

应用 GeXP 遗传分析系统检测病毒性脑炎患儿脑脊液中的人类鼻病毒*

王 琼¹, 林广裕², 高 璐¹, 蔡晓莹², 张银辉¹, 陈洁玲², 陆学东^{1△} (1. 广东医学院附属福田医院检验医学部, 广东深圳 518033; 2. 汕头大学医学院第二附属医院儿科, 广东汕头 515041)

【摘要】 目的 探讨儿童脑炎与鼻病毒的关系以及 GeXP 多重基因表达遗传分析系统在病毒性脑炎患儿脑脊液人类鼻病毒检测方面的应用价值。**方法** 选择 2012 年 1~12 月因发热抽搐等症状就诊于汕头大学医学院第二附属医院儿科重症监护室的患儿脑脊液 140 份, 应用 GeXP 遗传分析系统对脑脊液标本进行包括人类鼻病毒在内的常见呼吸道病毒筛查, 巢式 RT-聚合酶链反应(PCR)扩增鼻病毒阳性标本, 并对扩增产物进行核酸序列测定和同源性比对。**结果** GeXP 遗传分析系统共检测出 6 份鼻病毒阳性标本, 经巢式 RT-PCR 扩增、核酸序列测定和同源性比对, 结果为鼻病毒 C 型 4 份, 与 GenBank 数据库参考序列同源性为 95.8%~98.3%。鼻病毒 A 型和 B 型各 1 份, 与参考序列同源性分别为 96.0% 和 99.0%。**结论** 鼻病毒是引起儿童脑炎的病原之一, GeXP 遗传分析系统为病毒性脑炎的病原学研究提供快速高通量的检测。

【关键词】 鼻病毒; 病毒性脑炎; 儿童; GeXP 遗传分析系统

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.13.005 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)13-1828-04

Application of GeXP genetic analysis system for detecting human rhinovirus in cerebrospinal fluid of children patients with viral encephalitis* WANG Qiong¹, LIN Guang-yu², GAO Jun¹, CAI Xiao-ying², ZHANG Yin-hui¹, CHEN Jie-ling², LU Xue-dong^{1△} (1. Department of Laboratory Medicine, Affiliated Futian Hospital, Guangdong Medical College, Shenzhen, Guangdong 518033, China; 2. Department of Pediatrics, Second Affiliated Hospital, Medical College of Shantou University, Shantou, Guangdong 515041, China)

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between the viral encephalitis in children with human rhinovirus(HRV) and the application value of the GenomeLab Gene Expression Profiler(GeXP) analyzer for the detection of HRV in the cerebrospinal fluid (CSF) of children patients with viral encephalitis. **Methods** 140 CSF specimens from children patients with convulsions and fever admitted to the pediatric intensive care unit (PICU) of the Second Affiliated Hospital of Medical College of Shantou University from January 2012 to December 2012 were collected and tested for common respiratory viruses including HRV by using GeXP genetic analysis system. The HRV positive specimens were amplified by nested RT-PCR, and the positive PCR products were sequenced. The resultant DNA sequences were aligned with the reference HRV sequence in GenBank. **Results** Totally 6 HRV positive specimens were detected by GeXP genetic analysis system. Among them 4 specimens were HRV-C genotypes showing 95.8%~98.3% identity with reference sequences. The others were 1 specimen of HRV-A and 1 specimen of HRV-B genotype which show 96.0% and 99.0% identity with reference sequences respectively. **Conclusion** HRV is one of the pathogens causing viral encephalitis in children; the GeXP genetic analysis system could be used as a rapid and high throughput detection tool for viral encephalitis etiology research.

【Key words】 human rhinovirus; viral encephalitis; children; GeXP genetic analysis system

病毒性脑炎病因复杂, 目前已知可引起脑炎的病毒有 130 多种, 但仍有 48%~85% 的中枢神经系统感染性病原不明^[1]。人类鼻病毒(HRV)属于小核糖核酸病毒科肠道病毒属, 是一组单正链的小分子 RNA 病毒, 是成年人和儿童呼吸道感染最常见的病原, 有研究发现 HRV 与婴幼儿的热性惊厥发作有关^[2]。GeXP 多重基因表达遗传分析系统结合多重聚合酶链反应(PCR)技术和毛细管电泳技术, 可以同时检测多达 35 个基因的表达丰度, 具有较高的检测灵敏度和特异性, 目前已成功应用于细菌氨基糖苷类耐药基因检测、呼吸道病毒和脑炎相

