

DOI:10.13350/j.cjpb.220813

· 调查研究 ·

急性脑膜炎/脑炎综合征病例病原学研究*

吴晓平¹, 张鸽^{2**}, 李静坤³, 张学颖⁴, 王琨⁴

(1. 唐山市中医医院, 河北唐山 063000; 2. 唐山市工人医院; 3. 开滦(集团)有限责任公司唐家庄医院; 4. 唐山市第五医院)

【摘要】 目的 对急性脑膜炎/脑炎综合征病例病原学进行研究, 为患者早期诊治提供依据。方法 采集患者血液和脑脊液标本, 并进行病原学检测。采用酶联免疫吸附试验对柯萨奇病毒、埃可病毒、单纯疱疹病毒抗体和乙型脑炎病毒 IgM 抗体检测。采用 RT-PCR 检测脑膜炎奈瑟氏菌、EB 病毒、腺病毒等进行检测。采用全自动微生物鉴定系统进行菌种鉴定。采用 RT-PCR 分析肠道病毒的亚型。全自动蛋白分析仪检测脑脊液的 C 反应蛋白(CRP)、胱抑素 C(Cys C)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、免疫球蛋白(IgG)和 S100B 蛋白(S100B)并进行组间对比分析。结果 350 例患者中男 202 例, 女 148 例, 男女比为 1.36:1。按年龄划分: <1 岁 47 例、1~5 岁 90 例、5~10 岁 91 例、10~15 岁 39 例、15~20 岁 17 例、20~30 岁 21 例、30~40 岁 13 例、40~50 岁 11 例、≥60 岁 7 例。按季节划分: 春季 92 例, 夏季 107 例, 秋季 66 例, 冬季 85 例。按症状划分发热、头痛、腹泻、恶心、呕吐、精神萎靡、意识障碍、嗜睡、躯体形式障碍和脑膜刺激征患者例数分别为: 317、186、31、232、167、259、96、103、51 和 87 例。病原菌检出 68 株, 其中金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、肺炎链球菌、表皮葡萄球菌、无乳链球菌、脑膜炎奈瑟氏菌、肠球菌、流感嗜血杆菌、其他病原菌检出数分别为: 12、9、9、7、6、5、5、4 和 11 株。病毒检出 66 株, 其中埃可病毒、柯萨奇病毒、单纯疱疹病毒、腮腺炎病毒、EB 病毒、巨细胞病毒和其他病毒检出数分别为: 15、12、10、6、6、5 和 12 株。肠道病毒亚型分布: 埃可病毒 33 型 6 株、埃可病毒 11 型 5 株, 埃可病毒 30 型 3 株, 埃可病毒 9 型 1 株; 柯萨奇病毒 B5 型 8 株, 柯萨奇病毒 B3 型 4 株。病毒感染者和病原菌感染者的 CRP、CysC、MMP-9 和 IgG 数据组间对比差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 5 岁儿童以下是主要患病人群。夏季患者例数较多, 秋季患者例数较少。病毒感染者和病原菌感染者临床检验数据存在一定差异, 有助于临床诊断。

【关键词】 脑炎脑膜炎症候群; 病原菌; 病毒; 临床特征**【中图分类号】** R378**【文献标识码】** A**【文章编号】** 1673-5234(2022)08-0934-04

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Aug.; 17(8):934-937.]

Study on etiology of acute meningitis and encephalitis syndromes(AMES)WU Xiao-ping¹, ZHANG Ge², LI Jing-kun³, ZHANG Xue-ying⁴, WANG Kun⁴ (1. Tangshan Traditional Chinese Medicine Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China; 2. Tangshan Worker Hospital; 3. Kailuan (Group) Limited Liability Company Tangjiazhuang Hospital; 4. Tangshan No. 5 Hospital) *****【Abstract】 Objective** To study the etiology of AMES, so as to provide basis for early diagnosis and treatment.

