

改良脑脊液标本镜检处理程序临床应用

张岳峰 王华成

【摘要】 研究背景 脑炎的明确诊断有赖于在脑实质或脑脊液中发现病原体,但脑脊液标本制备过程中所经历的离心、洗涤等步骤均可导致病原体结构破坏、丢失,直接影响诊断效率。为了提高阳性检出率,有必要对传统脑脊液标本镜检处理程序中可能导致病原体减少的步骤进行改良。方法 采集 23 例疑似病毒性脑炎患者和 10 例对照者的脑脊液标本,分别采用加入戊二醛溶液使之终浓度达 2.5%,混匀、静置 4 h 后肉眼观察沉淀物形成再离心收集病原体方法;或不经戊二醛溶液处理即离心收集病原体方法。Gimenze 染色检测脑脊液病原体。结果 对照组患者两种脑脊液处理方法,差异无统计学意义($P = 1.000$)。疑似病毒性脑炎组经传统脑脊液标本镜检 10 例 Pandy 球蛋白定性试验阳性,经改良脑脊液标本镜检 23 例均可见沉淀物形成,差异具有统计学意义($P = 0.000$);其中 7 例患者脑脊液培养可见病原体生长,经 Gimenze 染色、免疫荧光染色和聚合酶链反应明确诊断为立克次体感染。结论 改良脑脊液标本镜检处理方法可有效分离细胞、病原体和蛋白质。

【关键词】 脑炎,病毒性; 戊二醛; 离心法; 沉淀; 脑脊髓液; 细胞学技术

An improved specimens handling procedure for pathogen detection of the cerebrospinal fluid by microscope

ZHANG Yue-feng¹, WANG Hua-cheng²

¹Department of Neurology, ²Department of Laboratory, Guangzhou Brain Hospital, Guangzhou 510370, Guangdong, China

Corresponding author: ZHANG Yue-feng (Email: yf-zhang@qq.com)

【Abstract】 **Background** The diagnosis of encephalitis depends on the finding of pathogens in the brain parenchyma or cerebrospinal fluid (CSF). But the success rates of finding pathogens by microscope are low by the traditional specimens handling procedure in which pathogens are detected by direct centrifugation of CSF getting from lumbar puncture. The process of pathogen collection from the CSF such as centrifugation and washing would cause the destruction and loss of pathogens, resulting in a lower rate of pathogen discovery. Therefore, in order to increase the detection rate of pathogenic microorganisms in CSF, these traditional steps need to be improved. **Methods** CSF samples of 23 patients with suspected viral encephalitis and 10 control patients with fracture were prepared by two methods: traditional specimens handling procedure (TSHP) and improved specimens handling procedure (ISHP). In the ISHP, a final concentration of 2.5% glutaraldehyde was added to CSF in a glass tube, mixed and kept not moving in 4 °C for 2 to 4 h or in 37 °C for 1 h. Then a smear was made from the sediment formed in the tube to check pathogens by microscope. As for the TSHP, pathogens were collected by direct centrifugation of CSF which had not been treated after lumbar puncture, and checked through Gimenze staining. **Results** There was no statistically significant difference between the two dealing procedures in the control group ($P = 1.000$). As for the case group, there were 10 cases showing positive in Pandy test after TSHP, and visible sediments were seen in all the 23 cases after ISHP. There was statistically significant difference between two kinds of CSF treatment for the finding of pathogens ($P = 0.000$). Seven cases presented pathogen growth in CSF and were diagnosed as rickettsial infections by Gimenze staining, immunofluorescence assay (IFA) and polymerase chain reaction (PCR). **Conclusion** Improved specimens handling procedures of CSF contribute to the separation of cells, pathogens and proteins.

