

病毒性脑炎患者脑脊液和血清配对标本疱疹病毒和肠道病毒的检出率比较分析

申辛欣¹ 白雪丁² 黎赛³ 阮洋³ 易苏武³ 肖政辉³ 马学军¹

¹中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所,北京 102206;²唐山工人医院 063000;³湖南省儿童医院,长沙 410007

通信作者:马学军,Email: maxj@ivdc.chinacdc.cn; 电话:010-58900810 肖政辉,Email: Xiaozhenghui888@163.com, 电话:0731-85600901

申辛欣和白雪丁对本文有同等贡献

【摘要】 目的 比较病毒性脑炎患者脑脊液、血清配对标本中疱疹病毒属病毒,肠道病毒的检出率。**方法** 采集 2017 年 12 月至 2018 年 2 月湖南省长沙市儿童医院诊断疑似病毒性脑膜炎患儿 109 例脑脊液、血清配对标本,采用一步法巢式实时荧光定量 RT-PCR 和实时荧光定量 PCR 法分别进行肠道病毒和疱疹病毒属病毒检测,分析不同标本类型病毒检出率。运用 SPSS17.0 对检测结果进行统计分析。**结果** 109 例患者的配对标本人疱疹病毒 6 型(human herpes virus type 6, HHV6)、单纯疱疹病毒(Herpes simplex virus, HSV)、EB 病毒(Epstein-Barr virus, EBV)、巨细胞病毒(Cytomegalovirus, CMV)、肠道病毒(Enterovirus group A type 71, EV-A71)血清阳性率分别为 7.34%、4.59%、7.34%、9.17%、10.09%,脑脊液阳性率分别为 5.50%、2.75%、0.50%、6.42%。结果显示两种类型标本病毒检测结果的差异有统计学意义($P < 0.05$)。在脑脊液和血液样本中,可检出 EV-A71 病毒阳性的最长时间分别为发病后 2 d 和 7 d,可检出 CMV 病毒阳性的最长时间分别为发病后 3 d 和 26 d,可检出 HHV6 病毒阳性的最长时间分别为发病后 7 d 和 8 d,可检出 HSV1 病毒阳性的最长时间均为发病后 12 d;在血清样本中,可检出 EBV 病毒阳性最长时间为发病后 10 d,而脑脊液样本在发病 10 d 内均无法检出该病毒。**结论** EV-A71 是导致该地区病毒性脑炎的最主要的病原体,血清标本病毒总体阳性率高于脑脊液标本。血清内脑炎相关的大多数病毒的存活时间较长于脑脊液中。提示对于病毒性脑炎患儿病原检测,时间具有重要意义,可根据发病时间合理选择标本类型进行测定。

【关键词】 病毒性脑炎;肠道病毒;疱疹病毒属

基金项目:国家传染病重大专项(2017ZX10302301-004, 2017ZX100101, 2017ZX10104001);儿童急救医学湖南省重点实验室(2018TP1028)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2019.02.002

Comparison of detection rates of herpes virus and enterovirus in paired cerebrospinal fluid and serum specimens of patients with viral encephalitis

Shen Xinxin¹, Bai Xueding², Li Sai³, Ruan Yang³, Yi Suwu³, Xiao Zhenghui³, Ma Xuejun¹

¹National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China ²Tangshan Gongren Hospital, Tangshan 063000, China; ³Hunan Children's Hospital, Changsha 410007, China

Shen Xinxin and Bai Xueding contributed equally to the article

Corresponding author: Ma Xuejun, Email: maxj@ivdc.chinacdc.cn, Tel:0086-10-58900810; Xiao Zhenghui, Email: Xiaozhenghui888@163.com, Tel:0086-731-85600901

