

柯萨奇B5病毒引起山东省一起无菌性脑膜炎暴发的鉴定及其亲缘进化分析

王海岩 李岩 徐爱强 张勇 陶泽新 刘桂芳 刘尧 宋立志 张丽
颜丙玉 纪峰 许文波

【摘要】 目的 鉴定引起2005年山东省兖州市一起无菌性脑膜炎暴发的病原体,并对分离的柯萨奇B5病毒(CVB5)进行基因特征分析。方法 从兖州市无菌性脑膜炎暴发期间部分住院患者中采集78份粪便标本和58份脑脊液标本进行病毒分离和血清型鉴定;同时对其阳性分离物采用反转录-聚合酶链反应进行分子定型,对其中的CVB5进行全长VP1区核苷酸序列测定和亲缘进化分析。结果 78份粪便标本和58份脑脊液标本的病毒分离率分别为38.5%(30/78)和48.3%(28/58)。58株阳性分离物的血清型鉴定和分子定型结果显示,其中54株为CVB5,2株为ECHO24, CVB3和CVA9各1株。病原学结果显示引起此次无菌性脑膜炎暴发的病原体主要为CVB5。同源性分析显示, CVB5分离株与2002年浙江分离株(Zhejiang/12/02株)在核苷酸水平上同源性最近,为97.5%~97.8%;与CVB5原型株(Faulkner株)相比核苷酸同源性为78.3%~78.6%。VP1区亲缘进化树显示CVB5可以分为A、B、C、D 4个基因型,引起本次暴发的CVB5属于基因型D。结论 CVB5是引起兖州市无菌性脑膜炎暴发的病原体。优势基因型的变迁可能是造成无菌性脑膜炎反复暴发的因素之一。

【关键词】 柯萨奇B5病毒; 无菌性脑膜炎; 亲缘进化分析

Identification and phylogenetic analysis of Coxsackie-virus B5 during an outbreak of aseptic meningitis in Shandong WANG Hai-yan¹, LI Yan¹, XU Ai-qiang¹, ZHANG Yong², TAO Ze-xin¹, LIU Gui-fang¹, LIU Yao¹, SONG Li-zhi¹, ZHANG Li¹, YAN Bing-yu¹, JI Feng¹, XU Wen-bo². 1 Shandong Provincial Center for Disease Control and Prevention, Jinan 250014, China; 2 National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention
Corresponding author: XU Ai-qiang, Email: aqxuepi@163.com
This work was supported by a grant from the Shandong Scientific Research Major Project on Medicine (No.2007HZ090)

【Abstract】 **Objective** To identify the pathogen that caused an outbreak of aseptic meningitis in Shandong province in 2005. Phylogenetic analysis was carried out on Coxsackie-virus B5 (CVB5) which was isolated during this outbreak. **Methods** 78 stool and 58 cerebrospinal fluids (CSF) specimens were collected from some inpatients during this outbreak. Virus isolation and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was then performed. Phylogenetic trees based on entire and partial VP1 sequences were constructed among CVB5 isolates and others published in GenBank. **Results** The isolation rates of stool and CSF specimens were 38.5% (30/78) and 48.3% (28/58) respectively. Among the results of serotype identification and molecular typing of 58 positive isolates, 54 were identified as CVB5, 2 as ECHO24, 1 as CVB3 and 1 as CVA9. Results from viral investigation showed that CVB5 was the main pathogen causing this outbreak. Data from homological comparisons indicated that Shandong strains had the highest nucleotide acid identity with the Zhejiang/12/02 strain (97.5%~97.8%), and lower identity (78.3%~78.6%) with the prototype strain (Faulkner strain). Phylogenetic tree in VP1 region showed that CVB5 could be separated into four genotypes. Isolates of this outbreak belonged to genotype D. **Conclusion** CVB5 was the major etiological agent correlated with this outbreak. The shift of predominant genotype might serve as one of the causes that associated with the outbreaks of aseptic meningitis.

