

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2023.14.014

CpG-ODN DSP30 联合 IL-2 刺激在慢性 B 淋巴细胞增殖性疾病 细胞遗传学检测中的临床价值

贾晓冬¹, 李建伟¹, 毛 翠^{2△}

1. 天津金域医学检验实验室有限公司细胞遗传室, 天津 300392; 2. 广州金域医学检验集团
股份有限公司实验室管理中心, 广东广州 510005

摘 要:目的 探讨未甲基化胞嘧啶鸟嘌呤二核苷酸寡脱氧核苷酸(CpG-ODN)DSP30 联合白细胞介素-2 (IL-2)刺激在慢性 B 淋巴细胞增殖性疾病(B-CLPD)细胞遗传学检测中的应用价值。方法 选取 2020 年 1 月至 2021 年 6 月天津金域医学检验实验室的 491 例 B-CLPD 患者骨髓标本作为研究对象, 将其中 240 例慢性淋巴细胞白血病(CLL)患者作为 CLL 组, 251 例非 CLL 的其他 B-CLPD 患者作为 non-CLL 组。将每例骨髓标本分为 2 份, 一份为实验组, 一份为对照组, 同步进行培养。实验组采用 CpG-ODN DSP30 联合 IL-2 刺激细胞并培养 72 h, 对照组采用常规培养细胞 48 h, 培养完成后收集细胞并制备染色体, 应用 G 显带技术进行核型分析, 比较实验组和对照组染色体核型培养成功率和染色体核型异常检出率的差异, 并比较 CLL 组与 non-CLL 组的染色体核型异常情况。结果 实验组染色体核型培养成功率和异常检出率均明显高于对照组, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。与 CLL 组比较, non-CLL 组高水平复杂核型及复杂核型占比更高, 更易出现 14q32(IGH)重排、6q-、7q-、+3 及 +18。结论 采用 CpG-ODN DSP30 联合 IL-2 刺激能明显提高 B-CLPD 的细胞遗传学异常检出率, 并且在非 CLL 的 B-CLPD 中同样具有重要价值。

关键词:慢性淋巴细胞白血病; 慢性 B 淋巴细胞增殖性疾病; 细胞遗传学; 未甲基化胞嘧啶鸟嘌呤二核苷酸寡脱氧核苷酸; 白细胞介素-2

中图分类号: R446.11

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2023)14-2048-05

Clinical value of CpG-ODN DSP30 combined with IL-2 immune stimulation in cytogenetic detection of B-cell chronic lymphoproliferative disorders

JIA Xiaodong¹, LI Jianwei¹, MAO Cui^{2△}

1. Department of Cytogenetics, Tianjin Kingmed Medical Laboratory Co., Ltd., Tianjin 300392,
China; 2. Laboratory Management Center, Guangzhou Kingmed Medical Laboratory Group
Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong 510005, China

Abstract: **Objective** To investigate the application value of unmethylated cytosine guanine dinucleotide oligodeoxynucleotide (CpG-ODN) DSP30 combined with interleukin-2 (IL-2) immune stimulation in cytogenetic detection of B-cell chronic lymphoproliferative disorders (B-CLPD). **Methods** A total of 491 B-CLPD bone marrow samples were collected from January 2020 to June 2021 in Tianjin Golden Med Laboratory. Among them, 240 patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) were selected as CLL group, and 251 patients with other B-CLPD without CLL were selected as non-CLL group. Each bone marrow specimen was divided into two parts, one as the experimental group and the other as the control group. The experimental group was stimulated with CpG-ODN DSP30 combined with IL-2 and cultured for 72 hours, and the control group was cultured for 48 hours. After the culture, the cells were collected and chromosome was prepared, and the karyotype was analyzed by G-banding technology. The success rate of chromosome karyotype culture and the detection rate of abnormal chromosome karyotype were compared between the experimental group and the control group, and the abnormal chromosome karyotype was compared between CLL group and non-CLL group. **Results** The success rate and abnormal detection rate of chromosome karyotype culture in the experimental group were significantly higher than those in the control group, and the differences were statistically significant ($P<0.05$). Compared with CLL patients, non-CLL patients had a higher proportion of high-level complex karyotypes and complex karyotypes, and were more likely to have 14q32 (IGH) rearrangement, +3, 6q-, 7q- and +18. **Conclusion** CpG-ODN DSP30 combined with IL-2 stimulation can significantly improve the detection rate of cytogenetic abnormalities in B-CLPD, and it is also important in non-CLL B-CLPD.