【Key words】 Encephalitis, viral; Glutaral; Centrifugation; Precipitation; Cerebrospinal fluid;

doi:10.3969/j.issn.1672-6731.2013.02.006

基金项目:中国博士后基金资助项目(项目编号:20060390759);广州市脑科医院博士启动基金资助项目(项目编号:20081013)

作者单位:510370 广州市脑科医院神经内科(张岳峰),检验科(王华成)

通讯作者:张岳峰(Email:yf-zhang@qq.com)

Cytological techniques

This study was supported by China Postdoctoral Science Foundation (No. 20060390759) and Guangzhou Brain Hospital Doctoral Starting Foundation (No. 20081013).

脑实质发现病原体为诊断脑炎的金标准。然而,由于脑组织活检获得标本的有创性不易被患者及其家属接受,至今尚不能成为诊断脑炎的主要实验室检查方法。脑脊液病原微生物检查是替代脑组织活检而明确诊断脑炎最可靠的方法。虽然相比脑组织活检,腰椎穿刺脑脊液检查更易被患者及其家属接受,但相对血液标本,腰椎穿刺获得的脑脊液标本量较少,且其中微生物、细胞、蛋白质、脂质、非蛋白氮(NPN)等生物成分含量较低,若直接镜检则必须采用高速离心法以提高标本中生物成分含量的浓度。根据 Schwarz^[1]的研究,传统脑脊液检测技术及其各种改进方法均会导致大量细胞丢失。即使是 Schwarz 发明的目前广泛应用于临床的两步法离心收集技术亦会导致至少 10% 的细胞丢失^[1-2];而相对分子量更小的病原微生物、蛋白质成分则更易在离心过程中损失,导致脑脊液病原微生物的阳性检出率较低。另外,传统未经处理的离体脑脊液标本中的二氧化碳极易释放进入空气,标本搁置时间较长会因缺乏缓冲盐等原因而致 pH 值发生改变(数秒内脑脊液 pH 值可由 7.32~7.36 升至 7.80 以上),细胞和病原微生物存在时间极短^[3]。这也是导致脑脊液病原微生物阳性检出率偏低和较长时间保存的标本无法用于检测的重要原因之一。在少量脑脊液标本中直接发现病原体或脑炎标志物,须尽量减少其在脑脊液处理过程中的损失,以及在离心浓缩过程中脑脊液成分的丢失。最大限度保持病原微生物、细胞和蛋白质等待测物质性状,对提高脑脊液病原体和脑炎标志物阳性检出率至关重要^[3-4]。鉴于此,须固定脑脊液中生物活性成分,减少自然破坏;并尽可能使相对分子量较小的物质相结合,以减少离心过程中生物成分的丢失与破坏。我们通过戊二醛预先固定脑脊液,然后进行脑脊液标本镜检处理,对提高病原微生物阳性检出率效果良好,结果报告如下。

资料与方法

一、一般资料

1. 纳入与排除标准 (1)病毒性脑炎诊断标准:

参照赵钢^[5]和 Steiner 等^[6]提出的病毒性脑炎诊断标准,符合其中②~⑤项标准,伴或不伴①项表现者即可明确诊断。①发病前 5~15 天表现有发热等感冒样前驱病史。②有精神障碍、智力障碍等高级皮质功能改变或局灶性神经功能障碍表现。③脑脊液有或无炎症性改变,但常规检查方法未发现细菌(包括结核分枝杆菌)、真菌等感染的证据。④脑电图主要呈现弥漫性异常,亦可见局灶性改变;头部核素扫描、CT 和 MRI 检查无占位性病变征象[除外单纯疱疹病毒性脑炎(HSE)和某些局灶性脑炎]。⑤脑脊液未检出病毒性抗原或特异性抗体。(2)其他纳入标准:由于部分入组患者进入疾病恢复期后拒绝再次行腰椎穿刺,故本研究仅纳入急性期患者。(3)排除性传播疾病(STD)引起的脑炎(病)、肿瘤、急性播散性脑脊髓炎(ADEM)、多发性硬化(MS)等中枢神经系统疾病。(4)本研究获得广州市脑科医院伦理委员会批准(批准号:20120312),患者或其家属签署知情同意书。

