

江苏省不明原因轻型呼吸道传染病暴发的病因学研究

许文波¹, 崔爱利¹, 史智扬², 汪华², 张勇¹, 唐震², 刘和平², 李显², 朱贞¹, 唐浏英¹

(1. 中国疾病预防控制中心 病毒病预防控制所, 北京 100052; 2. 江苏省疾病预防控制中心, 南京 210009)

摘要: 自2004年4月18日起至6月末, 江苏省东台市发生以发热、咽部充血、扁桃体肿大为临床表现的原因不明的疫情暴发, 发病人群以中小學生、幼儿为主, 地域以许河镇、新街镇以及临近乡镇为主。疫情涉及东台市9个镇, 合计报告709例, 分布在75所学校, 240个班级。暴发的特点为传染性强, 短期内出现大量的患者, 发病有班级聚集性特点, 未发现成人感染。临床表现以发烧(100%)、咽部充血(91.40%)、扁桃体肿大(60.22%)、咽痛(50.00%)为主; X线检查可发现肺纹理增强(90.3%)。用Hep-2细胞从患儿20份咽拭子标本中分离到12株病毒, 经PCR扩增腺病毒L3部分基因及其PCR产物的序列测定和分析, 证实这12株病毒为腺病毒3型; 对28份咽拭子标本直接进行DNA提取和PCR扩增, 有17份标本PCR扩增L3部分基因呈阳性, 经序列测定和分析, 也为腺病毒3型。这29个阳性标本L3基因的1446个核苷酸的序列与GenBank上所发表的腺病毒3型序列同源性高达99.5%。双份血IgG检测: 对江苏省采集10份患儿急性期和恢复期双份血清, 以从患儿咽拭子分离到的腺病毒3型作为抗原, 进行病毒抗体测定, 6份患儿的双份血清腺病毒总IgG滴度呈4倍以上增高。患儿急性期血IgA检测: 对暴发疫情34例患儿急性期血清(发病时间为1~3天)进行腺病毒IgA抗体测定, 结果有9份标本为阳性, 1份标本为可疑阳性, 阳性率为26.47%。IgA阳性率低可能与血清采集时间过早有关, 机体还未全部产生IgA。另外, 还对江苏省送检的从患儿血培养基培养的细菌毒株进行了鉴定, 对其16S rRNA基因进行了基因扩增及序列分析, 序列测定和分析提示为A组M3型化脓性链球菌。实验研究结果并结合此次疫情的流行病学和患儿的临床表现, 证实腺病毒3型是引起此次儿童不明原因轻型呼吸道传染病暴发的病原体, 部分病例伴有原发或继发化脓性链球菌感染。

关键词: 暴发; 腺病毒3型; L3基因

中图分类号: R373.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-8721(2005)05-0325-07

自2004年4月18日起, 江苏省东台市部分中、小学校的学生发生以发热、咽喉肿痛、咽部充血、扁桃体肿大为临床表现的原因不明的疫情暴发, 持续2个多月。经过对在校学生的流行病学调查结合住院治疗学生的临床检查和讨论, 初步认定这是一起以轻型上呼吸道感染症状为主的传染病暴发疫情。本研究证实此次暴发疫情的病原体为腺病毒3型, 部分病例继发化脓性链球菌感染。腺病毒在自然界分布广泛, 迄今为止, 已经发现有100多个血清型。目前发现针对人类致病的腺病毒有49个血清型。作为人类呼吸道和消化道疾病的病原体, 腺病毒能够引起急性咽炎、婴幼儿致死性肺炎、流行性结膜炎、膀胱炎、肠炎等多种病症, 以及扁桃体、腺体组织和淋巴组织的隐性或持续性感染。在49个血清型的腺病毒中仅有大约1/3能够引起人类疾病, 大多数型别的毒株感染不出现临床症状。以腺病毒纤

维蛋白对各种血红细胞的凝聚能力作为判定标准, 可将这49个血清型分为A~F6个亚属, 其中可引起上呼吸道感染的腺病毒主要集中在B亚属, 包括腺病毒3、7、11、14、21型等^[1]。

材料与方 法

1 疫情调查 在当地疾控中心、卫生院、医院的配合下, 通过对发生的病例及其接触者进行现场追踪调查, 调查疫情流行情况, 包括患者的临床特点及此次疫情的流行特点、时间分布、地点分布、人群分布、传播特征以及已经采取的控制措施等情况。

