

# 浙江省 2008—2012 年肠道病毒相关病毒性脑炎病原谱及分子流行病学特征分析

严菊英 缪梓萍 吕华坤 周佳悦 陈寅 卢亦愚 张严峻

**【摘要】** 目的 了解 2008—2012 年浙江省肠道病毒相关病毒性脑炎病原谱及分子流行病学特征。方法 从监测点采集疑似病毒性脑炎患者脑脊液和粪便样本利用 RD 和 Hep-2 细胞分离病毒,采用肠道病毒标准血清定型,并对分离株 VP1 基因测序,进行同源性与进化分析。结果 从 610 例患者 616 份样本中分离到人类肠道病毒(HEV)127 株(20.6%),其中柯萨奇病毒(CV)60 株,埃可病毒(ECHO:E)67 株,病毒血清型分别为 CVA9、CVB1、CVB3~5、E3、E4、E6、E9、E14、E25、E30。2008—2012 年优势株分别为 CVB3、CVB5、E6、E30 和 E30。各分离株 VP1 基因序列全长 834~918 个核苷酸,与相应原型株核苷酸(nt)和氨基酸(aa)的同源性分别为 76.7%~85.0% 和 91.1%~97.9%;浙江分离株型内差异最大为 E6, nt 和 aa 差异分别为 20.4% 和 4.8%。基于 VP1 基因的进化分析结果表明,浙江分离株均位于 HEV-B 分支上,并显示出一定地域和时间效应;E6 血清型内部又分成 2 小分支。结论 2008—2012 年浙江省病毒性脑炎的主要病原为 HEV-B,涉及 12 个血清型;不同年份优势流行株不断变化,E30 为绝对优势株;浙江 E6 分离株存在 2 个亚类流行株。

**【关键词】** 肠道病毒相关脑炎;病原谱;VP1 基因

**Etiological and molecular-epidemiological analysis on enterovirus associated encephalitis in Zhejiang, 2008–2012** YAN Ju-ying<sup>1</sup>, MIAO Zi-ping<sup>2</sup>, LV Hua-kun<sup>3</sup>, ZHOU Jia-yue<sup>1</sup>, CHEN Yin<sup>1</sup>, LU Yi-yu<sup>1</sup>, ZHANG Yan-jun<sup>1</sup>. 1 Department of Microbiology, 2 Department of Infectious Disease, Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310051, China

Corresponding author: YAN Ju-ying, Email: jyyan1960@hotmail.com

This work was supported by grants from the National Science and Technology Support Projects for the "Twelfth Five-Year Plan" of China (No. 2012ZX10004-210-002) and the Science and Technology Department of Zhejiang Province (No. 2012C33063).

**【Abstract】** **Objective** In order to investigate etiology and molecular-epidemiological characteristics of enterovirus associated encephalitis (EAE) in Zhejiang, 2008–2012. **Method** Cerebrospinal fluid and stool specimens were collected from suspected EAE patients, who were admitted to our hospitals. RD and Hep-2 cell lines were used to isolate enterovirus (EV). Serotypes of these EV isolates were identified through neutralization test by using serotype specific anti-sera. VP1 genes of these isolates were sequenced, compared and used for the construction of phylogenetic tree. **Results** 127 (20.6%) human enterovirus (HEV) strains were isolated from 616 samples, which were collected from 610 patients. Serotypes of these EV isolates, including 60 coxsackievirus (CV), and 67 Echovirus (E) appeared to be CVA9, CVB1, CVB3–5, E3, E4, E6, E9, E14, E25 and E30, respectively. Predominant EV serotypes on EAE from 2008 to 2012 were seen as CVB3, CVB5, E6, E30 and E30, respectively. The full length of VP1 genes from different EV isolates was between 834 and 918 nucleotides. The VP1 gene similarities between these isolates and the reference strains were from 76.7% to 85.0% (nucleotides level) and 91.1% to 97.9% (amino acids level). The VP1 genes from E6 serotype isolates appeared most diverged, reaching 20.4% (nucleotides level) and 4.8% (amino acids level). Based on the generated phylogenetic tree, all the EV isolates were fallen on the same branch of HEV-B, and the isolates in the same serotype formed one sub-branch, suggesting there existed geographical and temporal effects. E6 isolates diverged into two branchlets. **Conclusion** EVs

