

北京地区2006—2008年肠道病毒71型VP1区基因特征分析

李仁清 陈丽娟 王玉梅 张合润 贺雄

【摘要】 **目的** 了解2006—2008年北京地区分离的不同来源肠道病毒71型(EV71)VP1区基因特征。**方法** 从手足口病例、急性弛缓性麻痹病例和健康儿童的粪便、咽拭子和疱疹液标本中分离EV71病毒株,选取其中9株EV71分离株,采用RT-PCR扩增VP1区全长基因片段并进行序列测定、系统发生树构建、核苷酸同源性及组内和组间进化距离分析。**结果** 9株EV71在系统发生树上与C基因型中的C4亚型代表株属同一分支;在核苷酸同源性分析中,9株分离株与C4亚型代表株的同源性达到92.1%~93.9%,明显高于与C1、C2、C3亚型代表株的同源性(分别为88.8%~89.5%、89.4%~90.0%和88.4%~89.3%);三种不同来源的分离株病毒之间具有较高的同源性(95.9%~100.0%),但与1998年分离的C4亚型代表株的同源性却较低(分别为93.3%~93.9%和92.1%~92.9%)。在进化距离的分析上,C4亚型内各组间距离较大,尤其是亚型代表株与分离株之间距离最大($D = 0.052 \sim 0.071$)。**结论** 2006—2008年北京地区流行的EV71仍然是C4亚型,在同一时间不同地区、不同来源、不同疾病状态下分离的EV71在VP1区全长基因序列上无明显差别;但是随着时间推移,核苷酸变异的不断积累,出现新亚型的概率也在不断增加,因此有必要加强分离株的监测以掌握EV71的变异趋势。

【关键词】 手足口病; 肠道病毒71型; 基因型

Genetic characteristics of enterovirus 71 isolated in Beijing, 2006–2008 Li Ren-qing, CHEN Li-juan, WANG Yu-mei, ZHANG He-run, HE Xiong. Beijing Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100013, China

【Abstract】 **Objective** To sequence and analyze the VP1 region of isolated enterovirus from different sources in Beijing, 2006–2008. **Methods** 9 EV71 were selected from the isolates identified through the specimen of human hand foot mouth disease (HFMD), acute flaccid paralysis (AFP) and healthy children in Beijing, 2006–2008. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method was used to amplify and sequence the whole VP1 gene of enterovirus. Phylogenetic tree was constructed, with the means of nucleotide homology and distance between/within groups analyzed. **Results** The 9 selected strains were clustered with C4 subgenotype reference strains in Phylogenetic tree and showed high nucleotide acid identity (92.1%–93.9%) in nucleotide homology analysis, and had higher homology than C1, C2, C3 subgenotype reference strains (88.8%–89.5%, 89.4%–90.0% and 88.4%–89.3%, respectively). High homologous (95.9%–100.0%) was noticed between the isolated stains from three different sources, but low homologous (93.3%–93.9%, 92.1%–92.9%, respectively) showed between the isolated stains and C4 reference strains isolated in 1998. There appeared larger variations between groups in C4 subgenotype when analyzing the distance between groups means, especially between the reference strains and isolated strains ($D=0.052-0.071$). **Conclusion** The EV71 isolated in Beijing, from 2006 to 2008 also appeared to be C4 subgenotype and there was no significant difference found in the whole sequence of VP1 gene of the strains isolated from different regions, sources, or under different diseases occurred in the same period. There were more nucleotide variations and more chances for the presence of new subgenotype, suggesting that it is necessary to strengthen the surveillance program on EV71 isolates.