2 病毒鉴定

2.1 病毒分离 收集20份患儿咽拭子, 常规处理后, 接种于传代人喉癌上皮细胞系(Hep-2细胞)培养。步骤: (1) 选出形态良好、刚长成片的单层细胞, 倒掉培养液, 留少许液体, 准备接种咽拭子标本, 同时设置细胞对照; (2) 加入咽拭子标本悬液0.2ml左右, 使液体浸没细胞层与细胞充分接触, 37℃吸附1h; (3) 倒去标本液, 加入含小牛血清2%的细胞维持液6ml, 37℃培养; (4) 每日观察细胞, 如有细胞病变(CPE), 待CPE达70%以上时收获, 再冻化3次, -70℃保存或立即进行基因检测。如第7~10日仍无CPE, 则将瓶中

收稿日期: 2005-04-08; 修回日期: 2005-05-09

基金项目: 卫生部疾病预防控制专项(2004年)

作者简介: 许文波(1963-), 男, 吉林舒兰市人, 研究员, 主要从事常见病毒病的诊断和病毒分子流行病学研究(wenchun@public.bta.net.cn)

内容物冻化 3 次,再次接种长满 70%左右的新细胞,盲传连续 3 次,不出现 CPE 为阴性标本。

2.2 病毒 DNA 提取 采用 QIAGEN 公司的 DNA 提取试剂盒提取病毒 DNA。取 200 μ l 病毒悬液或患儿咽拭子,加入 20 μ l 蛋白酶溶液,加 600 μ l AL 缓冲液,混匀 15s,56 $^{\circ}$ C 水浴 10min,瞬时离心。加 600 μ l 无水乙醇,震荡混匀后瞬时离心,将上述液体约 700 μ l 过柱,8 000 r/min 离心 1min,弃废液;用同样的方法将剩余的液体过柱。加 500 μ l A W1 缓冲液,8 000 r/min 离心 1min,弃废液;再加 500 μ l A W2 缓冲液,14 000 r/min 离心 3min,弃废液。将柱子放入洁净的离心管中,加 50 μ l AE 缓冲液在柱子中的滤膜上,室温放置 10min,8 000 r/min 离心 1min。离心后收集的液体即为病毒 DNA 溶液,可以进行后续的工作。

2.3 PCR 检测腺病毒亚属和型别鉴定 采用腺病毒通用引物对标本 DNA 进行 PCR 扩增。引物为: VA3 和 VA6。所用引物序列如下:

VA3: 5'-TCTCGGTVA GRCG YGCGCARTC-3';

VA6: 5'-TCTCGCAGCACNGG ATGCATCT-3'。

PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min,接着是一个热循环过程,94 $^{\circ}$ C 变性 1min,54 $^{\circ}$ C 退火 45s,72 $^{\circ}$ C 延伸 2min,30 个循环后,72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。扩增片段位于基因组 L3 基因内,大小约 500bp,PCR 完成后,用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析结果,将 PCR 产物纯化后直接进行序列标记反应,进行测定和分析。

针对腺病毒 B 亚属设计了 3 对特异性引物,并利用这 3 对引物对标本 DNA 进行 PCR 扩增。引物为: adv-hexon-1 与 adv-hexon-2,AD52 与 ADS-D,ADS-U 与 AD32。所用引物序列及在基因组中相应位置见表 1、图 1。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min,接着是一个热循环过程,94 $^{\circ}$ C 变性 1min,50 $^{\circ}$ C 退火 45s,72 $^{\circ}$ C 延伸 90s,35 个循环后,72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。扩增片段位于基因组 L3 基因内,片段大小分别约 600bp、970bp、820bp,PCR 完成后,用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析结果,将 PCR 产物纯化后直接进行序列标记反应,测定和分析。

表 1 PCR 扩增部分 Hexon 基因所用的引物序列及其位置

Table 1 Sequences and positions of PCR primers for amplifying partial Hexon gene of adenovirus

Primer	Sequence	Amplicon length (bp)	Position in Hexon gene (AF542126)
adv-hexon-1	5'-ATGCCACCCCATCGATGATGC-3'	600	1-22 nt
adv-hexon-2	5'-CCATGATTCTTCTCCAACTTGAG-3'		578-600 nt
AD52	5'-GGACAGGATGCTTCGGAGTA-3'	970	49-68 nt
ADS-D	5'-TTCCAGTACTGTGTAGTAC-3'		990-1009 nt
ADS-U	5'-TAACTCTCATGCAAATTTGG-3'	820	906-925 nt
AD32	5'-GCGGTGTTGTGAGCCATGGG-3'		1837-1856 nt

