

· 实验室研究 ·

2011 年河南省脑炎患者柯萨奇病毒 B5 型分离株基因组序列分析

马红霞 潘静静 康锴 谢志强 茹维萍 陈豪敏 黄学勇 许汴利

【摘要】 目的 分析河南省柯萨奇病毒 B5(CVB5)分离株全基因序列,了解其遗传特性。方法 采集 2 例脑炎患者临床标本,分离病毒,提取病毒阳性分离物 RNA,进行 RT-PCR 扩增,产物直接测序。利用 DNASTar 5.01 和 Mega 5.05 软件进行全基因序列拼接及亲缘进化分析。结果 获得 2 株 CVB5 分离株(03001N 和 17Y)全基因组序列,核苷酸长度分别为 7408 bp 和 7404 bp,两者核苷酸同源率为 97%,同 2010 年河南 CVB5 分离株同源率最高,分别为 98% 和 99%。5' -UTR 分别为 747 bp 和 743 bp;3' -UTR 区均为 103 bp;病毒基因组编码区全长同为 6558 bp,编码含 2185 个氨基酸残基的多聚蛋白,氨基酸同源率为 99%。VP1 区系统发生树分析显示,2 株 CVB5 分离株进化关系较近,同近年来国内其他分离株成一簇,而 2009 年的河南省 CVB5 分离株同山东省 CVB5 分离株成一簇。结论 河南省内存在不同 CVB5 株传播链的流行,此次分离株为近几年内的主要流行株。

【关键词】 柯萨奇病毒 B5 型; 脑炎; 系统进化分析

Genome sequences of coxsackievirus B5 isolated from viral encephalitis patients in Henan province, 2011 MA Hong-xia, PAN Jing-jing, KANG Kai, XIE Zhi-qiang, RU Wei-ping, CHEN Hao-min, HUANG Xue-yong, XU Bian-li. Henan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Zhengzhou 450016, China

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

This work was supported by grants from the Henan Department of Science and Technology Project (No. 122400450357) and Henan Province Health Department and China's Ministry of Health Co-build Project (No. 201201003).

【Abstract】 **Objective** To analyze the complete genome sequences of two coxsackievirus B5 (CVB5) isolated in Henan province, 2011. **Methods** Specimens were collected from viral encephalitis patients and followed by viral isolation on them. RNA were extracted from positive isolates and the amplified products were sequenced. The full-length genomes of them were acquired by assembling the fragments, using DNASTar 5.01 software while phylogenetic analysis were performed with Mega 5.05 and other software. **Results** The genomes RNA of 03001N and 17Y showed 7408 bp and 7404 bp long, and the 5' - and 3' -untranslated regions were 747 bp, 743 bp and 103 bp, 103 bp, respectively. BLAST analysis of these two isolates, based on the complete genome, showed 97% identity, with both of them having the highest similarity (98%, 99%) to the CVB5 strain isolated from Henan in 2010 rather than other CVB5 strains. Coding regions of both isolates were 6558 bp, code for a polyprotein of 2185 amino acids (aa) and both of them showed 99% amino acid identity. Phylogenetic tree in VP1 region showed that the two isolates belonged to the same clade with other strains isolated from all over the country in the past years, except for some CVB5 strains isolated from Henan and Shandong province in 2009 that formed the other cluster. **Conclusion** It seemed that more than one group of CVB5 were circulating in Henan province and these two isolates appeared the main epidemic strains circulating in the past years.

【Key words】 Coxsackievirus B5; Encephalitis; Phylogenetic analysis

柯萨奇病毒 B 组(CVB)感染常表现为无症状,但也可诱发心脏和中枢神经系统等的严重疾病,如病毒性脑炎和病毒性心肌炎等^[1]。近年来我国大陆 CVB5 引起的脑炎及伴有神经系统症状的手足口病

的流行报道越来越多^[1-7],河南省内也多次出现 CVB5 引起的脑炎暴发及散发病例^[5,6]。本研究对 2011 年河南省脑炎患者标本中分离的 2 株 CVB5 进行全基因组序列测定和分析,并与 GenBank 上登录的其他 CVB5 毒株序列,尤其是河南省往年 CVB5 分离株进行比较和分析。

材料与方法

1. 病毒来源:03001N 来源于平顶山市病毒性脑

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.012.013

基金项目:河南省科技厅项目(122400450357);河南省医学科技攻关计划省部共建项目(201201003)

作者单位:450016 郑州,河南省疾病预防控制中心

通信作者:许汴利, Email: xubl@hncdc.com.cn

炎患儿脑脊液标本, 17Y 来源于漯河市病毒性脑炎患儿咽拭子标本, -70 °C 保存。所有标本的采集均经家属知情同意。

2. 研究方法:

