

## · 综述 ·

## 细菌性中枢神经系统感染的实验室诊断研究进展

曹敬荣 王培昌 陈静 高世超

【摘要】 细菌性中枢神经系统感染是常见且严重的颅内感染性疾病，其早期实验室诊断对治疗和预后具有重要作用。细菌性中枢神经系统感染的实验室诊断由脑脊液常规和生化等传统检测，逐渐发展为PCR技术、核酸杂交、16S rRNA测序以及基因芯片技术的多方法、多指标联合检测和多学科合作，促进了该病早期、快速的实验室诊断发展。本文就细菌性中枢神经系统感染的流行病学、常见致病菌及实验室诊断等方面进行了综述。

【关键词】 中枢神经系统感染；细菌；实验室；诊断

**Advances in laboratory diagnosis of bacterial central nervous system infections** Cao Jingrong, Wang Peichang, Chen Jing, Gao Shichao. Department of Clinical Laboratory, Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Beijing 100053, China  
Corresponding author: Wang Peichang, Email: pcw1905@126.com

【Abstract】 Bacterial central nervous system infection is a common and severe intracranial infectious disease, and its early laboratory diagnosis had an important role in the treatment and prognosis. The laboratory techniques for diagnosis of bacterial central nervous system infection experienced cerebrospinal fluid routine, biochemical and other traditional detections to PCR, nucleic acid hybridization, 16S rRNA sequencing and microassay technology for multiple methods, multiple indexes and multidisciplinary cooperation, which promote the development of the early and rapid laboratory diagnosis. This paper reviewed about the epidemiology, common pathogens and the progress in laboratory diagnosis of bacterial central nervous system infection.

【Key words】 Central nervous system infection; Bacteria; Laboratory; Diagnosis

中枢神经系统感染可由细菌、真菌、病毒、螺旋体、立克次体、寄生虫和朊蛋白等多种已知或未知的生物性病原体引起，其中细菌性中枢神经系统感染（bacterial central nervous system infections, BCNI）是最常见且严重的颅内感染性疾病，其病死率和致残率高，严重威胁患者的生命，而早期明确感染的病原学诊断是正确抗感染治疗的关键。目前，对该病的诊断仍主要依据脑脊液检查结果，但中枢神经系统的复杂性和特殊性导致传统的脑脊液检测方法敏感性和特异性较低，尤其是抗菌药物的应用以及脑脊液中含菌量较少等因素，临床很难早期明确病原体并进行有效治疗。而随着分子生物学技术的发展、核酸杂交以及基因扩增技术的广泛应用，BCNI的早期诊断有了更敏感和更特异的检测手段。本文拟就细菌性中枢神经系统感染的流行病学、常见致病菌及实验室诊断等方面进行综述。

#### 一、细菌性中枢神经系统感染流行病学

BCNI按来源分为社区性和医院获得性感染，按病原分为结核性和细菌性（又称化脓性）两类，在发达国家成人中发病率为（4~6）/10万。近年来，该类患者病死率因抗菌药物的应用已由50%~90%下降至10%以下，但社会经济的发展、人员流动性加大和交通意外致脑外伤增加等因素使BCNI的发生率呈上升趋势，仍是位居世界感染性疾病病死率前10位的严重感染性疾病之一<sup>[1-2]</sup>。随着B组流感嗜血杆菌疫苗（Hib疫苗）的应用，该菌引起的感染发生率显著下降，婴幼儿和儿童的发病率显著降低。但该疫苗在许多发展中国家尚未得到广泛应用，BCNI的病死率仍高达10%~30%，甚至35%以上（一些非洲国家），存活者发生永久性神经系统后遗症的比例亦较高（30%~50%）<sup>[1-2]</sup>。另外，由于结核耐药菌的出现、免疫抑制剂的应用和获得性免疫缺陷综合征（acquired immune deficiency syndrome, AIDS）的传播流行，结核病死灰复燃，使中枢神经系统结核分枝杆菌感染的发病率亦随之上升。

医院获得性BCNI是最常见和严重的院内感染，常见的影响因素包括直接经鼻咽部黏膜侵入、随血流到达脑膜、继发于邻近感染病灶（如中耳炎、乳突炎和鼻窦感染等）、继发于远隔部位感染（如肺炎、肺脓肿、脓胸和腹腔感染