Key words: chronic lymphocytic leukemia; B-cell chronic lymphoproliferative disorders; cytogenetics; unmethylated cytosine guanine dinucleotide oligodeoxynucleotide; interleukin-2

慢性 B 淋巴细胞增殖性疾病(B-CLPD)是一组可累及骨髓和外周血的成熟 B 淋巴细胞克隆增殖性疾病,其中慢性淋巴细胞白血病(CLL)是临床最为常见的一类 B-CLPD。细胞遗传学分析对 B-CLPD 的诊断、危险分层、预后判断及诊疗方案选择均具有重要意义,但由于常规细胞遗传学(CC)获取的成熟 B 淋巴细胞有丝分裂指数低,进而导致疾病检出率低,且荧光原位杂交(FISH)只能检测特异位点的异常,不能全面分析染色体异常,因此,B-CLPD 的诊断与鉴别诊断一直是国内临床工作的难点^[1-2]。有研究发现,未甲基化胞嘧啶鸟嘌呤二核苷酸寡脱氧核苷酸(CpG-ODN)刺激 CLL 细胞增殖,可明显提高染色体核型培养成功率和染色体核型异常检出率^[2-5],但未对非 CLL 的其他 B-CLPD 进行相关研究。因此,为提高 CLL 及其他 B-CLPD 患者的疾病检出率,本研究进一步探讨了 CpG-ODN DSP30 联合 IL-2 作为刺激剂对 CLL 和非 CLL 的其他 B-CLPD 的染色体核型培养成功率和染色体核型异常检出率的影响,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2020 年 1 月至 2021 年 6 月天津金域医学检验实验室初诊的 491 例 B-CLPD 患者作为研究对象,将 240 例 CLL 患者作为 CLL 组,男 168 例,女 72 例;中位年龄 67 岁。将 251 例非 CLL 的其他 B-CLPD 患者作为 non-CLL 组,男 149 例,女 102 例;中位年龄 66 岁。CLL 及非 CLL 的其他 B-CLPD 患者诊断符合《血液病诊断及疗效标准(第 4 版)》^[6],患者均通过流式细胞术检测到单克隆成熟 B 淋巴细胞,根据英国马斯登皇家医院免疫标志积分系统^[7]进行分类,CLL 患者积分为 4~5 分,非 CLL 的其他 B-CLPD 患者积分低于 3 分,积分为 3 分时进行 FISH 检测并参考其他相关检测以排除套细胞淋巴瘤(MCL)等。

1.2 仪器与试剂 光学显微镜 BX41 购自奥林巴斯株式会社;二氧化碳培养箱 MCO-18AC 购自日本松下电器产业株式会社;BSL-2 生物安全柜 BSC-1500 II B2-X 购自济南鑫贝西生物技术有限公司;医用离心机 JW-1048 购自安徽嘉文仪器装备有限公司;数显恒温水箱 HH-W21-600 购自常州澳华仪器有限公司;电热鼓风干燥箱 DHG-9140A 购自上海一恒科学仪器有限公司;Metasystem 染色体自动扫描分析系统购自卡尔蔡司光学(中国)有限公司。冰醋酸购自国药集团化学试剂有限公司;Gibco 培养基和胰酶均购自美国赛默飞世尔科技有限公司;CpG-ODN DSP30、IL-2 和秋水仙素均购自上海乐辰生物科技有限公司;DSP30 碱基序列为 TCGTCGCTGTCTCCGCTFCTTCTTGCC;低渗液为 0.075 mmol/L 氯化钾溶液,均购自国药集团化学试剂有限公司;固定液为冰醋酸和甲醇,按照 1:3 进行配制,均购自国药集团化学试剂有限公司;Giem-

sa 染色液购自珠海贝索生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 染色体培养与制备 采用牛鲍氏计数板对骨髓细胞进行细胞计数,将每例患者标本分为 2 份,分别为实验组和对照组,按照 1×10^6 /mL 细胞密度种入含 8 mL Gibco 培养液的培养瓶中,同步进行培养。实验组加入 100 μ L CpG-ODN DSP30 和 IL-2 刺激剂(浓度为 2 μ mol/L),对照组不加刺激剂。实验组和对照组均放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 培养箱,对照组培养 48 h,实验组培养 72 h。完成培养后加入 20 μ g/mL 秋水仙素 0.05 mL 孵育 2 h,收集细胞,进行制片、染色。