(1) 病毒分离及鉴定: 将所有标本接种于单层非洲绿猴肾细胞(Vero 细胞), 36 °C、5%CO₂培养箱培养, 盲传 3 代后收集出现细胞病变(CPE)的培养物, 用于序列扩增及鉴定分型。

(2) RT-PCR 扩增及序列测定: 病毒阳性分离产物, 首先使用肠道病毒 5' -UTR 区通用扩增引物 EVF/EVR 进行扩增^[8], 琼脂糖凝胶电泳, 测序, 初步鉴定后采用文献[9]方法及引物进行基因组分段扩增并测序。

(3) 序列分析: 测得的序列使用 DNASTar 软件中的 SeqMan 程序进行序列拼接。将拼接完成序列在美国生物技术信息中心网站进行 BLAST 分析 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), 初步发现同源序列。使用 DNASTar 5.01 中 MegAlign 软件分析核苷酸序列同源性, 最后用 Mega 5.05 软件进行进化树分析和作图, 采用最大似然法构建系统发生树, 建树的可靠性通过 1000 bootstrap 值来评估。本研究 2 株 CVB5 分离株的核苷酸序列已提交至 GenBank 数据库, 序列号分别为 JX017382 和 JX017383。

结 果

1. 全基因组序列测定及分析: 将所有阳性病毒分离物使用肠道病毒 5' -UTR 区核苷酸序列通用引物进行扩增, 测序结果在美国生物技术信息中心网站进行 BLAST 分析, 显示所有序列均与 CVB5 同源性最高。获得的 2 株 CVB5 (03001N 和 17Y) 全基因组序列长度分别为 7408 bp 和 7404 bp, 其中, 5' -UTR 分别为 747 bp 和 743 bp; 病毒基因组编码区全长同为 6558 bp, 编码含 2185 个氨基酸残基的多聚蛋白; 3' -UTR 区均为 103 bp。

2. 核苷酸和氨基酸序列同源性比较: 03001N 和 17Y 的全基因组序列核苷酸同源性为 97%, 与 GenBank 上其他 CVB5 的全基因组序列同源性分别为 80% ~ 98% 和 80% ~ 99%, 其中与这两株 CVB5 分离株基因组核苷酸同源性最高的均为 2010 年河南 CVB5 分离株 COXB5/Henan/2010, 两者与原型株基因组核苷酸同源性均为 81%。两者 CDS 氨基酸同源性为 99%, 与两者氨基酸同源性最高的为 COXB5/Henan/2010, 同源性为 98%。

3. 种系进化分析: 将本研究的 2 株 CVB5 分离株

与 GenBank 上检索到的 35 株 CVB5 (包括 17 株其他河南来源 CVB5 分离株) 几乎全长 VP1 区核苷酸序列(nt2451 ~ nt3246, 参照原型株 Faulkner) 构建系统发生树。分析显示, 各 CVB5 分离株在系统发生树上的分布同时呈现了地理与时间上的趋近性, 主要分为 4 组。Genogroup I 仅包含 1 株 CVB5 原型株 Faulkner, 分离于 20 世纪中期; Genogroup II 包含 2 株 CVB5 分离株, 分别是 1998 年中国山东分离株 CVB5 98388 和 2000 年韩国分离株 2000/CSF/KOR, 组内核苷酸同源性为 92.8%; Genogroup III 共包含 15 株 CVB5 分离株, 分离时间均为 2009 年, 组内核苷酸同源性为 95.7% ~ 100.0% (其中 13 株来自河南省, 核苷酸同源性为 96.1% ~ 100.0%; 2 株来自山东省, 两者间核苷酸同源性为 99.5%); Genogroup IV 包含近年来在中国各地陆续分离出的 15 株和国外分离的 4 株, 组内核苷酸同源性为 90.1% ~ 100.0%, 其中 6 株河南分离株均分离自脑炎/脑膜炎患者标本, 在 Genogroup IV 中分别位于 2 个进化分支内, COXB5/Henan/2000 和 03001N 分别于 2010 年和 2011 年分离于河南省平顶山地区 2 例脑炎患者, 两株 CVB5 核苷酸同源性为 96.5%, 并与 2011 年分离于河南省漯河地区的 17Y 及 2009 年河南分离株 CB28 形成一个分支; 另外 2 株 CVB5 河南分离株 19CSF 和 20CSF 是 2011 年分离于河南省漯河地区的脑炎患者, 核苷酸同源性达 99.1%, 两者与 2010 年长春分离株 CVB5/CC10/10/CC/10 和 CVB5/CC10/17/CC/10 进化距离最近, 形成一个分支。

