

埃可病毒 11 型山东株分子流行病学研究

樊庆莹 王海岩 杨赫 冯艺 张岩 李岩 陶泽新 纪峰 宋立志 刘桂芳
刘尧 冯蕾 徐爱强

【摘要】 目的 分析埃可病毒 11 型(Echo11)山东分离株的分子流行病学特征。方法 对 1994—2009 年山东省急性弛缓性麻痹监测系统中采集到的粪便标本,采用 RD、Hep-2 和 L20B 3 种细胞进行病毒分离;对阳性分离物采用中和试验确定其血清型别;选取 27 株 Echo11 山东株病毒,测定 VP1 完整编码区序列,与国外其他病毒株进行同源性分析并构建 VP1 区全基因亲缘进化树,分析其进化来源及不同基因型的流行范围。结果 1994—2009 年山东省急性弛缓性麻痹病例标本共分离出 915 株已确定血清型的非脊髓灰质炎肠道病毒(NPEV),其中 Echo11 79 株,占 8.6%。Echo11 山东株 VP1 区全长共 876 个核苷酸,编码 292 个氨基酸;27 株 Echo11 VP1 区山东株之间核苷酸同源性为 76.4%~100.0%,氨基酸同源性为 91.4%~100.0%;与原型 Gregory 株之间核苷酸同源性为 77.7%~80.7%,氨基酸同源性为 90.7%~94.8%。结论 山东省存在 Echo11 A 基因型和 C 基因型流行,并构成 A1、A2 和 C1 三个新基因亚型,且不同亚型内存在着多条传播链,A1 亚型为近年山东省流行的基因亚型。

【关键词】 埃可病毒 11 型;基因特征;分子流行病学

Study on the genetic characterization and molecular epidemiology of echovirus 11 strains isolated in Shandong province, China FAN Qing-ying¹, WANG Hai-yan², YANG He¹, FENG Yi², ZHANG Yan², LI Yan², TAO Ze-xin², JI Feng², SONG Li-zhi², LIU Gui-fang², LIU Yao², FENG Lei², XU Ai-qiang^{1, 2}. 1 Institute of Epidemiology and Health Statistics, School of Public Health Shandong University, Jinan 250012, China; 2 Shandong Provincial Center for Disease Control and Prevention, Shandong Provincial Key Laboratory of Infectious Disease Control and Prevention
Corresponding author: XU Ai-qiang, Email: aqxuepi@163.com

This work was supported by grants from the National Science and Technology Major Projects (No. 2009ZX10004-202) and Shandong Scientific Research Major Project on Medicine (No. 2007HZ090).

【Abstract】 **Objective** To analyze the evolution and genetic characterization of echovirus 11 (Echo11) from the acute flaccid paralysis (AFP) cases in Shandong province. **Methods** Isolation of Enterovirus was performed from stool samples of AFP cases from 1994 to 2009. All positive strains were sero-typed by neutralization test. Entire VP1 coding region from 27 strains typed as Echo11 was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and subsequently phylogenetic analyse on VP1 sequences from these strains and others published in GenBank were conducted. **Results** From 1994 to 2009, altogether 915 non-polio enterovirus (NPEV) strains were isolated with 79 (8.6%) isolates serotyped as Echo11. There were 876 nucleotides (nt) in the complete VP1 genes, encoding 292 amino acids (aa). The nt identities were 76.4%–100.0% among those Echo11 Shandong strains with the aa identities as 91.4%–100.0%. The nt and aa identities were 77.7%–80.7% and 90.7%–94.8% between Shandong strains and prototype strains, respectively. **Conclusion** All Echo11 strains could be divided into four genotypes. Shandong strains that forming three (A1, A2 and C1) new sub-genotypes, with every sub-genotype had several brands. Sub-genotype A1 appeared to be the lately circulating one.

