

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

從細菌培養陰性腦膜炎及腦炎病人腦脊髓液中篩檢潛藏病  
毒基因

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2314-B-040-030-

執行期間：92年08月01日至93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

共同主持人：林克亮

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，2年後可公開查詢

中 華 民 國 93 年 11 月 2 日

# 行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

從細菌培養陰性腦膜炎及腦炎病人腦脊髓液中篩檢潛藏病毒基因

計畫類別： 個別型計畫      整合型計畫

計畫編號：NSC-92-2314-B-040-030-

執行期間：2003年8月1日至2004年7月31日

計畫主持人：陳志豪

共同主持人：林克亮

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：中山醫學大學微生物暨免疫學科

中 華 民 國 93 年 10 月 31 日

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## Preparation of NSC Project Reports

計畫編號：NSC- 92- 2314-B-040-030-

執行期限：92 年 8 月 1 日至 93 年 7 月 31 日

主持人：陳志豪 中山醫學大學微生物暨免疫學科

共同主持人：林克亮 中山醫學大學附設醫院檢驗科

計畫參與人員：紀有財、王雅利 中山醫學大學生化暨生物科技研究所

### 一、中文摘要

在九十一年度的計畫中,我們從無菌性腦炎及腦膜腦炎病人中採集了 100 個細菌培養陰性的腦脊髓液,以 PCR 及 RT-PCR 來偵測多種病毒基因。初步結果顯示以巨細胞病毒之陽性率最高(24 例) 其次是第一型單純疱疹病毒(20 例) A 型及 B 型流感病毒(分別為 9 例及 1 例),以及腸病毒(5 例)(分別為 B 型柯沙奇病毒 4 例及第 6 型依柯病毒 1 例)。其中少部份的檢體中可同時檢出兩種或以上的病毒基因,顯示同一個體可同時感染不同病毒,即混合感染(mixed infection)的現象。另外結果也證明除了細菌外,至少有 5 種病毒可以侵犯神經系統並引起症狀,然而仍有將近一半的檢體無法得到正確的致病原。為了探究這些找不到致病原的檢體是否含有其他未知的病毒基因,且避免因使用特異性引子進行 PCR 及 RT-PCR 而忽略混合感染的情形,在本計畫中,我們以之前實驗後 5 種病毒偵測皆呈陰性的 46 個腦脊髓液檢體當樣本,採用序列非依賴性單一引子增幅(Sequence independent single primer amplification/SISPA)試驗,來尋找病毒基因,並透過基因選殖、基因序

列分析、演化分析及生物資訊等技術來鑑定病毒基因,以期能解答這些不明原因所引起的腦膜炎及腦炎等相關疾病。實驗結果可在少數檢體中增幅到一些基因片段。理論上實驗的方法合理可行,但其敏感度不高。探究其原因可能有:因核酸量太少導致敏感度不夠,再則因未知的病毒基因太大而使 SISPA 方法中接合器接不上,病毒核酸不穩定而降解掉等。儘管如此,此鑑定病毒基因的系統仍值得我們更致力去建立。

關鍵詞：腦脊髓液、不知名的病毒基因、序列非依賴性單一引子增幅 (SISPA)

### Abstract

In 2002 NSC project, we collected 100 bacteria culture negative cerebrospinal fluid (CSF) samples from patients who have been diagnosed as aseptic meningitis and/or meningoencephalitis. The samples were subjected to detect several types of virus genes by PCR and RT-PCR. The preliminary results showed 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. However, the etiology of 50% of the CSF samples is still unknown. In order to explore the etiology of these samples whether they contain genes of unknown viruses, we employ sequence independent single primer amplification (SISPA) method to detect any viral genes. In addition, we also use molecular cloning techniques, DNA sequencing, phylogenetic analysis and bioinformatics, to identify those viral genes. Our result showed that gene fragments could only be detected in few samples of CSF although the strategy of SISPA is rational; the sensitivity of the method is low. The reason may be: (1) The concentration of nucleic acid is low; (2) The length of nucleic acid is too long, (3) DNA/RNA is easily degraded, etc. However, SISPA is worth for development to identify unknown pathogens from clinical specimens.

