

宁夏地区 2008 年肠道病毒 71 型分离株基因特征分析

马江涛 陈慧 马学旻 郝琼 詹军 夏清 严冬梅 王东艳 许文波

【摘要】 目的 研究宁夏地区手足口病患者中肠道病毒 71 型(EV71)分离株的基因特征。**方法** 采集手足口病患者标本进行病毒分离培养,阳性标本进行 RT-PCR 鉴定后,选取 29 株 EV71 分离毒株,对其 VP1 区进行核苷酸序列测定,并参考 A、B、C 各基因型的参考毒株和以往中国 EV71 的分离毒株进行同源性分析并构建系统发生树。**结果** 从 439 份标本中分离肠道病毒 215 株,经 RT-PCR 鉴定,93 株为 EV71。选取其中 29 株进行 VP1 基因全序列测定,根据 VP1 全基因序列构建系统发生树,29 株毒株均在 C 基因型中,与 C4 亚型属同一分支,与 C4 亚型代表株核苷酸同源性为 91.7%~99.4%,氨基酸同源性为 96.6%~100.0%。**结论** 宁夏地区手足口病患者中分离的 EV71 毒株属 C 基因型的 C4 亚型。

【关键词】 肠道病毒 71 型;分离株;手足口病;基因特征

Genetic characterization of enterovirus 71 stains isolated in Ningxia province in 2008 MA Jiang-tao*, CHEN Hui, MA Xue-min, HAO Qiong, ZHAN Jun, XIA Qing, YAN Dong-mei, WANG Dong-yan, XU Wen-bo. *Ningxia Center for Disease Control and Prevention, Yinchuan 750004, China

【Abstract】 Objective To study the genetic characterization of enterovirus 71 (EV71) strains isolated from specimens of patients with hand-foot-mouth disease (HFMD) in Ningxia province in 2008. **Methods** All the stool, throat swab and vesicle samples that collected from patients with HFMD were cultured. The positive isolates were identified by reverse transcriptase PCR (RT-PCR) with specific primers of EV71. Complete VP1 gene sequences (891 nucleotides) of 29 strains (part of 93 EV71 strains) were determined and compared with A, B and C genotype reference EV71 strains while EV71 China isolates by homogeneity and phylogenetic tree analyses. **Results** 215 strains of EV were isolated from 439 specimens. Results from RT-PCR indicated that 93 strains belong to EV71. Phylogenetic tree analysis revealed that the selected 29 stains were clustered with reference strains of C4 subgenotype. The nucleotide identity with C4 reference strains was 91.7%~99.4%. The amino acid homogeneity was 96.6%~100.0%. **Conclusion** The recently identified EV71 strains in Ningxia province belonged to subgenotype C4 which resembled to most of the isolates in China.

【Key words】 Enterovirus 71; Stains isolated; Hand-foot-mouth disease; Genetic characterization

肠道病毒 71 型(EV71)在世界的许多国家和地区发生过流行^[1]。2008 年我国部分地区因 EV71 引起手足口病发生流行,同年 3—6 月宁夏地区也发生了该病的流行,经实验室诊断主要病原为 EV71。本研究对引起宁夏地区手足口病的 EV71 分离株进行分子流行病学调查,初步阐明了该病毒的基因特征。

材料与方 法

1. 标本采集:收集宁夏地区各市、县具有手足口病症状的患者标本,共收集 335 例患者的 439 份标本,其中粪便标本 158 份,咽拭子标本 203 份,疱疹液标本 78 份。样品采集和处理程序按照国家“手足口防治指

南”(2008 版)的标准;预处理后置-20℃冰箱保存备用。

2. 方法: Hep-2(人上皮癌细胞)细胞和 RD(人横纹肌肉瘤细胞)细胞由中国疾病预防控制中心国家脊髓灰质炎实验室提供。对 439 份手足口病患者标本进行病毒分离;标本预处理后接种到单层、形态良好的 RD 和 Hep-2 细胞上。每日观察细胞病变(CPE),当 Hep-2 细胞无病变而 RD 细胞 CPE≥75%时收获病毒,第 3 代仍不出现 CPE 则判为阴性。细胞培养和病毒分离均按“手足口防治指南”操作。病毒 RNA 提取采用 Promega 公司生产的总 RNA 提取试剂盒提取病毒核酸,操作步骤按照试剂盒说明书。

