



· 论 著 ·

湖南某地区 12 株肠道病毒 71 型聚集性病例基因组的序列分析

李万峰 戴文辉 符清明 (长沙医学院 湖南长沙 410219)

摘要: **目的** 分析湖南省湘西某地区疾控中心 2013 年 6-9 月期间采集、分离的 12 株肠道病毒 71 型基因组具体序列, 对其基因同源性进行分析。**方法** 对 12 株肠道病毒 71 型感染的手足口病确诊患儿进行样本采集、分离、培养和核酸序列分析。**结果** 12 株 EV71 病毒中获得 5 个来源不同的 EV71 病毒; VP1 部分基因进行同源性分析具有高度同源性 (高到 95.7%-100.0%) 之间; 基因全序列分析共存在 36 个碱基的差别。**结论** EV71 病毒分离株 VP1 基因进行全序列分析具有高度的同源性, 可能存在共同的进化源, 结合该地区上报和搜集病例的流行病学特征和人群的聚集性特点。

关键词: 湖南 肠道病毒 71 型 聚集性病例 基因序列分析

中图分类号: R725.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-5187 (2017) 07-070-01

基金项目: 湖南省教育厅科研基金资助项目 (NO: 12C0527- 湖南地区肠道病毒 71 型分子流行病学研究)

手足口病是对儿童健康安全威胁较为严重的一类传染病, 其发病人数常年位居丙类传染病之首。临床表现为低热、口腔等部位的丘疹疹和溃疡, 其病原学分析以肠道病毒 71 型 (EV71) 最为常见^[1]。湖南丘陵地区较多, 湘西仍存在加多农村自然村, 容易发生手足口病的聚集性病例。对该地区所搜集的患者进行病毒基因组序列分析有助于该病的早期检测和防控措施的及时开展, 现将本次研究结果汇报如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象

湖南省湘西某地区疾控中心于 2013 年 6-9 月期间, 上报的 26 例手足口病可疑病例, 最终确诊手足口病患者 16 例。病原学分析发现, 其中的 12 例为肠道病毒 71 型感染。

1.2 流行病学分析

(1) 时间分布: 患者均发病于 6-7 月之间, 其他时间亦有散发病例。

(2) 地区分布: 患者分布于 6 个自然村 (该 6 个自然村地理位置上存在毗邻关系), 其中发病 3 例的家庭 1 个、2 例的家庭 3 个、1 例家庭的 3 个。

(3) 人群分布: 患者中男性 4 人、女性 8 人; 均为 1-5 岁之间的儿童, 平均年龄 (3.15±1.09) 岁; 其中 10 例患者在首发病例后 3 天内陆续发病, 大于 3 天的仅 2 例患者; 12 例患者中包括 5 例重症患者、7 例非重症患者。

1.3 调查和研究方法

(1) 标本采集: 该地区疾控中心成立调查小组, 接到病例上报后即刻前往患者所在地, 由专业人员对急性期发作的患者进行肛拭子的样本采集, 存储于 3ml 采集液中, 低温保存及时送检。

(2) 病毒分离: 病毒核酸的提取使用专用成品试剂盒。鉴定使用 RT-PCR 成品试剂盒。

(3) 病毒培养: 对肠道病毒 71 型阳性标本接种到肌肉瘤细胞 (RD) 进行培养, 出现特有病变细胞后进行收集和病毒 RNA 的提取。

(4) 基因文库构建和测序: 使用逆转录试剂盒合成 cDNA, RT-PCR 引物参照中国疾病对 EV71 测序时所用引物, 标记产物经过葡聚糖凝胶 G-50 纯化 (QIAGEN 胶纯化试剂盒) 后, 在 ABI3100 自动化序列仪上进行核苷酸序列的测定^[2]。

