

## · 实验室研究 ·

# 浙江省2002—2018年病毒性脑膜炎病原学与分子流行病学特征

缪梓萍 严菊英 孙逸 陈寅 龚黎明 葛琼 史雯 潘军航 茅海燕 张严峻

浙江省疾病预防控制中心,杭州 310051

缪梓萍和严菊英对本文有同等贡献

通信作者:孙逸, Email:ysun@cdc.zj.cn

**【摘要】目的** 了解2002—2018年浙江省病毒性脑膜炎病原学及分子流行病学特征。**方法** 从设立的监测点医院采集疑似病毒性脑膜炎患者样本2 173份,其中脑脊液1 718份、粪便455份,用荧光定量PCR方法检测脑脊液中人类肠道病毒(HEV)、腮腺炎病毒(MuV)、单纯疱疹病毒(HSV)、巨细胞病毒(CMV)和乙型脑炎病毒(JEV)核酸,粪便样本只检测HEV;用ELISA方法检测脑脊液中上述5种病毒IgM抗体;对HEV核酸阳性样本扩增病毒VP1基因和测序,确定病毒型别并进行进化分析。**结果** 在2002—2018年2 173份样本中检出HEV核酸阳性871份(40.1%),其中脑脊液1 718份、阳性654份(38.1%),粪便455份、阳性217份(47.7%);871份HEV核酸阳性样本,VP1扩增测序阳性670份,其中HEV-A 5份、HEV-B 665份,涉及23个病毒血清型,分别为柯萨奇病毒(CV)A组CVA4、CVA6、CVA9、CVA10,CVB组1~5,埃可病毒(EchoV;E)E3、E4、E6、E7、E9、E11、E14、E16、E18、E21、E25、E30、E33和肠道病毒(EV)-71,位于前3位的分别为E30、E6和CVB5,该3个血清型间隔若干年呈现病毒活动性增强的趋势。从2012—2015和2018年795份脑脊液中检出HEV核酸阳性374份、MuV 6份、HSV和CMV均为5份,对其中的368份脑脊液同时检测5种病毒IgM抗体,HEV抗体阳性2份、JEV 6份、MuV 1份。670份HEV中除1份EV-71外,EchoV 517份、CV 152份,两者之比为3.4:1,两类病毒间隔3~5年存在优势株交替变化的趋势。VP1进化树显示,浙江省HEV位于HEV-A和HEV-B分支上,E30存在h和i基因亚型。**结论** 浙江省病毒性脑膜炎的主要病原为HEV-B;EchoV检出率明显高于CV,两类病毒存在交替变化的趋势;优势血清型E30、CVB5和E6间隔若干年呈现病毒活动性增强的趋势;监测点HEV活动强度与病毒性脑膜炎暴发疫情的发生两者之间在时间上有较好的相关性。

**【关键词】** 病毒性脑膜炎;肠道病毒;埃可病毒;柯萨奇病毒

基金项目:国家科技重大专项(2017ZX10103008-002)

DOI:10.3760/cma.j.cn112338-20190625-00463

## Etiology and molecular-epidemiological characteristics of viral meningo-encephalitis in Zhejiang province, 2002–2018

Miao Ziping, Yan Juying, Sun Yi, Chen Yin, Gong Liming, Ge Qiong, Shi Wen, Pan Junhang, Mao Haiyan, Zhang Yanjun

Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310051, China

Miao Ziping and Yan Juying contributed equally to the article

Corresponding author: Sun Yi, Email: ysun@cdc.zj.cn

**【Abstract】Objective** To understand the pathogens and molecular-epidemiologic characteristics of viral meningo-encephalitis in Zhejiang province during 2002 to 2018. **Methods** All the samples were collected from suspected patients admitted to the hospitals under the monitoring program. Of the total samples, 2 173 were cerebrospinal fluids while the other 455 were stool specimens. Cerebrospinal fluid (CSF) samples were subject to real-time qPCR for the detection of Human enterovirus (HEV), Mumps virus (MuV), Herpes simplex virus (HSV), Cytomegalovirus (CMV) and Japanese encephalitis virus (JEV). Stool sample were subject to real-time qPCR for HEV. ELISA was used to detect the IgM antibodies in CSF, in the 5 kinds of virus mentioned above. VP1 genes from all RNA-positive specimen were amplified, sequenced, for typing and for evolution analysis. **Results** 871 (40.1%) of the 2 173 samples were detected as HEV nucleic acid positive during 2002 to 2018.

