

无菌性脑膜炎暴发中 Echo30 病毒的基因特征及分子进化分析

王海岩 徐爱强 朱贞 李岩 纪峰 张勇 张丽 许文波

【摘要】 目的 了解引起无菌性脑膜炎暴发的 Echo30 病毒的基因特征,分析其遗传变异规律及进化来源。方法 对 2003 年济南章丘市无菌性脑膜炎暴发中分离到的 Echo30 病毒进行了 VP1 区全基因序列测定,与国内外报道的 Echo30 病毒 VP1 区序列进行同源性比较,并通过构建进化树分析其遗传进化规律。结果 济南章丘市 Echo30 分离株 VP1 区核苷酸同源性在 98.9%~99.5% 之间,与同年山东省泰安市 Echo30 分离株同源性最高(98.5%~99.0%),与浙江、江苏两省的 Echo30 分离株同源性在 98.2%~98.9%,而与 1997 年法国分离株(89.1%~89.7%)和 2001 年台湾省分离株(87.4%~87.6%)的同源性相差较大,与原型株 Bastianni 株同源性最低,在 82.4%~82.8%。进化树分析显示,中国大陆近几年无菌性脑膜炎 Echo30 分离株独处一支,呈单源性发生关系。结论 2003 年, Echo30 病毒在山东省部分地区发生了一定程度的传播,并导致了无菌性脑膜炎的局部流行,进化树分析表明,中国大陆 Echo30 分离株与国外早期的分离株相比,其抗原性不完全相同,已形成新的基因亚型。

【关键词】 无菌性脑膜炎; Echo30 病毒; 基因特征; 分子进化

The genetic characterization and molecular evolution of echovirus 30 during outbreaks of aseptic meningitis WANG Hai-yan*, XU Ai-qiang, ZHU Zhen, LI Yan, JI Feng, ZHANG Yong, ZHANG Li, XU Wen-bo. *Shandong Provincial Center for Disease Control and Prevention, Jinan 250014, China Corresponding author: XU Ai-qiang, Email: aqxuepi@163.com

【Abstract】 **Objective** To study the variation and evolution rules and analyze the genetic characterization of echovirus 30 during an outbreak of aseptic meningitis. **Methods** For all the echovirus 30 isolates during the outbreaks in Zhangqiu city in 2003, complete VP1 genes were determined. Phylogenetic tree reconstruction and pairwise sequence were determined to compare the homological relationship and evolution rules between Zhangqiu strains and the other reported echovirus 30 in GenBank. **Results** Pairwise sequence comparisons in VP1 region indicated that there were 98.9%-99.5% identity of nucleotide acid among Zhangqiu strains, and having the highest homology with Taian strains (98.5%-99.0%) isolated in Shandong province. At the same time, when comparing with Zhejiang and Jiangsu strains, the nucleotide homology showed 98.2%-98.9%, relatively low identity with Taiwan strains (87.4%-87.6%) and French strains(89.1%-89.7%) but only 82.4%-82.8% identity when comparing with echovirus 30 prototype strain Bastianni. Data from phylogenetic tree analyses indicated that all the echovirus 30 correlated with aseptic meningitis in China recently came from the same evolution linkage and formed a monophyletic cluster. **Conclusion** In 2003, there was an circulation of echovirus 30 in Shandong province which causing an endemic of aseptic meningitis in local areas. Data from phylogenetic tree analyses indicated that the antigenic characteristics of echovirus 30 in mainland China might be different from strains early isolated in other continents and formed a new genotype.

【Key words】 Aseptic meningitis; Echovirus 30; Genetic characterization; Molecular evolution

病毒感染引起的中枢神经系统疾患临床主要

表现为无菌性脑膜炎和脑膜脑炎,其中以无菌性脑膜炎最为常见,而人类肠道病毒(HEV)是其最主要的病原体之一,约占35%~83%^[1]。根据 HEV 衣壳蛋白 VP1 区序列可将其分为 A、B、C、D 4 个组,其中 B 组主要包括 CoxB 1~6 型、所有 Echo 亚型、CoxA9、HEV69 型以及近年发现的 HEV73 型^[2,3],

基金项目:山东省医药卫生科研(2005)资助项目

作者单位:250014 济南,山东省疾病预防控制中心免疫预防管理(王海岩、徐爱强、李岩、纪峰、张丽);中国疾病预防控制中心病毒预防控制所(朱贞、张勇、许文波)