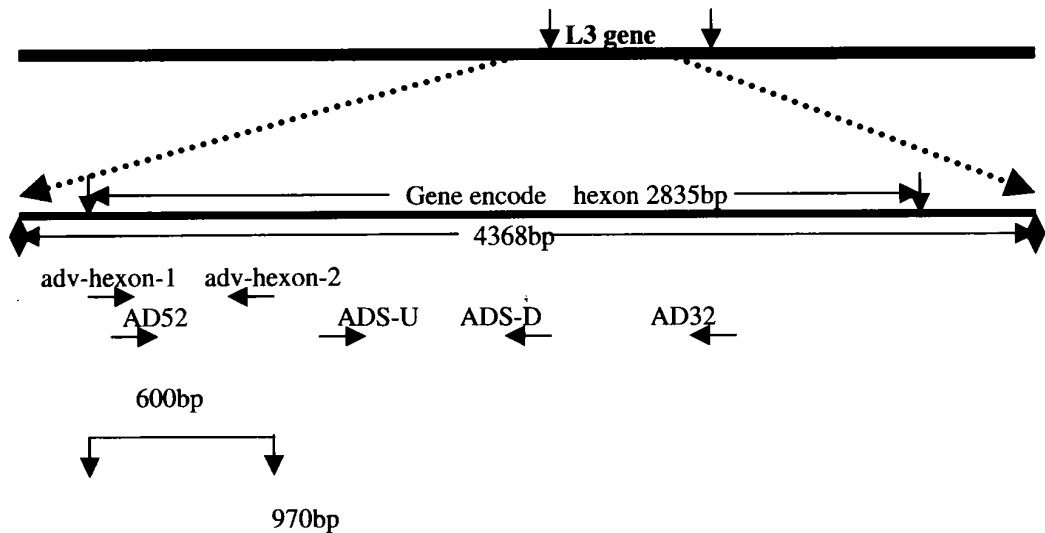


图 1 PCR 扩增部分 Hexon 基因所用的引物位置

Figure 1 The positions of PCR primers for amplifying partial Hexon gene of adenovirus

2.4 DNA 序列测定和分析 扩增后的 PCR 产物用 QIAGEN 纯化试剂盒 (QIAquick Gel Extraction Kit) 纯化。然后分别使用 adv-hexon-1 与 adv-hexon-2, AD52 与 ADS-D, ADS-U 与 AD32 引物,用 Big DyeTM Terminator V3.0 Cycle Sequencing Ready reaction kit 试剂盒,采用 Sanger 末端双脱

氧终止法进行双向标记反应。标记反应条件如下: 96 $^{\circ}$ C 10s,50 $^{\circ}$ C 5s,60 $^{\circ}$ C 2min,25 个循环,最后 70 $^{\circ}$ C 10min 延伸。标记反应后产物经葡聚糖凝胶 G-50 纯化后,去除多余非特异性荧光。纯化后的产物在 Perkin Elmer 公司 ABI3100 测序仪上,自动完成序列测定和校对分析。序列结果用

Sequencher, BioEdit, MEGA 软件进行整理和分析。

2.5 血清学检测 采集 10 份患儿急性期和恢复期双份血清, 分别从患儿咽拭子分离到的腺病毒 3 型作为病毒抗原, 以正常的 Hep-2 细胞作为细胞对照, 包被 ELISA 板, 血清从 1:100 开始, 做 4 倍稀释, 进行腺病毒 IgG 抗体水平测定。采用赛润公司腺病毒 IgA 检测试剂盒, 对 34 份患儿急性期血清(发病时间为 1~3 天)进行腺病毒 IgA 抗体测定, 步骤参见赛润公司的腺病毒 IgA 检测试剂盒说明书。

结 果

1 疫情调查情况

此次疫情主要发生在学校。自 2004 年 4 月 18 日起, 江苏省东台市陆续发现症状以发热、咽部充血、扁桃体肿大为主, 人群以中小学生、幼儿为主, 地域以许河镇、新街镇以及临近乡镇为主的不明原因性暴发疫情。许河镇最早的病例出现在 2004 年 4 月中旬, 至 5 月 16 日前, 不断有病例发生, 17 日开始迅速上升, 19~20 日达到高峰, 并持续在较高水平, 下降比较缓慢, 自 5 月 29 日起发病人数开始下降。从 5 月下旬起, 与许河镇相邻的新街镇陆续发现多起病例, 于 5 月 31 日达到高峰, 从 6 月初开始下降。截至 6 月 15 日, 在东台市 9 个镇合计报告 709 例, 分布在 75 所学校, 240 个班级, 病例数达 3 例或以上的班级 52 个, 病例最多的班级达到 24 例。患者主要是 18 岁以下的在校学生及儿童, 年龄最小 7 个月, 10~14 岁年龄组占总发病数的 43.9%, 发病率在性别上无显著性差异。该病典型的临床表现为发烧(100%)、咽部充血(91.40%)、扁桃体肿大(60.22%)、咽痛(50.00%)。X 线检查发现肺纹理增强(90.3%); 血液白细胞计数在 $3\ 700 \sim 25\ 900/\text{mm}^3$, 中性粒细胞百分比在 35%~90% 之间。多无明显的病毒血症症状, 未见重要脏器功能损害征象。病程最短 2 天, 最长 10 天, 平均(5.10±1.99)天。对症治疗和支持治疗措施有效, 预后良好, 无死亡病例发生。