Keyword: cerebrospinal fluid, unknown virus gene, sequence independent single primer amplification (SISPA)

## 二、計畫緣由與目的

造成病毒性腦膜腦炎 ( Viral meningoencephalitis ) 的病因很多，但大部

分以腸病毒 ( Enteroviruses ) 為主 ( Maxson and Jacobs, 1993 )、腮腺炎病毒 ( Mumps virus ) ( Cherry, 1987 )、第一型及第二型單純疱疹病毒 ( Herpes simplex viruses I & II ) ( Thomas et al., 1989 )、節肢動物病毒 ( Arboviruses ) ( Cherry, 1987 )、淋巴球增多性絨毛腦炎病毒 ( Lymphocytic choriomeningitis virus ) ( Cherry, 1987 )、人類免疫不全病毒 ( Human immunodeficiency virus ) ( Gabuzda and Hirsch, 1987 )、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 ) ( Fujimoto et al., 1998; Chan et al., 1999; McCullers et al., 1999; Shiraishi et al., 2001 )、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 ( Johnson and Richardson, 1968 ; Cherry, 1987 ; Chaudhry and Cunha, 1991 )。

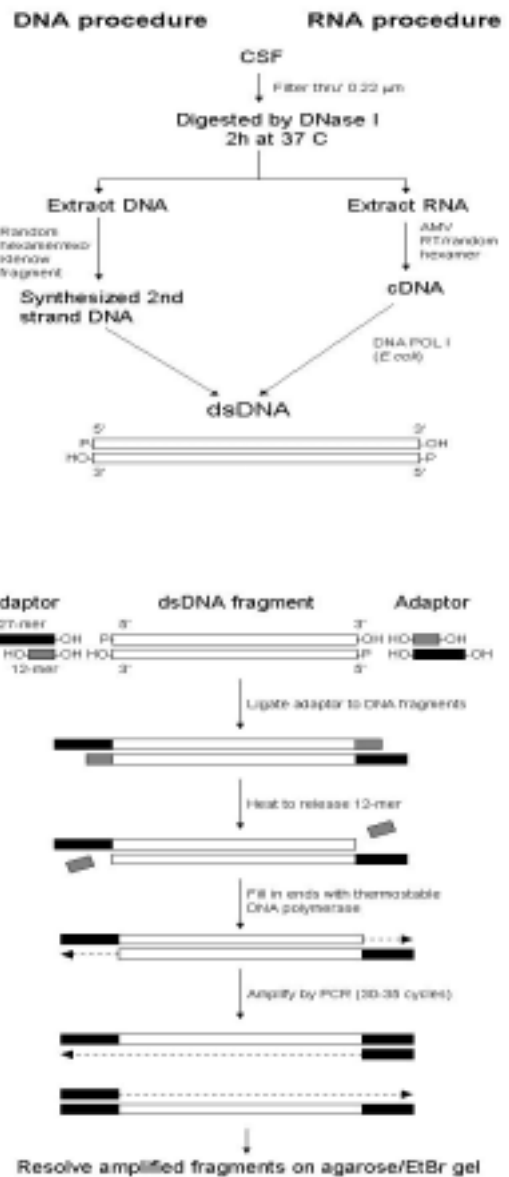
國外研究發現病毒性腦膜腦炎在幼童之罹患率非常普遍，大多為 1-10 歲的幼童 ( Dalton & Newton, 1991; Donald et al., 1986 )。以腸病毒所引起的病毒性腦膜腦炎，其臨床症狀皆以急性發高燒、頭痛、噁心及嘔吐等。偶爾可出現倦怠及無食慾等一般症狀。年齡較大的兒童則會出現肌肉酸痛、懼光。在美國，由腸病毒引起的病毒性腦膜腦炎之病因以柯沙奇 B5、及 Echovirus types 4、6、9 及 11 為主 ( Cherry, 1987 )。以單純疱疹病毒引起的病毒性腦膜腦炎則可出現在各年齡層 ( Thomas et al., 1986 )。