【Abstract】 Objective To compare the detection rate of herpes virus and enterovirus (EV) in paired cerebrospinal fluid and serum samples of patients with viral encephalitis. **Methods** A total of 109 paired cerebrospinal fluid and serum specimens were collected from patients who were clinically diagnosed with suspected viral meningitis in Children's Hospital of Hunan from December 2017 to February 2018. One-step nested real-time fluorescence quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and real-time fluorescence quantitative PCR were used to detect enterovirus and herpes virus respectively and

the detection rates of different virus and sample types were analyzed. SPSS 17.0 was used for statistical analysis of the test result. **Results** Among the 109 pairs of specimens, the positive rates of human herpes virus type 6 (HHV6), herpes simplex virus-1 (HSV1), Epstein-Barr virus (EBV), cytomegalovirus (CMV) and enterovirus group A type 71 (EV-A71) in serum were 7.34%, 4.59%, 7.34%, 9.17% and 10.09%, respectively, and in cerebrospinal fluid were 5.50%, 2.75%, 0, 5.50%, and 6.42%, respectively. The result showed that there were statistically significant differences between the two types of specimens for herpes virus and enterovirus ($P < 0.05$). In cerebrospinal fluid and serum samples, the longest time for EV-A71 positive detection was 2 and 7 days after onset, respectively; the longest time for CMV positive detection was 3 and 26 days after onset, respectively; the longest time for HHV6 positive detection was 7 and 8 days after onset, respectively; the longest time for HSV1 positive detection was both 12 days after the onset; in serum samples, the longest time for EBV positive detection was 10 days after onset, but in cerebrospinal fluid, no EBV was detected within 10 days of onset. **Conclusions** EV-A71 is the most prevalent pathogen causing viral encephalitis in human, the overall positive rate of virus in serum samples was higher than that in cerebrospinal fluid samples. Virus stays longer in serum than in cerebrospinal fluid. It is suggested that the time is of great significance for the pathogen detection of children with viral encephalitis, the specimen type can be selected reasonably according to the time of onset.

[Key words] Viral encephalitis; Enterovirus; Herpes virus.

Fund programs: China Mega-Project for Infectious Disease (2017ZX10302301-004, 2017ZX100101, 2017ZX10104001); Key Laboratory of Children's Emergency Medicine of Hunan Province (2018TP1028)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2019.02.002

病毒性脑炎是一组由各种病毒感染引起的可累及脑实质和软脑膜的弥漫性炎症综合征,主要表现为发热、头痛、呕吐和脑膜刺激征等临床症状。是中枢神经系统最常见的感染性疾病。根据文献报道,病毒性脑炎常见病原主要包括:肠道病毒(enterovirus, EV),乙型脑炎病毒(japanese encephalitis virus, JEV),腮腺炎病毒(mumps virus, MuV),单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV),水痘-带状疱疹病毒(varicella zoster virus, VZV),EB病毒(Epstein-Barr virus, EBV),人疱疹病毒 6 型(human herpes virus type 6, HHV6),巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)等^[1-3]。临床上对于病毒性脑炎的诊断方式主要依靠询问病史、临床症状、脑脊液检查及影像学检查等,而其中脑脊液检查结果尤为重要。由于脑脊液采集为有创手段且较为困难,对患儿伤害较大,所以探讨不同标本类型的病原检出率,对及时发现确诊患儿,减轻患儿痛苦有重要意义。经过查阅文献发现,国内对于手足口病不同标本类型病原检出的比较分析有大量报道,研究较为成熟,可以指导临床在早期通过采集高质量的标本,以提高阳性检出率,对明确病原体以及进一步救治有重要意义^[4-5]。而目前国内对于病毒性脑炎患者的配对标本病毒检出率比较鲜有报道,而由于脑脊液检查对于疾病诊断的重要性及脑脊液标本自身采集的弊端,故探索是否有可替代的标本类型很有临床研究价值。对于探讨不同类型标本病原体阳性检出率情况的分析国内大多采用完全随机分析方法,

这使得实验均衡性较差,误差较大,效率较低。而本实验利用实验室自建的一步法巢式实时荧光定量 PCR 技术结合实时荧光定量 PCR 技术检测病毒性脑炎患儿脑脊液,血清中的病毒核酸,同时采用自身配对设计方法,可以提高研究结果的准确性,进一步了解不同类型标本病原体阳性检出率的差异,为临床诊断提供依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 以 2017 年 12 月—2018 年 2 月湖南省长沙市儿童医院诊断疑似病毒性脑炎的住院患儿为研究对象。疾病诊断标准参照《小儿神经系统疾病基础与临床》第 2 版^[6]。根据病史及临床检查结果排除细菌性脑膜炎、结核性脑膜炎、颅内占位性疾病、脑血管病、全身感染性脑病等。共选取了 109 例满足条件的患儿,患儿年龄 1 月龄~13 岁,男性 54 例,女性 55 例,采集其血清及脑脊液配对标本。两类型样本均在发病后 1~26 d 内采集。

