· 调查报告与分析 ·

# 一起疑似病毒性脑膜炎暴发病原学检测分析*

严菊英, 秦淑文, 吕华坤, 孙逸, 茅海燕, 张严峻

**摘　要: 目的**　2014 年 10 月浙江省金华市荣光小学发生疑似病毒性脑膜炎暴发疫情, 为及时查明病因, 分析病原的分子特征并进行病原溯源。**方法**　开展流行病学调查, 采集患者脑脊液和咽拭子样本 6 份, 检测人类肠道病毒(HEV)核酸和分离病毒, 对 HEV 分离株 VP1 基因测序, 进行同源性与进化分析。**结果**　在全校 328 名学生中, 发病 7 例, 罹患率 2. 13%。患者年龄 7 ~ 8 岁; 临床症状为发热、头痛、呕吐等; 从 5 例患者 6 份样本中均检测到 HEV 核酸, 其中 3 份脑脊液中分离到 3 株肠道病毒埃可 30 型(echovirus 30, E30); 新分离株与 E30 原型株之间 VP1 区核苷酸和氨基酸同源性分别为 81. 8% 和 91. 8% ~ 92. 1%; 进化分析显示: 新分离株位于 E30 G 基因亚型分支上, 与 2013 年浙江省 CHN/ZJ/RA-72/13 株亲缘关系最近。**结论**　引起 2014 年 10 月浙江省金华市荣光小学聚集性病毒性脑膜炎暴发疫情的病原为 E30 G 基因亚型病毒。

**关键词**: 暴发; 病毒性脑膜炎; 埃柯病毒 30 型; G 基因亚型; VP1 基因
**中图分类号**: R 395. 6　**文献标志码**: A　**文章编号**: 1001-0580(2017)02-0298-04　DOI: 10. 11847/zgggws2017-33-02-34

## Pathological and molecular characteristics of a viral meningitis outbreak among pupils in Jinhua city of Zhejiang province, 2014

YAN Ju-ying, QIN Shu-wen, LÜ Hua-kun, et al (*Laboratory for Viral Detection, Microbial Detection Institute, Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou, Zhejiang Province* 310051, China)

**Abstract: Objective**　To identify and trace the pathogen of a suspected viral meningitis outbreak in a primary school in Jinhua city of Zhejiang province in 2014. **Methods**　Epidemiological investigation was conducted and 3 specimens of cerebrospinal fluids (CSF) and 3 of throat swab were sampled from suspected patients for isolation and detection of human enterovirus (HEV) nucleic acid. Then VP1 genes of the isolated virus were sequenced for the construction of phylogenetic tree and homologous analysis. **Results**　Totally 7 cases aged 7 to 8 years were identified among 328 pupils in the school, with a morbidity of 2. 13%. All the cases had symptoms of headache, fever, and vomiting. Six specimens from 5 patients were positive for HEV nucleotide and 3 strains of echovirus 30 (E30) were isolated from CSF specimens. The homology of nucleotide sequences of the VP1 gene was 81. 8% and that of amino acid sequences ranged from 91. 8% to 92. 1% between the 3 isolated strains and the prototype strain Bastianni of E30, respectively. The phylogenetic tree of VP1 gene showed that the E30 strains isolated belong to the E30 G subtype and are of close homology to CHN/ZJ/RA-72/13 strain isolated in Zhejiang province in 2013. **Conclusion**　The viral meningitis outbreak among pupils in Jinhua city of Zhejiang province in 2014 was caused by echovirus 30 G genotype.

**Key words**: outbreak; viral meningitis; echovirus 30; G genotype; VP1 gene

病毒性脑膜炎(viral meningitis), 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。引起病毒性脑膜炎的病原有人类肠道病毒(human erterovirus, HEV)中埃柯病毒、柯萨奇病毒、流行性腮腺炎病毒和单纯疱疹病毒等, 据研究 80% 的病毒性脑膜炎病例是由 HEV 引起。埃柯病毒 30 型(echovirus 30, E30)是 HEV 的一个血清型, 是引起世界各地病毒性脑膜炎最常见病原之一[1-3]。2002—2004 年浙江省和江苏省也发生了 E30 引起的病毒性脑膜炎暴发疫情[4-5]。2014 年浙江省金华市荣光小学发生了疑似病毒性脑膜炎暴发疫情, 为迅速查明病因与病原的分子特征, 及时采取有效的控制措施, 本研究于 2014 年 10 月在浙江省金华市荣光小学采集 5 例患者 6 份咽拭子和脑脊液标本进行病原学研究。现将结果报告如下。

