

急性出血性结膜炎爆发中柯萨基 病毒 A₂₄ 变种的分离与鉴定

吴家驹 张齐良 胡必勇 陈茂义

(湖北沙市卫生防疫站, 沙市 434000)

胡希民 谭顺华 宋 平

(中国医学科学院医学生物学研究所, 昆明)

提 要

1988年7—11月湖北沙市出现了一次急性出血性结膜炎(红眼病)的爆发流行, 市区发病率为7%, 累计患者不少于1.7万人。用Hela细胞从38例典型红眼病患者眼拭中分离出病毒28株(74%), 理化试验与电镜观察提示为肠道病毒, 根据其生物学特性与特异性中和实验证明为柯萨基A组24型变种(CA24V)。检测的两个毒株中一株对乳鼠有致病性, 而另一株无致病性。流行后红眼病48名患者恢复期血清CA24V特异性中和抗体阳性率(以 $\geq 1:4$ 为阳性计)为81.2%, 非红眼病对照血清阳性率为14.6%, 差异极显著($P < 0.01$), 结合流行病学与临床特征, 认定是CA24V引起的AHC爆发流行。

关键词 柯萨奇病毒A24变种 急性出血性结膜炎 肠道病毒

急性出血性结膜炎(AHC, 俗称红眼病)是一种呈爆发流行波及面广的传染病, 近20年来, 全世界不同地区出现了多次流行, 并证明有两种肠道病毒——肠道病毒70型(EV70)和柯萨基病毒A24变种(CA24V)是主要病原^[1]。七十年代初以来, 国内许多城市亦曾发生红眼病流行, 鉴于我国大陆以往只证明为EV70引起AHC的研究报告, 1988年7~11月沙市地区发生AHC流行时, 我们作了病毒学与流行病学研究, 证明是由CA24V引起的AHC爆发, 本文报告病毒学研究结果。

材 料 与 方 法

一、标本采集 本地红眼病发病高峰期(8月下旬)在市二医院眼科门诊部现场用棉拭擦洗红眼病人眼结膜及分泌物, 置0.5%水解乳蛋白中, 立即置冰壶带回试验室, 加双抗后放-30℃冰箱保存。血清标本采自流行高峰后1个月左右恢复期AHC病人与未患过红眼病的正常人, 均低温冻存。

本文于1989年4月28日收到

[致谢]: 本课题研究工作中, 电镜观察得到湖北医学院病毒研究所邓志明所长及梁浩麟主任的帮助, 并赠给EV70抗血清; 湖北省医学科学院病毒所赠予Hela与Vero细胞; 新加坡大学Yin-Murphy教授惠赠CA24V代表株(EH24/70)毒种及抗血清。沙市第一人民医院病理科周开敏主任代做病理切片, 一并深表谢意。

二、病毒分离 用 HeLa 细胞管, 按常规方法接种^[2], 37°C 静置培养, 观察 7~9 天, 出现 CPE 者冻存留待鉴定。所用的 HeLa 与 Vero 细胞均为湖北省医学科学院病毒所赠予。

三、免疫血清制备 用本次分离的代表株 88E04 与 88E09 在不含血清维持液的 HeLa 细胞瓶中 37°C 培养 2~3 天即达完全病变, 冻融 3 次 3000r/m 离心 20 分钟, 上清液免疫健康公鸡(1.5kg 左右), 方法参考文献^[2]。

四、病毒滴定与中和试验 用微板法, 基本上按文献^[3]进行。病毒鉴定时用 Vero 细胞, 测定人血清抗体时用 HeLa 细胞与 88E64 病毒抗原。

五、理化特性试验 按文献^[4]的方法作了耐氯仿, 盐酸(PH3.0), 1mol/L MgCl₂ 加热保护及 5-碘脱氧尿苷对复制影响的试验。

六、鼠眼感染试验 代表株 88E04 与 88E09 病毒, 分别注射同窝出生后 ≤ 48 小时的昆明种乳鼠各 5 只, 每只注射脑内 10 微升, 腹腔与皮下各 20 微升, 留 2~3 只对照, 放回母鼠缸中按常规观察与传代^[2]。

七、电镜观察 由湖北医学院电镜室协助完成。

结 果

一、流行概况: 沙市地区 1988 年 7 月第 3 周眼科门诊红眼病病人开始增加, 8 月的第 3 周到 9 月的第 3 周为发病高峰, 一直延续到 11 月中旬才终止, 此次流行历时 4 个月。经调查推算全市市区人口平均发病率为 7%, 累计患者不少于 1.7 万人。主要临床表现为结膜感染、结膜下出血、异物感、眼痒、多泪、眼睑肿胀、眼痛、畏光、双眼受累及部分患者有上感样症状, 多数患者一周内恢复, 未观察到神经系统方面的疾病。^[5]

