

# 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

田炳均 吴燕 张东华 何丽芳 丁峥嵘 陆林

**【摘要】** 目的 描述云南省 1997 - 2000 年及 2004 年 5 年的肠道病毒(EV)分离状况及型别特征。方法 5 年在急性迟缓性麻痹病例中共检测到 210 株非脊髓灰质炎(脊灰)肠道病毒(NPEVs), 其中 12 株经血清学鉴定为腺病毒。剩余 198 株经基因测序定型, 即病毒 VP1 区基因序列转变为氨基酸序列后与标准株进行比较。结果 经分子生物学定型: 人类 EV-A 组 5 株(5 个血清型)、EV-B 组 158 株(34 个血清型)、EV-C 组 32 株(6 个血清型)、未分离到 EV-D 组病毒。在急性迟缓性麻痹病例监测中, 210 个分离株, EV-B 组病毒占 75.2%, 为主要型别; EV-C 组占 12.2%, 腺病毒占 5.7%, EV-A 组占 2.4%。结论 云南省 EV 的流行中, 以 EV-B 组较多。

**【关键词】** 非脊髓灰质炎肠道病毒; 分子生物学定型; 流行病学

**Study on the molecular typing and epidemiology of non-polio enteroviruses isolated from Yunnan province, China** TIAN Bing-jun, WU Yan, ZHANG Dong-hua, HE Li-fang, DING Zheng-rong, LU Lin. Yunnan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Kunming 650022, China

**【Abstract】** **Objective** This report presented an overview on the epidemiology of enterovirus in Yunnan province, the People's Republic of China. **Methods** A total of 210 strains of non-polioviruses isolated under acute flaccid paralysis surveillance during a 5-year study period from 1997 to 2000 and 2004 were examined. Of the 210 non-polioviruses strains, a total of 12 strains of adenoviruses were serologically identified. The remaining 198 isolates were used for molecular typing, and the viral genomes of 195 non-polio enteroviruses (NPEVs) were translated to corresponding amino acid sequences and compared with those of the prototype strains. **Results** Based on molecular typing, 5 isolates were classified into 5 serotypes of human enterovirus A species while 158 isolates into 34 serotypes of B and 32 isolates into 6 serotypes of C species. However, we did not isolate any viruses which belonged to human enterovirus D species. Thus, under acute flaccid paralysis surveillance, human enterovirus B species accounted for 75.2% of the 210 isolates and was considered as the predominant one, followed by human enterovirus C (12.2%), adenovirus (5.7%), and human enterovirus A (2.4%). **Conclusion** Although the epidemiological characteristics of NPEVs from Yunnan province remained "unknown", the molecular typing method had provided us a breakthrough to understand the epidemiology of these viruses.

**【Key words】** Non-polio enteroviruses; Molecular typing; Epidemiology

最近根据分子生物学特征和致病特性提出了肠道病毒(EV)新的分类标准。EV 属被分为 5 个不同的组, 即脊髓灰质炎(脊灰)病毒、EV-A、EV-B、EV-C、EV-D<sup>[1]</sup>。也提出了多种分子生物学定型方法及新型 EV<sup>[2-5]</sup>。自 1995 年以来, 中国没有发现本土脊灰野毒病例<sup>[6,7]</sup>; 但在急性迟缓性麻痹病例(AFP)的监测过程中, 许多非脊灰 EV (NPEVs) 被检测到。本文对 1997 - 2000 年及 2004 年云南省 EV 的分离状况和分子生物学定型结果进行了描述。

## 材料与方法

1. NPEVs: 从 1997 - 2000 年及 2004 年 5 年期间, 云南省报告 1260 例 AFP 病例(15 岁以下儿童), 其中 1219 例至少采集了 1 份粪便标本。对这些标本严格按 WHO 的要求进行了处理并接种于 WHO 推荐的细胞系。1997 - 2000 年所用细胞为 RD、HEP-2 和 L20B。从 2001 年开始, 所用细胞为 RD 和 L20B。出现完全细胞病变(CPE)后, 收获细胞并储于 -20℃。共分离到 299 株病毒, 对这些病毒按 WHO 的要求进行了脊灰病毒的鉴定。在中和试验中共鉴定出 89 株脊灰病毒。这些病毒送国家