【Key words】 Coxsackie-virus B5; Aseptic meningitis; Phylogenetic analysis

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.01.016

基金项目:山东省医药卫生重点项目(2007HZ090)

作者单位:250014 济南,山东省疾病预防控制中心(王海岩、李岩、徐爱强、陶泽新、刘桂芳、刘尧、宋立志、张丽、颜丙玉、纪峰);中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所国家脊髓灰质炎实验室(张勇、许文波)

王海岩、李岩同为第一作者

通信作者:徐爱强, Email: aqxuepi@163.com

人肠道病毒(HEV)属于小核糖核酸病毒科肠道病毒属,根据其对人致病性、抗原特性及小鼠颅内接种后的致病性,最初分为4类,即脊髓灰质炎病毒(PV)、柯萨奇A组病毒(CVA)和B组病毒(CVB)以及埃可病毒(ECHO)。随着分子生物学技术的不断进步,HEV被按照其不同的遗传特性划分为A、B、C、D 4个组,其中所有血清型的CVB和ECHO都属于B组^[1]。CVB共分为6个血清型(CVB1~CVB6),能在人群中引起小范围的流行,进一步研究发现CVB还和一些慢性疾病的发生密切相关^[2]。本研究对2005年夏秋季山东省兖州市发生的一起不明原因的脑膜炎暴发进行了分子分型及同源性分析^[3]。

材料与方法

1. 临床标本:2005年夏秋季山东省兖州市发生了一起不明原因的脑膜炎暴发,在初步排除细菌性脑膜炎的基础上,采集了部分住院患者的脑脊液标本58份和粪便标本78份进行病毒分离,标本在无菌容器内冷藏运送至山东省疾病预防控制中心(CDC),粪便标本在接种到细胞之前按照WHO《脊髓灰质炎实验室手册》第4版的操作规程进行预处理^[4]。

2. 病毒分离与血清学定型:取0.2 ml粪便标本悬液或脑脊液标本接种到人横纹肌肉瘤细胞(RD)、人喉癌上皮细胞(HEp-2)和非洲绿猴肾上皮细胞(Vero)上,36℃培养,每份标本至少传两代;如果不出现细胞致病变效应(CPE),则判为阴性结果;如果出现了肠道病毒特异的CPE,则收获,于-20℃保存。然后分别使用HEV组合血清(KMB),CVB组单型抗血清进行血清型别鉴定,方法为微量中和试验法。3种细胞由中国CDC病毒病预防控制所提供,血清和标准毒株(CVB5/Faulkner)均由中国医学科学院医学生物学研究所肠道病毒血清室提供。

3. RNA提取和RT-PCR:使用QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA)提取病毒的RNA,从140 μl的病毒分离物中提取50 μl的总RNA,提取的RNA保存在-20℃待用。参照参考文献[5]方法合成肠道病毒VP1区分子定型引物012、011和040,稀释至工作浓度25 μmol/L。使用One-step RT-PCR Kit (Promega, USA)进行RT-PCR反应,反应条件为:50℃反转录35 min,94℃预变性3 min,32个循环:94℃30 s,45℃30 s,72℃40 s;最后72℃延伸10 min;设立阴性对照,使用2%琼脂糖凝胶对PCR产物进行电泳分析。

4. CVB5全长VP1区扩增:在已鉴定为CVB5的分离物中,随机选择10株不同来源毒株(脑脊液标本3株,粪便标本7株)进行全长VP1区核苷酸序列测定和分析。CVB5全长VP1扩增引物由中国CDC病毒病预防控制所提供;上游引物:CB5-S(5'-TGA CCT GCT GGT ATC AAA CG-3');下游引物:CB5-A(5'-AAC ACC GGC TCT GGC TAT GG-3'),引物浓度25 μmol/L。使用One-step RT-PCR Kit (Promega, USA)进行RT-PCR反应;反应条件:50℃反转录35 min,94℃预变性3 min;35个循环:94℃30 s,45℃30 s,72℃70 s;最后72℃延伸10 min,设立阴性对照,使用2%琼脂糖凝胶对PCR产物进行电泳分析。

