

· 实验研究 ·

苏北地区 2003 年病毒性脑膜炎爆发病原分离株 Echo30 的序列分析

赵雅男 姜庆五 姜仁杰 沈进进 陈胤忠 汪华

【摘要】 目的 测定 2003 年苏北地区无菌性脑膜炎爆发的病毒分离株部分基因序列,了解该流行株的分子生物学特点及遗传变异规律。方法 随机选取 3 株分离的病毒株,用能特异性扩增肠道病毒 VP1 区 3' 段序列的两对引物 012/011、040/011 进行逆转录聚合酶链反应,扩增产物经凝胶纯化后测序。将序列输入 GenBank 用 BLAST 程序进行核苷酸和氨基酸序列比对;选取部分肠道病毒序列,经 CLUSTALX 1.83 对齐后,在 PHYLIP 3.5c 中构建进化树,了解分离毒株 Echo30 的进化关系。结果 3 株病毒测序结果均为 Echo30 型肠道病毒。进化树分析显示分离的 Echo30 毒株与国外 1999 年和 2000 年分离株的亲缘关系最近;但 3 株分离株自成一簇,与国外毒株存在地区差别。结论 利用 VP1 区 3' 段序列可以快速正确区分肠道病毒分离株的型别,分离株与国外同型流行株在比较区段的遗传变异规律类似。

【关键词】 肠道病毒; Echo30; 序列分析

Sequence analysis of Echovirus type 30 isolated from an aseptic meningitis outbreak in northern Jiangsu province in 2003 ZHAO Ya-nan*, JIANG Qing-wu, JIANG Ren-jie, SHEN Jin-jin, CHEN Yin-zhong, WANG Hua. *Key Laboratory of Public Health Safety, Ministry of Education, School of Public Health, Fudan University, Shanghai 200032, China

Corresponding author: JIANG Qing-wu, Email: qwjiang@shmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To determine the partial sequence of virus strains causing an aseptic meningitis outbreak in northern part of Jiangsu province in 2003 and to compare them with the same serotype strains isolated in other countries to better understand its genetic characteristics and hereditary trend of development. **Methods** Virus RNA was amplified using two sets of specific enteroviral 3' half of VP1 primers 012/011 and 040/011. Polymerase chain reaction (PCR) products were purified and sequenced. BLAST program was then used to perform on nucleotide and amino acid pairwise-alignment with all available sequences in NCBI database. Phylogenetic trees were drawn to compare with other enteroviral sequences using PHYLIP software. **Results** Under BLAST program, three sequences we submitted to GenBank were identically inferred as echovirus type 30, which had been identified by neutralization test in previous study. Phylogenetic analysis demonstrated that strains isolated from this outbreak were aggregated into a cluster, and the closest relationships with them were those isolated in 1999 and 2000. This phenomenon indicated that Echo30 from this outbreak was different from other strains in different epidemic area. **Conclusion** 3' half of VP1 sequence could be used to quickly identify the serotype of isolated enterovirus. Strains isolated from this outbreak had the similar hereditary developing trend comparing with Echo30 strains isolated from other countries.

【Key words】 Enterovirus; Echovirus 30; Sequence analysis

我国江苏省北部地区(苏北)在 2003 年 1—7 月爆发了较大规模的无菌性脑膜炎,涉及范围之广、发病人数之多,在国内较少见。经及时采取措施,控制了脑膜炎的疫情,并在流行期间采取了部分患者

的脑脊液(CSF)和粪便标本;经过病毒分离和初步鉴定,目前本实验室已从患者的 CSF 中分离出多株相同性质的病毒,血清学鉴定为 Echo30 型肠道病毒。这是首次分离到此次脑膜炎爆发的病因病毒。Echo30 是近 20 年来肠道病毒所致无菌性脑膜炎流行的主要病原之一^[1],但我国对于从脑膜炎流行中分离出 Echo30 的报道较少,相关的生物学信息更少。本研究在明确此次脑膜炎爆发病原的基础上,

