文章编号:1000-5404(2010)15-1589-05

论著

重庆地区 2009 年手足口病病原分离鉴定及病毒基因组特征

蔡丽君[1],王 均[1],许红梅[1],常国辉[2] (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院感染消化科[1];100071 北京,军事医学科学院微生物流行病研究所病原微生物生物安全国家重点实验室[2])

【摘要】 目的 对 2009 年重庆市手足口病(hand-foot-mouth disease, HFMD)患儿粪便标本的病原进行分离鉴定及全基因组序列测定,并同相关毒株序列进行同源性比对和进化分析,以了解新分离病毒基因组序列特征及可能的传播来源。方法 将 47 例手足口病患儿临床标本接种人横纹肌肉瘤细胞(human rhabdomyosarcoma,RD)进行分离培养,采用 EV、EV_{71}、Cox A16 特异性引物对出现细胞病变的细胞上清进行 PCR 鉴定,同时电镜观察病毒颗粒形态,将鉴定的病毒基因组分为 4 个片段进行 RT-PCR 扩增,扩增产物纯化后进行 PCR 测序。通过末端重叠序列拼接成全长病毒基因组序列,利用生物信息学软件对序列进行比对分析,绘制进化树。结果 在 47 例 HFMD 患儿临床标本接种 RD 细胞培养中,有 7 份观察到明显的细胞病变,通过 RT-PCR 检测有 3 份呈 EV 特异性引物及 EV_{71} 特异性引物阳性,而所有标本 Cox A16 特异性引物检测为阴性,EV_{71} 特异性引物的 PCR 产物测序结果证实为 EV_{71} 病毒,同时用电镜观察形态病毒感染的 RD 细胞,为圆形无包膜病毒颗粒,证实所分离病毒为 EV_{71}。测序获得的 3 株 EV_{71} 病毒基因组全长分别为 7 409、7 406 nt 和 7 404 nt,其 VP1 氨基酸序列同源性达 99% 以上。Blast 分析表明重庆毒株 Chongqing-2-09-China(GQ994990.1)、Chongqing-3-09-China(GQ994991.1)均与安徽阜阳 2008 年分离的 3 株 EV_{71} 毒株同源性较高,重庆毒株 Chongqing1-09-China (GQ994989.1)与 2005 年台湾分离 984 polyprotein、1235 polyprotein 序列毒株同源性最高,进化分析表明属于 C4 基因亚型。结论 新分离的重庆 EV_{71} 毒株基因组序列符合肠道病毒特征,与国内 2008 年安徽阜阳及台湾 2005 年分离的 EV_{71} 病毒可能具有相同来源。

【关键词】 手足口病;EV_{71} 病毒;基因组;序列测定;进化分析
【中图法分类号】 R512.5;R372;R394.3 【文献标志码】 A

Identification of enterovirus type 71 isolated from Chongqing children with hand-foot-mouth disease in 2009 and its genomic characteristics

Cai Lijun[1], Wang Jun[1], Xu Hongmei[1], Chang Guohui[2] ([1]Department of Infection and Gastroenterology, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014; [2]State Key Laboratory of Pathogens and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing, 100071, China)

【Abstract】 Objective To study the genomic sequence characteristics and possible origins of enterovirus type 71 (EV_{71}) isolated from feces of patients with hand-foot-mouth disease (HFMD) from Chongqing in 2009, and compare the evolution of 3 EV_{71} strains with similar genome sequences. Methods HFMD specimens were inoculated into human rhabdomyosarcoma (RD) cells for isolation of enteroviruses (EV). Supernatant of diseased cells was detected by RT-PCR with specific primers of EV, EV_{71} and Coxsackie A16, respectively. Morphology of virus particles was observed under an electron microscope. The identified virus gene was cut into 4 fragments and amplified by RT-PCR. Complete genome sequences were detected by PCR, analyzed using bioinformatic programs, and plotted into an evolution tree. Results Significant diseased cells were observed in 7 out the 47 specimens from patients with HFMD that were inoculated into RD cells to isolate EV. RT-PCR showed that 3 out of the 7 specimens were positive for the specific primers of EV and EV_{71}, while all the samples were negative for the specific primers of Coxsackie A16. EV_{71} was confirmed to be an EV_{71} virus by sequencing of the PCR products of its specific primers. The virus particles in infected RD cells were round in shape with no envelope under a scanning electron microscope. The length of 3 EV_{71} strains was 7 409 nt, 7 406 nt, and 7 404 nt, respectively. Their homologous VP1 sequence reached over 99%. Blast analysis showed that the homology of strains isolated in Chongqing (Chongqing2-09-China and Chongqing3-09-China) was similar with