5. 核苷酸序列测定和分析:PCR产物经纯化(QIAquick Gel Extraction Kit)后,采用末端双脱氧终止法进行标记反应(BigDye Terminator v3.0 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, Foster City, USA)。标记反应产物再经葡聚糖凝胶G-50 (Pharmacia, Sweden)纯化后,使用ABI公司的3100型序列测定分析仪(Applied Biosystems, Hitachi, Japan)进行序列测定。

6. 生物信息学分析:使用Squencher 4.0.5软件对核苷酸序列进行整理,多序列比对采用BioEdit Sequence Alignment Editor software 5.0.9软件;使用MEGA4.0软件邻接法(neighbor-joining)构建系统发生树,建树的可靠性通过1000 bootstrap值来评估。将此次暴发中分离到的10株CVB5 VP1区核苷酸序列已提交至GenBank数据库,序列号为DQ246506~DQ246515。

结 果

1. 病原学鉴定:兖州市无菌性脑膜炎暴发共报告病例280例,罹患率为0.46‰。78份粪便标本和58份脑脊液标本分别分离到30株和28株病毒,分离率为38.5%和48.3%。对所有阳性分离株采用HEV组合血清进行鉴定,从粪便标本中分离到的30株阳性分离物中有26株鉴定为CVB5,1株为CVA9,3株不能定型。从脑脊液中分离到的28株阳性分离物中,除1株为CVB3外,其余均为CVB5。分子定型结果显示,未定型毒株中1株为CVB5,另外2株为ECHO24,其余与中和试验结果一致(表1)。5例患者的粪便和脑脊液标本中同时分离到CVB5,证实引起此次无菌性脑膜炎暴发的病原体主要为CVB5。

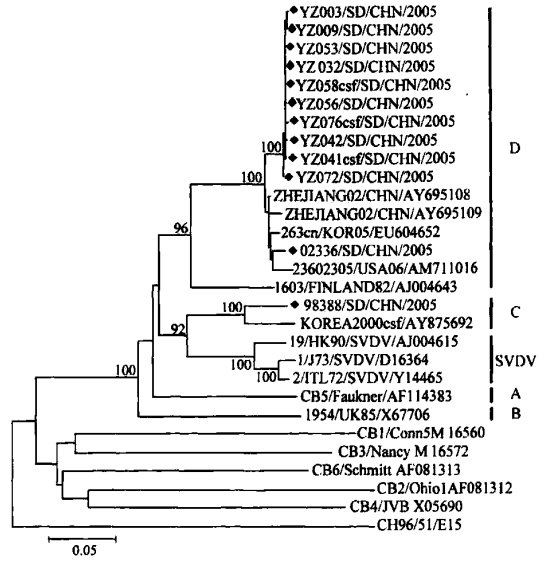
表1 兖州市无细菌脑膜炎报告病例临床标本病毒分离和鉴定结果

标本种类	标本数	病毒血清型				阳性数	阳性率 (%)
		CVA9	CVB3	CVB5	ECHO24		
粪便	78	1	0	27	2	30	38.5
脑脊液	58	0	1	27	0	28	48.3
合计	136	1	1	54	2	58	42.6

2. CVB5全长VP1区同源性分析:随机选取10株CVB5分离株进行全长VP1区核苷酸序列测定和分析,所有毒株VP1区核苷酸序列长度均为849 bp,编码283个氨基酸;核苷酸同源性为99.5%~100%,氨基酸同源性为99.4%~100%;证明这些CVB5来源于同一个传播链。与此次暴发分离株同源性最近的是2002年浙江省脑膜炎分离株,核苷酸同源性为97.5%~97.8%,氨基酸同源性为99.6%~100%;与原型株Faulkner相比,核苷酸同源性为78.3%~78.6%,氨基酸同源性为93.6%~94.4%。