通讯作者:徐爱强,Email: aqxuepi@163.com

是引起无菌性脑膜炎的主要病原体,而 Echo30 是近年来在国内外引起无菌性脑膜炎最为流行的病毒^[4-7]。2003 年夏秋季,山东省济南市所辖章丘市发生了一起不明原因的脑膜炎暴发,共报告临床确诊病例 1743 例,罹患率为 1.81‰,发病高峰集中在 7-8 月份,年龄集中在 15 岁以下儿童,以 5~9 岁为主(55.00%),男女患病比例为 1.57:1。我们在流行期间采集了部分病例的粪便和血清标本,经过病毒分离和血清学鉴定为 Echo30 病毒。为进一步了解该病毒分离株的遗传变异规律及其进化来源,对其衣壳蛋白 VP1 区进行了序列测定,并与国内外已发表的引起无菌性脑膜炎的 Echo30 病毒序列进行了同源比较分析。

材料与方 法

1. 标本采集与处理:采集病例发病后粪便和急性期(发病 14 天内)、恢复期(发病 28 天后)血清标本,在无菌容器内冷藏运送至山东省疾病预防控制中心肠道病毒学实验室。用于病毒分离的粪便标本采用双抗(青霉素和链霉素)和氯仿进行预处理,3000 r/min 离心 20 min, -20℃ 保存。

2. 病毒分离与血清学定型:病毒分离采用 RD、Hep-2、Vero 3 种细胞进行,血清型鉴定采用微量板中和试验;患者急性期和恢复期血清运用中和抗体试验技术,测定中和抗体 IgG 水平。HEV 组合血清(KMB)及 Echo30 单型抗血清,标准毒株(Echo30/Bastianni)均由中国医学科学院医学生物学研究所肠道病毒血清室提供。

3. 病毒核糖核酸(RNA)的提取:将病毒接种于 RD 细胞,待细胞病变(CPE)达 III 时收获, -20℃ 冻融 3 次,参照文献[2],将病毒培养液加入 Trizol-氯仿提取总 RNA,加入异丙醇、75% 酒精沉淀,最后加入 20 μl dH₂O 和 1 μl RNA 酶抑制剂(RNasin), -20℃ 保存备用。

4. 逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR)合成互补脱氧核糖核酸(cDNA)链:参照文献[2],合成了可扩增 VP1 区的引物 008 (5'-GCRTGCAATGAYTTC TCWGT-3') 和 011 (5'-GCICIGAYTGITGIC RAA-3'),覆盖了 VP1 基因的全长 876 bp。首先用下游引物进行逆转录反应,条件是:42℃, 45 min。灭活逆转录酶后,加入上游引物,使用 PE 公司的 9700 型 PCR 仪进行扩增反应,条件是:高温启动 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 45℃ 30 s, 72℃ 30 s, 进行 35

个循环;最后 72℃ 10 min 结束反应。每次实验设去离子水为阴性对照。得到的 PCR 产物经 2% TAE 琼脂糖凝胶电泳鉴定。所用的 AMV 逆转录酶及 Taq DNA 聚合酶均购自 Bio-Lab 公司。

5. Echo30 型病毒特异性引物的设计与 RT-PCR:参照文献[8],设计了能够特异性扩增 Echo30 VP1 区 158 bp 产物的寡核苷酸引物 120S (5'-GACCCIGARIRIGCIYTNA-3') 和 47A (5'-TKIACRTGICKIGTYTGCAT-3'),对所有 Echo30 分离株以及其他 Echo 病毒(Echo6、Echo7、Echo9、Echo11、Echo13 和 Echo29)进行 RT-PCR,同时设阴性对照,阳性对照。

6. 序列测定和同源性分析:PCR 产物用 QIA 纯化试剂盒(QIAquick Gel Extraction Kit)进行纯化,然后采用 Sanger 末端双脱氧终止法,双向标记测定 VP1 基因的全长。序列测定使用 ABI 公司的 310 O 型自动核酸测序仪。序列结果采用 Sequencher, Bioedit 软件进行分析,用相邻连接方法(neighbor-joining method)建进化树,建树软件为 Mega,版本号 3.0。