这次急性轻型呼吸道传染病的特点是传染性强, 短期内出现大量的患者, 发病有班级聚集性特点, 未发现成人感染, 无死亡病例。通过对许河镇、新街镇部分发病小学、中学及幼儿园的调查, 发现该病可以在同学间、班级间、家庭间传播, 因此推测该病的传播主要以密切接触和飞沫传播为主。

2 病原学检测结果

2.1 病毒分离 将江苏省采集的 20 份咽拭子标本在 Hep-2 细胞上进行病毒分离, 其中有 12 份标本出

现细胞病变, 细胞一般在培养 3~4 天出现病变, 病变特征为细胞肿胀变圆, 折光度增强。

2.2 PCR 检测腺病毒亚属和型别鉴定 针对腺病毒设计的一对通用引物位于 L3 基因内, 长 500bp, 对在江苏省采集的 28 份咽拭子标本和分离的 12 份病毒分离物进行 DNA 提取和 PCR 扩增, 结果 28 份咽拭子标本中有 17 份为 PCR 阳性, 12 份病毒分离物皆为 PCR 阳性, 将 PCR 产物进行了序列测定和分析, 将得到的 29 份标本的序列进行比较, 发现核苷酸序列完全一致, 同源性的 100%。并与 GenBank 上所发表的序列相比较, 结果与腺病毒 7 型和 3 型最为接近, 同源性皆为 95%。因此鉴定这些病毒为腺病毒 B 亚属, 初步判断为腺病毒 3 型或 7 型。为鉴定腺病毒的血清型别, 明确病原体是腺病毒 3 型还是 7 型, 故设计了 3 对针对腺病毒 7 型和 3 型位于 L3 基因的引物, 片段长度分别为 600bp、820bp、970bp。腺病毒亚属鉴定时, PCR 为阳性的 17 份咽拭子标本和 12 份病毒分离物进行 DNA 提取, PCR 扩增, 序列测定, 对 3 个片段进行整合分析, 得到大小为 1 446 个核苷酸的部分 L3 基因片段。将得到的 29 份标本的序列进行比较, 发现核苷酸序列完全一致, 同源性 100%。本文将所得到的江苏省流行的代表株 L3 基因片段(1 446 个核苷酸)与 2004 年江西省流行的腺病毒 3 型代表株的序列(未发表), 以及从 GenBank 检索到腺病毒 3 型序列进行核苷酸和氨基酸序列同源性分析, 结果见表 2。江苏省流行的毒株代表株(Jiangsu04-1)的部分 L3 基因的核苷酸序列已输入美国国立医学图书馆(NCBI)的基因库(GenBank), GenBank 号为 DQ177310。

通过比较发现, 江苏省流行的毒株代表株(Jiangsu04-1)与江西省流行的毒株代表株(Jiangxi04-1)最为接近, 核苷酸序列同源性达 99.9%, 只有 1 个核苷酸不同; 氨基酸序列同源性达 99.7%。使用美国国立医学图书馆的 BLAST 服务器将其与 GenBank 上所发表的序列进行同源性分析发现, Jiangsu04-1 与腺病毒 3 型同源性最大, 并与韩国学者在 GenBank 上所发表的一条基因序列(GenBank 号为 AF542126)较为接近, 核苷酸同源性为 99.7%, 只有 5 个核苷酸不同, 氨基酸序列同源性达 99.5%, 因此将病毒定型为腺病毒 3 型。

另外, 本文还通过 Sequencher、BioEdit、MEGA 等软件, 构建了腺病毒亚属之间和腺病毒 3 型的部分 L3 基因亲缘性系统发生树种系发生树, 结果分别见图 2 和图 3。

表 2 江苏省、江西省流行的代表株与 GenBank 中腺病毒 3 型的部分 L3 基因和氨基酸序列同源性分析

Table 2 Homology analysis of partial L3 gene and amino acids of prevalent adenovirus representative strains in Jiangsu, Jiangxi and Adenovirus type 3 strains from GenBank