654 (38.1%) of the 1 718 CSF sample were HEV nucleic acid positive while 217 (47.7%) of the 455 stool sample were HEV nucleic acid positive. Among the total positive nucleic acid sample, 670 of them were VP1 sequence positive, including 5 HEV-A and 665 HEV-B. There were 23 HEV serotypes, including Coxsackievirus (CV) CVA4, CVA6, CVA9, CVA10, CVB1~5, Echovirus (EchoV; E) E3, E4, E6, E7, E9, E11, E14, E16, E18, E21, E25, E30, E33 and EV-71. The top three serotypes went to E30, E6 and CVB5. These three serotypes presented enhanced viral activity in every several years. 795 CSF samples were detected as virus nucleic acid positive, including 374 HEV, 6 MuV, 5 HSV and 5 CMV, from 2012 to 2015 and in 2018. 5 kinds of IgM antibodies were detected simultaneously in 368 CSF samples, including 2 HEV positive, 6 JEV positive and 1 MuV positive for 5 viruses, respectively. Except for EV-71, there were 517 EchoV and 152 CV viruses presented, with the ratio of 3.4 : 1. These two kinds of viruses alternately changed for each predominant epidemic strains in every 3~5 years. Based on VP1, results from the phylogenetic tree showed that HEV from Zhejiang province clustered into HEV-A and HEV-B clades respectively. E30 developed both h and i sub-genotypes.

**Conclusions** HEV-B seemed the main pathogen for viral meningo-encephalitis in Zhejiang province. Ratio of positive detection on EchoV was significantly higher than that on CV. These two kinds of virus alternately presented changing tendency in every several years. Predominant epidemic strains E30, CVB5 and E6 were presenting enhanced viral activity, also in every several years. High correlation was found in both HEV viral activity from the surveillance sites and in time line of the viral meningo-encephalitis outbreaks.

**【Key words】** Viral meningitis; Enterovirus; Echovirus; Coxsackievirus

**Fund program:** National Science and Technology Major Project of China (2017ZX10103008-002)

DOI:10.3760/cma.j.cn112338-20190625-00463

病毒性脑膜炎(virus meningitis)又称为无菌性脑膜炎(aseptic meningitis, AM),是由各种病毒引起的一组以精神和意识障碍为突出表现的中枢神经系统感染性疾病,主要临床症状为发热、头痛、呕吐和不同程度的意识障碍。引起AM的病原有人类肠道病毒(Human enterovirus, HEV)、腮腺炎病毒(Mumps virus, MuV)、单纯疱疹病毒(Herpes simplex virus, HSV)、巨细胞病毒(Cytomegalovirus, CMV)和虫媒病毒等,据研究约80%以上AM是由HEV引起。HEV属于微小核糖核酸病毒科肠道病毒属,该属分为4类(HEV-A~D)<sup>[1]</sup>,包括脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒(Coxsackievirus, CV)、埃可病毒(EchoV; E)和肠道病毒(EV)68~71型,近几年肠道病毒的血清型在不断增加,目前已有100多个型<sup>[1]</sup>。HEV感染表现为多种临床症状,包括无菌性脑膜炎、心肌炎、新生儿败血症、手足口病和急性弛缓性麻痹等<sup>[2]</sup>。浙江省从2002~2018年通过设立AM监测点,开展疑似AM病例病原学与分子特征研究。

## 材料与方法

1. 监测点设置与标本来源:从2002~2018年根据地理位置,在浙江省东、南、西、北设立AM监测点,分别为诸暨市、瑞安市与鹿城区、衢州市和海盐县,在每个监测点选择综合性医院神经内科和儿科全年监测,每个监测点每年采集脑脊液或粪便样本≥50份。疑似AM病例定义:≤15岁,急性起病,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,外周血和脑脊液样本临床检验排除细菌性,高度怀疑为AM的患者。由医院采集患者脑脊液或粪便样本,送至CDC进行检测;2002~2018年共采集2 173例患者样本,其中脑脊液1 718份,粪便455份,样本带冰运送到实验室,-80℃低温冰箱保存。

2. 病毒核酸提取和检测:脑脊液样本直接使用,粪便样本制备20%悬液,处理方法按WHO规范;核酸提取采用德国Qiagen公司的病毒总核酸提取试剂盒Pathogen 96 QIAcube® HT Kit,按试剂盒说明书操作。HEV、JEV、MuV、HSV和CMV 5种病毒核酸检测均采用荧光定量PCR方法,引物和实验方法参照文献[3],试剂盒采用宝生物工程(大连)有限公司生产的试剂,按试剂盒说明书操作。脑脊液样本检测5种病毒核酸,粪便标本只检测HEV核酸。

