

河南省肠道病毒 Echo6 型脑炎病毒分离株全基因组序列分析

李幸乐 黄学勇 陈豪敏 许汴利

【关键词】埃可病毒; 全基因组; 序列分析

Genomic characteristics of echovirus 6 strains isolated from Henan province LI Xing-le, HUANG Xue-yong, CHEN Hao-min, XU Bian-li. Henan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Zhengzhou 450016, China
Corresponding author: XU Bian-li, Email: xubl@hncdc.com.cn
【Key words】Echovirus; Complete genome; Sequence analysis

2008年7—9月河南省多个地区出现以儿童为主的中枢神经系统感染性疾病暴发,证实为肠道病毒 Echo6 型感染^[1]。本研究筛选2株脑脊液分离株进行全基因组序列测定。

1. 材料与方法:

(1)标本及毒株:2008年河南省开封市、洛阳市各1例病毒性脑炎患儿的脑脊液标本,经人横纹肌肉瘤细胞分离得到病毒,并经肠道病毒 VP1 区通用引物扩增,测序后鉴定为 Echo6 病毒,分别命名为 Echo6/Henan/116/2008 和 Echo6/Henan/127/2008。

(2)试剂:病毒基因组 RNA 提取试剂盒为天根生化科技(北京)有限公司产品,RT-PCR 试剂盒为大连宝生物工程技术有限公司产品,其他试剂均为分析纯。

(3)引物设计与合成:参考 Echo6 病毒原型株 D'Amori (GenBank 序列号:AY302558)、俄罗斯分离株 EV6-10887-99 (GenBank 序列号:AY896760)全基因组序列,采用 DNASTar 和 Primer 5.0 软件设计11对首尾相互重叠的引物,分段扩增 Echo6 病毒全基因组序列。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

(4)病毒 PCR 扩增:按照试剂盒说明书提取病毒基因组总 RNA 并进行反转录,然后以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增条件为:95 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 50 s, 38 °C 退火 50 s, 72 °C 延伸 90 s, 40 个循环; 72 °C 延伸 10 min。

(5)生物信息学分析:将 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 软件进行核苷酸序列拼接及校对,得到 Echo6 病毒全基因组序列,并递交 GenBank。同时从 GenBank 选取 Echo6 病毒全基因组作为参比序列,使用 Cluster 1.81 软件将本研究分离株和所有参比序列标准化,然后使用 Mega 4.0 软件进行同源性分析,同时采用 NJ 法构建进化树。

2. 结果:

(1)Echo6 病毒基因结构特征:为确保数据的准确性,11 对 PCR 扩增产物均采用双向重叠测序。所得 Echo6 病毒全

基因组序列 Echo6/Henan/116/2008 和 Echo6/Henan/127/2008 递交至 GenBank,获得序列号为 HM185055 和 HM185056。除 3' 末端的 PolyA 尾巴, Echo6/Henan/116/2008 全基因组长度为 7406 bp,其中 A 占 28.38%, G 占 24.21%, C 占 23.16%, T 占 24.25%, AT 含量丰富(52.63%)。基因组 5' 端为 743 bp 的非编码区(5' UTR),5' UTR 之后为 6573 bp(不含终止密码子)的编码区,编码 2191 个氨基酸的多聚蛋白,最后为 87 bp 的 3' UTR。与其他 Echo6 病毒株相比, Echo6/Henan/116/2008 在编码区没有核苷酸的缺失和插入。

(2)病毒基因组核苷酸序列分析:以 Echo29 JV-10 作为外部组,将 Echo6/Henan/116/2008 序列与 Echo6 病毒原型株 D'Amori、瑞典分离株 Charles、美国分离株 lytic、俄罗斯分离株 EV6-10887-99 和 EV6-14103-00 以及本研究另一分离株 Echo6/Henan/127/2008 进行比较。Echo6/Henan/116/2008 株全基因组与 Echo6/Henan/127/2008 的同源性为 99.3%,与基因型 A 组(D'Amori、Charles 和 lytic)的同源性为 75.8%~76.0%,与俄罗斯分离株 EV6-10887-99 和 EV6-14103-00 的同源性为 79.1%~80.7%,与 Echo29 JV-10 的同源性最低,为 72.2%(表 1)。