	Jiangsu 04-1	Jiangxi-04-1	AF542126	AF542104	AF542105	AF542107	F542113	AF542123	AF542125	X76549
Jiangsu 04-1		0.997	0.995	0.985	0.981	0.983	0.966	0.987	0.987	0.975
Jiangxi04-1	0.999		0.997	0.987	0.983	0.985	0.968	0.989	0.989	0.977
AF542126	0.997	0.997		0.989	0.981	0.987	0.970	0.991	0.991	0.975
AF542104	0.994	0.995	0.995		0.987	0.993	0.981	0.989	0.985	0.973
AF542105	0.991	0.992	0.990	0.993		0.989	0.977	0.977	0.977	0.973
AF542107	0.992	0.993	0.993	0.996	0.995		0.979	0.983	0.983	0.975
AF542113	0.986	0.986	0.988	0.991	0.988	0.992		0.970	0.966	0.966
AF542123	0.994	0.995	0.997	0.995	0.988	0.992	0.988		0.983	0.966
AF542125	0.994	0.995	0.997	0.994	0.988	0.992	0.986	0.994		0.975
X76549	0.985	0.986	0.984	0.984	0.985	0.986	0.979	0.981	0.984	

Note: Percentages on the left lower part are nucleotide identities, on the right upper part are amino acid identities.

AF542126-strain KNIH Ad00/17; AF542104-strain KNIH Ad98/1; AF542105-strain KNIH Ad99/1;

AF542107-strain KNIH Ad99/3; AF542113-strain KNIH Ad99/9; AF542123-strain KNIH Ad00/10;

AF542125-strain KNIH Ad00/16; X76549-strain-GB All these eight strains are adenovirus type 3.