1.3.2 染色体核型分析 采用 Metasystem 染色体自动扫描分析系统分析,每份标本分析 20 个以上染色体处于中期分裂相的培养细胞。核型异常根据文献[8]进行详细描述。1 个异常克隆需满足以下条件之一:(1) ≥ 2 个细胞有同样的染色体数目增加或结构重排;(2) ≥ 3 个细胞有同样的染色体数目减少。在 CLL 中,3 个或 4 个不相关的染色体畸变定义为复杂核型(CK),5 个或 5 个以上的异常(+12、+19 和其他与预后良好相关的异常除外)定义为高水平复杂核型(high-CK)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行数据分析处理。计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验,当单组 $n < 5$ 时采用 Fisher 确切概率法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

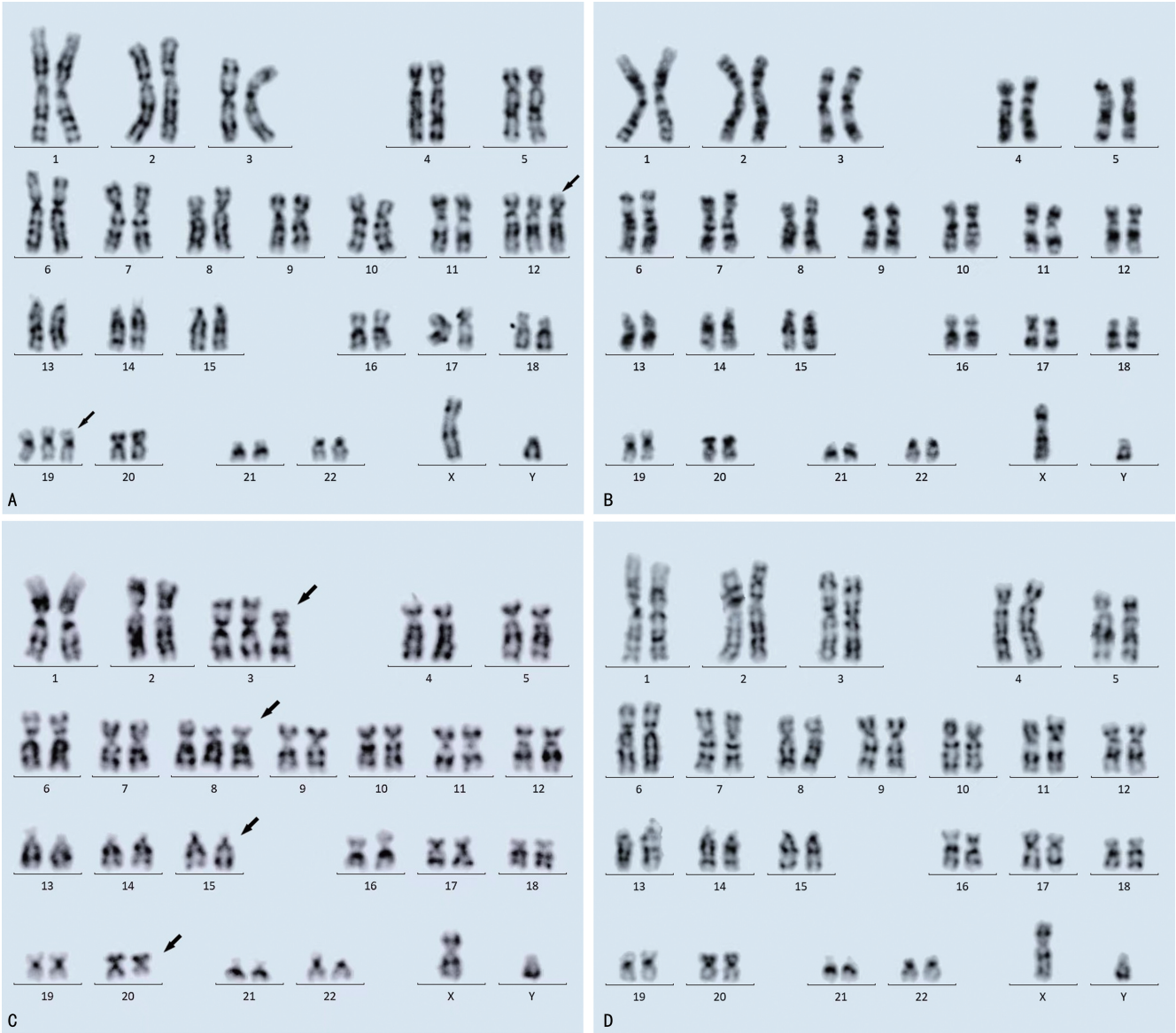
2 结果

2.1 染色体核型培养成功率和异常检出率比较 在 240 例 CLL 患者和 251 例非 CLL 的其他 B-CLPD 患者中,实验组染色体核型培养成功率及异常检出率均明显高于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1、图 1。进一步分析发现,在采用 CpG-ODN DSP30 联合 IL-2 刺激后,CLL 患者与 non-CLL 患者染色体核型培养成功率及异常检出率比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 CLL 组和 non-CLL 组采用 CpG-ODN DSP30 联合 IL-2 刺激后染色体核型异常检出情况比较 进一步比较 CLL 组和 non-CLL 组采用 CpG-ODN DSP30 联合 IL-2 刺激后染色体核型异常检出情况,包括染色体数目异常和结构异常。结果显示,non-CLL 组 high-CK 及 CK 比例均明显高于 CLL 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。