

· 实验室研究 ·

宁夏地区 1997—2011 年急性弛缓性 麻痹病例非脊髓灰质炎肠道病毒 分型鉴定分析

马江涛 陈慧 袁芳 马学旻 关光玉 詹军

【摘要】 目的 对 1997—2011 年宁夏地区急性弛缓性麻痹 (AFP) 病例中分离的 73 株非脊髓灰质炎肠道病毒 (NPEV) 进行分型鉴定。方法 采用简并引物 RT-PCR 对分离株进行 VP1 区基因扩增和序列测定, 测序结果进行 BLAST 比较和基因进化分析。结果 经过基因测序分析鉴定, 73 株 NPEV 中, 有 4 株无法定型, 另 69 株共包括 27 个血清型, 分别属于 A 组肠道病毒 (HEV-A) 和 HEV-B 组, 无 HEV-C 和 HEV-D 组毒株, 其中 HEV-A 组毒株包括 8 个血清型 23 株, HEV-B 组毒株包括 19 个血清型 46 株。69 株病毒中, 以 EV71 所占比例最大 (9/69), 以 CVA4、CVA16、Echo24、Echo6 和 Cox A9 所占比例较高。结论 1997—2011 年宁夏地区 AFP 病例分离的 NPEV 以 HEV-B 组为主要型别 66.7% (46/69)。

【关键词】 非脊髓灰质炎肠道病毒; 分子生物学定型; 流行病学

Typing and identification of non-polio enterovirus from acute flaccid paralysis cases in Ningxia, 1997–2011 MA Jiang-tao, CHEN Hui, YUAN Fang, MA Xue-min, GUAN Guang-yu, ZHAN Jun. Ningxia Center for Disease Control and Prevention, Yinchuan 750004, China
Corresponding author: ZHAN Jun, Email: nx_zhanjun@126.com.

【Abstract】 **Objective** To identify the serotype of 73 non-polio enterovirus (NPEV) strains from acute flaccid paralysis (AFP) cases in Ningxia province, during 1997–2011. **Methods** Partial sequencing of the VP1 region was amplified by RT-PCR with degenerate primers and sequenced while sequences were compared with the database of GenBank by the BLAST algorithm. Evolution was analyzed by constructing phylogenetic tree using Mega 5.1. **Results** In this study, a total of 73 NPEVs were analyzed, including 4 strains un-typed, 69 strains typed by RT-PCR. A total of 27 serotypes were identified, including 8 serotypes of human enterovirus (HEV) -A, 19 serotypes of HEV-B. The HEV-B group (46/69, 66.7%) constituted the largest proportion of isolates, followed by HEV-A (23/69, 33.3%), but no strains were found that belonged to HEV-C or HEV-D group. In the 69 strains, enterovirus 71 was the most frequently seen isolates, followed by coxsackie-virus A4, 16, 9 and echovirus 24, 6. **Conclusion** HEV-B was the most predominant (46/69, 66.7%) serotype of NPEV in Ningxia during the AFP surveillance, in 1997–2011.

【Key words】 Non-polio enterovirus; Molecular identification; Epidemiology

急性弛缓性麻痹 (AFP) 病例监测是脊髓灰质炎 (脊灰) 消除阶段和维持无脊灰阶段调整免疫策略的重要依据, 而随着全球脊灰野病毒的逐步消灭, 由非脊灰肠道病毒 (NPEV) 引起的 AFP 越来越引起重视。为了解宁夏地区 NPEV 的型别特征和流行病学规律, 本研究采用 RT-PCR 方法对 1997—2011 年 AFP 病例监测系统中分离到的 NPEV 进行型别鉴

定, 以期展示宁夏地区 AFP 病例中 NPEV 病原谱。

材料与方 法

1. 病毒株来源: 粪便标本来源于 1997—2011 年宁夏回族自治区 AFP 病例监测系统报告的 AFP 病例 (15 岁以下儿童), 绝大部分病例按照 WHO 的要求采集双份粪便, 所有粪便标本按照 WHO《脊髓灰质炎病毒实验室操作手册》处理后接种于 WHO 推荐的细胞, 出现病变后, 进行中和试验鉴定。鉴定后的脊灰毒株送国家脊灰实验室进行型内鉴定, 其余 NPEV 在 -20 °C 保存。本研究对历年来本实验室保