## 1　材料与方法

1. 1　疫情概况　10 月 21 日, 金华市疾病预防控制中心接到金华市荣光小学疫情报告, 该校发生疑似病毒性脑膜炎病例 4 例, 目前均在住院治疗, 存在聚集性可能。接报后, 金华市疾病预防控制中心立即组织开展调查。情况如下: 1)金华市荣光小学位于金华市婺城新区文津路 1 号, 为 2012 年开始招生的民办寄宿制小学, 目前全校共 3 个年级 11 个班级 328 名学生, 教职工 30 人。2)首发病例: 王某某, 男, 二(4)班, 2007 年 1 月 18 日出生, 患儿于 10 月

* **基金项目**: 浙江省科技厅项目(2012C33063)
**作者单位**: 浙江省疾病预防控制中心微生物检验所病毒检验科, 杭州 310051
**作者简介**: 严菊英(1960 - ), 女, 浙江杭州人, 主任技师, 大专, 主要从事肠道病毒实验室检测与研究工作。
**数字出版日期**: 2016 - 2 - 23 8: 27
**数字出版网址**: http://www. cnki. net/kcms/detail/21. 1234. R. 20160223. 0827. 034. html

12 日上午 8 时 30 分出现头痛,以颞部及前额部为主,伴有呕吐 10 余次,吐出为内容物,于 10 时左右出现发热,最高 38.6℃,查血常规白细胞 14.18 × $10^9$/L,中性粒细胞 84.1%,淋巴细胞 10.1%,血红蛋白 151 g/L,血小板 398 × $10^9$/L。CRP < 0.5 mg/L。头颅 CT 未见明显异常;咽充血,双侧扁桃体 II 度肿大,无脓性分泌物,两肺呼吸音粗,四肢肌力、肌张力正常,双侧巴氏征、布氏征阴性,金华市中心医院拟"病毒性脑膜炎"收治入院。

1.2 病例纳入与样本采集 10 月 1 日—10 月 26 日,金华市荣光小学中,有出现发热、头痛伴呕吐之一,脑脊液单核细胞增多或者治疗上采取甘露醇等降颅压效果明显的所有学生及教职工。开展流行病学调查,搜索到 7 例病例,对其中的 5 例采集 3 份咽拭子和 3 份脑脊液,样本冷藏运送到实验室。

1.3 检测方法

1.3.1 HEV 核酸检测 从 3 份咽拭子和 3 份脑脊液提取 HEV 核酸(RNA 提取试剂盒,德国 Qiagen 公司);实时荧光定量 - 聚合酶链反应(real-time PCR)[6]检测核酸[荧光 RT-PCR 试剂盒,宝生物工程(大连)有限公司]。

1.3.2 病毒分离与鉴定 采用人横纹肌瘤细胞(human rhabdomyosarcoma, RD)和人喉表皮样癌细胞(human epidermoid cancer cells, Hep-2)(中国 CDC 病毒病预防控制所脊髓灰质炎病毒室)培养法分离 HEV[7]。阳性分离物采用 HEV real-time PCR 方法进行鉴定。

1.3.3 VP1 基因扩增 HEV 分离株采用 RT-PCR 方法扩增 VP1 基因并测序[宝生物工程(大连)有限公司试剂]。引物序列和反应条件参考文献[7],扩增片段 876 bp。

1.3.4 测序与进化分析 采用 PCR 扩增产物纯化后直接测序[生工生物工程(上海)股份有限公司完成]。数据处理采用 DNAMAN 6.0 和 ClustalX 2.0。采用 MEGA 6.2 软件构建进化树,建树方法采用邻接法(neighbor-joining, NJ),可信度评估采用 1 000 bp 值,USA/Charles/E6 株作为外群对照。

## 2 结 果

2.1 流行病学特征 全校 328 名学生中,发病 7 例,罹患率 2.13%(7/328),无教职工发病;7 例患者为 5 例男性 2 例女性,年龄在 7 8 岁,分布于 2 个班级,发病时间集中在 10 月 12 日—10 月 26 日;患者均有发热(38.5℃以上)、头痛、呕吐症状,5 例有扁桃体肿大,2 例有脑电图异常,7 例均无胃肠道症状、脑膜刺激征和神经精神改变。脑脊液显示无色透明清亮,糖及氯化物正常,有核细胞增多。7 例患者 4 例住院治疗,所有患者经治疗均已痊愈,其余学生和教职工经流行病学追踪调查至最后 1 例病例发病后 10 d,未发生新病例。