作者单位:200032 上海,复旦大学公共卫生学院教育部公共卫生安全重点实验室(赵雅男、姜庆五);江苏省盐城市疾病预防控制中心(姜仁杰、沈进进、陈胤忠);江苏省疾病预防控制中心(汪华)

通讯作者:姜庆五,Email:qwjiang@shmu.edu.cn

随机挑选本次分离病毒中的 3 株进行了 VP1 区 3' 段序列的测定和分析,以深入了解其分子生物学特点,分析基因变异规律,探讨我国的 Echo30 流行株与国外流行株之间的区别和联系。

材料与方 法

1. 病毒来源:选取苏北地区脑膜炎患者脑脊液标本中分离到的 Echo30 病毒中的 3 株,编号分别为 FDJS03_30、FDJS03_73、FDJS03_102。3 株病毒均由 MRC-5(人胚肺成纤维细胞)分离得到,并经中和试验(KMB 组合血清及单价抗血清)鉴定为 Echo30 (其结果另文报道)。

2. 病毒 RNA 的提取:参照文献[2]的方法,取病毒的细胞培养上清液 200 μl,用 Trizol 提取 RNA,并经异丙醇沉淀、75% 乙醇洗涤后,溶于 20 μl 经 DEPC 处理的水中。-80℃ 保存。

3. VP1 区 3' 段序列的合成:参照文献[3]的方法,用随机六聚寡核苷酸(random hexamer)为引物进行逆转录(RT)反应,将 RNA 逆转录成 cDNA。经两对肠道病毒通用引物进行聚合酶链反应(PCR)扩增,证实得到的 cDNA 确实为肠道病毒基因序列(此处未显示该数据资料);继而用两对简并引物^[4](012 5'-ATGTAYGTICCCICGIGG-3'、040 5'-ATGTAYRTICCIMCIGGIGC-3'、011 5'-GCICCI GAYTGITGICCRAA-3')进行 PCR,得到长度约 450 bp、含 VP1 区 3' 段及 2A 区 5' 末端的核酸片段。PCR 反应条件为:012/011 94℃ 5 min; 94℃ 30 s,53℃ 30 s,72℃ 30 s,72℃ 7 min。040/011 仅将退火温度改为 51℃,其他条件与上述相同。

4. DNA 序列测定和分析:两对 VP1 段引物 RT-PCR 后的产物经上海博亚生物技术有限公司提供的琼脂糖凝胶回收系统回收纯化后,在 ABI3730 型 DNA 序列自动分析仪上进行序列测定。序列结果输入 GenBank 用 BLAST 程序进行相关序列的比较,并用 CLUSTALX 1.83 和 OMIGA 2.0 处理序列,PHYLIIP 3.5c 进行进化树分析。研究中采用的肠道病毒参比序列均取自 GenBank 数据库。

结 果

1. 病毒 VP1 区 3' 段核苷酸同源性比较:测序后得到 3 条长 425 bp 的核苷酸序列(已输入 GenBank,序列号分别为 AY603474、AY601757、AY601758),用 BLAST 程序将得到的核苷酸序列输入 NCBI 的

GenBank 数据库中进行相关序列的查找和比对,结果与分离毒株具有较高同源性的全是 Echo30 型肠道病毒,同中和试验结果一致。其中与此次脑膜炎病病毒 VP1 区 3' 段序列同源性最高(同源性在 95%~98%)的 5 株 Echo30 病毒分别来自罗马尼亚、乌克兰及前苏联部分地区(表 1)。此次测序的 3 株病毒两两间仅有 1~2 个碱基的差别(图 1),同源性高达 99.5%,证明 3 株分离病毒属于同一型,且来源相同。用 BLAST2 程序分别比较 3 株病毒的测定序列与 Echo30 原型株(prototype)Bastianni 株的 VP1 区核苷酸序列,它们与原型株的同源性均为 84%。

