

病患者的耐药检测都有发现,而针对PI和NRTI的2个耐药位点L90M和T215D尚未发现。提示耐药株的传播可能来源于在患者的继发突变。

2008年北京市、河南省和湖南省等开展了HIV耐药监测,耐药突变株总体的传播水平尚处于低流行状态( $<5\%$ )<sup>[3-5]</sup>。本研究耐药警戒线分析提示,2009年云南省德宏州耐药株已达中度传播水平(5%~15%),而且同时检测到了RT和PR区的耐药突变株。为应对耐药传播上升的趋势,对治疗人群的规范治疗及科学管理仍然是当前艾滋病患者治疗工作的重点。应进一步提高依从性,减少治疗患者中耐药毒株的发生,重视对接受治疗患者的行为干预,采取措施减少耐药株向新近感染人群的传播。此外,为全面了解耐药传播的情况,还需要考虑增加监测点并扩大监测地区,每年进行耐药警戒线的调查,根据监测结果决定是否进行治疗前的耐药检测。

### 参 考 文 献

- [1] Bennett DE, Myatt M, Bertagnolio S, et al. Recommendations for surveillance of transmitted HIV drug resistance in countries scaling up antiretroviral treatment. *Antivir Ther*, 2008, 13 Suppl 2: S25-36.
- [2] Myatt M, Bennett DE. A novel sequential sampling technique for

the surveillance of transmitted HIV drug resistance by cross-sectional survey for use in low resource settings. *Antivir Ther*, 2008, 13 Suppl 2: S37-48.

- [3] Chen X, Xing H, He JM, et al. Study on the threshold of HIV-1 drug resistance in Hunan province. *Chin J Epidemiol*, 2008, 29(8): 787-789. (in Chinese)
- 陈曦,邢辉,贺健梅,等. 湖南省HIV-1耐药警戒线调查. *中华流行病学杂志*, 2008, 29(8): 787-789.
- [4] Hei FX, Li Y, Liao LJ, et al. The prevalence of HIV-1 drug resistant strain in Beijing in 2008. *Chin J Microbiol Immunol*, 2008, 29(6): 499-502. (in Chinese)
- 黑发欣,李洋,廖玲洁,等. 2008年北京市HIV-1耐药株传播调查. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2008, 29(6): 499-502.
- [5] Yuan Y, Cao XL, Liu HW, et al. Study on the transmission of drug resistant human immunodeficiency virus-1 in Henan province. *Chin J Prev Med*, 2009, 43(11): 956-959. (in Chinese)
- 袁源,曹新良,刘宏伟,等. 河南省人类免疫缺陷病毒-1型耐药毒株的变异情况研究. *中华预防医学杂志*, 2009, 43(11): 956-959.

(收稿日期:2010-10-18)

(本文编辑:尹廉)

## 病毒性脑炎病例中Echo6河南分离株VP1基因特征分析

李幸乐 黄学勇 许汴利 陈豪敏 唐晓燕 杜燕华 晁灵

【关键词】 病毒性脑炎;埃可病毒

**Analysis on the gene characteristics of VP1 region in Echo6 strains in Henan, China** Li Xing-le<sup>1</sup>, HUANG Xue-yong<sup>1</sup>, XU Bian-li<sup>1</sup>, CHEN Hao-min<sup>1</sup>, TANG Xiao-yan<sup>1</sup>, DU Yan-hua<sup>1</sup>, CHAO Ling<sup>2</sup>. 1 Henan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Zhengzhou 450016, China; 2 School of Public Health, Zhengzhou University

Corresponding author: XU Bian-li, Email: xubl@hncdc.com.cn

This work was supported by grants from the Scientific and Technological Research Projects of Henan Medicine (No. 200702016) and Major Projects of Medical Science Research in Henan Province (No. 201001015).

【Key words】 Viral encephalitis; Echovirus

本研究对2008年Echo6河南分离株VP1区全基因序列

进行分析,并在此基础上对Echo6的基因特征和分子流行病学进行初步分析。

### 1. 材料与方法:

(1)标本来源:2008年1月至2010年10月,在开封、洛阳、新乡3地县级以上医院无菌采集诊断为病毒性脑炎病例的脑脊液标本,标本在24 h内-20℃冻存,并通过冷链送至河南省疾病预防控制中心(CDC)。

(2)病毒分离和定型:每份脑脊液标本各取100 μl接种至人横纹肌瘤细胞(RD)、人喉癌上皮细胞(Hep-2)和非洲绿猴肾细胞(Vero),分别置36℃(RD和Hep-2)和37℃(Vero)、5% CO<sub>2</sub>培养箱培养,连续培养7 d,逐日观察并记录细胞病变(CPE)。盲传3代,未出现CPE者弃去,出现CPE者,继续盲传至出现规律CPE,收获的病毒利用肠道病毒组合血清(RIVM)进行微量板中和试验以定型<sup>[1]</sup>。