关虫媒病毒的检测等领域^[3-5]。本文旨在探讨 HRV 作为病毒性脑炎病原的意义以及 GeXP 遗传分析系统在病毒性脑炎患儿脑脊液中 HRV 检测方面的应用价值, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 标本来源 选择 2012 年 1~12 月因发热抽搐等症状就诊于汕头大学医学院第二附属医院儿科重症监护室的 140 份患儿脑脊液标本, 患儿均于入院 24~72 h 内行侧卧位腰椎穿刺, 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

* 基金项目: 广东省深圳市科技计划项目资助(201202158); 广东省深圳市福田区卫生公益性科研项目资助(FTWS201231)。

作者简介: 王琼, 女, 研究生, 主管技师, 研究方向为微生物及分子诊断检验。△ 通讯作者, E-mail: hubiyun180@163.com。

涂片等检查,剩余的装入无菌试管并做好标记,置于一80℃冰箱中待检。同时收集患儿的临床资料。

1.2 病毒核酸提取 病毒 DNA/RNA 提取试剂盒(EasyPure Viral DNA/RNA Kit)购于北京全式金生物技术公司,核酸提取严格按照说明书操作,提取核酸置于一80℃冰箱保存备用。

1.3 GeXP 多重遗传分析系统进行多种呼吸道病毒检测 呼吸道病毒多重检测试剂盒购于宁波海尔施基因科技有限公司,对常见呼吸道病毒(流感 A、B 型,副流感 1、2、3 型,腺病毒,HRV,人呼吸道合胞病毒,人冠状病毒,人偏肺病毒,人博卡病毒)进行多重 PCR 检测。病毒核酸的扩增程序包括反转录反应和 PCR 反应,反应总体积均为 10 μL。反转录反应体系:H₂O 4.5 μL,5×RT Buffer 2.0 μL,ResV RT primer mix 1.0 μL,Reverse transcriptase 0.5 μL,核酸标本 2 μL;反转录反应条件:48℃ 1 min,42℃ 60 min,95℃ 5 min。PCR 反应体系:10×RT Buffer 1.0 μL,25 mmol/mL MgCl₂ 2 μL,ResV PCR primer mix 1.0 μL,Solution X 1.0 μL,Taq DNA Polymerase 0.35 μL,反转录产物 4.65 μL;PCR 反应条件:94℃ 1 min,94℃ 30 s,60℃ 30 s,70℃ 30 s,35 个循环;70℃ 1 min。各病毒扩增核酸片段大小信息见表 1。其中 huRNA 和 huDNA 为质控核酸提取过程中 RNA 和 DNA 完整性的内参照,InControl 为质控 RT 和 PCR 反应过程的内参照。多重扩增产物进行毛细管电泳;按 19 μL 的甲酰胺(SLS)+内标 Marker(DNA 标准品 SS-400)(100:1)的比例配制上样试剂,加入 1 μL PCR 产物,放入 GenomeLab™ GeXP 遗传分析仪中进行毛细管电泳,使用默认的分析参数(Default GeXP Analysis Parameter)对毛细管电泳结果进行片段分析。电泳的试剂和仪器购自美国贝克曼公司。

1.4 巢式 RT-PCR 扩增 HRV 针对 HRV 的 5' UTR 和 VP4/VP2 区设计巢式引物,对经 GeXP 检测的 HRV 阳性标本再进行巢式 RT-PCR 扩增,引物序列和扩增片段大小见表 2。引物由 Invitrogen(上海)生物公司合成,RT-PCR 和 PCR 扩增采用德国 Qiagen 公司的 One step RT-PCR Kit 及 Hot-StarTaq Master Mix Kit。采用 1%琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物,凝胶成像分析系统观察结果。RT-PCR 反应体系: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,外巢上游引物 0.1 μL,外巢下游引物 0.1 μL,核酸标本 1.0 μL;引物工作浓度为 10 μmol/L;RT-PCR 反应条件:50℃ 30 min,95℃ 15 min;94℃ 45 s,58℃ 45 s,72℃ 1 min,35 个循环;72℃ 10 min。PCR 反应体系:H₂O 11 μL,HotStar Taq Master Mix 12.5 μL,内巢上游引物 0.5 μL,内巢下游引物 0.5 μL,RT-PCR 产物 0.5 μL;引物工作浓度为 10 μmol/L;PCR 反应条件:95℃ 15 min;94℃ 30 s,57℃ 30 s,72℃ 1 min,35 个循环;72℃ 10 min。