3. CVB5进化分析:为了进一步分析CVB5的基因变异规律以及国内外CVB5的遗传进化关系,将本次无细菌脑膜炎暴发中分离到的10株分离株与山东省往年分离到的2株病毒(98388/SD/CHN/1998, 02336/SD/CHN/2002)以及GenBank上检索到的11株CVB5病毒的全长VP1区核苷酸序列构建亲缘进化树。进化树分析表明,所有CVB5毒株明显的区别于其他血清型的CVB病毒(bootstrap值为100);构成一个单独的分支(图1)。CVB5根据其核苷酸同源性可划分为A、B、C、D 4个基因型;其中原型株(Faulkner株)是基因型A的惟一成员。1985年英国手足口病患者的分离株(1954-UK85株)属于基因型B;基因型C由山东省1998年分离株和韩国2000年脑膜炎分离株构成,与他们同源性最近的是3株猪水疱病毒(SVDV);基因型D的成员包括了本次暴发的分离株,2002年山东分离株,以及近年来中国浙江、韩国、美国、芬兰的脑膜炎分离株。核苷酸同源性比较显示,各基因型成员之间核苷酸同源性最低72.2%,最高81.6%,基因型内部成员之间的同源性均>80%,分离自1950年的原型株(Faulkner株)与其他基因型成员的差异在19.4%~26.9%(表

2)。



注:◆代表山东省CVB5地方株,ECHO15毒株CH96-51株作为组外对照

图1 CVB5全长VP1编码区核苷酸序列进化树

由于GenBank数据库中登录的全长VP1区核苷酸序列较少,而以往的研究表明VP1区3'端365 bp的核苷酸序列包含肠道病毒血清型特异性信息,该区域序列与原型株比较同源性>75%可以确定为相同血清型病毒^[6]。针对此区域的亲缘进化树显示, CVB5仍可以分为4个基因型,与基于全长VP1区核苷酸的划分结果基本一致。随着核苷酸序列的增加,基因型的划分可以显示出CVB5在地理和时间上的分布,原型株(Faulkner株)仍为基因型A的惟一成员,基因型B又可分为3个基因亚型,涵盖了1984-2002年土耳其、瑞典、比利时、英国、美国等欧美地区的分离株;基因组D可以分为2个基因亚型,主要包括近年亚洲地区中国和韩国的脑膜炎分离株,但是在D1亚型中包含了芬兰和法国的2个分离株,在D2亚型中有1株2006年美国分离株(图2)。

