

的免疫力下降有关,建议高年龄组人群通过增加接种针次来提高免疫效果。国产人用狂犬病疫苗及国产与进口疫苗混合接种者血清抗体阳性率明显高于进口疫苗接种者,杨洁等^[1]曾报道可能存在疫苗抗原与试剂包被抗原不匹配的原因。目前国内间接 ELISA 人用狂犬病病毒 IgG 抗体试剂盒具有一定的非特异性反应,除了检测狂犬病病毒抗体成分外,可能还有其他非特异性成分^[2]。进口疫苗纯化程度高于国产疫苗,产生的特异性会更高,如果包被抗原中有效成分不足,会导致狂犬病病毒抗体检测率降低。另外不同厂家生产的检测试剂,其抗体检测阳性率和抗体滴度均存在差异,对免疫效果检测造成一定的误差。有条件的单位应推广使用快速荧光灶抑制试验(RFFIT)^[3]。分析不同免疫程序与血清抗体阳性率的关系,全程免疫者抗体阳性率高于未全程免疫者;首次全程免疫抗体阴性者(狂犬病毒中和抗体未达到 0.5 IU/ml 安全浓度)加强注射 1~3 针后,抗体提高到 99.44%;注射抗狂犬病病毒血清后再进行全程免疫者抗体阳性率达 99.79%。表明狂犬疫苗注射后与免疫次数、剂量等因素有关;抗体阳性率在在一定范围随着针次的增加而提高;严重咬伤者注射抗狂犬病病毒血清后再进行全程免疫可获得满意效果。分析不同采血时间对抗体阳性率的影响,在距接种最后 1 针 20 d 内采血检测阳性率最高,随着采血时间的延长抗体阳性率逐渐下降,60 d 后采血检测阳性率仅为 75.00%,因此应注意采血时间对抗体检测结果的影响。吴迎春等^[4]曾报道,由于疫苗运输贮存条件不同和人群对接种知识掌握不全面等因素导致乡镇接种点的抗体阳性率明显低于城区接种点。分析城

区和乡镇接种点血清抗体阳性率无明显差异,随着卫生资源投入,乡镇接种点冷链车、专用冰箱的配备,疫苗运输贮存的条件得到极大改善;同时采用知情同意书告知接种者按规程进行全程疫苗接种、及时采血检测以及抗体阴性者及时进行加强免疫等措施,可大大提高人群免疫效果。

参 考 文 献

- [1] Yang J, He JG, Zhang TG, et al. Analysis of antibody level of 891 individuals after being inoculated rabies vaccine in Beijing. Chin J Health Laborat Technol, 2008, 18(12):2711. (in Chinese)
杨洁,和京果,张铁钢,等.北京市 891 例狂犬病疫苗接种后抗体水平分析.中国卫生检验杂志,2008,18(12):2711.
- [2] Wang WW, Zhang GQ, Xu LF. Progress in research on determination of rabies virus antibody by ELISA. Chin J Biol, 2010, 23(6):669-672. (in Chinese)
王伟,张国强,许丽峰.酶联免疫法检测抗狂犬病病毒抗体的研究进展.中国生物制品学杂志,2010,23(6):669-672.
- [3] Ministry of Health of the People's Republic of China. The standard of preventive treatment for rabies exposure (2009 Ed.). 2009. (in Chinese)
中华人民共和国卫生部.狂犬病暴露预防处置工作规范(2009).2009.
- [4] Wu YC, Chen FY, Yu ZX, et al. Detection of the immunization effect after inoculating rabies vaccine among 3174 individuals. Jiangsu Health Care, 2009, 11(1):16. (in Chinese)
吴迎春,陈芳云,俞志祥,等.接种狂犬病疫苗 3174 例免疫效果分析.江苏卫生保健,2009,11(1):16.

(收稿日期:2010-04-15)

(本文编辑:万玉立)

一株埃可病毒 25 型河南分离株全基因特征分析

晁灵 黄学勇 李幸乐 许汴利

【关键词】埃可病毒 25 型;全基因序列

Analysis on genomic characteristics of Echo25 strains isolated from Henan province CHAO Ling¹, HUANG Xue-yong², LI Xing-le², XU Bian-li². 1 College of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 2 Henan Center for Disease Control and Prevention

Corresponding author: XU Bian-li, Email: xubl@hncdc.com.cn

This work was supported by a grant from the Henan Medical Science and Technique Foundation (No. 200702016).

