

中国云南省与缅甸接壤地区健康儿童肠道病毒携带情况调查

丁峥嵘 汤晶晶 田炳均 张杰 李立群 赵智娴 何丽芳

【摘要】 目的 了解缅甸入境健康儿童和云南省口岸地区健康儿童肠道病毒(EV)携带情况及病毒型别特征。方法 在10个边境口岸<15岁的健康儿童中采集粪便标本,进行病毒分离和型别鉴定。共采集到319份粪便标本。脊髓灰质炎(脊灰)病毒(PV)用抗体中和试验鉴定,并送国家脊灰实验室进行型内鉴别;非脊灰肠道病毒(NPEV)用基因测序方法进行鉴定;腺病毒用血清学方法鉴定。结果 共检测到EV 53株(带病毒率为16.6%),其中PV 23株(阳性率7.2%)经国家脊灰实验室证实均为疫苗株,未发现脊灰野病毒;NPEV 30株(阳性率9.4%),经VP1区核苷酸序列测定,除1株未被所有EV通用引物扩增外,其余29株分别属于HEV-A组(1株,1个血清型,占3.3%)、HEV-B组(20株,11个血清型,占66.7%)、HEV-C组(8株,4个血清型,占26.7%),未检测HEV-D组病毒。同时还检测到腺病毒4株,阳性率为1.25%。分别做B组和C组病毒基因树,相同型别的分离株都与对应的标准株聚集在一起。同源性计算表明,分离株与对应标准株的核苷酸同源性及其氨基酸同源性分别在75%和85%以上,符合国际测序定型标准。结论 在中国云南省与缅甸接壤地区,EV携带率较高,特别是PV阳性率高于急性弛缓性麻痹常规监测。EV中以HEV-B组病毒为主,病毒血清型的分布具有多样性,并发现EV73(2株)、EV75(1株)、EV80(1株)和EV96(4株)等新型EV。

【关键词】 肠道病毒; 测序定型; 健康儿童

Status of enterovirus infection and molecular identification among healthy children at the areas bordering Myanmar, in Yunnan province, China DING Zheng-rong, TANG Jing-jing, TIAN Bing-jun, ZHANG Jie, LI Li-qun, ZHAO Zhi-xian, HE Li-fang. Yunnan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Kunming 650022, China

Corresponding author: DING Zheng-rong, Email: ynepidzr@sohu.com

【Abstract】 Objective To explore the enterovirus infection status among healthy children under 15 years old in the border areas of Yunnan province that connecting Myanmar. Methods A total of 319 stool samples were collected from healthy children in the 10 entrance ports. Enterovirus was isolated from these stool samples and then poliovirus and adenovirus were serotyped by neutralization test using specific anti-sera. All the non-polio enteroviruses(NPEVs) were identified by partial sequencing of VP1 gene. Results All 53 enterovirus were isolated from 319 stool samples and 16.6% of them carried the virus. 23 polio virus (PVs) and 30 NPEVs were isolated with rates of carrying the virus were 7.2% and 9.4% respectively. 4 adenovirus were also isolated with a rate as 1.25%. 1 isolate could not be amplified by any Pan-enterovirus primers or by RT-PCR so was not able to be sequenced. The results of NPEVs sequencing showed that: 1 isolate (3.3%) was classified into 1 serotype of HEV-A while 20 isolates (66.7%) were classified into 11 serotypes of HEV-B and 8 isolates (26.7%) were classified into 3 serotypes of HEV-C. However, we could not isolate any viruses that belong to HEV-D. *nt*. Result from the *aa* identify calculation showed that the *nt* and *aa* identification between isolates and corresponding standard strains were more than 75% and 85% respectively. The findings were similar to the international standards. Conclusion Our results showed that the rate of carrying the enterovirus especially poliovirus in some areas of Yunnan province that bordering Myanmar was higher than that of rate through the routine acute flaccid paralysis detection system. Of the enterovirus isolated, HEV-B group appeared the predominant with the wide spread of enterovirus serotype. Some newer enterovirus were also detected such as EV73(2 strains), EV75(1 strain), EV80(1 strain) and EV96(4 strains).

