

分子生物学方法在儿童流行性感 监测中的应用

朱汝南 钱渊 王芳 刘成贵

【摘要】 目的 建立一种能够快速、特异、有效地直接从临床标本中检测流行性感(流感)病毒并进行病毒型和亚型鉴别的方法,同时了解近年来北京地区 A₃ 型流感病毒血凝素重链(HA1)区基因的变异特点。方法 根据编码 A、B 型流感病毒膜蛋白 M 基因的核苷酸序列设计两对引物,用于同一逆转录(RT)-PCR 反应中(多重 RT-PCR),根据 A、B 型毒株扩增产物的大小(分别为 506 bp 和 261 bp)鉴别 A、B 型流感病毒。另根据编码 A₁ 和 A₃ 型流感病毒糖蛋白 HA 基因的核苷酸序列设计两对引物,与 B 型 M 基因引物用于同一 RT-PCR 反应中,可区分 A₁、A₃ 或 B 型流感病毒(扩增产物分别为 944 bp、1 072 bp 和 261 bp)。为提高检测临床标本的敏感性,针对 A₁ 和 A₃ 型病毒 HA 基因和 B 型病毒 M 基因又设计了 3 对引物作为外侧引物,进行巢式-PCR 反应。根据第二次 PCR 的扩增产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳中的大小即可确定型别。经 PCR 扩增 1996~2002 年间分离的北京地区 A₃ 型流感病毒株 HA1 区基因,测序并进行序列分析。结果 用上述多重 RT-PCR 鉴定流感病毒分离株 156 株,与血凝抑制试验阳性符合率为 100%。用多重巢式-PCR 检测 92 份已经病毒分离确定为流感的儿科临床呼吸道标本,与病毒分离和血凝抑制试验阳性符合率分别为 76.9%(A₁ 型)、57.1%(A₃ 型)、86.5%(B 型)。对 5 株 1996~2002 年间 A₃ 型分离株 HA1 区基因序列分析结果显示,不同年份的分离株 HA1 区基因具有较高的核苷酸和氨基酸同源性,而且年份越近的毒株之间同源性越高。结论 多重 RT-PCR 和巢式-PCR 可同时检测不同型别的流感病毒,并可直接对临床标本进行检测,为流感监测提供更加快速的新方法。北京地区 A₃ 型流感病毒分离株 HA1 区基因持续不断地发生点突变,糖基化位点不断增多,可能是导致其抗原漂移的原因。

【关键词】 流感病毒;多重逆转录-聚合酶链反应;巢式-聚合酶链反应;序列分析

Application of molecular biological techniques in the surveillance of influenza viruses in infants and young children ZHU Ru-nan, QIAN Yuan, WANG Fang, LIU Cheng-gui. Beijing Municipal Laboratory of Infection and Immunity, Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020, China

【Abstract】 Objective To establish a rapid, specific and effective technique for identifying subtyping A₁, A₃ and B of influenza virus isolates and clinical specimens as well as to analyze the sequences of nucleotides and deduced amino acids of HA1 regions from isolates of influenza virus A₃ isolated from 1996 to 2002. **Methods** Six inner and outer sets of oligonucleotide primers were designed to detect, type and subtype human influenza A and B. The first two corresponding sets differentiate type A and B of matrix(M) gene while, the second two corresponding sets identify the H₁ and H₃ subtypes of type A virus HA gene. To type and subtype influenza viruses in clinical isolates, a mixture of inner primer sets specific for H₁, H₃ and B were used in a single PCR reaction tube. To detect influenza viruses in clinical specimens, a mixture of the outer primer sets were used in a single primary PCR tube, and the inner ones in a single second PCR reaction tube. Amplified products were visualized in 1.2% agarose gel containing ethidium bromide. HA1 regions of hemagglutinin of 5 field strains (H3N2) isolated from 1996 to 2002 in Beijing were amplified by RT-PCR and sequenced directly. **Results** There was 100% correlation between multiplex RT-PCR and culture to type and subtype influenza viruses from clinical isolates. For typing and subtyping, 76.9%, 57.1% and 86.5% were positive for A₁, A₃ and B by multiplex nested-PCR compared with virus isolation on culture, respectively. The sequence data of HA1 of A₃ strains showed that there was a high homology of nucleotide and amino acid, and the closer the date of isolating was, the higher homology showed.

