

病毒性脑炎患儿脑脊液人类鼻病毒检测的价值*

高 珺¹, 王 琮², 林广裕³, 陈洁玲³, 陆学东²

(1. 广东医学院, 广东湛江 524023; 2. 广东医学院附属福田医院医学检验部, 广东深圳 518033;
3. 汕头大学医学院第二附属医院儿科, 广东汕头 515041)

摘要:目的 了解儿童病毒性脑炎的病原体, 建立快速、特异检测鼻病毒的方法, 探讨病毒性脑炎与鼻病毒的相关性。方法 收集2012年1月~12月全年期间收住在汕头大学医学院第二附属医院儿科重症监护室出现发热、惊厥症状的患儿脑脊液标本169份, 应用巢式RT-PCR扩增脑脊液标本的鼻病毒核酸, 对阳性结果进行核酸序列测定和同源性分析。结果 巢式RT-PCR总共检测出39份鼻病毒阳性样本, 总阳性检出率为23.1%; 人类鼻病毒(HRV)感染的儿童中年龄在5岁以下的占87.6%; 7~9月份HRV阳性检出率较高; 序列分析显示39例HRV检测阳性标本中HRV-A型18例(46.1%, 18/39), HRV-B型7例(17.9%, 7/39), HRV-C型14例(35.9%, 14/39); 28例病毒性脑炎有8例检出HRV, 其中3例为HRV-C。结论 建立的巢式RT-PCR可以检测到脑脊液标本中的鼻病毒片段, 并且HRV-A、B和C三型均有检出, 结合临床症状可认为HRV可能是病毒性脑炎的病原体之一。

关键词:鼻病毒; 病毒性脑炎; 儿童; 巢式逆转录聚合酶链反应

中图分类号: R512.3; R373.19 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2015)02-011-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2015.02.004

Value of Human Rhinovirus Detected in Cerebrospinal Fluid of Children with Viral Encephalitis

GAO Jun¹, WANG Qiong², LIN Guang-yu³, CHEN Jie-ling³, LU Xue-dong²

(1. Guangdong Medical College, Guangdong Zhanjiang 524023, China;
2. Department of Laboratory Medicine, Affiliated Futian Hospital of Guangdong Medical College Guangdong Shenzhen 518033, China; 3. Department of Pediatrics, the Second Affiliated Hospital of Shantou University Medical College, Guangdong Shantou 515041, China)

Abstract: **Objective** To understand the pathogen of viral encephalitis (VE) in children, and establish a rapid and specific method for detecting human rhinovirus (HRV), and investigate the correlation between HRV and viral encephalitis (VE). **Methods** 169 CSF specimens were collected from children with convulsions and fever, who were admitted to the pediatric intensive care unit (PICU) of Second Affiliated Hospital of Shantou University Medical College between January 2012 and December 2012. Nested RT-PCR was used to detect HRV in CSF specimens, and the positive PCR products were sequenced, then analyzed and constructed the phylogenetic tree by software. **Results** 39 (23.1%) out of 169 samples were HRV positive. Among them, 148 (87.6%) children were below 5 years old. The detection rate of HRV increases from July to September, and reached its highest point in September. Sequence analyzed showed that the 39 HRV positive specimens including 18 (46.1%, 18/39) positive for HRV-A, 7 (17.9%, 7/39) positive for HRV-B, 14 (35.9%, 14/39) positive for HRV-C. There were 8 out of 28 VE cases were detected in HRV, including 3 (50%, 3/6) positive for HRV-C. **Conclusion** HRV could be detected in CSF specimens by nested RT-PCR, including three types of HRV, combined with clinical symptoms considered that HRV may be one of the VE pathogen.

