

2010 年上海市疑似流行性乙型脑炎患者的病原谱研究

朱兆奎, 滕峥, 俞雪莲, 王嘉瑜, 朱奕奕, 何懿, 周欣, 张曦, 吴凡

摘要: 目的 了解上海市疑似流行性乙型脑炎(乙脑)患者的病原谱构成。方法 将 2010 年 5-10 月收集的 145 例疑似乙脑患者的 93 份血清、103 份脑脊液标本采用实时荧光 PCR (real-time PCR) 法和酶联免疫吸附试验 (ELIAS) 检测常见脑炎病毒核酸和病毒 IgM 抗体。检测病毒包括乙脑病毒 (JEV)、肠道病毒 (EV)、巨细胞病毒 (CMV)、单纯疱疹病毒 (HSV)、水痘-带状疱疹病毒 (VZV)、麻疹病毒 (MV)、呼吸道合胞病毒 (RSV)、腮腺炎病毒 (MuV)、西尼罗病毒 (WNV)。结果 100 例检出病毒核酸和/或病毒 IgM 抗体阳性 (68.97%), 病毒核酸或病毒 IgM 抗体检测阳性作为判断病毒感染的指标, 其中 EV 感染 49 例 (33.79%)、HSV 感染 22 例 (15.17%)、JEV 感染 11 例 (7.59%)、CMV 感染 5 例 (3.45%)、MuV 感染 3 例 (2.07%), 另有 10 例病例判断为两种或以上病毒混合感染 (6.90%), 未检出 VZV、MV、RSV、WNV。结论 2010 年上海市疑似乙脑患者病原以 EV、HSV 和 JEV 为主, 提示在乙脑流行季节, 需加强病毒性脑炎的监测和鉴别诊断, 为临床诊治和疾病防控提供科学依据。

关键词: 流行性乙型脑炎; 病毒性脑炎; 病原谱; 实时荧光 PCR; 酶联免疫吸附试验

中图分类号: R512.32

文献标识码: A

文章编号: 1003-9961(2011)11-0848-04

Pathogenic spectrum of suspected Japanese encephalitis cases in Shanghai 2010 ZHU Zhao-kui, TENG Zheng, YU Xue-lian, WANG Jia-yu, ZHU Yi-yi, HE Yi, ZHOU Xin, ZHANG Xi, WU Fan. Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200326, China

Corresponding author: ZHANG Xi, Email: xzhang@scdc.sh.cn

Abstract: **Objective** To understand the pathogenic spectrum of suspected Japanese encephalitis cases in Shanghai. **Methods** A total of 93 serum samples and 103 cerebrospinal fluid samples were collected from 145 suspected Japanese encephalitis cases during May-October 2010 to detect viral nucleic acid and IgM antibodies of common encephalitis viruses by using real-time PCR and ELISA. The detected viruses included Japanese encephalitis virus (JEV), enteric virus (EV), cytomegalovirus (CMV), herpes simplex virus (HSV), varicella-zoster virus (VZV), measles virus (MV), respiratory syncytial virus (RSV), mumps virus (MuV) and West Nile virus (WNV). **Results** A total of 100 samples were detected to be positive either in viral nucleic acid detection or in IgM antibody detection, the positive rate was 68.97% (100/145). Among these 100 patients, 49 (33.79%) were infected with EV, 22 (15.17%) were infected with HSV, 11 (7.59%) were infected with JEV, 5 (3.45%) were infected with CMV, 3 (2.07%) were infected with MuV, and 10 (6.90%) were co-infected with two or more viruses; No VZV, MV, RSV and WNV were detected. **Conclusion** The major pathogens in suspected Japanese encephalitis cases were EV, HSV and JEV in Shanghai in 2010. The study results indicated that the surveillance and differential diagnosis of viral encephalitis should be strengthened even in the high incidence season of Japanese encephalitis to provide clinical information for diagnosis and treatment of the disease as well as scientific evidence for the disease control and prevention.