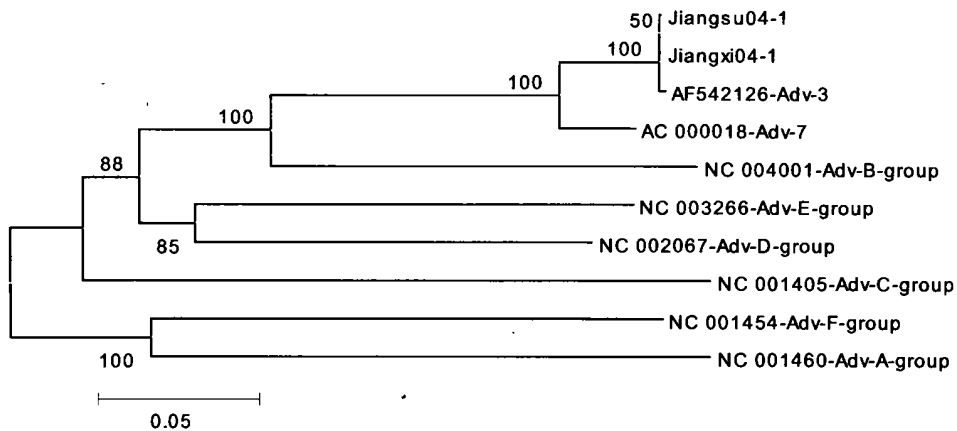


图 2 腺病毒亚属之间的部分 L3 基因亲缘性系统发生树

Figure 2 Phylogenetic tree of partial L3 gene of human adenovirus subgenus

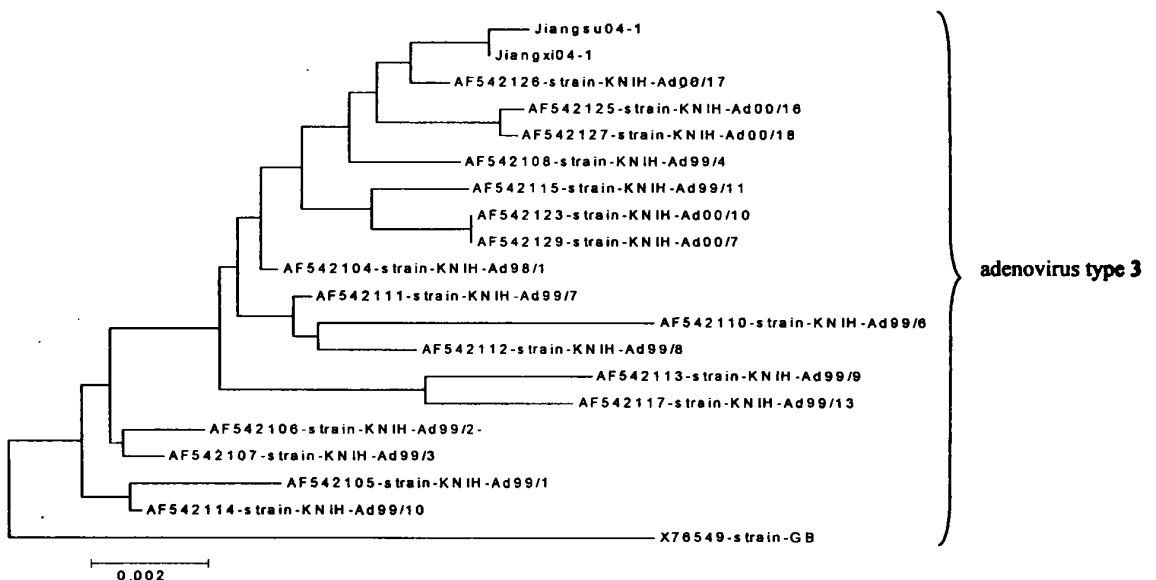


图 3 腺病毒 3 型部分 L3 基因亲缘性系统发生树

Figure 3 Phylogenetic tree of partial L3 gene of human adenovirus type 3

由图 2 可以发现, 将江苏省流行的毒株代表株 Jiangsu04-1 与腺病毒 A ~ F6 个亚属的毒株进行遗传学分析, 在种系发生树上, Jiangsu04-1 与江西省流行的毒株代表株 (Jiangxi04-1) 最为接近, 属于腺病毒, 位于腺病毒 B 亚属中, 与其它亚属的遗传距离较远。在腺病毒 B 亚属中, 与腺病毒 3 型最为接近, 因此可以认为 Jiangsu04-1 和 Jiangxi04-1 皆为腺病毒 3 型。

由图 3 可以看出, Jiangsu04-1 与 Jiangxi04-1 最接近, 只有 1 个核苷酸不同。将来自 GenBank 中的腺病毒 3 型部分 L3 核苷酸序列与 Jiangsu04-1 序列进行比较分析发现, Jiangsu04-1 与韩国学者在 GenBank 上所发表的一条基因序列 (GenBank 号为 AF542126) 较为接近, 该结果与使用 BLAST 服务器进行同源性分析的结果一致。由于 GenBank 中腺病毒 3 型 Hexon 蛋白的基因序列较少, 因此无法通过种系发生树对比来判定中国的这两株腺病毒的基因型别。

2.3 血清学检测 对江苏省采集的 10 份患儿急性期和恢复期双份血清, 以从患儿咽拭子分离到的腺病毒 3 型作为抗原进行病毒抗体 IgG 测定。结果有 6 份患儿的双份血清腺病毒总 IgG 滴度呈 4 倍以上增高。对江苏省采集的 34 份患儿急性期血清 (发病时间为 1 ~ 3 天) 进行病毒抗体 IgA 测定, 结果有 9 份标本为 IgA 阳性, 1 份标本为 IgA 可疑阳性, 阳性率为 26.47%。

讨 论

国外文献表明, 腺病毒的某些类型会引起大规模暴发流行。腺病毒感染多在冬春季发生, 主要经呼吸道传播。主要临床表现包括急性咽痛、发热, 体温常可达 39℃, 常有咳嗽, 可有区域性淋巴结肿大。体检可见咽部充血、扁桃体肿大, 多无分泌物, 发生肺炎时有相应的体征^[1]。

通过流行病学调查分析与实验室检测结果证实, 江苏省这次暴发疫情是以腺病毒 3 型为主引起的上呼吸道感染。其依据是: (1) 患儿的临床表现符合咽炎特征: 此次腺病毒 3 型引起的上呼吸道感染暴发主要波及中小学生、幼儿, 临床表现为发烧 (100%)、咽部充血 (91.40%)、扁桃体肿大 (60.22%)、咽痛 (50.00%); X 线检查可发现肺纹理增强 (90.3%); 与文献报道一致^[2]。(2) 病毒分离和鉴定, 对江苏省采集的 20 份咽拭子标本在 Hep-2

细胞上进行病毒分离, 其中有 12 份标本出现细胞病变, 一般在 3 ~ 4 天出现, 病变特征为细胞肿胀变圆, 折光度增强; (3) PCR 检测: 对在江苏省采集的咽拭子标本和病毒分离物进行 DNA 提取和 PCR 扩增、序列测定和分析, 与 GenBank 上所发表的序列相比较, 与腺病毒 3 型最为接近, 同源性为 99%, 故将病毒定型为腺病毒 3 型。(4) 血清学分析: 对江苏省采集的 10 份患儿急性期和恢复期双份血清, 以从患儿咽拭子分离到的腺病毒 3 型作为抗原, 进行病毒抗体测定。6 份患儿的双份血清腺病毒总 IgG 滴度呈 4 倍以上增高; 对江苏省采集 34 份患儿急性期血清 (发病时间为 1 ~ 3 天) 进行病毒抗体 IgA 测定, 结果有 9 份标本为 IgA 阳性, 1 份标本为 IgA 可疑阳性, 阳性率为 26.47%。IgA 阳性率低可能与血清采集时间过早有关, 机体还未产生 IgA。由于患儿的临床表现符合咽炎特征, 而且经病毒分离和鉴定、血清学分析、PCR 检测, 均可以证实病原体为腺病毒 3 型。另外, 对江苏省送检的从一个患儿血培养基培养的细菌标本进行了鉴定, 对其 16S rRNA 基因进行了基因扩增及序列分析, 显示为 A 组 M3 型化脓性链球菌。因此, 对上述实验结果初步分析并结合此次暴发流行的流行病学特点和患儿的临床症状, 提示此次儿童不明原因呼吸道传染病暴发, 主要由腺病毒 3 型引起, 部分病例继发包括化脓性链球菌在内的细菌感染。