二、病毒分离: 采取 38 份眼拭标本, 经 3 代培养, 已分离出病毒 28 株, 阳性率为 74%。按发病到采样的日数分, 1—2 天为 83% (25/30), 3—4 天为 38% (3/8)。按出现 CPE 阳性的传代数分, 一代阳性 20 株 (53%), 二代阳性 6 株 (16%), 三代阳性 2 株 (5%)。

病毒在 HeLa 细胞中复制后, CPE 明显, 早期可见散在的园化细胞, 晚期细胞全部园化, 继之全部脱落。病毒在 Vero 细胞上产生的 CPE 与上相同, 证明 Vero 细胞也是敏感的。

三、病毒的理化特性: 几种抵抗力试验结果表明 (表 1), 2 个代表株的理化特性相似, 都耐酸、抗氯仿, 在 5-碘脱氧尿苷存在时感染性不下降, 能被 1 mol/L MgCl₂ 保护 (在 50°C 加温 60 分钟滴度未明显下降), 因此具有肠道病毒的特性。^[8]

表 1. 代表株的理化特性试验 (TCID₅₀/0.1ml)

Table 1. Physico-chemical characteristic experiments of two strains (TCID₅₀/0.1ml)

试验毒株	病毒 对照	pH 3.0	20%	0.005%	50°C	1 小时
		1 小时	氯仿	5 碘尿苷	病毒对照	1 mol/L MgCl ₂
88E04	6.0	5.77	5.77	6.0	2.50	6.0
88E09	7.0	6.77	6.56	6.77	3.67	6.67

四、电镜观察：88E04 株感染的 Vero 细胞，经超薄切片电镜检查，发现细胞浆内有许多呈晶格样排列的病毒颗粒，其直径为 25nm 左右（见图 1）。

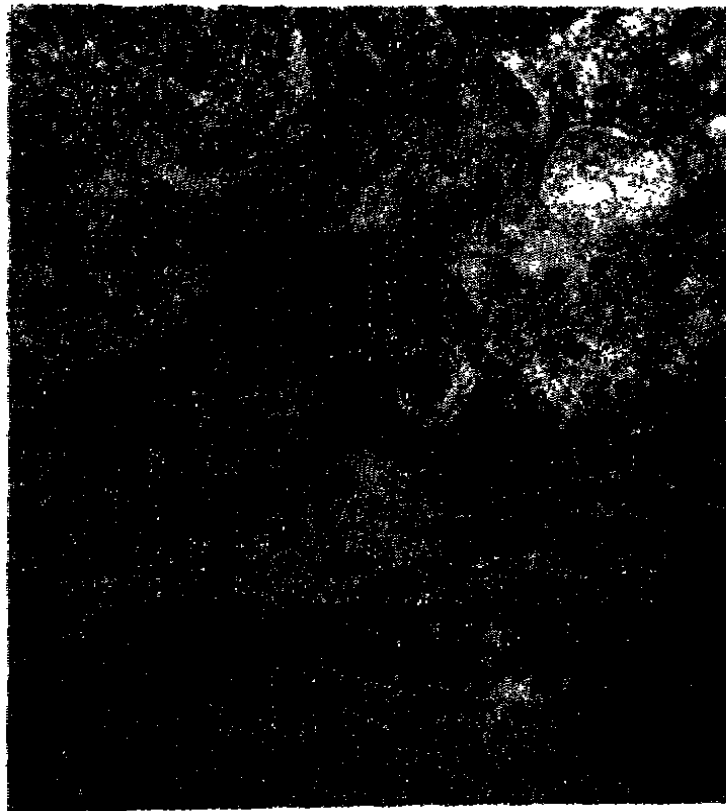


图 1、电镜下所见的 Vero 细胞内的
病毒颗粒，呈典型晶格排列

直径为 25nm (放大 39,000 倍)。

Fig 1. Electron micrograph of negatively stained virion of strain 88E04 in material from Vero cell culture (X 39000)

五、乳鼠感染试验：二个代表株注射乳鼠第 1 代各 5 只，，到第七天均未见发病，但在第 2 代第 4 天时 88E09 株注射的 5 只乳鼠都比对照鼠小，1 周解剖时除个体小外（5.5 克/只：4.5 克/只），还可见白毛比对照鼠少，呈明显发育不良；第 3 代的第 6 天，除发育不良外，有一只右前脚向外翻，不能运动，第 7 天余 4 只亦全部发病。病鼠骨骼肌经病理切片证实有柯萨基 A 组病毒感染的病变特征^[6]：肌纤维断裂、失去条纹，单核细胞、多形核细胞与嗜伊红细胞浸润等。并从病鼠分离到同样病毒。88E04 注射的乳鼠经传 4 代未见发育不良和发病，与对照鼠体重一样。