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2012.11.015

作者单位: 750004 银川, 宁夏回族自治区疾病预防控制中心

马江涛、陈慧同为第一作者

通信作者: 詹军, Email: nx_zhanjun@126.com

存的 NPEV 病毒株进行肠道病毒型别鉴定。

2. 研究方法:

(1) 病毒 RNA 提取和引物设计: 采用瑞士罗氏公司 High Pure Viral RNA Kit 试剂盒, 按操作说明书提取病毒 RNA。反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 及测序引物参照 Oberste 的方法, 选用不同引物对 (012/011、040/011) 进行 VP1 区基因扩增^[1], 对用上述引物不能扩增的毒株, 选用其他引物对 (187/222、188/222、189/222) 扩增^[2]。引物序列, 011: 5' -GCI CCI GAY TGI TGI CCR AA-3', 012: 5' -ATG TAY GTI CCI CCI GGI GG-3', 040: 5' -ATG TAY RTI CCI MCI GGI GC-3', 187: 5' -ACI GCI GYI GAR ACI GGN CA-3', 188: 5' -ACI GCI GTI GAR ACI GGN G-3', 189: 5' -CAR GCI GCI GAR ACI GGN GC-3', 222: 5' -CIC CIG GIG CIA YIW ACA T-3'。

(2) RT-PCR: 采用一步法 RT-PCR 扩增试剂盒 (美国 Invitrogen 公司), 反应体系: 2×反应缓冲液 (含 0.4 mmol/L dNTPs, 3.2 mmol/L MgSO₄) 12.5 μl, 酶混合物 (SuperScript[®] III RT/Platinum[®]Taq) 0.5 μl, 引物 012、040、011 (0.1 mmol/L) 各 1 μl, 模板 RNA 0.5 μl, 补足无 RNA 酶水至 25 μl。反应条件: 45 °C 30 min, 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 60 s, 40 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖电泳分析结果。

(3) 序列测定与分析: 电泳阳性的 PCR 产物 (500 bp 左右) 送北京博迈德公司进行测序, 测序结果使用 Sequencher 软件 (美国 Gene Codes 公司) 编辑整理后, 与 GenBank 数据库进行 BLAST 比较分析。病毒血清型别的确定参照 Oberste 等^[1]推荐的方法, 即 VP1 区的基因序列与基因库中标准株的同一区域的序列进行比较。种系进化树的分析选用 Mega 5.1 软件, 进化树的构建方法采用邻位连接法 (Neighbor-joining, NJ), 可信度评估 Bootstrap 设置为 1000。

结 果

1. NPEV 分离率: 1997—2011 年宁夏地区共报告 AFP 病例 521 例, 分离获得 73 株 NPEV, 其中包括 2008 年从 AFP 病例密切接触者粪便中分离的 15 株。AFP 病例中 NPEV 的分离率各年有所不同, 最低为 2004 年的 6.3%, 最高为 1998 年的 18.2%, 平均分离率为 11.1%, 其中 1997 年和 1998 年分离率最高, 可能与 2000 年之前采用 RD 和 Hep-2 两种细胞

系进行脊灰病毒分离有关 (表 1)。

表 1 1997—2011 年宁夏地区报告 AFP 病例数和 NPEV 分离率 (%)

年份	AFP 病例数	粪便标本份数	NPEV 分离株数	NPEV 分离率
1997	19	37	3	15.8
1998	11	22	2	18.2
1999	27	54	2	7.4
2000	41	81	5	12.2
2001	25	48	3	12.0
2002	31	62	3	9.7
2003	28	54	2	7.1
2004	48	95	3	6.3
2005	31	62	4	12.9
2006	39	78	4	10.3
2007	45	89	5	11.1
2008	48	96	5	10.4
2009	27	53	3	11.1
2010	42	84	6	14.3
2011	59	118	8	13.6
合计	521	1033	58	11.1