腺病毒感染无特效的治疗和预防药物, 一般性措施难以奏效。加强监测以便早期发现和隔离传染源, 是防止暴发和流行的有效措施^[3]。

在 2004 年, 全国多个省发生了由腺病毒引起的轻型上呼吸道感染疫情, 包括江苏省和江西省等 (待发表)。从江苏省和江西省患病儿童分离到的腺病毒其核苷酸序列同源性达 99.9%, 提示这两个省的流行可能是来源于同一个病毒的传播链。

此次疫情病原学鉴定中, 采用了 ELISA、病毒分离鉴定、PCR 结合序列测定和分析。ELISA 具有快速、灵敏、简便、成本低等优点, 适用于大量标本的检测, 可用于临床辅助诊断和流行病学调查, 但不适于早期诊断。PCR 技术具有更高的灵敏度, 操作方便, 并且可检测储存较长时间的标本及多种标本 (如血液、血清、粪便、呼吸道分泌物、组织切片等), 适于早期诊断。PCR 结合序列测定和分析可以快速鉴定病毒的血清型别、基因型和鉴定病毒基因变异。

目前根据文献报道, 腺病毒 3 型的基因型很多, 其中原型株为 Ad3p 基因型, 根据 Bam HI 酶切图谱

的差异已将毒株分为 Ad3a 至 Ad3x 基因型^[10]。其中,再根据限制性内切酶酶切图谱分析,Ad3a 基因型的变异株被分为 Ad3a1 至 Ad3a18 基因型^[4,9,11-13]。另外,在腺病毒 3 型病毒流行过程中,基因型的异质性比较常见,例如在 1983 年中国北京腺病毒 3 型流行暴发中,在一个月内有 3 个基因型(Ad3a2、Ad3a4、Ad3a5)被分离到^[4]。在同一血清型中大多数的基因型是密切相关的,这暗示着这些变异有可能是在流行基因型基因漂移的结果。^[13]

但根据以往的文献来看,目前腺病毒 3 型主要是通过 REA 方法进行分子流行病学研究,很少用核苷酸序列来进行基因型分析。根据文献表明,腺病毒的 Hexon 蛋白携带有主要的属和亚属特异性抗原决定簇以及次要的种特异性抗原决定簇,具有 7 个高变异区,其中 3 个区域(A1、A3、B1)与血清型特异性密切相关。因此,通过对这些高变异区域进行测序来鉴定腺病毒的血清型别是可行的。通过 REA 和测序方法来鉴定血清型别是有效的,并且结果完全一致^[14]。通过用 Hexon 蛋白的核苷酸序列分析,进一步分析了腺病毒 3 型基因型特征,并与 REA 方法分析的基因型进行比较。

本研究对建立我国流行的腺病毒毒株库和基因库,对实验室早期诊断、控制和预防腺病毒在中国儿童中的暴发有重要科学意义。将对国际上腺病毒基因型和亚型的标准命名和分子流行病学研究提供帮助。

参考文献:

- [1] 金奇主编. 医学分子病毒学[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 691—708.
- [2] Papapetropoulou M, Vantarakis A C. Detection of adenovirus outbreak at a municipal swimming pool by nested-PCR amplification [J]. J Infect, 1998, 36: 101—103.
- [3] Gottsch J D. Surveillance and control of epidemic keratoconjunctivitis [J]. Tran Am Ophthalmol Soc, 1996, 94: 539—587.
- [4] Li Q G, Wadell G. Comparison of 17 genome types of adenovirus type 3 identified among strains recovered from six continents [J]. J Clin Microbiol, 1988, 26: 1009—1015.
- [5] Guo D F, Shibata R, Shinagawa M, et al. Genomic comparison of adenovirus type 3 isolates from patients with acute conjunctivitis in Japan, Australia and the Philippines [J]. Microbiol Immunol, 1988, 32: 833—842.
- [6] Shiao S, Aoki K, Isobe K, et al. Genome analysis of adenovirus type 3 isolated in Japan [J]. J Clin Microbiol, 1996, 34(2): 413—416.
- [7] Itakura S, Aoki K, Sawada H, et al. Analysis with restriction endonucleases recognizing 4- or 5-base-pair sequences of human adenovirus type 3 isolated from ocular diseases in Sapporo, Japan [J]. J Clin Microbiol, 1990, 28: 2365—2369.
- [8] Adrian T, Best B, Hierholzer J C, et al. Molecular epidemiology and restriction site mapping of adenovirus type 3 genome types [J]. J Clin Microbiol, 1989, 27(6): 1329—1334.
- [9] Li Q G, Zheng Q J, Liu Y H, et al. Molecular epidemiology of adenovirus types 3 and 7 isolated from children with pneumonia in Beijing [J]. J Med Virol, 1996, 49: 170—177.
- [10] Kajon A E, Mistchenko A S, Videla C, et al. Molecular epidemiology of adenovirus acute lower respiratory infections of children in the south cone of South America (1991—1994) [J]. J Med Virol, 1996, 48: 151—156.
- [11] Golovina G I, Zolotaryov F N, Yurlova T I. Sensitive analysis of genetic heterogeneity of adenovirus types 3 and 7 in the Soviet Union [J]. J Clin Microbiol, 1991, 29: 2313—2321.
- [12] Tveten Y, Ahlquist J, Krovgold L, et al. Restriction endonuclease analysis of adenovirus type 3 isolated in Norway from 1970 to 1991 [J]. APMIS, 1994, 102: 215—218.
- [13] Kim Y J, Hong J Y, Lee H J, et al. Genome type analysis of adenovirus types 3 and 7 isolated during successive outbreaks of lower respiratory tract infections in children [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(10): 4594—4599.
- [14] Li Q G, Henningsson A, Juto P, et al. Use of restriction fragment analysis and sequencing of a serotype specific region to type adenovirus isolates [J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(3): 844—847.

Etiological Research of the Unknown Mild Respiratory Tract Infectious Disease in an Outbreak in Jiangsu Province

XU Wen-bo¹, CUI Ai-li¹, SHI Zhi-yang², WANG Hua², ZHANG Yong¹,
TANG Zhen², LIU He-ping², LI Xian², ZHU Zhen¹, TANG Liu-ying¹

(1. National Institute for Viral Disease Control and Prevention, China CDC, Beijing 100052, China;

2. Jiangsu Center for Disease Control and Prevention, Nanjing 210009, China)

Abstract: An outbreak of the unknown mild respiratory tract infectious disease occurred in the children of Dongtai city of Jiangsu Province from April 18 to the late June in 2004. The clinical syndromes of the patients were fever, pharyngeal hyperemia and antiadoncus, etc. The patients were pupils, middle school students and the infants. Most of the patients distributed in Xuhe, Xinjie and the adjoining townships. 709 patients in 9 townships were reported in this outbreak, who distributed in 240 classes of 75 schools. This outbreak was characterized by high infectivity, massive patients appearing within a relatively short period, and class clustering. No adult infection was found. Clinical manifestations of the patients mainly included fever (100%), pharyngeal hyperemia (91.40%), antiadoncus (60.22%) and pharyngalgia (50.00%); X-ray examination showed intensification of pulmonary grains (90.3%). 12 viral isolates from 20 throat swab specimens using Hep-2 cells were identified as adenovirus type 3 by L3 gene PCR and sequencing analysis. DNA extraction and PCR were carried out directly from 28 throat swab specimens, and 17 positives were also identified as adenovirus type 3 by sequencing analysis. Comparing 1446 nucleotides of the amplified L3 gene of total of the 29 positive specimens using BLAST server, it showed 99.9% homology with available adenovirus type 3 strains in the GenBank so far, indicating that adenovirus type 3 strains are highly conservative. 10 paired sera of the patients were tested for IgG antibody, using adenovirus type 3 isolate from swab samples as antigen, a four-fold rise in the antibody titer of the adenovirus type 3 appeared in 6 paired sera. 34 acute phase sera (collected within 1–3 days after disease onset) were tested for IgA antibody. 9 samples showed positive, 1 was suspected positive, the positive rate was 26.47%. The relatively low positive rate of IgA may be due to the early collection of sera when IgA antibody had not been totally produced yet. In addition, one bacteria strain cultured from the blood of a patient was identified belonging to A group type M3 pyogenic streptococcus using 16S rRNA gene amplification and sequencing analysis. In this paper, by comprehensive analysis of epidemiology, clinical symptoms and laboratory data, it indicated that adenovirus type 3 was the main etiologic agent of this unknown mild respiratory tract infectious disease outbreak, some patients may have original or secondary acquired pyogenic streptococcus infection.

Key words: outbreak; adenovirus type 3; L3 gene

Corresponding author: XU Wen-bo, E-mail: wendun@public.bta.net.cn