2.2 HEV 核酸检测和病毒分离(表 1) 3 份咽拭子和 3 份脑脊液样本 HEV 核酸检测均阳性,从 3 份脑脊液样本中分离到 3 株 HEV,经 VP1 基因全长测序,确定病毒型别为 E30。

**表 1** 疑似病例样本中 HEV 检测与病毒型别

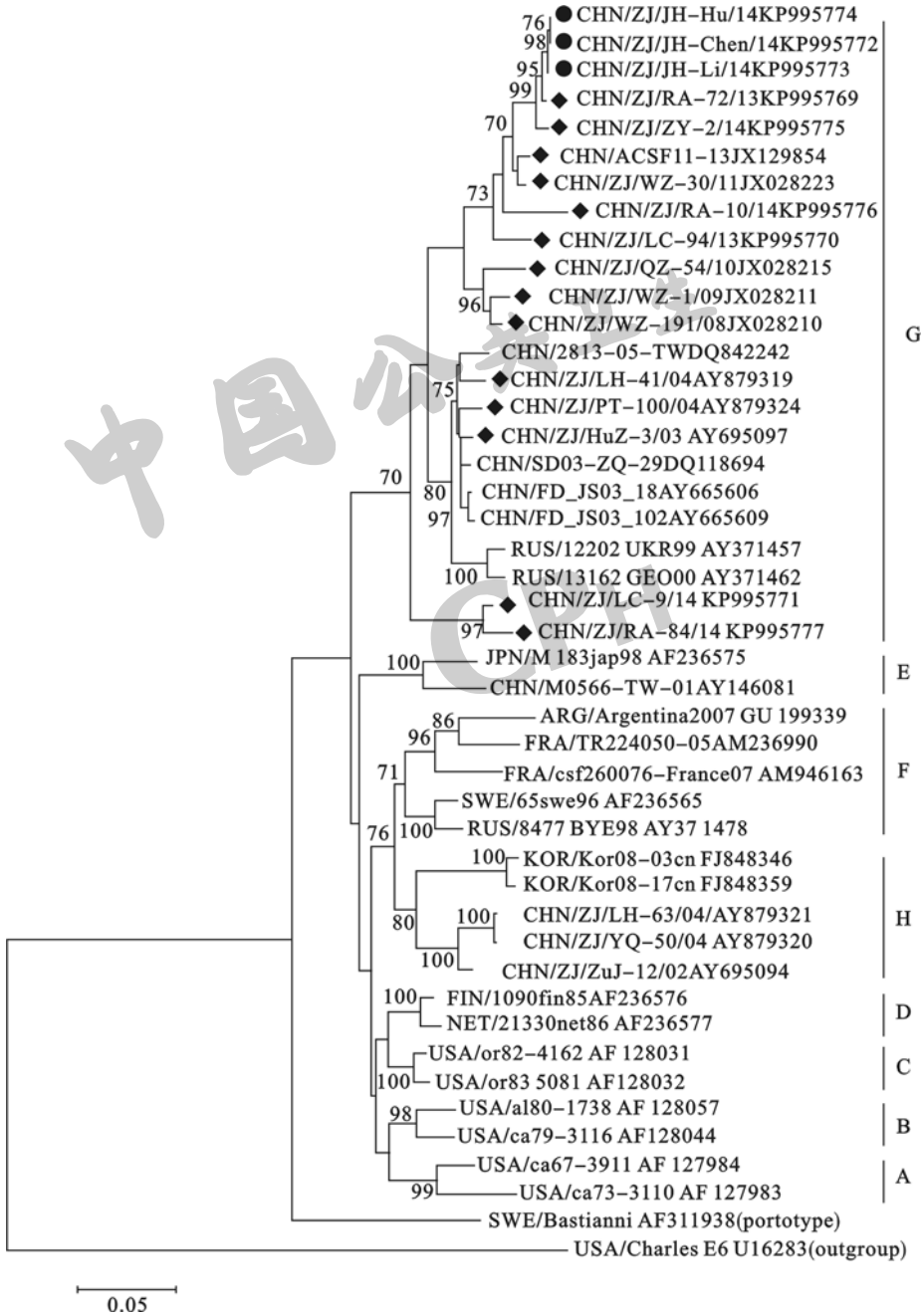
| 病例 | 性别 | 年龄(岁) | 发病日期 | 采样日期 | 样本种类 | 咽拭子 | 脑脊液 | | | 最终结果 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | 核酸[a] | 核酸 | 病毒分离 | 型别 | |
| 王某某 | 男性 | 7 | 10.12 | | 无 | | | | | |
| 陈某某 | 女性 | 7 | 10.17 | 10.19 | 脑脊液 | | + | + | E30 | E30 |
| 李某某 | 男性 | 7 | 10.18 | 10.20 | 脑脊液 + 咽拭子 | + | + | + | E30 | E30 |
| 梅某某 | 男性 | 8 | 10.13 | 10.15 | 咽拭子 | + | | | | HEV |
| 胡某某 | 男性 | 7 | 10.20 | 10.21 | 脑脊液 | | + | + | E30 | E30 |
| 张某某 | 女性 | 7 | 10.21 | 10.21 | 咽拭子 | + | | | | HEV |
| 应某某 | 男性 | 7 | 10.26 | | 无 | | | | | |