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.012.008

基金项目:国家科技重大专项(2012ZX10004-210-002);浙江省科技厅项目(2012C33063)

作者单位:310051 杭州,浙江省疾病预防控制中心微生物所(严菊英、周佳悦、陈寅、卢亦愚、张严峻),传染病防制所(缪梓萍、吕华坤)

通信作者:严菊英, Email: jyyan1960@hotmail.com

from HEV-B were the etiologic agents for EAE in Zhejiang province from 2008 to 2012. All these EV isolates showed 12 serotypes, with predominant isolates varied every year. E30 was determined as the most dominant serotype while serotype E6 diverged into two sub-genotypes.

**【Key words】** Enterovirus associated encephalitis; Etiological spectrum; VP1 gene

病毒性脑炎的病原包括虫媒病毒、肠道病毒、疱疹病毒及腮腺炎病毒等,其中90%以上是由人类肠道病毒(HEV)引起。根据抗原特性及对人类和实验动物致病机制,HEV分为4类(HEV-A~D)64个血清型,包括脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒(CV)、埃可病毒(ECHO)和肠道病毒(EV)68~71型<sup>[1]</sup>。本研究对2008—2012年浙江省监测点疑似病毒性脑炎患者样本进行病原学和病毒分子流行病学特征分析。

### 材料与方法

1. 标本来源:根据地理位置、医院的规模等因素综合考虑,在浙南、浙西选取2所医院作为监测点,2008—2012年每年从上述监测点中采集样本。疑似病毒性脑炎病例定义:患儿( $\leq 15$ 岁)起病急,具有发热、头痛、呕吐等症状,伴有不同程度的意识障碍或脑膜刺激征等。所有符合病例定义者均要求由医院采集脑脊液或粪便(最好同时采集)并送至疾病预防控制中心(CDC)。共收到610例患儿616份样本(脑脊液412份、粪便204份),其中6例同时采集脑脊液和粪便。样本带冰运送到实验室, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱保存。

2. 细胞和试剂:RD、Hep-2细胞和EV标准血清来源于中国CDC病毒病预防控制所诊断室;核酸提取试剂采用德国Qiagen公司的RNA提取试剂盒(RNeasy mini Kit);RT-PCR试剂采用宝生物工程(大连)有限公司的二步法RT-PCR试剂盒(Code:DRR019A)。

3. 病毒分离和鉴定:按WHO规程采用RD和Hep-2两种传代细胞同时分离,阳性分离物用EV标准血清采用微量中和试验法定型<sup>[2]</sup>,操作步骤按说明书进行。中和试验不能确定病毒型别的阳性分离物,采用EV通用引物扩增病毒VP1区全长并测序<sup>[3]</sup>,BLAST比对确定病毒型别。

4. VP1基因扩增:取病毒分离物100  $\mu\text{l}$ ,按试剂盒说明书提取病毒核酸,最终洗脱至50  $\mu\text{l}$ 作为RNA模板。采用二步法RT-PCR扩增肠道病毒VP1基因,引物参考文献[3],序列为008:5'-GCR TGC AAT GAY TTC TCW GT-3',011:5'-GCI CCI GAY TGI TGI CCR AA-3',扩增片段为998个碱基对。反转录反应条件:45  $^{\circ}\text{C}$  30 min, 99  $^{\circ}\text{C}$  5 min, 5  $^{\circ}\text{C}$

