

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

台灣腦膜腦炎病人腦脊髓液的多種病毒診斷及化學激素成份分析

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2314-B-040-011-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：中山醫學大學醫學系

計畫主持人：陳志豪

計畫參與人員：紀有財、王雅利、林雅惠

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，1年後可公開查詢

中 華 民 國 92 年 10 月 27 日

度範圍仍不清楚,因此我們聯想到細胞激素的檢驗,例如 GRO α ,可能可以作為中樞神經系統感染區分病毒、細菌或其他致病因的另一個選擇。

關鍵詞：腦脊髓液、中樞神經系統感染、化學激素

Abstract

Routinely, majority of the cerebrospinal fluid (CSF) showed negative result in bacteria culture. To examine whether these CSF contained any virus genes, we collected 100 samples of cerebrospinal fluid (CSF), which has been identified as bacterial culture negative, from the patients. The CSF was subjected to detect genes of several viruses by means of both PCR and RT-PCR. Our result indicated that the positive case of cytomegalovirus was the highest (i.e. 24 cases), following by herpes simplex virus (20 cases), types A and B of influenza viruses (9 cases and 1 case, respectively), and enteroviruses (5 cases) (including 4 cases of coxsackie B viruses and 1 case of echovirus type 6). In addition, some of the CSF samples could be detected for more than one viral gene. These results suggested that co-infection might be occurred in the same individual. Our result also showed that at least five types of viruses could infect the nervous system and caused neurological symptoms. Besides, we also used the commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits to quantify six different chemokines including MCP-1, MIP- β , IP-10, RANTES, IL-8 and GRO α , from these virus gene positive CSF. Our results showed that

the concentrations of chemokines in certain virus-positive CSF are increased and GRO α could be detected in most of virus-positive CSF. Lacking of normal CSF to compare and no such reference, the normal range of concentration of chemokines in CSF is still unclear. We suggest that chemokines examination, e.g. GRO α , may be an alternative choice to differentiate virus infection from bacteria or other causation of CSF disorder.

二、研究背景及目的

造成病毒性腦膜腦 (viral meningoencephalitis) 的病因很多,但大部分以腸病毒(Enteroviruses)為主(1)、腮腺炎病毒(Mumps virus)(2)、第一型及第二型單純疱疹病毒(Herpes simplex viruses I & II)(3)、節肢動物病毒(Arboviruses)(2)、淋巴球增多性絨毛腦炎病毒(Lymphocytic choriomeningitis virus)(2)、人類免疫不全病毒(Human immunodeficiency virus)(4)、腺病毒(Adenovirus)、水痘及帶狀疱疹病毒(Varicella-zoster virus)、巨細胞病毒(Cytomegalovirus)、EB病毒(Epstein-Barr virus)、流行性感冒病毒(Influenza virus)(5,6,7,8)、副流行性感冒病毒(Parainfluenza virus)、麻疹病毒(Measle virus)、及德國麻疹病毒(Rubella virus)等,均有造成病毒性腦炎的可能(2, 9, 10)。

國外研究發現病毒性腦膜腦炎在幼童之罹患率非常普遍,大多為1-10歲的幼童(11,12)。以腸病毒所引起的病毒性腦膜腦炎,其臨床症狀皆以急性發高燒、頭痛、噁心及嘔吐等。偶爾可出現倦怠及無食慾

等一般症狀。年齡較大的兒童則會出現肌肉酸痛、懼光。在美國，由腸病毒引起的病毒性腦膜腦炎之病因以柯沙奇 B5、及 Echovirus types 4、6、9 及 11 為主(2)。以單純疱疹病毒引起的病毒性腦膜腦炎則可出現在各年齡層(3)。