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。而從九十一年度的計畫中，我們已經從無菌性腦炎及腦膜腦膜炎病人所採集的 100 個細菌培養陰性的腦脊髓液中，以 PCR 及 RT-PCR 偵測到多種病毒基因。初步結果顯示以巨細胞病毒之陽性率最高 (24 例) 其次是第一型單純疱疹病毒 (20 例) A 型及 B 型流感病毒 (分別為 9 例及 1 例)，以及腸病毒 (5 例) (分別為 B 型柯沙奇病毒 4 例及第 6 型依柯病毒 1 例)。其中少部份的檢體中可同時檢出兩種或以上的病毒基因，顯示不同病毒有共同感染同一個體的現象。本結果證明除了細菌外，至少有 5 種病毒可以侵犯神經系統並引起症狀，然而仍有約一半的檢體無法得到解答，這些檢體中是否含有一些比較不常見或不完整的病毒基因，值得深入探討。為了解決此難題，Allander 氏等 (2001) 首先將含有病毒的血漿或血清以 0.22 $\mu$ m 過濾膜過濾，以去除細菌，再加入 DNase I 以去除宿主本身的 Genomic DNA，再把剩餘的 DNA 或 RNA 分別以 Random hexamer/exo-Klenow fragment 或 AMV-RT/random hexamer 及 DNA polymerase I 合成雙股 DNA 後，以序列非依賴性單一引子增幅 (Sequence-independent single primer amplification; SISPA) 試驗來增幅，經非選擇性的方式把檢體中所有核酸都增幅及選殖，之後再把所得到的 DNA 依序定序後再與基因庫中已知的基因作比對，希望能夠針對病因不明的腦膜炎、腦炎及中樞神經系統感染等相關疾病找出答案。

本計劃則參考 Allander 氏等 (2001) 之方法加以修改，並結合由 Maxim Biotech, Inc. 所生產的「PCR\* Kits For DNA Ladder Assay」來偵測腦脊髓液中的病毒基因 (圖一)。

### Sequence-independent single primer amplification



圖一：序列非依賴性單一引子增幅 (Sequence-independent single primer amplification; SISPA) 試驗流程

### 三、結果與討論

從九十一年度研究計畫之初步結果發現約有 50% 的檢體可檢測出病毒基因，但仍

然有 50%的檢體檢測不出任何病毒基因,這些檢體中是否含有一些比較不常見或不完整的病毒基因,是值得深入探討。有鑑於此, Martin 氏(1994)首先將一些不常見或造成非典型症狀的病毒稱為 Stealth virus,在此暫翻譯為潛藏病毒。隨後 Martin 氏 (1996)於急性腦病變(Acute encephalopathy)病人的腦脊髓液(Cerebrospinal fluid; CSF)中分離到潛藏病毒(Stealth virus)。其後又陸續於罹患大腦血管炎(Cerebral vasculitis)及慢性疲勞症候群(Chronic fatigue syndrome)等病人的腦脊髓液中偵測到潛藏病毒(Martin 1996 and 1997)。後來發現某些潛藏病毒為猴子巨細胞病毒 (Simian Cytomegalovirus) (Martin 1999),也有其他人類巨細胞病毒及 EB 病毒的感染所造成(Thorley-Lawson 1999)。