1.2 样本处理 将采集的患儿的脑脊液,血清标本分装至 1.5 ml 螺口冻存管中,于 24 h 内置于 -80 °C 低温冰箱保存。所有标本统一干冰运送至中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所中心实验室。样本送达实验室后分别取 140 μl、200 μl 用于核酸提取,其余冻存 -80 °C 低温冰箱。

1.3 仪器与材料 核酸提取采用天隆科技公司 ZTLJB-Y64 核酸提取试剂盒, QIAamp RNA 病毒核酸提取试剂盒及天隆科技公司 NP968-C 核酸提取

表 1 病毒性脑炎患者血清和脑脊液配对标本病毒检出率

Tab.1 Virus detection rate of serum and cerebrospinal fluid matched specimens in patients with viral encephalitis

| 标本类型 | 病毒检出率[%(阳性数/总例数)] | | | | |
|------|-------------------|-------------|-------------|--------------|---------------|
| | HHV6 | HSV1 | EBV | CMV | EV-A71 |
| 脑脊液 | 5.50(6/109) | 2.75(3/109) | 0.00(0/109) | 5.50(6/109) | 6.42(7/109) |
| 血清 | 7.34(8/109) | 4.59(5/109) | 7.34(8/109) | 9.17(10/109) | 10.09(11/109) |

仪。实时荧光定量 PCR 采用商业化试剂盒 Seegene Meningitism ACE Decetion 及 Bio-rad 公司的 CFX96 荧光定量 PCR 检测系统。q-PCR 反应体系配置与加样全部使用 Beckman coulter 公司的 BiomeKFX 实验室全自动工作站。

1.4 实验方法

1.4.1 病毒核酸提取:取每份标本 140 μ l、200 μ l 分别采用 QIAamp RNA 病毒核酸提取试剂盒,天隆公司试剂盒按说明书操作抽提病毒核酸。

1.4.2 病原鉴定:标本提取核酸后,Quantiative real time polymerase chain reaction, q-PCR 所用的检测方法参考已有的研究^[7],包括引物,探针以及反应条件,利用实验室全自动工作站结合实时荧光定量 PCR 检测系统对疱疹病毒属病毒进行检测,根据说明书完成自动化实验设计和操作程序编写。一步法巢式实时荧光定量 RT-PCR 参照本实验室自建方法对 EV 进行检测^[8]。

1.5 统计学方法 用 SPSS17.0 软件对检测结果进行统计分析,两样本率的比较用配对卡方检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脑脊液与血清配对标本病毒阳性检出率 109 例疑似病毒性脑炎病例中,脑脊液标本中 22 例(20.18%) 检出病毒阳性,其中 HHV6 6 例(5.50%),HSV1 3 例(2.75%),CMV6 例(5.50%),EV71 7 例(6.42%),EBV 未检出;血清标本中 42 例(38.53%) 检出病毒阳性,其中 HHV6 8 例(7.34%),HSV1 5 例(4.59%),EBV8 例(7.34%),CMV10 例(9.17%),EV71 11 例(10.09%)。对于疱疹病毒属和肠道病毒,血清中的病毒检出率均高于脑脊液。见表 1。

2.2 脑脊液、血清配对标本病毒检测结果 109 例患者配对脑脊液和血清标本,疱疹病毒属病毒和肠道病毒属病毒同时检出阳性共 9 例,同时检测为阴性共 54 例,脑脊液标本检出为阳性而血清标本检出为阴性共 13 例,其中 HHV6 病毒 3 例,EV71 病毒 3

例,HSV1 病毒 3 例,CMV 病毒 4 例;血清标本检出为阳性而脑脊液标本检出为阴性共 33 例,其中 HHV6 病毒 5 例,HSV1 病毒 5 例,EBV 病毒 8 例,CMV 病毒 8 例,EV71 病毒 7 例。经统计分析,两种类型标本对病毒检出率差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 病毒性脑炎患者脑脊液和血清配对标本检测结果比较