Conclusions Multiplex RT-PCR and nested-PCR for influenza viruses could provide a useful alternative to existing methods of influenza detected and identified from clinical isolate and specimens. There were certain, continuous mutations and increasing glycosylated sites which might cause the antigen drift in the A₃ strains during 1996-2002 in Beijing area.

【Key words】 Influenza virus; Multiplex RT-PCR; Multiplex nested-PCR; Sequence analysis

流行性感冒(流感)病毒是引起急性呼吸道感染的重要病原,它可在短期内突然发生,起病急,蔓延快,往往造成不同程度的流行,甚至造成世界性大流行。在上世纪流感病毒就引起4次世界性大流行,造成相当严重的损失^[1]。儿科呼吸道感染病人的突然大量增加往往是流感流行的晴雨表,因此儿童中的流感监测有着特殊重要的意义。要及时预测和控制流感的流行,必须有快速、准确的鉴定和分析流感抗原变异的方法。因此,本研究室多年来在利用经典病毒学方法(病毒分离和血凝(HA)试验)对儿童中流感流行情况进行监测的同时,还建立了分子生物学方法检测和鉴定流感病毒,并对近年A₃型流感病毒分离株的血凝素基因进行了序列分析。

材料与方法

一、材料

1. 标本和毒株来源:1996年11月至2001年12月从首都儿科研究所附属儿童医院门诊、急诊收集上呼吸道感染、发热38℃以上就诊患儿咽拭子标本进行流感病毒分离。流感病毒分离株为我所历年进行流感监测分离到的病毒。

2. 引物:①用于分离株cDNA合成和PCR扩增的引物由美国疾病预防控制中心(CDC)WHO流感中心提供,或根据序列自行设计,见表1和表2。针对A、B型流感病毒结构蛋白M基因的引物,分别

扩增506 bp(A型)和261 bp(B型)片段,可同时鉴别A、B型病毒;针对A₁、A₃型流感病毒表面糖蛋白血凝素HA基因的引物,可分别扩增944 bp和1 072 bp,与针对B型M基因的引物一起使用,可鉴别A₁、A₃和B型病毒;②为检测临床标本中的流感病毒,根据A₁、A₃型HA基因和B型M基因另设计合成了3对引物,作为第一次PCR扩增的外侧引物,上述3对用于检测分离株的相应引物作为第二次PCR扩增的内侧引物,扩增产物大小同上,分别为944 bp(A₁型)、1 072 bp(A₃型)和261 bp(B型)。

3. 试剂:①RNA尿素提取液,见参考文献[2];②逆转录酶(M-MLV),200 U/μl(GIBICO公司);Taq酶,5 U/μl(上海生物工程公司);③Oligo d(T)₁₈,40 ng/μl;Rnasin,40 U/μl(华美公司)。

二、方法

1. 病毒分离和鉴定:处理后的标本接种MDCK细胞,常规方法观察病变,于第3~6天连续做HA试验。HA试验阳性者进一步用血凝抑制(HI)试验进行型别鉴定。特异性血清由美国CDC WHO流感中心提供,包括抗A/悉尼/05/97(H3N2)、A/北京/262/95(H1N1)、B/北京/184/93、B/北京/243/97血清。

