

临床经验

泛病原体基因芯片在小儿肺炎中检出博卡病毒

彭淑梅 邓华 李敏敏 黄淑君 周伟平 鲁灵龙
黄冬平 李文成 林英 陈秋平 张亮

(广东省妇幼保健院儿科 / 广东省妇幼保健院转化医学中心, 广东 广州 511400)

呼吸道感染是儿童常见病, 病原学复杂, 20%~30% 的小儿呼吸道感染病原难以明确^[1-2]。传统的病原学检测手段如荧光定量 PCR、抗原抗体免疫学方法或细菌培养等, 操作繁琐、通量低, 一次只能检测少数几种致病原^[3-6]。本研究对 1 例病原不明的小儿肺炎, 利用泛病原体基因芯片进行高通量病原学筛查分析, 并予后续 PCR 扩增及测序验证, 以探讨该芯片系统应用于呼吸道感染病原学诊断的可行性。

1 资料与方法

1.1 研究对象

2015 年 5 月我科收治的 1 例病原不明肺炎、右上肺不张患儿, 男, 1 岁 5 个月。诊断符合儿童社区获得性肺炎标准^[7]。

1.2 辅助检查及诊治过程

血常规: 白细胞 $13.0 \times 10^9/L$ 、中性粒细胞 52.4%, 余正常。C 反应蛋白 11.52 mg/L (参考值: <10 mg/L)、降钙素原 0.20 ng/mL (参考值: <0.05 ng/mL)。胸部正位片: 双肺纹理增多、模糊, 右上肺可见片状致密影, 右上肺不张。

予美洛西林舒巴坦、哌拉西林舒巴坦联合阿奇霉素抗感染治疗, 肺部症状改善欠佳, 于入院第 3 天行支气管镜检查, 镜下见支气管粘膜充血水肿, 较多白色分泌物, 右上肺段支气管开口部分分泌物堵塞, 留取肺泡灌洗液进行细菌培养和病毒 (巨细胞病毒、EB 病毒、呼吸道合胞病毒、肠道病毒)、肺炎支原体、结核等病原学分析及泛病原体基因芯片筛查。病毒、结核等病原学

检测采用 PCR 方法 (中山大学达安基因股份有限公司), 结果均为阴性。细菌培养结果阴性。

1.3 泛病原体基因芯片检测

使用北京天根生化科技有限公司病毒基因组核酸提取试剂盒, 按说明书提取、纯化肺泡灌洗液样本中的核酸。参照文献^[8], 提取的核酸行反转录生成 cDNA, 进行 PCR 扩增, 程序: 94℃ 预变性 2 min; 94℃ 变性 30 s、50℃ 退火 45 s、72℃ 延伸 1 min, 共 35 cycles, 72℃ 延伸 5 min。PCR 产物纯化后经随机引物和 Klenow 酶反应标记 cy5 荧光素。对照则标记 cy3 荧光素。对照来自无合并感染的慢性咳嗽病例为排除支气管异物时行支气管镜检留取的肺泡灌洗液标本。将 cy5 和 cy3 标记的 PCR 产物混合, 与泛病原体芯片 (Agilent 公司定制芯片) 65℃ 杂交 17 h, 清洗, Agilent 扫描仪扫描、提取数据并导入芯片判读软件进行判读。

1.4 芯片结果验证

对基因芯片检出的博卡病毒, 据文献^[9]设计博卡病毒种属特异性引物 (上游引物: GAGCTCTGTAAGTACTATTAC; 下游引物: CTCTGTGTTGACTGAATACAG)。PCR 扩增产物行双向测序 (上海铂尚生物技术有限公司)、序列 BLAST 比对确认。

2 结果

2.1 芯片杂交分析

杂交芯片背景干净, 红、绿、黄信号清晰可见 (图 1)。将杂交信号导入芯片判读软件进行分析, 选择属、种水平富集度高的进行统计学评估,

[收稿日期] 2016-03-24; [接受日期] 2016-04-21
[作者简介] 彭淑梅, 女, 主任医师。

结果显示：博卡病毒高度富集、位居首位，判定为阳性（表 1）。

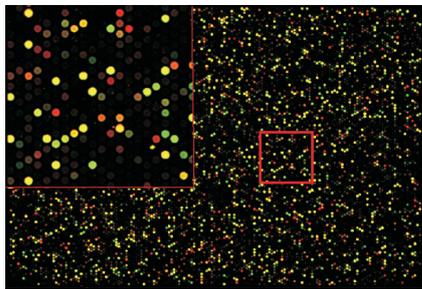


图 1 泛病原体基因芯片杂交图 左上角方框为小方框的放大图。黄色信号表示检测样本与对照样本的荧光素信号强度相近，红色信号表示检测样本的信号强于对照样本，绿色信号表示检测样本的荧光信号弱于对照样本。