7. 核酸序列的提交:此次暴发中分离到的 19 株 Echo30 VP1 序列已提交至 GenBank,序列号为 DQ118685~DQ118700。

结 果

1. 病原分离及血清学诊断:本次无菌性脑膜炎暴发共采集了 43 例病例的粪便标本,分离到 HEV 19 株,分离率为 44.12%,所有毒株采用血清中和实验鉴定均为 Echo30 型病毒;在所有阳性病例中有 13 例采集了双份血清,针对分离株 Echo30 病毒进行中和抗体水平测定,结果 76.92% 双份血清抗体呈 4 倍增高;对流行区 15 岁以下健康儿童的抗体水平测定显示,中和抗体滴度分布集中在 1:64~256 之间,几何平均滴度(GMT)为 1:53.08^[9]。因此,可以确定本次暴发的病原体即为 Echo30 型病毒。

2. 病毒分离株 VP1 区序列测定:为进一步从分子生物学上核实病毒型别,所有 19 株病毒分离株全部运用 RT-PCR 方法进行核酸扩增,PCR 产物经纯化后,进行基因序列的测定,经手工裁剪后,保留 VP1 区全长 876 bp 的核酸序列。将测序结果输入 GenBank,用 BLAST-n 检索对比后发现,除 Echo30 外,19 株病毒分离株与其他任何一型 HEV 核苷酸同源性均不足 75%,而与 Echo30 原型株 Bastianni

株相应区段的核苷酸则有 82.5% 的相似性。用 BLAST 程序自动翻译成对应的氨基酸,得到相应的氨基酸同源性比较结果,与核苷酸的同源性比较相似,19 株 Echo30 分离株 VP1 的氨基酸序列与 Bastianni 株相应位置的同源性达到了 93.1%~93.5%,而与其他 HEV 原型株相比则不到 80%。根据 HEV 同一血清型核苷酸和氨基酸同源性应分别超过 75% 和 88% 的原则^[2],可认为与 Echo30 原型株 VP1 序列高度同源的 19 株分离株病毒应属于 Echo30,该结果与前述病原学诊断结果一致。

3. Echo30 特异性引物核酸扩增:参照 Kilpatrick 等设计了能扩增 Echo30 VP1 区 158 bp 的特异性引物 120S 和 47A,对所有 19 株分离株病毒进行了 RT-PCR 反应,结果均为阳性,而对照的其他 Echo 型别分离株均为阴性。

4. Echo30 分离株病毒 VP1 区全基因核苷酸和同源性比较:在 19 株分离株病毒中,随机选取 4 株,与我国浙江省 (AY695097)、江苏省 (AY665606)、山东省泰安市 (DQ118683)、台湾省 (AY146082) 及欧美地区 (AJ241449/AF127985) 引起无菌性脑膜炎的 Echo30 分离株以及 Echo30 原型株 Bastianni (AF081430),进行了 VP1 区核苷酸同源性比较分析。表 1 结果显示:4 株章丘市分离株间,核苷酸同源性在 98.9%~99.5%;与同年山东省泰安市 Echo30 分离株同源性最高,在 98.5%~99.0%,与国内浙江、江苏两省的 Echo30 分离株同源性在 98.2%~98.9%,而与 1997 年法国分离株 AJ241449 (89.1%~89.7%) 和 2001 年台湾省分离株 AY146082 (87.4%~87.6%) 的同源性相差较大,与原型株 Bastianni 株同源性最低,在 82.4%~82.8% 之间。

5. Echo30 分离株病毒 VP1 区氨基酸序列同源性比较:VP1 区氨基酸同源性比较显示 (图 1),4 株章丘市分离株氨基酸序列基本一致,与它们同源性最为接近的是大陆已公布的 Echo30 分离株,最多有 1 个氨基酸的差异;其次同源性较近的是台湾省 2001 年无菌性脑膜炎分离株,有 4 个氨基酸差异;而与欧美地区分离株及原型株 Bastianni 株同源性较低,但变异是散在分布的,无集中变异区。

6. Echo30 分离株病毒 VP1 区进化树分析:为了进一步分析此次 Echo30 分离株的基因变异规律以及国内外 Echo30 病毒的遗传进化关系,我们将 4 株分离株病毒与不同时期、不同国家和地区的 Echo30 采用相邻连接方法构建进化树,将 Echo21-Farina 株作为外部组,采用 Bootstrap 法进行分析,可以将 Echo30 病毒分为 5 个基因组 (图 2)。基因组 1 包括 20 世纪 60 年代和 70 年代欧美分离株,其代表株为 MN60-Giles 和 PR61-PR17;基因组 2 包括原型株 Bastianni 株在内的欧美分离株;基因组 3 包括 20 世纪 80 年代和 90 年代的欧美分离株;基因组 4 为 1998 年和 2001 年日本和我国台湾无菌性脑膜炎暴发的分离株;基因组 5 为大陆近几年无菌性脑膜炎 Echo30 分离株。本次分离株全部位于基因组 5,呈单源性的发生关系,紧密地结成一簇。