【Key words】 Hand foot mouth disease; Enterovirus 71; Genotype

肠道病毒71型(EV71)是小RNA病毒科肠道病毒属(Enterovirus, EV)的成员,可以引起以发热和

手、足、口腔及臀部等部位的皮疹、溃疡为主要临床特征的急性传染病——手足口病(HFMD)。EV71还可引起诸如心肌炎、肺水肿、无菌性脑膜脑炎、脑干脑炎、脊髓灰质炎(脊灰)样麻痹等严重并发症。

自1974年首次报道^[1]以来, EV71 在世界大部分地区均有流行。20世纪90年代后期, EV71 开始肆虐东亚地区^[2,4], 其中最令人关注的是1998年在台湾地区的EV71感染(报告129 106例, 其中重症405例, 死亡78例), 患者发生严重的脑干脑炎, 并引发急性弛缓性麻痹(AFP)、肺水肿和出血等严重并发症。近年来, 我国大陆包括北京、安徽、山东等地区陆续出现HFMD疫情, 并在疫情样本中分离到EV71。为了解北京地区EV71基因特征, 探讨病毒株流行、变异情况, 对实施疾病预防控制策略和措施提供科学依据, 我们选择2006年以来自不同人群(HFMD病例、AFP病例和健康儿童)标本分离的9株EV71, 测定VP1区全长核苷酸序列, 结果报告如下。

材料与方法

1. 材料:

(1) 标本采集: 在北京市各区县疾病预防控制中心(CDC)的协助下采集2006—2007年健康儿童粪便标本, 2007—2008年HFMD患儿的疱疹液、咽拭子和粪便标本及2007年AFP病例粪便标本。

(2) 试剂及细胞: 本实验采用的病毒RNA提取试剂盒、onestep RT-PCR试剂盒和PCR产物纯化试剂盒均购自QIAGEN, RNA酶抑制剂(RNasin)等购自天根生化科技(北京)有限公司。BigDYE Terminator V13.1 Cycle Sequencing试剂盒和BigDYE XTerminator Purification试剂盒均购自ABI。人横纹肌肉瘤(RD)细胞来源于中国CDC病毒病预防控制所国家脊灰实验室。

(3) 引物合成: 合成EV种属特异性引物(EV1/EV2)、EV71特异性引物(EV71-S/EV71-A)和VP1区全长测序引物(EV71-VP1-S/EV71-VP1-A)各一对, 引物序列见表1, 均由北京六合通经贸有限公司合成。EV1和EV2序列参考文献[5]合成, EV71-S和EV71-A序列参照《手足口病预防控制指南(2008年版)》, EV71-VP1-S和EV71-VP1-A序列由中国CDC病毒病预防控制所国家脊灰实验室提供。

表1 EV鉴定和全长VP1扩增引物

| 引物 | 序列 (5'~3') |
|------------|----------------------------|
| EV1 | TCCGGCCCTGAATGCGGCTAATCC |
| EV2 | ACACGGACACCCAAAGTAGTCGGTCC |
| EV71-S | GCAGCCCAAAAGAACTTCAC |
| EV71-A | ATTTCAGCAGCTTGGAGTGC |
| EV71-VP1-S | GCAGCCCAAAAGAACTTCAC |
| EV71-VP1-A | AAGTCGCGAGAGCTGTCTTC |

2. 方法:

(1) EV的分离: 对不同来源的粪便、咽拭子和疱疹液标本进行相应处理后接种到形态良好、刚长满单层的RD细胞上, 同时设正常细胞对照。其中粪便标本用含10%氯仿的PBS充分振荡制成粪悬液, 4000 r/min离心20 min, 取上清液用于细胞接种; 疱疹液、咽拭子可直接接种细胞。每份标本在每种细胞上各接种2管, 每管接种0.2 ml, 置37℃、5%的CO₂培养箱内, 每日观察细胞病变(CPE), 待CPE达到Ⅲ以上, 再续传一代, 待CPE达到Ⅲ以上, 将培养物置于-80℃保存, 即为阳性分离病毒株。如第1代接种7 d无CPE出现, 则盲传一代, 再连续观察7 d仍无CPE出现, 则判为阴性。

