

· 现场调查 ·

肠道病毒 ECHO 19 型引起无菌性脑炎流行的诊断与遗传性分析

杨秀惠 严延生 何爱华 陈前进 张月花

【摘要】 目的 明确引起无菌性脑炎流行的病原,了解其遗传特征。方法 收集部分病例脑脊液及双份血清标本,同时应用传统的病毒分离及中和鉴定、RT-PCR 扩增肠道病毒目的基因片段及序列分析和双份血清中和抗体变化 3 种方法进行病因学诊断;并进一步针对病原进行基因序列测定和遗传树图构建分析。结果 直接从首例及随后送检的 18 份脑脊液标本中扩增出肠道病毒核酸进行了早期诊断;病毒分离鉴定及双份血清中和抗体检测结果为:用 RD 和 Hep-2 两种细胞从 30 份脑脊液标本中分离出肠道病毒 ECHO 19 型 16 株(阳性分离率为 53.33%),检测 5 例病例双份血清 ECHO 19 病毒中和抗体水平,其中 4 例双份血清抗体阳转或呈 4 倍及以上升高,同时也证实了肠道病毒 ECHO 19 为此次脑炎流行的病因;其中 5 株病毒 VP1 区全基因序列与已发表的其他 ECHO 19 病毒株进行比对分析,显示:本次分离株间核苷酸序列同源率为 98.9%~100.0%,来自于一个共同的祖先,而与已发表其他毒株间亲缘性较远,差异性为 13.0%~22.4%,属于一新的变异福建株。结论 此次无菌性脑炎流行的病原为一变异的 ECHO 19 病毒;运用分子生物学技术不仅可以达到早期诊断目的,而且可以从分子水平提示病毒的遗传特性。

【关键词】 肠道病毒 ECHO 19 型;脑炎,无菌性;遗传性分析

Molecular identification and genetic analysis of an echovirus 19-associated epidemic of aseptic encephalitis
YANG Xiu-hui*, YAN Yan-sheng, HE Ai-hua, CHEN Qian-jin, ZHANG Yue-hua. *Fujian Center for Disease Control and Prevention, Fuzhou 350001, China

Corresponding author: YAN Yan-sheng

【Abstract】 Objective To ascertain the pathogen of aseptic encephalitis epidemic in Long-Yan city in Fujian, and to find out the genetic characteristics of the virus. **Methods** Rapid detection of enteroviral RNA by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was directly carried out in cerebrospinal fluid (CSF) to isolate and identify the viruses from CSF at the same time, and to detect the neutralization antibody in two serum specimens collected in acute and convalescence phase. Nucleotides of VP1 region was also analyzed by constructing phylogenetic tree. **Results** ECHO 19 infection was rapidly diagnosed and sequence analysed by RT-PCR, and then echovirus type 19 from 16 of 30 CSF samples (53.33%) was isolated and detected using RD and Hep-2 cells simultaneously. The titer of ECHO 19 neutralization antibody became positive or increased by 4 times from acute to convalescence phase in 4 of the 5 patients. Phylogenetic analyses of the VP1 genes of these isolates showed that their nucleotides identity were 98.9%-100.0% which were different from those ECHO 19 from GeneBank database by 13.0%-22.4%. **Conclusion** The etiology of the epidemic of aseptic encephalitis was attributed to ECHO 19. The method of molecular identification not only provided rapid diagnosis of enterovirus infections, but also information about the genetic character of the viruses.

【Key words】 Enterovirus echovirus type 19; Encephalitis, aseptic; Phylogenetic analysis

儿童无菌性脑炎多是由病毒引起的中枢神经系统感染,肠道病毒是最常见的病原之一^[1]。与福建省毗邻的台湾地区曾于 1998 年和 2001 年分别

暴发主要由肠道病毒 71 型与埃柯病毒 (echovirus, ECHO) 30 引起的无菌性脑炎流行^[2,3]。2004 年入夏以来,福建省龙岩市第一医院收治的病毒性脑炎病例数多于往年的 3~4 倍,呈流行态势。采集部分病例脑脊液及血清标本,运用分子生物学方法结合传统的病毒分离、中和鉴定结果,确定其病原为肠道

基金项目:福建省科技重大专项基金资助项目(2004YZ01-2)

作者单位:350001 福州,福建省疾病预防控制中心(杨秀惠、严延生、何爱华);龙岩市疾病预防控制中心(陈前进、张月花)