讨 论

HEV 是引起无菌性脑膜炎最重要的病原体之一,每年在美国和加拿大约导致 50 000 人住院^[6]。在引起无菌性脑膜炎的 HEV 中,HEV-B 组中的 Echo30、Echo13、Echo9、CoxA9 和 CoxB3、CoxB5 型均有报道,特别是 2003 年 Echo30 和 Echo9 在美国多个州引起了无菌性脑膜炎的暴发^[10]。

表 1 4 株 Echo30 分离株病毒 VP1 区核苷酸和氨基酸同源性比较

序列	SD03-ZQ-02	SD03-ZQ-09	SD03-ZQ-20	SD03-ZQ-26	AY695097	AY665606	DQ118683	AY146082	AJ241449	AF127985	Bastianni
SD03-ZQ-02	-	0.995	0.992	0.989	0.986	0.987	0.988	0.874	0.891	0.876	0.824
SD03-ZQ-09	0.996	-	0.994	0.992	0.988	0.989	0.990	0.874	0.893	0.878	0.825
SD03-ZQ-20	0.996	0.993	-	0.990	0.985	0.986	0.987	0.875	0.897	0.882	0.828
SD03-ZQ-26	1.000	0.996	0.996	-	0.982	0.984	0.985	0.876	0.889	0.878	0.824
AY695097	1.000	0.996	0.996	1.000	-	0.989	0.986	0.877	0.894	0.882	0.825
AY665606	0.996	0.993	0.993	0.996	0.996	-	0.985	0.876	0.894	0.882	0.827
DQ118683	0.996	0.993	0.993	0.996	0.996	0.993	-	0.871	0.890	0.873	0.824
AY146082	0.979	0.976	0.976	0.979	0.979	0.979	0.976	-	0.897	0.893	0.829
AJ241449	0.979	0.976	0.976	0.979	0.979	0.982	0.982	0.976	-	0.936	0.832
AF127985	0.965	0.962	0.962	0.965	0.965	0.969	0.962	0.965	0.979	-	0.827
Bastianni	0.934	0.931	0.931	0.934	0.934	0.934	0.938	0.921	0.938	0.924	-

注:黑体字为章丘市分离株;左下为氨基酸同源性,右上为核苷酸同源性

SD03-ZQ-26	NDPESALNKA	10	VGRVADTVAS	GPVNTEQIPA	LTAVETGHTS	QVVPSDTMQT	RHVINYHTRS	ESSIENFMGR	AACVYIAQYA	TEKVNDELDR	90						
SD03-ZQ-02							
SD03-ZQ-09							
SD03-ZQ-20							
DQ118683							
AY695097							
AY665606							
AY146082	R							
AF127985	R	V	V	NG							
AJ241449	R	V							
Bastianni	G	V	F	L	A	H	T	A	D
SD03-ZQ-26	TFVITSSQRT	130	STTYASDSP	LTHQVMYYP	GGP1PKSYED	FAWQTSINPS	VFWTEGNAPP	RMS1PFMSVG	NAYCNFYDGW	SHPSSQSGVYG	210						
SD03-ZQ-02							
SD03-ZQ-09							
SD03-ZQ-20							
DQ118683							
AY695097							
AY665606							
AY146082							
AF127985							
AJ241449							
Bastianni	NR							
SD03-ZQ-26	FKPKHVKAWV	250	PRAPRLCPYL	YARNVNFVQ	GVTESRDKIT	LDRSTHINPLT	NT				290						
SD03-ZQ-02							
SD03-ZQ-09							
SD03-ZQ-20							
DQ118683							
AY695097							
AY665606							
AY146082							
AF127985							
AJ241449							
Bastianni							