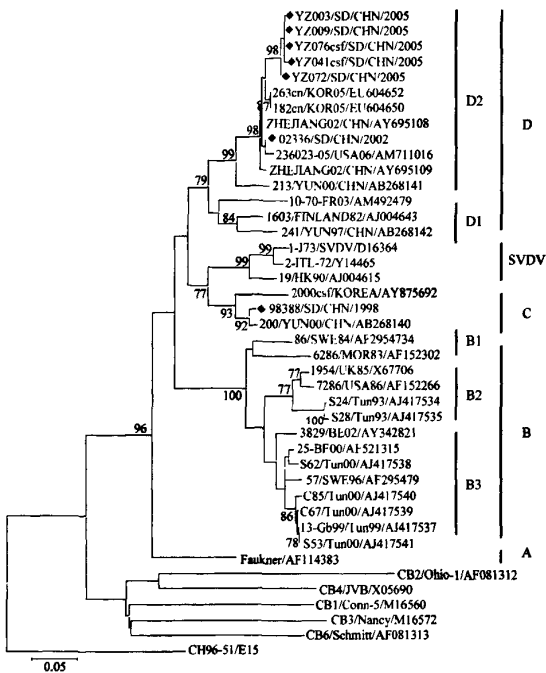
讨 论

全球范围内与CVB相关的无细菌脑膜炎散发

表2 CVB5病毒4个基因型的组间及组内核苷酸(氨基酸)同源性(%)分析

基因型	A	B	C	D	SVDV	
A	—	77.6(95.7)	79.4~79.5(96.8~98.2)	74.7~80.3(96.3~96.6)	72.2~73.8(94.1~98.8)	
B		—	72.2~74.9(95.3~95.7)	74.8~77.0(96.3~97.0)	77.5~78.4(93.3~94.7)	
C			—	78.8~81.6(92.6~96.6)	82.2~84.3(94.6~95.9)	
D				—	79.1~84.8(94.4~96.2)	
SVDV					—	
						94.6~97.8(98.4~98.8)

注:—:基因型A、B各只有1个成员



注：◆代表山东省 CVB5 地方株，ECHO15 毒株 CH96-51 株作为外部对照

图 2 CVB5 VP1 编码区部分核苷酸序列(330 bp)进化树

病例和爆发性流行每年都有报道。早期研究表明在 CVB 的 6 个血清型中，CVB2、CVB4、CVB6 是引起婴幼儿无菌性脑膜炎最主要的病原体^[7]。但是近几年中国大陆 CVB3 和 CVB5 引起的无菌性脑膜炎的流行报道较多^[8-10]。在 2005 年山东省的无菌性脑膜炎暴发中采集的患者临床标本中，分离到的病毒以 CVB5 为主，占 93.1%；尽管在 1 例患者的粪便标本中分离到的 CVA9，另 1 例患者的脑脊液标本中分离到 CVB3，但是脑脊液标本中 CVB5 的分离率高达 48.3%，充分说明 CVB5 是引起此次脑膜炎暴发的主要病原体；部分患者可能由 CVB3 或 CVA9 引起。本次暴发中，脑脊液标本的采集时间距离发病时间间隔在 0~11 d 之间，平均 6 d，说明在 HEV 引起的中枢神经系统疾病中，在发病 1 周内采集患者脑脊液标本进行病毒分离具有较高的诊断价值。

CVB5 引起的疾病逐渐被人们熟识，但对该病毒株的遗传特性及其分子流行病学研究开展不多。本次研究以全长 VP1 区核苷酸序列为目的片段对 CVB5 进行遗传进化分析。亲缘进化树分析表明，CVB5 可以被分为 4 个基因型，亲缘进化树 bootstrap 值 >75% 支持了对各基因型的划分。再次验证了根据全长 VP1 区核苷酸序列同源性对同型 HEV 进行“基因型”划分的理论：即相同基因型毒株之间序列

同源性 >80%，不同基因型成员之间序列差异大于型内成员之间的差异^[11-13]。VP1 区部分核苷酸序列亲缘进化树显示 CVB5 在地理和时间分布上有一定的聚集性，CVB5 原型株 (Faulkner 株) 分离自 1950 年，是基因型 A 的惟一成员，基因型 B 在 1985—2002 年流行于欧美地区的多个国家，基因型 D 则是近年来引起亚洲地区无菌性脑膜炎的优势基因型，在 2000 年以后主要分布于亚洲的中国、韩国；但是在 2003 年法国和 2006 年美国也分离到 D 型毒株，提示 D 型是目前在世界范围内广泛流行的基因型。山东省 1998 年的分离株 98388/SD/CHN/1998、云南省 2000 年分离株 200/YUN00 同属于基因型 C，两省分离到的其他毒株和浙江省毒株则属于基因型 D，说明中国大陆至少存在 2 种基因型 CVB5 的传播链，不同基因型的循环出现，可能是引起无菌性脑膜炎暴发的原因之一。SVDV 在抗原性上与 CVB5 相似，可以被原型株 Faulkner 株的抗血清所中和，反之亦然，一般只在猪中间流行，不引起人类发病^[14]。亲缘进化树显示其与 CVB5 基因型 C 同源性最近，核苷酸同源性在 82.2%~84.3%，原则上可以划分为基因型 C 的成员。