【Key words】 Echovirus 11; Genetic characterization; Molecular epidemiology

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.02.012

基金项目:国家科技重大专项(2009ZX10004-202);山东省医药卫生重点项目计划课题(2007HZ090)

作者单位:250012 济南,山东大学公共卫生学院流行病与卫生统计学研究所(樊庆莹、杨赫、徐爱强);山东省疾病预防控制中心山东省传染病预防控制重点实验室(王海岩、冯艺、张岩、李岩、陶泽新、纪峰、宋立志、刘桂芳、刘尧、冯蕾、徐爱强)

樊庆莹、王海岩同为第一作者

通信作者:徐爱强, Email: aqxuepi@163.com

人类肠道病毒(HEV)目前共有 90 多个血清型,分为 4 个基因组:A、B、C、D^[1,2]。除脊髓灰质炎(脊灰)病毒(PV)外,非脊灰肠道病毒(NPEV)感染亦与急性弛缓性麻痹(AFP)之间关系密切。在全球消灭脊灰的病毒学监测工作中,从 15 岁以下 AFP 病例的粪便标本中分离到大量的 NPEV。山东省 AFP 病例病毒学监测分析结果显示,埃可病毒 11 型(Echo11)为优势流行株之一^[3]。为了解山东省 AFP 病例标本中分离出的 Echo11 病毒的基因特征和分子进化,本研究对 1994—2009 年山东省 AFP 监测系统中分离到的部分 Echo11 病毒进行 VP1 区全基因序列的测定和进化树分析。

材料与方法

1. 标本来源:所有标本来自 1994—2009 年山东省 AFP 监测系统。AFP 病例发病 14 d 内,由各市、县疾病预防控制中心(CDC) 24 h 内采集双份粪便标本,在无菌容器内冷藏运送至山东省 CDC 脊灰实验室。

2. 病毒分离和血清学检测:按文献[4]的操作流程对粪便标本进行预处理,取 0.2 ml 标本悬液接种到 RD、Hep-Ⅱ 和 L20B 3 种细胞上,36 ℃ 培养,盲传 2 代,出现细胞病变后,收获-20 ℃ 保存;用 HEV 组合血清(KMB)采用微量板中和法对阳性分离物进行血清型别鉴定。

3. 病毒株的选择:1994—2009 年常规 AFP 监测中共分离到 915 株 NPEV,血清学检测结果显示 Echo11(79 株),占 8.6%。根据病毒株的分离年代和地区,随机选取 27 株 Echo11 山东株进行 VP1 区序列测定和分析。除山东省青岛市、烟台市外,其他地市均选择病毒株进行研究,其中章丘市和聊城市选取的病毒株数目较多,分别为 4 株和 3 株,其余地市为 1~2 株。

4. 病毒 RNA 的提取:使用美国 QIAamp Viral RNA Mini 试剂盒,操作按照说明书进行。从 200 μl 的细胞培养物中提取 50 μl RNA,加入 1 μl 的 RNA 酶抑制剂,-20 ℃ 保存。

5. RT-PCR:参照文献[5]分别合成扩增 HEV VP1 基因片段的引物:187(ACI GCI GYI GAR ACI GGN CA)、011(GCI CCI GAY TGI TGI CCR AA)、008(GCR TGC AAT GAY TTC TCW GT)、013(GGI GCR TTI CCY TCI GTC CA),将上述引物稀释至工作浓度 25 μmol/L,采用美国 Promega 公司的 Access RT-PCR System 一步法试剂盒分别扩增 VP1 编码区

3'端 670 bp 和 5'端 640 bp 片段。反应条件为:反转录 45 ℃ 45 min,94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 30 s,45 ℃ 30 s,72 ℃ 40 s,32 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。

6. 核苷酸序列测定和同源性分析:PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,阳性产物送北京华大生物技术有限公司,分别以引物 187、008 进行序列测定,将得到的 VP1 区序列通过拼接得到 VP1 全长核苷酸序列。多序列比对采用 BioEdit Sequence Alignment Editor software 5.0.9 软件,使用 MEGA4.0 软件,邻接法(Neighbor-joining)构建系统发生树,进化树的可靠性通过 1000 bootstrap 值来评估。基因序列提交至 GenBank。