病毒感染中樞神經系統 (Central nervous system/CNS) 與人體內化學激素之產生及神經組織化學激素受器 (Receptor) 之表現有著密切的關係。國外許多研究發現病毒感染中樞神經系統可引起 CSF 中 Chemokines 成份之變化(13,14,15,16)。如第一型疱疹病毒 (Herpes simplex viruses/HSV) 引起腦炎的病人，其 CSF 中 Chemokines 之濃度會大量增加，這些 Chemokines 包括 MCP-1、MIP-1 α 、IL-8 及 RANTES(17)。表示這些 Chemokines 在 HSV-1 感染 CNS 之致病機制中扮演相當重要的角色。而在臨床應用上則可以測定這些 Chemokines 在 CSF 中之濃度來反映腦炎的嚴重性。而以 HSV-1 對小白鼠作人工感染實驗結果也顯示，包括 GRO- α 肽、MIP-1 β 肽、MIP-2、MCP-1、IP-10 及 RANTES 皆有被向上調高之趨勢(18,19)。腸病毒 (Enteroviruses) 及副黏液病毒 (Paramyxovirus) 感染中樞神經系統，病

人 CSF 中 MCP-1 及 IP-10 亦會明顯增高(20)，表示 MCP-1 及 IP-10 為吸引活化 T 淋巴球及單核球具有重要的作用。

中山醫學大學附設醫院檢驗部根據以往的經驗，發現很多腦膜腦炎病患腦脊髓液 (Cerebrospinal fluid/CSF) 的細菌分離率偏低，不排除是病毒所引起。因此本計畫利用最新發展的方法，如腸病毒診斷晶片、PCR 及 RT-PCR 等，來檢測國內比較可能引起腦膜腦炎的幾種主要病毒，包括腸病毒、第一型及第二型疱疹病毒 (Herpes simplex viruses I & II)、巨細胞病毒 (Cytomegalovirus)、及流行性感冒病毒 (Influenza virus)。此外，從國外文獻發現病毒性腦膜腦炎病患腦脊髓液中有幾種特定之化學激素有明顯增多的現象，因此本計畫的另一部分則以現有的 ELISA 套組檢測腦膜腦炎病患 CSF 中含量並配合病毒診斷的結果作比較及分析。

三、材料與方法

- I. 檢體收集: 由中山醫學大學附設醫院檢驗科細菌組負責收集被診斷為腦炎且細菌培養陰性的腦脊髓液檢體 100 支。
- II. DNA/RNA 的萃取: 分別採用 QIAamp DNA Blood Mini Kit 和 QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen-Germany)，並參考其建議之方法進行，RNA 以 random

hexamer 轉成 cDNA 備用。

III. PCR/RT-PCR 的進行: 參照劉武哲先生所著「臨床病毒學檢驗手冊」(1998), 利用病毒特定基因所設計的特異性 primers (Herpes simplex viruses: DNA polymerase gene, positions 64,364 to 64,832 of HSV-1 or 64,825 to 65,215 of HSV-2 (Kimura et al., 1990) 、 Cytomegalovirus (CMV): late antigen (pp65/71) gene, position 118,878-119,277 (Demmler et al., 1988) 、 Enterovirus (EV) RT-PCR: Pan-EV primer designed in the untranslated region, positions 160-599 (Tsao et al., 2002) 、 Influenza viruses type A and B (Flu A/B) RT-PCR: nonstructural genes, positions 441-630 of Flu A or 704-925 of Flu B viruses (Claas et al., 1993)) 及建議的放大 cycle 數目來進行, 並將 PCR 產物以 1.5~2% agarose gel 跑電泳分析。

IV. 腸病毒生物晶片: 採用晶宇公司的 DR. EV chip 來區分腸病毒第 71 型 (Enterovirus 71)、柯沙奇病毒 A16 型 (Coxsackievirus A16) 及其他所有腸病毒 (Pan-enterovirus), 操作步驟參照其建議之方法進行。

V. 化學激素濃度測定: 為測定腦脊髓液中 GRO- α 、MIP-1 β 、MIP-2、MCP-1、IP-10 及 RANTES 六種特定之化學激素, 以現有的 ELISA 套組 (Human GRO alpha/CXCL1 Quantikine Immunoassay Kit 、 Human RANTES/CCL5 Quantikine Immunoassay Kit 、 Human MIP-1 beta/CCL4 Quantikine Immunoassay Kit、 Human IL-8/CXCL8 QuantiGlo Immunoassay Kit 、 Human IP-10/CXCL10 Quantikine ELISA、 Human MCP-1/CCL2 Quantikine Immunoassay Kit) , 依其建議之方法來偵測並分析。

