论著

文章编号:1000-5404(2009)23-2342-05

2007－2008年北京地区CA16VP1区系统进化分析

王 娟[1],罗 珍[2],范东瀛[1],高 娜[3],朱俊萍[1],安 静[1] (首都医科大学:[1]基础医学院微生物学教研室,北京 100069;[2]附属北京儿童医院皮肤科,北京 100045;[3]第三军医大学基础医学部组织胚胎学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

摘 要:目的 了解2007－2008年北京地区柯萨奇病毒A组16型(Coxsackievirus A16,CA16)流行情况及其种系进化规律和基因分型。**方法** 收集北京地区2007－2008年133例手足口病病例临床标本,从中筛选CA16毒株,扩增部分毒株VP1区并进行序列测定和分析。**结果** 共筛选得到39例45份CA16阳性标本,测定其中16株病毒的VP1区核苷酸序列,其同源性为91.43%～98.65%,氨基酸同源性为97.98%～100%。该16株病毒与GenBank中选取的24株CA16参考株的核苷酸同源性为78.13%～98.65%,氨基酸同源性为89.9%～100%。16株北京分离株中的9株与近年多数中国大陆分离株形成进化树上亲缘关系较近的一群,其余7株与我国台湾及周边国家的一系列分离株亲缘关系较近。**结论** CA16为北京地区手足口病的主要致病原之一,本地区毒株同源性较高,同GenBank中24株CA16参比毒株序列进行系统进化分析显示其属于B基因群,16株北京分离株在系统进化树上有分别归属于两支的趋势。

关键词: 柯萨奇病毒A组16型;手足口病;系统进化分析
中图法分类号: R181.34; R373.23; R394.3 **文献标识码:** A

Phylogenetic analysis based on VP1 gene of coxsackievirus A16 strains isolated in Beijing from 2007 to 2008

WANG Juan[1], LUO Zhen[2], FAN Dong-ying[1], GAO Na[3], ZHU Jun-ping[1], AN Jing[1] ([1]Department of Microbiology, School of Basic Medical Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069; [2]Department of Dermatology, Beijing Children's Hospital, Capital Medical University, Beijing 100045; [3]Department of Microbiology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the epidemic situation and the phylogenetic relationship of Coxsackievirus A16 (CA16) in Beijing from 2007 to 2008. **Methods** CA16 strains were isolated from the clinical specimens of 133 patients with hand-foot-mouth disease (HFMD). VP1 gene fragments were amplified by RT-PCR. The produced fragments were sequenced and analyzed. **Results** Totally 45 CA16 positive specimens were identified from 39 patients and the entire VP1 genes of 16 CA16 strains were sequenced. For these 16 strains, the nucleotide identity of VP1 genes ranged from 91.43% to 98.65%, the amino acid identity ranged from 97.98% to 100%. The nucleotide and amino acid identity of VP1 genes between these 16 strains and CA16 reference strains from GenBank was 78.13% to 98.65% and 89.9% to 100% respectively. Nine out of the 16 CA16 strains are closely related with some mainland Chinese isolates in recent years. The other 7 strains are closely related with Taiwan-98 isolate, shzh01-69 isolate and some isolates from other countries. **Conclusion** CA16 is one of the important pathogens of HFMD in Beijing, and the isolates in this study have close association in genetic relationship. Phylogenetic analysis shows that all of the 16 CA16 strains isolated in this study belong to genogroup B and they might be divided into 2 branches.