Methods Blood and CSF samples were collected for etiology detected. The antibodies against the IgM of Coxsackie virus, ekovirus, herpes simplex virus and Japanese encephalitis virus were detected by ELISA. The *Neisseria meningitides*, EB virus and adenovirus were detected by RT-PCR. The strains were identified by automatic microbial identification system. The subtypes of enterovirus were analyzed by RT-PCR. CRP, Cys C, MMP-9, IgG and S100B protein in CSF were detected by automatic protein analyzer and compared among groups. **Results** Among the 350 patients, there were 202 males and 148 females, with a male to female ratio of 1.36:1. According to age, 47 cases were under 1 year old, 90 cases were between 1 and 5 years old, 91 cases were between 5 and 10 years old, 39 cases were between 10 and 15 years old, 14 cases were between 15 and 20 years old, 17 cases were between 20 and 30 years old, 21 cases were between 30 and 40 years old, 13 cases were between 40 and 50 years old, 11 cases were between 50 and 60 years old, and 7 cases were over 60 years old. According to seasons, 92 cases were in spring, 107 cases were in summer, 66 cases were in autumn and 85 cases were in winter. According to the symptoms, the number of patients with fever, headache, diarrhea, nausea, vomiting, mental depression, disturbance of consciousness, lethargy, somatoform disorder and meningeal irritation were 317 cases, 186 cases, 31 cases, 232 cases, 167 cases, 259 cases, 96 cases, 103 cases, 51 cases and 87 cases respectively. 68 strains of pathogenic bacteria were detected, including 12 strains of *Staphylococcus aureus*, 9 strains of *Escherichia coli*, 9 strains of *S. pneumoniae*, 7 strains of *S. epidermidis*, 6 strains of *S. agalactis*, 5 strains of *N. meningitides*, 5 strains of *Enterococcus*, 4

* **【基金项目】** 河北省中医药管理局 2020 年立项课题(No. 2020410)。** **【通讯作者】** 张 鸽, E-mail: 390771986@qq.com**【作者简介】** 吴晓平(1963-), 女, 河北唐山人, 本科, 主任医师, 主要研究方向: 院内感染管理。E-mail: hwiw2853@21cn.com

strains of *Haemophilus influenzae*, and 11 strains of other pathogenic bacteria. 66 strains of viruses were detected, including 15 strains of Echo virus, 12 strains of Coxsackie virus, 10 strains of herpes simplex virus, 6 strains of mumps virus, 6 strains of EB virus, 5 strains of cytomegalovirus and 12 strains of other viruses. Distribution of enterovirus subtypes: 6 strains of Echo 33, 5 strains of Echo 11, 3 strains of Echo 30 and 1 strain of Echo 9; 8 strains of Coxsackie virus B5 and 4 strains of Coxsackie virus B3. The CRP, CysC, MMP-9 and IgG data of virus infected patients and pathogen infected patients were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Children under 5 years old are the main patients. The number of patients was more in summer and less in autumn. There are some differences in clinical test data between virus infected and pathogen infected, which is helpful for clinical diagnosis.

【Key words】 acute meningitis and encephalitis syndromes (AMES); pathogenic bacteria; viruses; clinical features

急性脑膜炎/脑炎综合征 (Acute meningitis and encephalitis syndrome, AMES) 属于感染性疾病、中枢神经系统的炎症性疾病, 其中脑炎更加严重。患者起病急, 临床上具有发热、头疼、恶心、呕吐、腹泻、嗜睡、意识障碍、注意力下降、注意力不集中、记忆力下降、昏迷、抽风、意识障碍、躯体性障碍, 另外还会有局灶性表现如偏身感觉障碍、偏瘫和局灶性神经功能缺损等一类表现的病例群体^[1]。有研究指出引发 AMES 的病原体有 100 多种, 其中多数是由病毒和病原菌引起, 而原虫、寄生虫、支原体和其他病原体引起的 AMES 较少^[2-3]。随着近年来乙脑疫苗、流感嗜血杆菌 (Hib) 结合疫苗和 13 价、23 价肺炎链球菌结合疫苗 (PCV13, PCV23) 的广泛接种, AMES 的病原谱发生了改变。AMES 多发于 15 岁以下儿童, 严重者可能死亡, 据统计 2019 年 AMES 全球死亡人数约为 25 万人^[4]。由于气候和环境的不同, AMES 具有一定的地域性。因而研究本地区 AMES 发病特点和病原谱构成特点可以为防治 AMES 提供科学依据, 避免患者错过治疗的有利时机, 造成不可逆伤害。