過去以分子生物技術來尋找未知基因的方法有很多,早在 1989 年 Choo et al 等便以構築 random-primed complementary DNA library 的技術從 non-A, non-B hepatitis (NANBH)病人的血漿中選殖到 C 型肝炎病毒的基因。但是,不是每種病毒的核酸都能輕易以相同方法被偵測到,因此以一般分子生物學的方法來偵測這些基因,是要靠增幅(Amplification)及篩選(Selection)來達成(Muerhoff et al., 1997)。

在本計畫中,我們以之前實驗後 5 種病毒偵測皆呈陰性的 46 個腦脊髓液檢體當樣本,採用序列非依賴性單一引子增幅(Sequence independent single primer amplification/SISPA)試驗,來尋找病毒基因,由 Table 1 可見此 46 個 CSF 皆來自具有中樞神經系統症狀的病人,理應可找到感染原,但仍然沒有得到陽性的結果,其原因很多,除了可能此 46 個樣本真為陰性檢體,其中最大的原因在於一般的檢體(如血漿 血清 CSF )中含有大量的 Genomic DNA

及只有相對極少量的病毒基因,以本實驗收集的 CSF 來說,只各取 50ul 分別進行 DNA 和 RNA virus 的檢測,要在其中找到極少量的病毒基因是十分困難的,且臨床上 CSF 取得不易,約 2~3ml CSF 就得完成常規、生化檢測及細菌培養,甚至包括細菌的直接檢測法,而無法得到較多的檢體,所以可能因為病毒核酸量相對極少而使敏感度不夠導致偽陰性。

近年來,未知序列核酸之增幅是以序列非依賴性(Sequence-independent) PCR 方法來偵測,該方法是先將 Primer-binding sequence 黏接在 cDNA 片段的兩端後再用單一引子來增幅(Muerhoff et al., 1997)。類似的方法很多,其中又以序列非依賴性單一引子增幅(Sequence-independent single primer amplification; SISPA)試驗最有名(Reyes and Kim, 1991),實驗先以 EL-4 lymphoma cell 做 PCR Kits For DNA Ladder Assay 的測試,在 Fig 1 可見到預期的結果,且即使經過 10 倍、100 倍稀釋也可見其 ladder,而在檢體中沒有得到陽性的結果,可能因未知的病毒基因太大而使 SISPA 方法中 adaptor (primer-binding sequence)不易接上,另外也可能因實驗過程中病毒核酸不穩定而降解掉...等等,但此方法在理論上可行,唯獨耗費之人力與時間甚鉅,一個檢體從 SISPA 到基因選殖且不含定序與分析就需五天,並不適合作為臨床檢驗之用。

另外,其實實驗結果也不是毫無所獲,在 Fig 2 可見 12 號與 59 號病人的 CSF 經 SISPA 後可在電泳圖上依稀可見幾個 bands,且經幾次重複試驗仍可呈現,在九十一年度研究計畫裡也發現其 CSF 中的 RANTES、MIP-1 $\beta$ 、IP-10、IL-8、GRO  $\alpha$  等細胞激素濃度偏高,唯一可惜的是始終無法順利將基因選殖出來,至今原因仍不清

楚,希望日後能更進一步嘗試其他方法將其選殖出來做定序與分析。

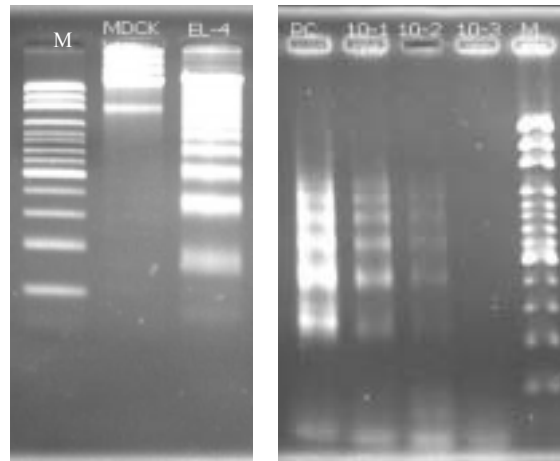
而另一項有趣的發現是這些 PCR/RT-PCR negative 的 CSF 大多分布在十二月份,佔陰性檢體的 41.3%(19/46),以台灣的季節來看則正值冬季,或許將其 CSF 以台灣冬季流行且會造成中樞神經系統感染的病毒來當 PCR 放大的標靶,可能可以藉此增加敏感性與特異性來找到病毒基因。