3. 病毒IgM抗体测定:采用捕获ELISA法测定脑脊液中IgM抗体,HEV、MuV、HSV和CMV采用德国赛润/维润试剂,JEV采用中国上海贝西生物技术股份有限公司试剂,按试剂盒说明书操作。

4. VP1基因扩增、测序:HEV核酸阳性的脑脊液和粪便样本,用巢式RT-PCR方法扩增VP1基因,片段长度665 bp,引物和方法参照文献[4],试剂采用宝生物工程(大连)有限公司的RT-PCR试剂,按试剂盒说明书操作。取扩增产物5 μl,用1.5%琼脂糖凝胶电泳,根据DNA分子量标准确认反应产物大小。扩增产物纯化后直接测序,委托生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

5. 病毒型别确定:VP1基因测序数据采用Lasergene 7.1和DNAMAN 7.0软件处理,采用在线肠道病毒比对工具和NCBI BLAST比对确定病毒血清型别。

6. 进化分析:VP1基因进化树构建采用MEGA 7.2软件,建树方法采用邻接法(NJ),可信度评估采用1 000 bp值。测序数据已递交GenBank。

## 结 果

1. 人群分布:2 173例疑似病毒性脑膜炎患者中,男性1 442例,女性731例,男女病例比为1.97:1。<3岁的散居儿童占11.97%(260例),3~7岁占57.57%(1 251例),8~12岁占26.18%(569例),12~15岁占4.28%(93例)。见图1。

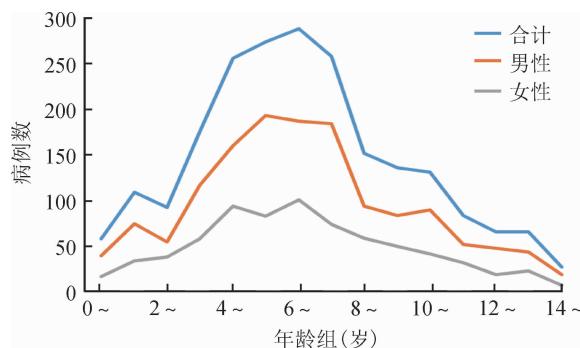


图1 2 173例疑似病毒性脑膜炎患者性别年龄分布

2. 2002—2018年HEV检测与病毒型别分布:从2 173份样本中检出HEV核酸阳性871份(40.1%),其中脑脊液1 718份、阳性654份(38.1%),粪便455份、阳性217份(47.7%),粪便中HEV阳性率高于脑脊液;对核酸阳性样本扩增VP1基因和测序,阳性670份(30.8%),其中HEV-A组5份、HEV-B组665份,HEV-B占绝对优势(30.6%)。670份HEV涉及23个血清型,分别为CVA4、CVA6、CVA9、CVA10型和CVB1~5型,EchoV E3、E4、E6、E7、E9、E11、E14、E16、E18、E21、E25、E30、E33型和EV-71型(图2),其中仅从粪便中检出的血清型为CVA4、A6和B2。

3. 脑脊液中5种病毒核酸和IgM抗体检测:对2012—2015年和2018年795份脑脊液同时检测HEV、JEV、MuV、HSV和CMV核酸,结果390份阳性,其中HEV、MuV、HSV和CMV阳性数分别为374、6、5和5份,阳性率分别为47.0%、0.8%、0.6%和0.6%;JEV未检出(表1)。对2013—2014年368份脑脊液除检测核酸外,同时检测5种病毒IgM抗体,结果9份阳性,其中HEV、JEV和MuV的阳性数分别

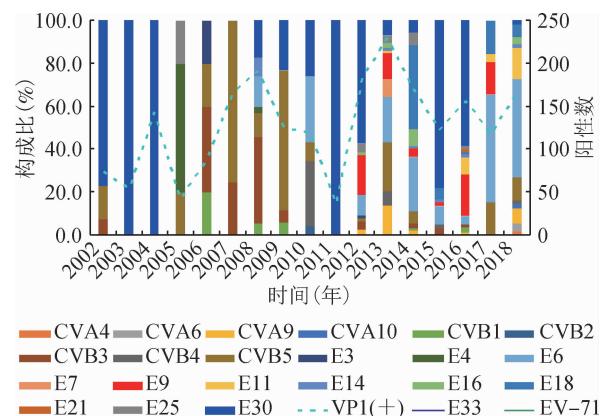


图2 2002—2018年浙江省HEV脑膜炎VP1阳性病原型别构成

表1 脑脊液中5种病毒的核酸检测结果

年份	脑脊液 (份)	病毒种类及检出阳性数(份)				
		HEV	JEV	MuV	HSV	CMV
2012	182	80	0	1	1	1
2013	211	75	0	1	2	2
2014	157	90	0	0	0	0
2015	121	77	0	0	0	0
2018	124	52	0	4	2	2
合计	795	374	0	6	5	5