5 min,PCR反应条件为95  $^{\circ}\text{C}$  2 min后,95  $^{\circ}\text{C}$  1 min、45  $^{\circ}\text{C}$  2 min、72  $^{\circ}\text{C}$  1 min,循环35次,72  $^{\circ}\text{C}$ 延伸8 min。取扩增产物5  $\mu\text{l}$ ,用1.5%琼脂糖凝胶电泳,根据DNA分子质量标准确认反应产物。

5. DNA序列测定和分析:采用PCR扩增产物纯化后直接测序,测序委托生工生物工程(上海)股份有限公司完成。数据处理采用DNAMAN和ClustalX软件,进化树的构建采用Mega 5.10软件,建树方法采用邻位连接法(Neighbor-joining, NJ),可信度评估采用1000 bootstrap值。

### 结 果

1. 临床特征:610例中男性403例,女性207例,男女之比为1.95:1;年龄5月龄至15岁,其中 $\leq 5$ 岁264例(43.3%)、6~10岁278例(45.6%)、11~15岁68例(11.1%);发热539例(88.4%)、头痛543例(89.0%)、恶心464例(76.1%)、呕吐529例(86.7%)、意识障碍33例(5.4%)、脑膜刺激征阳性11例(1.8%);发病时间5—10月有491例(80.5%)。

2. 病毒分离及其型别分布:616份样本中分离到HEV 127株,分离率为20.6%。其中412份脑脊液中分离到66株,分离率16.0%;204份粪便中分离到61株,分离率29.9%;5年间病毒分离率波动在16.8%~28.0%;分离的127株均为B组(HEV-B),涉及12个血清型,分别为CVA9、CVB1、CVB3~5、E3、E4、E6、E9、E14、E25和E30型(表1);分离毒株数排名前4位的血清型分别为E30(41株)、CVB5(29株)、CVB3(17株)和E6(16株)。不同年份HEV优势流行株明显不同,2008年为CVB3、2009年为CVB5,2010年为E6,2011年和2012年均均为E30。E30在5年中均有检出,且分离株最多,为绝对优势株。6例同时采集脑脊液和粪便样本中有5例在两类样本均分离到同一血清型病毒,分别为E30病毒3例, CVB3、CVB5各1例;1例两类样本病毒分离均阴性。

3. VP1区同源性分析:从每年各监测点脑脊液和粪便样本中分离获得测序毒株(对同一血清型数量较少的毒株全部测序,而同型分离株数量较多者选取大部分毒株),127株中对84株(脑脊液52株、粪便32株)进行VP1区全长测序,所有测序株VP1全长为834~918个核苷酸(nt),推导编码278~306

表 1 2008—2012 年浙江省病毒性脑炎患者样本中 HEV 分离结果

年份	样本份数	阳性份数	阳性率 (%)	病毒型别											
				A9	B1	B3	B4	B5	E3	E4	E6	E9	E14	E25	E30
2008	191	32	16.8	-	2	14	-	4	1	1	5	-	-	1	4
2009	125	35	28.0	-	3	2	-	22	-	1	-	-	-	-	7
2010	119	25	21.0	-	-	-	7	2	-	-	9	-	1	-	6
2011	36	7	19.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7
2012	145	28	19.3	2	-	1	-	1	1	-	2	3	-	1	17
合计	616	127	20.6	2	5	17	7	29	2	2	16	3	1	2	41

注:病毒型别中 A 为 CVA, B 为 CVB

个氨基酸(aa),测序株各血清型内 nt 和 aa 同源性分别为 79.6%~98.0%和 95.2%~99.8%,与各原型株的 nt 和 aa 的同源性分别为 76.7%~85.0%和 91.1%~97.9%(表 2);浙江省 HEV 血清型内 nt 和 aa 差异最大的毒株为 E6,分别为 20.4%和 4.8%,差异最小的毒株为 CVB3,分别为 2.0%和 0.4%。浙江 E30 与福建株(CSF08-141)和山东株(2010Linyi)之间 nt 同源性为 93.4%~97.6%,与台湾株(08-TW-0547)和印度株(N-944)之间 nt 同源性为 83.5%~86.1%;浙江 E6 与河南株(Henan-116)之间 nt 同源性为 80.1%~95.8%,与印度株(N-700-INDIN-2011)和韩国株(Kor08-ECV6-13cn)之间 nt 同源性为 81.8%~86.6%。

