

## 上海市人群 Echo30 病毒性脑膜炎隐性感染调查

高洁, 赵雅男, 姜庆五\*

(复旦大学 公共卫生学院 流行病学教研室, 公共卫生安全教育部重点实验室, 上海 200032)

**摘要:** 为了了解上海市不同年龄组人群的 Echo30 病毒隐性感染情况及 IgG 抗体阳性率分布。采集上海市 412 份不同年龄组人群血清, 用间接酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测血清中的 Echo30 IgG 抗体。发现受检普通人群血清中 Echo30 IgG 抗体阳性率为 25.8%。其中 1 岁以下婴幼儿中未见抗体阳性者, 15 岁以下儿童抗体阳性率较低 (10%~16.7%), 15 岁以上人群抗体阳性率水平明显升高 (45.0%~46.7%)。孕妇与普通人群抗体阳性率无显著性差异。研究结果提示上海市人群中存在隐性感染者, 人群通过自然感染获得免疫保护, 15 岁以下儿童为 Echo30 感染及发病的高危人群, 母体传递给婴幼儿的抗体水平较低, 不能为婴幼儿提供先天性免疫保护。

**关键词:** 埃可病毒 30 型 (Echo30); 无菌性脑膜炎; 肠道病毒; 隐性感染

**中图分类号:** R373.2<sup>+</sup>4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8721 (2007) 02-0121-04

近年来, 我国不同地区报道发生了多起较大规模的无菌性脑膜炎暴发, 患者主要集中在 15 岁以下儿童, 症状上主要为发热、头痛、恶心、呕吐, 病程 3~10 天, 预后一般良好, 部分病例可能出现神经系统后遗症<sup>[1-3]</sup>。经一系列流行病学调查和病毒分离鉴定证实菌性脑膜炎暴发的毒株具有我国国内流行株的特点, 与以往国外报告毒株存在差异<sup>[1-5]</sup>。

2003 年 1~7 月, 在我国苏北的无菌性脑膜炎暴发疫情中, 我们从人群分离得到 Echo30 毒株, 并完成相关生物信息学分析<sup>[3-5]</sup>。在此基础上, 本室利用自人群分离的毒株建立了检测人群血清 Echo30 特异性 IgG 抗体的间接酶联免疫吸附试验 (ELISA)。为了了解上海市人群 Echo30 国内流行株引起的病毒性脑膜炎的隐性感染情况及保护性分布情况, 我们使用 ELISA 方法对不同年龄组的 412 名健康人血清进行了 Echo30 IgG 抗体检测, 并进行了相应比较分析。

## 材料与方法

### 1 材料和试剂

1.1 调查对象 上海市某门诊 60 岁以下健康体检人群血清, 共 412 份。其中 330 份为普通人群血清, 8 月龄以下年

龄组 30 人, 8 月~1 岁组 30 人, 1~2 岁组 30 人, 2~10 岁组 60 人, 10~15 岁组 30 人, 15~20 岁组 30 人, 20 岁以上组 120 人; 另外 82 份为孕妇血清, 20~30 岁组 52 人, 30 岁以上组 30 人。

1.2 病毒株和细胞来源 FDI S03\_84 该株 Echo30 病毒由 2003 年苏北无菌性脑膜炎暴发中的一名 6 岁患儿脑脊液中分离得到, 其全基因组测序工作已由本室完成。试验用 MRC5 细胞购自上海中国科学院细胞所, 引种自 ATCC。

1.3 试剂和仪器 最低必需培养基 (MEM) (Gibco, USA)、BCA 蛋白定量试剂盒 (碧云天)、96 孔酶标板 (Dynatech Immulon, USA)、辣根酶 (HRP) 标记的山羊抗人 IgG 抗体 (Vector, USA)、邻苯二胺 (OPD) (Sigma, USA)、Beckman Optimal L-80 XP 超速离心机、Bio-tek Elx 800 酶标仪。

### 2 方法

2.1 病毒扩增和抗原制备 将 Echo30 FDI S03\_84 毒株接种于 75cm<sup>2</sup> 培养瓶中的 MRC5 细胞单层, 待细胞完全病变后, 20 和 37 冻融 3 次, 3 000r/min 离心 20min 去除细胞碎片, 取上清。反复接种传代, 扩增病毒至足够量。56 灭活 2h, 40 000r/min 超速离心 1.5h, 沉淀溶于少量 PBS 中, 置 40% 蔗糖溶液上 40 000r/min 离心 3h, 少量 PBS 溶解沉淀, BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白含量, 20 保存备用。