Keywords: human rhinovirus; viral encephalitis; children; nested reverse transcription-polymerase chain reaction

病毒性脑炎(viral encephalitis, VE)是一种常见的中枢神经系统疾病, 主要临床表现有发热、头痛、呕吐、抽搐和意识障碍等, 在婴幼儿中发病率最高。目前已可知引发病病毒性脑炎的病毒有130多种, 目前仍有70%的病毒性脑炎病原体是现在的检测方法无法检出的^[3]。这源于病毒性脑炎的病

变部位隐匿, 轻重程度差别大, 使得临床表现多变, 轻重不一。人类鼻病毒(human rhinovirus, HRV)是成人与儿童呼吸道感染的主要病原体, 通常在5岁以下患有呼吸道疾病的儿童中感染率较高^[1]。可通过直接接触或空气飞沫传播, 在呼吸道疾病中可以和其他病毒、细菌一起合并感染。2003年有

* 作者简介: 高 珺(1989-), 女, 研究生在读, 临床检验诊断学, Tel: 13723483437, E-mail: junegao@163.com。

通讯作者: 陆学东, 研究员, E-mail: luxuedong2004@163.com。

研究发现,HRV与婴幼儿热性惊厥发作有关^[2],但是尚没有足够充分的证据明确二者之间的相关性,现收集2012年1月~12月因发热、惊厥等症状组合入院的患儿脑脊液标本,进行HRV检测及其他病原体检测,初步探讨病毒性脑炎患儿中HRV感染的状况。

1 材料与方法

1.1 研究对象 收集2012年全年之内收住在汕头大学附属第二医院儿科重症监护室并出现发热或抽搐症状的患儿脑脊液169例,其中男性93例,女性76例;患儿年龄26天~13岁;按照《儿科学》病毒性脑膜炎诊断标准,临床诊断为病毒性脑炎的患儿有28例,其余141例临床诊断主要有呼吸道感染、手足口病、癫痫等。患儿均于入院24~72 h行侧卧位腰椎穿刺,选择L4-L5或L3-L4间隙穿刺,留取脑脊液5 ml,其中3~4 ml送常规生化检验、细菌培养、新型隐球菌培养及抗酸杆菌涂片等检查,剩余的装入无菌试管内,置于-80℃冰箱中待检,同时收集患儿的临床资料。标本收集均取得患儿家属签字同意,并获得医院伦理委员会的同意。

1.2 试剂 应用北京全式金生物技术公司生产的病毒DNA/RNA提取试剂盒,提取核酸于-80℃冰箱保存备用。RT-PCR试剂使用Qiagen公司 One-Step RT-PCR Kit。PCR试剂使用Qiagen公司的HotStarTaq Master Mix Kit。

1.3 引物的设计与合成 针对HRV的5'UTR和VP4/VP2保守区域,参考GenBank中已知的HRV序列,设计合成HRV巢式PCR引物,引物序列和扩增片段大小见表1。引物由Invitrogen(上海)生物公司合成。

表1 HRV巢式RT-PCR扩增引物

靶点	引物序列(5'-3')	片段大小(bp)
5'UTR	F1:CAAGCACTTCTGYWCCCC	390
	R1:ACGGACACCCAAAGTAG	
	F2:CGTTAYCCGCAAGRYGCCTAC	218
	R2:TTAGCCRCATTCAGGRGG	
VP4/VP2	F3:CCGGCCCCCTGAATGYGGCTAA	660
	R3:GCATCIGGYARYTTCCACCACCANCC	
	F4:ACCRACCTACTTTGGGTGTCCGTG	533
	R4:TCWGGHARYTTCCAMCACCANCC	

1.4 方法

1.4.1 HRV 5'UTR 基因片段扩增:经巢式RT-PCR方法扩增HRV。PCR反应为每管10 μl,首先使用引物F1,R1进行一次RT-PCR,RT-PCR反应体系为:H₂O 5.95 μl,5×RT-PCR Buffer 2

μl,OneStep RT-PCR Enzyme Mix 0.4 μl,dNTP Mix 0.4 μl,RNA酶抑制剂0.05 μl,F1 0.1 μl(10 μmol/L),R1 0.1 μl(10 μmol/L),核酸样本1.0 μl;反应条件为:50℃ 30 min,95℃ 15 min;94℃ 45 s,58℃ 45 s,72℃ 1 min,35个循环;72℃ 10 min,预期扩增产物长度为390 bp。以第一次RT-PCR反应产物0.5 μl为模板,应用引物F2,R2进行二次PCR扩增,反应体系为:H₂O 11 μl,HotStar Taq Master Mix 12.5 μl,F2 0.5 μl(10 μmol/L),R2 0.5 μl(10 μmol/L),RT-PCR产物0.5 μl;PCR反应条件:95℃ 15 min;94℃ 30 s,57℃ 30 s,72℃ 1 min,35个循环;72℃ 10 min,预期扩增产物长度为218 bp。扩增产物经1 g/dl琼脂糖凝胶电泳。阳性扩增产物送Introvigen公司测序。