CLL 组常见的染色体核型异常由高至低依次为 +12、13q-、abn(17p)、14q32(IGH)重排、11q-、6q-等,而 non-CLL 组常见的染色体核型异常由高至低依次为 IGH 重排、6q-、+12、7q-、13q-、abn(17p)、+3、+18 等。与 CLL 组比较,non-CLL 组更易出现 IGH 重排、6q-、7q-、+3 及 +18,见图 2。

表 1 实验组和对照组 CLL 和 non-CLL 患者染色体核型培养成功率和异常检出率比较[%(n/n)]

组别	CLL		non-CLL	
	培养成功	异常检出	培养成功	异常检出
实验组	98.33(236/240)	53.39(126/236)	97.61(245/251)	59.18(145/245)
对照组	86.67(208/240)	1.92(4/208)	81.27(204/251)	0.00(0/204)
χ^2	30.226	141.429	35.461	178.322
P	<0.001	<0.001	0.001	<0.001



注:A 为实验组 1 例 CLL 患者核型分析结果,48,XY,+12,+19;B 为对照组与 A 相同的 1 例 CLL 患者核型分析结果,未检出异常;C 为实验组 1 例 non-CLL 患者核型分析结果,48,XY,+add(3)(p13),del(8)(p21),+del(8)(p21),add(15)(q15),del(20)(q12);D 为对照组与 C 相同的 1 例 non-CLL 患者核型分析结果,未检出异常。

图 1 实验组和对照组 CLL 和 non-CLL 患者染色体核型分析结果

表 2 CLL 组和 non-CLL 组使用 CpG-ODN DSP30 联合 IL-2 刺激后染色体核型异常检出率比较[%(n/n)]

组别	1 种异常	两种异常	CK	high-CK
CLL 组	50.00(63/126)	27.78(35/126)	9.52(12/126)	12.70(16/126)
non-CLL 组	23.45(34/145)	21.38(31/145)	21.38(31/145)	33.79(49/145)
χ^2	20.861	0.498	7.098	6.454
P	<0.001	0.221	<0.001	<0.001