注: 部分 AFP 病例未采集到双份粪便; 分离率 = NPEV 分离株数 / AFP 病例数

2. 分子生物学鉴定: 对 73 株 NPEV (58 株来自 AFP 病例, 15 株来自 AFP 病例密切接触者) 进行型别鉴定, 其中 4 株 (1999 和 2001 年各 1 株, 2004 年 2 株) 无法定型, 其余 69 株分别属于 A 组肠道病毒 (HEV-A) 和 HEV-B, 无 HEV-C 和 HEV-D 病毒株。HEV-A 包括 8 个血清型 23 株, 分别为 9 株 (2002、2006、2008、2010 年各 1 株, 2011 年 5 株) EV71, 4 株 (2000、2005、2008、2010 年各 1 株) Cox A4, 3 株 (2008 年分离) Cox A16, Cox A2 和 Cox A10 各 2 株 (均 2008 年分离), Cox A6 和 Cox A8 各 1 株 (分别 2006、2008 年分离) 和 1 株 (2000 年分离) EV89; HEV-B 包括 19 个血清型 46 株, 分别为 6 株 (1999、2000、2003、2005、2007、2010 年各 1 株) Echo24, Cox A9 (2008 年分离)、Echo6 (2001、2003、2007 年各 1 株, 2005 年 2 株) 各 5 株, 4 株 (2006、2007 年各 1 株, 2008 年 2 株) Echo11, Cox B1 (2004 年 1 株, 2010 年 2 株)、Echo1 (1998、2001、2002 年各 1 株)、Echo14 (2008 年 1 株, 2011 年 2 株)、(2000、2006、2009 年各 1 株) Echo25 各 3 株, Cox B5 (2008 年分离)、Echo15 (1997、2011 年各 1 株)、Echo32 (1997、1998 年各 1 株) 各 2 株及 Cox B3 (2009 年)、Echo7 (1997 年)、Echo9 (2000 年)、Echo12 (2007 年)、Echo13 (2002 年)、Echo18 (2009 年)、Echo30 (2010 年) 和 EV88 (2007 年) 各 1 株。

3. 种系发生分析: 将 69 株病毒的基因序列应用 Sequencher 软件整理后, 序列结果选用 Mega 5.1 软

件构建种系发生树进行分析比较(图1)。人肠道病毒(HEV)血清型别分为5组,即HEV-A、HEV-B、HEV-C组、HEV-D组和鼻病毒A、B、C型(<http://www.picornaviridae.com>)。69株NPEV明显分化为2支,包括HEV-A和HEV-B,无HEV-C和HEV-D组病毒株,其中HEV-A组包括23株,HEV-B组包括46株,与BLAST分型结果一致。