通讯作者:严延生

病毒 ECHO 19 型。

材料与方法

1. 标本采集与保存:2004 年 4-8 月在 122 例病毒性脑炎病例中,采集 30 份病例脑脊液置于无菌管内,于 4℃ 以下低温保存。对 5 例采集急性期及恢复期双份血,仅 1 例同时有脑脊液标本,无菌分离血清后 -20℃ 以下保存。

2. 病毒分离及中和鉴定:将每份脑脊液同时接种于人上皮癌细胞(Hep-2)和人横纹肌瘤细胞(RD)各 2 管,待管内细胞长满单层时,每管接种 0.15 ml 的脑脊液,置于 37℃、5% 的二氧化碳培养箱内培养,每日观察细胞病变(CPE),待 CPE 达到卅以上将培养管置于 -20℃ 保存,即为阳性分离株;如果无 CPE,则盲传 2 代,每代连续观察 7 天以上,判为阴性株。

阳性分离株用 100TCID₅₀ 稀释度与等量 25 个中和单位组合血清充分混匀,于 37℃ 作用 1.5 h,加入相应的细胞悬液,每天观察细胞生长情况,至第 5 天与第 7 天时根据说明书判定结果。所用诊断血清有世界卫生组织赠送的 RIVM 和购于昆明生物制品所的 KMB 8 组合血清,所有的步骤及结果判定均按说明书进行。

3. 双份血清中和抗体滴度检测:将急性期与恢复期血清同时从 1:4 起倍比稀释,每个滴度 2 孔,每孔 50 μl,取等量含 100TCID₅₀ 的 ECHO 19 病毒悬液与之中和 1.5 h,然后加入细胞悬液,置 37℃、5% 的二氧化碳培养箱内培养,第 3、5 天观察细胞病变情况,以能完全中和病毒的最高稀释度为中和抗体滴度。实验中同时设细胞、血清及病毒对照。

4. 病毒核酸提取及 RT-PCR:用 Qiagen 公司的 RNA 柱提取试剂盒,直接从脑脊液提取病毒 RNA。经细胞培养阳性的病毒悬液用 Invitrogen 公司的 Trizol LS RNA 提取试剂盒提取核酸。所有操作均按说明书规定进行。

用于肠道病毒诊断的引物位于 5' UTR 保守区,除首例送检标本应用 PE2/PE1 引物进行 RT-PCR,为提高敏感性对其后送检的标本应用 RT 及巢式 PCR 进行诊断。其外套的上游引物 EV1 (5'-CGGTACCTTTGTACGCCTGT-3' 65~84),下游引物为 EV4 (5'-ATTGTCACCATAAGCAGCCA-3' 594~575),内套上游引物 PE2 和下游引物 PE1 以及扩增 VP1 全长的 008 和 011 两对引物均参照参

考文献[4]。引物核苷酸的位置均以 PV1-Mahoney 株为参照。

RT 反应参照 Biolab 公司 M-MuLV 逆转录酶的操作说明书进行。第一轮 PCR 反应体系是:逆转录 cDNA 10 μl、上下游引物各 1 μl、dNTP 2 μl、Taq 酶(Biolab 公司) 1 μl、10× Taq 酶缓冲液 5 μl、高压去离子水 30 μl;反应条件是:94℃ 5 min,94℃ 30 s、42℃ 30 s、72℃ 1 min 35 个循环。反应后转入 72℃ 10 min。内套 PCR 反应体系是:第一轮反应产物 3 μl、内套上下游引物各 1 μl、dNTP 2 μl、Taq 酶(Biolab 公司) 1 μl、10× Taq 酶缓冲液 5 μl、高压去离子水 37 μl;反应条件是:94℃ 5 min,94℃ 30 s、50℃ 30 s、72℃ 1 min 35 个循环。反应后转入 72℃ 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

5. 序列测定及分析:PCR 产物用 QIA 纯化试剂盒(QIAquick Gel Extraction Kit)进行纯化,然后用 ABI 公司的 DNA Sequenceing Kit (Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction)进行标记反应。标记反应后 CENTRISEP COLUMNS 试剂盒去除多余引物等干扰物质,最后在 ABI PRISMTM 310 Genetic Analyzer 进行全自动序列测定。序列结果用 Sequencher、Bioedit、MacVector、Mega 软件进行编辑分析。