1.5 HRV 巢式 RT-PCR 扩增片段序列测定及同源性比对 巢式 RT-PCR 及 PCR 扩增后的 HRV 阳性产物交 Invitrogen(上海)生物公司进行核酸序列测定,所得序列输入美国国家生物技术信息中心(NCBI)的 GenBank 数据库,用 BLAST 进行同源性比对。

1.6 应用荧光定量 PCR 对 HRV 阳性标本进行常见 10 种脑炎病毒检测,总肠道病毒、肠道病毒 71 型、柯萨奇病毒 A16 试

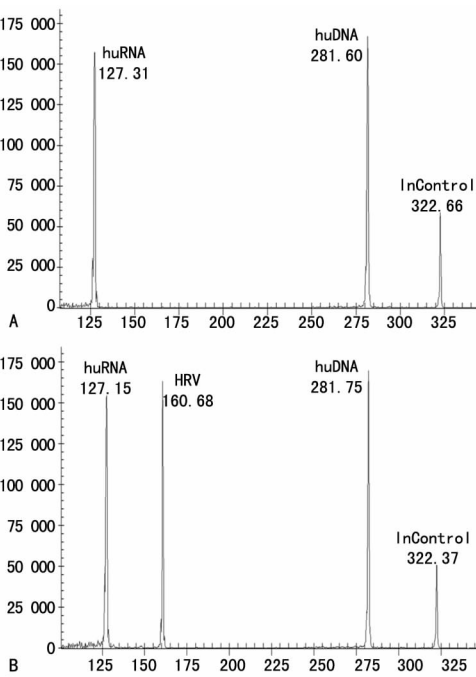
剂盒购于上海之江科技股份有限公司;乙型脑炎病毒、单纯疱疹病毒、风疹病毒、EB 病毒、人巨细胞病毒试剂盒购于广州华银医药科技有限公司;腮腺炎病毒、麻疹病毒试剂盒购于北京金豪制药股份有限公司。均严格按照说明书操作。

2 结 果

2.1 GeXP 多重呼吸道病毒检测结果 140 份患儿脑脊液标本中,共检测出 HRV 阳性标本 6 份,其他呼吸道病毒均未检出。GeXP 毛细管电泳结果见图 1。阴性标本电泳图中出现 3 个内质控峰,而 HRV 阳性标本中除外 3 个质控峰,在核酸片段大小为 160.68 nt 处出现特异的 HRV 阳性峰。

表 1 各病毒扩增核酸片段大小信息

目的基因/内参	片段长度(nt)
人 RNA 内参	127
甲型流感病毒	139
腺病毒	143
副流感病毒 1 型	151
人博卡病毒	156
HRV	160
人冠状病毒 1	182
乙型流感病毒	207
副流感病毒 3 型	213
副流感病毒 2 型	225
人偏肺病毒	236
呼吸道合胞病毒	246
人 DNA 内参	281
人冠状病毒 2	291
反应内参	322



注:A 为阴性标本检测结果;B 为 HRV 阳性标本检测结果;横坐标显示核酸片段大小(nt),纵坐标显示荧光信号强度。

图 1 GeXP 多重呼吸道检测结果

表 2 巢式 RT-PCR 扩增引物

靶点	引物序列(5′~3′)		片段大小(bp)
5′UTR	F out:	CAA GCA CTT CTG YWC	390
	R out:	CCC ACG GAC ACC CAA AGT AG	
	F in:	CGT TAY CCG CAA GRY GCC TAC	218
	R in:	TTA GCC RCA TTC AGG RGG	
VP4/VP2	F out:	CCG GCC CCT GAA TGY GGC TAA	660
	R out:	GCA TCI GGY ARY TTC CAC CAC CAN CC	
	F in:	ACC RAC TAC TTT GGG TGT CCG TG TCW	533
	R in:	GGH ARY TTC CAM CAC CAN CC	

注:F out 为外巢上游引物;R out 为外巢下游引物;F in 为内巢上游引物;R in 为内巢下游引物。

2.2 HRV 巢式 RT-PCR 扩增结果 对 6 份 GeXP 检测 HRV 阳性标本应用巢式 RT-PCR 扩增 HRV 5′UTR 区 218 bp 和 VP4/VP2 区 533 bp 的基因片段,其中 1 份标本在两个区域均扩增出阳性条带,4 份仅在 VP4/VP2 区扩增出阳性条带,1 份仅在 5′UTR 区扩增出阳性条带,扩增产物凝胶电泳结果如图 2 所示。