Tab.2 Comparison of cerebrospinal fluid and serum samples

from patients with viral encephalitis

| 标本类型 | 脑脊液 | | 合计(例) | |
|-------|-------|-------|-------|----|
| | 阳性(例) | 阴性(例) | | |
| 血清 | 阳性(例) | 9 | 33 | 42 |
| | 阴性(例) | 13 | 54 | 67 |
| 合计(例) | 22 | 87 | 109 | |

2.3 两类型样本病毒检出时间比较 在脑脊液和血液样本中,可检出 EV71 病毒阳性的最长时间分别为发病后 2 d 和 7 d,可检出 CMV 病毒阳性的最长时间分别为发病后 3 d 和 26 d,血清中 EV71 和 CMV 存活时间较脑脊液中长;在脑脊液和血液样本中,可检出 HHV6 病毒阳性的最长时间分别为发病后 7 d 和 8 d,可检出 HSV1 病毒阳性的最长时间均为发病后 12 d,血清和脑脊液样本中 HHV6 和 HSV1 存活时间大致相同;在血清样本中,可检出 EBV 病毒阳性最长时间为发病后 10 d,而脑脊液样本在发病 10 d 内均无法检出该病毒。

3 讨论

病毒性脑炎是儿童最常见的中枢神经系统感染性疾病之一,病死率高,存活者易留有不同程度的后遗症,其病因复杂,可由 100 多种病毒感染所致,且由不同病原引起的脑炎,其治疗,愈后也常常不同^[9]。根据文献报道^[10],EV 目前是世界范围内引起神经系统感染最常见的病毒类型,而 EV-A71 是 EV 家族较常见成员,近年在我国广泛流行,主要引起手足口病暴发流行,也有一些患者直接引起病毒性脑炎,不发生手足口病。本研究血清中 EV-A71 核酸检测阳性病例 11 例,检测阳性率为 10.09%,占血清病毒阳性病例的 26.19%;脑脊液中 EV-A71 核

酸检测阳性病例 7 例,检测阳性率为 6.42%,占脑脊液病毒阳性病例的 31.81%。均高于其他疱疹属病毒检出率。白永生等^[11]经 PCR 检测 118 例病毒性脑炎患者脑脊液,其中 EV-A71 检测阳性率 18.6%,占 EV 阳性病例的 52.3%;孙东等^[12]从西京医院收集的 35 例 EV 所致脑炎患者脑脊液中经过荧光定量 PCR 检测,发现 EV-A71 病毒阳性 18 例,阳性率超过 50%;本研究结果与上述研究结果一致,可以提示湖南长沙地区的主要导致病毒性脑炎的病原体为 EV-A71。由于本研究对于 EV-A71 的鉴定采用本实验室自建一步法巢式实时荧光定量 RT-PCR 方法,经大量临床样本验证,此方法灵敏度较实时荧光定量 PCR 高 10 倍,所以也有可能是方法学原因导致 EV-A71 在血清和脑脊液中检出率均高于其他病毒。有待今后增加样本量进行进一步验证。

人类疱疹病毒有 8 种,研究表明,疱疹病毒也是儿童病毒性脑炎较常见病原^[13]。本研究在血清中共检测到 4 种疱疹病毒,脑脊液中检测到 3 种疱疹病毒,其中血清中 CMV 核酸检测阳性病例 10 例,检测阳性率为 9.17%,占血清疱疹病毒阳性病例的 32.26%;高于其他疱疹病毒。脑脊液中 CMV 核酸检测阳性病例 6 例,检测阳性率为 5.50%,占脑脊液疱疹病毒阳性病例的 40%,与 HHV6 相同,高于其他疱疹病毒。有报道称 CMV 在体内广泛潜伏存在,在患病时机体抵抗力下降,免疫功能出现紊乱,在体内潜伏的 CMV 被激活,经血液循环入侵脑组织,造成中枢神经损伤^[14]。以至于血清和脑脊液的 CMV 核酸被检出,且阳性率较高。本实验由于样本量较少,不足以充分说明该情况,所以需要进行大量临床样本加以验证。