讨 论

本研究对 2011 年河南省脑炎患者标本中分离的 2 株 CVB5 进行全基因组序列测定和分析, 并将其与 GenBank 上登录的其他 CVB5 毒株, 尤其是河南省往年的 CVB5 分离株进行比较。结果显示 2 株 CVB5 与 2010 年平顶山 CVB5 分离株 COXB5/Henan/2010^[9] 及另外 1 株 CVB5 毒株 CB28 进化关系最近, 在系统进化树上单独呈密切相关一簇。而 CB28 和 COXB5/Henan/2010 分别分离于 2009 年和 2010 年发生在河南省两起脑炎暴发事件中的患者标本, 本研究 03001N 来源于散发病例标本, 17Y 来源于暴发事件标本。由此可见, 该传播链上的 CVB5 毒株至少近几年在河南省一直存在, 既可引起脑炎暴发, 也可引起散发。而与该分支上同在 Genogroup IV 的另一分支, 也包含 2 株河南 CVB5 分离株 (19CSF 和 20CSF) 均分离于 2011 年河南省漯河地区脑炎暴发事件中患者标

本。有报道显示^[3,10],该分支的 CVB5 毒株存在着基因重组,而且重组母株包含 COXB5/Henan/2010。由此提示, CVB5 在河南省流行过程中可能发生了重组现象。然而本研究获得的 2 株 CVB5 分离株未发现基因重组现象,虽然同样是来源于 2011 年漯河地区脑炎暴发事件标本。

CVB5 的 VP1 区进化树分析显示,近年来我国大陆分离到的毒株同源性最高,说明国内的 CVB5 分离株之间存在一定的分子流行病学联系。除了与本研究 2 株 CVB5 进化关系较近的 CB28 毒株, GenBank 上同样分离于

2009 年河南省脑炎暴发事件患者标本的其他 13 株 CVB5 毒株,与同期分离于山东省的 2 株 CVB5 在进化树上构成另外一组 (Genogroup III),可以推测其进化途径可能十分相近,充分显示了进化关系在时间和地理上的趋近性。

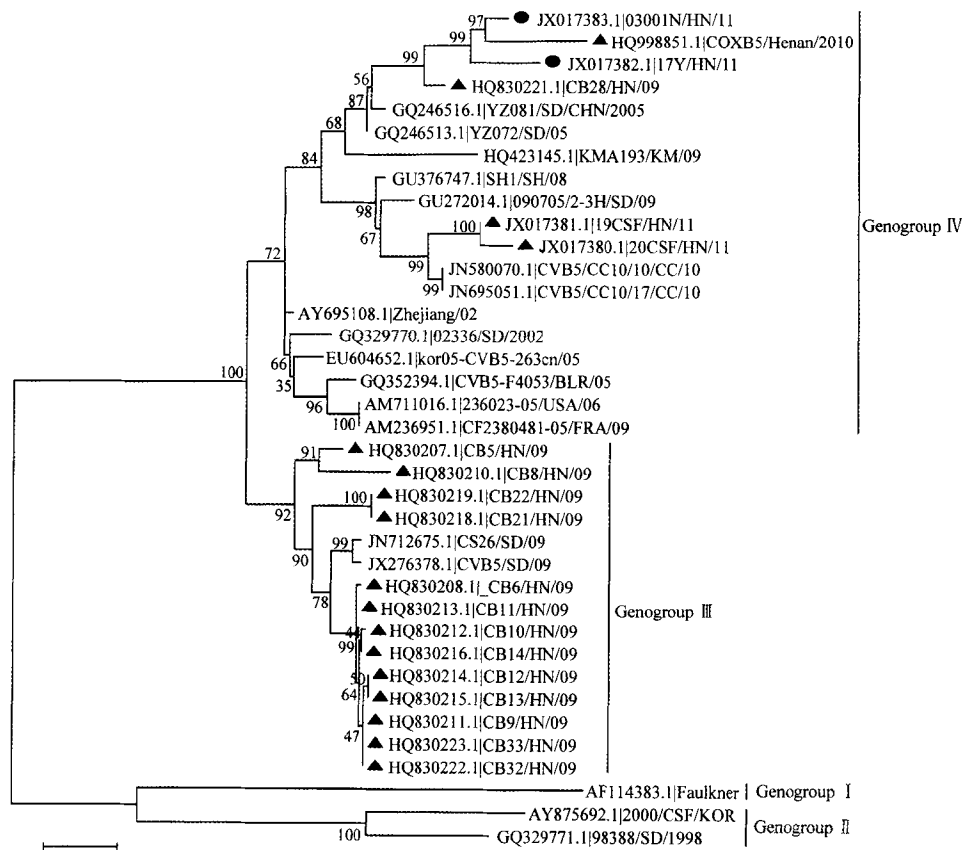
有报道显示^[1], CVB5 具有不同于其他 5 个血清型的独特循环模式,即每隔 3~6 年出现一次流行,每次流行的持续时间约为 1 年。本研究提示 2009—2011 年河南省不同地区出现的脑炎暴发事件中 CVB5 毒株之间存在着进化关系上的差异,其中引起 2009 年和 2011 年暴发的 CVB5 分离株均混杂着不同进化速度的毒株。