2. RNA提取:取150 μl病毒培养液或标本液,加入等量尿素提取液提取RNA,酚-氯仿抽提,乙醇沉淀后用20 μl焦炭酸二乙酯处理的H₂O溶解RNA,见文献[2]。

表1 流感病毒分离株及标本分型引物

外侧引物				内侧引物			
序号	序列	位置	片段长度(bp)	序号	序列	位置	片段长度(bp)
AMA*	5' <i>cgg gga att cag caa aag ca</i> 3'	1~10	1 027	AMC*	5' att tgt gtt cac gct cac cg 3'	204~223	506
AMB*	5' <i>cgg gga att cag tag aaa caa</i> 3'	1 017~1 027		AMD*	5' acc agc act gga gct agg at 3'	690~709	
BMA*	5' agc aga agc agg cac tt 3'	1~18	1 191	BMC*	5' cgc ctg tt gga gac aca att g 3'	29~49	261
BMB*	5' agt aga aac aac gca ctt 3'	1 174~1 191		BMD*	5' ttg ttc cca ttc ctg aca ggg 3'	269~289	
AH1A	5' cag atg cag aca caa tat gt 3'	76~95	1 015	AH1C	5' ata ggc tac cat gcg aac aa 3'	95~114	944
AH1B	5' aaa ccg gca atg gct cca aa 3'	1 071~1 090		AH1D	5' ctt agt cct gta acc atc ct 3'	1 014~1 038	
AH3A	5' <i>gcg gga gct cat ga a gac tat cat tgc t</i> 3'	30~47	1 704	AH3C	5' <i>cgg gga gct cac tat cat tgc ttt g</i> 3'	36~50	1 072
AH3B	5' <i>cca ggc atg ctg cac tca aat gca at</i> 3'	1 717~1 733		AH3D	5' <i>tac tgg cat gcc tgc gat tgc gcc gaa t</i> 3'	1 070~1 087	

注:AM针对A型流感病毒M基因设计的引物;BM针对B型流感病毒M基因设计的引物;AH1针对A₁型流感病毒HA基因设计的引物;AH3针对A₃型流感病毒HA基因设计的引物;*为自行设计的引物,其余引物为美国CDC WHO流感中心提供;斜体字母为酶切位点

表2 A₃型流感病毒 HA 测序引物

序号	序列	位置
AH3FA	5' act atc att gct ttg 3'	+ 36 ~ + 50
AH3RB	5' tgg cat agt cac gtt cag 3'	- 567 ~ - 584
AH3RC	5' cag tat gtc tcc egg ttt 3'	- 760 ~ - 777
AH3RD	5' ctg cga ttg cgc cga at 3'	- 1 070 ~ - 1 087

注:以上引物均为美国 CDC WHO 流感中心提供

3. cDNA 合成:①鉴定流感病毒分离株:取 5 μl 上述方法提取的核酸加入 40 ng Oligo d(T)₈。70℃ 孵育 5 min。室温渐冷后加入 5 × buffer 3.75 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L dNTPs, 5 U RNasin, 200 U M-MLV, 总反应体积为 20 μl, 37℃ 孵育 1 h。②检测标本中的流感病毒:同时使用 A₁、A₃ 和 B 型流感病毒 3' 端特异性引物 AH1A、AH3A 和 BMA 合成 cDNA, 反应条件同上。

4. 多重 RT-PCR 鉴定流感病毒型和亚型:取上述 cDNA 合成反应液 2 μl 加入 48 μl PCR 反应液中, 包括 10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTPs, 1.5 U Taq 酶, 0.5 μmol/L 各内侧引物。PCR 反应条件为 94℃ 1 min, 45℃ 1 min, 72℃ 90 s, 扩增 30 个循环。

5. 多重巢式-PCR 检测标本中流感病毒:从标本提取的 RNA 经 cDNA 合成后, 进行两次 PCR。第一次 PCR 使用针对各基因的外侧引物, 第二次使用相应的内侧引物进行扩增;取 2 μl cDNA 进行第一次 PCR 反应, 取 5 μl 第一次 PCR 产物进行第二次 PCR 反应。第一次 PCR 反应条件为:94℃ 1 min, 45℃ 1 min, 72℃ 90 s, 扩增 30 个循环, 第二次反应退火温度为 50℃, 其余条件同第一次 PCR。