(1)RT-PCR 鉴定:RT-PCR 扩增采用一步法进行,引物由国家脊髓灰质炎实验室提供:VP1F2: 5'-GCA GCC CAA AAG AAC TTC AC-3' 和 EV71R2: 5'-ATT TCA GCA GCT TGG AGT GC-3',扩增片段长度 341 bp。PCR 条件为:42℃ 45 min,95℃ 3 min;95℃

30 s, 51℃ 25 s, 72℃ 60 s, 循环35次; 72℃ 7 min。PCR产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳分析结果。

(2) EV71 VP1 区基因扩增: 引物序列根据 AF286531 等 EV71 毒株序列设计, 引物序列为: EV71F: 5'-CTA TGA AGT TGT GTA AGG AT-3' 和 EV71R: 5'-ACC ACT CTA AAG TTG CCC AC-3', 扩增片段长度为 891 bp。选取其中鉴定为 EV71 的 29 株毒株扩增 VP1 区基因。反应条件为: 42℃ 45 min, 95℃ 3 min; 95℃ 20 s, 50℃ 25 s, 72℃ 90 s, 共 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析结果。RT-PCR 所需试剂均为美国 Promega 公司生产。

(3) 序列测定与分析: 扩增 PCR 产物用 QIAGEN 公司生产的 QIAquick Gel Extraction Kit 试剂盒纯化, 操作步骤按照试剂盒说明书进行, 回收产物送基因公司进行序列测定。测序结果用 DNASTar 软件进行整理后构建基因进化树, 确定其基因亚型, 并进行核苷酸与氨基酸序列同源性分析。

结 果

1. EV71 的分离: 2008 年 5—8 月对收集到的 439 份标本进行病毒分离, 利用 RD 和 Hep-2 两种细胞共分离 EV71 阳性毒株 215 株, 总阳性率为 48.97% (215/439), 其中粪便标本的检出率最高为 75.31% (119/158), 其次为咽拭子和疱疹液病毒分别为 38.92% (79/203) 和 21.79% (17/78)。

2. RT-PCR 鉴定: 对 215 株细胞分离阳性毒株用引物 VP1F2 和 EV71R2 进行 RT-PCR 鉴定, 其中有 93 株扩增出 226 bp 的特征性基因片段, 证实为 EV71 毒株, 占总毒株的 43.25%, 并进一步对扩增片段做核苷酸序列测定。

3. EV71 VP1 区核苷酸序列测定: 选取 93 份阳性标本中 29 株进行 VP1 全基因序列分析, 序列结果应用 MegAlign 3.1 对 29 株宁夏分离株和 EV71 各个基因型与亚型代表株^[2,3], 以及以往中国 EV71 的分离毒株的 VP1 核苷酸序列进行分析, 构建基于 VP1 区的基因进化树 (图 1)。确定宁夏地区流行的 EV71 均为 C4 基因亚型。

4. EV71 分离株 VP1 编码基因核苷酸、氨基酸序列同源性分析: EV71 VP1 区基因全长 891 个核苷酸, 编码 297 个氨基酸。根据 VP1 区核苷酸序列分析, EV71 可分为 A、B、C 3 个基因型^[2]。此次测序的 29 株 EV71 型毒株的 VP1 序列与 GenBank 检索到的 EV71 各基因型和亚型代表株 (A、B、C1、C2、C3、C4)