(2) EV特异性核酸检测: 将含有阳性分离病毒株的培养物4000 r/min离心10 min, 取上清液用病毒RNA提取试剂盒提取病毒RNA, 采用onestep RT-PCR试剂盒进行病毒RNA的RT-PCR扩增。以提取的病毒RNA为模板, 用EV种属特异性引物(EV1/EV2)和EV71特异性引物(EV71-S/EV71-A)进行扩增, 两对引物均扩增出目的核酸片段的标本判为EV71阳性。用于EV种属特异性引物扩增和EV71特异性引物扩增的RT-PCR反应条件参照onestep RT-PCR试剂盒操作手册的条件为: 50℃ 30 min, 95℃ 15 min, 94℃ 30 s, 52℃ 30 s, 72℃ 30 s, 35个循环, 72℃ 10 min, 4℃ 10 min。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定。

(3) VP1全长核苷酸序列和氨基酸序列分析: 以EV71阳性标本提取的RNA为模板, 用VP1区全长基因片段扩增引物(EV71-VP1-S/EV71-VP1-A)进行RT-PCR。其RT-PCR反应条件为: 50℃ 30 min, 95℃ 15 min, 94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 90 s, 共35个循环, 72℃ 10 min, 4℃ 10 min。RT-PCR扩增产物用于核酸序列测定。测序采用QIAquick PCR Purification试剂盒纯化, 用BigDYE Terminator V13.1 Cycle Sequencing试剂盒进行测序的标记反应。标记产物用BigDYE XTerminator Purification试剂盒纯化, 采用美国ABI 3100自动测序仪完成测序和校对。将测得的核苷酸序列使用Bioedit和MEGA4进行分析, 用于构建系统发生树的EV71病毒各基因型代表株的VP1区核苷酸序列来自美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)的GenBank数据库。

结果

1. EV的分离及鉴定: 将2006—2008年期间采

集到的包括健康儿童粪便、AFP 病例粪便、HFMD 患儿(包括重症病例)的咽拭子、疱疹液和粪便标本进行病毒分离。2006—2007 年健康儿童粪便 360 份,其中 28 份病毒分离结果阳性,经 EV 种属特异性引物和 EV71 特异性引物进行 EV71 检测,仅 1 株病毒为 EV71;2007 年 HFMD 疫情标本共 217 份,对其中的 116 份(主要是粪便标本)进行病毒分离,其中 11 份病毒分离结果阳性,经分子生物学鉴定,有 7 株病毒为 EV71;2007 年 AFP 病例粪便有 255 份标本,其中 33 份病毒分离结果阳性,经分子生物学鉴定,有 2 株病毒为 EV71;2008 年对 217 份 HFMD 患儿咽拭子、疱疹液标本进行病毒分离,阳性样本中有 41 份经分子生物学鉴定为 EV71。从上述 51 株 EV71 病毒中筛选出 9 株病毒(分别来自健康儿童、AFP 病例、HFMD 及其重症死亡病例)进行 VP1 区全长基因特征分析,结果见表 2。

2. EV71 病毒 VP1 全长核苷酸序列和氨基酸序

表 2 9 株 EV71 毒株 EV 特异性核酸检测结果

| 病毒株 | 标本来源 | 标本类型 | EV 种属特异性核酸 | EV71 特异性核酸 |
|--------------|---------|------|------------|------------|
| BJ06-sjs01 | 健康儿童 | 粪便 | + | + |
| BJ07-J056 | AFP 病例 | 粪便 | + | + |
| BJ07-Z011-6 | HFMD 病例 | 粪便 | + | + |
| BJ08-Z001-2 | HFMD 病例 | 咽拭子 | + | + |
| BJ08-Z002-16 | HFMD 病例 | 疱疹液 | + | + |
| BJ08-Z004-3 | HFMD 病例 | 疱疹液 | + | + |
| BJ08-Z011-4 | HFMD 病例 | 疱疹液 | + | + |
| BJ08-Z020-1 | HFMD 病例 | 疱疹液 | + | + |
| BJ08-Z025-5 | HFMD 病例 | 疱疹液 | + | + |