FDJS03-30 TTATGTACGTGCCCGCGGGGGTCCAACTCCCTAAAGTTATGAGGATTCGCATGCGAGACGTCCACTAAACCCAA 75
FDJS03-73 TTATGTACGTGCCCGCGGGGGTCCAACTCCCTAAAGTTATGAGGATTCGCATGCGAGACGTCCACTAAACCCAA 75
FDJS03-102 TTATGTACGTGCCCGCGGGGGTCCAACTCCCTAAAGTTATGAGGATTCGCATGCGAGACGTCCACTAAACCCAA 75

FDJS03-30 GCGTATTCTGGACGGAGGGTAATGCCCGCCAGGATTCGATACATTATGAGCGTGGTAAACGCATACTGCA 150
FDJS03-73 GCGTATTCTGGACGGAGGGTAATGCCCGCCAGGATTCGATACATTATGAGCGTGGTAAACGCATACTGCA 150
FDJS03-102 GCGTATTCTGGACGGAGGGTAATGCCCGCCAGGATTCGATACATTATGAGCGTGGTAAACGCATACTGCA 150

FDJS03-30 ACTTCTATGATGGATGGTCTCACTTCAGTCAGAGCGGGCTCTATGGATATACCACTTGAACAACATGGGTACT 225
FDJS03-73 ACTTCTATGATGGATGGTCTCACTTCAGTCAGAGCGGGCTCTATGGATATACCACTTGAACAACATGGGTACT 225
FDJS03-102 ACTTCTATGATGGATGGTCTCACTTCAGTCAGAGCGGGCTCTATGGATATACCACTTGAACAACATGGGTACT 225

FDJS03-30 TATACTTTAGACATGTGACAAATGCTGCTTACCCAGTCAATGATGTTGCCCGTGTCTACTTTAAACCCAAAC 300
FDJS03-73 TATGTACGTGCCCGCGGGGGTCCAACTCCCTAAAGTTATGAGGACTTCGCATGCGAGACGTCCACTAAACCCAA 300
FDJS03-102 TATGTACGTGCCCGCGGGGGTCCAACTCCCTAAAGTTATGAGGATTCGCATGCGAGACGTCCACTAAACCCAA 300

FDJS03-30 ATGTCAAGGCCCTGGGTGCCCGCGGCCAAGCTTGTGCCGTATTTGTATGCAAGGAATGCACTTTGATGTGC 375
FDJS03-73 ATGTCAAGGCCCTGGGTGCCCGCGGCCAAGCTTGTGCCGTACTTGTATGCAAGGAATGCACTTTGATGTGC 375
FDJS03-102 ATGTCAAGGCCCTGGGTGCCCGCGGCCAAGCTTGTGCCGTATTTGTATGCAAGGAATGCACTTTGATGTGC 375

FDJS03-30 AAGGGGTGACCGAGTCTCGGGACAAAITACTCTTGACCGATCAACCCAT 425
FDJS03-73 AAGGGGTGACCGAGTCTCGGGACAAAITACTCTTGACCGATCAACCCAT 425
FDJS03-102 AAGGGGTGACCGAGTCTCGGGACAAAITACTCTTGACCGATCAACCCAT 425

图1 分离的 3 株病毒 3' 段 VP1 核苷酸序列比较

表1 核苷酸序列同源性比较(以 FDJS03_30 为例)

Table with 3 columns: GenBank 序列号, 同源性(%) (一致数/比较数)*, 病毒株来源. Rows include AJ304441, AY271500, AJ304434, AY271499, AY271501, AF081340.