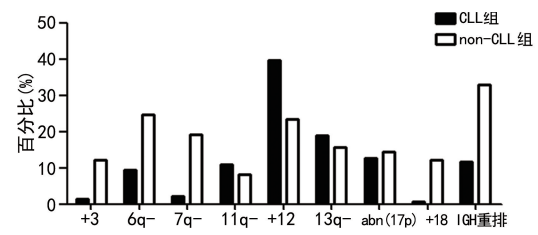


图 2 CLL 组和 non-CLL 组常见的染色体核型异常检出情况比较

3 讨 论

B-CLPD 的细胞遗传学异常对于判断疾病进展、评价临床预后及制订治疗方案等均具有重要临床意义。细胞遗传学分析是检测细胞遗传学异常的常用方法,但由于成熟 B 淋巴细胞属于终末分化期 B 细胞,增殖分化能力差,大多数处于分裂间期,常规培养不易获得中期分裂相。目前,已有研究探讨了各类刺激剂对提高常规培养中 B 淋巴细胞中期分裂相获得率的不同影响,包括脂多糖、美洲商陆有丝分裂原及植物血凝素(PHA)等,但这些刺激剂对染色体核型异常检出率的提升效果不佳^[8-10]。因此,寻找合适的刺激剂对提升染色体核型培养成功率及异常检出率均具有重要临床意义。

现有研究表明,人工合成的 CpG-ODN DSP30 能够直接激活 B 淋巴细胞,提高其增殖能力和细胞因子的分泌速率^[9-10]。有研究发现,IL-2 具有抗凋亡作用,可促进成熟 B 淋巴细胞增殖、分化,从而提高中期细胞培养成功率^[11]。因此,CpG-ODN DSP30 联合 IL-2 可以刺激成熟 B 淋巴细胞有丝分裂,从而可以提高 B 淋巴细胞染色体核型培养成功率及异常检出率。多项研究发现,CpG-ODN 联合 IL-2 共同刺激 B 淋巴细胞可将染色体核型异常检出率提高至 64%~83%^[4-5,10-13]。王冬梅^[14]等应用 CpG-ODN DSP30 及 IL-2 刺激对 115 例 CLL 患者的骨髓标本培养后进行 R 显带分析,其染色体核型培养成功率为 74.8%,异常检出率为 58.1%。买地娜·艾尔肯等^[15]应用 PHA、CpG-ODN DSP30 联合 IL-2 刺激剂对 82 例 CLL 患者的骨髓标本进行培养制片,其染色体核型培养成功率分别为 90.2%和 68.3%,异常检出率分别为 13.5%和 46.4%。有研究发现,CpG-ODN DSP30 和 IL-2 联合刺激对于 CLL 的细胞遗传学分析效果极佳,但对于非 CLL 的其他 B-CLPD 研究仍涉及较少^[10-13]。本研究进一步探讨在 CLL 及非 CLL 的其他 B-CLPD 的细胞遗传学分析诊断中使用 CpG-ODN DSP30 联合 IL-2 刺激对疾病染色体核型检测的影响发现,CLL 和非 CLL 的其他 B-CLPD 患者骨髓细胞经 CpG-ODN DSP30 和 IL-2 联合刺激培养的染色体核型培养成功率分别为 98.33%和 97.61%,异常检出率分别为 53.39%和 59.18%。本研究与国内之前报道比较,新增了对非 CLL 的其他 B-CLPD 的对照研究,且增加了病例数,染色体核型培养成功率及异常检出率均明显提高,染色体核型培养成功率接近或

高于部分国外数据,但异常检出率相比国外数据稍低,考虑是因为种族差异及地域差异因素影响^[10-13]。

B-CLPD 是一组异质性很强的疾病,已有研究表明,染色体核型分析对 B-CLPD 患者诊断、准确危险分层、评估预后及制订治疗方案等方面均具有重要临床意义^[9]。本研究发现,CLL 组常见的染色体核型异常为 +12、13q-、abn(17p)、IGH 重排、11q-、6q-等;non-CLL 组常见的染色体核型异常为 IGH 重排、6q-、+12、7q-、13q-、abn(17p)、+3、+18。既往有文献报道,+12 是 CLL 中最频繁的染色体畸变^[16],与本研究结果一致,常与不典型 CLL 细胞形态和免疫表型有关,但出现 +12 的 CLL 患者生存期与正常核型患者无差异。单纯 13q 缺失预后较好,生存期长,不需要过多治疗^[17]。abn(17p)往往提示存在 p53 基因缺失,在疾病复发或恶性进展时其水平较高,疾病进展较快,患者预后差,生存期短^[15]。本研究发现,CLL 组检出 CK 患者占 9.52%,high-CK 占 12.70%,而 non-CLL 组检出 CK 占 21.38%,high-CK 占 33.79%。既往研究发现,CK 与 CLL 患者不良预后相关,特别是 high-CK 与 CLL 中不良预后和对治疗(包括新药物)的不良反应有关^[18]。而在 B-CLPD 患者中,多由特定和常见的染色体易位来解除对已知致癌基因的控制,如滤泡性淋巴瘤的 t(14;18)(q32;q21)(涉及 IGH::BCL2 融合基因),伯基特淋巴瘤的 t(8;14)(q24;q32)(涉及 IGH::MYC),以及 MCL 的 t(11;14)(q13;q32)(涉及 IGH::CCND1 融合基因),平衡易位在 CLL 中很少见^[19]。