【基金项目】 病原微生物生物安全国家重点实验室开放基金(SKLPBS0919)
【通信作者】 许红梅,E-mail:xuhongm0095@sina.com
常国辉,E-mail:changuohui999@yahoo.com.cn

that of strains isolated in Fuyang, Anhui Province (2008), China. The homology of Chongqing1-09-China was identical with that of 984 polyprotein and 1 235 polyprotein isolated in Taiwan (2005, China). Phyiogenefie analysis showed that these strains belonged to subtype of C4 gene. **Conclusion** The newly isolated EV strains have the characteristics of enterovirus and may be of the same origin of those isolated in Fuyang County, Anhui Province (2008) and Taiwan (2005), China.

[Key words] hand-foot-mouth disease; enterovirus type 71; genome; sequencing; phylogenetic analysis

Supported by the Opening Funds from State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity (SKLPBS0919). Corresponding author: Xu Hongmei, E-mail: xuhongm0095@sina.com, Chang Guohui, E-mail: changguohui999@yahoo.com.cn

肠道病毒71型(enterovirus type 71, EV_{71})为小RNA病毒科肠道病毒属病毒。自1974年Schmidt等[1]首次报道从美国加利福尼亚爆发的表现为神经系统症状疾病的患者中分离到EV_{71}病毒,至今许多国家已经相继报道EV_{71}病毒引起的暴发与流行。目前已知EV_{71}病毒感染的手足口病(hand-foot-mouth disease, HFMD)最为常见,多发生于婴幼儿,可引起手、足、口腔等部位的疱疹,个别患者可引起心肌炎、肺水肿、无菌性脑膜脑炎等并发症。近年EV_{71}病毒在亚太地区的流行呈上升趋势,其中以1997-1998年东南亚和台湾、香港地区大规模手足口病的流行最为严重[2,3],在中国大陆,手足口病是每年夏秋季节在各地多发的肠道传染病。2009年4月在重庆地区部分幼托机构发生了手足口病的局部流行或散发,对收集患儿标本进行病毒分离,分离出3株EV_{71}型病毒。为鉴定新分离毒株的基因组特性,了解流行株的地理来源,我们对其中3株病毒的基因组进行全序列测定及分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本采集 选取2009年3-4月在重庆医科大学附属儿童医院门诊和住院部诊断为手足口病,同时征得家长同意的47例患儿。诊断标准参照第7版实用儿科学[4]。用无菌方法采集急性期患儿(病后3~7 d)3~5 g粪便或肛拭子,置于灭菌的带盖玻璃瓶中,脑脊液标本直接采集,所有标本放入-70 ℃冰箱保存,置于干冰下保存运输。

1.1.2 细胞及试剂 人横纹肌肉瘤细胞(human rhabdomyosarcoma, RD)由军事医学科学院微生物流行病研究所提供,RNA提取试剂盒(Qiagen Viral RNA Mini Kit)和胶回收试剂盒Quick Gel Extraction Kit(Qiagen公司),2.5 mmol/L dNTP Mixture、*Taq* DNA聚合酶、Maker DL 2000和pMD18-T(日本TaKaRa公司),AMV逆转录酶、RNasin抑制剂(美国Promega公司),逆转录酶Superscript™ Ⅱ RT(Invitrogen公司)、Phusion™ High Fidelity DNA Polymerase(Biolabs),普通试剂均为分析纯试剂。

1.1.3 检测引物 本研究所用的人肠道病毒核酸通用引物(EV)、EV_{71}核酸引物(EV_{71})及柯萨奇A组16号病毒核酸引物(Cox A16)序列均参考国家脊灰实验室[5],具体序列见表1,引物由上海生工生物工程公司合成。