表 1 病原体种水平的富集分析

病原体	ma	Mb	P 值
人博卡病毒	6	23	0.0005
仓鼠多瘤病毒	2	9	0.416
墨累溪谷脑炎病毒	2	14	0.724
化脓性链球菌	2	52	0.999

注：[ma] 检出的阳性探针数；[Mb] 针对该病原体设计的全部探针数。

2.2 博卡病毒验证

以原核酸样本为模板，PCR 扩增产物电泳显示预期大小特异性片段（354 bp），见图 2A。PCR 产物行双向测序，测序结果与 GenBank 公布的博卡病毒相关序列比对，证实为博卡病毒，与 Human bocavirus strain Lz13 及 Human bocavirus isolate BJ3111 同源性为 100%，系统进化树见图 3。

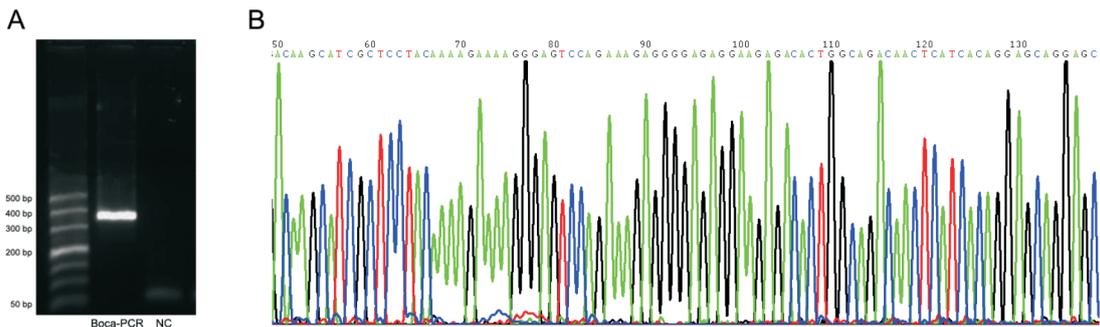


图 2 博卡病毒验证 A：PCR 产物琼脂糖凝胶电泳，片段大小 354 bp；B：PCR 产物测序峰图。

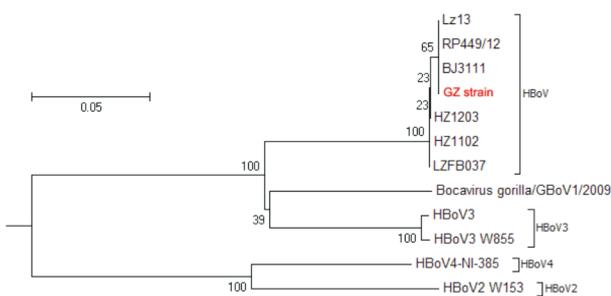


图 3 进化树分析 GZ strain 为本次在广州地区检出的博卡病毒株。

3 讨论

儿童呼吸道感染的病原学种类繁多，如涉及病毒、细菌、支原体、真菌等。此外，随着社会与时代的变迁，致病性病原体也处在变化之中，使得呼吸道感染的病原学诊断更具挑战。而准确

的病原学诊断是对因用药的重要基础。

泛病原体组学的方法包括高密度芯片技术和第二代测序技术^[10]。由于高密度芯片技术在实验操作和数据分析上相对简单，因此美国研发的 Virochip、GreeneChip、MDA，以及新加坡研发的 PathogenChip 芯片都已用于临床^[11-16]，发现了多个罕见病原体感染的病例。利用我国自主研发的泛病原体芯片在不明原因的儿童手足口病、成人重症肺炎和腹泻患者中都检出了致病性的病原体^[8,17]。

本研究使用的芯片参考了国际上已有的泛病原体芯片，针对感染脊椎动物的病原体进行了探针设计，每种病原体设计了多条探针，覆盖面广，可同时检测 2000 余种病毒、124 个属的细菌、38 个属的真菌以及 47 个属的寄生虫。此外，由于所设计的探针为 60-mer 长度的探针，因此杂交具有一定的兼容性，能检出目前已知病原体基础上发

生的变种。但芯片技术的扩增利用了随机引物扩增的方法,因此灵敏度相对基于特异引物的PCR扩增低。再加上以非感染样本作为对照,芯片检出到的病原体,其信号丰度远超出对照水平,将正常人群可能携带的一些共生痕量微生物、即背景因素排除在外。这也是为什么在本研究中,芯片筛查出的阳性病原体经过PCR扩增后,条带都非常明显的原因。从样本采集到报告结果,本项检测可在30h内完成。特别是芯片数据判读部分,导入芯片的原始信号文件、利用在线判读软件,5min内就能得到结果。因此,芯片技术是不明原因感染的疑难病例进行病原学诊断的一个有力武器。