本研究对于不同标本类型配对样本进行统计分析后,可以得出两种样本类型的病毒检出率有差异,血清中病毒检出率较高于脑脊液。对于配对样本结果比较中显示的血清和脑脊液检测结果不一致情况,目前尚无法解释其机制,可能与个体差异有关,在身体不同部位的样本中病毒复制情况不同。此外,两类型标本病毒检出时间比较结果显示,血液标本中 EV-A71 和 CMV 病毒最长存活时间分别为发病后 7 d 和 26 d,均高于脑脊液标本中该两种病毒最长存活时间的发病后 2 d 和 3 d;血液标本和脑脊液标本中 HHV6 病毒和 HSV1 病毒存活时间大致相同;在血清样本中,EBV 病毒最长存活时间为发病后 10 d,而脑脊液样本在发病 10 d 内均无法检出该

病毒。病毒在脑脊液中存活时间较短有可能是病毒一过性入脑或是病毒并未直接入脑,而是通过引起机体免疫反应导致脑膜病变。以上结果可以进一步提示临床,在病毒性脑炎病原学检测时,时间具有重要意义,可根据发病时间合理选择标本类型进行测定。由于本研究条件限制,并未能采集更多临床标本,所以此结论有待日后进一步研究证明。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 申辛欣:论文撰写、实验操作;白雪丁:实验操作;黎赛:实验操作、病例收集;阮洋、易苏武、肖政辉:病例收集;马学军:研究设计、指导、论文修改、经费支持

参考文献

- [1] 潘晓玲,梁国栋.病毒性脑炎[J].中华实验和临床病毒学志,2006,20(3):288-291. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2006.03.029.
- [2] 卢囡囡,李红,赵生仓,等.青海省高原地区致儿童病毒性脑炎肠道病毒监测结果分析[J].中国病原生物学杂志,2017,12(10):931-938. DOI:10.13350/j.cjpb.171002.
- [3] Granerod J, Crowcroft NS. The epidemiology of acute encephalitis [J]. *Neuropsychol Rehabil*, 2007, 17(4-5):406-428. DOI: 10.1080/09602010600989620.
- [4] 李颀,居丽雯,蒋露芳,等.不同病程手足口病患者咽拭、肛拭配对标本肠道病毒检出率的比较[J].中华传染病杂志,2013,31(3):170-172. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1000-6680.013.03.008.
- [5] 陈荣凤,龙虎,刘昕,等.桂林市手足口病不同标本类型病原阳性检出率比较[J].实用预防医学,2014,21(5):519-521. DOI:10.3969/j.issn.1006-3110.2014.05.003.
- [6] 吴希茹,林庆.小儿神经系统疾病基础与临床(第2版)[M].人民卫生出版社,2009:204.
- [7] 于盼辉,王佑,李静洁,等.2015年—2016年石家庄地区儿童病毒性脑炎病原学研究[J].病毒学报,2017,33(2):181-185. DOI:10.13242/j.cnki.bingduxuebao.003119.
- [8] Shen Xx, Qiu FZ, Zhao HL, et al. A novel and highly sensitive real-time nested RT-PCR assay in a single closed tube for detection of enterovirus [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2018,90(3):181-185. DOI:10.1016/j.diagmicrobio.2017.11.015.
- [9] Hinson VK, Tyor WR. Update on viral encephalitis [J]. *Curr Opin Neurol*, 2001,14(3):369-374.
- [10] 陈伟,刘晓静,崔宸,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. DOI:CNKI;SUN;JBKZ.0.2009-03-027.
- [11] 白永生,郭林池,杨安宁,等.病毒性脑炎患者脑脊液肠道病毒和 EV-A71 检测与分析[J].宁夏医学杂志,2014,36(9):784-786. DOI:10.13621/j.1001-5949.2014.09.0784.
- [12] 孙东.液相芯片技术在病毒性脑炎诊断中的应用研究[D].西安:第四军医大学,2012.
- [13] 吕有道.儿童病毒性脑炎 124 例临床及病毒病原学分析[J].临床合理用药,2013,6(3):49-50. DOI:10.15887/j.cnki.13-1389/r.2013.07.127.
- [14] 邓少丽,陈伟,刘尚婵.疱疹病毒性脑炎的病原分析[J].中国医师杂志,2003,5(1):60-61. DOI:CNKI;SUN;DDYS.0.2003-01-025.

(收稿日期:2018-12-25)

(本文编辑:陈培莉)