Key words: Coxsackievirus A16; hand-foot-mouth disease; phylogenetic analysis

---

基金项目: 北京市自然科学基金(7072009);北京市属高等学校人才强教计划(2006)
Supported by the Natural Science Foundation of Beijing (7072009) and the Talent Plan of High Educational Colleges of Beijing (2006)
作者简介: 王 娟,女,江苏省盐城市人,硕士研究生,主要从事病原微生物方面的研究。电话:(010)83911737,E-mail:juans2007006@yahoo.cn
通信作者: 朱俊萍,电话:(010)83911688,E-mail:jpzhu0217@vip.sina.com
安 静,电话:(010)83911741,E-mail:anjing@ccmu.edu.cn
收稿日期: 2009-07-27;**修回日期:** 2009-09-07

柯萨奇病毒 A 组 16 型(Coxsackievirus A16, CA16)为无包膜单正链 RNA 病毒,属于小 RNA 病毒科(Picornaviridae)肠道病毒属(Enterovirus)。CA16 与肠道病毒 71 型(Enterovirus 71,EV71)同为儿童手足口病(hand-foot-mouth disease,HFMD)的两大主要病原。EV71 感染除引起 HFMD 外还可引起较为严重的并发症,如无菌性脑炎、脑膜炎、肺水肿等[1,2]。相对 EV71 而言,CA16 感染引起的 HFMD 症状较温和,合并症的发生率也较低[3]。但近年越来越多的报道指出,CA16 感染可能与心肌炎、难治性休克等致死性并发症的发生有关[4],个别地区还有引起成人致死性肺炎的报道[5]。CA16 的基因组全长约为 7 410 bp,其 VP1 基因长 891 bp,编码产生含 297 个氨基酸的 VP1 蛋白。VP1 蛋白是 CA16 主要的中和抗原决定簇所在部位,也是肠道病毒血清分型的依据。本研究从 2007 – 2008 年北京儿童医院门诊病例标本中筛选 CA16 阳性标本,并利用特异性引物扩增其 VP1 区进行序列测定和分析,以了解近年北京地区 CA16 流行情况和北京地区 CA16 的遗传学背景及种系进化关系。

1　材料与方法

1.1　标本采集

所用咽拭子标本和肛拭子标本取自北京儿童医院门诊诊断为手足口病的患儿,共 133 例,其中 2007 年 51 例,男性 29 例,女性 22 例,年龄分布 1 个月至 7 岁 10 个月之间;2008 年 82 例,男性 48 例,女性 34 例,年龄分布 8 个月至 14 岁之间,均为无严重神经系统并发症的轻症手足口病患者。所有标本采集后置于病毒保存液,–80℃冻存。

1.2　载体、酶、菌株与试剂

逆转录酶 SuperScript Ⅱ购自 Invitrogen 公司,pGEM-T Easy Vector System、随机引物购自 Promega 公司,RNA 酶抑制剂、dNTP、DNA 聚合酶、限制性内切酶购自 TaKaRa 公司。QIAamp Viral RNA Kit 购自 QIAGEN 公司。感受态大肠杆菌 DH5α、IPTG、X-Gal 购自鼎国生物技术公司。其他试剂均为分析纯试剂。

1.3　RNA 提取

直接从临床标本中提取病毒 RNA。参照 QIAamp Viral RNA Mini Kit 操作程序提取标本中的病毒 RNA。

1.4　RT

以病毒 RNA 为模板,应用随机引物在逆转录酶的作用下合成 cDNA。反应体系为 20 μl,包括 11 μl 病毒 RNA,随机引物,dNTP,反应条件为 65 ℃ 5 min,加入逆转录酶后 25 ℃孵育 10 min,42 ℃延伸 50 min,98 ℃变性 5 min。

1.5　PCR

以 CA16 和 EV71 国际标准株、亚洲地区参考株相关保守区序列为参考,利用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计特异性引物,肠道病毒通用引物及 CA16 筛选引物序列及反应条件、反应体系见文献[6]。首先应用肠道病毒 5′UTR 区通用引物(E1/E2)筛选肠道病毒阳性标本,再利用 CA16 筛选引物(CA16-1/CA16-2)从肠道病毒阳性标本中筛选 CA16 阳性标本。其后对部分 CA16 阳性标本的完整 VP1 区进行特异性扩增,引物序列为 VP1-1:5′-AGCCCAGGACAACTTCAC-3′, VP1-2:5′-GCCGATTCACTACCCTAT-3′。