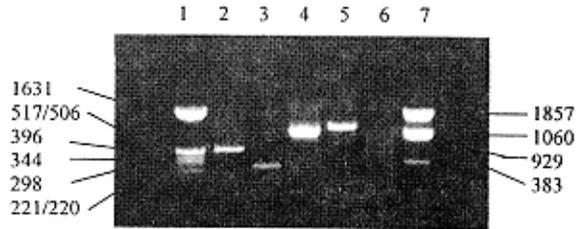
6. 核苷酸序列测定和序列分析:在朝阳医院基础研究中心使用 PE TECHNE 公司的 ABI373 型 DNA 测序仪进行测序。序列比较分析使用 Blast 2.0 在 GeneBank 中进行核苷酸及推导的氨基酸比较, 同时使用了 Dnasis 和 Clustalx 软件。参考株 A/南昌/933/95(H3N2) A/悉尼/05/97(H3N2) 的核苷酸与推导的氨基酸序列分别来自 Genebank 和美国 CDC。A/南昌/933/95 序列与 A/武汉/353/95(H3N2) 相同, A/武汉/353/95(H3N2) 和 A/悉尼/05/97(H3N2) 为 WHO 推荐的疫苗株。

结 果

1. 病毒分离和鉴定:从 1996 年开始进行流感病毒分离, 发现在大多数年份一个流行季节中往往

A₁、A₃ 和 B 型病毒都能分离到, 但是 1998 ~ 1999 年流行季节中分离到的毒株全部为 A₃ 型, 1999 ~ 2000 年则以 B 型为主。

2. 用 RT-PCR 对毒株分型鉴定:针对 M、HA 基因使用混合引物进行多重 RT-PCR, 对 1996 ~ 2001 年间 156 株流感病毒分离株(A₁ 型 25 株, A₃ 型 71 株和 B 型 60 株)进行型和亚型鉴定, 均能扩增与预期大小相符的片段, 与血凝抑制试验阳性符合率均为 100%。图 1 为多重 RT-PCR 对流感病毒各型别特异性扩增的结果。



1. PBR322/Hinf I; 2. A₃ 型流感病毒产生 506 bp 的扩增产物; 3. B 型流感病毒产生 261 bp 的扩增产物; 4. A₁ 型流感病毒产生 944 bp 的扩增产物; 5. A₃ 型流感病毒产生 1 072 bp 的扩增产物; 6. 未经感染的 MDCK 细胞对照; 7. PBR322/BstN I

图1 多重 RT-PCR 对流感病毒进行型别鉴定

3. 用巢式-PCR 对标本中的流感病毒分型鉴定:取冻存 - 70℃ 或新鲜采集的标本, 提取 RNA, 经 cDNA 合成后, 使用混合引物对 1996 ~ 2001 年间 92 份含 A₁、A₃ 和 B 型流感病毒的临床标本进行检测, 结果见表 3。检测结果与病毒分离阳性符合率分别为 76.9%(A₁ 型), 57.1%(A₃ 型), 86.5%(B 型)。

表3 多重巢式-PCR 与病毒分离和 HI 试验检测临床标本中流感病毒比较

流感病毒型别	分离株数	多重巢式-PCR 阳性株数
A ₁	13	10(76.9)
A ₃	42	24(57.1)
B	37	32(86.5)

注:括号内数字为阳性符合率(%)

4. 1996 ~ 2002 年北京地区 A₃ 型流感病毒分离株血凝素重链(HA1)区序列分析:1996 ~ 1997、1998 ~ 1999、1999 ~ 2000、2000 ~ 2001、2001 ~ 2002 年间各选取一株 A₃ 型流感病毒分离株, 通过对 PCR 扩增产物进行 HA1 区基因序列测定。5 株分离株的核苷酸和推导的氨基酸序列同源性比较见表 4。以 A/南昌/933/95(H3N2) 和 A/悉尼/05/97(H3N2) 为参考病毒株。测定结果, 所测北京地区的 5 株毒株的 HA1 区基因核苷酸序列长度均为 987 bp, 它们相互间共发生了 64 个位点核苷酸替换, 突变率为

6.5% ,其中 47 个发生在嘧啶碱与嘧啶碱和嘌呤碱与嘌呤碱之间的相互转换。不同年份的分离株 HA1 区基因之间具有较高的核苷酸同源性(96.0% ~ 98.9%) ,而且年份越近的毒株之间的同源性越高。