2. 标本来源 (1)不明原因脑炎疑似病毒性脑炎组(脑炎组):根据上述纳入与排除标准,共选择 2010 年 5 月-2012 年 10 月在广州市脑科医院神经内科住院治疗的不明原因脑炎疑似病毒性脑炎患者 23 例,男性 15 例,女性 8 例;年龄 7~55 岁,平均为 29 岁。(2)对照组:共选择无全身性或系统性疾病,并同期在外院骨科住院治疗的骨折患者 10 例,男性 7 例,女性 3 例;年龄 24~40 岁,平均 29 岁。入组前 15 天表现有发热、头痛、失眠、精神异常等临床症状且头部影像学检查明显异常者均不纳入本研究。

二、实验方法

1. 主要实验试剂与仪器 孔雀绿染液(规格:10 g/L)和戊二醛溶液(规格:250 g/L)均由西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司提供。石碳酸品红染液为中国台湾贝索(BASO)公司产品。SCR-300 型和 ABS-040 型立克次体免疫荧光抗体检测玻片均由澳大利亚 Rickettsial Reference Laboratory Barwon Health 提供。

2. 标本制备与检查方法 对照组患者于蛛网膜下隙阻滞麻醉联合硬膜外麻醉下行腰椎穿刺术获

得脑脊液 1000 μl , 脑炎组患者则于入院当日或次日同法采集等量脑脊液标本, 于生物安全柜中严格按照无菌操作原则进行检测, 防止污染。(1) 传统脑脊液标本镜检处理 (TSHP) [3-4, 7]: 以聚丙烯试管采集 1000 μl 脑脊液, 2000 $\times g$ 离心 10 min, 弃上清液后滴加 20 μl 生理盐水稀释沉淀, 取 10 μl 进行涂片; 待玻片干燥, 过火固定。(2) 改良脑脊液标本镜检处理 (ISHP): 1000 μl 脑脊液加入 100 μl 含质量分数为 25% 戊二醛的玻璃试管中, 混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 2~4 h 或 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置 1 h 可见沉淀物生成; 经预先固定的脑脊液加入 3 ml 蒸馏水, 稀释、混匀, 400 $\times g$ 离心 10 min, 弃上清后于沉淀物中加入 2 ml 蒸馏水混匀。重复操作上述程序 2 次, 去除戊二醛; 加入 20 μl 蒸馏水稀释、混匀, 取 10 μl 进行涂片。(3) Gimenez 染色 [8]: 石碳酸品红工作溶液染色 1 min, 蒸馏水洗涤 10 s, 质量分数为 0.8% 孔雀绿染液染色 45 s, 蒸馏水洗涤 10 s, 重复上述步骤直至出现蓝色或绿色, 洗净、吸干, 并于空气中干燥。

3. 观察项目 (1) 对两组患者的脑脊液化合物 [包括蛋白定量、葡萄糖、氯化物、腺苷脱氨酶 (ADA)、乳酸脱氢酶 (LDH)]、沉淀物、细胞学和病原体进行检测。(2) 传统脑脊液标本镜检处理方法采用潘氏 (Pandy) 球蛋白定性试验检测脑脊液蛋白质。改良脑脊液标本镜检处理方法可肉眼观察离心前产生的沉淀; 参照肥达反应方法予以倍比稀释, 根据最高稀释倍数所见沉淀的浓度即可粗略估计脑脊液细胞与蛋白质总量。(3) 采用 Gimenez 染色检测脑脊液病原体。

三、统计分析方法

所有数据均采用 SPSS 19.0 统计软件进行计算与分析。计数资料以率 (%) 或相对数构成比 (%) 表示, 采用 Fisher 确切概率法。以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、脑脊液沉淀物检测