(3)VP1区序列分析:将病变细胞反复冻融3次使病毒释放至培养液,利用天根生化科技(北京)有限公司生产的病毒基因组RNA提取试剂盒提取病毒RNA,所有操作按照说明书进行;参照文献[2],合成VP1区的2对引物:012-011、008-013,序列为:012: 5'-ATG TAY GTI CCI CCI GGI GG-3', 011: 5'-GCI CCI GAY TGI TGI CCR AA-3'; 008:

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.04.023

基金项目:河南省医学科技攻关项目(200702016);河南省医学科学攻关重大项目(201001015)

作者单位:450016 郑州,河南省疾病预防控制中心(李幸乐、黄学勇、许汴利、陈豪敏、唐晓燕、杜燕华);郑州大学公共卫生学院(晁灵)

通信作者:许汴利, Email: xubl@hncdc.com.cn

5' -GCR TGC AAT GAY TTC TCW GT-3' , 013: 5' -GGI GCR TTI CCY TCI GTC CA-3'。扩增、拼接后得到 VP1 区全基因序列共 867 bp。根据大连宝生物公司 RT-PCR 试剂盒说明书,利用随机六聚体引物反转录获取病毒 cDNA,PCR 反应体系:上下游引物 (20 μmol/L) 各 1 μl、dNTP 混合物 (10 mmol/L) 2 μl、Taq 酶 (大连宝生物公司) 0.5 μl、10 × Buffer 5 μl、cDNA 2 μl、ddH<sub>2</sub>O 38.5 μl;反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 45 °C 45 s, 72 °C 45 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。利用 2% 的琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物,PCR 阳性产物送南京金斯瑞生物科技有限公司测序,测序结果采用 DNASTar 7.0 软件进行拼接,与参考病毒株经 ClustalX 1.81 软件标准化后,参考文献 [3],利用 Mega 4.0 软件,采用邻接 (NJ) 法进行拼接。将 VP1 序列提交至 GenBank。

2. 结果:

(1) 病毒分离与定型:在采集到的 168 例脑脊液标本中,共分离到 7 株 Echo6, 4 株获得 VP1 区全长序列,另外 3 株中,1 株丢失一部分序列、2 株仅能测出其中一部分序列。通过 NCBI 网站上的 Blast 进行比对,证实为肠道病毒 Echo6。

(2) Echo6 分离株病毒 VP1 区全基因序列及同源性分析:经测序及比对分析,VP1 区全长 867 bp。4 株 Echo6 核苷酸同源性在 98.5% ~ 100.0%,其中 2 株序列完全相同。与 GenBank 上检索到的 Echo6 分离株比较,与同年山东省分离株 (GU272016) 最为接近,与安徽省 2005 年金寨县暴发分离株 (金寨株) 同源性相差较大,与原型株 AY302558 同源性最低 (表 1)。

(3) VP1 区氨基酸序列同源性分析:Echo6 VP1 编码 289 个氨基酸,与河南省 2008 年 Echo6 分离株氨基酸同源性为 98.6% ~ 100.0%,与 GU272016 氨基酸同源性为 92.9% ~ 93.1%,与金寨株氨基酸同源性为 84.0% ~ 84.1%,与原型株氨基酸同源性为 74.2% ~ 74.6% (表 1)。

(4) Echo6 VP1 区进化树分析:将 GenBank 中检索到的 Echo6 进行比较筛选,将筛选得到的 33 株 Echo6 与本研究得到的 Echo6 河南分离株的 VP1 区全基因核苷酸序列进行比较,并构建进化树。以 Echo29-JV-10 株为外部组, Echo6 可以划分为 4 个基因型,基因型 A 包括原型株和美国本土株。基因型 B 病毒株主要来自前苏联地区。25 株 Echo6 属于基因型 C,病毒株分别来自韩国、前苏联地区、法国、澳大利亚和中国河南、安徽、山东省,时间为 1998 - 2009 年,可进一步划分为 C1 ~ 4 的 4 个亚型。基因型 D 为新划分群,包含 2 株病毒,均来自中国山东省。河南省 4 株分离株在进化树上同属