六、病毒中和实验鉴定与抗原分析：我们先用 EV70 抗血清（含 50 个中和单位）对 2 个代表株作中和试验，都未被中和。昆明医学生物学研究所鉴定 4 个毒株（包括 88E04 与 88E09）亦不被 EV70 血清中和，但可被 CA24v 抗血清中和。最后用代表株与新加坡 CA24v 参考株（EH24/70）作了交叉中和试验与抗原分析，结果表明二者可互相中和且其抗原性相似（表 2），从而确证此次分离的毒株为 CA24v。

我们又用自制 40 个中和单位的 88E04 抗血清 (对本株中和效价为 1 : 1280, 免前不含 CA24V 抗体) 对其余毒株作中和试验, 结果均可被中和。88E09 虽然对乳鼠有致病性, 但与 EH24/76 和 88E04 可互相中和, 未见抗原性有明显差别 (表 2)。

表 2. 代表株与参考株的交叉中和试验结果

Table 2. Cross-neutralization tests with Singapore 1970 AHC epidemic virus (CA24V) and Shashi 1988 AHC epidemic viruses (88E04 and 88E09)

病毒	抗血清中和滴度 (50% 终点)		
	EH24/70 (猴)	88E04 (鸡)	88E09 (鸡)
EH24/70	1600	640	320
88E04	1200	1280	320
88E09	1600	640	320

七、血清抗体测定: 检测确系患过红眼病者恢复期血清 48 份, 并设同期相同数量非红眼病健康对照, 结果表明, 48 份 AHC 患者恢复期血清中和抗体阳性 (滴度 $\geq 1 : 4$) 率为 81.2% (详见表 3)。而同期非 AHC 健康人群血清阳性率仅为 14.6%。两组结果经卡方检验, 有极显著差异 ($P < 0.01$)。48 名 AHC 患者中有 4 人曾作病毒分离, 此次中和抗体均为阳性, 其中 3 人病毒分离亦为阳性。

表 3. 48 例 AHC 患者恢复期血清中和抗体测定

Table 3. Results of neutralization test with AHC patients sera collected from convalescent phase and control sera from non-AHC persons

抗体滴度	AHC		非 AHC		小 计
	人 数	%	人 数	%	
<1 : 4	9	18.8	41	85.4	50
1 : 4	6	12.5	1	2.1	7
1 : 8	15	31.2	4	8.3	19
1 : 16	14	29.2	2	4.2	16
$\geq 1 : 32$	4	8.3	0		4
阳性小计	39	81.2	7	14.6	

差异显著性检验: $\chi^2 = 42.7, p < 0.01$

讨 论

一、此次分离的毒株 (代表株) 耐氯仿、耐酸, 在 0.005% 的 5-碘脱氧尿苷中培养感染性不下降, 在 50°C 中加温能被 1 mol/L $MgCl_2$ 保护而不降低其感染性, 电镜下毒粒直径约为 25nm, 并在胞浆内呈典型晶格样排列, 具有肠道病毒的典型特征⁽⁸⁾。

三、特异性中和试验表明, 此次 2 个代表株用 50 个中和单位的 EV70 抗血清均不能中和, 此 2 个毒株与新加坡 EH24/70(CA24v) 作交叉中和试验与抗原分析, 可互相中和且抗原性相似, 确证为 CA24V。且全部毒株均可被 40 个单位的自制 88E04 抗血清中和, 说明此次分离株的抗原性均属 CA24v (EH24/70) 类。

三、从流行病学上来看, 自 1969 年 AHC 首先在加纳爆发以来, 世界上许多国家出现了 AHC 的多次爆发流行^[11], 而亚州更是多次出现 EV70 与 CA24V 的交替流行^[8, 12]、或混合流行^[7], 但 1981 年是 EV70 的最后一次世界流行^[10]。1985~1986 年新加坡再度发生 CA24V 的爆发^[13], 台湾^[12]、日本^[14]也同时发生了流行。近年我国大陆许多大中城市发生了流行, 沐桂藩已从 1988 年北京 AHC 爆发中分离到 CA24V^[15]。在调查中我们了解到, 沙市的一些学生暑假在北京旅游或探亲返回途中即得了红眼病, 有的是出差从北京、武汉感染归来, 这与我们对病毒的鉴定结果是一致的。

