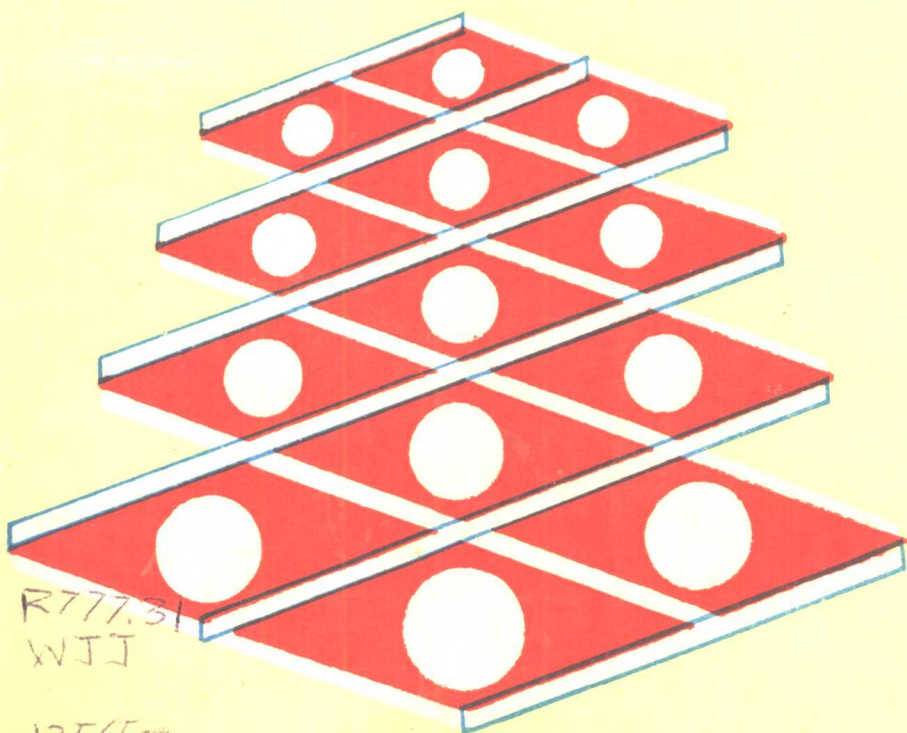


急性出血性结膜炎

红眼病

吴家驹 主编 李子华 编审

上海医科大学出版社



R777.31
WJJ

12565y

急性出血性结膜炎

(红眼病)

主编 吴家驹

编审 李子华

上海医科大学出版社

(沪)新登字207号

责任编辑 高 岑
封面设计 吴 平

急性出血性结膜炎

(红眼病)

主编 吴家驹

编审 李子华

上海医科大学出版社出版发行

上海市医学院路 138 号

邮政编码 200032

新华书店上海发行所经销

上海长鹰印刷厂印刷

开本: 787×1092 1/32 印张: 5.5 字数 126000

1993年5月第1版 1993年5月第1次印刷

印数: 1-4500

ISBN 7-5627-0150-4/R·141

定价: 6.20 元

前 言

急性出血性结膜炎(俗称红眼病),是近 20 年来全球广为流行的急性传染病。中国自 1971 年起,就不断发生过流行,特别是 1971 年和 1988 年的两次大流行,波及到全国许多城市。因而《中华人民共和国传染病防治法》已将它列为规定管理必须上报的传染病。

近年来对急性出血性结膜炎的研究,已取得很大进展,国外已有专著出版,国内亦有许多文献发表,作者收集已发表的资料,参考日本学者 Keizo Ishii 的专著《急性出血性结膜炎》并根据实际工作的体会,整理成册。旨在向广大医务工作者、教师和科研人员提供一本较为全面地介绍急性出血性结膜炎的病原学、流行病学、分子病毒学、诊断及预防的参考书。以便了解国内外对急性出血性结膜炎研究的最新成就,更好地开展预防工作。亦可供有关专业人员,作为一本工具书备阅。