作者单位: 650022 昆明, 云南省疾病预防控制中心

脊灰实验室进行型内鉴定以区别疫苗株与野毒株。本文对其余 210 株非脊灰病毒进行了分析。

2. 方法:用 QIAamp 试剂盒(德国 QIAGEN 公司)提取病毒 RNA,所用病毒培养液为 140  $\mu$ l,洗脱液为 60  $\mu$ l 无 RNA 酶灭菌纯水。RT-PCR 试剂盒为 Access RT-PCR (Promega 公司)。cDNA 合成、RT-PCR 及测序所用引物参照 Oberste (1999 年)方法进行。RT-PCR 在美国应用生物系统公司 9700PCR 仪上进行:48 $^{\circ}$ C 45 min、94 $^{\circ}$ C 2 min、94 $^{\circ}$ C 10 s、50 $^{\circ}$ C 10 s、65 $^{\circ}$ C 1 min,共 30 个循环,最后 65 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 产物用 2% 凝胶电泳,0.5  $\mu$ g/ml 溴化乙锭染色。PCR 产物用 QIAquick PCR 纯化试剂盒纯化(QIAGEN 公司)。PCR 产物序列用 ABI 3100 avant 测序仪进行测序。同时对双股进行测序并用 Sequencher 软件(美国 Gene Codes 公司)对序列进行编辑。病毒基因组 VP1 区部分序列的测序定型参照 Oberste (1999 年)的方法,用 187-222、188-222 和 189-222 引物(相对于 VP1 区 5' 端)进行 RT-PCR 反应。这些引物不能扩增的分离株再用 012-011 和 040-011 引物(相对于 VP1 区 3' 端)进行扩增。病毒血清型别的确定参照 Oberste (1999 年)所推荐的方法,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。如 VP1 区氨基酸(aa)序列同源性  $\geq 88\%$ ,即认为同一型别,即临界值为 12%。

腺病毒的鉴定:对于那些只在 HEP-2 细胞上生长并具有典型腺病毒细胞病变效应如“葡萄样 CPE”,既不能被脊灰组合血清中和,又不能被肠道病毒引物扩增的分离株,用腺病毒诊断试剂盒(美国 SA Scientific 公司)进行鉴定。

**结 果**

1. 1997-2000 年及 2004 年 NPEVs 分离结果:1997-2000 年及 2004 年中,共从 1219 例 AFP 病例中分离到 210 株非脊灰病毒。报告 AFP 病例数、标本采集率和 NPEVs 分离率见表 1。NPEVs 分离率各年有所不同,最低为 11.3%,最高为 26.4%,平均分离率为 17.2%。

在 210 株 NPEVs 中,共分离到 12 株(2.4%)腺病毒,其中 1997 年 5 株,2000 年 4 株,1998、1999 和 2004 年各 1 株。对剩余的 198 株 NPEVs 进行了分子生物学定型。用 EV 通用引物对这些病毒进行了基因扩增及测序。195 株属于 3 个组,即 EV-A 5 株

(2.4%,5 个血清型),EV-B 158 株(75.2%,34 个血清型),EV-C 32 株(12.2%,5 个血清型)。未分离到 EV-D 组病毒(表 2、3)。

**表 1** 云南省 1997-2000 年及 2004 年报告 AFP 病例数和 NPEVs 分离率

年份	AFP 病例数	例数 <sup>a</sup>	NPEVs	
			例数	分离率(%)
1997	288	275	37	13.5
1998	228	220	31	14.1
1999	227	224	45	20.1
2000	276	269	71	26.4
2004	241	231	26	11.3
合计	1260	1219	210	17.2

注:<sup>a</sup> 采集  $\geq 1$  份粪便标本例数

**表 2** 云南省 1997-2000 及 2004 年人类 EV-C 组分布

型别	分离株数					合计	分离株 <sup>b</sup>
	1997	1998	1999	2000	2004		
CA24	1	2	5	3	0	11	136-98
EV96	0	1	3	4	1	9	未做
CA20	2	0	0	4	0	6	231-00
不能定型 <sup>a</sup>	0	3	0	1	0	4	未做
CA18	0	0	1	0	0	1	未做
CA17	0	0	1	0	0	1	未做
合计	4	6	9	12	1	32	-

