

撤稿声明

撤稿文章名: 两例急性脑膜炎和脑炎快速检验病因分析方式的可行性研究
作者: 郑钰树, 史心峰, 庞静
* 通讯作者: 邮箱: mdnorman@163.com
期刊名: 临床医学进展 (ACM)
年份: 2020
卷数: 10
期数: 3
页码 (从X页到X页): 418-423
DOI (to PDF): <http://dx.doi.org/10.12677/ACM.2020.103066>
文章ID: 1571224
文章页面: <https://www.hanspub.org/journal/PaperInformation.aspx?paperID=34799>
撤稿日期: 2020-4-10

撤稿原因 (可多选):

- 所有作者
 部分作者:
 编辑收到通知来自于 出版商
 科研机构:
 读者:
撤稿生效日期: 2020-4-10

撤稿类型 (可多选):

- 结果不实
 实验错误 数据不一致 分析错误 内容有失偏颇
 其他:
 结果不可再得
 未揭示可能会影响理解与结论的主要利益冲突
 不符合道德
 欺诈
 编造数据 虚假出版 其他:
 抄袭 自我抄袭 重复抄袭 重复发表 *
 侵权 其他法律相关:
 编辑错误
 操作错误 无效评审 决策错误 其他:
 其他原因:

出版结果 (只可单选)

- 仍然有效.
 完全无效.

作者行为 失误(只可单选):

- 诚信问题
 学术不端
 无 (不适用此条, 如编辑错误)

* 重复发表: "出版或试图出版同一篇文章于不同期刊."

历史

作者回应:

是, 日期: yyyy-mm-dd

否

信息改正:

是, 日期: yyyy-mm-dd

否

说明:


“两例急性脑膜炎和脑炎快速检验病因分析方式的可行性研究”一文刊登在 2020 年 3 月出版的《临床医学进展》2020 年第 10 卷第 3 期第 418-423 页上。因该文研究另做他用, 暂不发表, 作者主动申请撤稿。根据国际出版流程, 编委会现决定撤除此稿件, 保留原出版出处:

郑钰树, 史心峰, 庞静. 两例急性脑膜炎和脑炎快速检验病因分析方式的可行性研究[J]. 临床医学进展, 2020, 10(3): 418-423. <http://dx.doi.org/10.12677/ACM.2020.103066>

指导编委:

Firstname Lastname
(function e.g. EiC, journal abbreviation)

所有作者签名:



The Feasibility Study of Two Cases Etiological Analysis of Acute Meningitis and Encephalitis by Emergency Lab Examination

Yushu Zheng¹, Xinfeng Shi², Jing Pang^{3*}

¹College of Medical, Veterinary & Life Science, University of Glasgow, Glasgow, UK

²Neurology Department, The Second People's Hospital of Xintai, Tai'an Shandong

³Teaching & Research Department, The Second People's Hospital of Xintai, Tai'an Shandong

Email: *sdta_jingjing@163.com

Received: Mar. 3rd, 2020; accepted: Mar. 18th, 2020; published: Mar. 25th, 2020

Abstract

Objective: To analyze the etiology of acute meningitis and encephalitis by emergency laboratory examination. **Methods:** Two patients with meningitis and encephalitis were investigated. The samples of cerebrospinal fluid, pharyngeal swab and feces were collected from the patients. RNA was extracted from all samples by ethanol precipitation and centrifugation column for cDNA reverse transcription, RT-PCR and sequence analysis. **Results:** Patient 1 and Patient 2 have been infected by the virus. The size of two amplicons of the structural gene *vp1* of enterovirus indicates that Patient 1 in infant is infected with two different enter viruses. Sequence analysis confirmed that Patient 1 was infected with Coxsackie B5 and Poliovirus type 3. Patient 2 was infected with HSV-1. **Conclusion:** The emergency laboratory examination method can investigate and analyze the effective etiology of acute meningitis and encephalitis.

Keywords

Acute Meningitis, Encephalitis, Emergency Laboratory Examination

两例急性脑膜炎和脑炎快速检验病因分析方式的可行性研究

郑钰树¹, 史心峰², 庞静^{3*}

¹格拉斯哥大学医学兽医学与生命科学院, 英国 格拉斯哥

²新泰市第二人民医院神经内科, 山东 泰安

³新泰市第二人民医院科教科, 山东 泰安

Email: *sdta_jingjing@163.com

*通讯作者。

收稿日期：2020年3月3日；录用日期：2020年3月18日；发布日期：2020年3月25日

摘要

【目的】通过快速检验手段对急性脑膜炎和脑炎进行病因分析。**【方法】**定点调研两名脑膜炎和脑炎患者，向患者收集脑脊液、咽拭子和粪便样品后通过乙醇沉淀和离心柱从所有样品中提取RNA进行cDNA逆转录、RT-PCR和序列分析。**【结果】**患者1和患者2已被病毒感染，其中肠道病毒病毒结构基因VP1的两个扩增子大小表明患者1感染了2种不同的肠道病毒。序列分析证实患者1感染柯萨奇B5和脊髓灰质炎病毒3型。患者2感染HSV-1病毒。**【结论】**快速检测手段能对急性脑膜炎和脑炎患者进行有效病因调查分析。