综上所述,CpG-ODN DSP30 联合 IL2 刺激可成为成熟 B 淋巴细胞染色体培养的首选刺激剂,可明显提高 B-CLPD 的染色体核型培养成功率及异常检出率,有助于更加全面地检出 B-CLPD 的遗传学异常,并且在非 CLL 的 B-CLPD 患者细胞遗传学检测中同样具有重要价值。与 CLL 患者比较,非 CLL 的 B-CLPD 患者更易出现复杂核型,预后更差,应进一步加强 B-CLPD 遗传学复杂性及多样性的认识。

参考文献

[1] 李增军,易树华,徐卫,等. B 细胞慢性淋巴增殖性疾病诊断与鉴别诊断中国专家共识(2018 年版)[J]. 中华血液学杂志,2018,39(5):359-365.

[2] DUBUC A M,DAVIDS M S,PULLUQI M,et al. FISH-ing in the dark:how the combination of FISH and conventional karyotyping improves the diagnostic yield in CpG-stimulated chronic lymphocytic leukemia[J]. Am J Hematol,2016,91(10):978-983.

[3] RIGOLIN G M,DEL G I,FORMIGARO L,et al. Chromosome aberrations detected by conventional karyotyping using novel mitogens in chronic lymphocytic leukemia: Clinical and biologic correlations[J]. Genes Chromosomes Cancer,2015,54(12):818-826.

[4] HOLMES P J,PEIPER S C,UPPAL G K,et al. Efficacy

of DSP30-IL2/TPA for detection of cytogenetic abnormalities in chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma[J]. *Int J Lab Hematol*, 2016, 38(5): 483-489.

[5] RIGOLIN G M, CIBIEN F, MARTINELLI S, et al. Chromosome aberrations detected by conventional karyotyping using novel mitogens in chronic lymphocytic leukemia with “normal” FISH: correlations with clinicobiologic parameters[J]. *Blood*, 2012, 119(10): 2310-2313.

[6] 沈悌, 赵永强. 血液病诊断及疗效标准[M]. 4 版. 北京: 科学出版社, 2018: 978-979.

[7] MATUTES E, OWUSU-ANKOMAH K, MORILLA R, et al. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL[J]. *Leukemia*, 1994, 8(10): 1640-1645.

[8] LIEHR T. International system for human cytogenetic or cytogenomic nomenclature (ISCN): some thoughts [J]. *Cytogenet Genome Res*, 2021, 161(5): 223-224.

[9] DUN K A, RILEY L A, DIANO G, et al. DSP30 and interleukin-2 as a mitotic stimulant in B-cell disorders including those with a low disease burden[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2018, 57(5): 260-267.

[10] MAI D N A, LIU H, WANG Y L, et al. Application of CpG oligodeoxynucleotide immunostimulation in chromosome study of chronic lymphoblastic leukemia[J]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 2020, 28(2): 470-475.

[11] DECKER T, BOGNER C, OELSNER M, et al. Antiapoptotic effect of interleukin-2 (IL-2) in B-CLL cells with low and high affinity IL-2 receptors[J]. *Ann Hematol*, 2010, 89(11): 1125-1132.

[12] STEPANOVSKA K, VANKOVA G, NEMETHOVA V, et al. Chromosome banding analysis of peripheral blood lymphocytes stimulated with IL2 and CpG oligonucleotide DSP30 in patients with chronic lymphocytic leukemia [J]. *Klin Onkol*, 2013, 26(4): 263-270.

