

PCR 法在疱疹病毒性脑炎诊断及疗效观察中的应用^①

卓礼梅^{1,②} 潘文彤¹ 邢诒刚¹ 陈火胜¹

(1 中山医科大学微生物学教研室; 广州, 510089 2 孙逸仙纪念医院神经内科)

提 要 选择疱疹病毒科病毒 DNA 多聚酶基因高保守区中的一对引物, 一次 PCR 可同时扩增疱疹病毒科的 4 种病毒 [单纯疱疹病毒 I 型 (HSV1)、单纯疱疹病毒 II 型 (HSV2)、EB 病毒 (EBV)、及巨细胞病毒 (CMV)] 相应的 DNA 片段。根据扩增产物分子的大小及对扩增产物酶切分析, 可将标本中的 4 种病毒准确分型。用该法检测临床疑为病毒脑炎患者和其他中枢神经系统疾病患者 (对照组) 的脑脊液 (CSF), 脑炎组 CSF 阳性率 30% (9/30), 对照组 CSF 阳性率 6.7% (2/30); 其中 8 例为 HSV1 阳性, 2 例为 CMV 阳性, 1 例为 HSV2 阳性。2 例病毒脑炎患者经用无环鸟苷抗病毒治疗 7~10 d 后其 CSF 中的 HSV1 DNA 由阳转阴。由此说明 PCR 法不仅可早期诊断疱疹病毒性脑炎, 还可显示抗病毒药物的疗效。

主题词 疱疹, 单纯/诊断; 脑膜炎, 病毒性/诊断; 聚合酶链反应

中图分类号 R373.31

疱疹病毒科的病毒中, EB 病毒 (EBV) 和巨细胞病毒 (CMV) 常引起免疫抑制人群的中枢神经系统感染; 单纯疱疹病毒 (HSV, 包括 HSV1、HSV2) 则常引起急性、散发性、局灶性脑炎 (HSE), 未经治疗死亡率高达 70%^[1]。疱疹病毒性脑炎的疗效关键在于早期诊断, PCR 能对前病毒或潜伏期低复制的病毒特异性 DNA 片段进行扩增检测, 我们选择疱疹病毒科病毒 DNA 多聚酶基因区中的一对引物, 可同时扩增疱疹病毒科的 4 种病毒 (HSV1、HSV2、EBV、CMV) 相应的 DNA 片段。根据扩增产物片段分子的大小不同及对扩增产物用 *Sma* I 内切酶酶切分析, 可将标本中的 4 种病毒准确分型。

1 材料与方 法

1.1 标 本

本校一、二附属医院儿科、内科送检的脑

脊液 (CSF) 标本 60 份。其中 30 份为临床疑为“病毒性脑炎”患者的 CSF, 30 份为其他中枢神经系统疾患的患者 CSF (做对照组), 患者年龄 2~62 岁, 发病 3~30 d 内收集 CSF。

1.2 病毒标准株及细胞株

HSV1 (F 株)、HSV2 (G 株)、CMV (AD169)、EBV (B95-8) 病毒标准株及人羊膜传代细胞、乙型脑炎病毒、结核杆菌、脑膜炎双球菌、新型隐球菌均由本室保存。

1.3 细胞培养

将待检 CSF 分 4 个稀释度 (原液、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3}) 接种在人羊膜传代细胞单层上 (24 孔板), HSV1 (F 株)、HSV2 (G 株) 作阳性对照, 37℃ 培养。阳性对照在 48~72 h 内出现 CPE。

1.4 病毒 DNA 提取

0.3 ml CSF 加等量裂解液 (0.2 mol/L Tris-HCl pH 7.5; 25 mmol/L EDTA; 0.3 mol/L NaCl; 20 g/L SDS; 400 mg/L 蛋白

① 本校科研基金资助课题; ② 第一作者, 1965 年出生, 女, 讲师

酶 K),混匀置 56℃水浴 30~60 min,加 0.6 ml 酚:氯仿:异戊醇混匀,15 000 r/min 离心 10 min,取上层水相加 2 倍体积无水乙醇沉淀(-20℃,2 h),15 000 r/min 离心 10 min,弃乙醇,抽干,DNA 沉淀溶于 20 μ l 无菌双蒸水中,4℃保存待用。

1.5 PCR 扩增

引物: P1, 5'-CGACTTTGCCAGCCTGTACC-3'; P2, 5'-AGTCCGTGTCCC CGTAGATG-3'。扩增的序列位于疱疹病毒科病毒 DNA 多聚酶基因区,HSV1 及 HSV2 的扩增片段为 518 bp,EBV 的扩增片段为 524 bp,CMV 的扩增片段为 589 bp。