美国 1997—1999 年肠道病毒监测系统数据显示 CVB5 并非排前 15 位的优势血清型，但到了 2000 年多个州出现了无菌性脑膜炎的流行，CVB5 排位升至第一，达到 34.4%^[15]。山东省对肠道病毒历年监测资料显示，ECHO 病毒所占比例较大，其中 2003 年 ECHO30 有过局部的流行，并引起了无菌性脑膜炎的暴发^[11]。本次病原体转变为 CVB5，说明环境中优势毒株的交替出现和易感人群的积累，是引起疾病流行的重要因素。因此，加强对 HEV 的常规监测，控制相关疾病的发生，将是消灭脊髓灰质炎以后我国预防控制肠道病毒所面临的另一重大课题。

(感谢济宁市和兖州市疾病预防控制中心工作人员在现场调查工作中的大力支持与合作)

参 考 文 献

[1] King A, Brown F, Christian P, et al. Picornavirida in Virus Taxonomy. Seventh Report of International Committee for the Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier Academic Press, 2000:657-683.
 [2] Pallansch MA, Roos RP. Enterovirus: polioviruses; coxsackieviruses; echoviruses, and newer enteroviruses. Fields Virology, 4th ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, 2001:655-712.
 [3] Yan BY, Zhang L, Xu AQ, et al. Analysis on an outbreak investigation of viral meningitis caused by CoxB5 virus. Prev Med Trib, 2007, 13(1):11-12. (in Chinese)

- 颜丙玉, 张丽, 徐爱强, 等. 一起柯萨奇 B5 病毒所致病毒性脑膜炎暴发调查. 预防医学论坛, 2007, 13(1): 11-12.
- [4] WHO. Polio laboratory manual, 4th ed. WHO, Geneva, Switzerland, 2004; 83-96.
- [5] Oberste MS, Mather 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(3): 1941-1948.
- [6] Oberste MS, Mather K, Kilpatrick DR, et al. Typing of human enteroviruses by partial sequence of VP1. J Clin Microbiol, 1999, 37(5): 1288-1293.
- [7] Rotbart HA, Sawyer MH, Fast S, et al. Diagnosis of enteroviral meningitis by using PCR with colorimetric microwell detection Assay. J Clin Microbiol, 1994, 32(10): 2590-2592.
- [8] Xu AQ, Wang TZ, Wang YC, et al. Surveillance on relationship between enteroviruses Infection and epidemic of non-bacterial encephalitis. Chin Public Health, 2002, 18(11): 1335-1337. (in Chinese)
徐爱强, 王同展, 王玉才, 等. 无菌性脑炎与肠道病毒感染关系的研究. 中国公共卫生, 2002, 18(11): 1335-1337.
- [9] Chen L, Zhao YP, Zhang LB, et al. Nucleotide sequence of Coxsackie B5 virus isolated from meningoencephalitis patient. Chin J Vaccines Immun, 2003, 9(2): 94-97. (in Chinese)
陈立, 赵月萍, 张礼壁, 等. 引起脑膜脑炎流行的柯萨奇 B5 病毒的序列分析. 中国计划免疫, 2003, 9(2): 94-97.
- [10] Ge Q, Lu YY, Yan JY, et al. Genetic characterization of the VP1 gene of the two strains of Coxsackie B5 virus isolated from Zhejiang province in 2002. Chin J Health Laboratory Technol, 2005, 15(2): 134-137. (in Chinese)
葛琼, 卢亦愚, 严菊英, 等. 浙江省 2002 年两例柯萨奇 B5 病毒 VP1 区基因特征分析. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(2): 134-137.
- [11] Wang HY, Xu AQ, Zhu Z, et al. The genetic characterization and molecular evolution of echovirus 30 during outbreaks of aseptic meningitis. Chin J Epidemiol, 2006, 27(9): 793-797. (in Chinese)
王海岩, 徐爱强, 朱贞, 等. 无菌性脑膜炎暴发中 Echo30 病毒的基因特征及分子进化分析. 中华流行病学杂志, 2006, 27(9): 793-797.
- [12] Oberste MS, Maher K, Kennett ML, et al. Molecular epidemiology and genetic diversity of echovirus type 30 (E30): genotype correlates with temporal dynamics of E30 isolation. J Clin Microbiol, 1999, 37(12): 3928-3933.
- [13] Oberste MS, Nix WA, Kilpatrick DR, et al. Molecular epidemiology and type-specific detection of echovirus 11 isolates from the Americas, Europe, Africa, Australia, Southern Asia and the Middle East. Virus Res, 2003, 91(2): 241-248.
- [14] Zhang G, Haydon DT, Knowles NJ, et al. Molecular evolution of swine vesicular disease virus. J Gen Virol, 1999, 80(3): 639-651.
- [15] Centers for Disease Control and Prevention. Nonpolio enterovirus surveillance United States, 1997-1999. MMWR, 2000, 49(40): 913-916.