(3)病毒基因组氨基酸序列分析:Echo6/Henan/116/2008 株病毒基因组编码区全长 6573 bp,编码 2191 个氨基酸。Echo6/Henan/116/2008 株与其他 Echo6 毒株氨基酸同源性比较。Echo6/Henan/116/2008 株编码区序列与 Echo6/Henan/127/2008 的同源性为 99.3%,与基因型 A 株(D'Amori、Charles 和 lytic)的同源性为 77.3%~77.5%,与俄罗斯分离株 EV6-10887-99 和 EV6-14103-00 的同源性为 80.2%~81.6%,与 Echo29 JV-10 的同源性最低,为 74.5%。在结构蛋白 P1 区(包括 VP4、VP2、VP3 和 VP1), Echo6/Henan/116/2008 株与 Echo6/Henan/127/2008 株同源性最高(98.5%~99.5%),与 Echo29 JV-10 的同源性最低(62.7%~74.2%);在非结构蛋白 P2 区, Echo6/Henan/116/2008 株与 Echo6/Henan/127/2008 株同源性最高,为 99.5%,与俄罗斯株 EV6-10887-99 同源性最低,为 76.4%;在非结构蛋白 P3 区, Echo6/Henan/116/2008 株与 Echo6/Henan/127/2008 株同源性最高,为 99.6%,与俄罗斯株 EV6-14103-00 株同源性最低,为 75.6%(表 1)。

(4)病毒基因遗传进化分析:根据 P1 区核苷酸序列构建进化树(图 1)。分析结果显示, Echo6/Henan/116/2008 株、Echo6/Henan/127/2008 株与俄罗斯分离株的亲缘关系相近,与 D'Amori、Charles 和 lytic 的亲缘关系较远,与 Echo29 JV-10 的亲缘关系最远。

3. 讨论:Echo6 感染可引起多种疾病,常见的有病毒性脑炎、上呼吸道感染、胃肠炎和皮疹等^[2-4]。目前福建、安徽、河南等地均有 Echo6 导致的病毒性脑炎的报道^[1]。对河南省

表1 Echo6/Henan/116/2008株与其他Echo6毒株全基因组核苷酸/氨基酸同源性(%)

基因区域	Echo6/Henan/127/2008	D'Amori	Charles	lytic	EV6-10887-99	EV6-14103-00	Echo29 JV-10
5' UTR	99.3	82.8	83.0	82.9	88.6	87.3	81.5
P1	98.9/98.9	73.4/75.2	73.6/75.3	73.4/75.1	88.7/88.7	86.3/86.4	63.5/67.3
VP4	99.5/99.5	73.9/79.1	74.7/79.7	74.7/79.7	86.0/87.1	79.8/82.1	65.3/74.2
VP2	99.2/99.2	73.7/75.7	74.1/76.0	73.7/75.7	89.4/89.5	86.8/87.1	66.0/69.5
VP3	99.2/99.2	73.1/74.8	72.4/73.9	71.9/73.5	87.9/87.6	86.1/86.0	68.3/70.8
VP1	98.5/98.5	72.5/74.3	73.0/74.8	73.0/74.8	88.9/88.9	86.2/86.4	57.6/62.7
P2	99.5/99.5	67.0/77.7	66.6/77.5	66.7/77.5	62.0/76.4	61.9/76.5	67.5/78.5
P3	99.6/99.6	77.8/79.8	77.7/79.7	77.5/79.6	73.5/76.9	71.8/75.6	76.9/79.0
3' UTR	100.0	73.5	71.2	71.2	58.2	77.3	70.0
全基因/CDS	99.3/99.3	76.0/77.5	75.8/77.4	75.8/77.3	80.7/81.6	79.1/80.2	72.2/74.5

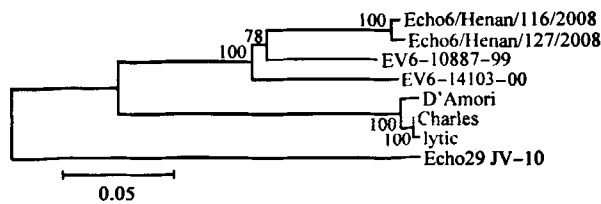


图1 Echo6病毒P1区遗传进化分析

Echo6 脑炎分离株全基因组序列分析发现:其编码区变异基本上为无义突变,核苷酸变化对氨基酸变化没有影响;P1区遗传进化分析表明其与俄罗斯 Echo6 分离株亲缘关系相近,与美国分离株亲缘关系较远,这与 VP1 区遗传进化分析结果一致;VP1 区遗传进化分析结果进一步显示河南分离株与山东分离株同属一个亚型^[1],由于国内目前针对 Echo6 病毒的分子流行病学特征研究尤其是全基因组特征研究甚少,因此河南省 Echo6 脑炎分离株与国内 Echo6 分离株的亲缘关系尚需要进一步的研究验证。