从核苷酸序列推导出的氨基酸序列比较可以看出 HA1 区均为 329 个氨基酸(图 2)。所测毒株的 HA1 蛋白分子之间的氨基酸同源性为 93.3% ~ 98.2% ,共发生了 30 个位点的氨基酸改变 ,表明 HA1 区基因中大多数核苷酸位点的替换为无效突变 ;同时所有半胱氨酸均未发生改变 ,说明不同毒株的 HA1 蛋白分子上的二硫键均相同 ;A/南昌/933/95(H3N2)病毒株 HA1 蛋白分子上共有 8 个糖基化位点(8 22 38 63 126 165 246 和 285 位点) ,而我们所测毒株在 122 和 133 位点多多了两个糖基化位点 ,分别位于抗原决定簇 A 区和受体结合位点前壁。自 1998 年后毒株又在 144 位点多了一个糖基化位点 ,位于抗原决定簇 A 区。30 个位点的氨基酸改变中大多数发生在抗原决定簇 ,共有 14 个发生在 A 和

B 区。其中较为一致的突变位于 122 ,124 ,133 ,142 , 144 ,156 ,158 ,190 ,192 ,196 ,226。可以看出每年的毒株都与前一年的毒株存在着一定的氨基酸差异 ,而且位于抗原决定簇或受体结合位点周围 ,这种变异可能导致病毒抗原性漂移。

表4 1996 ~ 2002 年北京地区 A₃ 型流感病毒分离株血凝素 HA1 区核苷酸和氨基酸的同源性比较

	Nan	X5	Syd	M339	W3	H188	Hh782
Nan		97.0	95.7	95.4	94.8	94.0	93.3
X5	98.4		96.0	96.0	95.4	94.5	94.2
Syd	98.0	98.4		97.6	96.7	95.1	95.1
M339	97.7	98.1	98.9		97.6	95.7	96.4
W3	96.5	96.9	97.7	97.9		97.0	98.2
H188	96.4	96.8	97.6	97.6	98.4		98.2
Hh782	96.0	96.5	97.3	97.3	98.2	98.5	

注 :Nan :A/南昌/933/95(H3N2) ;X5 :1996 ~ 1997 年分离株 ;Syd :A/悉尼/05/97(H3N2) ;M339 :1998 ~ 1999 年分离株 ;W3 :1999 ~ 2000 年分离株 ;H188 :2000 ~ 2001 年分离株 ;Hh782 :2001 ~ 2002 年分离株 ;黑体字为核苷酸序列同源性百分比(%) ,白体字为氨基酸同源性百分比(%)

Nan	10	20	30	40	50	60
X5	QKLPGNDS	ATLCLGHHAV	PNGTLVKTIT	NDQIEVTNAT	ELVQSSSTGR	ICDSPHRILD
Syd97	-I-					
M339				S		K
W3-1						Q
H188						G
Hh782						G
Nan						120
X5	GKNC TLIDAL	LGDPHCDGFG	NKEWDLFVER	SKAYSNCYPY	DVPDYASLRS	LVASSGTLEF
Syd97	-E-					
M339	-E-					
W3-1	-E-					
H188	-E-L-					
Hh782	-E-		-K-			
Nan						180
X5	TNEGFWITGV	AQDGTSYACK	RGSVKSFFSR	LNWLHKLEYK	YPALNVTMPN	NDKFDKLYIW
Syd97	N-S	S-N	R			
M339	N-S	N	S-I	Q-K		
W3-1	N-S	N-F	R-I	Q-K		
H188	N-S	N-S	R-N	Q-K		E
Hh782	N-S	N-S	R-N	Q-K		E
Nan						240
X5	GVHHPSTDSV	QTSLYVQASG	RVTVSTKRSQ	QTVIPNIGSR	PWVRGISSRI	SIYWTLVKPG
Syd97	I-D	I-A			V	H
M339	D	A			V	
W3-1	D	I-A			V	
H188	D	I-A		S	DV	
Hh782	G-D	I-A	I		R-DV	
Nan						300
X5	DILLINSTGN	L IAPRGYFKI	RS GKSSIMRS	DAPIGNCNSE	CITPNGSIPN	DKPFQNVNRI
Syd97				D		
M339				K		
W3-1				K		
H188				K		
Hh782				K		
Nan						329
X5	TYGACPRYVK	QNTLKIATGM	RNVPEKQTR			
Syd97						
M339						
W3-1						
H188						
Hh782						