注: *重症死亡病例

表 3 9 株 EV71 与各基因型及亚型代表株 VP1 区核苷酸和氨基酸同源性分析

| 病毒株 | C1 | C2 | C3 | C4 ^a | C4 ^b | A | B | CoxA16 |
|--------------|------------|------------|------------|-----------------|-----------------|------------|------------|------------|
| BJ06-sjs01 | 89.1(98.3) | 89.7(98.3) | 89.3(98.6) | 93.7(98.9) | 92.8(96.9) | 82.4(94.6) | 84.9(96.9) | 64.4(72.0) |
| BJ07-J056 | 88.8(98.9) | 89.7(98.9) | 88.6(97.9) | 93.3(98.9) | 92.3(96.9) | 82.3(94.9) | 84.8(97.6) | 63.6(72.7) |
| BJ07-Z011-6 | 89.2(98.6) | 89.4(98.3) | 88.5(98.3) | 93.9(98.6) | 92.7(96.6) | 82.1(95.2) | 85.4(97.3) | 63.5(72.7) |
| BJ08-Z001-2 | 88.8(98.6) | 90.0(98.9) | 88.8(98.3) | 93.6(99.3) | 92.9(97.3) | 82.1(94.6) | 84.8(97.3) | 62.8(72.3) |
| BJ08-Z002-16 | 89.1(99.3) | 89.5(98.6) | 88.4(98.3) | 93.3(99.3) | 92.1(97.3) | 81.9(94.9) | 85.1(97.9) | 64.3(72.7) |
| BJ08-Z004-3 | 89.5(99.3) | 90.0(98.6) | 89.2(98.3) | 93.8(99.3) | 92.4(97.3) | 82.9(94.9) | 85.1(97.9) | 64.1(72.7) |
| BJ08-Z011-4 | 88.8(98.6) | 90.0(98.9) | 88.7(98.3) | 93.6(99.3) | 92.9(97.3) | 82.1(94.6) | 84.8(97.3) | 62.8(72.3) |
| BJ08-Z020-1 | 88.8(98.6) | 90.0(98.9) | 88.8(98.3) | 93.6(99.3) | 92.9(97.3) | 82.1(94.6) | 84.8(97.3) | 62.8(72.3) |
| BJ08-Z025-5 | 89.0(99.3) | 89.6(98.6) | 88.4(98.3) | 93.3(99.3) | 92.2(97.3) | 82.4(94.9) | 85.1(97.9) | 63.6(72.7) |

注: C1: AY207626-0389-MAA-00; C2: AF286522-2912-TAI-98; C3: AY125971-KOR-EV71-07; C4^a: AF286531-3254-TAI-98; C4^b: AF302996-SHZH98; A: ETU22521-BrCr; B: ETU22522-MS/7423/87; CoxA16: CAU05876-G-10; 括号外数据代表核苷酸同源性百分比(%), 括号内数据代表氨基酸同源性百分比(%)