一个分支 (图 1),均属于 C2 亚型。

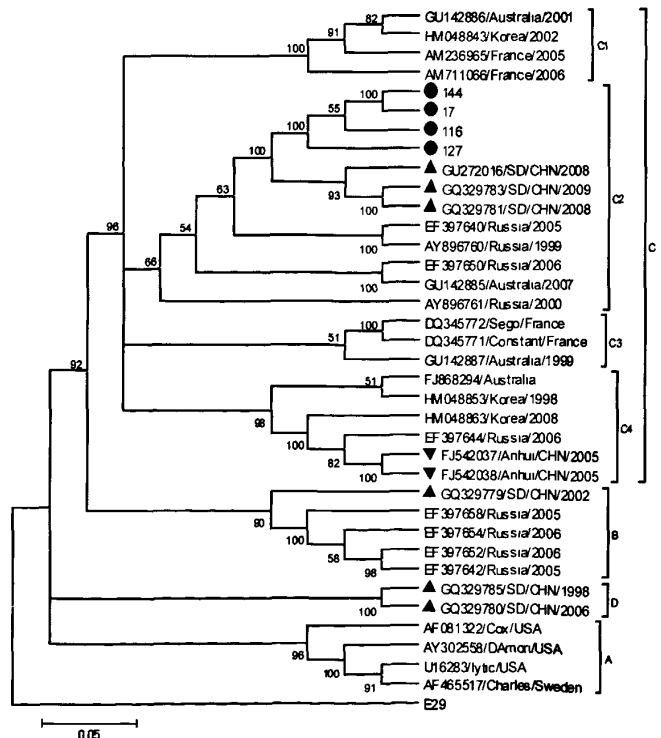
(5) VP1 基因序列提交:将序列提交至 GenBank,得到的序列号分别为 HM185055、HM185056 和 HM535636。

3. 讨论: Echo6 可引起病毒性脑炎、手足口病等多种疾病,侵袭对象以 1 岁以下婴幼儿为主,病死率 5.6%,国内外均有由 Echo6 引起的公共卫生事件报道。2008 年河南省引起病毒性脑炎肠道病毒的监测中,同时分离到多种 Echo, Echo6 占有较大比例。同源性分析结果显示 Echo6 分离株核苷酸差异 < 2%,可以判定 2008 年 Echo6 在河南省发生了一定程度的传播,导致病毒性脑炎的流行。进化分析显示, 2008 年河南省分离株与近年山东省分离株高度同源,由于河南省与山东省相邻,环境和气候因素相近,推测同一时间河南与山东省之间存在 Echo6 的传播。GenBank 现已公布的

表 1 Echo6 分离株 VP1 区基因核苷酸与氨基酸同源性分析

病毒株编号 或序列号	AY302558	GU272016	FJ542037	FJ542038	144*	17*	116*	127*
AY302558		<b>0.733</b>	<b>0.745</b>	<b>0.748</b>	<b>0.726</b>	<b>0.726</b>	<b>0.726</b>	<b>0.729</b>
GU272016	0.749		<b>0.832</b>	<b>0.832</b>	<b>0.928</b>	<b>0.928</b>	<b>0.927</b>	<b>0.928</b>
FJ542037	0.759	0.844		<b>0.998</b>	<b>0.831</b>	<b>0.831</b>	<b>0.829</b>	<b>0.827</b>
FJ542038	0.762	0.844	0.998		<b>0.831</b>	<b>0.831</b>	<b>0.829</b>	<b>0.827</b>
144*	0.742	0.929	0.841	0.841		<b>1.000</b>	<b>0.989</b>	<b>0.986</b>
17*	0.742	0.929	0.841	0.841	1.000		<b>0.989</b>	<b>0.986</b>
116*	0.742	0.928	0.840	0.840	0.988	0.988		<b>0.989</b>
127*	0.746	0.931	0.840	0.840	0.985	0.985	0.988	

注:AY302558 为原型株, GU272016 为山东株, FJ542037、FJ542038 为金寨株,\* 本研究分离株; 白体为氨基酸同源性, 黑体为核苷酸同源性



注:●本研究分离的 Echo6, ▼安徽分离株, ▲山东分离株

图 1 Echo6 分离株 VP1 区全基因序列系统发生树

Echo6 划分为4个基因型,并呈现出一定的时间和地域特征。A群近年未见出现,有消亡趋势。C群包含了来自全球各地的大多数Echo6分离株,可以肯定是主要的流行基因型。中国存在B、C和D型的传播流行,C型较多见,B、D型目前仅山东省有报道,与全球流行趋势基本一致。

### 参 考 文 献

[1] Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al. *Fields virology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996:655-712.

[2] Oberste MS, Maher K, Kennett ML, et al. Molecular epidemiology and genetic diversity of echovirus type 30 (E30): genotypes correlate with temporal dynamics of E30 isolation. *J Clin Microbiol*, 1999, 37(12):3928-3933.

[3] Mao NY, Zhao LP, Zhu Z, et al. An aseptic meningitis outbreak caused by echovirus 6 in Anhui province, China. *J Med Virol*, 2010, 82(3):441-445.