关键词

急性脑膜炎，脑炎，急诊快速检验

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

急性脑膜炎是对脑膜和脑脊液(CSF)感染的炎症反应。脑膜炎的炎症发生部位是主要位于颅骨与脑之前的三层膜结构系统中，其中以紧贴脑表面的透明膜较为好发，而脑炎的炎症发生部位是脑实质。脑膜炎主要表现为头疼、发热、脑膜刺激征，意识障碍、吞咽障碍等。

脑炎是一种以意识改变、发热、癫痫、神经系统缺陷、脑脊液细胞增多、神经影像学及脑电图异常为特征的综合征[1]。脑炎最常见的病因是由嗜神经病毒引起的急性病毒性脑炎，包括单纯疱疹病毒(HSV)、水痘带状疱疹病毒(VZV)、肠病毒和虫媒病毒[1]。脑膜炎和脑炎的最常见诱因是感染，其中感染可能是由细菌、病毒、真菌和其他生物(例如脾虫叮咬)引起。据 De Crom 等人 2016 年报道，肠病毒是脑膜炎的最常见原因。Gnani 和 Whitley 在 2017 年的一项研究表明，由单纯疱疹病毒(HSV)引起的脑炎极为罕见，但致命，HSV-1 在成人中造成了 90% 以上的单纯疱疹脑炎[2] [3] [4] [5]。

急性脑膜炎和脑炎有许多共同的临床症状，如发热和头痛。脑膜炎的症状还包括流感症状、困倦、对强光敏感和颈部僵硬。脑炎通常以神经功能障碍为特征，如行为改变、谵妄和精神错乱。脑膜炎和脑炎都可能危及生命，必要时需紧急处理。本文通过对两个病案研究调查分析急性脑膜炎和脑炎通过快速检验方法进行有效病因鉴别诊断，两例病例的研究报道均获得病人家属的知情同意。

2. 材料与方法

2.1. 案例基本信息

案例 1：患者 1 (Patient 1)

第一例病人是一名 4 月大男婴，因头痛及脖子僵硬被父母送医，该男婴来自巴基斯坦旁遮普省，曾随父母前往英国探亲。患者于十天前到达英国时身体状态良好。大约三天前开始流鼻涕症状。今天该男婴表现出烦躁的状态，似乎有喉咙痛的症状，表现出不愿意吞咽，并观察到其下巴不能放在胸口。当天早些时候，母亲两次喂食均发生了呕吐症状，且体温高，疑似发烧。其母亲注意到身上出现有皮疹，伴有痉挛发作，并且总是闭着眼睛，似乎光线使他头痛。男婴身体和四肢出现有黄斑丘疹，用手指按压时

会消退，伴有出血点。目前体温是 39℃，脖子很僵硬，呈现 Kernig 征阳性。

在检查了眼部真菌后进行腰椎穿刺，以确保视盘清晰(即没有乳头状水肿的迹象)。将部分脑脊液(CSF)和病毒传播介质中的咽拭子及粪便标本送至生物实验室。该男婴曾经接种结核病、小儿麻痹症、白喉、破伤风、百日咳、乙型肝炎、HIB 肺炎、细菌性脑膜炎和轮状病毒疫苗。

临床症状：疲乏；畏光；发烧(39℃)；Kernig 征；身体四肢出现斑丘疹，按压后消失；大量出血点；乳头未见明显水肿。

临床诊断：脑膜炎。

案例 2：患者 2 (Patient 2)

第二位患者是一位 45 岁的会计师，由于行为古怪和发烧，被妻子送入急救中心。调查当日早晨附近居民发现他在当地公园里无目的徘徊，并伴随有自言自语的异常精神症状，他的妻子感觉其丈夫在这一天里对周边事件的感知度越来越低。当与其丈夫交谈时，对于基础性问题他很难给出较为正确的答案，并且在回答问题的过程出现疲乏症状，昏昏欲睡。患者妻子提供的病历中表明该患者此前没有基础性较为严重的疾病，平时也没有定期服用药物的既往史，但是在过去的几天一直抱怨无法明确地辨别周围物体颜色，调查前一天自诉出现头痛、发热症状，服用药物扑热息痛。经检查，患者体温为 37.9℃，但除了意识下降和语言障碍外，没有其他异常迹象。遂在科室行腰椎穿刺，将脑脊液(CSF)样本连粪便样本和病毒传输介质中的咽拭子标本一起送至病毒实验室。同时对患者开始静脉注射阿昔洛韦(*intravenous acyclovir*)。