由于作者水平有限,书中不足之处,尚希广大读者批评指正。

编 者

1992年 9 月

目 录

第一章 急性出血性结膜炎的病原学	1
一、肠道病毒 70 型	1
二、柯萨奇病毒 A24 变种	14
三、EV70 型与 CA24v 的抗原与基因关系	22
第二章 肠道病毒 70 型所致 AHC 的流行特点	26
一、EV70 在东半球的第一次流行(1969~1972 年)	26
二、EV70 在东半球的第二次流行(1980~1982 年)	32
三、EV70 在西半球的流行.....	35
四、由混合感染引起的 AHC 流行	37
五、非流行期 AHC 的局部流行	40
六、EV70 的流行病学特点.....	43
第三章 柯萨奇病毒 A24 变种所致 AHC 的流行特点	52
一、1970~1971 年的 CA24v 流行	52
二、1975~1979 年的 CA24v 流行	53
三、1985~1988 年的 CA24v 流行	54
四、CA24v 流行在人群中分布特点	58
第四章 肠道病毒 70 型与柯萨奇病毒 A24 变种的血清 流行病学	67
一、血清流行病学试验方法.....	67
二、EV70 的血清流行病学	68
三、动物血清中 EV70 中和物质的分布.....	78
四、CA24v 的血清流行病学.....	81

五、小结.....	89
第五章 急性出血性结膜炎的临床流行病学.....	90
一、EV70 感染.....	90
二、CA24v 感染	93
三、腺病毒感染.....	99
四、EV70 感染与 CA24v 感染的比较	100
第六章 肠道病毒 70 型与柯萨奇病毒 A24 变种的分子流行病学.....	103
一、EV70 的分子流行病学.....	103
二、CA24v 的分子流行病学	110
三、AHC 病原体的起源.....	112
第七章 急性出血性结膜炎的实验室诊断方法.....	116
一、EV70 的分离与鉴定.....	116
二、CA24v 的分离与鉴定.....	125
三、常规血清学诊断.....	129
四、免疫荧光快速诊断.....	131
五、其他肠道病毒的鉴定.....	133
六、腺病毒的分离与鉴定.....	136
七、肠道病毒免疫血清制备.....	137
第八章 单克隆抗体与血清学诊断评价.....	140
一、肠道病毒 70 型的单克隆抗体(McAb).....	140
二、柯萨奇 A24 变种单克隆抗体.....	146
三、血清学试验应用评价.....	148
第九章 急性出血性结膜炎的监测与预防.....	156
一、日本全国性监测网.....	156
二、地区性监测.....	163
三、AHC 的预防	169

第一章 急性出血性结膜炎的病原学

近年来从急性出血性结膜炎(AHC)患者中分离到多种病毒,但引起AHC流行的只有肠道病毒70型(EV70)、柯萨奇病毒A24变种(CA24v)和腺病毒(Ad)的某些型别,这里只对EV70与CA24v的研究进展作一介绍。

一、肠道病毒70型

1971年Kono从AHC患者中首次分离出一种病原,并命名为AHC病毒,后来经国际肠道病毒参考中心协作研究,鉴定为EV70。EV70具有许多肠道病毒共有的特征(表1-1),但也有些特征与其他肠道病毒不具备的。

1. 形态与理化性质

EV70毒粒呈球形,立方对称,直径为 $30\pm 1\text{ nm}$,具典型肠道病毒形态(图1-1、图1-2)。

表 1-1 EV70的基本特性

A. 形态特点

形状	圆形
直径	$30\pm 1\text{ nm}$

B. 物理化学特性

CsCl 中浮密度	1.34 g/cm^3
蔗糖中浮密度	1.25 g/cm^3
毒粒的沉淀系数	160S
RNA的沉淀系数	34S
RNA的分子量	2.5×10^6

续表

RNA 基因的碱基组成	G 1622(21.95%) C 1542(20.83%) A 2302(31.15%) U 1925(26.05%)
	合计 7391
毒粒结构蛋白	VP1(35K), VP2(28K) VP3(27K), VP4(9K)
空壳的性质	
沉淀系数	895
蛋白数	3(VP0, VP1, VP3)
感染性病毒的稳定性	
pH3.0~8.6中稳定	
1mol/L $MgCl_2$ 溶液加温 50℃ 1 小时稳定	
0.1mol/L 氯化物中(pH3.0) 1 小时稳定	
对化学药物的抵抗力	
抵抗去氧胆酸钠	
抵抗氯仿与乙醚	