【Key words】Echo25; Complete genome

埃可病毒 25 型(Echo25)是一种常见的肠道病毒,2008 年河南省从病毒性脑炎患者脑脊液中分离出 4 株 Echo25。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.01.022

基金项目:河南省医学科技攻关项目(200702016)

作者单位:450001 郑州大学公共卫生学院(晁灵);河南省疾病预防控制中心(黄学勇、李幸乐、许汴利)

通信作者:许汴利, Email: xubl@hncdc.com.cn

鉴于目前除原型株 JV-4 外,尚未有 Echo25 全基因序列的测定,为了解其基因特征,本研究对其中 1 株进行全基因组序列测定。

1. 材料与与方法:

(1)毒株来源:待测病毒株是 2008 年河南省疾病预防控制中心(CDC)传染病预防控制所病毒性脑炎实验室分离并保存的毒株,命名为 HN-02。

(2)引物设计:根据原型株 JV-4(A Y302549)序列,设计 11 对首位相互重叠、覆盖全基因组的引物(表 1)。

(3)RNA 提取及反转录:将病毒接种于 RD 细胞,待细胞病变达 75% 时收获, -20 °C 反复冻融 3 次;用美国 Qiagen 公司的 Rneasy Mini 试剂盒提取 RNA,用大连宝生物公司的 PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis 试剂盒反转录 cDNA,所有操作按照说明书进行。

(4)PCR 扩增:PCR 反应体系(50 μl): 10× Buffer 5 μl, 4×dNTP 混合物 4 μl, 0.4 μl Taq 酶, cDNA 3 μl, 上下游特异引物(25 μm)各 1 μl。反应条件:94 °C 4 min; 94 °C 50 s,

表1 Echo25全基因组扩增引物序列

引物	序列(5'~3')	位置
1-F	TTAAAACAGCCTGTGGGTT	1~19
1-R	GTTAGCTCCCATCTTGCAC	735~754
2-F	GCCATATAGCTATTGGATTG	613~632
2-R	CTGGTGGAATTTGGATGCGTTG	1290~1311
3-F	TACATGCAGATTTACACTTTG	1125~1147
3-R	CAAAGTTCTCTTAAATACATT	2008~2028
4-F	CAAGGTTACCGACAATGCT	1729~1748
4-R	TAGAGGTCTGCCAAGATAAT	2921~2941
5-F	AATGACCCGGCTACCGCCATC	2448~2468
5-R	GTGGCTTACCATCGAAGG	3306~3323
6-F	CACGGTTCGGGTTTACTT	3147~3164
6-R	GCCCACCAGCGACTCTTT	3868~3873
7-F	TGCTGTGGTTGGAGGATG	3740~3757
7-R	GTTGGTGGCGACCGATTT	4471~4488
8-F	CCACTTTACGCAATTGAG	4342~4359
8-R	TTTGAAGGTAGAATTAAC	5197~5215
9-F	AGGAGAAGGGATGGCTGG	5171~5188
9-R	AGTGCTTGAGGAGGGCTG	5913~5920
10-F	GTCCTCATGTCCACTGGT	5836~5843
10-R	CTCAAACCTGGCATCGTAG	6655~6662
11-F	GACAGGCAGTGCAGTTGG	6552~6569
11-R	GTTTGAATGACTCCGTGGCG	7407~7426

40℃ 50 s, 72℃ 90 s, 共35个循环; 72℃ 10 min. PCR扩增产物经1.2%琼脂糖凝胶电泳鉴定, 产物纯化后送南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序。

(5)序列分析: 使用DNASar软件中的SeqMan程序将所测片段拼接起来, 得到HN-02全基因序列。从GenBank上选取同源性较高的其他型人肠道病毒B组(HEVB)如Echo病毒及柯萨奇病毒(CBV)等基因序列, 用BioEdit软件进行同源性比较。

(6)序列登录号: 所测HN-02全基因序列提交至GenBank。

2. 结果:

(1)HN-02是一条单股正链RNA, 除3'末端的多聚腺苷

酸尾(PolyA)外, 全长7423 bp。分为3个区: 743 bp的5'非编码区(5' UTR)、6584 bp的编码区(CDS)、96 bp的3' UTR。HN-02基因组特征为AT含量丰富, 占52.57%。HN-02分离株与原型株JV-4全基因序列核苷酸同源性为81.4%(表2)。

(2)5'和3'UTR: 与原型株JV-4相比, HN-02株5'UTR核苷酸同源性最高, 为83.0%, 3'UTR核苷酸同源性为74.7%。与HEVB其他型相比, 5'UTR核苷酸差异为13.2%~19.2%, 3'UTR核苷酸差异为12.2%~21.3%。各型别间5'UTR区核苷酸序列较保守。