1.4.2 HRV VP4/VP2 基因片段扩增:HRV VP4/VP2的扩增与5'UTR片段一样,同样是经巢式RT-PCR获得目的基因片段,PCR反应体系与程序也相同。区别在于,HRV VP4/VP2的PCR扩增中第一轮RT-PCR所用的引物是F4,R4,预期扩增产物长度为660 bp;再次PCR过程中使用的引物是F5,R5,预期扩增产物长度为533 bp。扩增产物同样经1 g/dl琼脂糖凝胶电泳。阳性扩增产物送Introvigen公司测序。测序所得结果首先经NCBI BLAST比对,确认是否为HRV,再经MegAlign软件与GenBank中HRV-A,B,C 3个基因型的参考株进行VP4/VP2基因区域的核酸序列比对。

1.5 统计学分析 应用SPSS13软件,阳性检出率的比较采用 χ^2 检验。

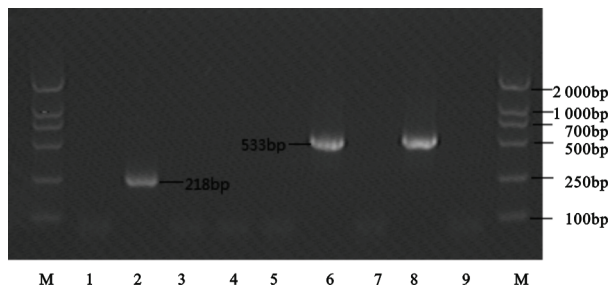
2 结果

2.1 脑脊液常规检查和生化检查 对169例脑脊液标本进行脑脊液常规和生化检查,按《实用儿科学》(第7版)儿童正常脑脊液标准^[2],有77例未见异常,常规检查异常脑脊液样本占全部样本的54.4%(92/169);所有标本均未检出隐球菌。28例病毒性脑炎患儿中,脑脊液常规检查异常的占75%(21/28),其中有9例潘氏试验阳性,7例蛋白定量较高,9例白细胞计数升高,7例葡萄糖升高,6例氯化物较高。

2.2 临床标本中HRV检测结果 对2012年全年的169例临床标本的检测中,对5'UTR区的扩增阳性结果可在218 bp处出现条带,对VP4/VP2区的扩增阳性结果可在533 bp处出现条带,两个片段均有阳性标本检出,片段大小与预期结果一致(见图1)。HRV阳性标本中男性22例(23.6%,22/93),女性17例(22.3%,17/76),男女之比为1.3:1,差异无统计学意义($\chi^2=0.039$, $P=0.469$)。

>0.05)。全年169例样本中,HRV总阳性检出率为23.1%(39/169),其中18例为HRV-A(阳性检出率为10.7%,18/169),占HRV阳性标本的46.1%(18/39);7例为HRV-B(阳性检出率为4.1%,7/169),占HRV阳性标本的18.0%(7/39);14例为HRV-C(阳性检出率为8.3%,14/169),占HRV阳性标本的35.9%(14/39)。28例临床诊断为病毒性脑炎的患儿中,检出HRV的有8例,阳性检出率为28.6%(8/28),其中有3例HRV-A,2例为HRV-B,3例为HRV-C。在其余141例临床诊断非病毒性脑炎患儿中,HRV总阳性检出率为22.0%(31/141)。病毒性脑炎患儿中HRV阳性检出率略高于非病毒性脑炎患儿。

患儿年龄分布情况见表2,HRV感染的患儿中年龄在5岁以下的占87.6%(148/169),其中又以<1岁组检出率最高(38.5%,15/39)。用卡方检验进行HRV阳性各年龄组检出率与5岁以上年龄组的比较,差异均无统计学意义($P>0.05$,见表2)。