2.2 间接 ELISA 检测 使用本室已确定的 ELISA 检测程序。碳酸盐缓冲液 (PH 9.6) 将抗原稀释为 2.5μg/mL, 包被 96 孔酶标板, 每孔 50μl, 4 过夜, 次日弃去抗原液, PBST (0.01mol/L PBS+0.05% Tween 20) 洗板。每孔加入 150μl 封闭液 (含 10% 小牛血清的 PBS) 封板, 4 过夜。去除封闭液后, 加 50μl 1:200 稀释的血清样本, 稀释液 (含 10% 小牛血清的 PBS) 作空白对照。37 孵育 1h, PBST 洗板后加 50μl 1:5 000 稀释的 HRP-羊抗人 IgG, 37 孵育 30min, 洗板后加 100μl OPD 底物应用液, 37 避光反应 15min, 加 50μl 2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应。Bio-tek Elx 800 酶标仪 490nm、630nm 双波长测定结果。并根据阳性判定值 (cutoff

收稿日期: 2006-09-27; 修回日期: 2006-12-22

作者简介: 高洁 (1982-), 女, 安徽蚌埠人, 硕士研究生, 主要从事传染病流行病学研究

\*通讯作者: 姜庆五, 男, 教授, E-mail: jiangqw@fudan.edu.cn

值)将样品判为抗体阳性或阴性。

2.3 统计分析 使用软件 SPSS 11.5 进行统计分析。

## 结 果

### 1 普通人群血清 Echo30 IgG 抗体检测结果及年龄分布情况

330 名普通健康人血清中共检出 85 例为 Echo30 IgG 抗体阳性,总阳性率为 25.8%。不同年龄组人群抗体阳性率情况有较大波动( $\chi^2 = 59.733, P < 0.001$ ),基本呈现出随年龄升高而升高的趋势,见表 1。研究发现,1 岁以下的婴幼儿,包括 8 月龄以内及 8 月龄至 1 岁婴幼儿中均无 Echo30 IgG 抗体阳性者,1~15 岁人群 Echo30 抗体阳性率均较低(10%~16.7%),15 岁以上人群 Echo30 抗体阳性率大幅度升高后趋于平稳(45.0%~46.7%)(图 1)。

表 1 上海市不同年龄组普通人群血清 Echo30 IgG 抗体检测情况

Table 1 Detection of IgG antibody to Echo30 in population of different ages in Shanghai

Age	No. tested	No. positive	Positive rate(%)
0-	30	0	0
8mon-	30	0	0
1y <sup>r</sup>	30	3	10.0
2y <sup>r</sup>	60	9	15.0
10y <sup>r</sup>	30	5	16.7
15y <sup>r</sup>	30	14	46.7
20y <sup>r</sup>	120	54	45.0
Total	330	85	25.8

$\chi^2 = 59.733 P < 0.001^*$

\* Statistically significant

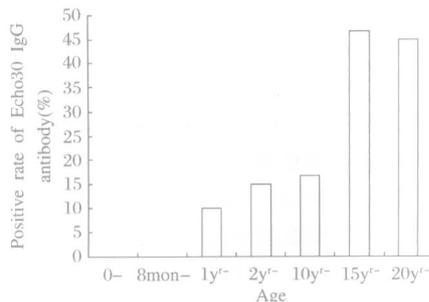


图 1 上海市各年龄组人群血清 Echo30 IgG 抗体阳性率

Figure 1 Positive rate of IgG antibody to Echo30 in population of different ages in Shanghai

### 2 不同人群血清 Echo30 IgG 抗体检出情况比较

受检血清中有 82 例为孕妇血清,其中 34 例为 Echo30 IgG 抗体阳性,阳性率为 41.5%。30 岁以上年龄组孕妇和 20~30 岁年龄组孕妇 Echo30 IgG 抗体阳性率无显著性差异( $\chi^2 = 3.13, P = 0.077$ )

(表 2)。因受检孕妇年龄均为 20 岁以上,选择普通人群中相应年龄段人群与之做比较。受检普通人群年龄在 20 岁以上的共 120 例,其中 54 例为 Echo30 IgG 抗体阳性,阳性率为 45.0%(表 3)。相应年龄孕妇与普通人群血清 Echo30 IgG 抗体阳性率情况类似,组间无显著性差异( $\chi^2 = 0.224, P = 0.878$ )。

表 2 不同年龄组孕妇血清 Echo30 IgG 抗体检测情况

Table 2 Detection of IgG antibody to Echo30 in pregnant women of different ages

Age(year)	No. tested	No. positive	Positive rate(%)
20-	52	19	36.5
30-	30	17	56.7
Total	82	36	43.9