10 例对照组患者经传统脑脊液标本镜检处理后, 1 例 Pandy 球蛋白定性试验呈阳性反应; 经戊二醛固定的改良脑脊液标本镜检处理后, 2 例肉眼可见沉淀物形成, 其中 1 例为 Pandy 球蛋白定性试验阳性患者。上述两种处理方法比较, 差异无统计学意义 (Fisher 确切概率法: $P = 1.000$; 表 1)。23 例疑似病毒性脑炎患者, 经传统脑脊液标本镜检处理后,

10 例 Pandy 球蛋白定性试验呈阳性反应; 经改良脑脊液标本镜检处理后, 23 例脑脊液标本均可见沉淀物形成 (图 1)。两种处理方法比较, 差异具有统计学意义 (Fisher 确切概率法: $P = 0.000$; 表 1)。

二、脑脊液病原体检测

对照组患者经传统和改良脑脊液标本镜检处理后, 无一例发现病原体; 脑炎组患者经传统脑脊液标本镜检处理后亦未发现病原体, 而经改良脑脊液标本镜检处理后 7 例可见病原体生长; 两种处理方法比较, 差异具有统计学意义 (Fisher 确切概率法: $P = 0.009$; 表 1)。脑炎组 7 例患者脑脊液标本均经 Gimenez 染色初步判定为立克次体感染 (图 1b), 并经进一步免疫荧光染色 (IFA) 和聚合酶链反应 (PCR) 得以明确诊断 (图 2), 7 例阳性脑脊液标本接种于豚鼠后均发生立克次体脑炎。

讨 论

脑脊液标本镜检前加入戊二醛溶液并使其终浓度达到 2.5% 的目的是: 戊二醛的两个醛基可分别与细胞、病原体和抗体蛋白质氨基形成 Schiff 碱 ($-\text{N} = \text{C}-$), 将它们以五碳桥相连接 [9]。经此方法处理后, 本组 23 例疑似病毒性脑炎患者的脑脊液标本静置 2 h 后均形成肉眼可见沉淀物, 而对照组脑脊液标本仅 2 例出现沉淀。检测结果提示, 疑似病毒性脑炎患者脑脊液中的蛋白定量和细胞总数发生改变。尽管脑炎组患者蛋白定量和细胞总数可以无改变, 如本研究脑炎组仅 5 例脑脊液标本蛋白定量检测异常, 但 Pandy 球蛋白定性试验阳性者 10 例, 表明脑炎组患者脑脊液球蛋白定量升高, 与总蛋白定量升高并不一定成比例 [10]。球蛋白定量升高 [如 IgG 的 GD1a (500)、GD1b (500)、GT1b (2000)、GQ1b (64 000) 等成分], 提示免疫应答反应参与脑炎病理生理学过程 [10-11]。球蛋白为小分子蛋白质, 该蛋白的增加并不一定必然增加脑脊液蛋白总量 [10], 但增加的蛋白质分子提供了更多的氨基形成五碳桥的 Schiff 碱 ($-\text{N} = \text{C}-$)。戊二醛缩合体使被结合的蛋白质分子与分子之间的间隔延长, 可免于蛋白质三级结构发生改变 [9]。因此, 戊二醛可将分散的蛋白质、细胞连接在一起形成肉眼可见的沉淀; 而未加戊二醛的脑脊液标本中的细胞、蛋白质不能形成彼此连接的化学键, 故不产生沉淀, 而加入石碳酸的脑脊液标本则仅沉淀球蛋白。

另外, 戊二醛还具有固定细胞、病原微生物及

表 1 传统与改良脑脊液标本镜检处理方法各项指标阳性检出比例的比较(例)*

Table 1. Comparison of CSF indicators treated by ISHP and TSHP*

Group	N	Abnormality of compound detection					Sediment			Abnormality of cell detection			Positive of pathogen detection		
		Protein	Glucose	Chloride	ADA	LDH	TSHP	ISHP	P value	TSHP	ISHP	P value	TSHP	ISHP	P value
Control	10	0	0	0	0	0	1	2	1.000	0	0	1.000	0	0	1.000
Case	23	5	0	14	5	7	10	23	0.000	15	15	1.000	0	7	0.009
P value		0.291	1.000	0.001	0.291	0.073	0.109	0.000		1.000	1.000		1.000	0.073	