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2016.01.003

基金项目：首都临床特色应用研究重点专项基金（No. Z1411070 02514012）

作者单位：100053 北京，首都医科大学宣武医院检验科

通讯作者：王培昌，Email: pcw1905@126.com

等)、发生于颅脑创伤或手术后(引流)等。研究报道开颅术后颅内感染发病率平均为2.3%~8.68%<sup>[3-4]</sup>。

## 二、细菌性中枢神经系统感染常见致病菌

国内外研究发现引起BCNI的病原菌在各地、各医院/科室、各年龄组均存在差异;院内感染与社区获得性感染的病原菌亦显著不同;后者病原菌以脑膜炎奈瑟菌、肺炎链球菌和流感嗜血杆菌为主,院内感染则以肠杆菌科细菌、铜绿假单胞菌和不动杆菌属等革兰阴性杆菌和革兰阳性球菌(如金黄色葡萄球菌、凝固酶阴性葡萄球菌和链球菌属等)为主<sup>[1-3, 5-7]</sup>。

1. BCNI病原菌的年龄分布:1个月以内新生儿最常见致病菌为B族链球菌、肺炎链球菌和B型流感嗜血杆菌感染,其次是李斯特菌、大肠埃希菌和其他革兰阴性杆菌。幼儿(特别是6岁以下)到成人感染病原菌以肺炎链球菌最常见,其次是流感嗜血杆菌,而李斯特菌和B组链球菌较少见。老年人感染病原菌最常见为肺炎链球菌、李斯特菌和革兰阴性杆菌(如大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、变形杆菌和铜绿假单胞菌等)。

2. 不同感染途径所致BCNI的常见病原菌:神经外科手术易受兼性/需氧革兰阴性杆菌以及葡萄球菌属感染<sup>[3-4, 8-9]</sup>,尤其引流等置管术后病原菌多为革兰阳性菌(55%~95%),如金黄色葡萄球菌、肠球菌及凝固酶阴性葡萄球菌等;术后有脑脊液漏者,如预防性应用抗菌药物可使革兰阴性菌的感染发生率显著增加,以铜绿假单胞菌、克雷伯菌属、大肠埃希菌和黏质沙雷菌最常见;导管植入者易感染金黄色葡萄球菌、凝固酶阴性葡萄球菌(尤其表皮葡萄球菌)及铜绿假单胞菌、不动杆菌等兼性/需氧革兰阴性杆菌和厌氧杆菌(如脆弱拟杆菌、痤疮丙酸杆菌和梭状芽孢杆菌等);穿透性脑外伤易感染金黄色葡萄球菌、凝固酶阴性葡萄球菌及铜绿假单胞菌、不动杆菌和大肠埃希菌等兼性/需氧革兰阴性杆菌<sup>[8-9]</sup>;基底部颅骨骨折及耳鼻喉手术早期易感染肺炎链球菌、A组/B族溶血性链球菌及流感嗜血杆菌等;有严重基础疾病者常由肠球菌引起感染。

## 三、细菌性中枢神经系统感染常用检测技术应用现状

1. 脑脊液涂片与细菌培养:脑脊液涂片和细菌培养目前仍是各临床实验室诊断中枢神经系统感染最常用的检测手段,从中发现致病菌是判断感染的“金标准”。脑脊液涂片可快速对含一定菌量的活菌、死菌进行检测,但阳性检出率低;细菌培养虽能鉴定细菌及通过药敏试验结果指导临床治疗,但存在耗时长(一般细菌3~4 d,结核分枝杆菌培养4~6周)和培养阳性率低等缺点,且易受病原菌量、病原菌是否存活、环境和抗菌药物使用等条件限制,无法满足临床快速诊断和及时治疗的需求。多位学者在提高涂片阳性率及培养方法方面进

行研究<sup>[6]</sup>,但单靠脑脊液涂片和培养仍会产生漏检,滞后于临床诊疗的需求。

## 2. 脑脊液免疫学检测方法及免疫学、生物化学标志物检测

(1) 乳胶凝集试验:乳胶凝集试验是用已知抗体与相应菌抗原结合产生肉眼可见凝集反应的方法,有研究应用该法检测脑脊液标本中脑膜炎双球菌、流感嗜血杆菌和肺炎链球菌抗原,特异性(100%)和敏感性(93%)均高于脑脊液涂片和培养<sup>[6]</sup>,但该方法只针对特异抗原,不能检测脑脊液中的未知病原菌。