表1 筛选肠道病毒通用引物(EV)及Cox A16、EV_{71}特异性引物

引物名称	引物序列(5′→3′)	PCR扩增长度(bp)
EV	上游 TCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCC	116
	下游 ACACGGACACCCAAAGTAGTCGGTCC	
EV_{71}	上游 GCAGCCCAAAAGAACTTCAC	226
	下游 ATTTCAGCAGCTTGGAGTGC	
Cox A16	上游 ATTGGTGCTCCCACTACAGC	208
	下游 TCAGTGTTGGCAGCTGTAGG	

1.2 病毒分离

将咽拭子、肛拭子以及大便标本经研磨、过滤处理后,接种到形态良好、单层的RD细胞中,对于疱疹液、脑脊液标本可直接接种到RD细胞,进行病毒分离,每份标本接种0.2 ml,复3孔,37 ℃吸附,2 h后换维持液,置37 ℃培养,同时设正常细胞对照,每日观察细胞病变(cytopathic effect, CPE)。当细胞病变达++++时即可判为阳性分离株。收获后置-70 ℃保存备用,如第1代接种7 d无CPE出现,则盲传3代,连续观察7 d仍无CPE出现,则判为阴性。

1.3 病毒RNA提取

将病变细胞反复冻融,离心后取上清,采用Qiagen Viral RNA Mini Kit(Qiagen, Genman)进行病毒RNA提取,提取步骤参照Qiagen Mini kit Handbook所提供的方法,提取纯化后的RNA保存在-80 ℃冰箱中备用。

1.4 RT-PCR检测EV_{71}病毒

以已提取的EV_{71}病毒RNA为模板,分别用表1中3种肠道病毒特异性下游引物(EV、EV_{71}和Cox A16)在AMV逆转录酶的作用下逆转录获得病毒cDNA。反应条件为:病毒RNA 5 μl,下游引物1 μl(20 mol/L),65 ℃变性10 min,冰浴5 min,5×AMV Buffer 4 μl,dNTPs(2.5 mmol/L)2 μl,RNasin抑制剂0.5 μl,AMV逆转录酶1 μl,补H_2O至20 μl体系。42 ℃逆转录1 h,70 ℃孵育15 min灭活AMV逆转录酶。然后以病毒cDNA为模板进行PCR扩增,PCR反应条件:cDNA 5 μl,上下游引物各1 μl,*Taq* DNA聚合酶0.5 μl,10×PCR Buffer 5 μl,dNTPs(2.5 mmol/L)4 μl,补H_2O至50 μl。95 ℃预变性5 min;94 ℃变性30 s,56 ℃退火30 s,72 ℃延伸45 s,共30个循环;72 ℃再延伸10 min,4 ℃保温,同时设纯水阴性对照。PCR结束后,取5 μl PCR产物,与1%琼脂糖凝胶进行凝胶电泳鉴定。

1.5 电镜观察

EV_{71}病毒分离株感染铺满RD细胞的T25细胞瓶(90%以上),37 ℃培养24 h后戊二醛固定RD细胞,送至重庆医科大

学电镜室切片观察。

1.6 病毒全基因序列扩增引物设计

引物序列根据 EV_{71} 型病毒亚洲地方株 EV_{71}/Fuyang. Anhui. P. R. C/17. 08/2（EU703813）、SHZH03（AY465356）和 SIN5865（AF316321）设计，引物位置以国际标准株 MS/7423/87（U22522）全基因组序列为准。利用软件 DNASTAR 和 Oligo6.0 设计扩增 EV_{71} 病毒全基因组核苷酸序列引物（表 2）。

