病毒的分离培养:病毒的分离培养是病毒性脑炎(脑膜炎)检测的“金标准”^[3],但由于病毒培养条件苛刻,目前实验室开展愈来愈少。

三、分子生物学诊断研究进展

采用分子生物学方法检测病毒核酸已越来越多的应用于临床实验室。利用分子生物学方法可以快速、灵敏、特异地检测病毒核酸,大大提高病毒诊断的效率。随着新的技术不断出现和发展,分子诊断方法在病毒性CNSI的诊断中发挥越来越重要的作用^[23],现已逐渐成为实验室病毒诊断的重要手段之一,为临床病原体诊断提供更加可靠的依据。

1. 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR):随着PCR技术的迅猛发展,基于PCR扩增技术方法(如巢式PCR和逆转录PCR等)的应用,为病毒的检测提供了更加快速简便的方法^[23]。一方面,PCR灵敏度较高,可检测CSF等病毒DNA含量较少的标本;另一方面,PCR方法的假阳性率较高^[3],检测过程容易污染。16S rRNA技术已广泛用于细菌病原体的检测^[24]。但是由于病毒基因变异性较大,不同病毒无法通过单次PCR反应就可以检测出所有常见病毒,因此,临床应用具有针对性。半定量和定量PCR^[25]可以对病毒核酸进行精确的定量分析,提高诊断的准确性,还可用来观察抗病毒药物的疗效、评估预后。

2. 实时荧光定量PCR技术(real-time PCR, RT-PCR):荧光定量PCR具有快速、高效、可定量和防污染的特点^[26]。近年来,随着众多新型实时荧光定量PCR仪的上市,临床已经普遍采用该方法用于病毒的检测。Sundén等^[27]运用荧光定量PCR技术对临床上有中枢神经系统感染症状,但细菌培养阴性,怀疑为病毒感染的373例患者的脑脊液进行检测,阳性率为4%,该方法与基于多重置换扩增(mutiplex displacement amplification, MDA)技术的全基因组扩增方法对照,阳性结果一致,提示荧光定量PCR具有高灵敏度和高特异性的特点。荧光定量PCR的应用虽已日渐广泛,但是其1次仅能检测1种特定病毒,无法进行广谱病原体筛查。

3. 多重PCR技术(mutiplex PCR):多重PCR是利用多条引物一次性检测多种病原体的更为灵敏、高效的PCR

表 1 CNSI 实验室检测项目推荐表^[5]

项目	结果提示	推荐等级	证据等级
分子生物学方法	检测脑脊液中病毒核酸	A	I
脑脊液检测	白细胞 > 10 × 10 ⁶ /L, 淋巴细胞为主; 有红细胞时CSF发黄; 葡萄糖正常或降低; CSF蛋白 > 50 mg/dl; 细胞因子异常也可提示	A	II
血清学检测	检测脑脊液或血清的病毒特异性IgM或IgG抗体; OCB升高也有提示	B	II
脑组织活检	敏感性高, 但不用于常规检测	C	III
病毒分离培养	现已很少使用	—	—

注: CSF: 脑脊液; OCB: 脑脊液寡克隆区带; “—” 无相关推荐等级和证据等级

方法^[28], 该方法可快速诊断病毒, 尤其是对未知原因的感染, 能敏感、特异、广谱地诊断病毒。Walls等^[29]运用同时检测单纯疱疹病毒、腮腺炎病毒、肠道病毒、水痘-带状疱疹病毒的多重PCR方法, 对怀疑为CNSI儿童的303份脑脊液进行检测, 阳性率为23%, 以肠道病毒为主(占24%)。Esposito等^[30]研究将多重PCR方法与荧光定量PCR方法相结合, 建立了多重荧光定量PCR, 用于检测424例儿童的流感病毒和呼吸合胞病毒, 阳性率高达65%, 已有相关试剂盒用于临床实验室检测。另外, 在建立多重PCR检测方法时应根据当地流行病学特点选择检测的目的病毒^[23]。

4. 基于PCR扩增的基因芯片技术(DNA microarray): 基因芯片技术将数以百计或千计的寡核苷酸探针结合到芯片载体上, 利用高特异性的核酸杂交反应, 通过分析PCR产物杂交结果来快速、准确、高通量地对多种病毒的核酸序列进行检测。由于病毒核酸有随机突变的特点, 因此, 相同病毒、基因型不同会导致杂交结果的不同, 可进行病毒分型, 为病毒不同亚型的鉴定提供了很好的手段^[31], 在病毒感染分子诊断方面具有广阔的应用前景。