【Key words】 Enterovirus; Typing by sequencing; Healthy children

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.02.016

作者单位: 650022 昆明, 云南省疾病预防控制中心

通信作者: 丁峥嵘, Email: ynepidzr@sohu.com

我国云南省与近年来仍有脊髓灰质炎(脊灰)野病毒流行的缅甸接壤^[1],由于两国边境线绵长,且边境地区通道众多,人员交往频繁,因此脊灰野病毒输入我国的危险性随时可能发生。作为常规急性迟缓性麻痹(AFP)病例监测系统的补充,了解云南省与缅甸接壤边境地区健康儿童肠道病毒(EV)携带情况,为脊灰监测、常规免疫、强化免疫等工作提供依据,于2007年11月在与缅甸接壤的6个州市的10个口岸采集健康儿童粪便标本并进行病毒分离和型别鉴定。

对象与方法

1. 调查对象:在与缅甸接壤的6个州市19个县中,选择出入境人员流动量较大的10个口岸,采集<15岁的人境健康儿童和口岸地区健康儿童粪便标本。每个口岸采集30份标本(单份便),入境儿童和口岸地区儿童粪便标本各占一半。共采集319份合格粪便标本。均在3 d内低温冷藏送至云南省疾病预防控制中心脊灰实验室。

2. 方法:

(1)病毒分离:所有粪便标本均按照WHO推荐的方法进行处理^[2],然后接种到L20B、RD和Hep-2细胞上。

(2)病毒鉴定:脊灰病毒(PV)型别用WHO提供的组合血清进行鉴定。非脊灰肠道病毒(NPEV)用基因测序定型。病毒RNA提取试剂盒为QIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN公司),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等^[3]的方法进行。RT-PCR和测序引物为:292:5'-MIG CIG YIG ARA CNG G-3', 222:5'-CIC CIG GIG GIA YRW ACA T-3', 012:5'-ATG TAY GTI CCI CCI GGI GG-3', 040:5'-ATG TAY RTI CCI MCI GGI GC-3', 011:5'-GCI CCI GAY TGI TGI CCR AA-3'。RT-PCR程序为:48℃ 45 min, 94℃ 2 min, 94℃ 10 s, 50℃ 10 s, 65℃ 1 min,共30个循环,最后在65℃延伸5 min。PCR产物用QIAquick PCR纯化试剂盒(QIAGEN公司)纯化。PCR产物送上海生工生物工程技术有限公司进行双向测序,并用Sequencher软件(美国Gene Codes公司)进行编辑。测序结果在基因库进行“Blast Search”并用Mega软件进行核苷酸序列和氨基酸序列比对^[4]。根据参考文献^[5],用分子生物学方法进行EV型别判定时,可将测得的VP1区序列提交与一个包含有

EV及小RNA科其他病毒的全部序列数据库,进行比较分析。如果其与某一型病毒株同源性不低于75%,同时与另一最接近的血清型的同源性不高于70%,则其与此病毒株为同一血清型;如果最高同源性介于70%~75%之间或与另一最接近血清型的同源性高于70%,则不确定型别,有待于用其他方法鉴定;如果最高同源性低于70%则说明此分离株序列与数据库中的所有序列均不匹配,可能属于新的型别。

(3)病毒遗传系统进化树分析:用Mega软件进行进化树分析和做图。进化树用临位相接法(neighbor joining method),所用模式为Kimura二参数置换法(Kimura 2-parameter substitution model)。用1000个pseudoreplicate datasets进行进化树bootstrap统计学分析。

(4)腺病毒鉴定:对于只在Hep-2细胞上生长且具有典型腺病毒细胞病变效应,既不能被脊灰组合血清中和,又不能被EV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(由日本国立感染症研究所吉田弘提供)。

结 果

1. 病毒分离:共检测319份粪便标本,分离到EV 53株,阳性率为16.6%。其中PV 23株(I型19株、II型3株、III型1株),阳性率为7.2%,未分离到混合型PV。23株PV经国家脊灰实验室鉴定均为疫苗株病毒。NPEV 30株,阳性率为9.4%;腺病毒4株,阳性率为1.25%(表1)。