Key words: Japanese encephalitis; viral encephalitis; pathogenic spectrum; real-time PCR; enzyme-linked immunosorbent assay

This study was supported by the National Science and Technology key Projects in the 11th five years plan (No. 2009ZX10004-105, 2009ZX10004-211); **Shanghai Municipal Health Bureau Project** (No. 2010048)

流行性乙型脑炎(Epidemic encephalitis B, 乙脑)是由乙脑病毒(又称日本脑炎病毒, Japanese encephalitis virus, JEV)引起的以中枢神经系统损害

为主的急性传染病。上海市曾是乙脑的流行区, 1965 年发生了乙脑的大流行, 发病率高达 52.11/10 万。自 1968 年起上海市逐步开展乙脑疫苗接种, 乙脑发病率逐年下降, 尤其是近 10 年, 发病率均在 0.2/10 万以下^[1-3]。乙脑病毒引起的病毒性脑炎与肠道病毒、疱疹病毒等其他病原体引起的病毒脑炎, 在临床表现上有颇多相似之处, 故单凭临床症状、体征及常规检查很难确诊, 需要借助各项辅助检查^[4]。为了解疑似乙脑患者的病原学特征, 我们在乙脑流行季节对 2010

基金项目 “十一五” 国家科技重大专项 (No. 2009ZX10004-105, 2009ZX10004-211); 上海市卫生局项目 (No. 2010048)

作者单位: 上海市疾病预防控制中心, 上海 200336

作者简介: 朱兆奎, 男, 浙江省杭州市人, 主管技师, 主要从事病毒性疾病的预防控制工作

通信作者: 张曦, Tel: 021-62758710-2501, Email: xzhang@scdc.sh.cn

收稿日期: 2011-05-16

年上海市各大医院送检的疑似乙脑患者的血清和脑脊液标本进行 JEV、肠道病毒(Enterovirus, EV)、巨细胞病毒(Cytomegalovirus, CMV)、单纯疱疹病毒(Herpes simplex virus, HSV)、水痘-带状疱疹病毒(varicella-zoster virus, VZV)、麻疹病毒(Measles virus, MV)、呼吸道合胞病毒(Respiratory syncytial virus, RSV)、腮腺炎病毒(Mumps virus, MuV)、西尼罗病毒(West Nile virus, WNV)等病毒核酸及 IgM 抗体检测,并分析了患者的年龄特征、时间分布情况及病原谱构成。现将初步研究结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 研究对象 2010 年 5-10 月在上海市儿童医院、儿科医院、儿童医学中心、瑞金医院、上海市第六人民医院等各大医院就诊的 145 例疑似乙脑患者。共收到上述患者血清及脑脊液标本 196 份,其中 47 例患者同时被采集了血清和脑脊液标本,42 例仅采集血清标本,56 例仅采集脑脊液标本。

1.2 免疫学检测 血清、脑脊液标本采用上海中正慧东医疗技术有限公司生产的“乙型脑炎病毒(抗 JEV)-IgM 酶联免疫吸附试验(ELISA)诊断试剂”进行 JEV-IgM 抗体检测;血清 EV-IgM、HSV-IgM、CMV-IgM、MV-IgM、MuV-IgM 抗体检测采用德国 Virion-Serion 公司相应病毒的 IgM ELISA 试剂盒;血清 RSV-IgM、VZV-IgM 抗体检测采用德国 IBL International 公司相应病毒的 IgM ELISA 试剂盒;血清 WNV-IgM 抗体检测采用美国 InBios International Inc 公司的“West Nile Detect™ IgM Capture ELISA”试剂盒。检测步骤严格按照试剂盒说明书进行。

1.3 分子生物学检测 取血清或脑脊液标本 200 μl,采用 Roche 公司的 MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit 试剂盒在 Roche 的 MagNA Pure LC 核酸提取仪上提取核酸 100 μl。取 5 μl 核酸模板,采用上海之江生物科技有限公司生产的荧光 PCR 试剂盒,在 Roche 的 LightCyclerR480 扩增仪进行实时荧光 PCR 检测,根据扩增曲线判断实验结果。