(2) 脑脊液免疫学标志物检测:正常脑脊液中抗体、补体含量极低,二者含量升高可提示不同类型颅内感染:病毒性感染时二者含量无显著升高,细菌性感染时,脑脊液免疫球蛋白IgM、IgG、IgA及补体C3、C4含量均显著升高,结核性则以IgG和IgA升高为主,化脓性感染以IgM升高为主<sup>[10]</sup>。但脑脊液抗体、补体升高对BCNI诊断不具特异性,脑梗死等疾病亦可使其含量升高,因此,临床诊断时应用较少。近年来,脑脊液细胞因子对BCNI早期诊断的检测成为热点,有研究报道,BCNI时脑脊液中TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-8水平显著升高,当TNF- $\alpha$  > 75.8 pg/ml、IL-6 > 90 pg/dl且IL-8 > 773.5 pg/dl时可鉴别细菌性和病毒性感染<sup>[11]</sup>。但细胞因子检测方法复杂、价格贵且无参考值,在临床应用中受限。

(3) 脑脊液生化标志物检测:脑脊液乳酸含量是临床鉴别细菌性及病毒性颅内感染常用的生化标志物之一,细菌性感染时其含量升高<sup>[12]</sup>,病毒性感染时无显著改变;脑脊液蛋白测定是脑脊液常规检测项目,临床上常结合脑脊液葡萄糖和氯化物等综合判断。近年来,与感染相关的一些特异性蛋白备受重视,如C-反应蛋白、降钙素原、 $\beta_2$ 微球蛋白、胱抑素C和S-100B蛋白等<sup>[13-14]</sup>,因其不受抗菌药物使用影响,为BCNI的鉴别诊断提供了新方向,但特异蛋白的检测复杂、耗时且各实验室临界值不统一等,目前仅限于实验研究阶段。

## 四、分子生物学技术在细菌性中枢神经系统感染诊断中的应用进展

近年来,分子生物学技术的飞速发展,为分子水平精确鉴定病原菌打开了窗口,脑脊液病原学检测已从细胞形态、数目等发展到DNA分子水平。采用聚合酶链反应(PCR)技术检测脑脊液中细菌标志性基因成为一种快速、简单、敏感和特异的方法,且不需体外培养,对厌氧菌/苛养菌等培养困难和培养不出的细菌更有优势。此外,巢式PCR、荧光定量PCR、16S rRNA基因序列分析及基因芯片技术等相继应用于临床,使BCNI的诊断不再局限于传统的检测方法。

1. 巢式和(或)半巢式PCR:本法需设计3条或4条的



引物两套,对脑脊液进行两步法基因扩增,检测其中含量低的病原体。Takahashi等<sup>[15]</sup>用巢式PCR检测脑脊液中含有甚微的结核分枝杆菌,较传统的PCR方法敏感度高出1 000~10 000倍,对结核性颅内感染的诊断起了很大作用。Chakrabarti等<sup>[16]</sup>用半巢式PCR检测脑脊液中细菌,与培养法相比其检测具有更高的敏感度和特异度。Failane等<sup>[17]</sup>对疑有BCNI的儿童脑脊液应用半巢式PCR检测脑膜炎奈瑟菌、肺炎链球菌和流感嗜血杆菌,阳性和阴性预测值均为90%以上,提示巢式PCR对革兰染色、培养或抗原检测阴性或不确定时更有检测价值。

## 2. 荧光定量PCR (RT-PCR) 技术

RT-PCR是常规PCR基础上加入荧光探针,具有准确性高、重复性好等特点,已广泛用于基因表达、病原体检测等领域。Chiba等<sup>[18]</sup>应用RT-PCR检测细菌性脑膜炎的病原体,阳性检出率(39%)显著高于脑脊液培养(10%)。Henry等<sup>[19]</sup>应用RT-PCR检测脑脊液中肺炎链球菌、流感嗜血杆菌和脑膜炎奈瑟菌敏感性和特异性分别达95.7%和94.3%,且不受抗菌药物应用影响。

细菌基因检测与细菌培养相比,灵敏度更高、耗时较少、不受抗菌药物使用及是否活菌干扰,但临床常用的PCR方法多根据细菌的保守基因或致病/耐药基因设计特异引物检测特定病原体,不能检测脑脊液中未知细菌和对病原菌进行分类,存在假阳性率高和费用昂贵等缺点。