(5) 核酸序列分析: 对测序结果使用 DNASTAR 进行拼接, 使用 NCBIblast 进行序列比对。

1.4 数据分析

采用 BioEdit 软件对核苷酸序列进行同源性分析, 采用 Mega6.0 对基因测序结果进行发育树的构建。

2 结果

2.1 病毒分离和培养结果

分离或培养的 12 株 EV71 病毒中获得 5 个来源不同的 EV71 病毒,

分别是 PY451 (非重症患者)、PY465 (非重症患者)、PY471 (非重症患者)、PY472 (重症患者) 和 PY476 (非重症患者)。

2.2 EV71 病毒分离株的同源性分析

根据 12 株 EV71 的 VP1 部分基因 (2985nt-3249nt) 核苷酸序列进行同源性分析, 并构建亲缘性关系树发现, 该次研究所采集、分离和培养的病毒标本具有高度同源性 (高到 95.7%-100.0%) 之间, 且在进化树种处于同一分支中, 说明该 12 株病毒标本具有共同的进化源。其中 PY451 和 PY465 感染者临床表现相似, 两病毒株相似度亦为 100%, 所涉及的 3 名患者均来自于同一自然村, 说明该地区 EV71 主要流行株相似度极高。

2.3 EV71 病毒分离株 VP1 基因的分析

12 株 EV71 病毒分离株的 VP1 基因进行全序列分析, 共存在 36 个碱基的差别, 但仅存在 8 个位点氨基酸的多态性, 说明该地区分离的 EV71 病毒相似度极高, 该结论与上述同源性分析结果一致。

3 讨论

肠道病毒 71 型于 1969 年在美国加利福利亚州以为中枢神经系统症状患儿的粪便标本中首次得到分离, 随着手足口病于 20 世纪 90 年代以来在全世界的广泛流行而备受关注^[2]。Brown (1999 年) 对肠道病毒 71 型进行分子流行病学分析发现, EV71 病毒主要分为 3 个基因型。而随着手足口病肠道病毒 71 型的不断变异, 其基因型种类也越来越多^[2]。对肠道病毒 71 型基因组的序列分析有助于确定手足口病首发病例来源, 判断该病毒的同源性及其变异状况, 从而为针对性的采取疾病防控措施提供理论依据。

研究发现, 该地区 12 例手足口病患者所分析的肠道病毒 71 型中, 有 5 个来源不同的 EV71 病毒, 但全部病株进行核苷酸序列的同源性分析, 标本具备高度同源性, 考虑到该地区居民的聚集性, 可能与原发疾病患者、隐性感染者和无症状带毒者在地区游走, 导致接触性传播有关, 而遭受粪便污染的食物和空气传播依然是该疾病的主要传播途径。受限于该地区的地形分布和人群流动特征, 手足口病广泛流行的可能性较低, 防控难度也不大^[3]。

VP1 基因是肠道病毒 71 型进行分子流行病学分析时的主要研究基因, 该编码区共 891nt, 编码了 297 个氨基酸^[3]。通过对 12 株 EV71 病毒分离株的 VP1 基因进行全序列分析发现, 存在碱基的一定差别, 但是氨基酸多态性不高, 说明该的确所手足口病所有病例的病毒株同源性较高。

参考文献

- [1] 刘莹莹, 千秋丽, 苏通, 等. 2011-2015 年河北省手足口病流行特征及病原特征分析 [J]. 中华疾病控制杂志, 2017, (2): 151-155.
- [2] 陈士伟, 王洁, 周仁希, 等. 2015 年杭州市手足口病肠道病毒 71 型和柯萨奇病毒 A 组 16 型构成变化与联合检测方法分析 [J]. 疾病监测, 2017, (2): 102-105.
- [3] 唐小清, 邓雯文, 张楠, 等. 2011-2015 年重庆市南岸区手足口病流行病学及病原学特征分析 [J]. 现代预防医学, 2017, (4): 599-604.

作者简介: 李万峰, 男, 实验师, 长沙医学院教师, 主要从事主要从事病原生物学、免疫学的实验教学及研究工作。