图1 Echo30 分离株 VP1 区基因全长氨基酸序列比较

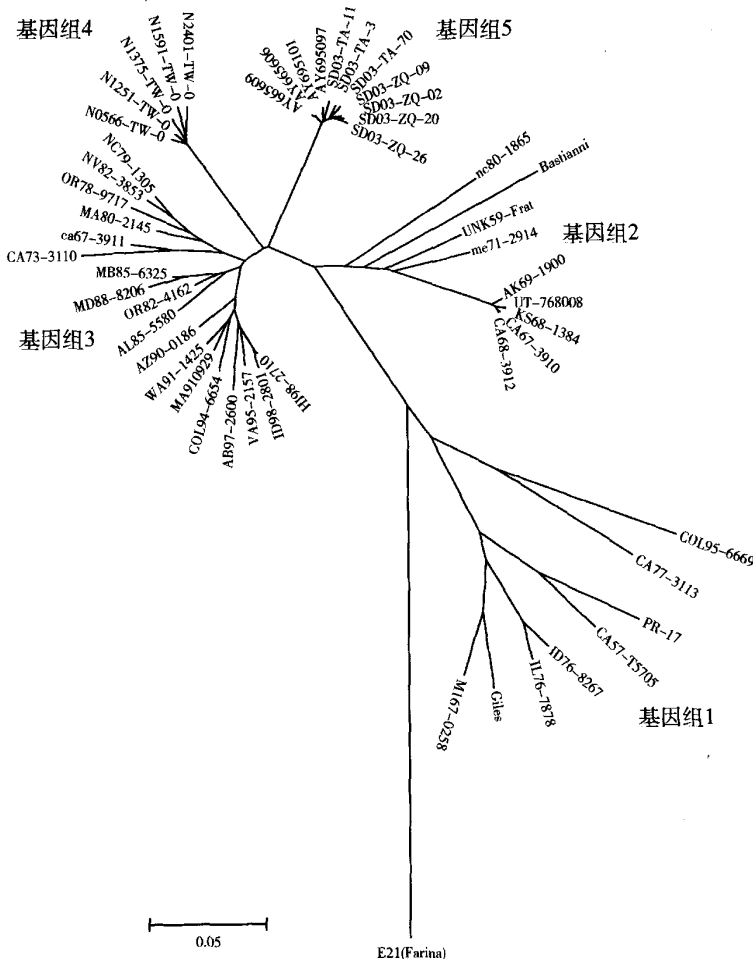


图2 Echo30 分离株 VP1 区全基因序列系统发生树

山东省健康儿童中 HEV 带毒率较高,其中 Echo 是主要的优势毒株^[11,12]。近年来对 HEV 所致疾病的监测结果显示,1994 年山东省苍山县和 1996 年栖霞市发生的两起无细菌性脑膜炎暴发,其病原分别为 CoxB3 和 CoxB5^[13],而 2003 年泰安市 HEV 所致中枢神经系统疾病的流行中,同时分离到 Echo19、EV71 和 Echo30,且以 Echo19 为主^[14],提示由 HEV 引起的疾病在不同地区、不同年份其血清型存有差异。20 世纪 90 年代中期山东省似乎以 CoxB 组病毒引起的疾病为多,但进入到 21 世纪后,Echo 病毒特别是 Echo30 引起的疾病暴发近些年时有报告。此次章丘市所分离的毒株为单一的 Echo30 型,且与同时期泰安市分离的 Echo30 毒株同源性最高(核苷酸同源性 98.5%~99.0%,氨基酸同源性 99.3%~99.6%),从分子流行病学的角度证实了

2003 年 Echo30 病毒在山东省部分地区发生了一定程度的传播,并导致了无菌性脑膜炎的局部流行。而同期山东省毗邻的江苏省也发生了 Echo30 引起的无菌性脑膜炎的流行,且范围较大,感染人数较多,发病高峰集中在 3-6 月份^[5],山东省两起 HEV 流行的高峰集中在 6-8 月份,通过对江苏省以及山东省泰安、章丘三地 Echo30 分离株 VP1 区全基因核苷酸比较发现,三者高度同源,加之发病时间、地理位置相近,因此极有可能在同一时间山东、江苏等地存在着 Echo30 的传播链。