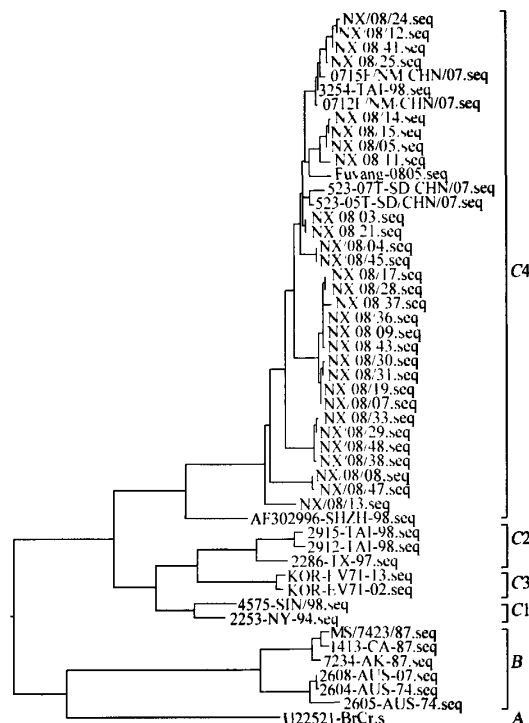


图1 宁夏地区分离的 EV 毒株与各亚型代表株 VP1 区基因进化树

进行核苷酸与氨基酸同源性比较 (表 1), 29 株分离株与 A、B、C 各基因型核苷酸序列同源性分别为 81.1% ~ 83.4%、83.0% ~ 85.4%、87.9% ~ 99.4%; 氨基酸序列同源性分别为 92.3% ~ 95.0%、95.6% ~ 98.0%、96.3% ~ 100.0%。与 C1、C2、C3、C4 代表株核苷酸序列同源性分别为 88.1% ~ 89.7%、88.8% ~ 91.4%、87.9% ~ 89.6%、91.7% ~ 99.4%; 氨基酸序列同源性分别为 96.6% ~ 99.0%、96.6% ~ 99.0%、96.3% ~ 98.3%、96.6% ~ 100.0%。通过以上分析, 确定宁夏地区 EV71 流行株为 C4 基因亚型。

讨 论

EV71 是小 RNA 病毒科肠道病毒属成员, 该病毒主要侵犯呼吸系统、中枢神经系统和心血管系统, 被认为是脊髓灰质炎消灭后最主要的嗜神经肠道病毒^[4], 曾在全世界引起多次大的暴发和流行。研究表明, 该病毒基因组中 VP1 是主要的中和决定因子, 它直接决定病毒的抗原性, VP1 基因具有与病毒血清型完全对应的遗传多样性^[5,6]。VP1 基因序列不仅可以作为肠道病毒属内不同血清型分类的依据, 并可作为小 RNA 病毒科内不同属的分类参考^[7]。根据 VP1 区核苷酸序列的系统发生树, EV71 分为 3 个独立的基因型 (A、B 和 C)。A 型为原始毒株, 只包含 1

个病毒株 U22521-BrCr; B 和 C 型又可分为 B1、B2、B3、B4 和 C1、C2、C3、C4^[2,8]。Brown 等^[2]研究发现,各基因型内部的差异 <12%,不同基因型间的差异位于 16.5%~19.7% 之间, A、B、C 3 个基因型的所有毒株的氨基酸同源性 >94%。

本研究对宁夏地区分离的 29 株 EV71 毒株进行了基因进化和核苷酸同源性分析,基于 VP1 基因全序列构建的基因进化树,此次分离的 29 株 EV71 毒株与 C4 亚型代表株具有最近的进化关系,其核苷酸同源性分别为 91.7%~99.4%,氨基酸同源性为 96.6%~100.0%,证实宁夏地区流行 EV71 毒株属 C 基因型 C4 亚型。根据宁夏地区 2008 年 29 株 EV71 分离株的基因特征与

其个案调查比较发现,宁夏地区 EV71 暴发同样具有聚集性特点,如 NX/08/12(中宁县新堡乡)和 NX/08/24(中宁县新堡乡)同源性为 99.9%;NX/08/33、NX/08/29、NX/08/48、NX/08/38 都为银川市兴庆区病例,同源性为 99.7%~99.9%,但同时不同地区基因型核苷酸序列具有很大的相似性,如 NX/08/8(固原市原州区)和 NX/08/47(银川市兴庆区)同源性为 99.9%,NX/08/30(贺兰县立岗镇)和 NX/08/31(银川市金凤区)同源性为 99.9%,但与中国大陆以往分离的 C4 亚型毒株有较大差异,提示 C4 基因亚型毒株在宁夏传播时间较长,而且此次流行中 EV71 可能存在多个传播链,同时也存在有输入性病例传播的可能。