PCR 扩增试剂盒购自复旦大学科技开发公司。PCR 反应体积 50 μ l。其中 5 \times buffer 10 μ l, dNTP (2 mmol/L) 5 μ l, 模板 DNA 10 μ l, 上、下游引物各 1 μ l (0.1 g/L), 双蒸水 (ddH₂O) 22 μ l, FD DNA 多聚酶 0.5~1.0 U。双温循环:93℃ 45 s, 60℃ 90 s, 30 个循环。扩增完毕,取 10 μ l 扩增产物用琼脂糖凝胶电泳观察结果。

1.6 PCR 扩增产物酶切分型

用计算机分析扩增片段的序列,可用 *Sma* I 内切酶对扩增产物进行酶切分型。取 PCR 扩增产物 10 μ l, 加 *Sma* I 内切酶 10 U (12 \times 10⁻⁶ U/L), 10 \times Buffer 2 μ l, H₂O 补至 20 μ l, 置 37℃水浴 1~2 h。酶切产物用琼脂糖凝胶电泳观察。

2 结 果

2.1 敏感性和特异性

2.1.1 敏感性 提取 HSV1 (F 株) 的病毒 DNA (紫外分光光度计定量), 用不同稀释度的 DNA 作为模板进行 PCR 扩增, 结果表明该法可检出 10 fg HSV1-DNA。

2.1.2 特异性 用 HSV1 (F 株)、HSV2 (G 株)、CMV (AD169)、EBV (B95.8) 病毒标准株及乙型脑炎病毒、结核杆菌、脑膜炎双球菌、新型隐球菌的核酸作模板进行 PCR 或

RT-PCR, 结果仅疱疹病毒科的 4 种病毒 DNA 有特异性扩增, 其余病原体均为阴性。表明该 PCR 法的特异性好。

2.2 病毒脑炎组与对照组比较

PCR 法检测 30 例“病毒性脑炎”患者 CSF, 阳性率 30% (9/30); PCR 阳性扩增产物酶切后发现其中 7 例为 HSV1 感染, 1 例为 HSV2 感染, 1 例为 CMV 感染。对照组患者 30 份 CSF 中, PCR 阳性率为 6.7% (2/30), 其中 1 例为 HSV1 感染, 1 例为 CMV 感染。2 组 PCR 检测结果比较, $P < 0.05$, 表明 2 组检测结果差异有显著性意义 (图 1, 图 2)。

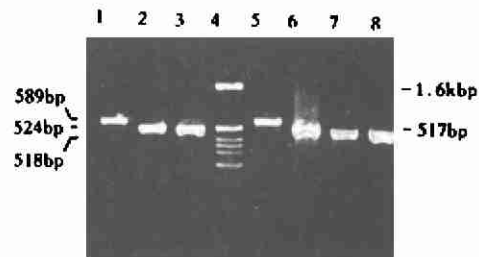


图1 PCR法扩增疱疹病毒的结果

1~4:分别为 HSV1、HSV2、EBV、CMV 病毒标准株; 5: PBR322/*Hinf* I; 6~8: 患者 CSF 标本

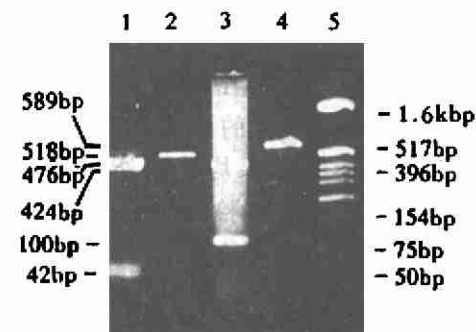


图2 PCR扩增产物经 *Sma* I 内切酶酶切分型

1~4:分别为 HSV1、HSV2、EBV、CMV 的 PCR 产物酶切结果; 5: PBR322/*Hinf* I

2.3 2组患者 CSF 细胞培养

20份病毒脑炎组患者的 CSF 及 20份对照组患者 CSF 进行细胞培养 (用人羊膜代

细胞)以分离单纯疱疹病毒,经3代盲传(每代5~7d)后结果均为阴性。

3 讨 论

本研究结果表明,在广州地区的病毒性脑炎患者中疱疹病毒科的病毒感染占有一定的比例(30%);其中HSV1感染率相对较高(7/9),与Rozenberg等报道的HSV1感染率为82%相一致^[2]。2例CMV感染者,年龄均在60岁左右,其中对照组的1例临床诊断为脊髓炎,患者住院6个月病情尚未稳定,后发展到昏迷,取CSF检查有CMV感染。进一步表明免疫抑制或免疫力低下人群中易发生CMV的感染。

2例疑为“病毒性脑炎”的患者,分别于发病后4与6d其CSF经PCR检测确诊为HSV1感染,即用无环鸟苷做针对性治疗。分别于用药后7d及10d再取CSF做PCR检测,结果均为阴性,患者的症状亦明显好转,而3例其它神经系统疾患的双份CSF作PCR结果均为阴性。由此可见,PCR法不仅适合于疱疹病毒性脑炎的实验诊断,而且还可能显示抗病毒药物的疗效。