[13] MUTHUSAMY N, BREIDENBACH H, ANDRITSOS L, et al. Enhanced detection of chromosomal abnormalities in chronic lymphocytic leukemia by conventional cytogenetics using CpG oligonucleotide in combination with pokeweed mitogen and phorbol myristate acetate [J]. *Cancer Genet*, 2011, 204(2): 77-83.

[14] 王冬梅, 徐卫, 董华洁, 等. CpG 寡脱氧核苷酸联合 IL-2 刺激慢性淋巴细胞白血病细胞的细胞遗传学研究[J]. *中国实验血液学杂志*, 2010, 18(5): 1114-1118.

[15] 买地娜·艾尔肯, 刘虹, 王—林, 等. CpG-寡核苷酸免疫刺激法在慢性淋巴细胞白血病遗传学研究中的应用[J]. *中国实验血液学杂志*, 2020, 28(2): 470-475.

[16] AUTORE F, STRATI P, LAURENTI L, et al. Morphological, immunophenotypic, and genetic features of chronic lymphocytic leukemia with trisomy 12: a comprehensive review[J]. *Haematologica*, 2018, 103(6): 931-938.

[17] PUIGGROS A, VENTURAS M, SALIDO M, et al. Interstitial 13q14 deletions detected in the karyotype and translocations with concomitant deletion at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia: different genetic mechanisms but equivalent poorer clinical outcome[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2014, 53(9): 788-797.

[18] JAROSOVA M, PLEVOVA K, KOTASKOVA J, et al. The importance of complex karyotype in prognostication and treatment of chronic lymphocytic leukemia (CLL): a comprehensive review of the literature[J]. *Leuk Lymphoma*, 2019, 60(10): 2348-2355.

[19] ZENE T, MERTENS D, DOHNER H, et al. Importance of genetics in chronic lymphocytic leukemia [J]. *Blood Rev*, 2011, 25(3): 131-137.

(收稿日期: 2022-12-17 修回日期: 2023-05-11)

(上接第 2047 页)

[7] 邵肖梅, 叶鸿瑁, 丘小汕. 实用新生儿学[M]. 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2019: 520-523.

[8] GRANDGIRARD D, GAUMANN R, COULIBALY B, et al. The causative pathogen determines the inflammatory profile in cerebrospinal fluid and outcome in patients with bacterial meningitis[J]. *Mediators Inflamm*, 2013, 2013: 312476.

[9] VIVAS M, FORCE E, EL HAJ C, et al. Experimental study of cerebrospinal fluid tumor necrosis factor- α release in penicillin- and cephalosporin-resistant pneumococcal meningitis treated with different antibiotic schedules[J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2017, 50(4): 435-439.

[10] PRASAD R, KAPOOR R, SRIVASTAVA R, et al. Cerebrospinal fluid TNF- α , IL-6, and IL-8 in children with bacterial meningitis [J]. *Pediatr Neurol*, 2014, 50(1): 60-65.

[11] SHARMA S, GOYAL M K, SHARMA K, et al. Cytokines do play a role in pathogenesis of tuberculous meningitis: a prospective study from a tertiary care center in India[J]. *J Neurol Sci*, 2017, 379: 131-136.

[12] SMITH N L, DENNING D W. Clinical implications of interferon-gamma genetic and epigenetic variants[J]. *Immunol*, 2014, 143(4): 499-511.

[13] PETTINI E, FIORINO F, CUPPONE A M, et al. Interferon-gamma from brain leukocytes enhances meningitis by type 4 streptococcus pneumoniae[J]. *Front Microbiol*, 2015, 6: 1340.

[14] LU D, CHEN C, YU S, et al. Diagnosis of tuberculous meningitis using a combination of peripheral blood T-SPOT, TB and cerebrospinal fluid interferon-gamma detection methods[J]. *Lab Med*, 2016, 47(1): 6-12.

[15] 陈峰, 何笑笑, 姜娜, 等. 肿瘤坏死因子 α 和消退素 D1 检测在新生儿化脓性脑膜炎中的意义[J]. *中华新生儿科杂志*, 2020, 35(1): 16-19.

(收稿日期: 2022-07-22 修回日期: 2023-05-05)