表 4 9 株 EV71 间 VP1 区核苷酸和氨基酸同源性分析

| 病毒株 | BJ06-sjs01 | BJ07-J056 | BJ07-Z011-6 | BJ08-Z001-2 | BJ08-Z002-16 | BJ08-Z004-3 | BJ08-Z011-4 | BJ08-Z020-1 | BJ08-Z025-5 |
|--------------|------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| BJ06-sjs01 | | 98.6 | 98.9 | 98.9 | 98.9 | 98.9 | 98.9 | 98.9 | 98.9 |
| BJ07-J056 | 96.5 | | 99.3 | 99.3 | 99.6 | 99.6 | 99.3 | 99.3 | 99.6 |
| BJ07-Z011-6 | 96.6 | 98.3 | | 99.3 | 99.3 | 99.3 | 99.3 | 99.3 | 99.3 |
| BJ08-Z001-2 | 96.7 | 98.4 | 98.3 | | 99.3 | 99.3 | 100.0 | 100.0 | 99.3 |
| BJ08-Z002-16 | 96.7 | 96.8 | 96.7 | 96.6 | | 100.0 | 99.3 | 99.3 | 100.0 |
| BJ08-Z004-3 | 96.2 | 96.4 | 96.2 | 96.4 | 95.9 | | 99.3 | 99.3 | 100.0 |
| BJ08-Z011-4 | 96.7 | 98.3 | 98.2 | 99.8 | 96.5 | 96.4 | | 100.0 | 99.3 |
| BJ08-Z020-1 | 96.7 | 98.4 | 98.3 | 100.0 | 96.6 | 96.4 | 99.8 | | 99.3 |
| BJ08-Z025-5 | 97.3 | 96.8 | 96.5 | 96.6 | 96.9 | 96.4 | 96.6 | 96.6 | |

注: 表内黑体数据代表氨基酸同源性百分比(%), 其他数据代表核苷酸同源性百分比(%)

列分析: 从 GenBank 数据库中下载各基因型和亚型代表株的 VP1 全长基因序列^[6,7]。将本实验室分离的 9 株 EV71 病毒分离株与代表株的 VP1 全长基因序列用 MEGA4 的 Neighbor-Joining 法构建亲缘性系统发生树, 选柯萨奇病毒(Cox)A 组 16 型(CoxA16)原型株作为外部对照(图 1)。9 株 EV71 病毒分离株在系统发生树上与 C4 亚型的代表株聚成一簇, bootstrap 值为 97%。利用 Bioedit 的 sequence identity matrix 进行 EV71 病毒分离株与各基因型和亚型代表株之间的核苷酸和氨基酸同源性分析, 结果见表 3 和表 4。从表 3 可以看出, 9 株 EV71 病毒分离株与 A、B、C 各基因型代表株核苷酸同源性分别为 81.9%~82.9%、84.8%~85.4%和 88.4%~93.9%(氨基酸的同源性分别为 94.6%~95.2%、96.9%~97.9%和 96.6%~99.3%), 可见分离株与 C 基因型代表株的同源性最高; 9 株 EV71 病毒分离株与 C 基因型各亚型代表株 C1、C2、C3、C4^a、C4^b 的核苷酸同源性分别为 88.8%~89.5%、89.4%~90.0%、88.4%~89.3%、93.3%~93.9%和 92.1~92.9%(氨基酸的同源性分别为 98.3%~99.3%、98.3%~98.9%、97.9%~98.6%、98.6%~99.3%和 96.6%~97.3%), 可见分离株与 C4 亚型两个代表株的同源性比与 C1、C2、C3 的高。

从表 4 可以看出, 9 株 EV71 病毒分离株之间的核苷酸同源性为 95.9%~100.0%, 高于与 C4 亚型代表株的同源性(93.3%~93.9%和 92.1%~92.9%)。分离株之间的氨基酸同源性为 98.6%~100.0%, 与

C4a亚型的同源性相当(98.6% ~ 99.3%),比C4b亚型的同源性高(96.6% ~ 97.3%)。

3. 组内和组间进化距离:将进化树中位于C4亚型分支的病毒株分为6个进化枝(Clade)(图1),其中分离自1998年的两个C4亚型代表株(AF286531-3254-TAI-98和AF302996-SHZH98)属于Clade 1,2003年分离的深圳病毒株(AY465356-SHZH03)属于Clade 2,本实验室分离的9株病毒分别属于Clade 3~6。利用MEGA4中的Compute between/within Groups Means计算每两个进化枝之间或每个进化枝内的平均距离(*D*)(如表5)。Clade 6组内变异最小(*D*=0.003),Clade 1组内变异较大(*D*=0.054)。Clade 1与其他进化枝之间的组间变异最大,*D*值为0.052~0.071;Clade 2与Clade 3~6之间的变异较大,*D*值在0.043~0.049之