材料与方法

1 研究对象

选取 2019 年 1 月-2021 年 12 月收治的 AMES 患者。纳入标准: (1) 急性发作并具有精神状态改变等 AMES 临床特征; (2) 脑电图或脑实质影像学提示脑炎; (3) 治疗期间进行病原体和自身抗体检测; (4) 档案资料齐全。排除标准: (1) 合并其他感染性疾病; (2) 合并其他免疫类疾病; (3) 心、肝、肾功能有严重疾病。所有患者及家属均知情同意并签署知情同意书。

2 仪器与试剂

VITEK[®] 2COMPACT 30/60 全自动微生物鉴定系统 (含 GN、GP 和 NH 鉴定卡), 法国生物梅里埃公司生产; BACTEC 9120 血培养仪, 美国 BD 公司生产; ABI-7500 型荧光定量 PCR 分析仪, 美国应用生物系统公司生产。荧光定量 PCR 反应试剂盒, 宝生物工程 (大连) 有限公司产品; 培养基, 贝瑞特生物技术 (郑州) 有限责任公司产品; 单纯疱疹病毒抗体和乙型脑炎

病毒抗体检测, 南京森贝伽生物科技有限公司产品; 柯萨奇病毒和埃可病毒抗体检测试剂盒, 深圳市赛尔生物有限公司产品。

3 方法

3.1 标本采集及鉴定 采集患者空腹静脉血 8 mL, 脑脊液 (CSF) 2 mL, 并尽快送检。柯萨奇病毒、埃可病毒、单纯疱疹病毒抗体和乙型脑炎病毒检测: 采用酶联免疫吸附试验对所有血清样本进行病毒 IgM 抗体检测, 操作参照试剂盒说明书。病原菌检测: 将脑脊液标本接种于巧克力琼脂培养基和哥伦比亚血琼脂培养基并放入 5% CO₂ 培养箱, 35 °C 培养。连续 5 d 观察是否有菌株生长。若有, 则立即进行接种培养并进行革兰染色试验, 然后采用全自动微生物鉴定系统进行菌种鉴定。操作依据《全国临床检验操作规程》。采用血液培养仪对血液标本进行培养, 其他同脑脊液标本培养和鉴定。采用 RT-PCR 检测脑膜炎奈瑟氏菌、EB 病毒、腺病毒等进行检测。

3.2 肠道病毒亚型分析 进一步培养鉴定为柯萨奇病毒和埃可病毒的毒株, 并采用 RT-PCR 扩增病毒 VP1 基因序列片段, 产物经 EB 染色, 1% 琼脂糖凝胶电泳, 电压 110 V, 35 min。经凝胶系统成像, 对产生特异性亮带且清晰的进行测序。测序结果采用 Bioedit 进行校正, 并与数据库中相关序列进行比对和血清型确定, 操作方法以及 RT-PCR 反应体系和反应条件参照文献^[5]。

3.3 脑脊液指标比较 选取病毒组和病原菌感染组各 60 例患者, 采用全自动蛋白分析仪检测脑脊液的 C 反应蛋白 (CRP)、胱抑素 C (Cys C)、基质金属蛋白酶-9 (MMP-9)、免疫球蛋白 (IgG) 和 S100B 蛋白 (S100B), 操作过程参照操作说明书。