表 2 PCR 扩增 EV_{71} 全基因组引物序列

引物名称	引物序列（5′→3′）	长度（bp）	核苷酸位置
1-EV_{71}	上游 TTAAAACAGCCTGTGGGTTG	2 470	1～2 470
1-EV_{71}	下游 GGAACTTTCAATTACATCTTGC		
2-EV_{71}	上游 GAGCCGATCCTGGGCGAAAT	1 494	1 971～3 464
2-EV_{71}	下游 TAGTGGATGACACGAGCAAGTC		
3-EV_{71}	上游 GGAGATAGGGTGGCAGATGT	2 512	2 438～4 949
3-EV_{71}	下游 GTTGGATGGCTTTCCCACACA		
4-EV_{71}	上游 TTCGCCGCAGGTTCTAC	2 619	4 787～7 405
4-EV_{71}	下游 GCTATTCTGGTTATAACAAATTT		

1.7 RT-PCR 反应扩增 EV_{71} 病毒全序

用病毒上清提取的 5 μl 总 RNA 在 20 μl 反应体系中逆转录成 cDNA，反应体系：特异性下游引物 1 μl，dNTPs（2.5 mmol/L）4 μl，加水补至 12 μl。先 65 ℃预变性 5 min，然后迅速将反应管至入冰盒中，在冰浴状态下加入 5 × First-Stand Buffer 4 μl 和 0.1 mol/L DTT 2 μl，充分混合反应液后再 42 ℃孵育 2 min，迅速加 1 μl 逆转录酶 Superscript™ Ⅱ RT，42 ℃孵育 50 min 后 70 ℃加热 15 min 灭活逆转录酶。取上述逆转录反应产物于 50 μl 反应体系中进行 PCR。反应体系组成如下：5 × Phusion HF Buffer 10 μl、dNTPs（2.5 mmol/L）4 μl、DMSO 1.5 μl、cDNA 5 μl、上游及下游特异引物各 1 μl、Phusion DNA 聚合酶 0.5 μl，补水至 50 μl 体系。反应参数：98 ℃ 30 s，98 ℃ 10 s，55 ℃ 10 s，72 ℃ 75 s，35 个循环后 72 ℃延伸 10 min。PCR 扩增的特异性片段经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离，PCR 产物送上海英骏公司进行序列双向测定。

1.8 扩增产物测序与拼接

将 PCR 产物经琼脂糖凝胶分离后，用凝胶纯化试剂盒回收。将纯化的 PCR 产物送生物公司测序。测定序列后的各片段采用 DNAstar Seqman 程序进行拼接组装及校对。

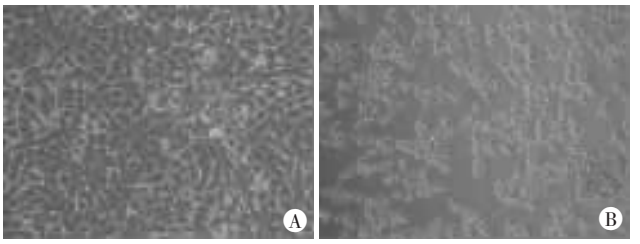
1.9 序列比对与进化分析

采用 Blast、DNAstar MegAlign 程序及 Chstal W 软件，对 EV_{71} 病毒进行同源性比对，并用 MEGA 4.0 软件对 EV_{71} 病毒国内外代表毒株 VP1 核苷酸序列进行进化分析，计算序列间遗传距离，用邻结法（neighbor-joining，NJ）构建系统进化树。

2 结果

2.1 细胞病变

采用 RD 细胞传代，对 47 例患儿临床标本进行病毒分离培养，其中 7 例患儿的临床标本出现了明显的 CPE。在倒置显微镜下与正常 RD 细胞比较，特点为细胞变圆脱落，经传代后上述细胞病变依然出现，提示分离到肠道病毒（图 1）。

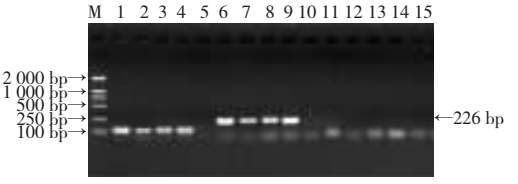


A：正常的 RD 细胞；B：病毒感染的 RD 细胞

图 1 病毒感染及未感染的 RD 细胞学观察（倒置显微镜 ×200）

2.2 EV_{71} 病毒的 RT-PCR 特异性核酸检测

对 7 株引起细胞病变的肠道病毒株采用特异性引物作 RT-PCR 扩增，其中从 3 株阳性毒株检测出 EV_{71} 病毒的 226 bp 特异核酸片段（图 2），其他 4 株能检测为 116 bp 肠道病毒属（EV），目前暂无法分类。