(收稿日期:2010-10-13)

(本文编辑:万玉立)

## 西藏自治区2202名藏族人群乙型肝炎病毒感染影响因素研究

达娃桑姆 达瓦 姜倩 平措次仁 顿珠多吉 张菊英

【关键词】 乙型病毒性肝炎; 危险因素

**Study on the risk factors of Hepatitis B virus infection of 2202 Tibetans in Tibet Autonomous Region** DAWA Sangmu<sup>1</sup>, DA Wa<sup>1</sup>, JIANG Qian<sup>2</sup>, PINGCUO Ciren<sup>1</sup>, DUNZHU Duoji<sup>1</sup>, ZHANG Ju-ying<sup>2</sup>. 1 *Tibet Center for Disease Control and Prevention, Lhasa 850000, China*; 2 *Department of Health Statistics, West China School of Public Health, Sichuan University* Corresponding author: ZHANG Ju-ying, Email: juying109@163.com

【Key words】 Hepatitis B virus; Risk factors

HBV感染可导致急性肝炎、肝硬化及肝癌等。已有研究显示,目前尚无治疗乙型肝炎(乙肝)的特效药物,预防仍是控制HBV感染的关键。目前,有关藏族人群乙肝病毒感染影响因素相关研究较少,本研究即分析西藏自治区藏族人群HBV感染的危险因素。

### 1. 对象与方法:

(1) 资料来源:我国卫生部2006年9月开展的“全国人群乙肝等有关疾病血清学调查”项目。

(2) 抽样方法:采用按规模大小成比例的概率抽样方法,抽取拉萨市城关区14个居委会及5个县8个村(拉萨市墨竹工卡县1个乡的3个村,日喀则地区江孜县、林芝地区米林县、山南地区乃东县各1个乡的2个村)的常住居民。

(3) 调查对象:按照2006年全国人群乙肝血清流行病学调查方案,采取PPS法,以家庭为单位抽取居住半年以上的常

住人口作为调查对象,共调查2590名1~59岁居民。进一步通过民族变量进行筛查,最终将1306户2202名藏族人纳入分析。其中城市地区778户,934人;农村地区528户,1268人。

(4) 现场调查:入户问卷调查使用全国统一的调查表,调查的主要内容包括:一般情况、HBV暴露史、乙肝疫苗免疫史。同时,每名调查对象采集静脉血2~4 ml,血标本采集当天即运送至所在地疾病预防控制中心(CDC),分离血清,-20℃冻存。现场调查结束后将血清标本送至中国CDC进行检测。

(5) 血清学检测:HBsAg、抗-HBs、HBeAg和抗-HBe使用厦门英科新创科技有限公司生产的酶联免疫吸附试验试剂进行检测,抗-HBc使用上海科华生物工程股份有限公司生产的ELISA试剂进行检测。其中,HBsAg、抗-HBs和HBeAg采用ELISA夹心法,抗-HBc和抗-HBe采用ELISA竞争抑制法。HBsAg、抗-HBs、抗-HBc三项指标中,任意一项为阳性即为HBV感染(接种乙肝疫苗后产生抗-HBs且其他指标均为阴性者除外),将1039例HBV感染阳性者作为病例组;HBsAg、抗-HBs、抗-HBc三项指标均为阴性者和接种乙肝疫苗后产生抗-HBs且其他指标均为阴性即为阴性,将1163例HBV阴性者定义为对照组。

(6) 统计学分析:采用EpiData 3.02软件建立数据库,所有问卷经复核并进行双录入,采用MLwiN 2.02软件进行统计学分析。本次调查所得资料具有明显的层次结构:即“乡-村-户-个人”4个水平。一般情况下,同一乡、同一村或者同一户的经济水平、生活方式及习惯上都具有某种程度上的相似性或聚集性,即每个个体调查所得数据不完全独立<sup>[1]</sup>。由于本研究中“户”以上的高水平单位样本数量太少,故只考虑两水平数据结构,即以“户”作为高水平即水平2,“个体”作为低水平即水平1。结合资料的抽样层次结构特点,首先拟合两水平logistic回归零模型,以判断是否存在高水平的聚集效应;若存在家庭聚集效应,计算方差成分系数(VPC)<sup>[2,3]</sup>以

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.04.024

作者单位:850000 拉萨,西藏自治区疾病预防控制中心传染病所(达娃桑姆、达瓦、平措次仁、顿珠多吉);四川大学华西医学中心公共卫生学院卫生统计学教研室(姜倩、张菊英)

达娃桑姆、达瓦同为第一作者

通信作者:张菊英, Email: juying109@163.com