3.4 资料整理 收集患者的年龄、性别、临床症状等基本临床资料, 并按照将患者按年龄、症状等进行分析。

3.5 统计学分析 计量资料用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用莱文方差等同性检验分析病毒组和病原菌 CRP、Cys C、MMP-9、IgG 和 S100B 指标差异, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

结 果

1 一般资料

350例 AMES 患者中男 202 例,女 148 例,男女比为 1.36:1。按年龄划分:<1 岁 47 例、1~岁 90 例、5~岁 91 例、10~岁 39 例、15~岁 14 例、20~岁 17 例、30~岁 21 例、40~岁 13 例、50~岁 11 例、≥60 岁 7 例。其中 5 岁以下 137 例,占总患者数 39.14%,是主要患病人群。按季节划分:春季 92 例,夏季 107 例,秋季 66 例,冬季 85 例。夏季患者例数较多,秋季患者例数较少。

2 临床症状

350 例患者中发热、头痛、腹泻、恶心、呕吐、精神萎靡、意识障碍、嗜睡、躯体形式障碍和脑膜刺激征患者例数分别为:317、186、31、232、167、259、96、103、51 和 87 例,分别占总人数的 90.57%、53.14%、8.86%、66.29%、47.71%、74.00%、27.43%、29.43%、14.57% 和 24.86%。患者中以发热、精神萎靡和恶心为主。

3 病原体分布

350 例患者样本中 134 份样本检出病原体,检出率 38.29%。其中细菌 68 株,病毒 66 株。细菌以葡萄球菌、链球菌和大肠埃希菌为主。病毒以埃可病毒、柯萨奇病毒和单纯疱疹病毒为主(表 1)。

表 1 病原体类型
Table 1 Pathogen distribution

病原体类型 Pathogen type	阳性数 Positive cases	检出率(%) Detection rate
细菌	68	19.43
金黄色葡萄球菌	12	3.43
大肠埃希菌	9	2.57
肺炎链球菌	9	2.57
表皮葡萄球菌	7	2.00
无乳链球菌	6	1.71
脑膜炎奈瑟氏菌	5	1.43
肠球菌	5	1.43
流感嗜血杆菌	4	1.14
其他病原菌	11	3.14
病毒	66	18.86
埃可病毒	15	4.29
柯萨奇病毒	12	3.43
单纯疱疹病毒	10	2.86
腮腺炎病毒	6	1.71
EB 病毒	6	1.71
巨细胞病毒	5	1.43
其他病毒	12	3.43
合计 Total	134	38.29

4 肠道病毒亚型分布

本次研究中检出埃可病毒 15 株,其中埃可病毒 33 型 6 株,埃可病毒 11 型 5 株,埃可病毒 30 型 3 株,埃可病毒 9 型 1 株。本次研究中检出柯萨奇病毒 12 株,其中柯萨奇病毒 B5 型 8 株,柯萨奇病毒 B3 型 4

株。

5 两组 CRP、CysC、MMP-9、IgG 和 S100B 差异比较

病原菌组 CRP:10.51±1.48mg/dL, CysC:0.83±0.10 mg/dL, MMP-9:61.07±2.64 ng/mL, IgG:6.78±0.61 和 S100B:0.69±0.06;病毒组 CRP:32.49±3.86 mg/dL, CysC:1.88±0.08 mg/dL, MMP-9:143.07±5.72 ng/mL, IgG:53.69±5.00 和 S100B:0.90±0.06。CRP、CysC、MMP-9、IgG 不同病原感染两组数据比较差异有统计学意义($P < 0.05$), S100B 不同病原感染两组数据比较差异无统计学意义($P > 0.05$)(表 2)。

表 2 不同病原脑脊液 CRP、CysC、MMP-9、IgG 和 S100B 比较
Table 2 Comparison of CRP, CysC, MMP-9, IgG and S100B in cerebrospinal fluid of different pathogens