2 结果

2.1 疑似乙脑患者的性别和年龄构成 145 例疑似乙脑病例中,男性 99 例(占 68.28%),女性 46 例(占 31.72%),男女性别比为 1:0.46。发病年龄以 15 岁以下为主,共 119 例(占 82.07%),年龄为 5 月龄至 84 岁。病例主要集中在 7-8 月,共 95 例(占 65.52%)。本市病例 82 例,占 56.55%,其中男性

58 例,女性 24 例,最大年龄 83 岁,最小年龄 5 月龄。外来病例 63 例,占 43.45%,其中男性 44 例,女性 19 例,最大年龄 61 岁,最小年龄 2 月龄。

2.2 乙脑病毒 IgM 抗体检测结果 对送检的 196 份标本进行乙脑 IgM 抗体检测,共检出 22 份阳性,阳性检出率为 11.22%。血清和脑脊液标本 JEV-IgM 检测结果见表 1。

表 1 JEV-IgM 抗体检测结果
Table 1 Detection result of JEV-IgM

样品类型	标本数	阳性数	阳性率(%)
血清	93	13	13.98
脑脊液	103	9	8.74
合计	196	22	11.22

2.3 9 种病毒血清 IgM 抗体检测结果 对送检的 93 份血清标本进行 EV、CMV、HSV、VZV、JEV、MV、RSV、MuV、WNV 9 种病毒的 IgM 抗体检测,共检出病毒 IgM 抗体阳性标本 62 份(标本阳性检出率为 66.67%),其中 HSV-IgM 23 份(24.73%)、EV-IgM 15 份(16.13%)、JEV-IgM 13 份(13.98%)、CMV-IgM 5 份(5.38%)、MuV-IgM 2 份(2.15%),另有 4 份血清标本同时检出 2 种及以上病毒 IgM 抗体阳性(4.30%)。

2.4 9 种病毒病原核酸检测结果 送检的 196 份标本进行 EV、CMV、HSV、VZV、JEV、MV、RSV、MuV、WNV 病毒核酸检测,共有 53 份标本检出病毒核酸阳性(标本阳性检出率为 27.04%),其中脑脊液标本检出病毒核酸 42 份(标本阳性检出率为 40.78%),血清标本检出病毒核酸 11 份(标本阳性检出率为 11.83%)。另有 1 份脑脊液标本同时检出 CMV 和 HSV 核酸。两种标本检出率经 χ^2 检验,差异有统计学意义($Z = 4.56, P < 0.001$)。血清和脑脊液标本核酸检测结果见表 2。

表 2 病毒核酸检测结果
Table 2 Detection result of viral nucleic acid

病毒类型	脑脊液核酸检测阳性数	血清核酸检测阳性数	两种标本核酸检测阳性总数	核酸检出阳性率(%)
EV	37	6	43	21.94
JEV	0	0	0	0.00
CMV	3	3	6	3.06
HSV	2	2	4	2.04
MuV	1	0	1	0.51
VZV	0	0	0	0.00
MV	0	0	0	0.00
RSV	0	0	0	0.00
WNV	0	0	0	0.00

2.5 疑似乙脑患者的病原谱分析 应用免疫学和分子生物学方法检测 145 例病例,检出病毒核酸和/或病毒 IgM 抗体阳性合计 100 例,标本阳性检出率

为 68.97% 9 种病毒检出的具体病例数见表 3。另外有 10 例患者同时检出 2 种及以上病毒核酸和/或病毒 IgM 抗体,其中 2 例同时检出 EV、CMV 2 例同时检出 EV、JEV 2 例同时检出 EV、HSV, 1 例同时检出 EV、MuV, 1 例同时检出 HSV、CMV, 1 例同时检出 EV、HSV、JEV, 1 例同时检出 EV、HSV、MuV, 疑似乙脑患者标本中检出病原构成比见图 1。检出的乙脑病毒和其他病原体的时间分布情况见图 2, 该图中有 2 例乙脑患者混合其他病毒感染。不同病毒检测阳性患者不同年龄组的分布情况见表 4。