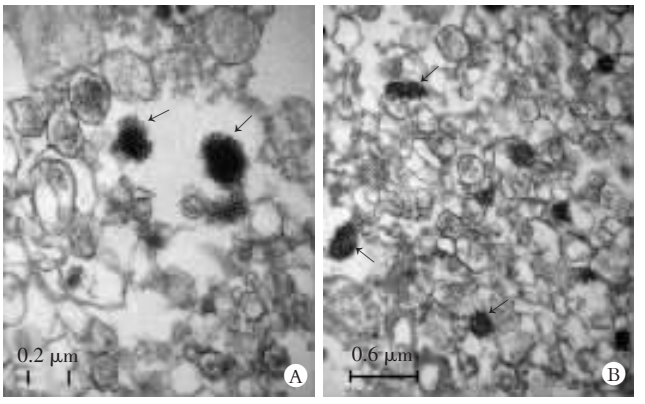


M：DNA 标准（DL 2000）；1－5：EV 116 bp 扩增结果（1：已分离河南 EV_{71} 株阳性对照；2－4：本次分离阳性 EV_{71} 株；5：纯水阴性对照）；6－10：对应样本 EV_{71} 226 bp 扩增结果；11－15：对应样本 Cox A16 引物扩增结果

图 2 重庆 EV 和 EV_{71} 目的基因片段 RT-PCR 扩增结果

2.3 EV_{71} 病毒形态学特征

重庆病毒分离株分别感染 RD 细胞，37 ℃培养 24 h 后戊二醛固定进行电镜观察，结果显示 EV_{71} 病毒侵犯正常 RD 细胞引起细胞凋亡，电镜下可见在凋亡细胞质内和内质网中有大量的直径为 20～30 nm 的圆形无包膜的病毒颗粒（图 3）。



A：凋亡 RD 细胞质中的病毒颗粒（箭头示）；B：凋亡 RD 细胞内质网中的病毒颗粒（箭头示）

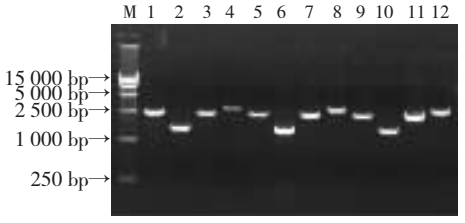
图 3 重庆 EV_{71} 病毒感染 RD 细胞的电镜观察（SEM）

2.4 新分离 EV_{71} 型病毒基因组全序列测定及基本特征

EV_{71} 病毒分别通过 RT-PCR 法获得覆盖 3 株 EV_{71} 型病毒分离株基因组全长的 4 个片段（图 4），对所有片段测序后拼接全长 EV_{71}，获得 3 株全长分别为 7 409、7 406 nt 和 7 404 nt 的 EV_{71}，并将 3 株 EV_{71} 病毒命名为 Chongqing1-09-China（GQ994989.1）、

Chongqing-2-09-China（GQ994990.1）、Chongqing-3-09-China（GQ994991.1）同时上传NCBI的GenBank。其结构是3′末端有多聚腺苷酸（poly A），5′末端共价结合有一个小分子量的蛋白（VPg），其病毒基因组结构分别有含746个核苷酸的5′非编码区（UTR），编码区1A（多肽VP4）、2B、2C、3A、VPg（5′末端结合蛋白）、3C（特异性蛋白酶）、3D（RNA多聚酶组分）、3′末端非编码区（83个核苷酸）以及多聚腺苷酸尾（AAAn）[6]。以下将3株EV_{71}简称为Chongqing-1-09、Chongqing-2-09、Chongqing-3-09。