Nan :A/南昌/933/95(H3N2) ;X5 :1996 ~ 1997 年分离株 ;Syd :A/悉尼/05/97(H3N2) ;M339 :1998 ~ 1999 年分离株 ;W3 :1999 ~ 2000 年分离株 ;H188 :2000 ~ 2001 年分离株 ;Hh782 :2001 ~ 2002 年分离株

图2 1996 ~ 2002 年北京地区流感病毒分离株 HA1 区推导的氨基酸序列比较

讨 论

WHO已在1947年建立了全球流感监测网,了解流感流行情况,以便及时发现并证实新的变异株,确保流感疫苗的针对性。本研究室对儿科病人中流感病毒的流行进行监测,以往通常使用经典病毒学方法(病毒分离、HA及HI试验),可以准确地鉴定出流行毒株的型别。但是如果病毒抗原发生较大变异或相应的特异性血清供应不足时,就会影响对毒株的鉴别,而且经典方法费时,出结果较慢。因此,我们建立了多重RT-PCR、巢式-PCR方法对流感病毒分离株进行型别鉴定,也可用以对临床标本直接进行检测,更加快速地确定流行毒株的型别。

通过多重RT-PCR方法同时鉴定流感病毒分离株型别,避免了分别进行PCR的繁琐,特异性好,与病毒分离和HI试验阳性符合率达100%^[3,4]。此方法稳定可靠,可与病毒分离相互验证,及时提供流行毒株的资料,还可对一些血凝阳性但滴度不高无法用HI试验鉴定的毒株进行鉴定,排除其他血凝阳性但非流感病毒感染的可能性。

巢式-PCR方法对临床标本中的流感病毒鉴定型别,经两次PCR可检测到标本中少量的病毒。实验结果表明,与病毒分离和HI试验相比阳性符合率略低。分析可能原因:①标本中病毒含量过少。我们使用1/4提取的RNA进行cDNA合成,再使用1/10 cDNA合成液进行PCR扩增,如果病毒含量过少可能会影响扩增结果;②本试验所检测的历年收集的临床标本为-70℃冻存几个月至几年不等,其间经几次冻融,病毒核酸有可能降解;③巢式-PCR方法将各型别引物同时加入一个反应管中进行扩增,反应混合液的pH值、Mg⁺⁺浓度、引物浓度等都有可能影响到对其中某一型别病毒的检测,导致灵敏度降低。目前,我们正在从以上几方面对试验条件进行优化,力求提高对临床标本的检测灵敏度。

巢式-PCR作为一种敏感、快速的检测方法可同时从临床标本中检出A₁、A₃和B型流感病毒,为临床诊断和治疗提供依据,并为临床治疗赢得宝贵时间。

流感流行至今仍未得到很好的控制,主要原因在于流感病毒的抗原性尤其是HA的抗原性经常不断地发生变异。目前已知A₃型流感病毒毒粒的HA蛋白分子上至少有5个抗原决定簇(A、B、C、D和E),且都位于HA蛋白分子的HA1区,其中A和B

区最为重要。因此,HA1的氨基酸序列的改变常与流感病毒血凝素抗原性变异密切相关,有时也会造成病毒宿主范围的变化。从我们对1996~2002年间A₃型流感病毒血凝素基因HA1区序列分析比较结果显示,不同年份的分离株HA1区基因之间虽然具有较高的核苷酸和氨基酸同源性,而且年份越近的毒株之间同源性越高,但是HA1区的核苷酸在持续不断地、快速地发生点突变,氨基酸的改变多数位于抗原决定簇A、B区或受体结合位点,提示流感病毒的抗原漂移可能主要受人群免疫压力的影响。所有毒株的HA1区基因的半胱氨酸和脯氨酸均相同,说明它们在HA分子二级结构和维持HA蛋白三维结构中起重要作用。与A/南昌/933/95(H3N2)相比,糖基化位点逐渐增多,增加的糖链可能会影响蛋白的抗原特性以及宿主CD4⁺细胞对HA分子的识别^[5,6]。北京地区在1998年冬季曾出现了一次较大规模的A₃型流感病毒流行,本研究室自门诊标本中分离到的病毒均为A₃型^[7]。我们报道了对3株分离株HA1区核苷酸和氨基酸序列的分析结果,可以看出此次流行的病毒与当时的疫苗株A/悉尼/05/97(H3N2)同源性很高。与A/南昌/933/95(H3N2)相比,除了与A/悉尼/05/97(H3N2)一样在抗原决定簇区出现了一致的氨基酸突变和糖链增加外,还在位于受体结合位点区第226位发生了氨基酸突变,这些有可能导致了此次流行毒株的抗原漂移,使人群已有的免疫力无法起到保护作用^[8],因而使此次A₃型流感流行较往年范围大。