表 3 9 种病毒核酸和 IgM 抗体检测阳性病例数
Table 3 Positive case numbers of viral nucleic acid and IgM detections

病毒类型	核酸检测阳性病例数	IgM 抗体阳性病例数	核酸、抗体共同阳性病例数	阳性病例总数 ⁽¹⁾
EV	43	18	3	58(9)
JEV	0	14	0	14(3)
CMV	6	6	4	8(3)
HSV	4	26	3	27(5)
MuV	1	4	0	5(2)
VZV	0	0	0	0
MV	0	0	0	0
RSV	0	0	0	0
WNV	0	0	0	0

注:(1) 括号内的病例数为混合感染病例数。

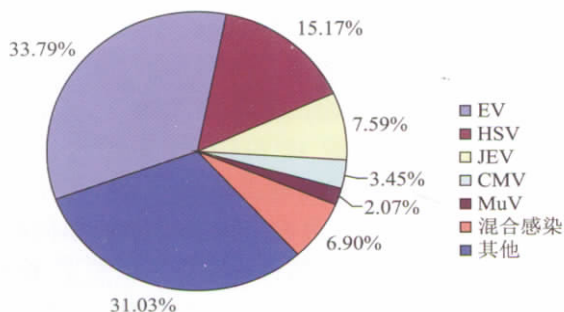


图 1 疑似乙脑患者标本中病原构成比

Figure 1 Proportion of pathogens detected in suspected Japanese encephalitis cases

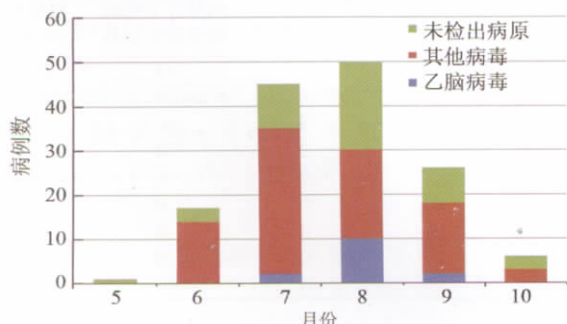


图 2 疑似乙脑患者标本中检出的 JEV 及其他病原体的时间分布

Figure 2 Time distribution of JEV and other viruses detected in suspected Japanese encephalitis cases

表 4 不同病毒检测阳性患者不同年龄组的分布

Table 4 Age distribution of cases infected with different viruses

病毒类型	<1 岁	1~ 岁	5~ 岁	10~ 岁	>15 岁	合计
EV	3	11	28	2	5	49
HSV	2	8	5	1	6	22
JEV	2	5	4	0	0	11
CMV	2	2	0	0	1	5
MuV	0	1	1	0	1	3
VZV	0	0	0	0	0	0
MV	0	0	0	0	0	0
RSV	0	0	0	0	0	0
WNV	0	0	0	0	0	0
混合感染	0	6	3	1	0	10
合计	9	33	41	4	13	100

3 讨论

乙脑是由 JEV 引起的以脑实质炎症为主要病变的急性传染病,经蚊虫传播,主要流行于亚洲地区,热带和亚热带地区最常见,好发于夏秋季。我国乙脑发病 5 月开始上升,7-8 月为高峰期,9 月开始明显下降^[5]。上海近年的监测数据显示,乙脑发病集中于 7-8 月,其中 7 月下旬、8 月上旬病例数占病例总数的 75% 以上^[2],而病毒性脑炎、脑膜炎全年均有发病,以春夏季(4-8 月)发病为主(占 86.11%)^[6]。本次研究送检的 145 例疑似乙脑发病时间在 5-10 月,95 例病例标本集中在 7 月和 8 月,占 65.52%。疑似病例的发病时间分布与上海乙脑发病时间分布基本一致。