注:<sup>a</sup> 未做的 4 株基因序列形成一个组,并认为同一个血清型别;<sup>b</sup> 中和试验确证的分离株

2. EV-A:该组中 5 株病毒经 188-222 引物扩增,基因序列转变成氨基酸后与标准株进行比较。结果为 1999 年 EV76 1 株,2000 年 CA8 1 株,2004 年 CA4、CA6 和 EV71 各 1 株。

3. EV-B:该组中 158 株经 187-222 引物扩增、测序后与标准株的序列进行比较,156 株分为 34 个血清型。2 株不能确定血清型别。各年分离情况见表 3。CB2、CB6 和 E4 用 012-011 引物扩增。75-99 号分离株为 EV80 型,113-00 和 133-99 号为 EV93 型(Stanway 个人通讯)。除 7 个分离株(CB4、E31、EV75、EV80、EV81、EV83 和 EV93)外,其余各株均用型特异性血清进行中和定型(血清由日本国立感染症研究所吉田弘先生提供)。

在 5 年间最常分离到的病毒有 11 个型别。相比之下,CB5、E20、E25 和 E30 只在 2 年内分离到;CB5 1997 年和 2000 年各 2 株,分离株的核苷酸同源性为 88.5%~95.2%,氨基酸同源性为 100%;E20 1997 年 2 株,1998 年 3 株,核苷酸同源性为 88.0%~98.7%,氨基酸同源性为 98.0%~100%;E25 1998 年 1 株,2000 年 2 株,核苷酸同源性为 83.2%,氨基酸同源性为 94.1%;E30 2000 年 1 株,2004 年 2 株,核苷酸同源性为 91.7%,氨基酸同源性为 100%。1999 年分

离到的 2 株 EV83 与标准株的核苷酸差异率为 22.3%。5 年中,4 年分离到 CB3。这些 CB3 之间的核苷酸差异率 < 7% (氨基酸差异率 3.2%), 故认为它们曾地方性流行。仅在 1 年内分离到 13 个型别, 7 个血清型 (E27、E21、EV75、E9、E18、E33 和 E83) 分离到数株, 即分别为 5、4、3、2、2、2 和 2 株, 除 EV83 外, E27、E21、E21、EV75、E9、E18 和 E33 等各分离株各自型别内的核苷酸差异率 < 8%。因此认为它们都属于同一个基因型别。

表3 云南省 1997-2000 年及 2004 年人类 EV-B 组分布

血清型别	分离株数						分离株 <sup>b</sup>
	1997	1998	1999	2000	2004	合计	
E13	4	1	2	3	3	13	25-00, 28-00, 31-00
E14	2	0	3	5	1	11	129-00
E12	0	3	0	5	3	11	152-00, 237-00, 238-00, 239-00
CB3	1	0	3	4	1	9	134-00
E2	2	1	2	3	1	9	116-00, 155-00
E6	3	4	2	0	0	9	147-99, 148-99
E1	2	0	4	2	0	8	156-00, 227-00, 89-99, 145-99, 157-99, 207-99, 62-97, 196-97
E7	1	3	0	3	0	7	19-00, 177-00, 178-00
E29	1	0	2	0	4	7	139-04, 140-04, 141-04, 157-04
E11	0	1	1	0	4	6	不能定型 <sup>a</sup>
E3	2	0	3	0	0	5	176-99, 222-99, 225-99
E19	2	3	0	0	0	5	64-98, 86-98, 98-98
E20	2	3	0	0	0	5	13-98, 103-98, 154-98
E27	0	0	0	5	0	5	145-00, 209-00, 220-00, 159-00
CB5	2	0	0	2	0	4	213-00
CA9	1	1	0	2	0	4	206-00
E21	0	0	4	0	0	4	166-99, 200-99, 204-99, 223-99
E24	3	0	0	1	0	4	139-00
E30	0	0	0	1	2	3	177-04, 178-04
CB1	0	0	2	1	0	3	102-00
E25	0	1	0	2	0	3	192-00
EV75	0	0	0	3	0	3	未做
CB4	0	1	0	1	0	2	未做
E9	0	0	0	2	0	2	183-00
E18	0	0	0	2	0	2	212-00, 236-00
E33	0	0	0	0	2	2	209-04, 210-04
EV83	0	0	2	0	0	2	未做
EV93	0	0	1	1	0	2	未做
不能定型	0	0	0	2	0	2	未做
CB2	0	0	0	1	0	1	162-00
CB6	0	0	0	1	0	1	83-00
E4	0	0	0	1	0	1	175-00
EV80	0	0	1	0	0	1	未做
E31	1	0	0	0	0	1	未做
EV81	0	1	0	0	0	1	未做
合计	29	23	32	53	21	158	-