结 果

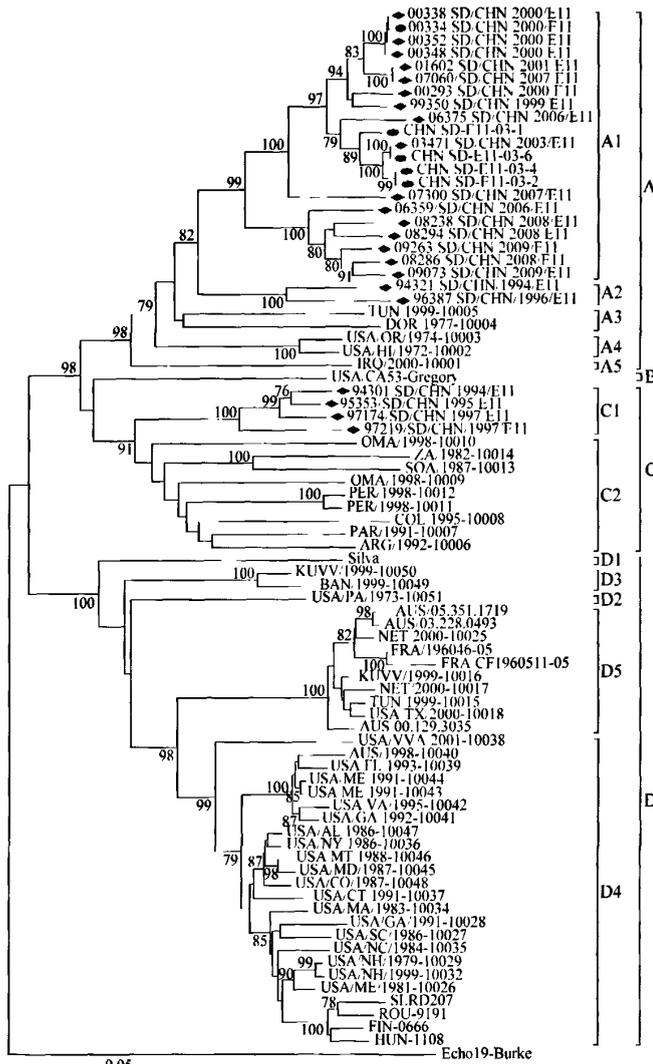
1. 病毒分离与血清型检测:1994—2009 年山东省 AFP 病例标本中共分离到 915 株 NPEV,血清学检测结果显示 Echo11 分离株最多,共 79 株,占 8.6%,其次为柯萨奇 B3 病毒(CB3)和 Echo6,分别为 56 株(6.1%)和 53 株(5.8%)。1995、1997、2000、2003 和 2008 年分离的 Echo11 病毒株数目较多,分别为 8、7、16、12 和 15 株病毒。

2. VP1 区全基因序列同源性比较:选取的 27 株 Echo11 山东株 VP1 区全长共 876 个核苷酸,编码 292 个氨基酸。同源性比较结果显示:所有山东株之间的核苷酸同源性为 76.4%~100.0%,氨基酸同源性为 91.4%~100.0%;与 Gregory 原型株之间的核苷酸同源性为 77.7%~80.7%,氨基酸同源性为 90.7%~94.8%;与 Silva 变异株之间的核苷酸同源性为 72.7%~75.9%,氨基酸同源性为 85.2%~89.0%。

3. VP1 区全基因序列进化树分析:将 27 株山东株与 GenBank 中发布的其他国家的 53 株 Echo11 病毒株序列构建 VP1 区全基因进化树(图 1)。根据 HEV“基因型”划分的标准:即相同基因型病毒株之间核苷酸序列同源性>80%,不同基因型成员之间序列差异大于型内成员之间的差异^[6,7],Echo11 病毒株可划分为 A、B、C、D 4 个基因型,山东株分布在 A 基因型和 C 基因型。4 个基因型之间的同源性比较见表 1。

A 基因型内山东株与国外病毒株之间的核苷酸同源性为 80.2%~84.7%,氨基酸同源性为 94.1%~99.6%。C 基因型内山东株与国外病毒株之间的核苷酸同源性为 81.5%~86.3%,氨基酸同源性为 94.8%~97.2%。

A 基因型又可以划分为 5 个亚型,C 基因型分为



注：◆ 本研究中的 Echo11 山东株；● 已发表的 Echo11 山东株
 图 1 Echo11 病毒 VP1 区全基因序列进化树

2 个亚型, D 基因型划分为 5 个亚型。山东株构成 A1、A2 和 C1 三个新基因亚型, A1 亚型均分离自 1998 年之后, 病毒株之间的核苷酸变异 < 13.7%, 氨基酸变异为 < 3.8%; A2 和 C1 两亚型内的病毒株均分离自 1994—1997 年, A2 亚型内病毒株的核苷酸变异为 8.5%, 氨基酸变异为 1.8%; C1 亚型病毒株间核苷酸变异为 3.2%~8.4%, 氨基酸同源性为 <