大量研究证据表明,基因重组是目前肠道病毒进化的主要机制^[2],P1 区尤其是 VP1 区基因重组频繁,P2、P3 区也有基因重组发生。河南省 Echo6 脑炎分离株 P1 区和 VP1 区遗传

进化分析结果不完全一致。提示肠道病毒各区进化不同步。本研究为 Echo6 病毒的进一步研究提供了良好的技术基础,丰富了 Echo6 病毒基因库资料。

参 考 文 献

[1] Li XL, Huang XY, Xu BL, et al. Analysis on the gene characteristics of VP1 region in Echo6 strains in Henan, China. Chin J Epidemiol, 2011, 32(4):425-427. (in Chinese)
李幸乐,黄学勇,许汴利,等.病毒性脑炎病例中 Echo6 河南分离株 VP1 基因特征分析.中华流行病学杂志,2011,32(4):425-427.
[2] Ventura KC, Hawkins H, Smith MB, et al. Fatal neonatal echovirus 6 infection: autopsy case report and review of the literature. Mod Pathol, 2001, 14(2):85-90.
[3] Abe O, Kimura H, Minakami H, et al. Outbreak of gastroenteritis caused by echovirus type 6 in an orphanage in Japan. J Infect, 2000, 41(3):285-286.
[4] Santos AP, Russo DH, Machado BC, et al. Echovirus 6 associated with exanthematic disease. Rev Soc Bras Med Trop, 2008, 41(6):672-675.
[5] Oberste MS, Maher K, Pallansch MA. Evidence for frequent recombination within species human enterovirus B based on complete genomic sequences of all thirty-seven serotypes. J Virol, 2004, 78(2):855-867.

(收稿日期:2012-04-12)
(本文编辑:万玉立)

婴幼儿轮状病毒腹泻发病危险因素 1:2 配对病例对照研究

刘海霞 孟蕾 刘新风 于德山 刘建地 杨建军 张静

【关键词】 轮状病毒;危险因素;病例对照研究

A matched case-control study on risk factors of rotavirus diarrhea in young children under five years old in Gansu province LIU Hai-xia¹, MENG Lei¹, LIU Xin-feng¹, YU De-shan¹, LIU Jian-di¹, YANG Jian-jun¹, ZHANG Jing². 1 Gansu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Lanzhou 730000, China; 2 Chinese Center for Disease Control and Prevention Corresponding author: ZHANG Jing, Email: jkccdc@vip.sina.com This work was supported by a grant from the Chinese Center for Disease Control and Prevention (CDC) and Gansu Provincial CDC Project

【Key words】 Rotavirus; Risk factors; Case-control study

WHO 估计全球每年有 453 000 例 5 岁以下儿童因感染

轮状病毒(RV)腹泻而死亡,大部分发生在发展中国家^[1];亚洲 5 岁以下儿童腹泻中 RV 检出率高达 55.0%,我国住院腹泻患儿 RV 检出率为 46.0%,门诊为 29.0%^[2];RV 可通过受污染的手和物品以及呼吸道进行传播^[3]。为此本研究于 2007—2008 年对甘肃省 5 岁以下儿童 RV 腹泻患病的危险因素开展 1:2 配对病例对照研究。

1. 对象与方法:

(1) 研究对象:2007 年 10 月至 2008 年 1 月甘肃省 2 个市级、6 个县级医院 5 岁以下 RV 腹泻住院病例,共 264 例。病例定义:①每日排便≥3 次,且粪便性状有改变;②年龄 0~59 月龄;③ELISA 方法检测 RV 为阳性;④住院时间≥24 h 或在门诊连续≥2 d 补液的急性腹泻儿童。对照组选择与病例组相同年龄段、性别,且在同一医院就诊的非感染性疾病(包括血液病和外伤等)的门诊或住院病例,共 528 例。划分 9 个年龄段:0~2、3~5、6~8、9~11、12~17、18~23、24~35、36~47、48~59 月龄。病例组平均(11.98±5.38)月龄,对照组平

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2012.08.030

作者单位:730000 兰州,甘肃省疾病预防控制中心急性传染病预防科(刘海霞、孟蕾、刘新风、于德山、刘建地、杨建军);中国疾病预防控制中心(张静)
刘海霞、孟蕾同为第一作者
通信作者:张静, Email:jkccdc@vip.sina.com