为2、6和1份,阳性率分别为0.5%、1.6%和0.3%,HSV和CMV抗体未检出;368份脑脊液中5种病毒的核酸和抗体合计检出阳性率分别为HEV 44.8%、JEV 1.6%、MuV、HSV和CMV均为0.5%,5种病毒总阳性率为48.1%。

4. EchoV与CV的消长及HEV优势株的变化:按HEV的经典分类,670份VP1扩增阳性HEV,除1份EV-71以外,EchoV 517份、CV 152份,EchoV检出率是CV的3.4倍(517/152),两类病毒间隔3~5年存在交替变化的趋势(图3)。不同年份优势株血清型不断发生变化,2002—2004年各监测点均检出E30,2008—2009年优势株转为CVB3和CVB5,2012—2014年分别转为E30、CVB5和E18,2015—2016年又转为E30,2018年转为E6(图2,4),其中最

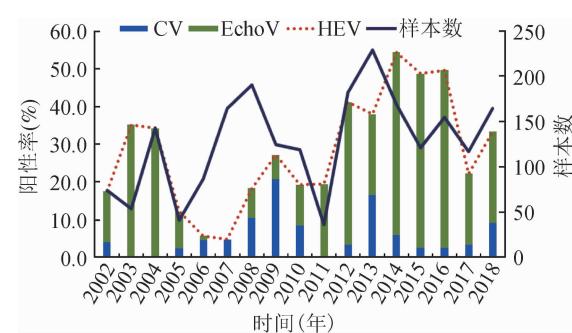
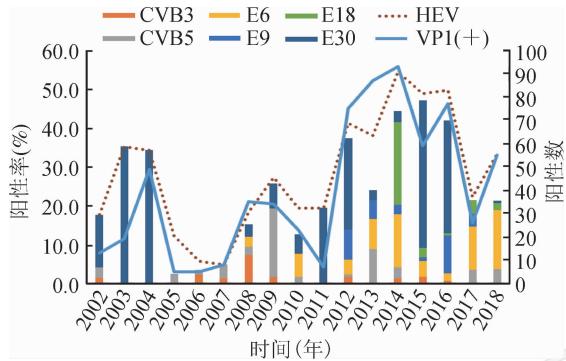


图3 2002—2018年浙江省HEV脑膜炎VP1阳性的EchoV和CV的消长

突出的优势株为E30, 阳性251份(占37.5%), 其次为E6和CVB5分别为106和74份, 分别占15.8%和11.0%。不同血清型HEV存在不同的时间循环模式趋势, 如E30、CVB5和E6在2008—2018年期间每间隔3~4年病毒活动性增强(图4), CVB1、E14和E25等无此现象, 而另一些病毒很少能检测到, 一旦出现则活动性较强, 如2014年的E18(图2)。