2.4%。3 个亚型山东株之间的同源性比较见表 2。

4. VP1 基因序列提交至 GenBank, 所得序列号为 DQ220784~DQ220787、HM446206~HM446215、HQ286038~HQ286044。

讨 论

Echo11 可以引起几乎所有的 HEV 性疾病, 大多没有明显的临床症状, 但也可以引起无菌性脑膜炎、手足口病等较为严重的疾病, 是较为受关注的一系列新生儿严重疾病^[8-12]。Echo11 是世界各地最常分离出的 HEV 之一^[7], 山东省 AFP 病例病毒学监测显示 Echo11 数量最多, 构成比为 8.6%, 与以往研究结果一致^[13-15], 但与之相关的疾病暴发尚未见报道。

Echo11 山东株 VP1 全长 876 个核苷酸, 编码 292 个氨基酸, 无碱基的插入与缺失, 但与 Gregory 原型株 (1953 年) 的核苷酸差异为 19.3%~22.3%, 氨基酸差异为 5.2%~9.3%, 核苷酸的变异引起相应氨基酸的变异, 且序列变异较大, 这可能与原型株的年代较为久远, 且病毒地域分布较为广泛有关, 同时也提示 Echo11 较为适应环境。相对于 Gregory 原型株, 山东株与 Silva 变异株 (1963 年) 之间的变异更为显著, 核苷酸变异为 24.1%~27.3%, 氨基酸变异为 11.0%~14.8%, 虽然本次研究没有使用抗-Gregory 抗血清和抗-Silva 抗血清对山东株进行中和实验, 但根据同源性比较结果, 推测山东株为原型株相似株而非变异株 Silva 的相似株。

将 Echo19-Burke 株设定为外部组, 按照 Bootstrap 法对 Echo11 进行基因分型, Echo11 病毒株序列可以分为 4 个基因型, 与以往研究结果相同^[12]。各基因型间的序列变异较大, 核苷酸变异在

表 1 Echo11 山东株各基因型同源性分析 (%)

基因型	A	B	C	D
A	80.2~100.0(93.8~100.0)	77.7~80.9(90.7~93.4)	75.3~80.3(91.4~94.8)	70.1~78.1(83.9~91.0)
B		a	79.2~81.3(93.8~95.5)	75.4~78.3(85.9~91.0)
C			81.5~98.0(94.8~100.0)	72.3~79.1(84.9~91.4)
D				79.5~99.4(88.6~100.0)

注: 括号外数据为核苷酸同源性, 括号内数据为氨基酸同源性; a: 代表此基因型内只有一个病毒株

表2 山东省3个亚型病毒株与Gregory株、Silva株之间的同源性分析(%)

基因型	A1	A2	C1	Gregory	Silva
A1	-	83.9 ~ 86.0	76.8 ~ 78.8	77.7 ~ 79.5	72.7 ~ 74.7
A2	95.5 ~ 98.2	-	76.4 ~ 77.7	78.0 ~ 78.5	75.5 ~ 75.9
C1	91.4 ~ 94.1	92.4 ~ 93.4	-	79.6 ~ 80.7	74.6 ~ 75.9
Gregory	90.7 ~ 93.4	92.4 ~ 92.8	93.8 ~ 94.8	-	75.9
Silva	85.2 ~ 87.6	87.3 ~ 87.6	88.6 ~ 89.0	89.3	-

注:黑体为核苷酸同源性,白体为氨基酸同源性

18.7%~29.9%之间,氨基酸变异在4.5%~16.1%,提示Echo11在进化上较为活跃。山东株位于A基因型和C基因型内,形成A1、A2和C1三个新的基因亚型,亚型之间的核苷酸同源性为76.4%~86.0%,氨基酸同源性为91.4%~98.2%,3个亚型之间的同源性差异较大可能与山东地域广阔、病毒株分离时间跨度较大且在山东省AFP监测中Echo11分离数量较大有关。A1亚型内病毒株数目最多,包含所分析的1999—2009年的全部病毒株,病毒株之间的核苷酸同源性为86.3%~100.0%,氨基酸同源性为96.2%~100.0%;A2和C1两基因亚型包含1994—1997年的病毒株,两基因亚型内病毒株序列的核苷酸同源性为76.4%~77.7%,氨基酸同源性为92.4%~93.4%,说明此期间山东省境内有两个差异较大的Echo11基因亚型共循环,而A1亚型内的病毒株为近年流行的基因亚型;同时3个亚型内山东株之间存在较大的差异,显示这些亚型内存在着多条传播链。

A基因型内山东株与国外病毒株之间核苷酸差异为15.3%~19.8%;C基因型内山东株与国外病毒株之间核苷酸差异为13.7%~18.5%,表明山东株与国外病毒株之间无直接的流行病学联系。

随着消灭脊灰的进展和保持无脊灰状态,国内已无由PV引起的麻痹病例,由NPEV引起的其他疾病日益受到人们的重视。在所有的NPEV病毒株中Echo11分离株较多,本研究有助于Echo11所致疾病的预防及控制。

参 考 文 献

[1] 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.