除了 SISPA 及其衍生出 Random PCR(Froussard, 1992)以外,其他尋找病毒基因的方法還有 Representational difference analysis (RDA)(Lisitsyn et al., 1993) , RDA 結合了序列非依賴性(Sequence-independent) PCR 增幅及減數雜交(Subtractive hybridization)等技術,剔除了基因篩選的步驟。過去以 RDA 成功地分別從血漿及血清中發現 GB 病毒及人類 TT 病毒(Simons et al., 1995; Nishizawa et al., 1997)。不過 RDA 需要兩種不同的檢體(即 Driver 及 tester)作比較,來尋找不同的基因,因此需要有病人及正常人的檢體互相比較,而正常人之 CSF 取之不易。所以儘管實驗沒有如預期的順利,但尋找未知病毒的基因在臨床上仍有其意義存在,而且也有各種的方法可行,因此這套鑑定病毒基因的系統仍值得我們更致力去建立,並將各種問題一一去克服。

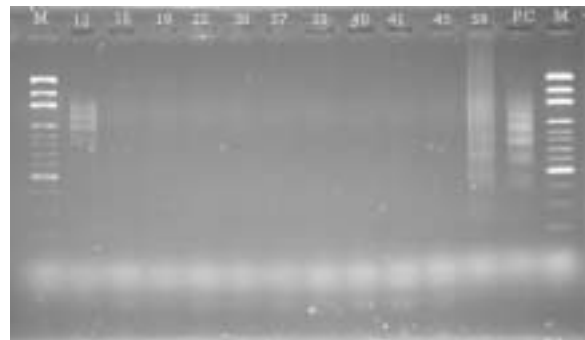
**Table 1.** Clinical features in the patients of CSF PCR/RT-PCR negative

Clinical feature	No. of cases
Meningitis	16
CNS infection	9
Hydrocephalus	4
Sepsis	3
V-P shunt infection	3
Fever	3
*Other	8
Total	46

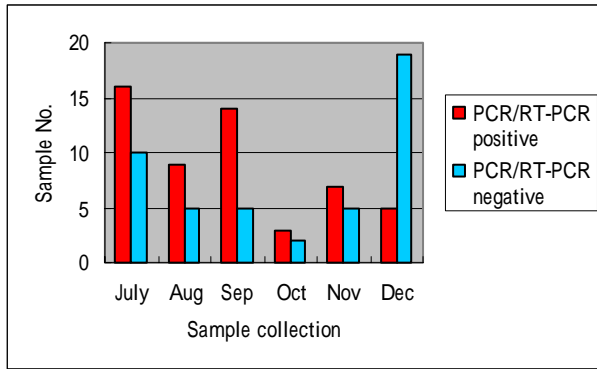
\*new born infection (1)、intracerebral hemorrhage (1) left ventricle dilatation (1) intraventricular hemorrhage (2)、no diagnosis (3)