PCR 扩增 CA16VP1 区,PCR 反应体系同上,反应条件为:94 ℃预变性 5 min ,94 ℃变性 1 min ,50 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 1 min 30 s,39 个循环,72 ℃延伸 10 min。

PCR 扩增后特异性片段经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离,TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit 回收纯化后,分别与 pGEM-T Easy 载体连接后转化感受态大肠杆菌 DH5α,阳性克隆经扩增后用 TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit 提取质粒,并经限制性内切酶酶切鉴定。

1.6　序列测定和系统进化分析

序列测定由 Invitrogen 公司完成,每一样本重复检测 3 次,用于序列拼接、分析和系统进化分析的软件包括 BioEdit、DNASTAR、ClustalX(1.83)和 MEGA4.1。从 GenBank 中选取 24 个不同年份不同地区的 CA16VP1 序列作参比序列,并以 BrCr(EV71)为组外对照。所有参比序列及来源见表 1。

表 1　系统进化分析所用参比序列

序列名称	分离年代	分离地	GenBank 索取号
G-10	1951	South Africa(SAF)	U05876
MY823-3	1997	Sarawak,Malaysia(SAR)	AM292433
5079	1998	Taiwan(TWN)	AF177911
S70382	1998	Sarawak,Malaysia(SAR)	AM292461
UM16809	1998	Peninsular Malaysia(MAL)	AM292483
0001	1999	Perth,Western Australia(AUS)	AM292434
UM12969	1999	Peninsular Malaysia(MAL)	AM292479
SB3512	2000	Sarawak,Malaysia(SAR)	AM292469
TSI-2000	2000	Thailand(THAI)	AM292477
UM17115	2000	Peninsular Malaysia(MAL)	AM292484
Shzh00-1	2000	China(CHN)	AY790926
S33072	2001	Sarawak,Malaysia(SAR)	AM292459
Shzh01-69	2001	China(CHN)	AY895111
EV4-5-HUKM	2002	Peninsular Malaysia(MAL)	AM292453
SB7883	2002	Sarawak,Malaysia(SAR)	AM292472
SB13044	2003	Sarawak,Malaysia(SAR)	AM292475
BJ03-ZDP	2003	China(CHN)	AY821798
0033	2005	Perth,Western Australia(AUS)	AM292435
1018T	2005	South Vietnam(VNM)	AM292441
SB16087	2005	Sarawak,Malaysia(SAR)	AM292476
Shzh05-1	2005	China(CHN)	EU262658
CNS68762	2006	Sarawak,Malaysia(SAR)	AM292451
FY18	2008	China(CHN)	EU812514
GZ08	2008	China(CHN)	FJ198212
BrCr	1970	United States of American(USA)	U22521

2　结果

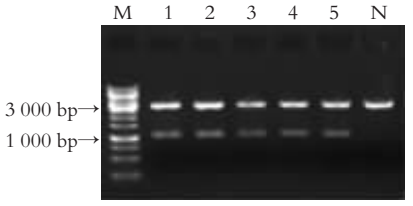
2.1　肠道病毒检测及 CA16 检测

以肠道病毒 5′UTR 区通用引物(E1/E2)对 2007 年 51 例共 82 份标本,2008 年 82 例共 157 份标本进行检测,PCR 扩增出约 435 bp 大小的片段判定为阳性。经检测,2007、2008 年样本中共有 92 例 106 份肠道病毒阳性标本。在此基础上,以 CA16 筛选引物(CA16-1/CA16-2)扩增肠道病毒阳性标本。