C. 病毒在细胞培养中的复制

感染谱	灵长类与非灵长类
复制部位	胞浆
最适生长温度	33℃
5 碘 2 脱氧尿苷	抵抗
放线菌素 D	抵抗
盐酸胍	抵抗

D. 医学生物学特性

原发感染部位	人结膜
急性出血性结膜炎和神经系统并发症的病原	

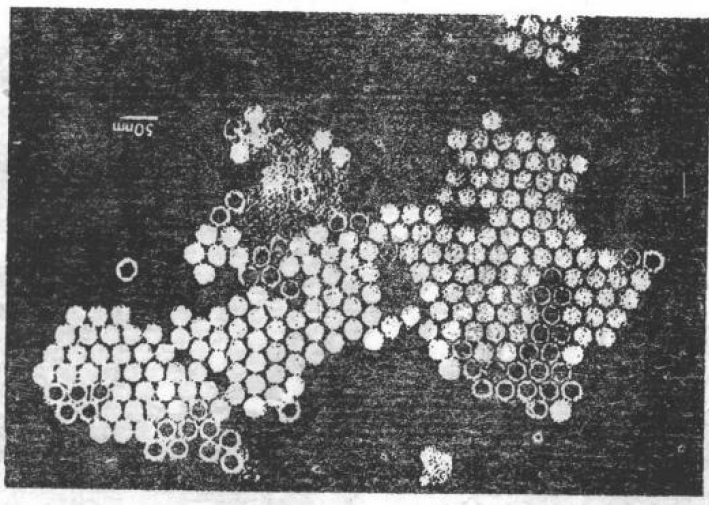


图 1-1 EV70 标准株 J670/71 的纯化毒粒
(Tsuruhara 原图, 1989)

表 1-1 列出了 EV70 的基本特征, 此病毒与其他肠道病毒一样是由单股的 RNA 基因组与 4 种结构蛋白组成, 近来 Yamazaki 等已测定出 EV70 全部 RNA 基因的完整碱基系列, 由 7 391 个核苷酸组成。

2. 生物学性质

(1) EV 70 生长的敏感温度

在细胞培养中, J670/71 株在 33℃ (最适温度) 比 37℃ (允许温度) 生长得好, 如果培养温度增加到 39℃ (非允许温度), 病毒的复制就停止。EV70 的这种温度敏感性在其他肠道病毒中都未发现。在这方面 EV70 更接近于鼻病毒 (小 RNA 病毒的另一个属)。

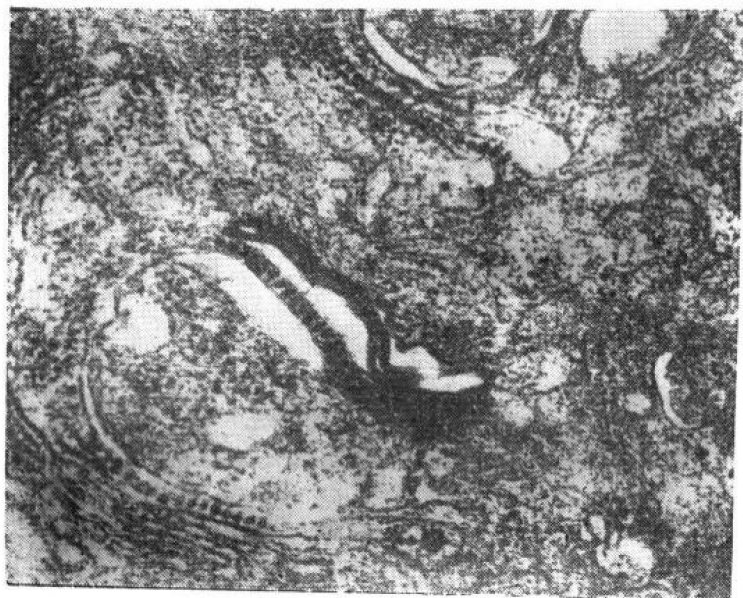


图 1-2 EV70 感染细胞(HEK)的胞浆内出现的串珠状排列的病毒颗粒,大小为 $25 \sim 26 \text{nm} \times 70000$ 倍(李子华原图)

有关 EV70 复制的温度敏感性研究表明:在培养系统中 RNA 的合成被非允许温度所抑制。有资料提示,温度敏感区域在病毒 RNA 转录的开始端,近来更为精确的分析证明,在病毒 RNA 转录起始时需要核苷酸蛋白 VPg-pU(pU)的形成。用 EV70 感染的 HeLa 细胞制备复制复合物作体外转录系统的研究,发现病毒在非允许温度会完全终止其转录,推测在该温度时,病毒不能进行尿苷化,而导致复制停止。

