

- (2) 李健, 王志强, 胡茂红, 等. 山东省肾综合征出血热死亡病例分析[J]. 中国公共卫生 2007 23(4): 490-491.
- (3) 余鹏博, 王敬军, 张家驹, 等. 汉坦病毒核蛋白原核表达纯化及其单抗制备[J]. 中国公共卫生 2005 21(12): 1445-1447.
- (4) 徐昭, 陈锦英, 李力, 等. 汉坦病毒 S 基因在大肠埃希菌中的克隆及表达[J]. 天津医药 2006 34(2): 324-327.
- (5) 赵凤玲, 陈锦英, 吕莉琨, 等. 汉坦病毒重组核蛋白抗体用于鼠肺组织病毒抗原的检测[J]. 中国人兽共患病学报 2008 24(6): 510-513.
- (6) 苏凤菊, 曾令兰. 肾综合征出血热的实验室早期诊断[J]. 中国医学文摘·检验与临床 2006 20(3): 23-25.
- (7) Tai PW, Chen LC, Huanq CH. Hanta hemorrhagic fever with renal syndrome: a case report and review [J]. J Microbiol Immunol Infect 2005 38: 221-223.
- (8) 李鹤, 马力, 李黎. 免疫磁性微球的研究进展[J]. 食品工程, 2007 3: 33-36.
- (9) Safarik I, Safarikova M. Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides [J]. Biomagn Res Technol, 2004 2: 7.
- (10) 许学斌, 顾宝柯, 金汇明, 等. 免疫磁珠法检测食品中的沙门菌及分离菌株的耐药性[J]. 中国食品卫生杂志 2006 18(3): 202-204.

收稿日期: 2011-02-26

(宋艳萍编辑 郭薇校对)

【检验技术】

辽宁省水痘-带状疱疹病毒基因型分析*

王艳, 马艳, 韩悦, 郭军巧

摘要: 目的 了解辽宁省水痘-带状疱疹病毒(VZV)基因型别。方法 选取水痘患者临床确诊病例7例,采集血清和咽拭子标本,分别检测VZV IgM抗体、扩增ORF22基因VZV核酸片段,进行核苷酸序列测定分析,测序结果与GenBank的VZV参考株基因序列进行比较。结果 7例临床确诊病例VZV IgM抗体均阳性(编号为VZV001~VZV007);其中3例的咽拭子标本扩增到目的片段(VZV001、VZV-002、VZV-005),测序结果证实为水痘-带状疱疹病毒;ORF22基因的单核苷酸多态性(SNP)分析显示,VZV-002与VZV-005基因序列完全一致,且在同一位点的碱基由C代替了A;VZV-001序列2个位点出现碱基代替,提示其基因可能发生点突变;与Dumas株序列比较,3株分离株在6个关键位点上有4个核苷酸不同,与P-Oka株则完全一致,3株VZV分离株的ORF22基因均鉴定为J基因型,与水痘-带状疱疹病毒P-Oka株的同源性为99.56%~99.78%。结论 辽宁省检测到的3株VZV基因型均为J型。

关键词: 水痘-带状疱疹病毒;基因型;单核苷酸多态性(SNP)分析

中图分类号: R 373.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)01-0076-03

Genotype analysis of varicella-zoster virus in Liaoning province WANG Yan, MA Yan, HAN Yue et al. Department of Planned Immunization, Liaoning Provincial Center for Disease Control and Prevention(Shenyang 110005, China)

Abstract: Objective To examine the genotype of varicella-zoster virus in Liaoning province. **Methods** The serum and throat swabs specimens were collected from 7 patients clinically diagnosed with varicella for the detection varicella-zoster virus(VZV) IgM and the amplification of DNA of the open reading frame(ORF) 22. The DNA was sequenced and analyzed with the data of VZV reference strains downloaded from GenBank. **Results** All the 7 patients were VZV IgM positive and the amplification and sequencing of 3 throat swabs(VZV001, VZV-002, VZV-005) confirmed the VZV. The results of ORF22 single nucleotide polymorphism(SNP) analyses showed that VZV-002 and VZV-005 had the same sequence and the single base transversion was A→C. The sequence of VZV-001 had 2 changed bases, suggesting the point mutation of the gene. Compared with Dumas strain, the 3 strains had 4 bases different on 6 key site and completely matched with P-Oka strain. The 3 strains were identified as J genotype and the nucleotide homology was 99.56%~99.78% with P-Oka. **Conclusion** The genotype of 3 VZV strains detected in Liaoning province belongs to J genotype.