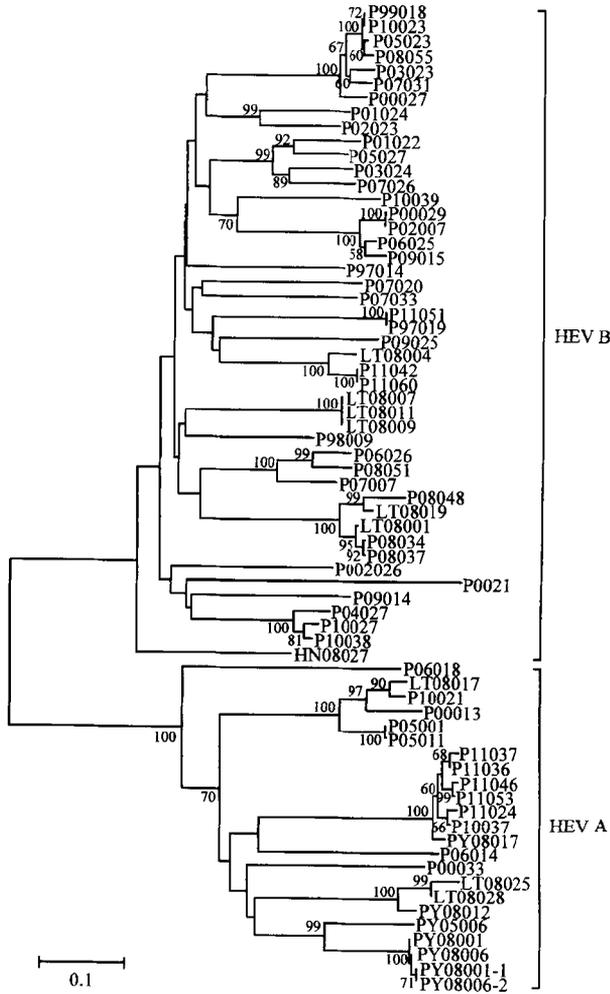


图1 69株宁夏地区NPEV分离株的VP1区基因进化树分析

讨论

尽管大部分NPEV感染表现比较轻微,或者无明显临床症状,但由于NPEV可引起急性心肌炎、出血性结膜炎、手足口病神经并发症和无菌性脑膜炎^[3-5],因此对NPEV分型鉴定仍具有重要的公共卫生学意义。在AFP监测系统中,WHO推荐使用微量中和试验对NPEV分离株进行血清型别鉴定^[6],但由于NPEV血清型多,定型过程费时费力,且型特异性抗血清和组合抗血清仅能覆盖部分型别,不能发现新的抗原变异和新的病毒型别。同时,病毒颗

粒的聚集会影响中和试验的结果判读。因此AFP病例监测系统中发现的多数NPEV不能被定型。近年来,国内外学者多采用RT-PCR和测序的方法对肠道病毒进行型别鉴定,弥补了中和试验的缺点^[2,7]。

本研究采用分子生物学方法对1997—2011年宁夏地区AFP病例中分离的69株NPEV进行血清型别鉴定,共包括27个血清型,隶属于HEV-A组和HEV-B组,其中HEV-B组为主要血清型别(66.7%),这与NPEV流行趋势一致^[8]。但不同的是,近15年来报告NPEV中,未发现HEV-C组病毒,这与我国其他省监测结果有所不同^[9-11]。在69株NPEV中,以EV71所占比例最大(9/69),尤其是2011年,EV71占据了全年NPEV的62.5%(5/8),而根据宁夏地区手足口病监测资料,2011—2012年6月底,EV71是引起手足口病的主要病原,说明EV71近年来在宁夏地区流行较广,应该引起重视。而Cox A4、A9、A16和Echo24、6所占比例也较高,这几种病毒是引起手足口病和无菌性脑炎脑膜炎的典型病毒,易引起大的爆发性流行。

本研究发现,宁夏地区HEV病原谱随时间变化而发生变迁,1997—2007年NPEV主要以Echo病毒为主(71.88%),其次为新型HEV和CoxA病毒(各占12.50%),而2008年由于标本主要来源于健康人群,主要以CoxA组病毒为主(70.00%),2009年以后AFP病例表现为混合感染,其中以Echo和新型HEV为主要病原,分别占41.18%和35.29%。这一方面提示CoxA组病毒致病性比较弱,以隐性感染为主,而Echo病毒和新型HEV致病性比较强;另一方面也揭示了宁夏地区HEV由较为单一的病原向复杂病原转移。值得一提的是,2000年和2007年从宁夏AFP病例粪便中分离的P00033和P07020分别属于EV89和EV88型病毒,这在国内较为少见,通过BLAST比较发现,其分别与美国AY697472和AY843306具有比较高的同源性。

通过对宁夏地区1997—2011年AFP病例粪便中NPEV的分型研究,初步探讨了AFP病例的病毒学病原谱,但针对HEV疾病的病毒学监测系统尚未完全建立,因此本研究也为今后宁夏地区建立基于实验室的病原学监测奠定基础。

参考文献

[1] Oberste M, Nix W, Maher K, et al. Improved molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing. *J Clin Virol*, 2003, 26: 375-377.
 [2] Oberste M, Maher K, Kilpatrick D, et al. Molecular evolution of