* 括号内数据均为碱基数

2. VP1 区氨基酸序列同源性比较:通过 BLAST 检索比对,找到分离毒株的读码框位置,用 OMIGA 2.0 软件自动翻译为相应的蛋白质氨基酸序列;重新用 BLAST 程序在 GenBank 中查找比对。发现和 3 株分离病毒同源性最高的几株病毒都是从 1997 年罗马

尼亚脑膜炎爆发中分离到的 Echo30 毒株(表 2),与核苷酸序列比对结果不太一致;本次分析的 3 株分离毒株在测序段的氨基酸序列完全一致,它们与原型株 Bastianni 株相应区段氨基酸的同源性达 96%。

表2 氨基酸序列同源性比较(以 FDJS03_30 为例)

| GenBank 序列号 | 同源性 (%) (一致数/比较数)* | 病毒株来源 |
|-------------|-----------------------|----------------|
| AJ295172 | 99(140/141) | 罗马尼亚(1997 年) |
| AJ295171 | 98(139/141) | 罗马尼亚(1997 年) |
| AJ295185 | 98(139/141) | 罗马尼亚(1997 年) |
| AJ295178 | 98(139/141) | 罗马尼亚(1997 年) |
| AF081340 | 96(136/141) | Bastianni, 原型株 |

* 括号内数据均为氨基酸个数

3. 进化树分析:为了进一步了解此次分离病毒的遗传进化性质及抗原变异情况,我们从 GenBank 下载了部分肠道病毒的核酸序列,经 CLUSTALX 1.83 比序对齐后构建进化树(图 2)。根据树结构,可以将进行比较的所有肠道病毒分为四簇,与目前国际认可的肠道病毒分类^[6]相同;此次分离的病毒株与另一株参比的 Echo30 在同一支上,表明根据 VP1 区 3' 段序列能够将临床分离毒株正确分型。

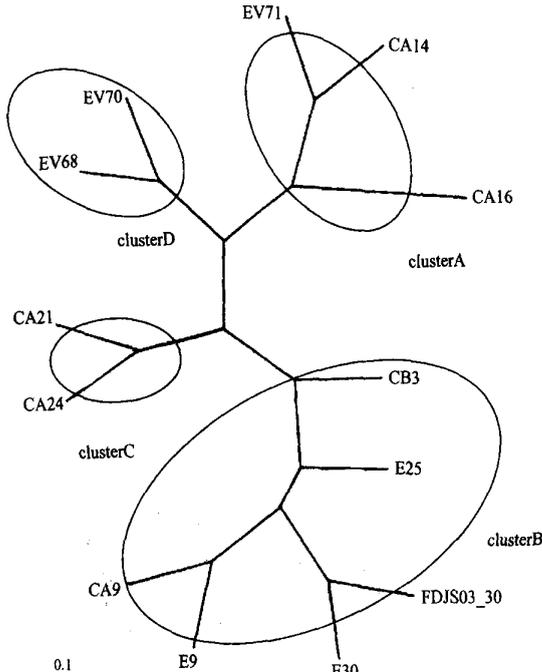


图2 人类肠道病毒部分 VP1 序列进化树分析
PHYLP3.5c, 最大简约性法构建进化树。参比序列 GenBank 序号为: AF081600 (EV71)、AF081597 (CA14)、AF081613 (CA16)、AF081622 (CB3)、AF081615 (E25)、AF081595 (E30)、AF081596 (E9)、AF081607 (CA9)、AF081603 (CA24)、AF081598 (CA21)、AF081348 (EV68)、D17595 (EV70)、FDJS03_30 为分离株

图2 人类肠道病毒部分 VP1 序列进化树分析

参照文献[6]从 GenBank 中选取部分 Echo30 毒株与分离株比较,以阐明本次分离毒株与其他

Echo30 毒株的亲缘关系。用最大简约性法构建的进化树(图 3)表明:3 株分离株位于同一支,再次证明其相同来源;与本次分离株亲缘关系最近的一组 Echo30 病毒分别是 2000 年罗马尼亚的一次脑膜炎流行中分离到的 AJ304441 和 AJ304434,以及乌克兰和乔治亚于 1999 年和 2000 年分离到的毒株 AY271499、AY271500、AY271501。参比的部分美国脑膜炎临床分离毒株大体按照分离年代不同聚集在一起,20 世纪 80 年代分离株 (AF128029、AF128021、AF152880、AF128033)与本次分离株的距离较近,90 年代分离株 (AF081626、AF081609、AF081640、AF081595) 则距离较远;原型株 Bastianni 和本次分离到的 Echo30 毒株距离最远。