组别 Group	CRP (mg/dL)	CysC (mg/L)	MMP-9 (ng/mL)	IgG	S100B (pg/ml)
细菌组	10.51±1.48	0.83±0.10	61.07±2.64	6.78±0.61	0.69±0.06
病毒组	32.49±3.86	1.88±0.08	143.07±5.72	53.69±5.00	0.90±0.06
F	54.47	4.26	41.36	101.66	1.92
P	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05

讨 论

AMES 可以由细菌、病毒和其他病原体引起,是中枢神经系统最为常见的感染性疾病^[5]。AMES 好发于儿童,尤其是婴幼儿。婴幼儿免疫系统发育不成熟,免疫力差易发生感染。王东等^[6]对东莞市了 5 家试点医院开展 AMES 监测结果显示 1~5 岁发病率最高,占总人数 32.50%。王爱梅等^[7]对 2010 年-2018 年濮阳市确诊为细菌性脑炎脑膜炎的研究中 1 岁以下的新生儿和婴儿是主要患病人群。本次研究中 5 岁以下 137 例,占总患者数 39.14%,是主要患病人群。AMES 的主要症状有发热、头痛、腹泻、意识障碍、躯体形式障碍和脑膜刺激征等,在本次研究中发热和精神萎靡是主要临床症状,并由少数患者出现躯体形式障碍和脑膜刺激征。自身免疫性脑炎患者的临床症状多为精神神经症状和异常运动等^[8]。有研究显示在儿童患者中病毒性脑炎患者则比细菌感染患者更易发生癫痫^[9]。Granerod 等^[10]研究认为单纯疱疹病毒感染性脑炎和自身免疫性脑炎的患者会有癫痫发作表现,而结核分枝杆菌或水痘带状疱疹病毒引起的脑炎很少有癫痫发作。AMES 病原体检出存在一定困难,赵佳佳等^[11]对张家口市 5 所医院的患者样本检测结果显示病原菌检出率为 14.94%,病毒检出率 11.97%。赵佳佳等^[11]研究中检出病原菌为金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、新型隐球菌和肺炎链球菌等,病毒为科萨奇病毒、埃可病毒和腮腺炎病毒等。王爱梅等^[7]对濮阳市三家哨点医院细菌性脑炎脑膜炎的研究显示细菌以肺炎链球菌、李斯特氏菌和无乳链球菌为主。

本次研究中对 350 例 AMES 患者样本中 68 份样本检出病原菌,检出率 19.43%;66 例样本检出病毒,检出率 18.86%。病原菌以葡萄球菌、链球菌和大肠埃希菌为主。病毒以埃可病毒和柯萨奇病毒为主。埃可病毒约有 30 多个血清型,其中 4、6、9、11、14、16、18、25、30、31 和 33 型与脑炎的发病有关^[12],本次检出共涉及 4 个基因型,其中 33 型最多。柯萨奇病毒是无包膜的单正链 RNA 病毒,它与手足口病、病毒性脑炎和心肌炎等发病有关^[13]。本次研究中检出柯萨奇病毒 12 株,其中柯萨奇 B5 型 8 株,柯萨奇 B3 型 4 株。本次研究中未检出乙脑病毒,这与乙脑疫苗的接种有关。肺炎链球菌仍有检出,因而推动肺炎链球菌疫苗接种有着重要意义。

CRP 属于急性反应蛋白,它是当人体发生感染或组织发生损伤急剧上升的蛋白质。它激活补体和加强吞噬细胞的吞噬而起调理作用,从而清除入侵的病原生物和凋亡的细胞,有效的促进机体恢复。因而随着患者病情的好转,CRP 会呈下降趋势。Cys C 一种小分子质量的胱氨酸蛋白酶抑制剂。所有有核细胞稳定地产生 Cys C,脑脊液中 Cys C 能够反应脑细胞功能。MMP-9 属于基质金属蛋白酶,它能够降解和重塑细胞外基质。IgG 是免疫球蛋白的一种,它是病原微生物进入到人体后产生的一种抗体,人体免疫系统的重要组成部分。S100B 是神经系统损伤的标志物之一,S100B 蛋白水平升高,提示神经系统损伤。病毒性脑炎患者与细菌性脑炎患者的 CRP、Cys C、MMP-9 和 IgG 的数值差异具有统计学意义,这与其他研究一致^[14-15]。而两组患者中 S100B 数值差异不具有统计学意义,这与 Melamed 等^[16]研究一致。对不同病原体的 AMES 患者症状进行研究,对早期诊断和及时治疗有着重要意义,可以改善患者的预后。