HEV 在其自身复制过程中,由于缺少 RNA 依赖的 RNA 聚合酶的校正活性,具有高突变率的特征,且 HEV 还有自发突变的倾向,大约在每一次复制过程中会发生一个碱基的突变^[15],这使得通过较小片段基因序列进行分子流行病学研究成为可能。对病毒衣壳蛋白 VP1 区和非编码区 2A 区连接处 150 bp 的序列分析,已广泛应用于脊髓灰质炎的分子流行病学研究。通过比较不同毒株 150 bp 核苷酸序列,差异小于 15% 的一组病毒,我们认为其属于同一“基因型”,差异若小于 2%,我们则认为其有直接的流行病学联系^[16]。研究发现,在同种血清型的脊髓灰质炎病毒中,不同基因型毒株可以反映截然不同的地理分布。通过对病毒 VP1 区构建进化树不难发现,中国大陆 Echo30 分离株与其他国家和地区的分离株病毒相比,独处一支,一方面因为 GenBank 上公布的中国大陆 Echo30 病毒多为近年来无菌性脑膜炎分离株,同源性接近,另一方面也说明引起无菌性脑膜炎暴发的多为本土病毒,而非外来输入病毒。但是由于缺乏其他时期的分离资料,还不能确定是否有其他 Echo30 基因型在中国大陆循环。

早期研究表明,Echo30 病毒根据其抗原性可以分为 3 个组: I 组代表株为 NY58-Bastianni 和 UNK59-Frater 株, II 组代表株为 MN60-Giles, III 组代表株为 PR61-PR17^[6]。进化树分析显示中国大陆 Echo30 分离株与上述 3 组的代表株位于不同基因组,说明它们与早期的 Echo30 代表株相比抗原性不完全相同,已形成独立的基因亚型。

参 考 文 献

- laboratory in diagnosis and management of patients with central nervous system disease. *Clin Microbiol Rev*, 1989, 2:1-14.
- Oberste MS, Mather K, Kilpatrick DR, et al. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J Virol*, 1999, 73:1941-1948.
- Oberste M, Schnurr D, Mather K, et al. Molecular identification of new picornaviruses and characterization of a proposed enterovirus 73 serotype. *J Gen Virol*, 2001, 82 Pt 2:409-416.
- Wang JR, Tsai HP, Huang SW, et al. Laboratory diagnosis and genetic analysis of an echovirus 30-associated outbreak of aseptic meningitis in Taiwan in 2001. *J Clin Microbiol*, 2002, 40: 4439-4444.
- Zhao YN, Jiang QW, Jiang RJ, et al. Echovirus 30, Jiangsu province, China. *Emerg Infect Dis*, 2005, 11:562-567.
- Oberste MS, Mather K, Kennett ML, et al. Molecular epidemiology and genetic diversity of echovirus 30 (E30): genotypes correlate with temporal dynamics of E30 isolation. *J Clin Microbiol*, 1999, 37:3928-3933.
- Savolainen C, Hovi T, Mulders MN. Molecular epidemiology of echovirus 30 in Europe: succession of dominant sublineages within a single major genotype. *Arch Virol*, 2001, 146:521-537.
- David R, Kilpatrick DR, Jacqueline Q, et al. Type-specific detection of Echovirus 30 isolates using degenerate reverse transcriptase PCR primers. *J Clin Microbiol*, 2001, 39:1299-1302.
- Rico-Hesse R, Pallansch MA, Nottay BK. Geographic distribution of wild poliovirus type 1 genotypes. *Virology*, 1987, 160:311-322.
- World Health Organization. Outbreaks of aseptic meningitis associated with echoviruses 9 and 30 and preliminary surveillance reports on enterovirus activity — United States, 2003. *MMWR*, 2003, 52:761-764.
- 徐爱强,王同展,王海岩,等. 山东省健康儿童肠道病毒带毒状况调查. *预防医学信息*, 2002, 8:3-5.
- 王海岩,徐爱强,刘桂芳,等. 山东省急性弛缓性麻痹病例非脊灰肠道病毒感染监测分析. *预防医学文献信息*, 2002, 8:643-645.
- 徐爱强,王同展,王玉才,等. 无菌性脑炎与肠道病毒感染关系的研究. *中国公共卫生*, 2002, 18:1335-1337.
- 王海岩,许文波,徐爱强,等. 一起传染病爆发中肠道病毒血清型鉴定和 ECHO30 基因特征分析. *病毒学报*, 2005, 21:106-112.
- Thoelen I, Moes E, Lemey P, et al. Analysis of the serotype and genotype correlation of VP1 and the 5' noncoding region in an epidemiological survey of the human enterovirus B species. *J Clin Microbiol*, 2004, 42:963-971.
- 李岩,徐爱强,宋立志,等. 埃柯病毒 30 型所致无菌性脑膜炎爆发的血清流行病学分析. *中国计划免疫*, 2005, 11:461-464.

(收稿日期:2006-01-12)

(本文编辑:张林东)