PCR 扩增出 882bp 大小的片段判定为 CA16 阳性。结果显示 2007、2008 两年标本中共扩增出 39 例 45 份 CA16 阳性标本。

2.2 CA16 阳性样本 VP1 区扩增

用 CA16VP1 区特异性引物(VP1-1/VP1-2)对 CA16 阳性标本进行特异性 PCR 扩增。PCR 产物大小约为 1 100 bp,经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测后回收纯化。纯化产物经连接、转化、质粒提取及酶切鉴定,结果如图 1 所示 5 个样本均切出大小约 1 100 bp 的条带,与预期相符。测序后用 BioEdit 和 DNASTAR 软件拼接后进行同源性比对,证实所得序列覆盖 VP1 基因全长。



M:DNA 标准;1:4232Y;2:4241Y;3:4282Y;4:5101Y;5:6041Y;N:pGEM-T Easy Vector

图 1 CA16 覆盖 VP1 区 PCR 扩增产物经分子克隆酶切鉴定

2.3 CA16VP1 区核苷酸、氨基酸序列同源性分析

首先将 16 株北京分离株的核苷酸序列和氨基酸序列进行比对,核苷酸同源性为 91.43% ~98.65%,氨基酸同源性为 97.98% ~100%,其中 5 株 VP1 区氨基酸序列完全相同。将 16 株北京分离株与从 GenBank 中选取的不同年份不同地区的 24 个 CA16 分离株的 VP1 基因序列进行同源性比对。16 株北京分离株与 G-10 国际标准株(U05876)的核苷酸同源性和氨基酸同源性较低,分别为 78.86% ~80.26% 和 91.25% ~92.26%;与 2008 年安徽阜阳株(EU812514)的核苷酸同源性和氨基酸同源性也较低,分别为 78.13% ~80.25% 和 89.90% ~90.91%;与其它 22 株 CA16 参比序列的核苷酸同源性为 88.28% ~98.65%,氨基酸同源性为 97.31% ~100%。表 2 为 CA16 北京分离株与各参比序列的核苷酸及氨基酸同源性比较结果。将 G-10 国际标准株(U05876)与 08 年安徽阜阳株(EU812514)进行同源性比较发现,两者全基因组序列的核苷酸同源性和氨基酸同源性分别高达 99.82% 和 99.64%,其 VP1 区的核苷酸和氨基酸同源性分别为 99.44% 和 98.65%。

表 2 CA16 北京分离株与参比毒株核苷酸及氨基酸同源性(%)

与北京分离株比较的参比毒株	核苷酸同源性	氨基酸同源性
G-10(CA16)	78.86 ~80.26	91.25 ~92.26
FY18-08(CA16)	78.13 ~80.25	89.90 ~90.91
其他 22 株 CA16 参比毒株	88.28 ~98.65	97.31 ~100
BrCr(EV71)	80.42 ~87.50	70.03 ~71.04

2.4 基于 VP1 基因的 CA16 系统进化分析

利用 MEGA4.1 软件对 16 株 CA16 北京分离株和 GenBank 中的 24 株 CA16 及 1 株 EV71 国际标准株进行系统进化分析,方法为 Neighbor-Joining。图 2 为基于 VP1 基因序列构建的系统进化树,从图中可见,A 基因群包括 G-10(U05876)和 2008 年安徽阜阳株(EU812514),其余均为 B 基因群。16 株北京分离株在进化树中分别归属于两支,其中 9 株与 BJ03-ZDP(AY821798)、Shzh00-1(AY790926)、Shzh05-1(EU262658)和 GZ08(FJ198212)等中国内地分离株构成亲缘关系较近的一支;其余 7 株与马来西亚、泰国、越南、澳大利亚等周边国家的一系列分离株及我国台湾分离株(AF177911)和深圳 shzh01-69 株(AY895111)形成亲缘关系较近的另一支;而马来西亚 1998 和 2005 年分离的两株 SAR-98 株(AM292461)和 SAR-05 株(AM292476)相对这两支独立分支。SAR-98 株(AM292461)与 B 型其他各株 VP1 区核苷酸同源性为 88.28% ~90.86%,SAR-05 株(AM292476)与 B 型其他各株 VP1 区核苷酸同源性为 89.71% ~94.84%,除这两株之外的 B 群株之间 VP1 区核苷酸同源性为 91.43% ~99.66%。