据分子流行病学资料显示,A₃型流感病毒的HA1蛋白编码区变异频率远远高于病毒的其他蛋白。抗原漂移是流感流行的预兆,A₃型病毒每隔数年就会发生一次较明显的抗原性漂移,因此密切监测HA1区基因变异情况将对于流感的预防、疫苗的筛选起到重要作用。

参 考 文 献

- 1 Lamb R, Krug RM. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: Fields BN, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott, 2001. 1487-1532.
- 2 Cane PA, Pringle CR. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus: rapid identification of subgroup A lineages. J Virol Meth, 1992, 40: 297-306.
- 3 朱汝南, 钱渊, 刘成贵, 等. 用逆转录聚合酶链反应鉴别甲型和乙型流感病毒感染. 中华儿科杂志, 2000, 38: 537-540.
- 4 Atmar RL, Baxter BD. Typing and subtyping clinical isolates of influenza virus using reverse transcription-polymerase chain reaction. Clinical and Diagnostic Virology, 1996, 7: 77-84.
- 5 Ludwig S, Pleschka S, Wolff T. A fatal relationship-influenza virus interactions with the host cell. Viral Immunol, 1999, 12: 175-196.

6 Cox N, Subbarao K. Influenza. *Lancet*, 1999, 354:7277-7282.
 7 刘成贵, 朱汝南, 万里涛, 等. 1998 ~ 1999 年北京地区流感病毒血凝素基因分析. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2000, 20:285-288.
 8 Vines A, Well K, Matrosovich M, et al. The role of influenza A virus

hemagglutinin resides 226 and 228 in receptor specificity and host range restriction. *J Virol*, 1998, 72:7626-7631.
 (收稿日期: 2002-08-27)
 (本文编辑: 张林东)

· 疾病控制 ·

深圳地区 1999 年手足口病患儿中肠道病毒 71 型的监测

何雅青 杨洪 严志平 张顺祥 何建凡

世界上许多国家和地区相继报道了肠道病毒 71 型 (enterovirus type 71, EV71) 的流行^[1-3]。目前已知 EV71 的感染可导致手足口病, 无菌性脑膜炎、脑炎和脊髓灰质炎样的麻痹性疾病等多种与神经系统相关的疾病。我们于 1999 年对深圳地区出现手足口病病例进行了 EV71 的监测, 结果报告如下。

1. 材料与方 法: 1999 年 1 ~ 8 月收集深圳市手足口病患儿粪便标本 51 份, 保存于 - 80℃。EV71 的标准毒株采用 EV71-SHZH98, 其全基因组已提交国际核酸与蛋白数据库 (GenBank, 接收号码为 AF302996)。病毒 RNA 的提取使用宝灵曼 High Pure Viral RNA 试剂盒, 取 200 μl 粪便上清或组织培养上清加入 400 μl 结合液, 混合均匀, 加入纯化过滤管中, 10 000 r/min 15 s; 弃去过滤液换一新的收集管, 加入 450 μl 洗液, 10 000 r/min 15 s; 重洗 1 次; 最后离心, 13 000 r/min 10 s, 弃去残余的洗液, 去掉收集管, 换一个干净的无 RNA 的 1.5 ml Eppendorf 离心管, 用 20 μl 洗脱液加入过滤管中, 1 000 r/min 离心 1 min, 将提取的 RNA 移到一个新的离心管中。RT-PCR 是利用一个共用的上游和两个不同的下游 EV71 病毒特异性引物, 序列分别为 5'-AAGGGCTGCTACTGCTACTGGAAGTTC-3'; 5'-TGACAGAAACCGGAGTCTTTG-3' 和 5'-GGCACTGTGTCATATATGCG-3'^[4]。以病毒 RNA 为模板, 在逆转录酶和 Taq DNA 聚合酶 (均为 Boehringer Mannheim 公司产品) 进行 RT-PCR 反应。反应条件为 94℃ 40 s, 50℃ 40 s, 72℃ 40 s, 40 个循环, 72℃ 延伸 10 min。