四、實驗結果

Table 1. Clinical features in this study

Clinical feature	No. of cases
Fever	10
Hydrocephalus	11
Intra-cranial/-ventricular hemorrhage	7
Meningitis	35
Sepsis	4
V-P shunt infection	3
*Other	30
Total	100

*Brain abscess, CNS infection, CNS lymphoma, Left ventricle dilatation, neonatal infection, seizure, skull bone fracture, etc.

Table 2. Result of PCR/RT-PCR of cerebrospinal fluids in this study

Types of virus	No. of positive
HSV	20
CMV	24
EV	5
Flu A	9
Flu B	1
All negative	46

Table 3. Result of mixed infection detected in cerebrospinal fluids in this study

Types of virus	No. of positive
CMV+EV	1
CMV+Flu A	3
CMV+HSV	7
Flu A+HSV	1
CMV+Flu A+HSV	1
Total	13

Figure1. Detection of virus by PCR/RT-PCR

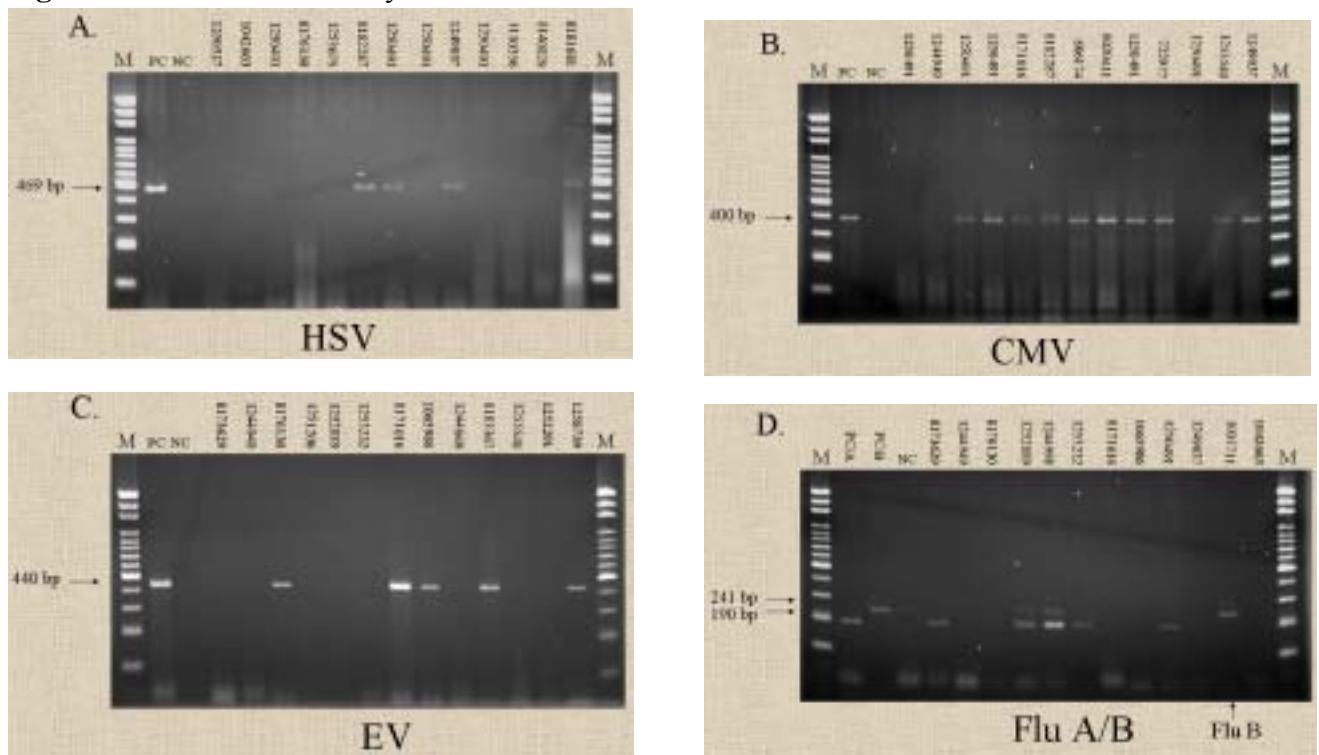


Table 4. Cerebrospinal fluid concentrations of MCP-1, MIP-1 β , IP-10, IL-8, Gro α and RANTES in influenza A virus, CMV, HSV, EV genes positive patients

valid sample no.	detection of virus gene	MCP-1 (pg/ml)	MIP-1 β (pg/ml)	IP-10 (pg/ml)	RANTES (pg/ml)	IL-8 (pg/ml)	GRO α (pg/ml)
24	Flu	<20	<2	6.8	<3	<5	75.5
38	Flu	491.7	1850	1559.8	720	13630.5	5331.3
65	Flu	<20	<2	221.7	<3	19947.4	2004.7
54	Flu & CMV	822.3	395.8	15.8	945	612.3	34.3
63	Flu & CMV	<20	<2	<2	<3	<5	109.66