结 果

1. 流行病学概况:2004 年 4 月开始龙岩市第一医院收治的病毒性脑炎病例与 2002 年及 2003 年同期相比,增多了 3~4 倍,仅 4-8 月份达 122 例,比 2002 年及 2003 年(分别 69 例与 71 例)全年还多,呈流行势态。病例主要集中在 4-8 月,以 5~12 岁儿童居多(占 71.13%),男童的病例数约是女童的 2 倍,病例波及全市除武平县以外的 6 个县区及毗邻的广东省大埔县,66% 病例集中在新罗区,其次是其周边的城区,这可能与医院所处地理位置有关。

2. 临床表现:病例均突然起病,大部分有发热,体温多为 38~39℃,头痛、呕吐症状明显,部分病例有咳嗽、嗜睡、抽搐。查体见大部分病例病理征阴性,少数病例巴氏征阳性,无其他异常。所有病例入院后经用抗病毒药物及对症支持治疗后好转,平均病程 10 天,无死亡及留有后遗症病例。

3. 病毒分离及中和鉴定:30 份病例脑脊液标本,16 份病毒分离阳性,阳性分离率达 53.33%。分离阳性的脑脊液标本均采自发病 7 天以内,7 天内

标本分离阳性率为 59.26%。两种细胞的阳性分离率, RD 高于 Hep-2 细胞, 从 CPE 过程看, RD 细胞上的 CPE 产生早且进展较 Hep-2 快(表 1)。第 1 份送检脑脊液标本用 RIVM 组合血清未鉴定出血清型(因其不含 ECHO 19 抗血清), 而后改用 KMB 组合血清鉴定 16 份阳性分离株均为 ECHO 19 型。

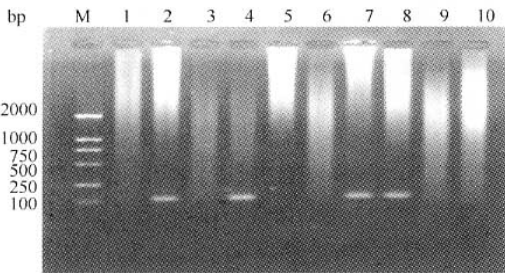
表1 RD 和 Hep-2 两种细胞的病毒分离情况

| 方法 | Hep-2 | | 合计 |
|------|---------|----|----------|
| | + | - | |
| RD + | 8 | 7 | 15(50.0) |
| - | 1 | 14 | 15 |
| 合计 | 9(30.0) | 21 | 30 |

注: 括号内、外数据分别为阳性率(%)和份数

4. 血清中和抗体滴度检测: 采双份血清的 5 例病例中, 早期中和抗体滴度均 $\leq 1:4$, 其中有 4 例恢复期中抗体滴度阳转或呈 4 倍及以上增长均 $\geq 1:16$, 1 例双份血清抗体滴度均为 $1:4$ 。从血清学角度也证实了此次流行为 ECHO 19 型引起。

5. RT-PCR 及基因定型: 第 1 份送检脑脊液标本直接提取病毒 RNA, 用肠道病毒诊断引物 PE2/PE1 进行 RT-PCR 扩增并获得了目的基因片段, 迅速判断此脑脊液标本中含肠道病毒 RNA。对随后送检的 29 份标本, 除一份因标本量少外, 在进行病毒分离同时进行 RT-nPCR 诊断, 结果共有 19 份标本检测阳性, 图 1 显示其中 10 份标本核酸检测结果。与病毒培养结果相比(表 2), 阳性检出率显著高于细胞培养(Fisher 双侧精确概率 $P = 0.016$)。



M: Marker; 1: csf04-1⁺; 2~10: csf04

图1 无菌性脑炎病例脑脊液标本肠道病毒核酸检测结果 (第二轮 PCR 扩增结果)

表2 病毒培养与 RT-PCR 检测结果比较

| 方法 | RT-PCR | | 合计 |
|--------|--------|----|----|
| | + | - | |
| 细胞培养 + | 14 | 2 | 16 |
| - | 5 | 8 | 13 |
| 合计 | 19 | 10 | 29 |

注: 表内数据为检测份数

从 16 份阳性分离株中, 随机挑选 5 株用 008/011 引物扩增并测得 VP1 基因全长。应用 NCBI 网络所提供的 Blast 比对工具, 将 VP1 基因序列与其所提供的序列数据进行比对, 发现此 5 株均与 ECHO 19 型同源性最高(77.6%~87.0%), 与其同源性最近的其他血清型为 ECHO 11 型 (AY121423), 为 72.6%~72.9%。故根据分子生物学定型标准^[5,6], 可判断此次引起脑炎暴发的病原为 ECHO 19 型, 与血清中和鉴定结果一致。