用于该病例病原学检测的试剂盒未覆盖常见的呼吸道病毒,如腺病毒、流感、副流感病毒,我们根据文献设计了腺病毒、副流感病毒、流感病毒的特异性PCR引物,对本例样本进行PCR扩增,结果均为阴性,与芯片筛查结果一致。尽管该病例血常规提示可能存在细菌感染,但在芯片中并未检测到细菌的探针信号。进一步,我们利用细菌通用引物进行扩增、测序,结果混杂、无规律,提示存在痕量、多种菌群。结合芯片结果显示博卡病毒高度富集,其他常见呼吸道病毒用芯片和PCR方法均未检出,可以排除其他病毒的共感染。因此,我们认为基于泛病原体芯片平台检出的单一博卡病毒在本例患儿的呼吸道感染过程中扮演关键角色。

人类博卡病毒属于细小病毒科、博卡病毒属。2005年瑞典科学家Allande首次在儿童呼吸道分泌物中发现了这种新病毒并命名^[18]。随后澳大利亚、日本、西班牙、印度等陆续对该病毒进行了报道,表明该病毒普遍存在,呈全球性分布^[19-24]。2006年,湖南发现我国第一例人类博卡病毒感染病例^[25]。一些研究表明,博卡病毒在呼吸道感染患儿的阳性率为4.53%,并非很罕见^[26]。博卡病毒感染的高发人群为6个月至3岁的婴幼儿,尤其1岁以下婴儿较多。可致上呼吸道感染、支气管炎、肺炎症状,主要表现为发热、咳嗽、流涕、喘息、腹泻等胃肠道症状。在本例中,前期经验性抗感染治疗效果欠佳,根据泛病原体芯片检出的结果,采取输注丙种球蛋白等治疗,病情逐渐好转、出院。

泛病原体芯片检测技术提供了一种系统、全

面的分析平台,具有独特的优势,可为不明原因感染的精确诊疗提供重要的技术支持。但高密度芯片耗材较为昂贵,不推荐作为常规病原学检测手段。

[参 考 文 献]

- [1] 季伟,陈慧中. 亟待提高对急性呼吸道感染多病原学联合检测重要性的认识[J]. 中华预防医学杂志, 2011, 45(3): 197-199.
- [2] Michelow IC, Olsen K, Lozano J, et al. Epidemiology and clinical characteristics of community-acquired pneumonia in hospitalized children[J]. Pediatrics, 2004, 113(4): 701-707.
- [3] 刘春艳,谢正德, Gonzalez R, 等. 儿童急性下呼吸道感染病毒病原学研究[J]. 中国实用儿科杂志, 2009, 24(4): 270-273.
- [4] 李红,卢囡囡,于娟,等. 西宁地区儿童急性呼吸道感染病毒病原学检测分析[J]. 中国妇幼保健, 2012, 27(1): 49-51.
- [5] 万凤国,陶云珍,张学兰,等. 7岁以下儿童急性下呼吸道感染病原学研究[J]. 中国实用儿科杂志, 2008, 23(12): 909-911.
- [6] 王淑会,季伟,张新星,等. 苏州地区14994例儿童呼吸道感染细菌病原学特点[J]. 中国当代儿科杂志, 2016, 18(1): 44-50.
- [7] 林立,李昌崇. 儿童社区获得性肺炎管理指南(2013修订)解读[J]. 中华妇幼临床医学杂志(电子版), 2014, 10(6): 728-732.
- [8] Huang WW, Yang YH, Zhang XL, et al. An easy operating pathogen microarray (EOPM) platform for rapid screening of vertebrate pathogens[J]. BMC Infect Dis, 2013, 13: 437.
- [9] Ma XM, Endo R, Ishiguro N, et al. Detection of human Bocavirus in Japanese children with lower respiratory tract infections[J]. J. Clin Microbiol, 2006, 44(3): 1132-1134.
- [10] McLoughlin KS. Microarrays for pathogen detection and analysis[J]. Brief Funct Genomics, 2011, 10(6): 342-353.
- [11] Wang D, Urisman A, Liu YT, et al. Viral discovery and sequence recovery using DNA microarrays[J]. PLoS Biology, 1(2): 257-260.
- [12] Chiu CY, Alizadeh AA, Rouskin S, et al. Diagnosis of a critical respiratory illness caused by human metapneumovirus by use of a pan-virus microarray[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(7): 2340-2343.
- [13] Palacios G, Quan PL, Jabado OJ, et al. Panmicrobial oligonucleotide array for diagnosis of infectious diseases[J]. Emerg Infect Dis, 2007, 13(1): 73-81.
- [14] Wong CW, Heng CL, Yee LW, et al. Optimization and clinical validation of a pathogen detection microarray[J]. Genome Biology, 2007, 8(5): R93.
- [15] Gardner SN, Jaing CJ, McLoughlin KS, et al. A microbial detection array (MDA) for viral and bacterial detection[J]. BMC Genomics, 2010, 11: 668.
- [16] Simões EA, Patel C, Sung WK, et al. Pathogen chip for respiratory tract infections[J]. J. Clin Microbiol, 2013, 51(3): 945-953.
- [17] 张学慧,李杰,高翔,等. 泛病原体生物芯片技术快速检测不明原因腹泻患者病原体[J]. 中华流行病学杂志, 2014,