33	CMV	14611.1	767.6	244	820	859.2	51.4

35	CMV	342.3	212	7.8	870	1020	2501.7
42	CMV	<20	<2	<2	ND	<5	18.8
44	CMV	<20	<2	849.4	ND	<5	689.2
46	CMV	<20	<2	<2	ND	<5	30.1
49	CMV	<20	661.4	423.8	1020	534.2	382.4
56	CMV	<20	<2	<2	ND	<5	172.2
57	CMV	18611.1	576.4	9.7	1095	50.4	12.2
60	CMV	<20	<2	<2	ND	<5	<3.13
61	CMV	<20	<2	<2	<3	<5	86.9
71	CMV	996.3	8.9	<2	870	<5	<3.13
72	CMV	<20	<2	<2	ND	<5	47.2
73	CMV	<20	<2	<2	ND	<5	<3.13
75	CMV	<20	<2	15.3	<3	1526.3	434
28	CMV& HSV	<20	<2	15.3	<3	<5	83.4
37	CMV& HSV	<20	<2	19.6	<3	<5	98
39	CMV& HSV	<20	<2	11.1	<3	<5	76.6
40	CMV& HSV	1988.9	22	<2	920	<5	17.4
41	CMV& HSV	2100	415.1	408	770	384.8	15.9
47	CMV& HSV	<20	<2	<2	ND	<5	<3.13
69	CMV& HSV	<20	<2	15.3	<3	8431.6	1404.7
1	HSV	122.2	885.1	315.8	870	89.2	40
8	HSV	<20	<2	30.2	<3	4815.8	241.8
17	HSV	<20	<2	94	<3	426.3	184.5
18	HSV	<20	<2	40.9	<3	<5	103.6
22	HSV	<20	<2	162.1	<3	<5	228.3
23	HSV	<20	<2	30.2	<3	<5	17.1
32	HSV	<20	<2	11.1	<3	<5	130.6
36	HSV	<20	<2	<2	ND	<5	18.8
78	HSV	<20	<2	43	<3	<5	<3.13
84	HSV	<20	96.4	<2	1095	<5	22.9
97	HSV	<20	<2	8.9	<3	<5	127.2
99	HSV	<20	<2	19.6	<3	<5	76.6
100	HSV	<20	<2	13.2	<3	<5	145.2
52	EV	<20	<2	30.2	<3	<5	98
55	EV	<20	<2	<2	<3	<5	17
67	EV	4953.3	352.5	837.6	770	<5	494.4
96	EV	<20	982.8	7028.1	<3	16942.1	4404.7