注:+ 为检测阳性;a 咽拭子样本 HEV 核酸由市级疾病预防控制中心检测,样本未送浙江省疾病预防控制中心,故未作 HEV 分离和基因测序。

2.3 VP1 基因同源性 3 株 E30 VP1 区测序,获得全长 876 个核苷酸,推导编码 292 个氨基酸,3 株新分离株之间核苷酸和氨基酸同源性分别为 99.9% ~100.0% 和 99.7% ~100.0%,新分离株与原型株(Bastianni)之间核苷酸和氨基酸的同源性分别为 81.8% 和 91.8% ~92.1%,与浙江省 2002—2014 年 E30 分离株之间的核苷酸和氨基酸同源性分别为 86.2% ~99.5% 和 98.3% ~100.0%,其中与浙江省 CHN/ZJ/RA-72/13 株同源性最高,核苷酸和氨基酸分别为 99.4% ~99.5% 和 99.7% ~100.0%。

2.4 进化分析(图 1) 3 株 E30 测序数据已登录 GenBank,登录号为 CHN/ZJ/JH-Chen/14:KP995772、CHN/ZJ/JH-Li/14:KP995773 和 CHN/ZJ/JH-Hu/14:KP995774。3 株 E30 与浙江省历年

E30 分离株和 GenBank 下载的不同时期、不同国家毒株序列构建进化树。从 VP1 基因进化树可见全球 E30 分成 8 个基因型(A-H),浙江省 E30 明显地分成 2 簇,分别位于 G 和 H 基因亚型分支上,新分离 E30(标注●的毒株)与浙江省 2011—2014 年 E30(标注▲的毒株)紧密的聚集在一起,并位于 G 基因亚型分支上,尤其与 2013 年 CHN/ZJ/RA-72/13 株具有最近的亲缘关系,而与浙江省 2002—2004 年分离的 3 株(CHN/ZJ/ZuJ-12/02、CHN/ZJ/YQ-50/04 和 CHN/ZJ/LH-63/04)H 基因型 E30 亲缘关系相对较远。




注:浙江省 E30 分离株采用 VP1 全长核苷酸序列(876bp)与 GenBank 下载的 E30 毒株序列采用 NJ 构建进化树,boostrap 值取 1000;USA/Charles/E6 作为外群对照;●为本次疫情分离株(毒株)命名:国家/省份/市 - 患者姓/分离年份,◆为浙江省 2002—2014 年分离株(毒株)命名:国家/省份/市或县 - 标本编号/分离年份,ZJ:浙江,JH:金华,RA:瑞安,WZ:温州,LC:鹿城,QZ:衢州,LH:临海,PT:普陀,HuZ:湖州,YQ:乐清,ZuJ:诸暨;下载序列为:国家/毒株名称 Gen Bank accession number

**图 1**　2014 年浙江省 E30 分离株 VP1 区进化分析

## 3　讨　论

本研究对金华市荣光小学疑似病毒性脑膜炎暴发疫情进行流行病学调查,在 328 名学生中发病 7 例,罹患率 2.13%。从 5 例患者 6 份样本中均检测到 HEV 核酸,其中 3 份脑脊液中分离到 3 株 E30,