Venter等^[32]设计了包含非洲南部常见的29种病原体的基因检测芯片(其中有20种病毒), 并对138例血清标本进行了检测, 阳性病例27例, 阳性率为20%, 结果显示该方法可以高效、广谱地对阳性标本进行筛查, 重复试验一致性较高, 且筛选出5例隐性感染者。国外有研究运用多种分子生物学方法对脑脊液标本进行病毒核酸检测, 结果显示基因芯片检测率最高、特异性最强^[33]。国内有研究者建立了水痘-带状疱疹病毒高通量检测并分型的基因芯片技术, 对临床44例标本进行检测, 结果显示阳性率为86%, 且能特异地检出病毒各分型^[34], 可用于临床带状-疱疹病毒感染的诊断及流行病学调查。

多重PCR技术的发展为DNA基因芯片技术提供了良好的基础。目前临床上尚无一种方法可一次性诊断病毒性脑炎的所有常见病原体, 多重PCR方法和基因芯片技术在病原学诊断上很有前途, 国内应继续加强这方面的研究。

5. 高通量测序技术(high-throughput sequencing): 高通量测序基于第二代测序技术平台, 可一次性对数十万到数百万条DNA分子进行序列测定, 通过数据分析即可诊断病原体, 具有通量高、准确性高和成本低等特点^[33], 已被越来越多地应用于病原基因组的检测。高通量测序技术可精准检测血清或脑脊液中未知病毒, 有助于检测不明原因的中枢神经系统感染, 其在移植相关脑炎病毒和新型脑炎病毒检测方面有独特潜力^[25]。高通量测序技术目前并未运用到临床常规实验室诊断中, 但其有广泛的应用前景和巨大的应用潜力。

病毒诊断的准确性很大程度上依赖于实验室接收标本的质量^[3]。脑脊液标本采样要严格无菌, 采样应在临床症状发生的早期, 且患者尚未用药, 否则检测结果将不准确。另外, 对于儿童疑似感染者, 发病7 d内还要对咽拭子和粪便标本进行检测^[29]。某些情况下实验室虽可检出病毒, 但患者并未表现出相应的感染症状, 存在病原体与患者当前疾病无关的情况^[35], 故实验室检测结果必须结合患者的临床资料^[27], 以防出现假阳性。

综上所述, 为提高病毒性CNSI诊断的质量和效率, 需要结合实验室实际情况尽可能采用多种方法联合检测(见表1), 并建立精确的临床诊断算法和完善的检测体系, 为病毒性CNSI的确诊提供更加有力的依据。

参 考 文 献

[1] Ory FD, Avellón A, Echevarría JE, et al. Viral infections of the central nervous system in Spain: a prospective study[J]. J Med Virol, 2013, 85(3):554-562.
 [2] John CC, Hélène C, Montano SM, et al. Global research priorities for infections that affect the nervous system[J]. Nature, 2015, 527(7578): S178-S186.
 [3] Kenneth M, Malcolm G. Laboratory techniques for human viral encephalitis diagnosis[J]. Infect Disord Drug Targets, 2011, 11(3):206-234.
 [4] Swanson PA 2nd, McGavern DB. Viral Diseases of the Central Nervous System[J]. Curr Opin Virol, 2015, 11(5):44-54.