2. 结果和分析:

(1) EV71 的检测: 以 EV71-SHZH98 作为标准对照, 用 RT-PCR 法扩增 51 份粪便标本的核酸样品, 结果有 21 份样品分别扩增出长度为 360 和 328 个碱基对的片段, 阳性率为 41.18%。

(2) EV71 的监测: 1999 年深圳市 6 个区均有手足口病的病例报告。对收到 51 份患儿样本进行 EV71 监测, 共检出阳性标本 21 份。从罗湖区的 30 例患儿中检出阳性者 12 例, 南山区 15 例患儿有 9 例 EV71 阳性, 说明在罗湖区和南山区均出现 EV71 的流行。

洪、张顺祥、何建凡) 南山区卫生防疫站 (严志平)

(3) 不同月份 EV71 的检测情况: 1 月份 3 例和 2 月份 1 例手足口病患儿均未发现 EV71 阳性, 2 月份 1 例手足口病患儿 5 月份共监测 9 例手足口病患儿, 其中 4 例为 EV71 阳性; 6 月份有 30 例患儿, 其中 EV71 阳性者 12 例, 7 月份 4 例中有 2 例为 EV71 阳性, 8 月份 4 例患儿有 3 例 EV71 阳性。

(4) 不同年龄、性别儿童 EV71 感染情况: 0 岁组的 3 例手足口病患儿中有 2 例是 EV71 感染, 1 岁组的 4 例手足口病患儿中有 1 例是 EV71 感染, 2 岁组患儿中有 4 例是 EV71 感染, 3 岁组患儿中有 6 例是 EV71 感染, 4 岁组的 12 例患儿中有 4 例是 EV71 感染, 5 岁组的 12 例手足口病患儿中有 4 例是 EV71 感染。从不同年龄组儿童的 EV71 感染情况可以看出, 51 例手足口病患儿主要是 5 岁以下的儿童, 且 EV71 感染率较高, 为 43.59% (17/39), 说明 5 岁以下的儿童是 EV71 感染的高危人群。不同性别间 EV71 感染率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

手足口病可由 EV71 感染所致, 也可由柯萨奇病毒 5、10 和 16 型等其他肠道病毒感染引起。1999 年对深圳地区出现的手足口病病例进行了 EV71 的监测, 结果发现感染率为 41.18%, 说明 EV71 是引起深圳地区儿童手足口病的主要病原。1999 年深圳地区从 5 月份开始出现手足口病病例, 6 月份达到高峰, 7 月份开始下降。在深圳罗湖区和南山区均出现 EV71 的流行。监测结果还表明, 5 岁以下的儿童是 EV71 感染的高危人群, 手足口病患儿中 EV71 的感染率为 43.59%。近年来, 亚洲地区相继爆发 EV71 的流行, 因此, 很有必要加强手足口病的监测, 掌握其流行规律。

参 考 文 献

1 Schmidt NJ, Lennette EH, Ho HH. An apparently new enterovirus isolated from patients with disease of the central nervous system. *J Infect Dis*, 1974, 129:304-309.
 2 Lum LCS, Wang KT, Lam SK, et al. Fatal enterovirus 71 encephalomyelitis. *J Pediatr*, 1998, 133:795-798.
 3 何雅青, 杨帆, 李良成, 等. 我国深圳地区手足口病患者肠道病毒 71 型的分离与鉴定. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1999, 13:83-84.
 4 杨帆, 金奇, 何雅青, 等. 肠道病毒 71 型中国分离株全基因组核苷酸序列分析. *中国科学*, 2001, 31:163-167.

(收稿日期: 2002-04-22)
 (本文编辑: 张林东)