对3株新分离EV_{71}进行基本特征分析，其中表3为重庆3株EV_{71}基因核苷酸数目基本情况，表4为重庆3株病毒核苷酸定位，将3株新分离的EV_{71}病毒全序列进行比对分析结果表明，重庆株Chongqing-2-09、Chongqing-3-09核苷酸变异性较小，其核苷酸序列一致性达97.2%，而重庆株Chongqing-1-09与这2株核苷酸一致性达94.5%及94.8%。



M：DNA标准（DL 15000）；1－4：Chongqing-1-09；5－8：Chongqing-2-09；9－12：Chongqing-3-09

图4 重庆3株EV_{71}目的基因片段RT-PCR扩增结果

表3 重庆3株EV_{71}基因核苷酸数目基本情况

毒株	核苷酸全长(nt)	A(%)	T(%)	C(%)	G(%)	A+T(%)	C+G(%)
Chongqing-1-09	7 409	27.13	24.91	24.08	23.88	52.04	47.96
Chongqing-2-09	7 406	27.07	24.91	24.08	23.94	47.96	48.13
Chongqing-3-09	7 404	27.17	24.93	24.08	23.82	52.10	47.90

表4 重庆3株EV_{71}基因核苷酸定位(nt)

编码区	Chongqing-1-09	Chongqing-2-09	Chongqing-3-09
5′UTR	1～743	1～742	1～742
P1	743～3 329	742～3 328	744～3 328
VP4	744～950	743～949	743～949
VP2	951～1 712	950～1 711	950～1 711
VP3	1 713～2 438	1 714～2 437	1 712～2 437
VP1	2 439～3 329	2 438～3 328	2 438～3 328
P2	3 330～5 063	3 329～5 062	3 329～5 062
P3	5 064～7 325	5 063～7 324	5 063～7 324
3′UTR	7 326～7 409	7 325～7 406	7 325～7 404
P1	743～3 329	742～3 328	744～3 328

2.5 重庆3株EV_{71}同源性分析

经上述核苷酸定位表明重庆3株EV_{71}（Chongqing-1-09、Chongqing-2-09、Chongqing-3-09）病毒组的组成和结肠道病毒特征，其中Chongqing-1-09与台湾2005年分离的984 polyprotein（DQ133458.1）及1235 polyprotein（DQ133459.1）非常接近，整个基因组核苷酸同源性达到96%，Chongqing-2-09与浙江大学分离的DTID/ZJU-74（FJ158601.1）和DTID/ZJU-62（FJ158600.1），安徽阜阳3株EV_{71}/Fuyang.Anhui.P.R.C/17.08（EU703814.1、EU703812.1、EU703813.1）相似度大，高达98%；Chongqing-3-09与广东毒株GZ-08-01（FJ360544.1）和阜阳3株（EU703814.1、EU703812.1、EU703813.1）较为接近，基因组核苷酸同源性为97%，其中与GZ-08-01同源性达98%，3株病毒与EV_{71}国际标准株MS/7423/87（U22522.1）核苷酸同源性依次为82.1%和82.1%、82%；与BrCr基因组核苷酸同源性（仅80.1%、80.2%和80.3%）差别较为明显，而与Cox A16病毒核苷酸序列比对同源性达77.9%、77.7%及77.9%。

2.6 基因分型

根据VP1区核苷酸序列分析，EV_{71}可分为3个基因型，8个基因亚型[7,8]。其中VP1区同源性高于91.0%的毒株为同一基因亚型。以Cox A16作为外群，对重庆3株EV_{71}病毒与GenBank中EV_{71}病毒各基因型及亚型外壳蛋白VP1编码区进行种系分析，用于比对的代表株登录号为：Cox A16 U05876（Cox A16 G-10）、A基因型U22521（BrCr）、B基因型U22522（MS7423-87）、C1基因型AY2076262（0389-MAA-00）、C2基因型AF286522（2912-TAI-98）、C3基因型AY125971（KOR-EV_{71}）、C4a基因型AF302996（SHZH98）及C4b基因型AY465356（SHZH03），用Neighbor-Joining法构建重庆3株与各代表株间的进化树。进化树分析显示，重庆3株与C4亚型代表株处于同一分支，相似度达92.1%以上，故属于C4亚型。其中3株重庆地区EV_{71}相互比对，VP1氨基酸序列同源性达99%以上。