(3)CDS特征: 与原型株JV-4相比, HN-02所编码的氨基酸差异为3.5%; 核苷酸差异为18.8%, 其中VP4-VP2核苷酸差异为18.6%~19.2%, VP1核苷酸差异为19.6%; P2、P3核苷酸差异分别为17.5%、19.9%。与HEVB其他型相比, VP4-VP2核苷酸差异为20.5%~34.3%, VP1核苷酸差异为30.9%~40.1%; P2、P3核苷酸差异为11.0%~19.4%。

(4)所测HN-02全基因序列提交至GenBank, 所得序列号为HM031191。

3. 讨论: 相对于5'UTR区, HN-02 CDS序列不断变异, 但这些变异为同义突变, 并不影响氨基酸序列^[1]。肠道病毒基因组中以衣壳蛋白VP1、VP2、VP3 CDS较易发生变异, 其中VP1蛋白上关键的抗原表位变化会影响病毒对宿主细胞的吸附及其免疫原性, 从而改变病毒的毒力^[2]。HN-02与HEVB其他型同源性分析发现, P1区氨基酸差异较大, 为18.8%~29.4%, P2、P3区相对保守, 氨基酸同源性均在95%以上, 表明不同区域在进化中并不同步。基因重组不仅仅发生在衣壳区, P2、P3区基因重组也很频繁, 有研究表明, 基因重组为肠道病毒进化的主要机制^[3]。随着新型肠道病毒的不断出现^[4]及肠道病毒频繁的基因重组^[2], 为进一步了解该病毒的基因特性, 应对肠道病毒UTR、病毒基因重组及抗原性改变情况等作更多的研究, 为疾病的防治提供详实的基础性资料。

表2 HN-02株与其他型HEVB毒株同源性比较结果(%)

病毒株	全基因组	5'UTR	CDS	P1	VP4	VP2	VP3	VP1	P2	P3	3'UTR
AY302549(ECHO25)	81.4	83.0	81.2(96.5)	81.4(96.1)	81.4(94.2)	81.0(98.0)	80.8(96.6)	80.4(97.5)	80.1(96.0)	82.5(97.3)	74.7
AY948442(ECHO30)	79.3	86.8	78.3(90.3)	74.7(80.0)	74.7(91.4)	70.7(82.5)	70.8(81.0)	67.2(97.1)	81.7(96.0)	85.4(97.6)	86.8
DQ246620(ECHO30)	79.3	86.7	78.3(90.7)	73.0(80.3)	73.8(91.4)	70.8(82.9)	70.7(81.9)	67.2(97.5)	81.9(96.8)	85.2(97.8)	87.8
EF155423(AMS573)	77.4	86.0	76.9(90.5)	76.1(81.2)	76.1(92.8)	72.6(83.7)	70.4(81.0)	69.1(98.9)	80.6(95.8)	80.8(97.1)	84.6
AY302547(ECHO21)	78.0	83.8	77.3(90.7)	79.5(80.7)	79.5(94.2)	73.7(82.9)	71.4(82.3)	68.8(98.2)	80.9(96.5)	80.8(97.6)	78.7
FJ172447(ECHO4)	78.7	80.8	78.5(87.9)	74.2(73.8)	74.2(92.8)	71.0(79.8)	67.9(72.2)	60.6(98.2)	82.1(95.6)	89.0(97.8)	81.9
AF524867(ECHO9)	77.6	86.8	76.5(86.4)	74.2(70.6)	74.2(92.8)	70.0(77.6)	65.7(69.4)	59.9(96.7)	82.1(96.7)	84.8(97.5)	82.6
FJ000001(CBV3)	78.1	86.5	77.1(87.7)	78.5(73.1)	78.5(91.4)	67.9(78.0)	70.3(74.3)	61.0(97.1)	81.9(95.8)	85.2(98.1)	81.8
GQ141875(CBV3)	78.1	86.8	77.1(87.8)	78.5(73.1)	78.5(91.4)	67.3(77.6)	69.6(74.7)	61.4(97.5)	81.8(96.0)	85.4(98.1)	80.0

注: 括号外数据为核苷酸同源性比较, 括号内数据为氨基酸同源性比较

参 考 文 献

[1] Nasri D, Bouslama L, Pillet S, et al. Basic rationale, current methods and future directions for molecular typing of human enterovirus. Expert Rev Mol Diagn. 2007, 7(4):419-434.
 [2] 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.

[3] Oberste MS, Peñaranda S, Pallansch MA. RNA recombination plays a major role in genomic change during circulation of coxsackie B viruses. J Virol, 2004, 78(6):2948-2955.
 [4] Oberste MS, Maher K, Michele SM, et al. Enteroviruses 76, 89, 90 and 91 represent a novel group within the species human enterovirus A. J Gen Virol, 2005, 86(Pt 2):445-451.

(收稿日期: 2010-05-19)
(本文编辑: 王玉立)