间;Clade 3~4与Clade 5~6之间的变异较小,*D*值在0.033~0.037之间;Clade 5和Clade 6之间的变异最小,*D*=0.018。

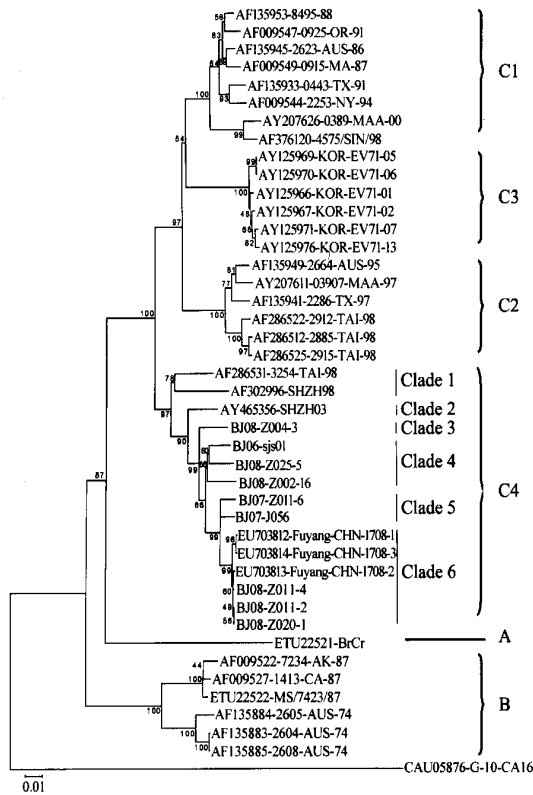
讨 论

利用分子生物学方法进行EV鉴定和分型具有敏感性高、特异性强和可重复等优点^[5],且VP1区序列分型结果与中和试验鉴定结果一致性较好^[8-10]。根据VP1区全长基因序列测序结果,可将EV71分为A、B和C三个基因型^[6]。自崔爱利等^[7]在2002—2003年中国大陆HFMD患儿的疱疹液中分离到C4亚型EV71毒株,C基因型至今已分为C1、C2、C3、C4四个亚型。

通过对2006—2008年不同来源的9株EV71病毒和各基因型及亚型代表株病毒VP1区全长基因序列同源性分析并构建亲缘性关系树,结果显示9株EV71病毒全部属于C4亚型;2006年以来在北京地区分离到的9株EV71病毒与2008年在安徽省阜阳市分离到的3株病毒无明显差别(数据未给出);三种不同来源(7株来自HFMD病例、1株来自AFP病例、1株来自健康儿童)的EV71病毒之间也没有明显的差别。因此可以推断,在同一时间段,分离自不同地区、不同来源的EV71病毒在VP1区全长基因序列上没有明显的差别。

在同源性分析中,2006年以来分离的9株EV71病毒之间具有较高的同源性(95.9%~100.0%),且高于与1998年分离的2株C4亚型代表株的同源性(分别为93.3%~93.9%和92.1%~92.9%),与2003年分离的SHZH03的同源性(95.1%~95.7%)介于以上两者之间。在进化距离分析中也体现了这种趋势,9株病毒所在的Clade 3~6具有最近的进化距离(*D*=0.018~0.037),SHZH98所在的Clade 2与Clade 3~6之间具有较长的进化距离(*D*=0.043~0.049),而2株C4亚型代表株所在的Clade 1与其他分离株病毒距离最远(*D*=0.052~0.071)。虽然本次分析的数据量有限,但还是可以看出10年来逐渐递变的趋势。随着核苷酸变异广泛和持续积累,是否会有新的基因亚型出现值得关注。