【参考文献】

- [1] Varici Balci FK, Sayiner AA. A seven-year evaluation of viral central nervous system infections[J]. Mikrobiyol Bul, 2019, 53(4): 434-441.
- [2] Bale JF. Virus and immune-mediated encephalitis: epidemiology, diagnosis, treatment, and prevention [J]. Pediatr Neurol, 2015, 53(1): 3-12.
- [3] Singhi P. Central nervous system infections in children: An ongoing challenge[J]. Indian J Pediatr, 2019, 86(1): 49-51.
- [4] Varici Balci FK, Sayiner AA. A seven-year evaluation of viral central nervous system infections[J]. Mikrobiyol Bul, 2019, 53(4): 434-441.
- [5] Boucher A, Herrmann J L, Morand P, et al. Epidemiology of infectious encephalitis causes in 2016[J]. Med Mal Infect, 2017, 47(3): 221-235.
- [6] 王东, 林瑞彬, 陈绍丽, 等. 2016-2017 年东莞市急性脑炎、脑膜炎流行特征及病原谱分析[J]. 华南预防医学, 2018, 44(6): 542-544, 548.
- [7] 王爱梅, 徐国锋, 孟晓飞, 等. 127 例细菌性脑炎脑膜炎症候群流行病学分析[J]. 河南预防医学杂志, 2020, 31(6): 417-422.
- [8] Thomas L, Mailles A, Desestret V, et al. Autoimmune N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis is a differential diagnosis of infectious encephalitis[J]. J Infect, 2014, 68(5): 419-425.
- [9] Thompson C, Kneen R, Riordan A, et al. Encephalitis in children [J]. Arch Dis Child, 2012, 97(2): 150-161.
- [10] Granerod J, Ambrose HE, Davies NWS, et al. Causes of encephalitis and differences in their clinical presentations in England: a multicentre, population-based prospective study[J]. Lancet Infect Dis, 2010, 10(12): 835-844.
- [11] 赵佳佳, 郭莱伊, 孙利, 等. 2014-2019 年张家口市脑炎脑膜炎症候群病例病原学监测结果分析[J]. 华南预防医学, 2022, 48(2): 230-233.
- [12] Krumbholz A, Egerer R, Braun H, et al. Analysis of anechovirus 18 outbreak in Thuringia, Germany: insights into the molecular epidemiology and evolution of several enterovirus species B members[J]. Med Microbiol Immunol, 2016, 205(5): 471-483.
- [13] Tavakoli NP, Wang H, Nattanmai S, et al. Detection and typing of enteroviruses from CSF specimens from patients diagnosed with meningitis/encephalitis[J]. J Clin Virol, 2008, 43(2): 207-211.
- [14] Hatachi T, Michihata N, Inata Y, et al. Prognostic factors among children with acute encephalitis/encephalopathy associated with viral and other pathogens[J]. Clin Infect Dis, 2021, 73(1): 76-82.
- [15] Chhatbar C, Prinz M. The roles of microglia in viral encephalitis: from sense to therapeutic targeting[J]. Cell Mol Immunol, 2021, 18(2): 250-258.
- [16] Melamed S, Avraham R, Rothbard DE, et al. Innate immune response in neuropathic forms of Gaucher disease confers resistance against viral-induced encephalitis [J]. Acta Neuropathol Commun, 2020, 8(1): 144.

【收稿日期】 2022-05-01 【修回日期】 2022-07-15