M:Marker;1,9为阴性对照;2,6,8为阳性结果;3,4,5,7为阴性结果。

图1 巢式RT-PCR检测HRV基因

表2 HRV感染患儿年龄分布表[n(%)]

年龄(岁)	n	HRV-A (n=18)	HRV-B (n=7)	HRV-C (n=14)	合计	P
<1	63	9(14.3)	1(1.6)	5(7.9)	15(23.8)	0.254
1~3	62	5(8.1)	4(6.5)	5(8.0)	14(22.6)	0.956
3~5	23	3(13.0)	0(0)	3(13.0)	6(26.1)	0.361
>5	21	1(4.8)	2(9.5)	1(4.8)	4(19.0)	

2.3 HRV感染的月份分布 HRV阳性检出率在所检年度的月份分布图见图2。HRV检出数在7~9月份较高。HRV-A在除2012年10月的各月份中均可检出,其中1月份检出率最高(25%,1/4);HRV-B仅在1月份、6~9月份检出,在7月份检出率最高(11.8%,2/17);HRV-C除11月份、12月份外的全年每个月份均有检出,其中10月份的检出率最高(26.7%,4/15)。HRV检出数及检出

率在1月份为最高峰,为50%(2/4,A,B均有检出),7~9月份有另一小高峰,依次为9月份(42.8%,6/14,以HRV-A为主)、8月份(31.6%,6/19,以HRV-C为主)、7月份(29.4%,5/17,以HRV-A和B为主)。

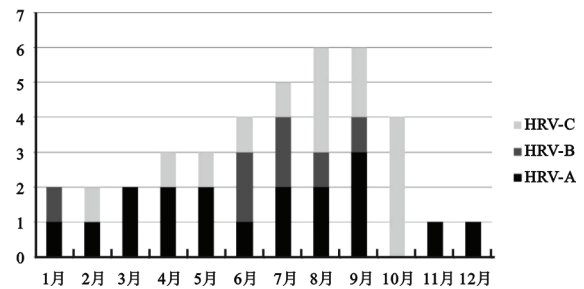


图2 2012年1~12月HRV检出阳性标本的月分布图

2.4 核酸序列测定和同源性比较 HRV阳性标本经PCR扩增的VP4/VP2区、5'UTR区部分核酸片段序列测序结果见图3。应用MegAlign进行序列同源性分析,所测HRV-A型标本序列与GenBank中的HRV-A参考株比较核苷酸同源性为60.1%~83.0%,在5'UTR区的型内核苷酸同源性为57.5%~97.7%,在VP4/VP2区的型内核苷酸同源性为59.4%~94.0%;所测HRV-B标本的序列在5'UTR区同源性为77.4%~97.4%,VP4/VP2区扩增未检出HRV-B;所测HRV-C型标本序列与GenBank中的HRV-C参考株比较核苷酸同源性为71.9%~89.1%,在5'UTR区型内核苷酸同源性为75.7%~95.1%,在VP4/VP2区型内核苷酸同源性为54.3%~96.4%。

3 讨论 病毒性脑炎是一种常见的中枢神经系统感染疾病,是由病毒侵犯脑实质引起的炎症,常表现为发热、头痛、抽搐、意识障碍和脑膜刺激症状等,可致中枢神经系统局灶性损害。有时病毒也可累及脑膜,称为病毒性脑膜炎。全世界大约有130多种病毒可引起病毒性脑炎^[3],患病率约3.5~7.4/10万,其中儿童和婴儿的患病率较高^[4]。常见病毒性脑炎主要有乙型脑炎、东、西方和委内瑞拉马脑炎、呼吸道传播的病毒性脑炎等。肠道病毒引起的脑炎也呈流行趋势,我国近年也发现多起肠道病毒脑炎的流行^[5]。也有少部分脑炎是由疱疹病毒引起的,包括单纯疱疹病毒、水痘-带状疱疹病毒、EB病毒和人类巨细胞病毒等。此外,随着分子生物学技术的应用,逐渐发现有越来越多的病毒可引发病毒性脑炎,及一些以前不引发脑炎的病毒感染也出现脑炎的症状,如登革热病毒感染^[6]。因此病毒性脑炎的病原学研究一直是临床试图解决的课题。