对 16 株北京分离株分别进行核苷酸及氨基酸变异位点分析,核苷酸变异为散在分布的无义突变,氨基酸未发现有意义的变异(结果未列示)。

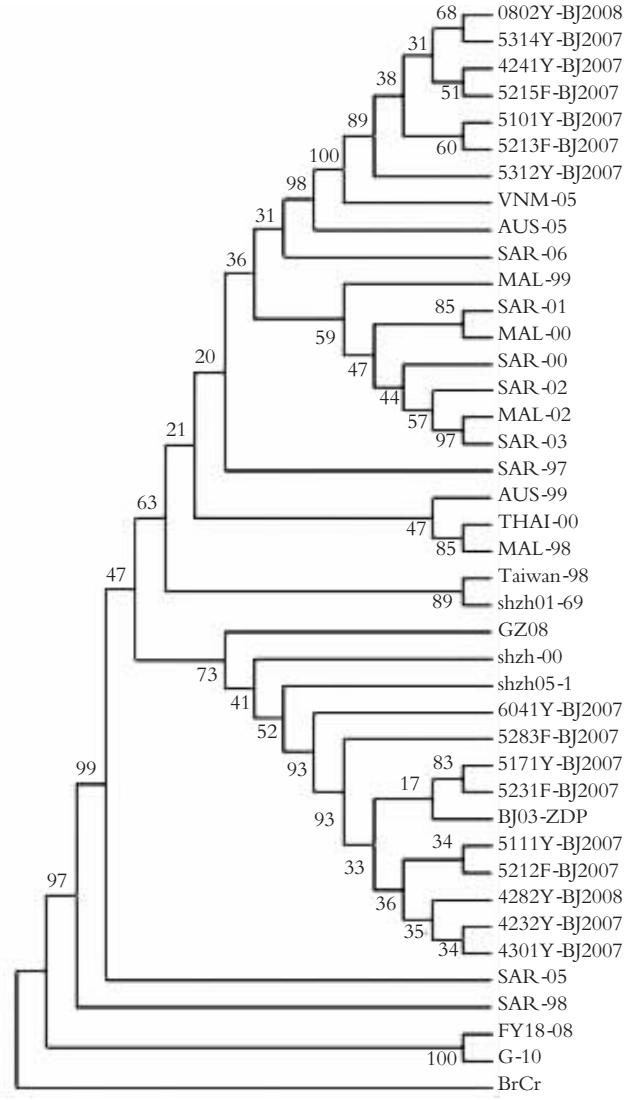


图 2 基于完整 VP1 基因核苷酸序列构建 CA16 系统进化树

3 讨论

自 20 世纪 40 年代末,柯萨奇病毒在全球多个国家引起过手足口病的暴发或流行。研究证实,CA2、CA4、CA5、CA8、CA10、CA16、CB5、EV71 等多种肠道

病毒均可引起手足口病,其中最主要的病原是 CA16 和 EV71,二者常相伴引起手足口病的暴发或流行,但每次流行中两种病毒所占比例有所不同。我国在上世纪 80 年代即从北京、天津、辽宁等地手足口病病例中分离鉴定出 CA16[7-9],提示 CA16 为当时我国北方地区手足口病的主要病原体。近年来对北京及其他省市手足口病的调查研究[6,10-13]也表明, CA16 和 EV71 仍为手足口病的主要致病原,但各省市报道的 HFMD 流行病原中两者比例存在一定差别。

与 EV71 相比,CA16 引起的临床症状较轻,相关研究及资料积累较少。迄今为止,GenBank 中分离自不同国家和地区的 CA16 全基因组序列毒株仅有 6 株。近年来有研究表明,CA16 感染也与一些致死性并发症的发生有关[4,5]。因此,逐步深入开展对 CA16 的研究具有重要意义。