表1 云南省各口岸地区健康儿童EV检测结果

采样地点	标本份数	阳性株数				阳性率(%)		
		PV I	PV II	PV III	NPEV	EV	PV	NPEV
怒江片马(pm)	30	0	0	0	4	13.3	0	13.3
普洱孟阿(ma)	28	0	0	1	4	17.9	3.6	14.3
德宏拉影(ly)	46	13	1	0	7	45.7	30.4	15.2
版纳打洛(dl)	31	1	0	0	1	6.5	3.2	3.2
保山猴桥(hq)	33	0	0	0	1	3.0	0	3.0
德宏畹町(wd)	31	1	0	0	1	6.5	3.2	3.2
德宏芒海(mh)	30	0	0	0	9	30.0	0	30.0
德宏姐告(jg)	30	1	0	0	2	10.0	3.3	6.7
临沧清水河(qsh)	30	3	2	0	1	20.0	16.7	3.3
临沧南伞(ns)	30	0	0	0	0	0	0	0
合计	319	19	3	1	30	16.6	7.2	9.4

2. NPEV定型:用EV通用引物对30株NPEV进行基因扩增及测序,其中1株(hq-128)不能被所有引物(292/222、012/011、040/011)扩增,其余29株属

于 3 个组,即 HEV-A 组 1 株(1 个血清型,CA6)占 3.3%,HEV-B 组 20 株(11 个血清型)占 66.7%,其中新型肠道病毒 EV73 2 株(ly80, mh-191), EV75 1 株(jg-221), EV80 1 株(mh-201); HEV-C 组 8 株(4 个血清型)占 26.7%,其中新型病毒 EV96 4 株(ma-40, mh-193, mh-203, jg-234)。未分离到 HEV-D 组病毒。分离株与对应标准株的核苷酸同源性在 76.7%~93.3%之间,与氨基酸同源性在 89.7%~98.4%之间,与国际测序定型标准一致(表 2)。

表 2 NPEV 与标准株同源性比较及定型结果

标本号	引物	与标准株 <i>nt</i> 同源性(%)	与标准株 <i>aa</i> 同源性(%)	血清 型别
HEV-A				
dl-114	292-222	84.1	97.2	CA6
HEV-B				
pm-2	292-222	78.2	90.2	E4
pm-4	292-222	79.7	97.4	E14
pm-9	292-222	76.7	97.3	E33
pm-10	012-011	77.8	89.7	E4
ma-46	292-222	79.4	93.5	E3
ma-48	292-222	84.1	98.2	CB2
ly-72	040-011	82.4	98.4	E7
ly-77	040-011	80.0	96.4	E7
ly-80	292-222	92.6	98.1	EV73
wd-181	292-222	79.7	97.3	E14
mh-187	292-222	91.2	97.4	E21
mh-191	292-222	93.3	98.1	EV73
mh-201	292-222	78.1	95.3	EV80
mh-214	292-222	80.1	95.5	E7
jg-221	040-011	87.5	96.0	EV75
qsh-271	292-222	78.6	96.6	E15
ly-307	292-222	78.5	94.6	E7
ly-308	040-011	82.4	98.4	E7
ly-315	292-222	78.6	93.6	E7
ly-319	040-011	90.3	96.4	E7
HEV-C				
ma-40	292-222	77.7	93.9	EV96
ma-47	292-222	77.7	95.7	CA17
mh-188	292-222	79.6	94.6	CA20
mh-193	292-222	81.2	93.7	EV96
mh-194	292-222	78.8	93.0	CA20
mh-200	292-222	79.8	95.7	CA24
mh-203	292-222	80.4	96.4	EV96
jg-234	292-222	82.0	95.5	EV96

3. 进化树分析:用 MEGA 软件分别分析 16 株 B 组、8 株 C 组病毒组间及与对应标准株间的亲源关系,从图 1、2 可看出相同型别的分离株与对应的标准株聚集在一起。HEV-B 组中,分离株 72、77、308、319、214、307 和 315 血清型别为 E7,其中 72、77、308、319 所用引物为 040/011,214、307、315 所用引物为 292/222。由于 040/011 扩增的是 VP1 区的 3' 端,而 292/222 扩增的是 VP1 区的 5' 端,所以做基