注:<sup>a</sup> Silva 株抗血清; <sup>b</sup> 中和试验验证的分离株

在 EV-B 组中, 通过 VP1 区部分序列测定, 尚不能对 2000 年分离的 2 株病毒 (65-00 和 167-00 号标本) 的型别进行定型。65-00 号最接近 E26, 用 187-222 引物合成的 325 bp 产物进行分析, 与 E26 标准株的核苷酸差异率为 28%, 氨基酸差异率为 16.7%。另一方面, 分离株 167-00 与 E15 标准株的核苷酸和氨基酸差异率分别为 24.1% 和 2.1%。然而, 167-00 号分离株 PCR 产物长度太短, 难以定型。再者, 这 2 株均不能被型特异性抗体中和, 所以把它们归类为“EV-B 组不能定型者”。

4. EV-C: 在 210 株 NPEVs 分离株中, 32 株 (15.2%) 属于 EV-C。引物 188-222 或 189-222 合成的 PCR 产物的基因序列转变为氨基酸序列后与标准株的序列进行比较分析。结果 28 株分为 5 个血清型 (表 2)。与标准株比较, EV-C 组的氨基酸差异率为 1.9%~9.2%。在 32 株 EV-C 中不能对 4 株进行血清型分类。然而它们在序列上高度相关, 353 bp 长的 VP1 区, 核苷酸差异率为 0.9%~7.9% (氨基酸差异率为 0%~2.6%)。这 4 株最接近的血清型是 CA13 和 CA18; 与 CA13 标准株的核苷酸差异率为 30%~30.3% (aa 差异率 17.1%~18%), 与 CA18 标准株的核苷酸差异率为 29.5%~30.6% (aa 差异率 16.2%~17.1%); 被定为“未能定型的 EV-C”。与标准株比较, 3 个血清型别 (CA24、EV96 和 CA20) 的核苷酸差异率较高。11 个 CA24 分离株的核苷酸差异率范围为 8.3%~18.1%, 9 株 EV96 10.7%~16.1%, 6 株 CA20 为 5.7%~19.4%。

在 5 年研究期间, 4 年分离到 CA24 和 EV96。因此认为这 2 个型别是云南省主要的流行株。2 年分离到 CA20 和“不能定型的 EV-C”, 而 1 年分离到 CA17 和 CA18。有意义的是, 2000 年分离的 4 株 CA20 之间核苷酸差异率为 5.7%~19.4%, 而 1997 年分离到的另外 2 株的核苷酸很相近。因此认为 2000 年 CA20 的亚型在本省有流行。相比之下, 1998 年 3 株“不能定型的 EV-C”的核苷酸同源性为 99.1% (氨基酸同源性为 100%), 它们与 2000 年 1 株的核苷酸同源性为 92.1% (氨基酸同源性为 100%)。认为“不能定型的 EV-C”病毒亚型曾在本省流行了 2 年。

5. 最常分离到的几种病毒的地理分布: EV-B 为主要流行病毒, 其次为 EV-C。多数毒株来自昭通、曲靖、红河、昆明、保山和大理等地区。这些地区的人口数、人口密度、< 15 岁人口数和每年报告的

AFP 数相对较多。

## 讨 论

本文描述了云南省 5 年期间非脊灰 EV 的总体流行情况(2001-2003 年的 EV 分离株未做)。自 1992 年以来,云南省在 AFP 监测系统中分离到了许多非脊灰 EV,但血清型别和流行概况未知。NPEVs 是脊灰病毒监测过程中产生的“副产品”。虽然在监测过程中获得了大量的 EV 阳性标本,但由于所用的细胞系(如 RD 和 HEP-2 细胞)的不同或 AFP 监测系统抽样的不同,会对分离病毒的比例有影响。在这些细胞中不能生长的病毒可能会被漏掉。例如 EV-A 组中有些病毒的有效分离途径是用乳鼠培养而不是用细胞系分离。本文是在一个特殊的省份较完整的描述了 NPEVs 的流行病学。