肠道病毒系统进化分析的标准不一,常采用 VP1 或 VP4 序列作为进化分析的指标。在 EV71 的分子流行病学研究中,基于 VP1 和 VP4 序列进行的系统进化分析中两者得到的结果基本相符[14]。但在 CA16 的系统进化分析中,可作为参比的 VP1 序列不多,早期 CA16 的系统进化分析多基于 VP4 序列进行,但 VP1 区作为病毒主要的中和抗原决定簇编码基因所在部位,其片段较 VP4 序列长,包含的信息量大,在研究病毒的变异趋势方面可能更有参考价值,因此本研究选用 VP1 序列作为系统进化分析的标准。

GenBank 中现有 CA16VP1 区序列数量较少,大多是来自亚太地区国家的分离株。从中选取 24 株代表不同国家不同年份的 CA16 代表株和一株 EV71 国际标准株 BrCr 作为组外对照,与本研究所得 16 株 CA16VP1 序列进行比对。经序列同源性分析,所有 16 株 CA16 北京分离株 VP1 区核苷酸和氨基酸同源性均较高,核苷酸同源性为 91.43% ~98.65%,氨基酸同源性为 97.98% ~100%,而与其他地区分离株的同源性则较低,但各有差别。与 G-10 国际标准株的核苷酸同源性最高为 80.26%,氨基酸同源性最高为 92.26%,与安徽阜阳株核苷酸同源性最高为 80.25%,氨基酸同源性最高为 90.91%,而与其他参比序列的同源性则相对前两者高,核苷酸同源性为 88.28% ~98.65%,氨基酸同源性为 97.31% ~100%。这些数据表明近年的 CA16 流行株与国际标准株相比在核苷酸水平和氨基酸水平都已经发生了较大的变化,但同时期同一地区流行株的同源性较高,提示 CA16 的变异可能与地域性有关。氨基酸水平未发现有意义的突变提示北京地区近年流行的 CA16 抗原性可能无明显变化。

同源性分析发现 08 年安徽阜阳株与 G-10 国际标准株的 VP1 区基因核苷酸和氨基酸同源性分别高达 99.44% 和 98.65%,后将两者全基因组序列进行比对,发现两者全基因组核苷酸和氨基酸同源性分别高达 99.82% 和 99.64%。

Li 等[12] 2005 年报道的研究我国深圳及北京地区 1999 – 2004 年分离的 CA16 的基因特征时,对包括其研究获得以及当时可从 GenBank 中获得的 CA16 参考毒株共 53 株,基于 VP4 序列进行了系统进化分析,将 CA16 分为 A、B、C 三个遗传谱系(genetic lineage)。2007 年 Perera 等[15]报道了对亚太地区 5 个国家时间跨度达 10 年的 52 株 CA16 的研究,其基于 VP1 区核苷酸序列进行的系统进化分析,将 CA16 分为 A、B 两个基因群(genogroup B),并认为 Li 等所描述的 CA16 的 C 系属于他们研究中 CA16 B 群的一个分支谱系。

本研究基于 CA16VP1 区全长 891bp 的核苷酸序列构建了系统进化树(图 2)。参考 EV71 分型标准[16]及 Perera 等[15]的 CA16 分型标准, 即 VP1 基因变异率达 15% 以上为不同基因群的标准,将表 2 所列 CA16 参比序列及 16 株北京分离株分为 A、B 两个基因群。A 群包括 G-10 (U05876) 和 08 年安徽阜阳株 (EU812514),二者 VP1 区核苷酸同源性为 98.65%,其余均划分为 B 群。A、B 两群之间的变异率为 19.74% ~22.21%,B 群分离株之间的变异率低于 11.7%。从图 2 系统进化树可见,本研究中 16 株 CA16 的北京分离株从进化趋势上与参比毒株形成亲缘关系较近的两支,其中一支包括我国南北方地区如,广州、深圳和北京等的中国内地分离毒株;另一支包括北京株、澳大利亚株及我国台湾、深圳的分离株和来自马来西亚、泰国、越南等周边国家的分离株。推测进化树上这两簇的形成可能与其进化来源有关。