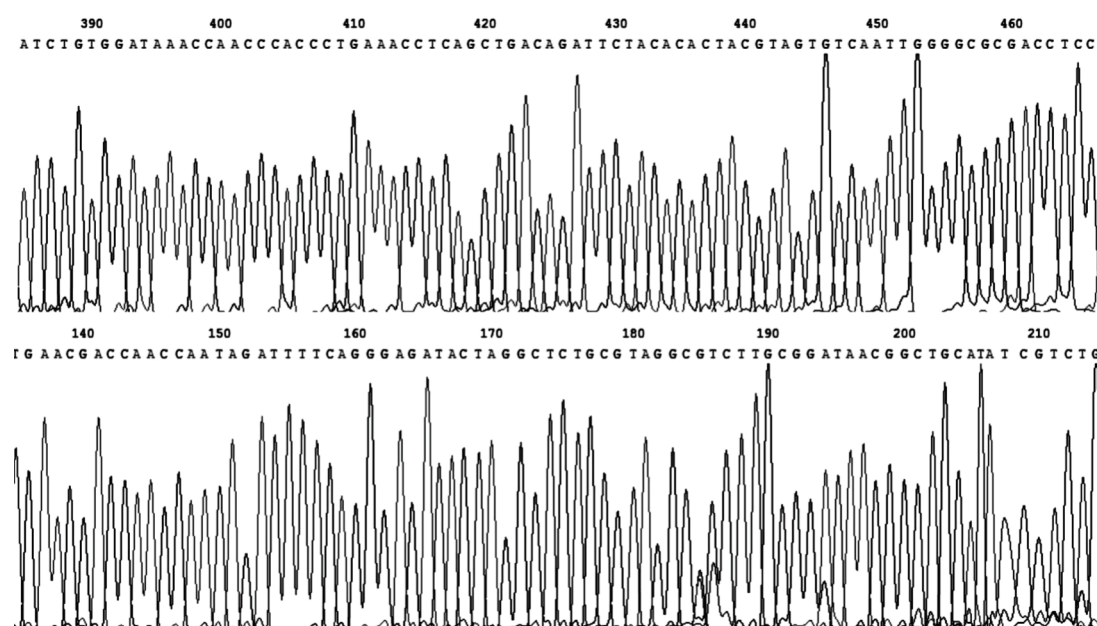


图3 HRV阳性标本部分核酸片段测序结果

本研究收集的169份脑脊液中,其中有24例患儿临床诊断为病毒性脑炎,经RT-PCR检测,结果显示其中6例检出HRV,占25%(6/24),分别为2例HRV-A,1例HRV-B,3例HRV-C。这6名患儿的平均年龄为31月,其中<3岁5名,占83.3%,说明本组婴幼儿更容易患鼻病毒感染引起的脑炎。6例患儿的发病时间处在6~10月份之间,这与整年全部标本中HRV检出率高峰7~9月份接近,提示夏季、秋季可能是鼻病毒感染引发脑炎的发病高峰期。8例患儿主要的临床症状有:发热(87.5%)、抽搐(37.5%)、咳嗽(25.0%)。按《实用儿科学》(第7版)儿童正常白细胞(WBC)计数标准^[2]1004-1708,4例(50.0%)升高,4例正常;按《实用儿科学》(第7版)儿童正常脑脊液标准^[2],4例(50.0%)WBC轻度升高,1例(12.5%)葡萄糖升高,蛋白、氯化物均正常;有2例的脑脊液检查未见异常。本次研究中发现HRV3种基因型均可引起儿童病毒性脑炎,但以HRV-A型和HRV-C型为主,检出的HRV阳性标本核苷酸序列的同源性为67.1%~92.7%,核苷酸变异性为2.6%~40.5%,说明与病毒性脑炎相关的HRV组内存在较大的遗传变异性。