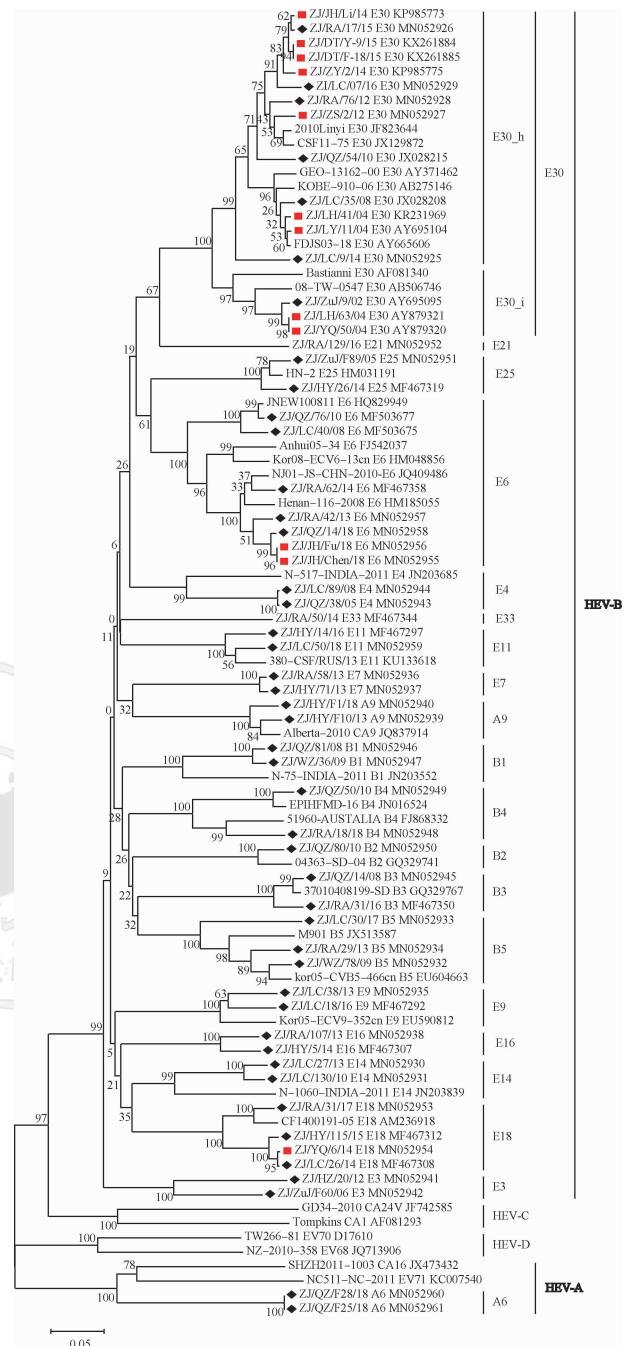
注:E30疫情:2002—2004、2012、2015年; E18疫情:2014年; E6疫情:2018年

图4 VP1测序阳性的HEV优势血清型不同年份病毒活动强度

5. VP1进化分析:浙江省HEV测序株与GenBank下载的国内外各血清型毒株VP1区序列构建进化树, 该树将HEV分成4个大进化分支, 分别为HEV-A~D(图5), 浙江省EV位于HEV-A和HEV-B进化支上, 每种血清型病毒单独成簇。来源于不同监测点的同血清型毒株在相同的进化分支上紧密地排列在一起, 显示了一定的地域聚集性; E30内部又明显地分成2小簇, 分别为E30\_h和E30\_i, 说明E30存在2个基因亚型。引起浙江省AM暴发疫情的E30、E6和E18与监测点来源的E30、E6和E18在进化树上紧密地集聚在一起, 两类来源不同的毒株在VP1区无差异。2002—2004年浙江省E30暴发疫情株ZJ/LH/41/04与江苏省E30株FDJS03-18进化关系很近, 浙江省ZJ/ZS/2/12、ZH/RA/76/12株与山东省E30 2010LinY1株也有很近的亲缘关系, 提示国内E30有区域聚集性。

## 讨 论

中国浙江省从2002—2018年连续17年的AM监测显示, 主要病原为HEV(40.1%), 其中又以HEV-B占绝对优势, 该结果与印度、中国山东省和澳大利亚AM监测结果相似<sup>[5-6]</sup>, 中国浙江省检出HEV 23个血清型, 其中20个血清型均可从脑脊液中检出, 提示这20个血清型可能引起AM; 中国浙江省排



注:◆监测点毒株; ■暴发疫情毒株; 毒株命名: 地区/监测点/标本编号/年份

图5 2002—2018年浙江省HEV VP1区进化树

前3位的血清型分别为E30、CVB5和E6, 与澳大利亚前3位E6、E30和E25略有不同<sup>[6]</sup>, 可能与不同的地理区域有关。

浙江省EchoV的检出率是CV的3.4倍, EchoV和CV间隔3~5年存在交替变化的趋势, 而优势毒株的改变往往伴随疾病的暴发, 如E30、E6和E18分别引起了浙江省临海、金华和乐清等地AM暴发疫情<sup>[7]</sup>。不同血清型病毒存在不同的时间循环模式趋

势,E30、B5和E6间隔3~4年病毒活动性增强,而其他血清型此类现象不明显,可能原因为不同病毒具有各自的人群免疫屏障、易感性、中和抗体的消长模式、再次感染的抗体阈值和病毒变异速率等因素<sup>[8]</sup>。同时存在病毒的重组,如浙江省2002—2004年发生E30暴发疫情,2005年检测到E30与E25重组病毒(KX774483;E25/ZE-wly/Zhejiang/CHN/2005)<sup>[9]</sup>。