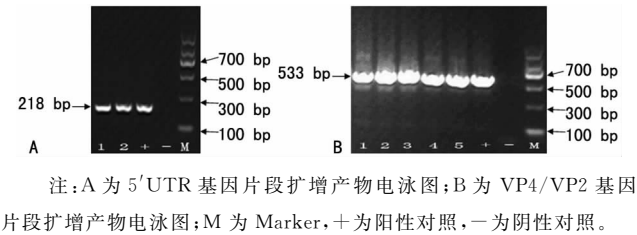


图 2 HRV 巢式 RT-PCR 扩增产物凝胶电泳图

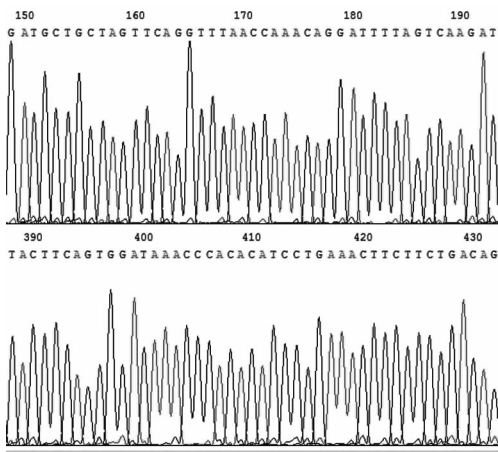


图 3 HRV 阳性株 VP4/VP2 区部分核酸片段测序结果

2.3 核酸序列测定和同源性比对结果 HRV 的 PCR 产物 VP4/VP2 区部分核酸片段测序结果如图 3 所示,所得序列经与 GenBank 中参考序列进行 BLAST 比对,结果 4 株为 HRV-C 型,其中 3 株与香港株 HQ444915 同源性为 95.8%~96.4%,1 株与香港株 HQ444822 同源性为 98.3%,而该株与其它 3 株 HRV-C 型的同源性为 74.3%~75.7%;另外 1 株为 HRV-A 型,与湖南长沙株 KF970861 同源性为 96.0%,1 株为 HRV-B 型,与澳大利亚株 KF499392 同源性为 99.0%。

2.4 脑炎病毒荧光定量 PCR 检测结果 对 HRV 阳性标本进行包括总肠道病毒、肠道病毒 71 型、柯萨奇病毒 A16、乙型

脑炎病毒、单纯疱疹病毒、风疹病毒、EB 病毒等 10 种常见脑炎病毒进行荧光定量 PCR 检测,结果 6 份标本均为阴性。

3 讨 论

病毒性脑炎是由各种病毒侵犯脑实质引起的炎症,常伴有脑功能紊乱。由于儿童的免疫系统和血脑屏障发育尚未成熟,病毒性脑炎好发于儿童。该病有可能损害中枢神经系统,预后不佳,病死率较高,部分存活者可有不同程度的神经系统后遗症。世界范围内已知可引起脑炎的病毒有 130 多种^[1],因为计划免疫接种的不断广泛和深入,常见的脑炎病毒种类不断发生变化,肠道病毒、疱疹病毒是目前我国儿童病毒性脑炎的最主要病原^[6]。随着更多的分子生物学技术被应用于病毒性脑炎的病原检测,有越来越多的呼吸道病毒也被证实与脑炎相关。Huang 等^[7]对 3 298 例咽拭子为腺病毒阳性的患儿进行临床资料分析时发现,109 例(3.3%)患儿合并有中枢神经系统症状,提示中枢系统功能障碍可能是腺病毒感染的严重并发症。有研究发现,部分流感患儿可合并急性脑病,遗留不同程度的神经系统后遗症^[8]。Sánchez-Torrent 等^[9]从 1 例 3 个月大婴儿的脑脊液中检测出甲型流感病毒 H1N1,证明该病毒与婴幼儿脑炎相关。Tison-Chambellan 等^[10]在对 1 例患有脑干脑炎的 7 岁男孩的脑脊液进行 PCR 分析中检出呼吸道合胞病毒,证实呼吸道合胞病毒与脑炎相关。为探讨儿童脑炎与呼吸道病毒的相关性,本文应用 GeXP 多重遗传分析系统对 140 份发热抽搐患儿脑脊液标本进行呼吸道病毒多重检测,共检出 6 份 HRV 阳性标本,进一步经巢式 RT-PCR 扩增及测序验证,其中 4 份为 HRV-C 型,1 份 HRV-A 型,1 份 HRV-B 型。6 份脑脊液标本经 10 种常见脑炎病毒荧光定量 PCR 检测,结果均为阴性。这 6 例患儿的平均年龄为 18.5 个月,其中 5 例年龄小于 3 岁,1 例 9 岁。本次研究提示 HRV 是引起儿童病毒性脑炎的病原之一,3 岁以下婴幼儿更容易罹患 HRV 脑炎。本研究 6 例 HRV 阳性病例仅有 3 例(50%)临床诊断为病毒性脑炎,提示临床上在无病原学依据的情况下易出现误诊漏诊。