E13、E30 和 EV71 型是能导致无菌性脑膜炎和手足口病的典型病毒,并能产生大的暴发。在这 5 年研究期间,由这些病毒引起的暴发不仅在中国有报道,也在亚洲其他国家有报道。尽管如此,研究表明,在云南省这些疾病的致病因子(病原体)分离数较少。可以认为,AFP 监测系统的抽样策略并不总是与 NPEVs 的流行病学有关。在中国,由 NPEVs 产生的疾病的病毒学监测系统尚未完全建立起来,因此本文描述的 NPEVs 分布情况为今后建立基于实验室监测的 EV 病原学监测作用重大。有意义的是,在研究期间,E12、E2、E1 和 E29 的分离年数在 3 年以上,比英国、西班牙、突尼斯、美国和日本等国 EV 的发病情况要多。另外,在云南省,CA24 和 EV96 是分离较多的病毒,但在其他国家较为少见。

本研究的两个特点是:较为少见的病毒如 E12、E2、E1 和 E29 在云南省有流行,EV-B 和 EV-C 组病毒中的某些病毒具有基因多样性的特点,是主要流行病毒。其次,云南省分离到的 EV-C 组病毒,特别是 CA20、EV96 和 CA24 具有基因多样性特点。最近报道了脊灰病毒和 EV-C 组病毒之间可能存在遗传重组;在柬埔寨发现 EV-C 组病毒和脊灰病毒 Sabin 3 型之间有遗传重组现象<sup>[1]</sup>。因为 EV-C 组在云南省较多,且云南省一直使用口服脊灰疫苗,在未来也有可能发生遗传重组的现象,值得关注。

以往研究表明,EV71、CA9、CA7 和 E9 等 NPEVs 可以导致短暂的麻痹。在某些情况下,由 NPEVs 引起的麻痹和由脊灰病毒引起的麻痹不能

从临床上轻易地区分开来。也有报道,CA24 可能是脊灰样麻痹的致病因子。由于本研究缺乏 AFP 病例的详细的临床资料,由 NPEVs 引起的麻痹应作进一步研究。

NPEVs 定型的金标准是中和试验。尽管本法可靠性高,但操作费时、费力,有时由于病毒颗粒聚集,抗原漂移,病毒的重组等原因,或标本中多种病毒的同时存在,未能对病毒正确定型。更重要的是,多数省份缺乏 NPEVs 定型组合血清,因此在 AFP 监测系统中发现的多数 NPEVs 不能被定型。到目前为止,用分子生物学方法对病毒进行定型的方法报道较多,本研究用其中的一个方法对 195 株 NPEVs 进行了定型,对新近发现的一些新型肠道病毒(如 EV75、EV76、EV80、EV81、EV83、EV93 和 EV96)也进行了定型。虽然云南省 NPEVs 的流行病学仍不清楚,但分子生物学定型方法对了解这些病毒的流行特征提供了一个有效的途径。随着中国消灭脊灰项目的进展,应进一步重视对 NPEVs 的病原学和流行病学研究。

(致谢:感谢日中医学协会的支持以及云南省各地州市疾病预防控制中心对标本的送检)

## 参 考 文 献

- [1] Stanway G, Brown F, Christian P, et al. Picornaviridae In Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses//Edited by Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, et al. Ball. Elsevier Academic Press, San Diego, 2005:757-763.
- [2] Norder H, Bjerregaard L, Magnius L, et al. Sequencing of 'untypable' enteroviruses reveals two new types, EV-77 and EV-78, within human enterovirus type B and substitutions in the BC loop of the VP1 protein for known types. J Gen Virol, 2003, 84(4):827-836.
- [3] Oberste M, Schnurr D, Maher K, et al. Molecular identification of new picornaviruses and characterization of a proposed enterovirus 73 serotype. J Gen Virol, 2001, 82(2):409-416.
- [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(2):445-451.
- [5] Oberste MS, Michele SM, Maher K, et al. Molecular identification and characterization of two proposed new enterovirus serotypes, EV74 and EV75. J Gen Virol, 2004, 85(11):3205-3212.
- [6] CDC. Progress toward poliomyelitis eradication — People's Republic of China, 1990 — 1996. MMWR, 1996, 45(49):1076-1079.
- [7] Zhang J, Zhang LB, Otten MW, et al. Surveillance for polio eradication in the People's Republic of China. J Infect Dis, 1997, 175 Suppl 1:S122-134.

(收稿日期:2006-10-25)

(本文编辑:尹廉)