由于从脑脊液中分离到同一血清型肠道病毒，对疫情病原的诊断具有确证意义，说明引起该起疫情的病原为 E30。为了及时控制疫情，采取了一系列措施，如每天开展晨检，对教室、宿舍、厕所、餐饮具等消毒，针对性地开展健康教育工作，要求勤洗手、喝开水、吃熟食，由于措施得力，经流行病学追踪调查至最后一例病例发病后 10 d，未发现新病例，疫情得到了及时控制。遗憾的是疫情有效控制后，未能对病原的传播方式进一步深入调查。本研究对 E30 分离株进行 VP1 区测序分析，由于该区域是肠道病毒衣壳蛋白中位于最外层的部分，大部分抗原决定簇也位于此，对该段序列的分析是毒株分型及其变异规律分析的有效手段[8]。本次疫情分离的 3 株 E30 与原型株 Bastianni 之间核苷酸和氨基酸的同源性分别为 81.8% 和 91.8% ~92.1%，根据肠道病毒同一血清型核苷酸和氨基酸同源性应分别超过 75% 和 88% 的原则[9]，从分子水平上进一步肯定了本次疫情的病原为 E30。新分离的 3 株 E30 之间 VP1 区核苷酸和氨基酸同源性很高，分别为 99.9% ~100.0% 和 99.7% ~100.0%，提示这些病原来源相同。依据病毒 VP1 基因全长 876 个核苷酸序列，将全球流行的 E30 分为 8 个基因型（A ~ H）[10]。浙江省 2002—2014 年 E30 在 VP1 基因进化树上位于 G 和 H 基因亚型上，本次疫情分离株属于 G 基因亚型，3 株 E30 紧密地聚集在一起，与浙江省 2013—2014 年 E30 亲缘关系很近，尤其与 CHN/ZJ/RA -72/13 株具有最近的亲缘关系，与福建省 2011 年分离株（CHN/ACSF11 -13）也有较近的亲缘关系，而与浙江省 2002—2004 年分离的 3 株 H 基因型 E30 亲缘关系相对较远，进化分析提示：引起本次疫情的 E30 G 基因亚型病毒最有可能来源于近几年在浙江省环境中循环却常常导致病毒性脑膜炎的病原[6,11]。浙江省自 2002 年以来，通过设立监测点开展对病毒性脑膜炎病原的监测，研究显示 E30 是引起浙江省病毒性脑膜炎病例的主要病原，2002 -2013 年浙江省 E30 的检出占 HEV 各血清型的 11.7% ~28.8%[6,11]，高于 1970—2008 年美国的 4.5% ~10.1%[2,12]，监测数据提示：E30 一直在浙江省环境中循环，并且活动强度较大，常常引起病毒性脑膜炎散发病例和暴发疫情，因此，必须加强监测，及时掌握病原体的遗传变异及致病性的改变，为传染病的预警及防控提供科学依据。

**参考文献**


[1] Milia MG, Cerutti F, Gregori G, et al. Recent outbreak of aseptic meningitis in Italy due to echovirus 30 and phylogenetic relationship with other European circulating strains[J]. J Clin Virol, 2013, 58(3): 579 -583.

[2] Croker C, Civen R, Keough K, et al. Aseptic meningitis outbreak associated with echovirus 30 among high school football players-Los Angeles County, California, 2014[J]. MMWR, 2015, 63(51 & 52): 1228.

[3] Kim HJ, Kang BH, Hwang SY, et al. Epidemics of viral meningitis caused by echovirus 6 and 30 in Korea in 2008[J]. J Virol, 2012, 9: 38(1 -7).

[4] 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[J]. 病毒学报，2011，27(5)：462 -467.

[5] 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[J]. 中华流行病学杂志，2005，4(26)：282 -285.

[6] 严菊英，缪梓萍，吕华坤，等. 浙江省 2013 年病毒性脑膜脑炎病原学及分子流行病学特征[J]. 中华流行病学杂志，2015，36(3)：88 -92.

[7] 严菊英，缪梓萍，吕华坤，等. 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[J]. 中华流行病学杂志，2013，34(12)：1189 -1193.

[8] Inge T, Elien M, Philippe L, et a1. Analysis of the serotype and genotype correlation of VP1 and the 5 noncoding region in an epidemiological survey of the human entcrovirus B species[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(3): 963 -971.

[9] Oberste MS, Maher K, Kilpatriek DR, et al. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to pieornavirus classification[J]. J Virol, 1999, 73: 1941 -1948.

[10] Choi YJ, Kwi SP, Kyoung AB, et al. Molecular characterization of echovirus 30-associated outbreak of aseptic meningitis in Korea in 2008[J]. J Microbiol Biotechnol, 2010, 20(3): 643 -649.

[11] Zhang L, Yan J, Ojcius DM, et al. Novel and predominant pathogen responsible for the enterovirus-associated encephalitis in Eastern China[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e85023.

[12] CDC. Nonpolio enterovirus and human parechovirus surveillance-United States, 2006 -2008[J]. MMWR, 2010, 59: 1577 -1580.


**收稿日期**：2015-07-09　（吴少慧编辑　韩仰欢校对）