根据各类标本的分离阳性率比较发现,粪便标本的检出率最高,其次为咽拭子和疱疹液。由此表明,引起手足口病的病毒在肠道内存活时间最长,从而印证了主要传播途径是粪-口;同时还可通过呼吸道飞沫和密切接触传播,因此有必要在手足口病流行时采取必要的隔离措施,防止疾病的进一步蔓延。

宁夏地区 2008 年暴发的手足口病疫情中,所有病例均无临床中枢神经系统症状;表明流行的 EV71 株可能是毒力较弱的一组。但目前有关 EV71 基因

表 1 宁夏地区 EV71 分离株与各基因型代表株 VP1 区核苷酸和氨基酸序列同源性分析(%)

分离株	A	B	C1	C2	C3	C4 ^a	C4 ^a
NX/08/11	83.4(95.3)	85.0(97.3)	89.0(98.7)	89.7(98.3)	88.6(98.3)	92.5(96.6)	98.7(100.0)
NX/08/12	82.7(94.6)	85.2(97.3)	88.9(98.7)	89.9(98.3)	88.6(97.7)	92.0(96.6)	99.1(99.3)
NX/08/13	82.2(95.0)	85.1(98.0)	89.1(99.3)	89.6(98.7)	88.6(98.3)	92.4(97.3)	96.9(99.3)
NX/08/14	82.6(94.6)	84.5(97.3)	89.5(98.7)	89.8(99.0)	88.7(98.3)	92.7(97.3)	98.4(99.3)
NX/08/15	82.7(95.0)	84.6(97.7)	89.6(99.0)	89.7(98.7)	88.6(98.0)	92.6(97.0)	98.5(99.7)
NX/08/17	83.0(94.6)	84.8(97.3)	89.0(98.7)	89.5(99.0)	87.9(98.3)	91.7(97.3)	97.4(99.3)
NX/08/19	82.6(94.6)	84.8(97.3)	89.2(98.7)	89.7(99.0)	88.1(98.3)	92.2(97.3)	97.6(99.3)
NX/08/21	82.6(95.0)	85.5(97.7)	89.7(99.0)	89.9(98.7)	88.8(98.0)	92.9(97.0)	99.1(99.7)
NX/08/24	82.6(94.3)	85.1(97.0)	88.8(98.3)	90.0(98.7)	88.7(98.0)	92.2(97.0)	99.0(99.0)
NX/08/25	83.0(95.0)	85.3(97.7)	89.1(99.0)	89.8(98.7)	88.5(98.0)	92.4(97.0)	99.4(99.7)
NX/08/28	83.0(94.6)	84.8(97.3)	89.0(98.7)	89.5(99.0)	87.9(98.3)	91.7(97.3)	97.4(99.3)
NX/08/29	82.7(95.0)	85.3(97.7)	89.0(99.0)	89.9(98.7)	88.8(98.0)	92.3(97.0)	97.3(99.7)
NX/08/03	82.6(95.0)	85.0(97.7)	89.7(99.0)	89.9(98.7)	88.8(98.0)	92.9(97.0)	99.1(99.7)
NX/08/30	82.5(94.6)	84.9(97.3)	89.3(98.7)	89.8(99.0)	88.2(98.3)	92.2(97.3)	97.6(99.3)
NX/08/31	82.5(94.6)	85.0(97.3)	89.3(98.7)	89.8(99.0)	88.2(98.3)	92.3(97.3)	97.8(99.3)
NX/08/33	82.6(94.6)	85.2(97.3)	88.9(98.7)	89.8(98.3)	88.7(97.7)	92.2(96.6)	97.2(99.3)
NX/08/36	82.8(94.6)	84.9(97.3)	89.1(98.7)	89.6(99.0)	88.0(98.3)	91.8(97.3)	97.5(99.3)
NX/08/37	82.7(94.6)	85.1(97.3)	89.0(98.7)	89.6(99.0)	88.0(98.3)	91.8(97.3)	97.5(99.3)
NX/08/38	82.7(95.0)	85.3(97.7)	89.2(99.0)	89.9(98.7)	89.0(98.3)	92.3(97.0)	97.3(99.7)
NX/08/04	82.6(95.0)	84.8(97.7)	89.2(99.0)	89.3(98.7)	88.1(98.0)	92.3(97.0)	98.3(99.7)
NX/08/41	82.8(94.6)	85.3(97.3)	88.9(98.7)	89.8(98.3)	88.5(97.7)	92.2(96.6)	99.2(99.3)
NX/08/43	82.7(94.3)	84.8(97.0)	89.0(98.3)	89.5(98.7)	87.9(98.0)	91.7(97.0)	97.4(99.0)
NX/08/45	82.6(95.0)	84.8(97.7)	89.2(99.0)	89.3(98.7)	88.1(98.0)	92.3(97.0)	98.3(99.7)
NX/08/47	82.1(94.6)	85.2(97.7)	88.1(99.0)	88.8(98.3)	87.9(98.0)	92.3(97.0)	96.5(99.0)
NX/08/48	82.8(95.0)	85.4(97.7)	89.1(99.0)	89.8(98.7)	88.9(98.0)	92.4(97.0)	97.4(99.7)
NX/08/05	82.8(95.0)	84.8(97.7)	89.5(99.0)	89.8(98.7)	88.7(98.0)	92.7(97.0)	98.7(99.7)
NX/08/07	82.6(94.6)	84.9(97.3)	89.2(98.7)	89.7(99.0)	88.1(98.3)	92.2(97.3)	97.6(99.3)
NX/08/08	82.2(94.6)	85.1(97.7)	88.2(99.0)	88.9(98.3)	88.0(98.0)	92.4(97.0)	96.6(99.0)
NX/08/09	82.8(94.6)	84.9(97.3)	89.1(98.7)	89.6(99.0)	88.0(98.3)	91.8(97.3)	97.5(99.3)