(2) 人受EV70感染的起始部位

大多数肠道病毒的初始感染部位是消化道，在消化道复制并通过病毒血症产生一系列症状。而EV70感染人的始发部位在结膜。还没有确切的证据表明此病毒能在消化道自行复制。EV70很难从咽拭与粪便中分离到，若偶尔能从AHC病人粪便中分离到此病毒，那么在眼拭标本中也能分离到。虽然没有完全排除EV70在肠道中复制的可能性，但更可能是在结膜上生长的EV70，分泌出来后通过咽喉而进入消化道，然后偶尔从粪便中发现。此假定也得到体外培养时EV70复制的最适温度的支持，肠道病毒生长的最适温度通常是37℃，而EV70是32~34℃，在39℃时就不再复制，提示此病毒在消化道中不易繁殖。结膜的温度较低，适宜病毒生长，因此可以认为EV70的最初感染部位在结膜。但对EV70引起AHC的确切机理还不清楚。

(3) EV70的广泛宿主范围与受体

大多数肠道病毒仅在原代或传代的人源和猴源组织中生长，人肠道病毒在非灵长类细胞培养中能生长的只有少数。据报告柯萨奇B5病毒能在猪细胞系中复制，其他型的柯萨奇B组病毒和Echo 4型病毒也能在非灵长类原代肾细胞培养中生长，EV70是其中之一。Yoshii等研究了EV70在非灵长类细胞中的复制，发现此病毒能被多种细胞吸附并在其中复制，这些细胞是：L（小鼠）、BHK21（田鼠）、RK13（兔）RK17（兔）、IB-RS-2（猪）、ESK（猪）和BK（牛）细胞（表1-2）。RK13、RK17和BK1细胞能允许病毒生长并产生细胞病变效应（CPE），但L、BHK2、IB-RS-2和ESK细胞仅允许病毒复制但不产生CPE。有趣的是，PK15（猪）和MDBK（牛）细胞尽管对EV70有很高的吸附率，却不能使病

表1-2 EV70 与脊髓灰质炎病毒(PV1)在 HEL 和各种非灵长类细胞(33°C)中的生长及产生的CPE

细胞培养 类 型 来源	CPE		生长		病毒的吸附率%	
	EV70	PV1	EV70	PV1	EV70	PV1
HEL 人	卅	卅	卅	卅	83~92(88) ^(a)	83~90(88)
L 小鼠	—	—	+	—	90~92(91)	5~14(8)
BKH21 田鼠	—	—	+	—	71~73(72)	0
RK13 兔	卅	—	卅	—	92~93(94)	6~14(9)
RK17 兔	卅	—	卅	—	90~92(91)	0
PK15 猪	—	—	—	—	87~91(89)	0
B-RS-2 猪	—	—	+	—	52~56(54)	0
ESK 猪	—	—	+	—		
MDBK 牛	—	—	—	—	80~82(81)	0
BK1 牛	卅	—	卅	—	91~93(92)	0

注: (a) 列出的数字为百分数范围(平均%)。

毒复制。这就表明, 病毒吸附在细胞表面并不一定能在细胞中繁殖。EV70 在兔肾细胞中生长得很好, 产生明显 CPE。进一步作生长试验证明, J670/71 株在 RK13 中培养, 经 3~4 小时迟滞期后呈指数繁殖, 7 小时后达最大滴度 ($10^{7.8}$ PFU/ml), 与灵长类细胞中的生长曲线没有多少区别。

在非灵长类细胞中复制似乎是 EV70 的一般特性, 因为不同的毒株也有同样的宿主范围和复制能力, 如 J670/71、Rabat 6 和 85 株等。相反, 另一种 AHC 病原则像脊髓灰质炎病毒及许多其他肠道病毒一样, 仅能在灵长类细胞中培养。

由于病毒感染最初是与细胞表面特异受体结合, 所以

受体的性质对病毒吸附和穿入是很重要的。为了辨别 EV70 的特异性受体, Yamazaki 等制备了对 HeLa 细胞受体的单克隆抗体, 这种单克隆抗体能阻止 EV70 被 HeLa 细胞与 RK13 细胞吸附, 也能抑制柯萨奇 B5 被 HeLa 细胞吸附 (虽然在程度上小些), 但不影响 HeLa 细胞吸附脊髓灰质炎病毒。