58	EV& CMV	6673.3	3740	7304.3	1070	1621.3	1507.5
----	---------	--------	------	--------	------	--------	--------

五、分析與討論

腦膜腦炎可由細菌、病毒和黴菌所引起,然而,其致病原很難由一般敏感性較低的培養方法鑑定出來,PCR 技術反而提供臨床醫師診斷中樞神經系統受微生物感染時的一個有效診斷方法。

在這次實驗的 100 個細菌培養陰性的腦脊髓液檢體中,以不同病毒基因設計的特異性 primers 經 PCR 和 RT-PCR 放大後跑電泳,結果指出至少有五種病毒基因可在腦脊髓液中被偵測出來,其中以巨細胞病毒最高,其他可偵測到的致病原包括單純疱疹病毒、A 型及 B 型流感病毒以及腸病毒,此外,少部份的腦脊髓液檢體可同時檢測出兩種或以上的病毒基因,顯示出不同病毒有共同感染同一個體的現象。很不幸的,仍有將近 50% 的腦脊髓液為陰性結果,因此猜想是否有其他未知或微量的病毒在這些腦脊髓液中,為了解開這個疑問,進一步利用 Sequence-independent single primer amplification(SISPA)技術研究中。

六種化學激素的含量測定,包括 MCP-1、MIP- β 、IP-10、RANTES、IL-8 和 GRO α , 結果呈現出在某些含有病毒基因的腦脊髓液其細胞激素是增加的,流感病毒整體而言較其他病毒感染的化學激素含量高,單純疱疹病毒感染的化學激素含量為病毒中最低的,但其 IP-10 皆高,可能和單純疱疹病毒最初感染粘膜或經由皮膚傷口進入體內有關,因為 IP-10(interferon-gamma inducible protein-10) 主要由 monocytes 產生,但也可由 T cells、fibroblasts 和 endothelial cells 產生。另外,有共同感染的腦脊髓液中化學激素的含量較單一感染腦脊髓液高,4 個腸病毒單一感染個案的化學激素含量呈現一半偏高而一

半偏低,如此矛盾的結果有待進一步釐清,可能和宿主因素不同有關。GRO α 可在大部份的病毒陽性腦脊髓液中偵測到,因缺乏正常腦脊髓液的比較且也沒有這樣的參考資料,使腦脊髓液中的正常細胞激素濃度範圍仍不清楚,因此我們聯想到細胞激素的檢驗,例如 GRO α , 可能可以作為中樞神經系統感染區分病毒、細菌或其他致病因的另一個選擇。此外, GRO α 視為 IL-8 family, 和 IL-8 在胺基酸序列上有很高的同源性(homology), 也被報告和 IL-8 在 3D 結構分析上有相似的型態,在白血球趨化作用幾乎有相同的 level,但在我們的實驗中卻未見此現象。

六、參考文獻

1. Maxson, S. and R. F. Jacobs. 1993. Viral meningitis: tips to rapidly diagnose treatable causes. *Postgraduate Med.* 93 (8): 153-166.
2. Cherry, J. D. 1987. Aseptic meningitis and viral meningitis. In: R. D. Feigin, J. D. Cherry, eds, *Textbook of pediatric infectious diseases*. 2nd ed., vol. 1. Philadelphia: Saunders, pp. 478-484.
3. Thomas, E. E., D. W. Scheifele, and B. S. MacLean. 1986. Herpes simplex type 2 aseptic meningitis in a two-month-old infant. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 8 (3): 184-186.
4. Gabuzda, D. H. and M. S. Hirsch. 1987. Neurologic manifestations of infection with human immunodeficiency virus: clinical features and pathogenesis. *Ann. Intern. Med.* 107 (3): 383-391.