3 讨论

EV_{71}是引起手足口病的主要病原体，多爆发于亚太地区的。2009年重庆春夏季手足口病在婴幼儿及学龄儿童中出现了流行趋势，因此为了了解新分离重庆EV_{71}病毒基因组序列特征及可能的传播来源，借助生物信息学和分子流行病学方法对重庆EV_{71}病毒进行同源性比对和进化分析具有现实意义。

本研究新分离的重庆3株EV_{71}病毒均来源重庆市手足口病患儿的粪便标本，3株稳定传代后EV_{71}型病毒接种于RD细胞24 h内均出现明显细胞病变现象，可用于病毒的快速培养。电镜观察可知病毒在感染细胞质和内质网大量存在，引起细胞凋亡，为了解病毒侵入细胞途径提供确凿的证据，同时在EV_{71}的VP1区特异性检测引物的RT-PCR 226 bp出现特异性条带及肠道病毒通用引物属116 bp的特异性条带，在分子生物学上证明为EV_{71}病毒，综上，本次分离的病毒为EV_{71}病毒。本次分离出病毒的标本均采自于门诊患儿，其中1株病毒来源于本院疑似病例，可见有些患儿可能在临床症状上并不明显，提示实验室检查在确诊临床病例上有很大帮助，但是实验室检测方面花费和时间在大部分情况下不是患儿家属能承受。而且粪便标本在分离的过程中往往会因为自身的毒性引起的细胞死亡，很难和细胞病变引起的凋亡区分，因为接种标本3 h内出现细胞病变可能和标本毒性有关，此时宜把标本处理液10倍稀释，重新接种细胞[5]。在本次分

离中,来自住院部患儿粪便标本均无分离出病毒,可能与住院患儿经药物治疗后病毒滴度下降,不易分离,或者现存的方法并不知道病毒的确切分型有关,如本次的分离的4株肠道病毒,此处有待进一步研究。同时本次也在47例患儿中收集2例脑脊液标本,但是未能分离到病毒,可能与脑脊液标本并不易检测到病毒有关[9]。

本研究表明,重庆3株EV_{71}与其他肠道病毒71型有相同的基因组结构;与EV_{71}国际标准株BrCr相比,在核苷酸和氨基酸存在较大的差异,核苷酸变异平均约为20%,氨基酸变异约为5%;与MS株比较核苷酸变异平均约为18%,氨基酸变异约为4%;其中在5′UTR和3′UTR区变异较大,在5′UTR存在20余处各有1个碱基的缺失及变异,由于EV_{71} 5′UTR的空间结构对病毒的功能有重要的影响,重庆3株为手足口病患儿并无中枢神经系统症状分离株(患儿粪便分离),而MS、BrCr株为脑炎患者分离株,因此5′UTR的结构可能与致病性相关[10]。

对重庆3株EV_{71}病毒核苷酸同源性比较结果表明,在P1区重庆3株EV_{71}与台湾984 polyprotein(DQ133458.1)、浙江大学DTID/ZJU-74(FJ158601.1)和DTID/ZJU-62(FJ158600.1),及安徽阜阳3株EV_{71}/Fuyang. Anhui. P. R. C/17.08(EU703814.1、EU703812.1、EU703813.1)同源性最高(92%左右),与标准株MS、BrCr的同源性居中(81%左右),而与Cox A16的同源性最低(72%)。氨基酸同源性比较结果表明,在P1区,重庆3株EV_{71}毒株与Cox A16的同源性最低(90.2%左右),但在P2和P3区,重庆株与Cox A16的同源性最高。病毒基因遗传进化分析表明[11],P1区为病毒结构蛋白的遗传区域,P2和P3为病毒非结构蛋白的遗传进化,重庆3株EV_{71}的结构蛋白P1区与中国台湾流行株及国内阜阳浙江株的亲缘关系最为密切,而对非结构蛋白(P2和P3区)的序列分析表明,重庆3株EV_{71}与Cox A16的同源性最高,氨基酸同源性高于毒株间的同源性,故推测重庆3株EV_{71}株结构蛋白的进化途径与中国台湾流行株及安徽阜阳株、国内浙江流行株可能相近,而非结构蛋白的进化途径与中国台湾流行株及安徽阜阳株、国内浙江流行株不同。而研究认为非结构蛋白,特别是P3区编码的RNA聚合酶在进化上高度保守,EV_{71}与Cox A16的关系密切[11]。