4. 进化分析:本研究 HEV 测序株与 GenBank 下载的国内外各血清型毒株 VP1 区全长 nt 序列构建进化树,可分成 4 个进化分支,分别为 HEV-A~HEV-D(图 1),浙江分离株均位于 HEV-B 进化支上,并分成 3 个簇,Cluster 1 为包括 E30 在内的 4 种 ECHO, Cluster 2 为包括 E9 在内的 3 种 ECHO, Cluster 3 为包括 CVA9 和 CVB 的 5 个型别,每种血清型病毒单独成簇。E30、E6 和 CVB5 等浙江分离株内部亲缘性

接近,不同年份的分离株位于相同的进化分支,E6 血清型内部又明显地分成 2 小簇,分别位于不同的小分支上(标注▲和◆的毒株),提示 E6 存在不同的基因亚型。浙江 E30 与山东株(2010Linyi)、福建株(CSF11-75)和日本株(KOBE-910-06)亲缘关系很近;浙江 E6 与山东株(JNEW100811)和河南株(Henan-116-2008)亲缘关系最近,而与同期的韩国株(Kor08-ECV6-13cn)和日本株(0445-osaka-JPN-2011)则亲缘关系相对较远。大部分血清型的浙江分离株在分离年代和地域上显示了一定的聚集性。