本次研究对送检的 196 份标本进行 JEV 核酸检测,结果全部为阴性,这可能是 JEV 感染后病毒血症时间较短所致。送检的 145 份疑似乙脑患者标本通过 real-time PCR 和 ELISA 联合检测,仅 9.66% 的病例实验室检测确诊为乙脑,这个数据进一步证明,乙脑仅靠临床很难与其他病毒性脑炎进行鉴别,容易造成乙脑的误诊和漏诊。

病毒性脑炎是由多种病毒引起的脑和脑膜病变的总称,是儿童最常见的中枢神经系统感染性疾病之一,病因复杂,可由 100 多种病毒感染所致^[7]。主要有 EV,包括脊髓灰质炎病毒、埃可病毒、柯萨奇和肠道病毒 71 型;疱疹病毒(包括 HSV、VZV、EB 病毒和 CMV)腺病毒;MV; MuV; JEV 以及新发的尼帕病毒和 WNV 等。随着计划免疫接种的不断广泛和深入,常见病毒种类也逐渐发生了变化^[8]。2006-2008 年广东省病毒性脑炎监测显示,以腺病毒最高,其次是 HSV、JEV、CMV、埃可病毒、柯萨奇病毒^[9]。李幸乐等^[10]对 2005 年河南省临床诊断为病毒性脑炎患者的急性期血清和脑脊液标本检测病毒特异性 IgM 抗体,结果 209 例患者中检测出病毒

特异性 IgM 抗体, 构成比顺序依次为柯萨奇病毒、埃可病毒、MuV、HSV、JEV、EB 病毒和 VZV。我们这次对送检的 196 份标本进行脑炎相关的 9 种病毒核酸检测, 53 份标本病毒核酸阳性, 脑脊液中的病毒核酸检出率明显高于血清中的病毒核酸检出率。两种标本中检出病毒核酸构成比顺序依次为 EV、CMV、HSV、MuV, 未检出 JEV、VZV、MV、RSV、WNV 病毒核酸。送检的 93 份血清标本进行脑炎相关的 9 种病毒特异性 IgM 抗体检测, 共检出 IgM 抗体阳性标本 62 份(阳性检出率为 66.67%) 构成比顺序依次为 HSV、EV、JEV、CMV、MuV, 另外有 4 份血清标本同时检出两种及以上病毒 IgM 抗体阳性, 未检出 VZV、MV、RSV、WNV 病毒特异性 IgM 抗体。

145 例患者的标本通过 real-time PCR 和 ELISA 联合检测, 其中 EV 49 例(33.79%)、HSV 22 例(15.17%)、JEV 11 例(7.59%)、CMV 5 例(3.45%)、MuV 3 例(2.07%), 另有 10 例检出 2 种或以上病毒核酸和/或者抗体(6.90%), 未检出 VZV、MV、RSV、WNV。实验中有 31.03% 的病例未能检出病原核酸和/或抗体, 这当中可能有一部分是由新的病原引起的感染, 另一部分可能是由于临床医生判断有误而造成的误诊或漏诊。另外实验方法本身的不够完善也是一个主要原因, 本次实验仅对 9 种较为常见的病毒进行检测, 而可以引起病毒性脑炎的病毒已知的有 100 多种, 许多病毒引起的感染没得到有效的检测。此外, 如果标本中病原含量较少、疾病早期或者患者已经进行了药物治疗, 都可能无法得到阳性结果。

本次研究发现, 100 例检出病毒阳性的患者中, 有 83% 的病例为 10 岁以内的儿童, 10 例混合感染的病例中有 9 例都发生在这个年龄段。病毒性脑炎这种年龄分布特点与儿童免疫系统功能发育不完善, 易于感染引发脑炎有很大的关系; 另外重症患者机体免疫功能下降, 造成 EV、HSV 等获得性的感染而造成混合感染。

综上所述, 2010 年上海市疑似乙脑患者病原以 EV、HSV 和 JEV 为主, 乙脑流行季节与其他非病毒性脑炎在临床上很难进行区分, 造成乙脑的误诊和漏诊。本次研究提示, 在乙脑流行季节需加强对于病毒性脑炎的监测和鉴别诊断, 不仅能为临床提供诊治信息, 也可为疾病预防和控制方案的制订提供依据。

参考文献

[1] Shen B, Ding D, Li YT, et al. Study on ecological factors for secular changes in incidence of Japanese encephalitis in Shanghai

[J]. *Chinese Journal of Public Health* 2002, 18(3): 308 - 309. (in Chinese)

沈冰, 丁汀, 李燕婷, 等. 上海市流行性乙型脑炎发病率长期变异的生态因素研究 [J]. *中国公共卫生*, 2002, 18(3): 308 - 309.