(4) 血凝作用

用 EV70 高浓度纯化毒粒作血凝抗原, 证明此病毒有血凝活性。EV70 能凝集人 O 型红细胞、豚鼠和鸡红细胞, 但不凝集猪、牛、马、羊和兔红细胞(表 1-3)。在 4℃ 和室温时以人 O 型红细胞的血凝滴度最高, 其次为豚鼠红细胞, 最低为鸡红细胞, 而 37℃ 对 EV70 的血凝不适宜。由于 EV70 的血凝素对

表 1-3 EV70(J670/71株)在三种温度中
对各种红细胞的血凝滴度

红细胞 ^(a)	在下列温度中的血凝滴度 ^(b)		
种 类	4℃	20~25℃	37℃
人 O 型	3 200	1 600	<10
豚鼠	1 600	800	<10
鸡	400	100	10
猪	<10	<10	<10
牛	<10	<10	<10
马	<10	<10	<10
绵羊	<10	<10	<10
兔	<10	<10	<10

注: (a) 红细胞为 0.4% 的 PBS(pH7.6) 悬液。

(b) 显示有血凝的抗原最高稀释度的倒数。

非特异性抑制素极为敏感,所以用感染细胞的粗制品作为血凝抗原即无血凝活性。因此在制备血凝抗原和进行血凝抑制试验时,应将非特异抑制物除去。

Utagawa 等报道, EV70 凝集红细胞的受体与其他小核糖核酸病毒凝集红细胞的受体不同, EV70 的受体对神经氨酸酶敏感,这在人肠道病毒中是独特的,而小核糖核酸病毒对神经氨酸酶则不敏感(除外小核糖核酸病毒科中心病毒与鼻病毒5型)。神经氨酸酶处理(2.5mU/ml)会严重损伤人 O 型红细胞联接 EV70 和门果病毒(心病毒属的 1 种)的能力,但用这种酶处理即使提高了 16 倍(40mU/ml)也不破坏 Echo7 型和 11 型吸附红细胞的能力。在血凝作用中,每个红细胞所需病毒颗粒的数量在 EV70 与门果病毒中是相似的,其 1 个血凝单位(HAU)分别为 17 和 18 个病毒颗粒/细胞,而 Echo7 型与 11 型的 1 个 HAU 需要 44 和 70 个病毒颗粒/细胞。因此就红细胞与病毒之间的关系而言, EV70 更接近于心病毒而不是肠道病毒。然而, EV70 对红细胞表面位点饱和的颗粒数是门果病毒的 7 倍。EV70 与门果病毒之间的区别也表现在它们的抗原性及在 37℃ 中的稳定性方面, EV70 在 0.1mol/L 的氯化物中于 37℃ 放置 60 分钟,其感染性不变,而门果病毒则下降。

(5) 对实验动物的致病性

EV70 分离物能在小鼠、兔的原代上皮细胞及猴结膜与角膜组织培养中生长得很好,但至今尚未发现实验动物产生结膜炎。Jayavas 曾报告,将 EV70 植入兔和猴的眼中可引起结膜炎,但其他实验室未证实这一结果。Yamazaki 等用 EV70 做实验,用适应兔肾生长的毒株直接接种在结膜上,也未产生眼部感染。

与柯萨奇病毒不同, EV70 分离物对乳鼠与成鼠均无致

病性。

把 EV70 接种在猴子的中枢神经系统,可表现出明显的神经毒力,如同时将病毒接种在脊索和丘脑,可引起猴的单侧或双侧下肢麻痹。这一发现为 EV70 引起的 AHC 并发类脊髓灰质炎麻痹症,提供了病因学佐证。

3. EV70 的抗原性

Mirkovic 等在对 J670/71 进行鉴定时,曾用柯萨奇病毒 A 组各型血清作过中和试验(表 1-4),发现少数抗血清有弱

表 1-4 柯萨奇病毒 A 组(CA)各型抗血清
对 J670/71 株及本株的中和抗体滴度

抗血清(a)	中 和 滴 度	
	J670/71 病毒	CA 同源病毒
CA1~CA12	—(b)	1:1 550~1:12 000
CA13	1:10	1:3 770
CA14	—	1:14 500
CA15	1:10	1:2 580
CA16	1:10	1:2 300
CA17	—	1:2 000
CA18	1:32	1:4 520
CA19(免疫前马血清)	1:60	—
CA19	1:320	1:4 120
CA19(田鼠抗血清)	—	1:4 096
CA20	1:20	1:7 150
CA21~22	—	1:3 700~1:6 400
CA24	—	1:408
DN19(CA24)(田鼠抗血清)	—	1:256