HRV 不但是引起儿童上呼吸道感染的最常见病因,而且能够引起肺炎、细支气管炎和哮喘急性发作。HRV 目前已有血清型达 151 个,基因型分为 A 型、B 型和新近发现的 C 型,HRV-C 型感染的临床表现各地报道不同,香港和澳大利亚的研究主要表现为细支气管炎,喘息及哮喘加重,而来自美国的报道主要为流感样症状,我国学者的报道主要以急性上呼吸道感染和支气管肺炎为主^[11]。本次研究中 HRV 3 种基因型均

可引起儿童病毒性脑炎,但以 HRV-C 型为主,4 株 HRV-C 型的同源性为 74.3%~75.7%,存在较大的遗传变异性。

GenomeLabTM GeXP 多重基因表达遗传分析系统是一种全新的基因表达谱定量分析平台,它将多重 PCR 和毛细管电泳技术相结合,采用通用引物(上游通用引物标记荧光)和特异性嵌合引物相结合的方法,使嵌合引物和通用引物保持适当的比例,由通用引物引导整个体系的扩增,克服了各靶基因扩增效率不一致造成的扩增偏爱性,使反应体系中各模板的扩增效率趋于一致,有效减少多重 PCR 出现假阴性结果的概率,从而实现多重 PCR 产物定量检测的目的,同时通过毛细管电泳可以直接显示出产物片段长度及相应荧光信号值大小,直观判断检测结果。该系统不依赖于特殊反应载体,只需常规 RT-PCR 试剂、上游荧光标记通用引物和毛细管分离胶等常规试剂和消耗品,使检测成本大为降低。从核酸提取、逆转录反应、PCR 反应到毛细管电泳,整个检测过程可在 8 h 内完成。本次研究应用该系统对脑脊液标本进行 12 个常见呼吸道病毒筛查,检测到的 HRV 阳性标本经巢式 RT-PCR 及测序确证为 HRV 感染,提示 GeXP 多重基因表达遗传分析系统作为一种快速和高通量的检测手段,能够为病毒性脑炎的呼吸道病毒病原学研究提供有力支持。

参考文献

[1] Khetsuriani N, Holman RC, Anderson LJ. Burden of encephalitis-associated hospitalizations in the United States, 1988~1997[J]. Clin Infect Dis, 2002, 35(2): 175-182.

[2] Lewis HM, Parry JV, Parry RP, et al. Role of viruses in febrile convulsions[J]. Arch Dis Child, 1979, 54(12): 869-876.

[3] 胡秀梅,徐邦牢,杨银梅,等.多重基因表达分析系统在氨基糖苷类多重耐药基因检测中的应用[J].中华预防医学杂志,2011,45(2):181-183.

[4] 李瑾,毛乃颖,秦萌,等.GeXP 多重 PCR 技术同时检测 12 种常见呼吸道病毒[J].病毒学报,2011,27(6):526-532.

[5] 何玢,王环宇,张晨,等.8 种脑炎相关虫媒病毒 GeXP 检测方法的初步建立[J].病毒学报,2012,28(1):57-62.

[6] 陈伟,刘晓静,崔寰,等.病毒性脑炎患儿脑脊液病毒核酸检测及临床分析[J].中华疾病控制杂志,2009,13(3):279-283.

[7] Huang YC, Huang SL, Chen SP, et al. Adenovirus infection associated with central nervous system dysfunction in children[J]. J Clin Virol, 2013, 57(4): 300-304.

[8] Okumura A, Tsuji T, Kubota T, et al. Acute encephalopathy with 2009 pandemic flu; comparison with seasonal flu[J]. Brain Dev, 2012, 34(1): 13-19.

[9] Sánchez-Torrent L, Trivio-Rodriguez M, Suero-Toledano P, et al. Novel influenza A (H1N1) encephalitis in a 3-month-old infant[J]. Infection, 2010, 38(3): 227-229.