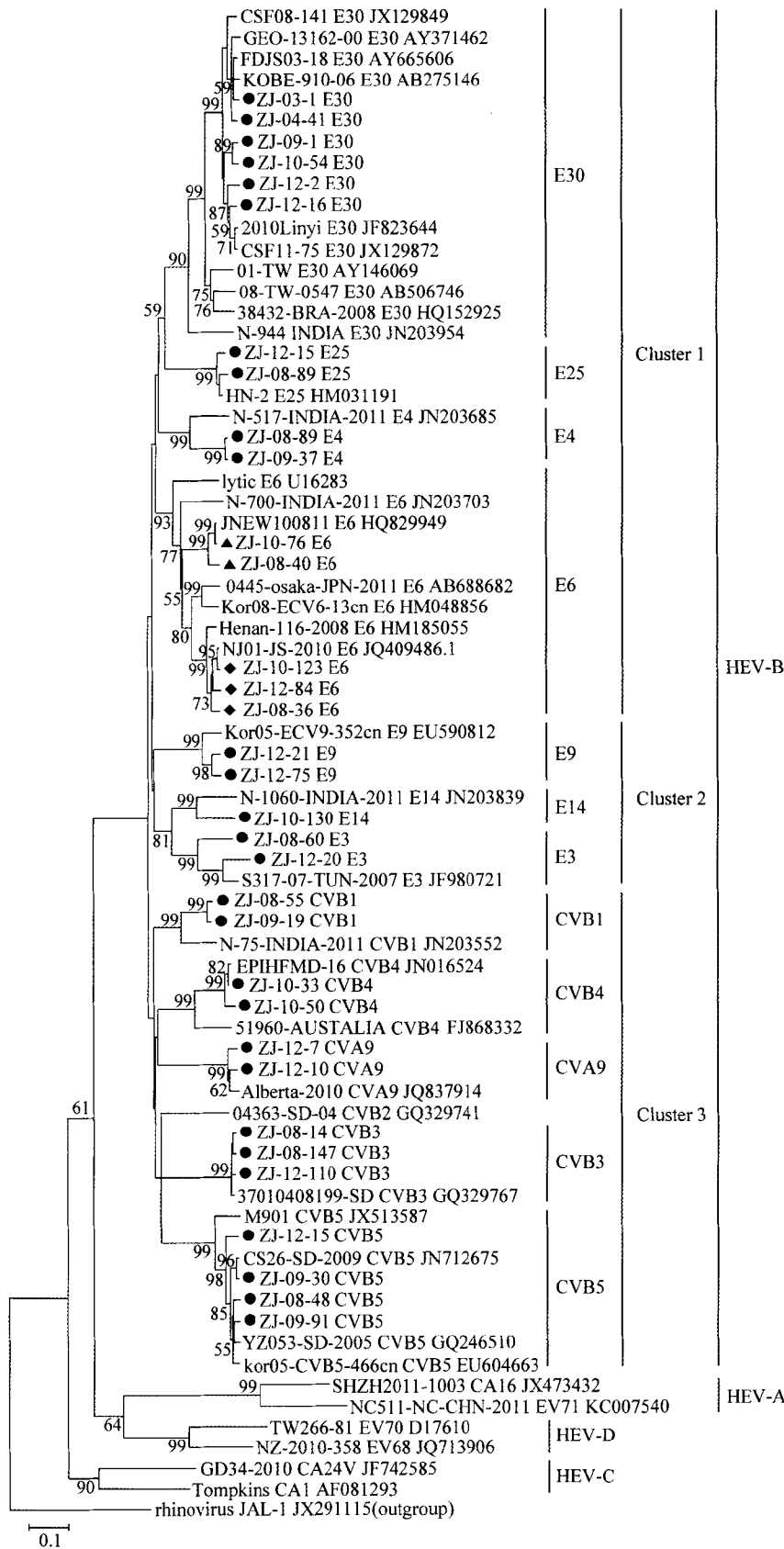
### 讨 论

近年来世界各地发生的多次病毒性脑炎暴发疫情与 HEV 有关<sup>[4,5]</sup>。美国建有全国性 EV 监测系统<sup>[6]</sup>,我国目前尚未建立该类监测网络,缺乏相关流行病学资料。浙江省从 2008—2012 年连续 5 年监测病毒性脑炎,结果显示①引起浙江省病毒性脑炎的病原为 HEV-B,涉及 12 个血清型,与 Mirand 等<sup>[7]</sup>报道结果相似。②各监测点优势株略有差异,CV 主要分离于浙西地区,而 ECHO 在浙南和浙西地区监测

表 2 2008—2012 年浙江省 HEV 型别分布及同源性比较

病毒型别	原型株	VP1 全长		同型株间(%)		原型株间(%)	
		nt	aa	nt	aa	nt	aa
CVA9	Griggss	906	302	95.3	98.0	80.7~81.1	91.1~92.4
CVB1	Conn-5	834	278	96.5~99.4	99.8~100.0	78.7~78.9	92.4
CVB3	Nancy	852	284	98.0~98.2	99.6~100.0	79.0~79.1	96.5
CVB4	JVB	852	284	96.5~99.2	99.3~100.0	85.0~85.4	97.9~98.6
CVB5	Faulkner	849	283	93.9~100.0	99.3~99.7	80.9~81.9	96.5~97.2
E3	Morrissey	876	292	80.0	97.5	80.6~82.5	97.2~97.5
E4	Pesacek	843	281	94.3~98.2	99.6	81.4~81.6	95.4~95.7
E6	Charles	867	289	79.6~94.3	95.2~99.7	76.7~77.9	92.5~96.6
E9	Hill	918	306	95.8~96.1	97.6~99.3	82.8~84.3	94.6~95.9
E14	Tow	894	298	- <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	79.4	96.7
E25	JV-4	876	292	93.2	97.3	79.3~80.6	93.2
E30	Bastianni	876	292	91.3~99.5	98.6~100.0	81.6~82.1	92.5~92.8