*Fisher exact probability test. The check method of sediments of CSF by TSHP was Pandy test. As for ISHP, through the adding of a final concentration of 2.5% glutaraldehyde in the tube, a smear was made from the formed sediment to check pathogens by microscope

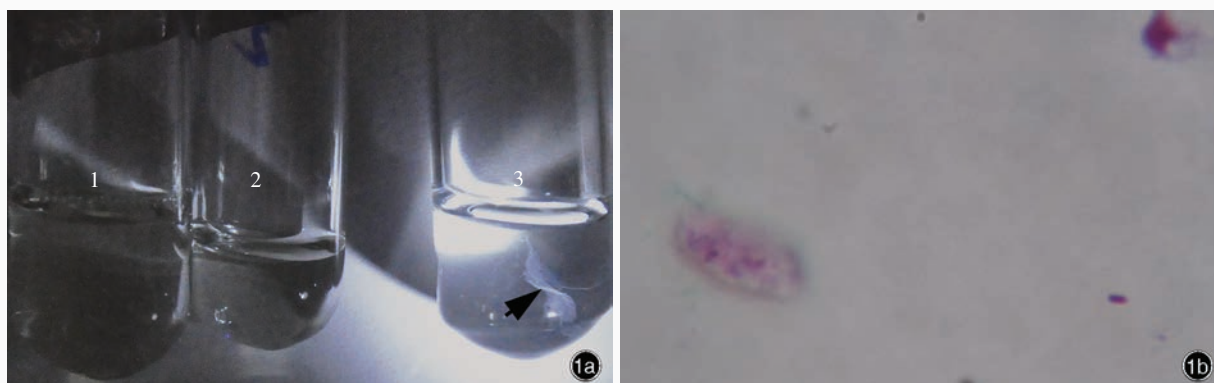


图 1 脑脊液沉淀物检测 1a 第 1 和第 2 号试管中分别为对照组和脑炎组患者脑脊液标本,经传统的 Pandy 球蛋白定性试验处理后未见沉淀生成;第 2 和 3 号试管中为同一例脑炎患者脑脊液标本,蛋白定量及白细胞计数于正常值范围,但第 3 号试管中加入终浓度为 2.5% 的戊二醛溶液后,可见沉淀物形成(箭头所示) 1b 同一例脑炎患者经传统检测方法未获得病原体而被诊断为疑似病毒性脑炎的不明原因脑炎,经改良脑脊液标本镜检处理后可见病原体生长,初步诊断为立克次体脑炎 Gimenze 染色 × 100

Figure 1 CSF sediment test. The specimens in tube 1 and tube 2 were CSF respectively taken from control group and case group, and no sediments could be seen in tubes after treated by Pandy test (TSHP). The specimens in tube 2 and tube 3 were CSF of the same patient in case group, and the results of protein assay and numeration of leukocyte were normal. Sediments formed in tube 3 after 2.5% glutaral was added (arrow indicates, Panel 1a). The patient was firstly suspected as viral encephalitis because his characters were similar with viral encephalitis and no pathogens were found in CSF by TSHP. However, after treated by ISHP, pathogens were found in a CSF smear, so the patient was diagnosed as rickettsial encephalitis Gimenze staining × 100 (Panel 1b)