3. 基于16S rRNA基因序列分析技术:16S rRNA基因核苷酸序列具有高度保守性,存在于所有细菌的染色体基因组中,其在保守区之间有9~10个变异区,利用16S rRNA可变区与恒定区的特性,设计细菌通用引物,能对临床分离的任何病原菌进行准确鉴定和定位及不同种属细菌的分类,较传统的细菌培养有更高敏感性。Failane等<sup>[17]</sup>利用16S rRNA基因扩增技术设计了快速检测颅内感染常见病原菌的检测方法,能准确、快速且高效地检测脑脊液中病原菌。国内学者应用该技术检测脑脊液中细菌,发现其阳性率显著高于培养法<sup>[20-21]</sup>。但存在实验条件要求高、试剂成本高和易污染导致假阳性等缺点。

4. 基因芯片检测技术:基因芯片技术是一种快速、高效、高通量的核酸分析技术,已广泛用于基因检测、药物或耐药基因的筛选、疾病相关基因的诊断、病原微生物感染的鉴定等领域。以往文献中,有学者针对化脓性脑膜炎常见菌属分别设计一条探针的微阵列检测芯片<sup>[22]</sup>,虽获得很好结果,但无法进行深入的亚型分析,对致病菌多样的临床样本感染的检测漏检概率大,不能对临床诊疗进行有效指导。侯晓霖等<sup>[23]</sup>通过NCBI数据库检索,筛选了包括脑膜炎奈瑟菌、肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、表皮葡萄球菌及其他凝固酶阴性葡萄球菌等化脓性脑膜炎常见细菌的多条16S rRNA序列特异性探

针(覆盖脑膜炎常见病原菌90%的亚种),并根据临床流行情况变化进行探针增减来满足临床需求。刘志忠等<sup>[24]</sup>应用基因芯片法检测临床脑脊液感染常见的10个种(属)病原菌,包括金黄色葡萄球菌、粪肠球菌和屎肠球菌、凝固酶阴性葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、鲍曼不动杆菌、阴沟肠杆菌、产气肠杆菌和肺炎克雷伯菌/肠杆菌属,与传统细菌培养比较符合率为97.0%,证实了芯片诊断技术筛查脑脊液病原菌的可行性,具有简便、快速、准确和高通量等优点,对临床样本检测及流行病学调查有重要意义。管义祥等<sup>[25]</sup>用多重PCR结合基因芯片检测脑脊液常见致病菌及耐药基因,证实基因芯片技术较脑脊液培养有更高的敏感性和特异性,适用于颅内感染病原菌的快速诊断,且在菌株不明时快速检测耐药基因为临床早期经验性用药指明了方向。目前,基因芯片的发展趋势主要为探针的高密度化,检测样品微量化和芯片矩阵面积微量化,这些将提高检测敏感度和降低成本。然而芯片检测操作繁琐,尤其芯片的洗涤、杂交条件及杂交温度的优化和信号探测等方面需特别注意,另外其高费用限制了其在临床检测方面的大规模应用。

总之,具有更多优点的分子诊断技术将应用在脑脊液的细菌学诊断,高通量、快速准确筛查脑脊液多种病原菌的方法将成为临床微生物检测技术的主要发展趋势之一。目前,针对细菌性中枢神经系统感染的实验室检测,笔者认为,各实验室应根据自身条件,对各种脑脊液检测方法进行综合评价及比较,采用不同方法与指标联合检测进行诊断;进行多学科合作,开发新的方法与技术,同时提高实验室人员的能力素质及质量控制体系等,以促进BCNI的实验室检测技术的发展。

## 参 考 文 献

- 1 Conen A, Walti LN, Merlo A, et al. Characteristics and treatment outcome of cerebrospinal fluid shunt associated infections in adults: a retrospective analysis over an 11-year period[J]. Clin Infect Dis, 2008, 47(1): 73-82.
- 2 高静, 钟建民. 化脓性脑膜炎病原菌及流行病学研究进展[J]. 江西医药, 2011, 46(10): 960-962.
- 3 徐明, 石广志, 唐明忠, 等. 1997-2010年某院神经外科患者脑脊液分离菌及其耐药性研究[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2012, 6(3): 202-208.
- 4 张冰琰, 陈晨, 虞胜强, 等. 成人开颅术后并发细菌性脑膜炎的危险因素分析[J]. 中华临床感染病杂志, 2014, 7(3): 202-206.
- 5 Adriani KS, van de Beek D, Brouwer MC, et al. Community-acquired recurrent bacterial meningitis in adult[J]. Clin Infect Dis, 2007, 45(5): e46-e51.
- 6 杨梅雨, 罗海燕. 不典型颅内感染的脑脊液诊断进展[J]. 实用预防医学, 2010, 17(11): 2342-2344.
- 7 田叶红, 陈佑义. 医院获得性细菌性脑膜炎常见病原体及危险因素[J]. 中国感染与化疗杂志, 2012, 12(2): 158-160.
- 8 Khan FY, Abukhattab M, Baager K. Nosocomial post-neurosurgical