6. VP1 基因遗传性分析: 已发表的 ECHO 19 型 VP1 区基因序列数据只有 5 个 (GenBank 序列号分别为: AF081332, AY167107, AJ241438, AY302544, AJ241430), 将其与本次分离株及 ECHO 11 型 (AY121423) 进行同源性分析(表 3), 结果显示: 本次分离株与 AF081332 株 (86.6%~87.0%) 之间核苷酸同源性最近, 与其他 4 株同源性均低于 80.0%, 可见引起本次无菌性脑膜炎的 ECHO 19 型与国外株亲缘关系较远, 是一新的变异株; 本次分离株之间 VP1 全长 879 个核苷酸差异为 0.6%~1.1%, 按核苷酸差异 $< 2\%$ 为有直接流行病学联系的判断标准, 判定本次分离株间有着直接的流行病学联系, 说明本次无菌性脑炎的流行为同一传染源引起; 氨基酸序列的比对结果同核苷酸一致, 本次分离株间同源性为 98.9%~100.0%, 与其他 ECHO 19 型病毒株差异性均 $> 2\%$, 与 ECHO 11 型 (AY121423) 同源性低于 85%。

将上述毒株 VP1 全基因序列构建遗传树图(图 2), 结果显示: 本次分离株独立一支, Bootstrap 值为 100, 与其他毒株之间距离较远, 分属不同的分支。

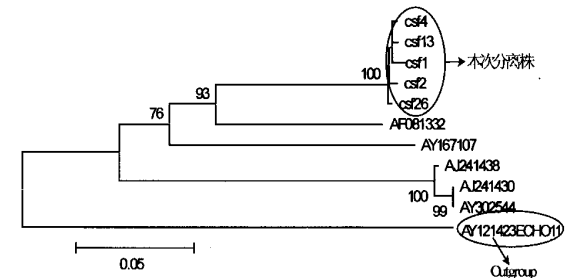


图2 ECHO 19 型 VP1 区遗传树分析

讨论

肠道病毒是引起无菌性脑炎常见的病原体, 一些型别可引起疾病爆发性流行, 且症状严重, 甚至导致猝死, 如新型肠道病毒 71 型。据美国疾病预防控制中心

制中心(CDC)历年的监测数据显示^[7-9], ECHO 6、9、11、13 和 30 等是引起无菌性脑膜炎较常见的血清型。引起本次无菌性脑膜炎流行的 ECHO 19 型在美国 CDC 的 1993-2001 年监测数据中均不在前 15 位优势血清型中,国内也未见由其引起的无菌性脑膜炎流行的报告。但据文献报道^[10,11], ECHO 19 型曾于 1974-1975 年在英格兰西北部、爱尔兰的北部地区引起以无菌性脑膜炎和上呼吸道感染为主的疾病大流行;1975-1976 年引起新西兰奥克兰地区同样症状的疾病暴发^[12]。因此本次在福建省龙岩市流行的 ECHO 19 型无菌性脑膜炎病例,目前虽无较严重病例发现,但其波及范围较广(7 个县中仅 1 个县未发现病例,其中还有 2 例病例来自其邻近的广东省),故必须继续对该病毒进行监测,以防其进一步扩散。

因肠道病毒引起的无菌性脑炎症状一般较单纯疱疹病毒轻,且病程较短,而传统的病毒分离鉴定方法又繁琐费时,故目前国内对此类病例诊断不多,报道较少。本次运用 RT-PCR 及 nPCR 方法直接从脑脊液标本中扩增肠道病毒核酸进行诊断,对疾病流行早期诊断及制定有效控制措施提供有利的实验室

支持。根据文献报道^[4,5],分析抗原位点集中且变异较大的衣壳蛋白 VP1 全基因序列或对 VP1 部分基因序列进行分子生物学定型较分析其他区域(UTR、VP2-VP4、3D 区等)更为正确,故此次 VP1 基因序列分析不仅正确鉴定了肠道病毒的型别为 ECHO 19,同时揭示了引起本次流行的 ECHO 19 型的遗传学特征:本次流行株与已公开发表的国外株同源性较低,为一新的变异株。

