

柯萨奇病毒感染的实验室诊断研究进展

彭育才 冯树异

(北京医科大学微生物学教研室, 北京 100083)

柯萨奇病毒 (Coxsacvirus, 简称 CV) 在分类学上属于微小 RNA 病毒科肠道病毒属。根据对敏感动物, 尤其是新生乳鼠的不同致病效应, 可将 CV 分为 A、B 两组 (CVA、CVB)。近年发现 CV 能引起一系列的人类疾病, 如上呼吸道感染、非细菌性脑膜炎、类脊髓灰质炎的麻痹性疾病、流行性肌痛或胸膜痛、心肌炎、心包炎、糖尿病等。临床上对这些疾病的确诊比较困难, 往往求助于实验室的方法, 本文主要报告

CV 的实验室检测研究的进展情况。

(一) 传统方法的不足

长期以来, 组织培养法一直是 CV 诊断的主要方法, 但组织培养相当耗时, 而且不能普及, 培养结果出来时, 早已无益于患者本人。更困难的是, 有部分 CV 不能在组织培养中增殖, 必须接种到裸鼠体内才能检测出来, 该方法繁杂, 一般诊断实验室不采用。

免疫学方法诊断病毒感染受到不同血清型间抗原性分化的限制。虽然有可能在 CVB 血清型间存在某一共同抗原,但为了覆盖引起人类疾病的常见 CV 血清型,仍然需要一系列抗不同血清型的抗血清。最近报告的许多血清型共有的 VP₃-2C 抗原^[1]和一种与多血清型的 VP₁ 衣壳蛋白交叉反应的单克隆抗体^[2]为免疫学诊断提供了新的途径,但这些实验结果还有待临床应用的进一步验证。血清学实验同样受到缺少用于免疫分析的共同 CV 抗原的限制,也需要一系列标准病毒株才能诊断出血清中抗体的类型。

(二) 核酸杂交法应用于 CV 的实验室诊断

CV 基因组间存在同源性,特别是非保守区核苷酸序列有高度同源性,这一点为核酸杂交诊断提供了理论依据。尽管从病人体内分离的病毒其抗原型每年都有变异,病毒所致疾病的临床特征也各有差异,但每一型病毒的基因组变异并不大。因此,发展快速的以核酸为基础的探针诊断方法很有前途。

1. 缺口翻译的 cDNA 探针:缺口翻译法合成 cDNA 探针是应用很广的方法,它简便、快速,能适应不同的实验需要。通过缺口翻译合成,可把带有显色基团或同位素的核苷酸掺入到新合成的 cDNA 链中去。目前常用的显色基团有生物素、地高率等,其特异性和敏感性各有差异,相对而言,地高率标记的探针要好一些。有人通过缺口翻译用生物素标记 CVB-3 的克隆序列从而制备出 cDNA 探针,该探针用于检测受染鼠心肌细胞中病毒 RNA,在受染鼠心肌组织中已不存在有感染性的病毒颗粒及有活性的病毒抗原时,原位杂交法仍可在受损心肌组织中检出病毒 RNA^[3],说明杂交方法有较高敏感性。一般情况下,探针制备时采用病毒基因组 5' 端或 3' 端非编码区的序列较为合适,这样的探针具有较广泛的交叉反应性,可以同多型病毒杂交。为了使杂交技术更适于临床应用,可以用几种肠道病毒探针混合在一起作杂交诊断,这样检测的 CV 病毒血清型范围更加广泛。

2. 单链 RNA 探针:目前,有条件的实验室

已经可以用特异的转录载体,合成正链和负链病毒 RNA 探针。理论上讲,相对 DNA 探针而言,单链 RNA 探针有如下几个优点:(1)RNA-RNA 杂交比 DNA-RNA 杂交具有更大的亲和性;(2)探针中不含 DNA 载体(质粒)的序列,从而消除了一些非特异性的杂交;(3)探针链没有自我环化现象。有人用转录载体合成了脊髓灰质炎病毒 I 型(PV-1)、CVB-3、和埃可病毒 9 型(ECHO-9)三种病毒的 RNA 探针,用这些探针作了三项实验^[4]:首先,与对应的 cDNA 探针作比较,来自 PV-1 的 RNA 探针在检测 10 倍稀释的 PV-1 和 CVA-9 时敏感性比对应的 cDNA 探针高 10-100 倍;其次,3 种 RNA 探针单独同 23 种不同血清型的动物和人类微小 RNA 病毒杂交,每种探针都能分别与多种靶病毒杂交,但不能检测全部病毒;最后,将 3 种探针混合在一起,再与 16 种人类肠道病毒作杂交试验,结果所有 16 型病毒都能被检测出来,其中包括两型不能在组织培养中生长的病毒(CVA-4 和 CVA-17)、几型生长缓慢的病毒和三型先前用 cDNA 探针检测不到的病毒。其他用 RNA 探针检测肠道病毒的研究也得到相似的结论^[5]。可以看到, RNA 探针在特异性和敏感性方面都优于相应的 cDNA 探针。