- Acinetobacter baumannii* meningitis: a retrospective study of six cases admitted to Harmed General Hosipital, Qatar[J]. J Hosp Infect,2012,80(2):176-179.
- 9 Yang M, Hu Z, Hu F. Nosocomial meningitis caused by *Acinetobacter baumannii*: risk factors and their impact on patient outcomes and treatments[J]. Future Microbial,2012,7(6):787-793.
- 10 邓敏峰, 柯以铨. 细菌性颅内感染的实验室诊断的新进展[J]. 中华神经医学杂志,2013,12(4):430-432.
- 11 Bociaga-Jasik M, Garlicki A, Cieaia A, et al. The diagnostic value of cytokine and nitric oxide concentrations in cerebrospinal fluid for the differential diagnosis of meningitis[J]. Adv Med Sci,2012,57(1):142-147.
- 12 Sakushima K, Hayashino Y, Kawaguchi T, et al. Diagnostic accuracy of cerebrospinal fluid lactate for differentiating bacterial meningitis from aseptic meningitis: a meta-analysis[J]. J Infect,2011,62(4):255-262.
- 13 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.
- 14 Morichi S, Kasshiwagi Y, Takekuma K, et al. Expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in cerspinal fluid and plasma of children with meningitis and encephslitis/enephalopathy[J]. Int J Neurosci,2013,123(1):17-23.
- 15 Takahashi T, Nakayama T, Tamura M, et al. Nested polymerose chain reaction for assessing the clinical course of tuberculous meningitis[J]. Neurology,2005,64(10):1789-1793.
- 16 Chakrabari P, Das BK, Kapil A. Application of 16S rDNA based seminested PCR for diagnosis of acute bacterial meningitis[J]. India J Med Res,2009,129(2):182-188.
- 17 Failane L, Wagner M, Chesky M, et al. Simultaneous detection of nisseria meningitidis, haemophihts influenzae and *Streptococcus sp.* by polymerase chain reaction for the diagnosis of bacterial meningitis[J]. Arq Neuropsiquiatr,2005,63(4):920-924.
- 18 Chiba N, Murayama SY, Morozumi M, et al. Rapid detection of eight causative pathogens for the diagnosis of bacterial meningitis by real-time PCR[J]. J Infect Chemother,2009,15(2):92-98.
- 19 Wu HM, Cordeiro SM, Harcourt BH, et al. Accuracy of real-time PCR, Gram stain and culture for *Streptococcus pnemoniae*, *Neisseria meningitis* and *Haemophilus influenzae* meningitis diagnosis[J]. BMC infections Diseases,2013,13(4):26-35.
- 20 梁志娟, 侯晓霖, 王振海, 等. 细菌性脑膜炎患者脑脊液细菌基因组DNA的提取及16SrDNA的鉴定[J]. 华中科技大学学报(医学版),2013,2(3):314-316.
- 21 陈茶, 屈平华, 顾全, 等. 基于细菌16S rRNA基因的PCR扩增与测序分析在临床不常见菌鉴定中的应用[J]. 中华检验医学杂志,2012,35(7):612-619.
- 22 Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, et al. PCR primers and probes for the 1S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid[J]. J Clin Microbiol,1994,32((2):335-351.
- 23 侯晓霖, 梁志娟, 王振海. 化脓性脑膜炎脑脊液常见病原菌基因芯片的构建[J]. 中国医科大学报,2013,42(1):14-18.
- 24 刘志忠, 张艳, 石广志. 基因芯片法检测脑脊液病原菌的临床应用[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版,2013,6(3):210-213.
- 25 管义祥, 沈剑虹, 居兴云, 等. 基因学快速检测脑脊液常见细菌感染的方法[J]. 中华神经科杂志,2012,45(8):586-589.

(收稿日期: 2015-02-20)

(本文编辑: 孙荣华)

曹敬荣, 王培昌, 陈静, 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.