(收稿日期: 2009-07-07)

(本文编辑: 尹廉)

(上接目录4)

- [6] 【题目】 加强对新生儿以外人群乙型肝炎疫苗免疫【第一作者】庄辉【年卷期页码】2004, 25(5): 376【被引频次】26
- [7] 【题目】 中国 1984—2002 年狂犬病流行情况及防控对策【第一作者】张永振【年卷期页码】2003, 24(10): 883-886【被引频次】26
- [8] 【题目】 我国人群脑卒中发病率、死亡率的流行病学研究【第一作者】赵冬【年卷期页码】2003, 24(3): 236-239【被引频次】26
- [9] 【题目】 中国 2001—2003 年流行性感流行特征分析【第一作者】张静【年卷期页码】2004, 25(6): 461-465【被引频次】24
- [10] 【题目】 广州市护士注射锐器伤相关危险因素的流行病学研究【第一作者】谢红珍【年卷期页码】2003, 24(3): 172-175【被引频次】22
- [11] 【题目】 中国人群 1991—2000 年伤害死亡的流行趋势和疾病负担【第一作者】杨功焕【年卷期页码】2004, 25(3): 193-198【被引频次】20
- [12] 【题目】 中国的自杀现状及未来的工作方向【第一作者】费立鹏【年卷期页码】2004, 25(4): 277-279【被引频次】19
- [13] 【题目】 中国控制血吸虫病流行的关键是人畜粪便【第一作者】王陇德【年卷期页码】2005, 26(12): 929-930【被引频次】18
- [14] 【题目】 中国中年人群高血压患病率及知晓率、治疗率、控制率的演变趋势【第一作者】王增武【年卷期页码】2004, 25(5): 407-411【被引频次】18
- [15] 【题目】 亚健康及其产生的三个主要原因【第一作者】董玉整【年卷期页码】2003, 24(9): 758-759【被引频次】18
- [16] 【题目】 中国居民营养与健康状况调查的总体方案【第一作者】杨晓光【年卷期页码】2005, 26(7): 471-474【被引频次】18
- [17] 【题目】 慢性乙型肝炎防治指南【第一作者】中华医学会肝病学会【年卷期页码】2006, 27(1): 79-88【被引频次】17
- [18] 【题目】 中国狂犬病流行近况及相关因素分析【第一作者】唐青【年卷期页码】2005, 26(3): 223-224【被引频次】17
- [19] 【题目】 中国 2005 年狂犬病流行相关因素分析【第一作者】宋森【年卷期页码】2006, 27(11): 756-759【被引频次】16
- [20] 【题目】 中国部分城市 2004 年 1389 例男男性接触者艾滋病高危行为及相关因素调查【第一作者】张北川【年卷期页码】2007, 28(1): 32-36【被引频次】15