为了测定这类分析的确切敏感度,Rotbart 等进一步制备了绝对互补于 CVB-3 负股 RNA 探针的正股 RNA,并对其进行了定量测定。这些正股 RNA 在最适固定相杂交的条件下同负股 RNA 探针杂交,结果显示检测敏感度可达 10 pg RNA^[6]。

3. 寡聚 DNA 探针:用快速合成法可以制备寡聚 DNA 片段,并在其上标记上显色基团。这样的探针有利于发展非同位素系统,应用时非常灵活。但非同位素标记的寡聚探针的敏感度比同位素标记的 RNA 探针要低得多。然而,由于寡聚探针序列长度较短,它们可以特异而牢固地结合于多种肠道病毒序列,因而其检测范围广。同时,寡聚序列的研究也为 PCR 方法应用于 CV 诊断提供了便利条件。

(三) PCR 应用于 CV 的实验室诊断

尽管杂交方法较为理想,但如何在杂交过程中减少靶序列的损失,如何发展更敏感的探针,以及如何更能适应临床的需要,这些努力都一直受到一些标本中肠道病毒滴度太低的限制。要克服这一障碍,可以从两方面入手,一是从生物学角度将病毒复制,另一方面通过酶促放大作用加强信号。在生物学放大的研究中,以往将病毒含量低于杂交检测敏感度 (10^2 TCID₅₀) 的标本接种到培养细胞中,然后作时间长短不一的培养,弃去培养基,将单层细胞刮下直接点膜固定,再与 cDNA 探针杂交。有时培养 60 小时后仍未出现 CPE,而杂交却能出现阳性信号。然而,对于那些不能在细胞培养中复制的 CV,如某些 CVA 血清型,该方法是不合适的。

在酶促放大方面,通过反复的多聚酶链延伸反应可以将单一的基因或短的 DNA 序列放大^[7]。在已知的病毒基因组全序列中,通过计算机辅助分析,可以从病毒 5' 端非编码区中找出完全保守的序列片段作为 PCR 的引物序列。将前后两个寡聚序列通过自动合成仪合成为单链 DNA。下游引物按负链合成,上游引物按正链合成。将 CV 的 RNA 提取以后,以下游的引物为引物通过逆转录合成第一条 cDNA 链,然后加入上、下游两个引物进行 PCR 循环,这样病毒 RNA 就得到了十分有效的放大^[8]。阳性的结果通过电泳能检测到扩增的 DNA 带,而且这条带能很好地与病毒探针杂交。

PCR 法应用于诊断肠道病毒感染的报道已有不少,其结果令人鼓舞。有人对一些患有手脚麻痹可疑为脑膜炎的儿童进行病原学调查,在临床诊断为无菌性脑膜炎的 12 名病人的脑脊液标本中,通过 PCR 扩增全部检测出有肠道病毒 RNA 的存在,一名诊断为病毒性大脑炎的儿童

也出现阳性结果,4 份患细菌性脑膜炎及 3 份患非感染性疾病的标本经 PCR 扩增后肠道病毒 RNA 阴性^[9]。由此可见,PCR 法同传统的诊断肠道病毒脑膜炎的组织培养法相比,敏感性更高,而且具有相同的特异性。

cDNA、RNA 及寡聚 DNA 制备成的探针对 CV 的杂交研究已经表明,单独一种探针或混合的两种探针都可以检测出多型病毒。然而,即使用最敏感的 RNA 探针 (³²P 标记),与同源性极大的 CV 杂交,其检出的最低量也只有 10pg。如果 CV 处于脑脊液中,由于 RNA 酶的作用,其敏感度还需降低 10 倍(到 100pg 左右),加进 RNase 抑制剂只能部分地保护病毒核酸,如果探针与同源性较小的柯萨奇病毒杂交,敏感度将会更低。上述种种理由使 PCR 应用于柯萨奇病毒诊断显得十分重要。目前对 PCR 的引物设计和探针的设计只是根据有限的几个序列资料,但柯萨奇病毒的序列同源性通过许多的交叉反应已经显示出来,而且一旦发现需要重新设计引物和探针,那也是一项极为容易的工作。有可能在不远的将来,一份临床标本送到实验室以后,通过快速 PCR 扩增,将其产物同非同位素标记的柯萨奇病毒探针杂交,几个小时之后,就能判断出结果,从而为临床确诊提供重要信息。

参 考 文 献

1. Romero JR et al.: *Pediatr Res.*, 20:319,1986.
2. Yousef GE et al.: *Intervirology*, 28:163,1987.
3. 沈茜等:中华微生物学与免疫学杂志, 11(3):193,1991.
4. Rotbart HA et al.: *Mol. Cell Probes*, 2:65,1988.
5. Cova L et al.: *J. Med. Virol.*, 24:11,1988.
6. Rotbart HA et al.: *Mol. Cell Probes.*, 1:347,1987.
7. 马静雅等:病毒学报, 7(2):164,1991.
8. Rotbart HA: *Pediatr Res.*, 25:189,1989.
9. Rotbart HA: *J. Pediatr.*, 117:85,1990.

(1991-12-11 收稿)