- [5] Steiner I, Budka H, Chaudhuri A, et al. Viral meningoencephalitis: a review of diagnostic methods and guidelines for management[J]. *Eur J Neurol*,2010,17(8):999-e57.
- [6] 谭毅, 谢艺红, 杨进业, 等. 贵港市急性脑炎及脑膜炎症候群病原体监测[J]. *中国公共卫生*,2014,30(3):353-356.
- [7] 杨丽萍, 王立文. 首都儿科研究所1997-2006年住院患儿中枢神经系统感染性疾病的流行病学特点[J]. *中华实用儿科临床杂志*,2009,24(12):924-926.
- [8] 李幸乐, 张爱梅, 徐子乾, 等. 河南省病毒性脑炎病原谱研究初报[J]. *医药论坛杂志*,2009(14):47-48.
- [9] France D, Laurent B, Alina F, et al. Detection of Herpesviridae in whole blood by multiplex PCR DNA-based microarray analysis after hematopoietic stem cell transplantation[J]. *J Clin Microbiol*,2014,52(7):2552-2556.
- [10] Sundén B, Larsson M, Falkeborn T, et al. Real-time PCR detection of Human Herpesvirus 1-5 in patients lacking clinical signs of a viral CNS infection[J]. *BMC Infect Dis*,2011,11(1):1-6.
- [11] 柯琼浪. 病毒性脑炎患儿的脑脊液检测分析[J]. *中国现代药物应用*,2010,4(20):68-69.
- [12] Studahl M, Lindquist L, Eriksson BM, et al. Acute viral infections of the central nervous system in immunocompetent adults: diagnosis and management[J]. *Drugs*,2013,73(2):131-158.
- [13] Neu N, Duchon J, Zachariah P. TORCH infections[J]. *Clin Perinatol*,2015,42(1):77-103.
- [14] Uta Meyding-Lamadé, Cornelian Strank. Herpesvirus infections of the central nervous system in immunocompromised patients[J]. *Ther Adv Neurol Disord*,2012,5(5):279-296.
- [15] Bhullar SS, Kashyap RS, Chandak NH, et al. Protein A-based ELISA: its evaluation in the diagnosis of herpes simplex encephalitis[J]. *Viral Immunol*,2011,24(4):341-346.
- [16] Hacoheh Y, Singh R, Forsyth V, et al. CSF albumin and immunoglobulin analyses in childhood neurologic disorders[J]. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*,2014,1(1):e10.
- [17] 杨洪芬, 张正君, 赵果园, 等. 脑脊液寡克隆抗体(IgG)检测在中枢神经系统疾病中的应用价值[J]. *现代预防医学*,2014,41(2):314-316.
- [18] 李幽然, 张国军. 脑脊液实验室检查对颅内感染的诊断价值[J]. *标记免疫分析与临床*,2014,21(4):474-478.
- [19] 李经猷, 张杜燕, 李洁敏. 病毒性脑炎患儿血清神经元特异性烯醇化酶检测的临床意义[J]. *中国实用医药*,2016(2):34-35.
- [20] 郝立科, 于文霞, 纪茹英. 病毒性脑炎血清酶学水平变化的临床意义[J]. *四川医学*,2009,30(11):1761-1762.
- [21] Bastos MS, Coelho-Dos-Reis JG, Zauli D AG, et al. Divergent cerebrospinal fluid cytokine network induced by non-viral and different viral infections on the central nervous system[J]. *BMC Infect Dis*,2015,15(1):1-9.
- [22] Jia L, Min L, Xuan W, et al. Serum uric acid levels in patients with infections of central nervous system[J]. *Acta Neurol Belg*,2015(11):1-6.
- [23] Steiner I, Schmutzhard E, Sellner J, et al. EFNS-ENS guidelines for the use of PCR technology for the diagnosis of infections of the nervous system[J]. *Eur J Neurol*,2012,19(10):1278-1291.
- [24] 曹敬荣, 高世超, 王培昌, 等. 细菌性中枢神经系统感染的实验室诊断研究进展[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志(电子版)*,2016,10(1):13-16.
- [25] Ziyaeyan M, Ailborzi A, Borhani Haghighi A, et al. Diagnosis and quantitative detection of HSV DNA in samples from patients with suspected herpes simplex encephalitis[J]. *Braz J Infect Dis*,2011,15(3):211-214.
- [26] Oberste MS, Penaranda S, Rogers SL, et al. Comparative evaluation of Taqman real-time PCR and semi-nested VP1 PCR for detection of enteroviruses in clinical specimens[J]. *J Clin Virol*,2010,49(1):73-74.
- [27] Sundén B, Larsson M, Falkeborn T, et al. Real-time PCR detection of human herpesvirus 1-5 in patients lacking clinical signs of a viral CNS infection[J]. *BMC Infect Dis*,2011,11(1):1-6.
- [28] Anderson TP, Werno AM, Kevin B, et al. Comparison of four multiplex PCR assays for the detection of viral pathogens in respiratory specimens[J]. *J Virol Methods*,2013,191(2):118-121.
- [29] Walls T, Mcsweeney A, Anderson T, et al. Multiplex-PCR for the detection of viruses in the CSF of infants and young children[J]. *J Med Virol*,2017,89(3):559-561.
- [30] Esposito S, Scala A, Tagliabue C, et al. Evaluation of a multiplex real-time polymerase chain reaction assay for the detection of influenza and respiratory syncytial viruses[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*,2016,84(1):40-42.
- [31] Lévêque N, Renois F, Andréoletti L. The microarray technology: facts and controversies[J]. *Clin Microbiol Infect*,2012,19(1):10-14.
- [32] Venter M, Zaayman D, Niekerk SV, et al. Macroarray assay for differential diagnosis of meningoencephalitis in Southern Africa[J]. *J Clin Virol*,2014,60(1):50-56.
- [33] Chien-Chin H, Rafal T, Thomas B, et al. Use of staged molecular analysis to determine causes of unexplained central nervous system infections[J]. *Emerg Infect Dis*,2013,19(9):1470-1477
- [34] 刘毓刚, 吴丽娟, 乔羲, 等. 流式液相芯片用于临床水痘-带状疱疹病毒检测及分型研究[J]. *临床检验杂志*,2015(9):653-656.
- [35] Handique SK. Viral infections of the central nervous system[J]. *Neuroimaging Clin N Am*,2011,21(4):601-613.

(收稿日期: 2016-03-11)
(本文编辑: 孙荣华)

高世超, 曹敬荣, 王培昌. 中枢神经系统病毒性感染的实验室诊断研究进展[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志(电子版)*,2017,11(3):218-221.