注: A:U22521-BrCr; B:U22522-MS/7423/87; C1:AY207626-0389-MAA-00; C2:AF286522-2912-TAI-98; C3:AY125971-KOR-EV71-07; C4^a:AF302996-SHZH98; C4^b:AF286531-3254-TAI-98; 括号外数据为核苷酸同源性;括号内数据为氨基酸同源性

型与毒株致病力、神经毒性的关系尚无定论,缺乏不同致病力 EV71 毒株间的关联性和差异性资料,所以为了更好地控制和预防手足口病,有待于开展更细致的手足口病监测工作,以阐明 EV71 毒株在我国的起源、流行和进化。

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(3):304-309.

[2] Brown BA, Oberste MS, Alexander JP, et al. Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998. J Virol, 2000, 74(24):9969-9975.

[3] 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.

[4] Wu TC, Wang YF, Lee YP, et al. Immunity to avirulent enterovirus 71 and coxsackie A16 virus protects against enterovirus 71 infection in mice. J Virol, 2007, 81(19):10310-10315.

[5] Shimizu H, Utama A, Onnimala N, et al. Molecular epidemiology of enterovirus 71 infection in the Western Pacific Region. Pediatr Int, 2004, 46(2):231-235.

[6] Bouslama MN, Harrath R, Ben Othman H, et al. Molecular phylogeny and genetic variability of echovirus 71 based on the analysis of 3' end of the VP1 gene. Ann Biol Clin, 2007, 65:621-628.

[7] 田波, 段海生, 荣一兵, 等. 肠道病毒 71 型分子流行病学研究进展. 中国病毒学, 2004, 19(4):426-429.

[8] Shih SR. Genetic analysis of enterovirus 71 isolated from fatal and nonfatal cases of hand-foot-and-mouth disease during an epidemic in Taiwan. Virus Res, 2000, 31:127-136.

(收稿日期:2009-02-23)
(本文编辑:尹廉)