HRV最早是在1956年由Pelon等人用组织培养的方法从上呼吸道感染病人鼻咽分泌物中分离出来的,属于小RNA病毒科肠道病毒属,核心为无折叠的单股正链RNA,全长约7200bp。基因组结构包括5'端非编码区(5'UTR)、开放阅读框(ORFs)、3'端非编码区(3'UTR)。ORFs转录后的产物被分成11个蛋白,其中4个蛋白(VP1, VP2, VP3, VP4)形成衣壳,呈二十面体围绕核心

RNA。基于对VP4/VP2衣壳蛋白编码区基因序列的进化分析,将HRV分为3个基因型:HRV-A,HRV-B,HRV-C。目前已检测到的HRV血清型达150多个^[7],是人类病毒中已知血清型最多的病毒。HRV的检测方法,最经典的是病毒分离培养,但HRV不稳定,不易分离^[8];由于HRV血清型较多,缺乏一个合适的交叉反应抗原,因此免疫学方法灵敏度低于细胞培养,所以在临床检测中这二者并不可行。现在,随着分子生物学技术的不断发展,RT-PCR方法应用到HRV检测后,其检出率有所提高^[9,10],逐渐成为目前应用最广泛的HRV检测方法,扩增的目的基因多是HRV的5'UTR和VP4/VP2保守区。本研究考虑到HRV不同基因型间变异性及其与肠道病毒属的高度同源性,参考国内外文献分别设计针对5'UTR区和VP4/VP2区保守区域的巢式PCR引物以同时检测HRV三种基因型。经凝胶电泳、核苷酸测序和系统进化树的构建可提示本研究建立的方法可检出脑脊液标本中的HRV,并且特异度及灵敏度良好。

HRV是引起包括普通感冒在内的轻微呼吸道感染的最常见原因,可引起急性上呼吸道感染和急性下呼吸道感染^[11,12],尤其在诱发哮喘急性发作上具有重要意义^[13]。据研究发现,感染鼻病毒滴度最高的位置是鼻部,因此多选择鼻咽标本用于诊断,包括鼻咽洗液、鼻拭子和咽拭子^[14]。当HRV的检出率随着RT-PCR方法的应用而提高时,越来越多的研究表明HRV不仅引起呼吸道感染,还可有其他多种临床表现,Stokes等^[15,16]在热性惊厥患儿的咽拭子中检测到鼻病毒,表明鼻病毒

与热性惊厥有关联,但并没有对相应病例的脑脊液进行鼻病毒检测,因而该例患儿仅诊断为热性惊厥。2012年本课题组从一个发热抽搐的患儿脑脊液中检测到HRV,首次提出HRV可能与脑炎有关的观点^[17]。脑脊液检查是中枢神经系统感染性疾病的必要手段,但脑脊液的变化与病情轻重无关,约70%的病毒性脑炎患者脑脊液表现正常或轻度异常,而仍有3%~5%的严重感染者脑脊液检查完全正常^[18]。从本研究的结果看来,28.6%的病毒性脑炎患儿脑脊液中检出HRV,并且HRV-A,B,C三型均有检出,这表明鼻病毒可能与我国小儿脑炎相关,并且可能是病毒性脑炎的多种病原体之一。同时,HRV RT-PCR检测阳性提示颅内存在鼻病毒感染,可以为临床诊断提供重要依据,从而帮助临床选择相应的治疗措施。但是本研究的周期较短,HRV阳性病例相对较少,对HRV不同分型与病毒性脑炎之间相关性的研究尚不充分,因此,对于人类鼻病毒的研究不应只局限在呼吸系统,有必要在神经系统相关疾病中展开深入研究,从而进一步明确鼻病毒与脑炎之间的相关性以及致病机制;同时,对病毒性脑炎患者脑脊液进行分子生物学方法检测也是非常重要的。

参考文献:

- [1] Arden KE, Faux CE, O'Neill NT, et al. Molecular characterization and distinguishing features of a novel human rhinovirus (HRV) C, HRV C-QCE, detected in children with fever, cough and wheeze during 2003 [J]. J Clin Virol, 2010, 47(3): 219-223.
- [2] 胡亚美, 江载芳. 普通实验室检查[M]. // 诸福棠. 实用儿科学. 7版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 170, 1704-1708.
Hu YM, Jiang ZF. General laboratory[M]. // Zhu Futang. Textbook of Pediatric. 7th ed. Beijing: People Hygiene Press, 2002: 170, 1704-1708.
- [3] David MK, Peter MH. Fields Virology[M]. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007: 572.
- [4] Davison KL, Crowcroft NS, Ramsay ME, et al. Viral encephalitis in England, 1989-1998: what did we miss? [J]. Emerging Infectious Diseases, 2003, 9(2): 234-240.
- [5] 魏桂荣, 张敏, 桂元武, 等. 脑脊液肠道病毒 RT-PCR 检测对病毒性脑炎患者的临床意义[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2007, 36(6): 821-823.
Wei GR, Zhang M, Gui YW, et al. Clinical significance of RT-PCR assay for enterovirus in patients with viral encephalitis[J]. Acta Med Univ Sci Techol Huazhong, 2007, 36(6): 821-823.
- [6] Nilsson J, Vene S, Mattsson L. Dengue encephalitis in a Swedish traveller returning from Thailand [J]. Scand J Infect Dis, 2005, 37(10): 776-778.
- [7] Schibler M, Gerlach D, Martinez Y, et al. Experimental human rhinovirus and enterovirus interspecies recombination[J]. J Gen Virol, 2012, 93(Pt 1): 93-101.
- [8] Mahony JB. Detection of respiratory viruses by molecular methods[J]. Clin Microbiol Rev, 2008, 21(4): 716-747.
- [9] Juven T, Mertsola J, Waris M, et al. Etiology of community-acquired pneumonia in 254 hospitalized children[J]. Pediatr Infect Dis J, 2000, 19(4): 293-298.
- [10] Marcone DN, Videla C, Ricarte C, et al. Rhinovirus detection by real-time RT-PCR in children with acute respiratory infection in Buenos Aires, Argentina [J]. Rev Argent Microbiol, 2012, 44(4): 259-265.
- [11] Michelow IC, Olsen K, Lozano J, et al. Epidemiology and clinical characteristics of community-acquired pneumonia in hospitalized children[J]. Pediatrics, 2004, 113(4): 701-707.
- [12] Tsolia MN, Psarras S, Bossios A, et al. Etiology of community-acquired pneumonia in hospitalized school-age children: evidence for high prevalence of viral infections[J]. Clin Infect Dis, 2004, 39(5): 681-686.
- [13] Lemanske RF, Jackson DJ, Gangnon RE, et al. Rhinovirus illnesses during infancy predict subsequent childhood wheezing[J]. J Allergy Clin Immunol, 2005, 116(3): 571-577.
- [14] Couch RB, Atmar RL. Rhinovirus[M]. // Lennette EH, Smith TF. Laboratory diagnosis of viral infections[J]. 3th Ed. New York: CRC Press, 1999: 787-802.
- [15] Stokes MJ, Downham MA, Webb JK, et al. Viruses and febrile convulsions[J]. Archives of Disease in Childhood, 1977, 52(2): 129-133.
- [16] Lewis HM, Parry JV, Parry RP, et al. Role of viruses in febrile convulsions[J]. Archives of Disease in Childhood, 1979, 54(11): 869-876.
- [17] 蔡晓莹, 陆学东, 林广裕, 等. 病毒性脑炎患儿脑脊液中人类鼻病毒的检测分析[J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2012, 39(5): 289-293.
- [18] Cai XY, Lu XD, Lin GY, et al. Detection of human rhinovirus in the cerebrospinal fluid of children with viral encephalitis[J]. International Journal of Epidemiology and Infectious Disease, 2012, 39(5): 289-293.
- [18] 邵旦兵, 孙海晨. 病毒性脑炎的研究进展[J]. 中国全科医学, 2008, 11(10B): 1817-1819.
Shao DB, Sun HC. Progress in research of viral encephalitis[J]. Chinese General Practice, 2008, 11(10B): 1817-1819.