注: (a) 无另外说明均为马抗血清。

(b) 1:8 或 1:10 稀释为阴性。

中和作用,如 CA19。Esposito 等用 J670/71 株与某些 CA 抗血清作蚀斑减少中和试验也发现 CA2、4、8、9 和 19 的猴抗血清对 EV70 有弱交叉反应。Kono 等检查了 EV70 与 Echo 4 型及 CA 组之间的交叉反应,发现 Echo 的 Shirophshire 株血清 1:20 能中和 EV70,但另外 3 株 Echo 4 型(Du、Toit、KP 和 197 株)抗血清不中和 EV70。在乳鼠中和试验中,CA19(Dohi 株)不被 10 倍稀释的 J670/71 猴抗血清中和。因此可以确定,早期的 EV70 分离物(包括 J670/71)与某些 Echo 4 及 CA 病毒没有抗原关系。

对 EV70 各分离株间的抗原性差异进行了研究,用早期从非洲、欧洲和亚洲分离的毒株作交叉中和试验表明,几乎所有 1971~1973 年分离的毒株用中和试验不能区分,提示这些毒株可能为单一抗原型组成。同时也观察到 G10/72(1972 年从日本岐阜地区分离到)不被 J670/71 的猴抗血清中和,而 J670/71 株可被 G10/72 的兔抗血清中和,其中和滴度与同源株相似。因此,EV70 分离物可分为 2 种类型:原型(proto type)与流行型(prime type),前者可被 2 个型别的抗血清中和,而后者仅被流行型抗血清中和。1971~1975 年从日本分离的 51 株 EV70 中,属原型的 24 株,属流行型的 27 株,其中 1971 年分离的 13 株都是原型,1974~1975 年分离的 18 株都属流行型,而 1972~1973 年分离的 20 株中既有原型株也有流行株。

Kawamoto 用交叉中和试验与动力学中和试验也研究了 EV70 毒株间的抗原特性,发现 1971~1976 年间的 12 株 EV70 可分成 3 个抗原亚群:①原型类,为 1971 年与 1972 年分离(4 株);②中间型,即 G10/72 类,1972 年与 1973 年各 1 株;③流行型(G2/74 类),为 1974~1976 年分离(6 株)。

Hierholzer 等也研究了 EV70 的抗原性变化,发现 1976 年前的毒株,有与同源株相同的中和滴度,而 1976 年以后的毒株中和滴度则低 4~16 倍。此外,Esposito、Hyggins 及 Lin 等也报告了 EV70 分离株间的特性,发现原型株与 1981 年中国台湾流行株之间在蚀斑大小及动力中和试验方面有差别。

以上这些研究说明,在用中和试验作血清学诊断时,应该用原型株(J670/71)与流行株 2 种抗原进行。

4. EV70 对物理因素、消毒剂和抗病毒药物的敏感性

(1) 物理因素

(a) 热失活

对 EV70 与脊髓灰质炎(PV)1 型(Sabin 株)的物理性能进行比较研究时,发现 EV70 在 0.05mol/L 的 Tris 缓冲液中(pH7.3)37℃的半生期为 6.4 小时,而 PV 为 41.6 小时,在 40℃、50℃和 60℃中进行试验,发现 EV70 在 40℃放置 30 分钟仍有感染性,而在 50℃放置 30 分钟则大部分失活,滴度从 $10^{7.0}$ TCD₅₀ 降到 $\leq 10^{1.0}$ TCD₅₀。表明 EV70 耐热性较差。

(b) 湿度

Sattar 等研究了空气温度与湿度对 EV70 稳定性的影响,将涂有病毒的不锈钢圆片放在各种温度与相对湿度中($20\% \pm 5\% \sim 95\% \pm 5\%$),发现病毒在 20℃ 时其存活与相对湿度水平有关,在高水平相对湿度中($95\% \pm 5\%$),病毒存活率最高;在低湿度中,EV70 的灭活率随温度上升而增加。

(2) 消毒剂

据报告,EV70 容易被多种杀菌剂如酚、甲酚、甲醛、升汞等灭活,当其他肠道病毒(PV1、CoxB5、Echo7 等)仅部分灭活或尚未灭活时,EV70 即已灭活,其灭活程度视杀菌剂浓度