注:<sup>a</sup>该血清型毒株只有 1 株,故无法计算同型株之间同源性



注：浙江 HEV 分离株采用 VP1 全长核苷酸序列(834 ~ 918 nt)与 GenBank 下载的相应血清型毒株序列采用 NJ 构建进化树, bootstrap 值取 1000; 鼻病毒(rhinovirus JAL-1)作为外群对照; ●、▲和◆为浙江分离株, 毒株命名: 省份(ZJ)/分离年份/标本号/血清型; 下载序列为: 毒株名称/血清型/GenBank accession number

图 1 浙江 HEV 分离株 VP1 区进化分析

点均有检出。不同年份优势流行株不断发生变化, 2008—2012 年优势株分别为 CVB3、CVB5、E6、E30 和 E30。5 年中 E30 每年均有检出, 其分离株占阳性毒株的 32.3%(41/127), 为绝对优势株, 该结果与国内外报道的 E30 是引起世界各地病毒性脑炎暴发或散发最常见的病原相一致<sup>[8,9]</sup>。优势毒株的改变往往伴随疾病的暴发, 如 E30 和 E6 分别引起浙江、江苏、山东、河南和安徽等地病毒性脑炎的流行<sup>[10-13]</sup>。③不同血清型 HEV 存在不同的时间循环模式趋势。即一些血清型可经常分离到, 但在某些年份相对高发, 如 E30、CVB5、CVB3; 而一些血清型仅在少数年份中分离到, 如 CVB4、E3、E14 和 E25。④粪便标本中 EV 的分离率(29.9%)高于脑脊液标本(16.0%); 在同时采集脑脊液和粪便样本的 6 例中, 5 例从两类样本均分离到同一血清型病毒, 仅 1 例病毒分离均阴性, 提示采集粪便标本也能达到理想的监测结果。

在 VP1 基因进化分析表明, 浙江 E30、E6 和 CVB5 等不同年份分离株均位于相同的进化分支上, 显示出一定地域和时间效应, 浙江株与山东和江苏等邻近省份分离株亲缘关系很近, 提示可能存在着共同的循环和进化关系。在进化树上浙江 E6 内部又明显地分成 2 小簇, 分别位于不同的小分支上, 说明导致浙江省病毒性脑炎的 E6 存在基因亚型, 即同时存在二类流行株, 均可引起病毒性脑炎流行或散发。通常在一起疫情中仅由一种流行株引起, 同时涉及到几种流行株的

情况相对较少<sup>[14]</sup>。

不同血清型HEV进化速度不同。浙江CVB3前后分离时间相差5年,但在VP1区nt和aa变异程度很小,变异率分别为2.0%和0.4%,其遗传进化相对稳定,而E6则变异程度相对较高,分别为20.4%和4.8%,进化速度相对较快,Mirand等<sup>[15]</sup>认为由于病原体的遗传变异和基因重组使其致病性发生改变,从而导致疾病的流行强度发生变化,因此对于EV的VP1区基因变异以及各地频频发生的病毒性脑炎疫情必须引起高度重视。

(感谢浙江省各监测点医院及当地疾病预防控制中心协助采集和运输样本)