$\chi^2 = 3.13 P = 0.077$

表 3 孕妇与普通人群血清 Echo30 IgG 抗体检测情况比较

Table 3 Comparison of positive rate of antibody to Echo30 among common population and pregnant women

Population	Echo30 IgG antibody		Positive rate(%)
	No. positive	No. negative	
Common population	54	66	120(45.0%)
Pregnant women	36	46	82(43.9%)
Total	88	114	202(44.6%)

$\chi^2 = 0.224 P = 0.878$

## 讨 论

Echo30 属人类肠道病毒血清型之一,是引起儿童无菌性脑膜炎的常见病原。但由于其抗原变异频繁,给血清学调查带来较大困难。我们从 2003 年苏北无菌性脑膜炎暴发人群中分离得到近期国内流行毒株,在毒株鉴定过程中,本室使用了各种肠道病毒的标准血清抗体与分离毒株进行了交叉中和试验,结果表明除 Echo30 抗体外,分离毒株不会和其他毒株的阳性标准血清发生交叉中和反应<sup>[6]</sup>。因此,为了提高抗体检测的准确度,我们使用该株由人群分离得到的流行毒株作为抗原建立了 Echo30 国内流行株血清 IgG 抗体特异性的 ELISA 检测方法<sup>[7]</sup>,并结合间接免疫荧光方法,对所建立的 ELISA 检测方法进行了评价,确定该方法具有较为理想的灵敏度和特异性后,我们使用该方法对上海市人群血清保护性抗体及隐性感染情况进行了初步调查分析。

人群对肠道病毒普遍易感,感染后多可获得同型病毒的持久免疫<sup>[8]</sup>。机体内存在 Echo30 IgG 抗体可以为机体提供对 Echo30 型肠道病毒的免疫保护。目前尚没有常规的肠道病毒计划免疫提供,人群的保护性抗体主要在自然感染过程中获得。自然

感染过程包括出现明显症状的显性感染和无明显症状的隐性感染。隐性感染者不仅可以通过感染过程获得对同型病毒的免疫保护,他们在感染过程中也可能成为疾病的传染源,因此,在 Echo30 病毒性脑膜炎的预防控制工作中,广泛存在的人群隐性感染状况是不容忽视的。此次研究发现,上海地区健康人群中存在一定水平的抗体阳性率者,这部分人群并未发生过典型的病毒性脑膜炎症状,提示该部分人群主要通过隐性感染获得免疫保护。

根据研究结果,从抗体的年龄分布情况来看,Echo30 IgG 抗体阳性率基本呈现随年龄升高而升高的趋势。15 岁以下儿童血清 Echo30 IgG 抗体阳性率水平较低,15 岁以上人群的抗体阳性率则有明显升高,提示 15 岁以下儿童缺乏 Echo30 保护性抗体。因此,无论 Echo30 病毒性脑膜炎的显性感染和隐性感染,国内流行株感染的高危人群都是年龄在 15 岁以下的儿童,这与近些年来我国各地病毒性脑膜炎暴发中患者年龄分布的情况基本吻合<sup>[1-3]</sup>。15 岁以上年龄人群的血清 Echo30 抗体阳性率水平基本维持稳定,未见 20 岁以上人群血清 Echo30 抗体阳性率继续有明显上升的现象,20 岁以上与 30 岁以上年龄组孕妇的血清 Echo30 抗体阳性率水平亦未见明显差异,这提示人群的自然感染过程大多在 15 岁以下完成,这可能和儿童的行为状态有关,该年龄段的儿童更容易在玩耍过程中受到 Echo30 病毒的感染。另外,不同年龄的人群对 Echo30 病毒的易感性是否本身就存在不同也有待于进一步的探讨。孕妇抗体水平与普通人群相似,但 8 月龄及 1 岁以内儿童均未检出抗体阳性者,提示母体传递给婴幼儿的抗体水平可能较低,难以为婴幼儿提供先天性的免疫保护,儿童都必须经历自然感染过程才能获得免疫保护。成人的抗体阳性率水平较高,有将近一半的成人已经通过自然感染获得保护性抗体,但也尚有一半左右的人群抗体为阴性,所以这一部分成人仍存在感染风险。目前尚未见成人中出现 Echo30 病毒型脑膜炎暴发的报告,这可能和绝大多数成人感染后,症状一般轻微,不易像儿童那样出现明显的脑膜炎症状有关;但也有报道说明,成人和婴幼儿如果发病,则出现神经系统后遗症的可能性较大<sup>[9,10]</sup>。因此,在 Echo30 病毒性脑膜炎防治工作中,我们认为应当加强对 15 岁以下儿童,包括对新生儿的保护,这部分人群为防治工作的重点关注人群。另外,也应关注成人感染情况,以避免神经系统后遗症的发生。