临床症状：意识下降；语言障碍。

临床诊断：脑炎。

2.2. 材料与方法

2.2.1. 向患者收集脑脊液、咽拭子和粪便样品

患者的脑脊液、咽拭子和粪便样品提取均由临床医师操作并提供至实验室。

2.2.2. 通过乙醇沉淀并利用核酸纯化柱从所有样品中提取 RNA

用 AVL 裂解缓冲液裂解样品，并在室温下保存 10 分钟，通过将乙醇添加到混合物中来回收水溶液中的 RNA 并用核酸纯化柱提纯 RNA；用洗涤缓冲液(AW1 和 AW2)洗涤核酸纯化柱后，再用用无菌水收集纯化 RNA 并在-20℃下保存。

2.2.3. cDNA 逆转录

对于每个样品加入 6 ul RNA，24 ul 5 x RT 缓冲液，9.6 ul 12 mM dNTP，1.2 ul Rnasin，6 ul 随机引物，MMLV-RT 和 0.1 M DDT 和 7.2 ul H₂O。将反应液在 25℃ 孵育 10 分钟，37℃ 孵育 45 分钟，95℃ 孵育 5 分钟，最后在 4℃ 中保存。

2.2.4. RT-PCR

肠病毒(VPI 基因)，cDNA 模板变性，在 94℃ 2 分钟为第一步，进行 1 个循环；94℃ 30 秒，55℃ 30 秒，72℃ 45 秒为第二步。进行 25 个循环；72℃ 10 分钟；取出后 4℃ 保存。

将 HSV-1，cDNA 模板变性在 94℃ 5 分钟，然后进行 94 个 20C 的 30 个循环。55℃ 20 秒；72℃ 20 秒；最后在 72℃ 延伸 5 分钟；最后在 4℃ 进行保存。

2.2.5. 序列分析

将要分析的样本序列是 FASTA 格式的。FASTA 格式的序列以单行描述开始，然后是序列数据行。描述行与序列数据的区别在于开头有一个大于(">")的符号。FASTA 是一种基于文本的格式，是表示核苷酸序列的标准。

样品中 DNA 序列为重叠聚合酶和表面基因的约 1000 bp。通过将基因编码为重叠的阅读片段，聚合酶和样本基因都由 *dsDNA* 的同一区域编码。通过对病毒基因组的这一部分进行测序，可以确定基因中与抗病毒抗性相关的突变。此外，对样本基因的分析可以确定导致表面抗原(*sAg*)逃逸突变的潜在因素

3. 结果

3.1. 脑脊液检查结果分析

脑脊液检查结果在表 1 中展示。白细胞计数采用直接计数法。用吸管吸冰醋酸后，全部吹出。只有少量的冰醋酸附着在管壁上。取少量混合脑脊液样品，用同一根吸管吸取，放入计数池，按上述方法计数。患者 1 和患者 2 的白细胞计数和细胞分类均呈明显上升趋势。患者 2 脑脊液中蛋白质含量的增加与脑脊液中氯化物含量相对于血液中氯化物含量的降低有关。细菌性感染的脑脊液中氯化物含量常降低，如化脓性脑膜炎和结核性脑膜炎，必须明显降低。流行性脑炎和急性脊灰白质炎症时，氯化物也可减少或在一定程度上正常；脑脓肿中氯离子含量的增加或减少不确定[2]。

Table 1. CSF findings in patients

表 1. 两例患者脑脊液检查结果

	患者 1		患者 2	
	结果	正常值比较	结果	正常值比较
颅内压	15 cm H ₂ O	Normal	14 cm H ₂ O	Normal
白细胞计数	66/mm ³	↑	72/mm ³	↑
白细胞分类	60%淋巴	↑	85%淋巴	↑
葡萄糖	55 mg/dL	Normal	65 mg/dL	Normal
蛋白质	45 mg/dL	Normal	70 mg/dL	↑

备注：↑表示比正常水平较高。

3.2. PCR 结果分析

患者 1 的 *VP1* 基因在脑脊液和粪便样品中检测到，其中在粪便样品中鉴定出 2 种不同大小的 *VP1* 扩增子；在所有样本中均未检测到 *HSV-1* 基因。