- 35(4): 473-474.
- [18] Allander T, Tammi MT, Eriksson M, et al. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples[J]. Proc Natl Acad Sci, 2005, 102(36): 12891-12896.
- [19] Sloots TP, McErlean P, Speicher DJ, et al. Evidence of human coronavirus HKU 1 and human bocavirus in Australian children[J]. J Clin Virol, 2006, 35(1): 99-102.
- [20] Allander T, Jartti T, Gupta S, et al. Human bocavirus and acute wheezing in children[J]. Clin Infect Dis, 2007, 44(7): 904-910.
- [21] Garcia ML, Calvo RC, Pozo SF, et al. Human bocavirus infections in Spanish 0-14 year old, clinical and epidemiological characteristics of an emerging respiratory virus[J]. An Pediatr(Barc), 2007, 67(3): 212-219.
- [22] Brieu N, Guyon G, Rodiere M, et al. Human bocavirus infection in children with respiratory tract disease[J]. Pediatr Infect Dis J, 2008, 27(11): 969-973.
- [23] Bharaj P, Sullender WM, Kabra SK, et al. Human bocavirus infection in children with acute respiratory tract infection in India[J]. J Med Virol, 2010, 82(5): 812-816.
- [24] Martin ET, Fairchok MP, Kuypers J, et al. Frequent and prolonged shedding of bocavirus in young children attending daycare[J]. J Infect Dis, 2010, 201(11): 1625-1632.
- [25] 瞿小旺, 漆正宇, 段招军, 等. 儿童急性呼吸道博卡病毒感染 [J]. 病毒学报, 2006, 22(2): 79-81.
- [26] 王维, 林书祥, 李胜英, 等. 住院呼吸道感染患儿博卡病毒感染分析 [J]. 中国当代儿科杂志, 2016, 18(1): 39-43.
- (本文编辑: 俞燕)

· 消息 ·

“新生儿高级生命支持与呼吸机应用培训班” 通知

广州市医学会新生儿科分会、广州市妇女儿童医疗中心（广州市儿童医院）拟于 2016 年 7 月 21~24 日（21 日报到，24 日下午结束）在广州市联合举办“新生儿高级生命支持与呼吸机应用培训班”，为期 3 天。本项目系国家级继续教育项目（2016-06-03-065），学习结束授予 I 类学分 10 分。

本项目拟采用理论讲授与技能站培训的方法使学员掌握新生儿呼吸衰竭、新生儿休克、急性肾功能衰竭、心律失常、DIC、胃肠功能衰竭、脑功能衰竭和脑死亡的基本理论；掌握新生儿常频机械通气和高频振荡通气的临床应用；掌握新生儿危重症的诊断处理程序和评估方法；系统掌握新生儿复苏和新生儿高级生命支持技术；掌握除颤仪的使用以及心电图的解读等，并模拟 NICU 常见典型病例，借助智能模拟人、呼吸机等进行实例演练、分析和讨论，提高学员解决临床实际问题的能力。

报名办法及注意事项：学费（含资料费）900 元，食宿统一安排，费用自理。由于要分组进行技能培训，故限招 80 人（分 4 个技能站，每组 20 人）。有意参加者请来信、电话或电子邮件联系，并注明联系方式以便发送报到通知。主办方联系地址：广州市人民中路 318 号 广州市儿童医院新生儿科，邮编 510120；联系人和联系方式：尧杰，15521191236，E-mail: yaojie125034@163.com；周伟，13928737378，E-mail: zhouwei_pu002@126.com）。

广州市妇女儿童医疗中心 / 广州市儿童医院
2016 年 2 月 28 日