本实验室从健康儿童的粪便中也分离到EV71。核苷酸同源性分析表明,来自重症病例(BJ07-J056)甚至死亡病例(BJ08-Z020-1,EU703812,EU703813和EU703814)的EV71病毒与来自普通HFMD病例(BJ07-Z011-6, BJ08-Z001-2, BJ08-Z002-16, BJ08-Z004-3, BJ08-Z011-4, BJ08-Z025-5)和健康儿童(BJ06-sjs01)携带的病毒没有明显的差别,说明导致



注:EU703812-Fuyang-CHN-1708-1/2/3为2008年安徽省阜阳市地区暴发HFMD疫情病毒分离株核苷酸序列

图1 EV71病毒VP1基因亲缘性系统发生树

表5 C4亚型分支病毒株6个Clade的组内及组间*D*值

| | Clade 1 | Clade 2 | Clade 3 | Clade 4 | Clade 5 | Clade 6 |
|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Clade 1 | 0.054 | | | | | |
| Clade 2 | 0.052 | — | | | | |
| Clade 3 | 0.068 | 0.043 | — | | | |
| Clade 4 | 0.071 | 0.046 | 0.038 | 0.030 | | |
| Clade 5 | 0.069 | 0.047 | 0.036 | 0.033 | 0.017 | |
| Clade 6 | 0.068 | 0.049 | 0.037 | 0.034 | 0.018 | 0.003 |

疾病不同状态和进程的原因与VP1区变异情况可能没有明显的关系。

综上所述,北京地区流行的EV71毒株仍为中国大陆流行的C4亚型,且在同一时间段,但不同地区(北京、阜阳)、不同来源(HFMD病例、AFP病例、健康儿童)、不同疾病状态(重症病例甚至死亡病例、普通HFMD病例或者健康儿童)分离的EV71病毒在VP1区全长基因序列上没有明显的差别。但是随着时间推移,核苷酸变异的不断积累,出现新亚型的概率也在不断增加,这需要通过加强分离株的监测来掌握EV71毒株的变异趋势,以便能更好的控制和预防新病毒株所造成的危害。

参 考 文 献

- [1] Schmidt NJ. An apparently new enterovirus isolated from patients with disease of the central nervous system. *J Infect Dis*, 1974, 129(3): 304-309.
- [2] Komatsu K. Outbreak of severe neurologic involvement associated with enterovirus 71 infection. *Pediatr Neurol*, 1999, 20(1): 17-23.
- [3] Ho M, Chen Eng-Rin, Hsu Kwo-Hsiung, et al. An epidemic of enterovirus

- 71 infection in Taiwan. *N Engl J Med*, 1999, 341(13): 929-935.
- [4] Shih SR, Ho MS, Lin KH, et al. Genetic analysis of enterovirus 71 isolated from fatal and non-fatal cases of hand, foot and mouth disease during an epidemic in Taiwan, 1998. *Virus Res*, 2000, 68(2): 127-136.
- [5] Yang CF, De L, Yang SJ, et al. Genotype-specific in vitro amplification of sequences of the wild type 3 polioviruses from Mexico and Guatemala. *Virus Res*, 1992, 24(3): 277-296.
- [6] Brown BA, Oberste MS, Alexander, et al. Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998. *J Virol*, 1999, 73(12): 9969-9975. Erratum in: *J Virol*, 2000, 74(24): 12003.
- [7] 崔爱利, 许文波, 李秀珠, 等. 肠道病毒71型的RT-PCR诊断及基因特征. *病毒学报*, 2004, 20(2): 160-165.
- [8] 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(3): 1941-1948.
- [9] Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, et al. Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J Clin Microbiol*, 1999, 37(5): 1288-1293.
- [10] Oberste MS, Maher K, Flemister MR, et al. Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(3): 1170-1174.