### 参 考 文 献

- [1] Tanway G, Brown F, Christian P, et al. Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London, Elsevier Family Picornaviridae, 2005: 757-778.
- [2] WHO EPI and Communicable Disease Departments. Laboratory manual of poliomyelitis. 4<sup>th</sup> ed. 2004: 84-94. (in Chinese)  
世界卫生组织扩大免疫规划和传染性疾病预防部. 脊髓灰质炎实验室手册. 4版. 2004: 84-94.
- [3] Wang JR, Tsai HP, Huang SW, et al. Laboratory diagnosis and genetic analysis of an echovirus 30-associated outbreak of aseptic meningitis in Taiwan in 2001. J Clin Microbiol, 2002, 40: 4439-4444.
- [4] Kumar A, Shukla D, Kumar R, et al. Molecular identification of enteroviruses associated with aseptic meningitis in children from India. Arch Virol, 2013, 158(1): 211-215.
- [5] Miyoshi M, Komagome R, Ishida S, et al. Genomic characterization of echovirus 6 causing aseptic meningitis in Hokkaido, Japan: a novel cluster in the nonstructural protein coding region of human enterovirus B. Arch Virol, 2013, 158(4): 775-784.
- [6] Khetsuriani N, LaMonte-Fowlkes A, Oberste MS, et al. Enterovirus surveillance-United States, 1970-2005. MMWR, 2006, 55 (SS08): 1-20.
- [7] Mirand A, Archimbaud C, Henquell C, et al. Prospective identification of HEV-B enteroviruses during the 2005 outbreak. J Med Virol, 2006, 78: 1624-1634.
- [8] Trallero G, Avellon A, Otero A, et al. Enteroviruses in Spain over the decade 1998-2007: virological and epidemiological studies. J Clin Virol, 2010, 47: 170-176.
- [9] Mistchenko AS, Viegas M, Latta M, et al. Molecular and epidemiologic analysis of enterovirus B neurological infection in Argentine children. J Clin Virol, 2006, 37: 293-299.
- [10] Yan JY, Lu YY, Xu CP, et al. Study on the etiological and molecular characters of septic meningitis epidemic in Zhejiang province in 2002-2004. Chin J Virol, 2011, 27(5): 462-467. (in Chinese)  
严菊英, 卢亦愚, 徐昌平, 等. 2002-2004年浙江省无菌性脑膜炎暴发疫情的病原学研究. 病毒学报, 2011, 27(5): 462-467.
- [11] Li XL, Huang XY, Xu BL, et al. Analysis on the gene characteristics of VP1 region in Echo6 strains in Henan, China. Chin J Epidemiol, 2011, 32(4): 425-427. (in Chinese)  
李幸乐, 黄学勇, 许汴利, 等. 病毒性脑炎病例中Echo6河南分离株VP1基因特征分析. 中华流行病学杂志, 2011, 32(4): 425-427.
- [12] Zhao YN, Jiang QW, Jiang RJ, et al. Sequence analysis of echovirus type 30 isolated from an aseptic meningitis outbreak in northern Jiangsu province in 2003. Chin J Epidemiol, 2005, 26(4): 282-285. (in Chinese)  
赵雅男, 姜庆五, 姜仁杰, 等. 苏北地区2003年病毒性脑膜炎爆发病原分离株Echo30的序列分析. 中华流行病学杂志, 2005, 26(4): 282-285.
- [13] 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.
- [14] Dalwai A, Ahmad S, Al-Nakib W, et al. Echoviruses are a major cause of aseptic meningitis in infants and young children in Kuwait. J Virol, 2010, 7: 236-241.
- [15] Mirand A, Henquell C, Archimbaud C, et al. Emergence of recent echovirus 30 lineages is marked by serial genetic recombination events. J Gen Virol, 2007, 88: 166-176.

(收稿日期: 2013-07-12)

(本文编辑: 张林东)

## · 消息 ·

### 中华预防医学会流行病学分会与国际流行病学分会 建立伙伴关系

为促进我国流行病学专业的国际交流与合作, 经由中华预防医学会流行病学分会主任委员李立明教授牵头联系, 中华预防医学会流行病学分会于2013年9月向国际流行病学分会(International Epidemiology Association, IEA)递交申请, 申请与其建立伙伴关系。经IEA执委会研究决定, 同意中华预防医学会流行病学分会的申请, 双方正式建立了伙伴关系。按照IEA的相关规定, 中华预防医学会流行病学分会成员能够以联合会员的形式申请加入IEA, 并且年费(25美元/人年)仅为普通IEA会员年费(50美元/人年)的一半, 同时享有普通IEA会员的所有权利(如免费阅读国际流行病学杂志刊登的所有文章等)。截至2013年11月底, 以中华预防医学会流行病学分会联合会员的形式加入IEA的专家已有36人。