四、病人恢复期抗体测定表明, 48 名 AHC 患者恢复期中抗体阳性率为 81.2%, 而同期非 AHC 对照组阳性仅 14.6%, 两组比较有极显著差异, 与印度报告的结果相似^[8], 证明系 CA24V 感染所致。至于对照组有 14.6% 抗体阳性者, 可能系隐性感染或非眼部感染所致, 因为 CA24V 引起的 AHC 患者中有 49% 亦可从其咽喉分离到病毒^[8], 我们在流行病学调查中亦曾观察到有部份 AHC 患者有感冒样症状。

五、乳鼠感染试验中, 观察到一株病毒对乳鼠有致病性, 而另一株传 4 代仍无致病性, 提示有二类毒株在人群间传播。1979 年印度 AHC 流行时分离到 260 株 CA24V, 用 10 株接种乳鼠, 传 3~4 代均见发病 (松弛性麻痹)^[8]。此次分离到对乳鼠致病与不致病病毒株可能是 CA24V 长期在人群中传播后, 其生物学特性发生了某些改变, 这在致病性与流行病学上都是有意义的。我们这次调查约 20% 有感冒样疾病, 是否与 CA24V 的生物学特性近年发生了某些改变有关, 还有待进一步研究证实。

参 考 文 献

- (1) Melnick JL, 1985 *Virology*, 1st ed (edited by Fields BN) 756, Raven press NY.
- (2) 中国医学科学院流行病学防治研究所, 1978, 常见病毒病实验技术, 197, 288, 科学出版社。
- (3) Melnick JL et al, 1969, *Diagnostic procedures for Viral and Rickettsial Infection*, 4th ed (edited by Jennette EH), 124~129, 538~547, Am Pub Heal Ass Inc, NY.
- (4) 卫生部防治慢性气管炎办公室, 1973, 慢性气管炎实验方法汇编, 182~185, 人民卫生出版社。
- (5) 张齐良、吴家驹等, 临床与实验病毒学杂志 待发表。
- (6) Yin-Murphy M, 1984, *Prog Med Virol*, Vol 29, 23~44, Karger, Basel.
- (7) 吴家驹, 1989, 肠道病毒引起的急性出血性结膜炎(综述), 湖北省第二次医学病毒学术会议大会报告。
- (8) Christopher S et al, 1982, *J. Infect. Dis*, 146(1): 16~19.
- (9) CDC, 1988, *MMWR*, 37(8): 128~129.
- (10) 中国医学科学院流研所编译, 1987 流行病学周报(41): 339~340.
- (11) Wadia NH et al, 1983, *J. Infect. Dis*, 147(4): 680~688.
- (12) Chu MY et al, 1988, *Am J. Epid*, 127(4): 795~800.
- (13) Yin-Murphy M et al, 1986, *Br. J. Ophthalmol*, 70(11): 869~872.
- (14) Aoki K et al, 1988, *Jpn. J. ophthalmol*, 32(1): 1~5.
- (15) Mu Guifan, 1988, *Virus Information Exchange New S letter*, 5(4): 133

Isolation and Identification of Coxsackievirus A24 Variant from Outbreak of Acute Hemorrhagic Conjunctivitis, China

Wu Jia-ju Zhang Qi-liang Hu Bi-yong Chen Mao-yi
(Shashi Health and Anti-epidemic Centre, Shashi 434000)

Hu Xi-min Tan Shun-hua Song Ping
(Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Science, Quenmin)

An outbreak of acute hemorrhagic conjunctivitis occurred in Shashi, Hubei province, China, during July—November 1988. Estimating cases were in 17 thousand (7%) of 250 thousand population in the urban district.

Virus was isolated in cultures of Hela cells from 28 of the 38 conjunctival swabs (74%). According to physico—chemical experiments and electron micrograph suggest that the viral isolates are enterovirus. All of the viral isolates were identified as an antigenic variant of coxsackievirus A24 by using of NT, one of two strains induces illness in suckling mice on the second passage, the other strain no pathogenicity was observed by fourth passage.

Among the 48 AHC patients from whom convalescent—phase sera were collected, only 39 (81.4%) demonstrated an antibody response detectable at a serum dilution of $\geq 1:4$, whereas non—AHC persons, only 7 of 48 sera had elevated antibody level ($P < 0.01$). Therefore it is an outbreak of acute hemorrhagic conjunctivitis due to coxsackievirus A24 variant in the area.

Key words: Coxsackievirus A24 variant (CA24v) Acute hemorrhagic conjunctivitis (AHC) Enterovirus