因树时不用 72、77、308、319。

讨 论

云南省地处中国西南边陲,外与近年来仍有脊灰野病毒流行的缅甸接壤^[1],存在输入性传播的危险;内与曾发现聚集性疫苗相关病例(cVDPV)的贵州省和发生过疫苗重组 PV 循环的四川省相邻^[6,7],给云南省维持无脊灰状态带来很大的挑战。本次调查选择出入境人员流动量较大的 10 个边境口岸 < 15 岁的人境健康儿童和境内健康儿童,进行 EV 动态监测,为维持无脊灰状态提供可靠的实验室依据。

本次调查分离的 PV 均为类疫苗株病毒,未发现野病毒株,说明目前云南省维持消灭脊灰状态良好。EV 和 PV 的分离率分别为 16.6% 和 7.2%,比同年在常规 AFP 标本中分离到的 NPEV 分离率(8.2%)和 PV 分离率(4.7%)高,是否与常规 AFP 病例采便及时率、采便质量、运送途中的保存状态等有关,有待进一步研究。

从各口岸 EV 分离情况可见,德宏拉影镇的 EV、PV 分离率分别为 45.7% 和 28.3%,均高于其他口岸。值得注意的是,E7 的 7 株病毒中,6 株来自德宏拉影镇,说明该病毒可能发生局部循环。德宏芒海镇虽未分离到 PV,但 NPEV 的分离率较高(30%);临沧南伞镇未分离到 EV。不同地区 EV 带病毒率的差异,可能是与当地的气候、地理环境、饮食与卫生习惯等因素有关,还有待进一步研究。

近来用基因测序方法对 EV 进行鉴定已成为定型的金标准^[8]。本次研究结果表明,云南省边境地区健康儿童携带的 NPEV 主要以 HEV-B 为主(66.7%),其次为 HEV-C 组。检测到的 EV 血清型涵盖 17 种,包括 4 种新型 EV:即 EV73、EV75、EV80 和 EV96。Tian 等^[9]曾对 1997—2000 年及 2004 年云南省 AFP 病例中的 NPEV 进行研究,并发现了 7 种新型 EV (EV75、EV76、EV80、EV81、EV83、EV93、EV96)。早在 2001 年,Oberste 等^[10]首先发现并报道了 EV73,此次在云南省边境健康儿童中检出 EV73,为国内首次报道。2 株 EV73 的基因序列已登入基因库,基因库编号为 AB474181 和 AB474182。新型 EV 在云南省的广泛分布及呈现多样性,表明继续开展对 EV 的分子生物学监测有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Wild Poliovirus Weekly Update. <http://www.polioeradication.org/casecount.asp>.
- [2] WHO. Polio laboratory manual. 4th ed. Geneva: WHO, 2004: 1-

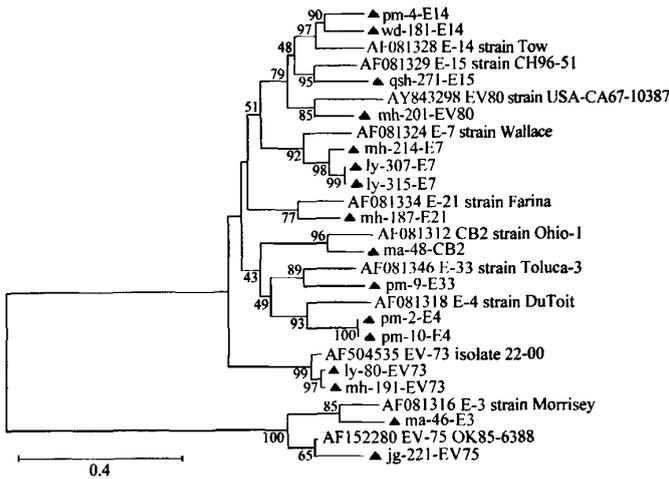


图1 HEV-B组分离株VP1区基因进化树分析(▲本次分离株)

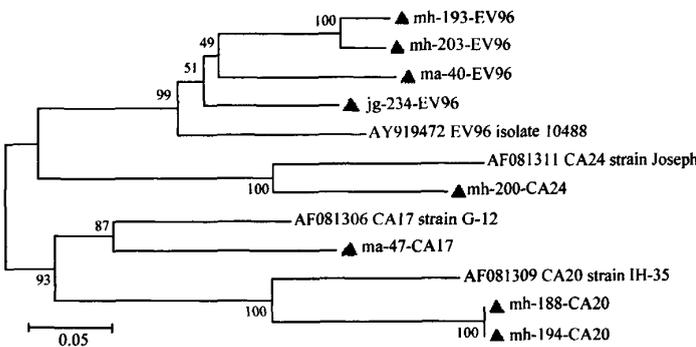


图2 HEV-C组分离株VP1区基因进化树分析(与标准株的比较)

157.
[3] Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, et al. Molecular evolution of the human enteroviruses; correlation of serotype with VP1

409-416.