患者 2 在任何样品中均未检测到 *VP1* 基因；在 CSF 中可检查出 *HSV-1* 基因(图 1)。

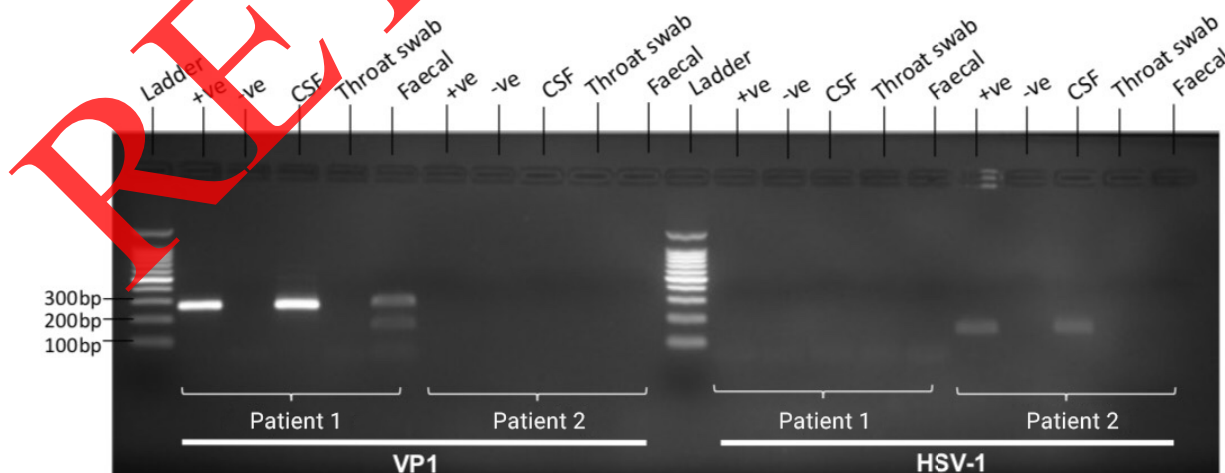


Figure 1. *VP1* and *HSV-1* RT-PCR analysis of CSF, throat swab and faecal samples from patient 1 and patient 2

图 1. 患者 1 和患者 2 脑脊液、咽拭子、粪便样品的 *VP1* 和 *HSV-1* RT-PCR 分析

3.3. 序列分析

两条 VP1 序列被鉴定为柯萨奇 B5 病毒和脊髓灰质炎病毒；进一步的 PCR 分析确定患有的脊髓灰质炎病毒是脊髓灰质炎病毒 3 型。

脑脊液中淋巴细胞数量的增加(表 1)表明患者 1 和患者 2 已被病毒感染。肠道病毒病毒结构基因 VP1 的两个扩增子大小表明患者 1 感染了 2 种不同的肠道病毒。序列分析证实患者 1 感染了柯萨奇病毒 B5 和脊髓灰质炎病毒 3 型。患者 2 感染 HSV-1 病毒。

4. 讨论

脑炎的病因包括病毒感染和自身免疫性疾病，前者较为常见；细菌或真菌感染引起的脑膜炎和脑脓肿一般不包括在脑炎的定义中[3]。据世界卫生组织统计，全球病毒性脑炎发病率为(3.5~7.4)/10 万，中国地方流行病学研究表明，中国的脑炎发病率也在这一范围内。目前，能引起脑炎的病毒有 120 多种，包括人肠道病毒、1 型和 2 型单纯疱疹病毒、水痘病毒等[6]。带状疱疹病毒、流行性乙型脑炎病毒、巨细胞病毒、腮腺炎病毒和风疹病毒较为常见[7]。病毒性脑炎的致病谱系常常因地制宜，时不时，尤其是在中国的温带、亚热带和热带地区。脑炎是脑实质炎症性疾病的总称[8]。临床主要表现为发热、意识障碍、癫痫发作和弥漫性脑功能损害。脑炎是医生经常面临的急重症之一[9]。及时正确的诊断是有效治疗的前提。然而，目前脑炎的病因诊断面临诸多困难。急性脑炎患者的常规病毒学检查包括 PCR 和 RT-PCR，分别用于检测病毒 DNA 和 RNA [10]。可检测的病毒包括 HSV-1, HSV-2, VZV, 肠道病毒；在小于 3 岁的儿童患者中，还可检测人类细小病毒。如果这些检测未能明确病因，可进行第二步及第三步检测[11] [12]。