5. **Fujimoto, S., M. Kobayashi, O. Uemura, M. Iwasa, T. Ando, T. Katoh, C. Nakamura, N. Maki, H. Togari, and Y. Wada.** 1998. PCR on cerebrospinal fluid to show influenza-associated acute encephalopathy or encephalitis. *Lancet* 352: 873-875.
6. **Chan, C. H., M. C. Wu, C. T. Huang, K. G. Wu, and W. T. Liu.** 1999. Genetic characterization of the hemagglutinin of two strains of influenza B virus co-circulated in Taiwan. *J Med Virol* 59: 208-214.
7. **McCullers, J. A., S. Facchini, P. J. Chesney, and R. G. Webster.** 1999. Influenza B virus encephalitis. *Clin Inf Dis* 28: 898-900.
8. **Shiraishi, K., S. E. Lindstrom, T. Saito, M. Shinjoh, R. Nerome, S. Funatsumaru, and K. Nerome.** 2001. Genetic analysis of an influenza B virus isolated from a patient with encephalopathy in Japan. *J. Med. Virol.* 65: 590-597.
9. **Johnson, R. T. and E. P. Richardson.** 1968. The neurological manifestations of systemic lupus erythematosus. *Medicine (Baltimore)* 47 (4): 337-369.
10. **Chaudhry, H. J. and B. A. Cunha.** 1991. Drug-induced aseptic meningitis: diagnosis leads to quick resolution. *Postgraduate Med.* 90 (7): 65-70.
11. **Dalton, M. and R. W. Newton.** 1991. Aseptic meningitis. *Dev. Med. Child. Neurol.* 33 (5): 446-451.
12. **Donald. P. R., P. J. Burger, and W. B. Becker.** 1986. Paediatric meningitis in the western Cape: a 3-year hospital-based prospective survey. *S. afr. Med. J.* 70 (7): 391-395.
13. **Ahuja, S. K., J. L. Gao, and P. M. Murphy.** 1994. Chemokine receptors and molecular mimicry. *Immunol. Today* 15: 281-287.
14. **Smith, G. L., J. A. Symons, A. Khanna, A. Vanderplasschem, and A. Alcami.** 1997. Vaccinia virus immune evasion. *Immunol. Rev.* 159: 137-154.
15. **Dairaghi, D. J., D. R. Greaves, and T. J. Schall.** 1998. Abduction of chemokine elements by Herpesviruses. *Semin. Virol.* 8: 377-385.
16. **Lalani, A. S., J. W. Barrett, and I. McFadden.** 2000. Modulating Chemokines: more lessons from viruses. *Immunol. Today* 21: 100-106.
17. **Rosler, A., M. Pohl, H. J. Braune, W. H. Oertel, D. Gemsa, and H. Sprenger.** 1998. Time course of Chemokines in the cerebrospinal fluid and serum during herpes simplex type 1 encephalitis. *J. Neurol. Sci.* 157: 82-89.
18. **Carr, D. J., S. Noisakran, W. P. Halford, N. Liukacs, V. Asensio, and I. L. Campbell.** 1998. Cytokine and chemokine production in HSV-1 latently infected trigeminal ganglion

cell cultures: effects of hyperthermic stress. *J. Neuroimmunol.* 85: 111-121.

19. Thomas, J., S. Kanangat, and B. T. Rouse. 1998. Herpes simplex virus replication-induced expression of Chemokines and proinflammatory cytokines in the eye: implications in herpetic stromal keratitis. *J. Interferon Cytokine Res.* 18: 681-690.

20. Lahrtz, F., L. Piali, D. Nadal, H. W. Pfister, K. S. Spanaus, M. Baggiolini, and A. Fontana. 1997. Chemotactic activity on mononuclear cells in the cerebrospinal fluid of patients with viral meningitis is mediated by interferon-gamma inducible protein-10 and monocyte chemotactic protein-1. *Eur. J. Immunol.* 27: 2484-2489.

21. Chomczynski, P. 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTech.* 15: 532-537.

22. Claas, E. C. J., M. J. W. Sprenger, G. E. M. Kleter, R. van Beek, W. G. V. Quint and N. Masurel. 1992. Type-specific identification of influenza viruses A, B and C by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 39: 1-13.

23. Liu, W. T., J. R. Sun, C. H. Lin, R. L. Kuo, and S. H. Kung. 2001. An

indicator cell assay for detection of human cytomegalovirus based on enhanced green fluorescent protein. *J. Virol. Methods* 96: 85-92.