为了解PCR法的检测效果,病人CSF用PCR法检测的同时亦进行组织培养,结果表明组织培养费时且检出率极低,而PCR法最早可在发病第3天的病人CSF中检出HSV1 DNA,这些结果均与国外的研究相似^[3~9]。结果表明PCR检测敏感性高,特异性好;由于仅用一对引物可同时检测4种病毒,而具有简单、经济、省时的特点。由于PCR法可以在病毒感染的早期进行检测,将会对疱疹病毒性脑炎的早期诊疗起重要作用。

参 考 文 献

- 1 Whitley RJ. Viral encephalitis. *N Engl J Med*, 1990, 323:242
- 2 Rozenberg F, Lebon P. Amplification and characterization of herpesvirus DNA in cerebrospinal fluid from patients with acute encephalitis. *J Clin Microbiol*, 1991, 29(11):2412
- 3 Nahmias AJ, Whitley RJ, Visintine AN, *et al.* Herpes simplex virus encephalitis: laboratory evaluations and their diagnostic significance. *J Infect Dis*, 1982, 145:829
- 4 Kahlon J, Chatterjee S, Lakeman FD, *et al.* Detection of antibodies to herpes simplex virus in the cerebrospinal fluid of patients with herpes simplex encephalitis. *J Infect Dis*, 1987, 155:38
- 5 Klapper PE, Cleator GM, Dennett C, *et al.* Diagnosis of herpes encephalitis via Southern blotting of cerebrospinal fluid DNA amplified by polymerase chain reaction. *J Med Virol*, 1990, 32:261
- 6 Powell KF, Anderson NE, Frith RW, *et al.* Non-invasive diagnosis of herpes simplex encephalitis. *Lancet*, 1990, 335(8687):357
- 7 Rowley AH, Whitley RJ, Lakeman FD, *et al.* Rapid detection of herpes simplex virus DNA in cerebrospinal fluid of patients with herpes simplex encephalitis. *Lancet*, 1990, 335(8687):440
- 8 Boerman RH, Arnoldus EPJ, Raap AK, *et al.* Polymerase chain reaction and viral culture techniques to detect HSV in small volumes of cerebrospinal fluid: An experimental mouse encephalitis study. *J Virol Methods*, 1989, 25(2):189
- 9 Aurclius E, Johansson B, Skoldenberg B, *et al.* Rapid diagnosis of herpes simplex encephalitis by nested polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid. *Lancet*, 1991, 337(8735):189

(1994-11-07收稿 1995-12-30修回)

APPLICATION OF PCR IN THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OBSERVATION OF HERPESVIRUS ENCEPHALITIS

Zhuo Limei¹ Pan Wentong¹ Xing Yigang² Chen Huosheng¹

(1 Department of Microbiology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089

2 Department of Neurology, Sun Yat-sen Memorial Hospital)

A single pair of oligonucleotide primers selected within a highly conserved region of the DNA polymerase gene of the herpesviruses was designed to amplify related viral genomes, i. e., herpes simplex virus type 1(HSV1), herpes simplex virus type 2(HSV2), Epstein-Barr virus (EBV) and cytomegalovirus (CMV), by the polymerase chain reaction. According to the molecular weight of the amplified products and a simple restriction enzyme cleavage, analysis of these amplified products accurate characterization of the 4 herpesvirus types were obtained. The assay was applied to cerebrospinal fluid(CSF) recovered from 30 patients with acute encephalitis and 30 patients with other central nervous system infections (as controls). The positive detection rate of CSF from encephalitis group was 30%, the positive rate of control group was 6.7%. 8 samples of CSF were positive for HSV1-DNA, 2 for CMV-DNA and 1 for HSV2-DNA. 7~10 days after antiviral treatment with acyclovir HSV1-DNA in the CSF from two patients with encephalitis was turned negative. The present results indicate that PCR is a valuable tool for the early diagnosis of herpesvirus encephalitis and also, an efficient method for testing the antiviral therapy.

Subject headings herpes, simplex/diagnosis; meningitis, viral/diagnosis; polymerase chain reaction

·新成果·

常年性变应性鼻炎(PAR)病理学和治疗学系列研究

课题负责 李 源

(中山医科大学附属第三医院耳鼻喉科,广州,510630)

采用超微结构、神经组化技术及动物实验和临床治疗观察,对常年性变应性鼻炎进行了一系列研究。对常年性变应性鼻炎鼻粘膜的超微结构病理特征、副交感纤维分布和胆碱能神经节以及鼻局部减敏治疗的临床疗效和鼻粘膜病理学改善进行了观察和描述,提出某些鼻内常用药物长期应用对鼻粘膜的毒性作用及选用意见。该研究对进一步探讨 PAR 发病机理、病理生理学以及临床治疗有较大指导意义。1994年获国家教委科技进步三等奖。

(陈丽芳)