目前,我国尚缺乏常规的肠道病毒监测系统,Echo30 病毒在人群中流行的资料严重不足,我们对引起多次脑膜炎暴发的 Echo30 具体传播途径尚不清楚。目前仅有通过加强肠道病毒传染病防治知识宣传,加强饮食、饮水卫生管理,来减少的发病<sup>[11]</sup>。但若希望真正切断疾病传播,在拥有血清学调查技术的基础上,需要进一步开展大范围的血清流行病学调查工作,结合现场流行病学工作和相关病毒信息,完善病毒监测体系,继续探索病毒在人间传播的关键环节,从而为疾病控制工作提供更为精确的理论指导。

### 参考文献:

- [1] 王海岩,许文波,徐爱强,等. 一起传染病暴发中肠道病毒血清型鉴定和 ECHO30 基因特征分析[J]. 病毒学报, 2005, 21(2): 106-112.
- [2] 龚黎明,严菊英,葛琼,等. 浙江省局部地区 2002-2003 年流行的无菌性脑膜炎的病原学检测与分析[J]. 中国计划免疫, 2004, 10(6): 336-339.
- [3] Zhao Y N, Jiang Q W, Jiang R J, et al. Echovirus 30, Jiangsu Province, China[J]. Emerg Infect Dis, 2005, 11(4): 562-567.
- [4] 赵雅男,姜庆五,姜仁杰,等. 苏北地区 2003 年病毒性脑膜炎暴发病原分离株 Echo30 的序列分析[J]. 中华流行病学杂志, 2005, 26(4): 282-285.
- [5] 赵雅男,姜庆五,姜仁杰,等. 我国新分离 ECHO30 病毒 VP1 序列分析[J]. 病毒学报, 2005, 21(2): 101-105.
- [6] 赵雅男,姜仁杰,姜庆五,等. 苏北地区无菌性脑膜炎病因病毒的分离和初步鉴定[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(1): 49-51.
- [7] Aspholm R, Zuo S S, Fohlman J, et al. A novel serological technique: polymerase chain reaction enhanced immunoassay. Application to enterovirus IgM diagnosis[J]. J Virol Meth, 1999, 80(2): 187-196.
- [8] 李岩,徐爱强,宋立志,等. 埃可病毒 30 型所致无菌性脑膜炎暴发的血清流行病学分析[J]. 中国计划免疫, 2005, 11(6): 461-464.
- [9] Bernit E. Prospective investigation of a large outbreak of meningitis due to Echovirus 30 during summer 2000 in Marseilles, France[J]. Medicine, 2003, 83(4): 245-253.
- [10] Schumacher J D. Outbreak of Echovirus 30 meningitis in Switzerland[J]. Scand J Infect Dis, 1999; 31: 539-542.
- [11] 姜仁杰,陈胤忠,赵雅男,等. Echo30 型病毒性脑膜炎暴发的流行病学调查[J]. 疾病控制杂志, 2005, 9(6): 616-618.

## Investigation of Asymptomatic Infection of Echovirus 30 in Population of Shanghai

GAO Jie , ZHAO Ya-nan , JIANG Qing-wu \*

( Key Laboratory of Public Health Safety, Ministry of Education, School of Public  
Health, Fudan University, Shanghai 200032, China)

**Abstract :** To investigate the serum level and distribution of IgG antibody to Echovirus30 (Echo30) in population of Shanghai, 412 serum samples were collected from healthy people in Shanghai. The IgG antibody to Echo30 was detected by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Positive rate of Echo30 antibody in the whole population of Shanghai was 25.8%. None of the sera from infants under 1 year old was Echo30 IgG positive. The positive rate was low in children under 15 years old (10%-16.7%) and high in children above 15 years old (45.0%-46.7%). There was no significant difference in positive rate of Echo30 antibody among the pregnant women and the common population. We concluded that there were asymptomatic infections of Echo30 in population of Shanghai. Population acquired immunity through natural infection. The children under 15 years old were at high risk of infection and diseases attack of Echo30. The level of Echo30 IgG antibody transmitted from mother to infant was low, so infant didn't have innate immunity.

**Key words :** Echovirus 30(Echo30); aseptic meningitis; enterovirus; asymptomatic infection

Corresponding author: JIANG Qing-wu, E-mail: jiangqw@fudan.edu.cn