VP1位于EV_{71}病毒衣壳蛋白表面,是主要的病毒中和决定因子,不但具有显著的基因多态性,而且还直接决定病毒的抗原性。因此VP1基因是EV_{71}病毒基因分型和遗传进化分析的最重要靶标[12],选取重庆3株EV_{71}的VP1基因全长891 bp进行进化分析。结果表明,重庆3株EV_{71}与C4亚型代表株SHZH98在VP1区的同源性高于92%,我们认为它们应属于同一基因亚型,再次提示C4亚型在我国的广泛流传,分析原因可能由于C4毒株已在中国流行多年,RNA病毒的较高变异率导致亚型内毒株间有了较大变异,但其中如种族、生活习惯及环境等,造成其抗原性上的相似。

本研究结果表明,引起重庆地区本次手足口病的病原主要为EV_{71},再次提示EV_{71}病毒的大规模流行[13]。但是目前国内现有EV_{71}毒株数量较少,尚不清楚不同致病力间毒株的关联和差异。因此,有待国内预防及医疗机构进行大规模的临床监测研究。

参考文献:

[1] Schmidt N J, Lennette E H, Ho H H. An apparently new enterovirus isolated from patients with disease of the central nervous system[J]. J Infect Dis, 1974, 129(3):304-309.
[2] Komatsu H, Shimizu Y, Takeuchi Y, *et al*. Outbreak of severe neurologic involvement associated with Enterovirus 71 infection[J]. Pediatr Neurol, 1999, 20(1):17-23.
[3] Ho M L, Chen E R, Hsu K H, *et al*. An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan. Taiwan Enterovirus Epidemic Working Group[J]. N Engl J Med, 1999, 341(13):929-935.
[4] 刘湘云. 肠道病毒感染[M]//胡亚美,江载芳. 实用儿科学. 第7版北京:人民卫生出版社,2002:802-810.
[5] 中国疾病预防控制中心. 手足口病实验室手册[M]. 北京:中国疾病预防控制中心, 2008:13-14.
[6] Lin K H, Hwang K P, Ke G M, *et al*. Evolution of EV71 genogroup in Taiwan from 1998 to 2005:emerging of subgenogroup C4 of EV71[J]. J Med Virol, 2006, 78(2):254-262.
[7] Brown B A, Oberste M S, Alexander J P Jr, *et al*. Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998[J]. J Virol, 1999, 73(12):9969-9975.
[8] McMinn P C, Lindsay K, Perera D, *et al*. Phylogenetic analysis of enterovirus 71 strains isolated during linked epidemics in Malaysia, Singapore, and Western Australia[J]. J Virol, 2001, 75(16):7732-7738.
[9] Yan J J, Wang J R, Liu C C, *et al*. An outbreak of enterovirus 71 infection in Taiwan 1998:a comprehensive pathological, virological, and molecular study on a case of fulminant encephalitis[J]. J Clin Virol, 2000, 17(1):13-22.
[10] 周世力, 李琳琳, 何雅青, 等. 我国分离的肠道病毒71型(SHZH03病毒株)全基因组核苷酸序列分析[J]. 病毒学报, 2004, 20(1):7-11.
[11] 金奇. 医学分子病毒学[M]. 北京:科学出版社,2001:30-34.
[12] Oberste M S, Maher K, Kilpatrick D R, *et al*. Molecular evolution of the human enteroviruses:correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification[J]. J Virol, 1999, 73(3):1941-1948.
[13] 韩剑峰, 安康, 刘洪, 等. 河南新乡2008年手足口病病原分离鉴定及病毒基因组特征[J]. 军事医学科学院院刊, 2008, 32(6):523-526.

(收稿:2010-01-14 修回:2010-03-01)
(编辑 张 维)