参 考 文 献

[1] Chen P, Tao ZX, Wang HY, et al. Identification and genetic characterization of coxsackievirus B5 isolated from an outbreak of aseptic meningitis. *Chin J Infect Dis*, 2012, 30 (3): 146-151. (in Chinese)
陈鹏,陶泽新,王海岩,等.柯萨奇 B5 病毒所致无菌性脑膜炎暴发的病原学鉴定及基因特征分析. *中华传染病杂志*, 2012, 30 (3): 146-151.

[2] Wang HY, Li Y, Xu AQ, et al. Identification and phylogenetic analysis of Coxsackie-virus B5 during an outbreak of aseptic meningitis in Shandong. *Chin J Epidemiol*, 2010, 31 (1): 64-68. (in Chinese)
王海岩,李岩,徐爱强,等.柯萨奇 B5 病毒引起山东省一起无菌性脑膜炎暴发的鉴定及其亲缘进化分析. *中华流行病学杂志*, 2010, 31 (1): 64-68.

[3] Han JF, Jiang T, Fan XL, et al. Recombination of human



注:▲河南省其他来源株;●本研究分离株

图 1 CVB5 VP1 区核苷酸序列系统发生树分析

coxsackievirus B5 in hand, foot, and mouth disease patients, *China. Emerg Infect Dis*, 2012, 18(2): 351-353.

[4] Weng YW, Zhou CH, Chen W, et al. Phylogenetic analysis on coxsackie virus B5 isolated from Fujian province, 2010. *Chin J Zoono*, 2011, 27(12): 1086-1089. (in Chinese)
翁学伟,周朝晖,陈炜,等. 2010 年福建省手足口病患者中柯萨奇 B5 病毒的序列分析. *中国人兽共患病学报*, 2011, 27(12): 1086-1089.

[5] Huang XY, Mu YJ, Li XL, et al. Etiology survey on an outbreak of viral encephalitis. *Chin J Prev Med*, 2011, 45 (9): 830-832. (in Chinese)
黄学勇,穆玉姣,李幸乐,等.一起暴发性病毒性脑炎的病原学调查. *中华预防医学杂志*, 2011, 45(9): 830-832.

[6] Ma HX, Mu YJ, Li XL, et al. Identification and phylogenetic analysis of coxsackie-virus B5 that caused an outbreak of viral encephalitis in Henan area. *Chin J Microbiol Immunol*, 2012, 32 (7): 610-613. (in Chinese)
马红霞,穆玉姣,李幸乐,等.引起河南省一起病毒性脑炎暴发的柯萨奇病毒 B5 的鉴定及其序列分析. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2012, 32(7): 610-613.

[7] Chen P, Tao ZX, Song YY, et al. A coxsackievirus B5-associated aseptic meningitis outbreak in Shandong province, China in 2009. *J Med Virol*, 2013, 85: 483-489.

[8] Zhang CM, Liu YJ, Wang XC, et al. Simultaneous detection of enteroviruses in water samples by RT-PCR. *Res Environ Sci*, 2007, 20(3): 137-141. (in Chinese)
张崇森,刘永军,王晓昌,等.逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术同时检测水中多种肠道病毒. *环境科学研究*, 2007, 20 (3): 137-141.

[9] Huang XY, Xu YL, Li XL, et al. Analysis of genomic characteristics of coxsackie virus B5 strains isolated from Henan province. *J Zhengzhou Uni: Med Sci*, 2011, 46(6): 868-871. (in Chinese)
黄学勇,许玉玲,李幸乐,等.柯萨奇病毒 B5 河南分离株全基因组序列测定及分析. *郑州大学学报:医学版*, 2011, 46(6): 868-871.

[10] Ma HX, Huang XY, Kang K, et al. Recombination in human coxsackievirus B5 strains that caused an outbreak of viral encephalitis in Henan, China. *Arch Virol*, 2013, 158(10): 2169-2173. (收稿日期:2013-08-01)
(本文编辑:张林东)