Hosoya 等[17]在研究中指出,CA16 的变异是一个随时间迁移逐渐呈现遗传多样性的长期的过程。在一个流行阶段内以某个基因群的毒株为主,下一个流行阶段中又由新的基因群替代成为新的优势流行株。他们认为其研究的日本 Fukushima 地区 CA16 相关的 HFMD 的反复爆发除了与病毒本身日积月累的遗传多样性有关外,还与新的基因群的引入有关。在进化树上聚集成簇的 CA16 分离株与分离时期的关系要比地域的关系更密切。由于本研究标本年限较集中,所构建进化树中病毒株的分簇与时间的关系不明显,但包括北京分离株在内的部分中国大陆分离毒株明显归属于一支。

CA16 的进化速度虽不如 EV71 快,但作为 RNA

病毒,CA16 变异频率也相对较高[18]。因此继续加强研究和积累 CA16 的相关流行病学资料具有十分重要的意义。本研究为进一步深入阐明和认识 CA16 的起源和进化积累了基础资料。

参考文献:

[1] Chan L G, Parashar U D, Lye M S, *et al*. Deaths of children during an outbreak of hand, foot, and mouth disease in Sarawak, Malaysia: clinical and pathological characteristics of the disease. For the Outbreak Study Group[J]. Clin Infect Dis,2000, 31(3): 678 - 683.

[2] Lin T Y, Twu S J, Ho M S, *et al*. Enterovirus 71 outbreaks, Taiwan: occurrence and recognition[J]. Emerg Infect Dis, 2003, 9(3): 291 - 293.

[3] Chang L Y, Lin T Y, Huang Y C, *et al*. Comparison of enterovirus 71 and coxsackie-virus A16 clinical illnesses during the Taiwan enterovirus epidemic, 1998[J]. Pediatr Infect Dis J, 1999, 18(12): 1092 - 1096.

[4] Wang C Y, Li-Lu F, Wu M H, *et al*. Fatal coxsackievirus A16 infection[J]. Pediatr Infect Dis J, 2004,23(3): 275 - 276.

[5] Legay F, Leveque N, Gacouin A, *et al*. Fatal coxsackievirus A-16 pneumonitis in adult[J]. Emerg Infect Dis, 2007, 13(7): 1084 - 1086.

[6] 朱俊萍,徐子刚,陈 辉,等. 2007 年北京地区儿童手足口病病原的初步筛查[J]. 病毒学报, 2009,25(1):23 - 28.

[7] 沐桂藩,吕 华,顾方舟,等. 北京市手足口病的病原学研究[J]. 病毒学报, 1986,2(3):220 - 222.

[8] 肖明华,叶智贞,张之伦,等. 天津市首次从手足口病人分离出 Cox-A16 肠道病毒[J]. 天津医药, 1985,13(6):355 - 357.

[9] 曹逸云,阳选祥,李 靖,等. 我国手足口病的病原学研究[J]. 中国医学科学院学报, 1985,7(5):333 - 336.

[10] 杨智宏,朱启镕,李秀珠,等. 2002 年上海儿童手足口病病例中肠道病毒 71 型和柯萨奇病毒 A 组 16 型的调查[J]. 中华儿科杂志, 2005, 43(9):648 - 652.

[11] 张寿斌,廖 华,黄呈辉,等. 深圳 237 例手足口病肠道病毒血清型基因及临床特征[J]. 中国当代儿科杂志, 2008,10(1):38 - 41.

[12] Li L,He Y,Yang H,*et al*. Genetic characteristics of human enterovirus 71 and coxsackievirus A16 circulating from 1999 to 2004 in Shenzhen, People's Republic of China[J]. J Clin Microbiol, 2005,43(3): 3835 - 3839.