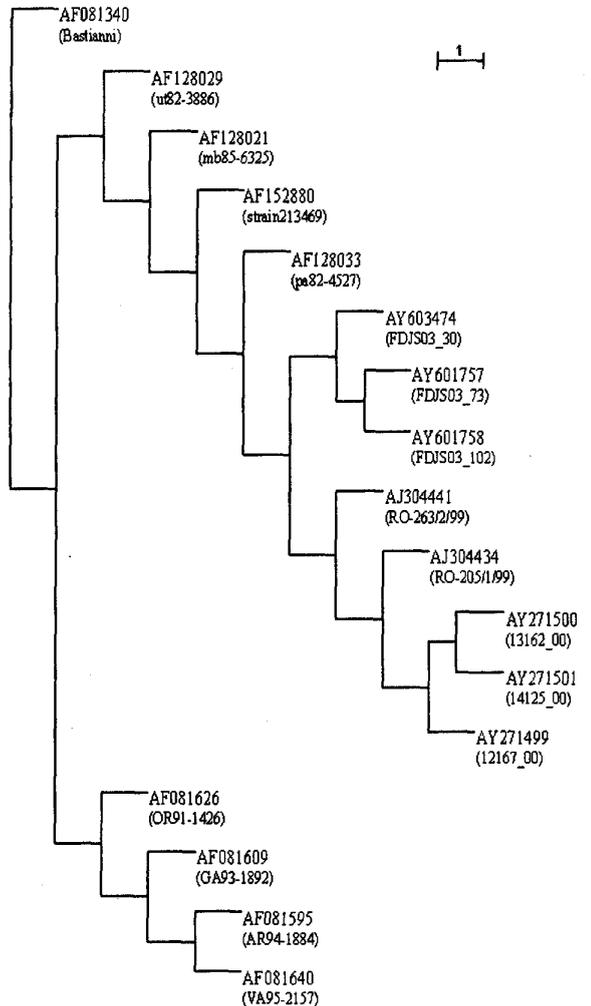


图3 Echo30 分离株部分 VP1 序列的进化树分析
AF081340 为 Echo30 原型株; AF081626、AF081609、AF081640、AF081595 为 90 年代美国分离毒株; AF128029、AF128021、AF152880、AF128033 为 80 年代分离株; AJ304441、AJ304434 为 1999 年分离自罗马尼亚; AY271499、AY271501、AY271500 为 2000 年分离自乌克兰等地;图中括号内为毒株名称

图3 Echo30 分离株部分 VP1 序列的进化树分析

讨 论

2003 年 1—7 月在我国苏北部分地区发生了较大规模的无菌性脑膜炎爆发(1681 例),主要发病人群是 15 岁以下的青少年。如此大规模的无菌性脑膜炎爆发近 20 年来在我国并不多见。从 66 例患者脑脊液分离到 18 株性质相同的肠道病毒,经中和试验鉴定均为 Echo30,从而推断此次脑膜炎爆发是由该病毒引起的。VP1 是肠道病毒衣壳蛋白中位于最外层的部分,大部分抗原决定簇也位于此,有研究表明按照 VP1 区 3' 段序列对肠道病毒进行基因分型与血清分型的吻合程度相当高^[4],对该段序列的分析是毒株分型及其变异规律分析的有效手段。因此,本研究选择该区域的病毒核酸序列作为分析比较的基础。

分离病毒 3' 段 VP1 序列测定后经 BLAST 程序在 GenBank 中检索比较,结果显示与其同源性最高的 50 个核酸序列均来自 Echo30 毒株,与中和试验的鉴定结果一致。但核苷酸序列和氨基酸序列同源性比较的结果并不一致,主要表现为同一分离株对应核苷酸序列和氨基酸序列同源性最高的毒株不同,说明 VP1 核苷酸序列的变异情况并非准确对应其氨基酸的改变。分离株与 Echo30 原型株的对比也发现,尽管核苷酸同源性仅 84%,但二者氨基酸序列的同源性则高达 96%,充分体现出核苷酸与氨基酸序列改变的不同步。