PCR 检测 HSV 脑炎早期脑脊液的敏感性和特异性都很高，但在临床实践中，阳性率往往受到标本质量、阿昔洛韦应用等因素的影响[9]。目前，疱疹病毒和肠道病毒的病毒核酸检测条件比较成熟，比较容易获得。利用液体芯片技术检测多种病毒有助于提高病毒性脑炎的诊断效率。对于其他相对罕见的病毒种类，仍然缺乏开放的病毒核酸检测实验室或商业诊断包。如有需要，可向有关的传染病管制及监察机构寻求协助。目前医疗 PCR 快速检测诊断项目在不同病原体例如细菌和病毒中的技术已经较为普遍运用。在病原体检测核定中 PCR 检测靶向为核酸 DNA/RNA，灵敏度高、特异性强等特性都是其相较其他检测方法的优势所在。目前已开发出基于不同引物的 PCR，如 *ctrA*, *porA*, *argA*, 16S rRNA, *siaD* 和 *NspA* 以及基于 *ctrA* 的实时 PCR (Real Time-PCR)。对脑膜炎球菌的诊断是非常快速和有用；限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)、rRNA 探针技术(ri-bototyping)、PCR 分析染色体二氢叶酸合成酶，基于 PCR 的 *pilA*, *pilB* 和 *porA* 基因重复序列可以检测不同的血清型和血清型脑膜炎球菌[13] [14] [15] [16]。

参考文献

- [1] 赵小冬. 济南市急性脑炎/脑膜炎症候群监测病例流行特征与病原谱分析[D]: [硕士学位论文]. 济南: 山东大学, 2012.
- [2] 黄辉, 郑峻松, 蒋丽莉, 等. 病例导入式自主设计性实验在临床基础检验学课程教学中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2015(7): 1004-1005.
- [3] Gnann, J.W. (2012) Varicella-Zoster Virus: Atypical Presentations and Unusual Complications. *The Journal of Infectious Diseases*, **186**, S91-S98.
- [4] Gnann, J.W. and Whitley, R.J. (2012) Clinical Practice. Herpes Zoster. *New England Journal of Medicine*, **347**, 340-346. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp013211>
- [5] 崔丽英, 关鸿志. 重视脑炎的病因诊断[J]. 中华神经科杂志, 2014, 47(7): 446-448.
- [6] 刘春艳, 申昆玲, 梁国栋. 2002-2005 年北京儿童医院住院患儿病毒性脑炎流行病学分析[J]. 中国实用儿科杂志, 2007, 22(7): 498-501.
- [7] 姜大景, 汪华, 向明清, 等. 病毒性脑炎患者恢复期继发癫痫的相关因素分析[J]. 神经损伤与功能重建, 2015(5):

406-408.

- [8] Xiang, Q.Y., Zhu, L., Zheng, K., *et al.* (2020) Association of Toll-Like Receptor 10 Polymorphisms with Pediatric Pneumococcal Meningitis. *APMIS*. <https://doi.org/10.1111/apm.13028>
- [9] Tutuarima, J.A., Hische, E.A., van Trotsenburg, L., *et al.* (2020) Thromboplastic Activity of Cerebrospinal Fluid in Neurological Disease. *Clinical Chemistry*, **1**, 99-100.
- [10] 张传博, 苏晓庆. 几种基于基因组 DNA 的真菌分类技术研究进展[J]. 贵州师范大学学报(自然科学版), 2006(1): 117-122.
- [11] Robinson, C.P. and Busl, K.M. (2019) Meningitis and Encephalitis Management in the ICU. *Current Opinion in Critical Care*, **25**, 1. <https://doi.org/10.1097/MCC.0000000000000640>
- [12] 周亮, 陆兵勋. 早期侧脑室穿刺引流治疗伴有恶性颅高压的新型隐球菌脑膜炎[J]. 临床神经病学杂志, 2011, 14(1): 46-47.
- [13] 吴丹, 李艺星, 邵祝军, 等. 2006-2013 年中国 4 个城市急性脑膜炎脑炎流行病学疾病负担研究[J]. 中华预防医学杂志, 2019, 53(2): 164-168.
- [14] 黄茜, 刘磊, 铁婷婷. 2013-2017 年西宁地区肺炎链球菌脑膜炎检出情况及相关流行病学分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2019(3): 342-344.
- [15] 王旭, 田玉玲, 姜洪波, 等. 脑炎/脑膜炎症候群患儿病原与临床分析[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2019, 34(12): 926-929.
- [16] 赵静, 张元杏, 刘慧勤, 等. 抗接触蛋白相关蛋白-2 抗体相关脑炎 11 例临床分析[J]. 中华神经科杂志, 2019, 52(7): 549-554.

RETRACTED