[13] 朱汝南,钱 渊,邓 洁,等. 北京市儿童手足口病与肠道病毒 71 型和柯萨奇病毒 A 组 16 型感染有关[J]. 中华流行病学杂志, 2007, 28(10): 1004 - 1008.

[14] Cardosa M J, Perera D, Brown B A, *et al*. Molecular epidemiology of human enterovirus 71 strains and recent outbreaks in the Asia-Pacific region: comparative analysis of the VP1 and VP4 genes[J]. Emerg Infect Dis, 2003,9(4):461 - 468.

[15] Perera D, Yusof M A, Podin Y, *et al*. Molecular phylogeny of modern coxsackievirus A16[J]. Arch Virol,2007,152(6):1201 - 1208.

[16] Brown B A, Oberste M S, Alexander J P, *et al*. Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998 [J]. J Virol, 1999,73(12): 9969 - 9975.

[17] Hosoya M, Kawasaki Y, Sato M, *et al*. Genetic diversity of coxsackievirus A16 associated with hand, foot, and mouth disease epidemics in Japan from 1983 to 2003[J]. J Clin Microbiol, 2007,45(1): 112 - 120.

[18] 杨朝辉,尹少甫,张宗久,等. 柯萨奇病毒 A 组 16 型[J]. 中国疫苗和免疫, 2009,15(1):72 - 77.

(编辑 王 红)

(上接 2337 页)

2 讨论

RN 临床并不少见,病发率在普通人群中为 0.11% ~10%,主要发生于儿童。患者早期表现为膀胱和输尿管返流(vesicoureteric reflux,VUR),随着病情的进展,当损害肾间质导致肾功能障碍时,即引起 RN。目前 RN 尚缺少敏感的检测方法,其发病机制也不清楚,可能与菌尿、尿流动力改变、免疫损伤、血管病变等方面的因素有关。本病系慢性进行性疾病,最后发生肾功能衰竭。由于 RN 均为 VUR 所致,因此 RN 的诊断分 2 步[2]:首先判断是否存在 VUR,其次判断是否有相关的肾脏结构和功能损害。

排尿性膀胱尿路造影是目前诊断 VUR 最直接、最准确的检查手段,该项检查结合膀胱压和尿流速率监测还可评价膀胱及尿道功能,通过导尿管和耻骨上膀胱穿刺管注入含可溶性造影剂溶液,排尿时摄片观察有无膀胱输尿管返流。返流分轻、中、重度,返流入肾脏集合系统的为重度返流,对肾功能损害较大。该项检查无创伤,简便、安全,如消毒彻底,检查前控制感染有效,很少发生逆行感染。本例患者经检查显示严重 VUR,而膀胱及尿道功能正常。肾脏功能损害主要依据尿蛋白、尿比重和肾功检测,确诊主要通过肾活检。本例患者肌酐明显增高,出现蛋白尿和尿比重下降,提示肾功能异常;肾活检显示肾小球及其间质的病变,证实其肾脏结构的损害。因而符合 RN 的诊断。

RN 的治疗是制止尿液返流和控制感染[2],防止肾功能进一步恶化。内科治疗包括控制尿路感染、定期排尿,避免膀胱内压力增高;如有便秘以及泌尿系结石应积极治疗。外科治疗包括抗返流手术——输尿管重新植入,该手术特别适用于儿童重度返流,轻或中度患者常无输尿管扩张或肾盂积液,一般不会造成严重肾实质病变,而且通常在控制尿路感染后返流可消失,所以一般不考虑手术治疗。成人 VUR 并出现反复尿路感染,经内科积极治疗无法控制者可考虑手术治疗。

关键词: 返流性肾病;膀胱造影;诊断

中图法分类号: R692 **文献标识码**: B

参考文献:

[1] Cendron M. Reflux nephropathy[J]. J Pediatr Urol,2008, 4(6):414 - 421.

[2] Brakeman P. Vesicoureteral reflux, reflux nephropathy, and end - stage renal disease[J]. Adv Urol, 2008, 2008: 508 - 949.

(编辑 张 维)