通过与 13 株选自 GenBank 的参考株以及 Echo30 原型株相应区段核酸序列的比较,我们发现此次分离的 Echo30 在基因进化上有以下几个规律:①分离株来源相同。无论核苷酸水平还是氨基酸水平,本次比较的 3 株病毒同源性都相当高,一致率分别为 99.5% 和 100%,且位于进化树的同一支,说明本次脑膜炎爆发有可能是由单一基因型的 Echo30 病毒引起的。②基因型相似的病毒其致病性可能不同。进化树分析表明,与本次分离株亲缘关系最近的是 2000 年罗马尼亚脑膜炎流行的病原病毒株以及 1999 和 2000 年在乌克兰等地分离到的毒株。值得注意的是乌克兰等地的分离株来自健康人。③ Echo30 的基因进化和时间有关。有研究表明引起无菌性脑膜炎大爆发的 Echo30 病毒在基因型的进化上存在明显的时间效应,即 20 世纪 80、90 年代的流行毒株与 60、70 年代明显不同,且北美地区所有 1993 年以后的分离株都属于同一发生系^[7]。由于

缺乏我国的相关资料,纳入本研究的都是国外的病毒分离株,比较发现尽管地域不同,Echo30 的进化依然有明显的时间趋势。和本次分离株亲缘关系最近的毒株都是 1999 和 2000 年分离到的,90 年代初美国等地分离株聚集成关系紧密的一簇,它们与 80 年代分离株和参比的所有分离株共同组成一个发生系中的一支,另一支的端点是 Echo30 原型株,说明不同年代的分离株较原型株都有较大的 VP1 区 3' 段核酸变异。④进化的地域性。本次分离株是比较中仅有的国内 Echo30 分离株,它们单独构成一簇然后加入其他毒株的进化支;80 年代分离株均来自美国,也成为关系紧密的一簇;而乌克兰、罗马尼亚等欧洲地区的分离株则构成另一簇。由于比较的例数较少,Echo30 的进化是否具有这样的地域分布规律仍有待深入研究。

Echo30 是目前肠道病毒性脑膜炎的最主要病原^[8,9]。但我国对该型病毒的报道不多,相关的生物信息学分析在国内也未见报道。本研究在该方面进行了积极的探索,但要全面了解该病毒的生物特性和遗传变异规律,尚需进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Atkinson PJ, Sharland M, Maguire H. Predominant enteroviral serotypes causing meningitis. *Arch Dis Child*, 1998, 78: 373-374.
- 2 Legay V, Chomel JJ, Lina B. Specific RT-PCR procedure for the detection of human parechovirus type 1 genome in clinical samples. *J Virol Methods*, 2002, 102: 157-160.
- 3 Shih SR, Wang YW, Chen GW, et al. Serotype-specific detection of enterovirus 71 in clinical specimens by DNA microchip array. *J Virol Methods*, 2003, 111: 55-60.
- 4 Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, et al. Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J Clin Microbiol*, 1999, 37: 1288-1293.
- 5 Lukashov AN, Lashkevich VA, Ivanova OE, et al. Recombination in circulating enteroviruses. *J Virol*, 2003, 77: 10423-10431.
- 6 Oberste MS, Maher 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.
- 7 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: 3928-3933.
- 8 Gosbell I, Robinson D, Chant K, et al. Outbreak of echovirus 30 meningitis in Wingecarribee Shire, New South Wales. *Commun Dis Intell*, 2000, 24: 121-124.
- 9 Charrel RN, Bernit E, Zandotti C, et al. An approach based on RFLP assay to investigate outbreaks of enteroviral meningitis. *J Clin Virol*, 2004, 29: 54-58.

(收稿日期:2004-05-12)

(本文编辑:尹廉)