- the human entero-viruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J Med Virol*, 1999, 73: 1941-1948.
- [3] Ho M, Chen E, Hsu K, et al. An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan. *N Engl J Med*, 1999, 341: 929-935.
- [4] Zhang H, Li Y, McClean D, et al. Detection of enterovirus capsid protein VP1 in myocardium from cases of myocarditis or dilated cardiomyopathy by immunohisto-chemistry: Further evidence of enterovirus persistence in myocytes. *Med Microbiol Immunol*, 1999, 193: 109-114.
- [5] Khalfan S, Aymard M, Lina B, et al. Epidemics of aseptic meningitis due to enteroviruses following national immunization days in Bahrain. *Ann Trop Paediatr*, 1999, 18: 101-109.
- [6] Muir P, Kammerer U, Korn K, et al. Molecular typing of enterovirus: current status and future requirements. The European Union Concerted Action on Virus Meningitis and Encephalitis. *Clin Microbiol Rev*, 1998, 11: 202-227.
- [7] Oberste M, Maher K, Flemister M, et al. Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(3): 1170-1174.
- [8] Lea NA, Akira S, Analisa B, et al. Detection of non-polio enteroviruses from 17 years of virological surveillance of acute flaccid paralysis in the Philippines. *J Med Virol*, 2012, 84: 624-631.
- [9] Tian BJ, Wu Y, Zhang DH, et al. Study on the molecular typing and epidemiology of non-polio enteroviruses isolated from Yunnan province. *Chin J Epidemiol*, 2007, 28(4): 346-349. (in Chinese)
田炳均, 吴燕, 张东华, 等. 云南省1997-2000年及2004年非脊髓灰质炎肠道病毒分子生物学及流行特征分析. *中华流行病学杂志*, 2007, 28(4): 346-349.
- [10] Chen L, Chen N, Qin MH, et al. A study on pathogen spectrum of acute flaccid paralysis cases in Sichuan province in 2007 to 2008. *Chin J Vaccines Immun*, 2010, 16(6): 513-516. (in Chinese)
陈立, 陈娜, 秦明辉, 等. 四川省2007-2008年急性弛缓性麻痹病例病原谱特征分析. *中国疫苗与免疫*, 2010, 16(6): 513-516.
- [11] Ge Q, Gong LM, Yan JY, et al. Typing and identification of acute flaccid paralysis associated non-polio enterovirus isolated in Zhejiang province. *Chin J Public Health*, 2010, 26(4): 450-452. (in Chinese)
葛琼, 龚黎明, 严菊英, 等. 浙江省急性弛缓性麻痹相关肠道病毒鉴定分析. *中国公共卫生*, 2010, 26(4): 450-452.

(收稿日期: 2012-07-03)

(本文编辑: 张林东)

中华流行病学杂志第六届编辑委员会通讯编委名单

- | | | |
|---------------------|-------------------|------------------------|
| 陈 曦(湖南省疾病预防控制中心) | 窦丰满(成都市疾病预防控制中心) | 高 婷(北京市疾病预防控制中心) |
| 姜宝法(山东大学公共卫生学院) | 李 杰(北京大学医学部) | 李十月(武汉大学公共卫生学院) |
| 李秀央(浙江大学医学院公共卫生学院) | 廖苏苏(中国医学科学院基础医学院) | 林 玫(广西壮族自治区疾病预防控制中心) |
| 林 鹏(广东省疾病预防控制中心) | 刘爱忠(中南大学公共卫生学院) | 刘 刚(四川省疾病预防控制中心) |
| 刘 静(北京安贞医院) | 刘 莉(四川省疾病预防控制中心) | 刘 玮(军事医学科学院微生物流行病学研究所) |
| 鲁凤民(北京大学医学部) | 欧剑鸣(福建省疾病预防控制中心) | 彭晓旻(北京市疾病预防控制中心) |
| 邱洪斌(佳木斯大学) | 赛晓勇(解放军总医院) | 苏 虹(安徽医科大学公共卫生学院) |
| 汤 哲(首都医科大学附属宣武医院) | 田庆宝(河北医科大学公共卫生学院) | 王 蓓(东南大学公共卫生学院) |
| 王素萍(山西医科大学公共卫生学院) | 王志萍(山东大学公共卫生学院) | 谢 娟(天津医科大学公共卫生学院) |
| 徐爱强(山东省疾病预防控制中心) | 徐慧芳(广州市疾病预防控制中心) | 严卫丽(新疆医科大学公共卫生学院) |
| 阎丽静(中国乔治中心) | 杨春霞(四川大学华西公共卫生学院) | 余运贤(浙江大学医学院公共卫生学院) |
| 曾哲涛(北京安贞医院) | 张 波(宁夏回族自治区卫生厅) | 张宏伟(第二军医大学) |
| 张茂俊(中国疾病预防控制中心传染病所) | 张卫东(郑州大学公共卫生学院) | 赵亚双(哈尔滨医科大学公共卫生学院) |
| 朱 谦(河南省疾病预防控制中心) | 祖荣强(江苏省疾病预防控制中心) | |