(收稿日期:2009-08-12)
(本文编辑:张林东)

sequence and application to picornavirus classification. *J Virol*, 1999, 73(3):1941-1948.
[4] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform*, 2004, 5(1):150-163.
[5] Oberste MS, Maher K, Flemister MR, et al. Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses. *J Clin Microb*, 2000, 38(3):1170-1174.
[6] Yan DM, Wang DY, Zhao R, et al. Molecular biology characterization of the poliovirus isolates of Guizhou in 2004. *Chin J Vacc Immun*, 2005, 11(4):260-267. (in Chinese)
严冬梅, 王东艳, 赵蓉, 等. 贵州省2004年分离到的脊髓灰质炎病毒分子生物学特征. *中国计划免疫*, 2005, 11(4):260-267.
[7] Zhang LB, Hou XH, Chen L, et al. An analysis of AFP cases induced by vaccine-recombinant polioviruses. *Chin J Vacc Immun*, 2003, 9(4):189-192. (in Chinese)
张礼璧, 侯晓辉, 陈立, 等. 由疫苗重组脊髓灰质炎病毒引起的聚集性急性弛缓性麻痹病例分析. *中国计划免疫*, 2003, 9(4):189-192.
[8] Brown BA, Maher K, Flemister MR, et al. Resolving ambiguities in genetic typing of human enterovirus species C clinical isolates and identification of enterovirus 96, 99 and 102. *J Gen Virol*, 2009, 90(7):1713-1723.
[9] Tian BJ, Yoshida H, Wu Y, et al. Molecular typing and epidemiology of non-polio enteroviruses isolated from Yunnan province, the People's Republic of China. *J Med Virol*, 2008, 80(4):670-679.
[10] Oberste MS, Schnurr D, Maher K, et al. Pallansch molecular identification of new picornaviruses and characterization of a proposed enterovirus 73 serotype. *J Gen Virol*, 2001, 82(2):

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊现已实行“中华医学会信息管理平台”在线投稿

2010年中华医学会信息管理平台升级,本刊登录网址更新为中华医学会网站:<http://www.cma.org.cn>。在线投稿请点击首页上方“业务中心”。新老用户使用过程中具体注意如下:(1)第一次使用本系统进行投稿的作者,必须先注册,才能投稿。注册时各项信息请填写完整。作者自己设定用户名和密码,该用户名和密码长期有效。(2)已注册过的作者,请不要重复注册,否则将导致查询稿件时信息不完整。如果遗忘密码,可以从系统自动获取,系统将自动把您的账号信息发送到您注册时填写的邮箱中。向中华医学会系列杂志中不同杂志投稿时无须重复注册,进入系统后即可实现中华医学会系列杂志间的切换。本刊的审稿专家可使用同一个用户名作为审稿人进行稿件审理和作者投稿。(3)作者投稿请直接登录后点击“个人业务办理”,然后点击左上角“远程稿件处理系统”,在页面右上角“选择杂志”对话框中的“中华流行病学杂志”再点击“作者投稿”。投稿成功后,系统自动发送回执邮件。作者可随时点击“在线查稿”,获知该稿件的审稿情况、处理进展、审稿意见、终审结论等;有关稿件处理的相关结果编辑部不再另行纸质通知。投稿成功后请从邮局寄出单位介绍信,来稿需付稿件处理费20元/篇(邮局汇款),凡未寄单位介绍信和稿件处理费者,本刊将对文稿不再做进一步处理,视为退稿。如有任何问题请与编辑部联系,联系电话:010-61739449, Email:lxonly@public3.bta.net.cn。

本刊编辑部