在对病原诊断中也运用了传统的病毒分离、鉴定和双份血清中和抗体检测进行验证。在病毒分离中应用两种细胞,其中 RD 细胞分离率高于 Hep-2 细胞,但 RD 细胞也存在漏检,所以病毒分离必须用多种细胞同时进行,以提高分离率。在双份血清中和抗体检测中,病例早期血清 ECHO 19 型的中和抗体均 $\leq 1:4$,提示:在非脊髓灰质其他肠道病毒无疫苗保护情况下,某个血清型在人群中感染率下降或病毒变异,导致人群中相应型别的中和抗体水平降低,无法形成免疫屏障,一旦病毒传入,就能引起疾病流行传播。因此进行人群肠道病毒监测,可对其相关疾病的发生进行早期预测及预报,有利于早期采取控制措施,避免疾病的扩散发展。

表 3 ECHO 19 型 VP1 全长氨基酸与核苷酸同源性比较

| | csf26 | csf2 | csf4 | csf13 | csf1 | AF081332 | AY167107 | AJ241438 | AY302544 | AJ241430 | AY121423 |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| csf26 | 1.000 | 0.996 | 0.993 | 0.996 | 0.979 | 0.959 | 0.921 | 0.921 | 0.935 | 0.825 | |
| csf2 | 0.994 | 1.000 | 0.996 | 0.993 | 0.979 | 0.959 | 0.921 | 0.921 | 0.935 | 0.825 | |
| csf4 | 0.994 | 0.993 | 1.000 | 0.989 | 0.976 | 0.955 | 0.918 | 0.918 | 0.931 | 0.822 | |
| csf13 | 0.993 | 0.992 | 0.994 | 1.000 | 0.972 | 0.952 | 0.914 | 0.914 | 0.928 | 0.819 | |
| csf1 | 0.990 | 0.989 | 0.992 | 0.990 | 0.976 | 0.955 | 0.918 | 0.918 | 0.931 | 0.825 | |
| AF081332 | 0.870 | 0.869 | 0.870 | 0.867 | 0.866 | 1.000 | 0.924 | 0.924 | 0.938 | 0.839 | |
| AY167107 | 0.830 | 0.827 | 0.829 | 0.826 | 0.825 | 0.836 | 1.000 | 0.924 | 0.938 | 0.819 | |
| AJ241438 | 0.779 | 0.778 | 0.777 | 0.776 | 0.779 | 0.794 | 0.789 | 1.000 | 0.972 | 0.822 | |
| AY302544 | 0.779 | 0.778 | 0.777 | 0.776 | 0.779 | 0.794 | 0.789 | 1.000 | 0.972 | 0.822 | |
| AJ241430 | 0.783 | 0.782 | 0.781 | 0.780 | 0.783 | 0.798 | 0.792 | 0.990 | 0.990 | 0.825 | |
| AY121423 | 0.729 | 0.728 | 0.726 | 0.723 | 0.726 | 0.717 | 0.706 | 0.709 | 0.709 | 0.711 | |

注:矩阵右上方为氨基酸同源性比较,左下方为核苷酸同源性比较

参 考 文 献

- 左启华. 小儿神经系统疾病. 第 1 版. 北京:人民卫生出版社, 1981. 328-342.
- Ho M, Chen ER, Hsu KH, et al. The enterovirus type 71 epidemic of Taiwan, 1998. *N Engl J Med*, 1999, 341: 929-935.
- Wang JR, Tsai HP, Huang SW, et al. Laboratory diagnose and genetic analysis of an echovirus 30-associated outbreak of aseptic meningitis in Taiwan in 2001. *JCM*, 2002, 40: 4439-4444.
- Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, et al. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J Virol*, 1999, 73: 1941-1948.
- Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, et al. Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *JCM*, 1999, 37: 1288-1293.
- Palacios G, Casaa I, Tenorio A, et al. Molecular identification of enterovirus by analyzing a partial VP1 genomic region with different methods. *JCM*, 2002, 40: 182-192.
- CDC. Nonpolio enterovirus surveillance—United States, 1993 - 1996. *MMWR*, 1997, 46: 748-750.
- CDC. Enterovirus surveillance—United States, 1997 - 1999. *MMWR*, 2000, 49: 913-916.
- CDC. Enterovirus surveillance—United States, 2000 - 2001. *MMWR*, 2002, 51: 1047-1049.
- Codd AA, Hale JH. Epidemic of ECV19 in the north-east of England. *J Hyg(Lond)*, 1976, 76: 307-317.
- Connolly JH, O' Neill HJ. Echovirus type 19 outbreak in northern Ireland during 1974 - 1975. *Ulster Med J*, 1977, 46: 50-52.
- Gold Water PN. Echovirus 19 outbreak in Auckland 1975 - 1976. *N Z Med J*, 1977, 86: 319-322.

(收稿日期: 2004-12-23)

(本文编辑: 张林东)