(收稿日期:2008-09-19)

(本文编辑:张林东)

· 疾病控制 ·

早餐奶污染恶臭假单胞菌引起食物中毒一例报告

孔繁才 崔一峰

2007年7月中旬江苏省海安县某小学一名学生因食用南方某品牌早餐奶数小时后出现腹痛、腹泻、发热等症状,经投诉由海安县工商部门去销售点采样后送海安县疾病预防控制中心检验,鉴定为恶臭假单胞菌污染牛奶引起的食物中毒。

取早餐奶分离于普通平板、血平板、SS平板,分别在有氧和厌氧条件下培养;将患者粪便分离于SS及普通琼脂平板,置37℃培养。24 h后取可疑菌落划线于普通琼脂斜面,37℃培养24 h。在分离接种的同时,用牛奶及粪便直接涂片进行革兰染色。结果在有氧和无氧条件下均有菌生长,早餐奶及粪便标本在营养琼脂平板上均出现大量圆形、光滑、湿润、黏稠中等大的菌落,SS平板出现大量光滑、湿润、圆整中等大的微凸无色半透明菌落,血平板上出现大量扁平、湿润黏稠的大菌落,不溶血。牛奶及粪便直接涂片镜检可见大量革兰阴性杆菌与分离菌染色形态一致。生化特性分析表明,从牛奶及粪便中分离出的可疑菌落均为氧化酶阳性,葡萄糖分解氧化型,用法国生物梅里埃公司生产的API20NE手工条鉴定,结果:NO₃-、TRP-、GLU-、ADH+、URE-、ESC-、GEL-、PNG-、GLU+、ARA-、MNE-、MAN-、NAG-、MAL-、GNT-、CAP+、ADI-、MLT+、CIT+、PAC+。生化谱编码均为:0140057为恶臭假单胞菌,鉴定百分率为99.5%。将分离菌接种于普通肉汤37℃培养18 h,用生理盐水稀释培养液使菌液浓度约10⁵ cfu/ml。取18~20 g小白鼠3只,腹腔注射0.5 ml/只,用大肠埃希菌作对照,逐日观

察。小白鼠在接种试验菌12 h后均出现厌食、精神萎靡、稀便等症状,36 h内有2只死亡,并从死亡小白鼠体内分离出接种菌,对照组小白鼠72 h无异常。药敏试验用K-B法,结果对氧哌嗪青霉素、先锋必、氯霉素、氟哌酸、四环素、氟喹酸、菌必治等药物敏感;对妥布霉素、丁胺卡那、环丙沙星、卡那霉素高度敏感;对林可霉素、氨苄青霉素、苯唑青霉素、复方新诺明、先锋VI、复达欣、先锋V、头孢呋肟、呋喃妥因、利福平耐药。

讨论:①从早餐奶及患者腹泻便中均分离到恶臭假单胞病原菌,经动物试验结合临床症状,证实这次食物中毒是由恶臭假单胞菌污染早餐奶引起。②恶臭假单胞菌分布很广,存活力强,在土壤、水、空气中均有存在,正常人的皮肤、肠道、呼吸道等处亦有本菌存在,一般为条件致病菌。该菌株动物试验3只小白鼠死亡2只,表明毒力较一般条件致病菌强。③早餐奶营养丰富,一旦被该菌污染,温度适宜时便大量繁殖。而早餐奶为小型包装非透明的袋装奶,饮用时一般都用塑料管直接插入吸吮,如被细菌污染即使牛奶在感官上发生变化,也不易发觉,极易引起食物中毒。在对该早餐奶进行检验时发现牛奶呈灰白色,并有大量絮状物。建议生产厂家改用透明度好一些的塑料袋或其他透明物品包装,从而能及时发现牛奶有无异常,避免饮用变质牛奶引起食物中毒。生产车间保持清洁和经常消毒,生产过程注意无菌操作,对出厂前的牛奶要严格消毒,防止被细菌污染。

(收稿日期:2008-06-02)

(本文编辑:张林东)