[2] Li YT, Zhu YY, Jin BH, et al. Epidemiological characteristics of Japanese encephalitis in Shanghai [J]. *Chinese Journal of Vaccines and Immunization*, 2009, 15(6): 507 - 510. (in Chinese)

李燕婷, 朱奕奕, 金必红, 等. 上海市流行性乙型脑炎流行病学分析 [J]. *中国疫苗和免疫*, 2009, 15(6): 507 - 510.

[3] Zhu ZK, Zhang X, Teng Z, et al. Development and primary application of a SYBR Green I real-time polymerase chain reaction for the detection of Japanese encephalitis virus [J]. *Chinese Journal of Vector Biology and Control*, 2007, 18(3): 215 - 218. (in Chinese)

朱兆奎, 张曦, 滕峥, 等. SYBR Green I 实时 PCR 检测乙脑病毒方法的初步建立与初步应用 [J]. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2007, 18(3): 215 - 218.

[4] Romero JR, Newland JG. Viral meningitis and encephalitis: traditional and emerging viral agents [J]. *Semin Pediatr Infect Dis* 2003, 14: 72 - 82.

[5] Li YX, Yin ZD, Li JH, et al. Epidemiological characteristic analysis of Japanese encephalitis in China during 2004 - 2006 [J]. *Chinese Journal of Vaccines and Immunization*, 2007, 13(6): 528 - 532. (in Chinese)

李艺星, 尹遵栋, 李军宏, 等. 中国 2004 - 2006 年流行性乙型脑炎流行病学特征分析 [J]. *中国计划免疫*, 2007, 13(6): 528 - 532.

[6] Li YQ, Jiang Y, Qiao GL. Investigation and analysis of 72 viral encephalitis and meningitis cases [J]. *Preventive Medicine Tribune* 2009, 15(12): 1255 - 1257. (in Chinese)

李轶群, 江雁, 乔国良. 72 例病毒性脑炎、脑膜炎病例调查 [J]. *预防医学论坛*, 2009, 15(12): 1255 - 1257.

[7] Hinson VK, Tyor WR. Update on viral encephalitis [J]. *Curr Opin Neurol* 2001, 14(3): 369 - 374.

[8] Zhong JM, Zhou MZ, Zhou HP, et al. Study the etiology of children's viral encephalitis [J]. *Journal of Applied Clinical Pediatrics* 2000, 15(4): 211 - 212. (in Chinese)

钟建民, 周末芝, 周红平, 等. 儿童病毒性脑炎病原学研究 [J]. *实用儿科临床杂志*, 2000, 15(4): 211 - 212.

[9] Chen QX, Mo YL, Zou LR, et al. Analysis of the surveillance on the viral encephalitis in Guangdong province, 2006 - 2008 [J]. *South China Journal of Preventive Medicine* 2009, 315(3): 9 - 12. (in Chinese)

陈秋霞, 莫艳玲, 邹丽容, 等. 2006 - 2008 年广东省病毒性脑炎监测情况分析 [J]. *华南预防医学*, 2009, 315(3): 9 - 12.

[10] Li XL, Zhang AM, Xu ZQ, et al. Preliminary study on viral etiology of viral encephalitis in Henan province [J]. *Journal of Medical Forum* 2009, 30(14): 47 - 48. (in Chinese)

李幸乐, 张爱梅, 徐子乾, 等. 河南省病毒性脑炎病原谱研究初报 [J]. *医药论坛杂志*, 2009, 30(14): 47 - 48.