[2] Oberste MS, Maher K, Nix WA, et al. Molecular identification of 13 new enterovirus types, EV79-88, EV97, and EV100-101, members of the species human enterovirus B. *Virus Res*, 2007, 128(1-2): 34-42.

[3] Ji F, Xu AQ, Wang HY, et al. Analysis on the virological surveillance for acute flaccid paralysis cases in Shandong from 2000 to 2006. *Prev Med Trib*, 2008, 14(3): 199-204. (in Chinese)

纪峰,徐爱强,王海岩,等. 2000—2006年山东省急性弛缓性麻痹病例病毒学监测分析. *预防医学论坛*, 2008, 14(3): 199-204.

[4] WHO. *Polio laboratory manual*, 4th ed. Geneva: WHO, 2004: 83-96.

[5] Oberste MS, Mather 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.

[6] Rezig D, Ben Yahia A, Ben Abdallah H, et al. Molecular characterization of coxsackievirus B5 isolates. *J Med Virol*, 2004, 72(2): 268-274.

[7] Oberste MS, Nix WA, Kilpatrick DR, et al. Molecular epidemiology and type-specific detection of echovirus 11 isolates from the Americas, Europe, Africa, Australia, southern Asia and the Middle East. *Virus Res*, 2003, 91(2): 241-248.

[8] Somekh E, Shohat T, Handsher R, et al. An outbreak of echovirus 11 in a childrens home. *Epidemiol Infect*, 2001, 126(3): 441-444.

[9] Apisarnthanarak K, Kitphati R, Pongsuwann Y, et al. Echovirus type 11: outbreak of hand-foot-and-mouth disease in a Thai hospital nursery. *Clin Infect Dis*, 2005, 41(9): 1361-1362.

[10] Chen JH, Chiu NC, Chang JH, et al. A neonatal echovirus 11 outbreak in an obstetric clinic. *Microbiol Immunol Infect*, 2005, 38(5): 332-337.

[11] Chevaliez S, Szendroi A, Caro V, et al. Molecular comparison of echovirus 11 strains circulating in Europe during an epidemic of multisystem hemorrhagic disease of infants indicates that evolution generally occurs by recombination. *Virology*, 2004, 325(1): 56-70.

[12] Lukashiev AN, Lashkevich VA, Koroleva GA, et al. Molecular epidemiology of enteroviruses causing uveitis and multisystem hemorrhagic disease of infants. *Virology*, 2003, 307(1): 45-53.

[13] Song HJ, Zhang ZG, Zhang XY, et al. Analysis on surveillance of non-polio enteroviruses among acute flaccid paralysis cases. *Chin J Public Health*, 2004, 20(5): 601-602. (in Chinese)

宋慧军,张振国,张晓晔,等. 急性弛缓性麻痹病例非脊髓灰质炎肠道病毒分析. *中国公共卫生*, 2004, 20(5): 601-602.

[14] Chang Z, Zhao S, Feng DX, et al. The typing analysis on surveillance of non-polio enteroviruses among acute flaccid paralysis cases in Henan province. *Chin J Public Health*, 2004, 20(8): 968-969. (in Chinese)

常哲,赵升,丰达星,等. 河南省非脊髓灰质炎肠道病毒感染的分型研究. *中国公共卫生*, 2004, 20(8): 968-969.

[15] Ge Q, Gong LM, Yan JY, et al. Analysis on surveillance of non-polio enteroviruses among acute flaccid paralysis cases in Zhejiang province during 2004-2007. *Chin J Health Laborat Technol*, 2008, 18(10): 1982-1983, 2005. (in Chinese)

葛琼,龚黎明,严菊英,等. 浙江省2004—2007年急性弛缓性麻痹病例中非脊髓灰质炎肠道病毒分析. *中国卫生检验杂志*, 2008, 18(10): 1982-1983, 2005.

(收稿日期:2010-10-13)

(本文编辑:万玉立)