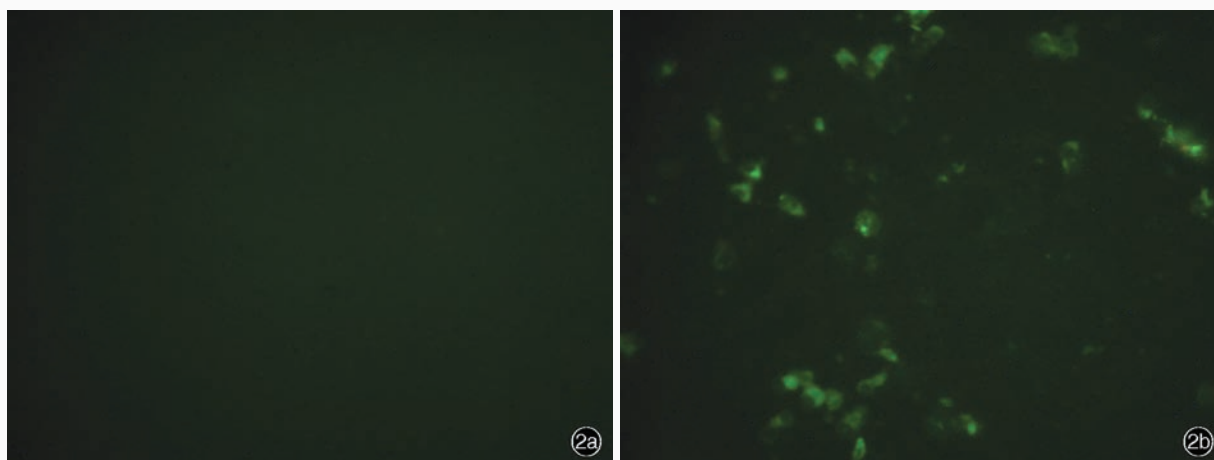


图 2 疑似病毒性脑炎的不明原因脑炎患者,经免疫荧光染色明确诊断为立克次体脑炎 × 400 2a 对照组 2b 脑炎组

Figure 2 The patient with suspected viral encephalitis were confirmed as rickettsial encephalitis by IFA × 400 Control group (Panel 2a). Case group (Panel 2b)

维持蛋白质三级结构的作用^[9],与传统未经固定即离心收集细胞与病原微生物的方法相比,改良法减少了这些物质自然或在离心过程中破坏的数量。

据 Kleine 等^[2]描述,脑脊液离心分离细胞洗涤时可导致细胞丢失,而免疫荧光染色因为标本预先经戊二醛溶液处理,可使细胞、病原体和蛋白质发生交

联作用,从而减少了病原体、细胞和蛋白质在离心作用下的破坏数量,以及洗涤减少的数量,这也是在不明原因脑炎脑脊液标本中病原体阳性检出率提高的原因。在制备脑脊液标本过程中对试管的选择也有一定要求,聚丙烯试管可与戊二醛发生交联作用,选择玻璃试管可以相对减少不必要的病原体、细胞、蛋白质黏附在试管壁上。

综上所述,采用改良脑脊液标本镜检处理方法先将细胞、病原体、蛋白质固定并凝聚后再离心沉淀,可降低离心速度,减少细胞破坏,保持细胞、病原体和蛋白质形态,可有效分离细胞、病原体和蛋白质,极大地提高病原体、细胞和蛋白质阳性检出率。由于收集脑脊液标本困难,使得本研究所纳入的总体样本较小,对试验结果有一定影响,因此尚待增加临床观察病例数以进行进一步临床研究。

参 考 文 献

[1] Schwarz G. Cytomorphology and cell yield in a new cytocentrifugal technique allowing the collection of the cell-free supernatant. *Lab Med*, 1991, 15:45-50.
 [2] Kleine TO, Hackler R, Meyer - Rienecker H. Classical and modern methods of cerebrospinal fluid analysis: report on the First All - German Symposium of the Society for Laboratory Medicine (FRG) and the Study Group for CSF Analysis and Clinical Neurochemistry of the Society for Psychiatry and Neurology (formerly GDR) in Marburg a. d. Lahn, October 5-6,