**Figure 1.** EL-4 cell in PCR Kits For DNA Ladder Assay



**Figure 2.** Detection of CSF by SISPA



**Figure 3.** The month distribution of CSF PCR/RT-PCR

#### 四、計畫成果自評

本次研究，雖然成果並不是很豐碩，但從一些理論及想法加以實現，也可以從計畫研究中得到很多寶貴的經驗。這些經驗可作為日後研究的參考。

#### 五、參考文獻

1. **Allander, T., S. U. Emerson, R. E. Engle, R. H. Purcell and J. Bukh.** 2001. A virus discovery method incorporating Dnase treatment and its application to the identification of two bovine parvovirus species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 11609-11614.
2. **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.
3. **Chaudhry, H. J. and B. A. Cunha.** 1991. Drug-induced aseptic meningitis: diagnosis leads to quick resolution. *Postgraduate Med.* 90 (7): 65-70.
4. **Cherry, J. D.** 1987. Aseptic meningitis and viral meningitis. In: R. D. Feigin, J. D. Cherry, eds, *Textbook of pediatric infectious diseases.* 2<sup>nd</sup> ed., vol. 1. Philadelphia: Saunders, pp. 478-484.
5. **Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M.** 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science.* 244(4902): 359-362.
6. **Dalton, M. and R. W. Newton.** 1991. Aseptic meningitis. *Dev. Med. Child. Neurol.* 33 (5): 446-451.
7. **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.
8. **Froussard, P.** 1992. A random-PCR method (rPCR) to construct whole cDNA library from low amounts of RNA. *Nucleic Acids Res.* 20: 2900.
9. **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.
10. **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.
11. **Kimura, M.** 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base



- substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111-120.
12. **Lisitsyn, N., N. Lisitsyn, and M. Wigler.** 1993. Cloning the differences between two complex genomes. *Science* 259: 946-951.
  13. **Martin W. J.** 1997. Detection of RNA sequences in cultures of a stealth virus isolated from the cerebrospinal fluid of a health care worker with chronic fatigue syndrome. Case report. *Pathobiol.* 65(1): 57-60.
  14. **Martin, W. J.** 1996. Simian cytomegalovirus-related stealth virus isolated from the cerebrospinal fluid of a patient with bipolar psychosis and acute encephalopathy. *Pathobiol.* 64(2): 64-66.
  15. **Martin, W. J.** 1996. Stealth viral encephalopathy: report of a fatal case complicated by cerebral vasculitis. *Pathobiol.* 64(2): 59-63.
  16. **Martin, W. J.** 1999. Stealth adaptation of an African green monkey simian cytomegalovirus. *Exp. Mol. Pathol.* 66(1): 3-7.
  17. **Martin, W. J., L. C. Zeng, K. Ahmed, and M. Roy.** 1994. Cytomegalovirus-related sequence in an atypical cytopathic virus repeatedly isolated from a patient with chronic fatigue syndrome. *Am. J. Pathol.* 145(2): 440-451.
  18. **Maxson, S. and R. F. Jacobs.** 1993. Viral meningitis: tips to rapidly diagnose treatable causes. *Postgraduate Med.* 93 (8): 153-166.
  19. **McCullers, J. A., S. Facchini, P. J. Chesney, and R. G. Webster.** 1999. Influenza B virus encephalitis. *Clin Inf Dis* 28: 898-900.
  20. **Reyes, G. R. and J. P. Kim.** 1991. Sequence-independent, single-primer amplification (SISPA) of complex DNA populations. *Mol. Cell. Probes* 5: 473-481.
  21. **Satiou, N. and M. Nei.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
  22. **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.
  23. **Simons, J. N., T. J. Pilot-Matias, T. P. Leary, G. J., Dawson, S. M. Desai, G. G. Schlauder, A. S. Muerhoff, J. C. Erker, S. L. Buijk, M. L. Chalmers, C. L. V. Sant, and I. K. Mushahwar.** 1995. Identification of two flavivirus-like genomes in the GB hepatitis agent. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 3401-3405.
  24. **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.
  25. **Thorley-Lawson D. A. and G. J Babcock.** 1999. A model for persistent

infection with Epstein-Barr virus: the  
stealth virus of human B cells. *Life  
Sciences* 65(14):1433-1453.

26. **Nishizawa, T., H. Okamoto, K.  
Konishi, H. Yoshizawa, Y. Miyakawa,  
and M. Mayumi.**  
1997. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*  
241: 92-97.