监测点HEV活动强度与AM暴发疫情的发生有密切关系,当监测点E30、E6和E18活动增强时,该年往往发生AM疫情<sup>[10]</sup>,两者在时间上有较好的吻合性,浙江省外环境中持续存在E30和E6等肠道病毒的循环,不断引起散发病例和暴发疫情,因此,监测点数据可为AM暴发疫情的可能发生提供预警。

浙江省肠道病毒位于HEV-A和HEV-B进化支上,不同监测点的相同血清型毒株在相同的进化分支上,显示了一定的地域聚集性。引起AM暴发疫情的E30、E6和E18株与监测点来源的E30、E6和E18株亲缘关系很近,说明两类毒株无差异。

本研究阐述了引起浙江省AM的主要病原、涉及的HEV血清型和不同年份的优势株;EchoV和CV存在间隔若干年交替变化的趋势;HEV活动强度与AM暴发疫情的发生在时间上有较好的吻合性;该研究对AM的预防与控制具有十分重要的流行病学意义。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**志谢** 各监测点医院及当地CDC协助采集和运输样本,在此表示衷心感谢

## 参 考 文 献

- [1] Knowles NJ, Hovi T, Hyypia T. Virus taxonomy: Classification and nomenclature of viruses. Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses [M]. Amsterdam: Elsevier, Inc., 2012:855-880.
- [2] B' Krong NTTC, Minh NNQ, Qui PT, et al. Enterovirus serotypes in patients with central nervous system and respiratory infections in Viet Nam 1997–2010[J]. Virol J, 2018, 15(1):69.

DOI: 10.1186/s12985-018-0980-0.

- [3] Cui AL, Xu CP, Tan XJ, et al. The development and application of the two real-time RT-PCR assays to detect the pathogen of HFMD[J]. PLoS One, 2013, 8(4):e61451. DOI: 10.1371/journal.pone.0061451.
- [4] Casas I, Palacios GF, Trallero G, et al. Molecular characterization of human enteroviruses in clinical samples: Comparison between VP2, VP1, and RNA polymerase regions using RT nested PCR assays and direct sequencing of products[J]. J Med Virol, 2001, 65(1):138–148. DOI: 10.1002/jmv.2013.
- [5] Kumar A, Shukla D, Kumar R, et al. Molecular identification of enteroviruses associated with aseptic meningitis in children from India [J]. Arch Virol, 2013, 158(1):211–215. DOI: 10.1007/s00705-012-1476-7.
- [6] Papadakis G, Chibo D, Druce J, et al. Detection and genotyping of enteroviruses in cerebrospinal fluid in patients in Victoria, Australia, 2007–2013 [J]. J Med Virol, 2014, 86: 1609–1613. DOI: 10.1002/jmv.23885.
- [7] 严菊英,秦淑文,吕华坤.一起疑似病毒性脑膜炎暴发病原学检测分析[J].中国公共卫生,2017,33(2):298–301. DOI: 10.11847/zggws2017-33-02-34.
- [8] Yan JY, Qin SW, Lyu HK. Pathological and molecular characteristics of a viral meningitis outbreak among pupils in Jinhua city of Zhejiang province, 2014[J]. Chin J Public Health, 2017, 33(2):298–301. DOI: 10.11847/zggws2017-33-02-34.
- [9] Sun Y, Miao ZP, Yan JY, et al. Sero-molecular epidemiology of enterovirus-associated encephalitis in Zhejiang Province, China, from 2014 to 2017[J]. Int J Infect Dis, 2019, 79: 58–64. DOI: 10.1016/j.ijid.2018.11.002.
- [10] Chen Y, Sun Y, Yan JY, et al. Molecular epidemiology and prevalence of echovirus 30 in Zhejiang Province, China, from 2002 to 2015[J]. J Microbiol Biotechnol, 2017, 27(12):2221–2227. DOI: 10.4014/jmb.1707.07016.
- [11] 孙逸,缪梓萍,严菊英,等.2015年浙江省洞头区病毒性脑炎暴发疫情病原学研究[J].疾病监测,2017,32(2):141–144. DOI: 10.3784/j.issn.1003-9961.2017.02.014.
- [12] Sun Y, Miao ZP, Yan JY, et al. Etiology of viral meningitis outbreak in Dongtou, Zhejiang, 2015 [J]. Dis Surveill, 2017, 32(2):141–144. DOI: 10.3784/j.issn.1003-9961.2017.02.014.

(收稿日期:2019-06-25)

(本文编辑:万玉立)