1990. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 1991, 29:705-714.
 [3] Kluge H, Wiczorek V, Linke E, Zimmermann K, Isenmann S, Witte OW. *Atlas of CSF cytology*. New York: Thieme, 2007: 7-8.
 [4] Wildemann B, Oschmann P, Reiber H. *Laboratory diagnosis in neurology*. New York: Thieme, 2010: 127-128.
 [5] Zhao G. *Central nervous system diseases*//Huang RX. *Neurology*. Beijing: Higher Education Press, 2010: 375-376.[赵钢. 中枢神经系统疾病//黄如训. 神经病学. 北京: 高等教育出版社, 2010: 375-376.]
 [6] Steiner I, Budka H, Chaudhuri A, Koskiniemi M, Sainio K, Salonen O, Kennedy PG. *Viral encephalitis: a review of diagnostic methods and guidelines for management*. *Eur J Neurol*, 2005, 12:331-343.
 [7] Teunissen CE, Petzold A, Bennett JL, Berven FS, Brundin L, Comabella M, Franciotta D, Frederiksen JL, Fleming JO, Furlan R, Hintzen RQ, Hughes SG, Johnson MH, Krasulova E, Kuhle J, Magnone MC, Rajda C, Rejdak K, Schmidt HK, van Pesch V, Waubant E, Wolf C, Giovannoni G, Hemmer B, Tumani H, Deisenhammer F. *A consensus protocol for the standardization of cerebrospinal fluid collection and biobanking*. *Neurology*, 2009, 73:1914-1922.
 [8] Parola P, Paddock CD, Raoult D. *Tick - borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts*. *Clin Microbiol Rev*, 2005, 18:719-756.
 [9] Doughty MJ. *Surface features and morphology of bulbar conjunctival cells of bovine eyes obtained from a slaughterhouse: a scanning electron microscope and impression cytology study*. *Curr Eye Res*, 2002, 24:341-353.
 [10] Odaka M, Yuki N, Yamada M, Koga M, Takemi T, Hirata K, Kuwabara S. *Bickerstaff's brainstem encephalitis: clinical features of 62 cases and a subgroup associated with Guillain-Barré syndrome*. *Brain*, 2003, 126:2279-2290.
 [11] Bullock FN, Fleischhacker HH. *Interpretation of the Pandy test*. *Acta Psychiatr Neurol Scand*, 1951, 26:149-153.

(收稿日期:2012-12-04)

· 小 词 典 ·

中英文对照名词词汇(四)

耐利奈唑胺金黄色葡萄球菌
 linezolid-resistant staphylococcus aureus(LRSA)
 耐青霉素肺炎链球菌
 penicillin-resistant streptococcus pneumoniae(PRSP)
 耐万古霉素肠球菌 vancomycin-resistant enterococci(VRE)
 耐万古霉素金黄色葡萄球菌
 vancomycin-resistant staphylococcus aureus(VRSA)
 脑源性神经营养因子
 brain-derived neurotrophic factor(BDNF)
 内-中膜厚度 intima-media thickness(IMT)
 鸟氨酸氨基甲酰转移酶
 ornithine carbamyl transferase(OCT)
 帕金森病 Parkinson's disease(PD)
 培养分泌蛋白-10 culture filtrate protein-10(CFP-10)
 平滑肌肌动蛋白 smooth muscle actin(SMA)

6-羟基多巴胺 6-hydroxydopamine(6-OHDA)
 8-羟基脱氧鸟苷 8-hydroxydeoxyguanosine(8-OHdG)
 轻度认知损害 mild cognitive impairment(MCI)
 人类白细胞抗原 human leukocyte antigen(HLA)
 人类免疫缺陷病毒 human immunodeficiency virus(HIV)
 人类疱疹病毒 human herpes virus(HHV)
 人绒毛膜促性腺激素 human chorionic gonadotropin(hCG)
 人胎盘催乳素 human placental lactogen(hPL)
 肉毒碱棕榈酰基转移酶 carnitine palmityl transferase(CPT)
 肉毒碱棕榈酰基转移酶 II 缺乏症
 carnitine palmityl transferase deficiency(CPTD)
 朊蛋白 prion protein(PrP)
 上皮膜抗原 epithelial membrane antigen(EMA)
 神经精神狼疮
 neuropsychiatric systemic lupus erythematosus(NP-SLE)