[10] Tison-Chambellan C, Cheuret E, Cances C, et al. Respiratory syncytial virus brainstem encephalitis in a 7-year-old boy[J]. Arch Pediatr, 2013, 20(6): 657-660.

[11] Jin Y, Yuan XH, Xie ZP, et al. Prevalence and clinical characterization of a newly identified human rhinovirus C species in children with acute respiratory tract infections[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(9): 2895-2900.

[12] 肖明盛,沈克.结直肠癌性肠梗阻 28 例外科治疗体会[J].检验医学与临床,2009,6(12):1023-1024.

[13] 林国乐,邱辉忠,肖毅,等.保护性造口在直肠癌低位前切除术中价值的前瞻性随机对照研究[J].中国现代手术学杂志,2013,17(1):5-9.

[14] 代全武,孙克新,罗芳,等.双管引流对直肠癌术后吻合口瘘的防治[J].中国医师进修杂志,2006,29(5):40-41.

[15] 雍铁山,罗满生,严太平,等.直肠癌术后吻合口漏 32 例治疗体会[J].实用临床医学,2009,10(9):39.

[16] 刘圣芳,刘新国.腹腔镜下直肠癌根治术后医院感染的临床分析及护理对策[J].检验医学与临床,2014,11(8):1030-1031.

[17] 彭 J, Lu J, Xu Y, et al. Standardized pelvic drainage of

[18] anastomotic leaks following anterior resection without diversion: a retrospective study[J]. Am J Surg, 2010, 199(6): 753-758.

[19] 肖明盛,沈克.结直肠癌性肠梗阻 28 例外科治疗体会[J].检验医学与临床,2009,6(12):1023-1024.

[20] 林国乐,邱辉忠,肖毅,等.保护性造口在直肠癌低位前切除术中价值的前瞻性随机对照研究[J].中国现代手术学杂志,2013,17(1):5-9.

[21] 代全武,孙克新,罗芳,等.双管引流对直肠癌术后吻合口瘘的防治[J].中国医师进修杂志,2006,29(5):40-41.

[22] 雍铁山,罗满生,严太平,等.直肠癌术后吻合口漏 32 例治疗体会[J].实用临床医学,2009,10(9):39.

[23] 刘圣芳,刘新国.腹腔镜下直肠癌根治术后医院感染的临床分析及护理对策[J].检验医学与临床,2014,11(8):1030-1031.

(收稿日期:2015-01-25 修回日期:2015-02-20)

(上接第 1827 页)

[1] Okoshi K, Masano Y, Hasegawa S, et al. Efficacy of transanal drainage for anastomotic leakage after laparoscopic low anterior resection of the rectum[J]. Asian J Endosc Surg, 2013, 6(2): 90-95.

[2] Blumetti J, Chaudhry V, Prasad L, et al. Delayed transanal repair of persistent coloanal anastomotic leak in diverted patients after resection for rectal cancer[J]. Colorectal Dis, 2012, 14(10): 1238-1241.

[3] Buckley JC. Complications after radical prostatectomy: anastomotic stricture and rectourethral fistula[J]. Curr Opin Urol, 2011, 21(6): 461-464.

[4] Shin US, Kim CW, Yu CS, et al. Delayed anastomotic leakage following sphincter-preserving surgery for rectal cancer[J]. Int J Colorectal Dis, 2010, 25(7): 843-849.

[5] Peng J, Lu J, Xu Y, et al. Standardized pelvic drainage of

[6] anastomotic leaks following anterior resection without diversion: a retrospective study[J]. Am J Surg, 2010, 199(6): 753-758.

[7] 肖明盛,沈克.结直肠癌性肠梗阻 28 例外科治疗体会[J].检验医学与临床,2009,6(12):1023-1024.

[8] 林国乐,邱辉忠,肖毅,等.保护性造口在直肠癌低位前切除术中价值的前瞻性随机对照研究[J].中国现代手术学杂志,2013,17(1):5-9.

[9] 代全武,孙克新,罗芳,等.双管引流对直肠癌术后吻合口瘘的防治[J].中国医师进修杂志,2006,29(5):40-41.

[10] 雍铁山,罗满生,严太平,等.直肠癌术后吻合口漏 32 例治疗体会[J].实用临床医学,2009,10(9):39.

[11] 刘圣芳,刘新国.腹腔镜下直肠癌根治术后医院感染的临床分析及护理对策[J].检验医学与临床,2014,11(8):1030-1031.

(收稿日期:2015-01-25 修回日期:2015-03-25)