Key words: varicella-zoster virus(VZV); genotype; SNP analysis

水痘病毒是儿童期水痘的病原体,其潜伏后再感染表现为带状疱疹,因而水痘病毒又称水痘-带状疱疹病毒(varicella-zoster-virus, VZV)。近年来从基因学上探索不同毒株间的差异及基因分类很受关注,VZV病毒虽然只有一个血清型,但是不同毒株之间仍存在着变异,其基因组变异率为0.05%~0.06%,与人类基因组变异率0.078%相近^[1]。为了解辽宁地区VZV基因型别的分布特点,本研究对7例临床诊断为水痘患者的咽拭子进行了聚合酶链反应(PCR)分析和

序列测定。现将结果报告如下。

1 对象与方法

1.1 对象 2009年12月份选取沈阳市传染病院临床诊断为水痘患者7例,分别采集咽拭子标本,编号为VZV-001~VZV-007;同时采集患者血清标本进行VZV IgM抗体检测。所有标本均置于-80℃保存。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂 ELISA试剂盒(德国维润(塞润)试剂公司);DNA提取试剂盒、TaqTM试剂盒、质粒pMD19-T、大肠埃希菌JM109感受态细胞(日本TaKaRa公司);PCR纯化试剂盒(美国Qiagen公司);2%琼脂糖凝胶(美国Promega公司)。

1.2.2 水痘IgM抗体检测 采用抗体捕捉酶联免疫吸附实

* 基金项目: 辽宁省博士科研基金(20052135)

作者单位: 辽宁省疾病预防控制中心免疫规划所 沈阳 110005

作者简介: 王艳(1978-),女,辽宁沈阳人,主管技师,学士,主要从事病毒检验工作。

通讯作者: 郭军巧, E-mail: guojunqiao@lncdc.com

验(ELISA)检测病人血清中水痘 IgM 抗体,均按试剂说明书操作。

1.2.3 聚合酶链反应(PCR) (1) 核酸(DNA)提取:使用 DNA 提取试剂盒从咽拭子标本中直接提取 VZV 的 DNA。按试剂说明书操作。上游引物 vzv-p22R1f: 5'-GGGTTTTGTAT-GAGCGTTGG-3'; 下游引物 vzv-p22R1r: 5'-CCCCGA-GGTTCGTAATATC-3' 特异性扩增 ORF22 基因 37837~38283 之间 447 个核苷酸片段^[2]。(2) 目的片段扩增:PCR 扩增试剂采用 TaqTM 试剂盒。PCR 反应条件:94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 1 min, 55℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。阳性对照株来源于国产长春新建水痘疫苗。

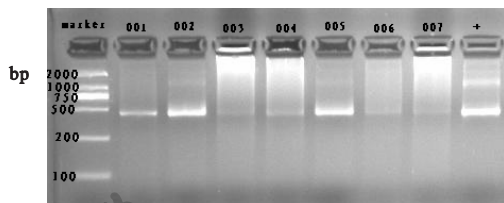
1.2.4 序列测定与基因型判定 采用 PCR 纯化试剂盒回收阳性逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)产物,将回收产物与质粒 pMD 19-T 载体按常规方法连接,然后转入大肠埃希菌 JM109 感受态细胞,通过 PCR 进行蓝白斑筛选和菌落初步鉴定。鉴定为阳性的克隆菌株送北京三博远志生物技术有限责任公司测序,测序结果在 GenBank 中用 Blastn 进行比较分析。基因型判定依据文献^[2],VZV 病毒基因 ORF22 在 37837~38283 位点之间有 6 个位点可准确的将 VZV 分为 E、J、M1 和 M2 等 4 个基因型。6 个位点分别为 37902、38019、38055、38081、38177、38229;其中 E 基因型在 6 个位点的碱基依次为 A、G、T、A、G、A,代表株为 Dumas 株;J 基因型依次为 G、G、C、C、A、A,代表株为 p-Oka 株;M1 基因型依次为 A、G、T、C、G、A,代表株为 CA123 株;M2 基因型分为 3 个亚型,也依据这 6 个位点的碱基不同而分型。

1.2.5 序列整理和分子生物信息学分析 序列资料以标准图形文件(.ab1)格式保存,使用 Sequencher 4.0.5 软件

(GeneCode, Ann Arbor, Michigan, USA) 整理序列资料,从 GenBank 数据库下载 VZV 各基因型参考株的序列资料,采用 MEGA 3.1 软件进行相关对比分析。

2 结果

2.1 水痘-带状疱疹病毒鉴定(图 1) (1) IgM 抗体:按照试剂盒结果判定标准,7 例患者血清标本的吸光度值均大于临界值(cutoff)上限,判定为水痘 IgM 抗体阳性,表明 7 例患者均为实验室确诊病例。(2) 扩增产物:7 份咽拭子标本中, VZV-001、002、005 等 3 份标本的 PCR 产物在约 447 bp 处均有一明显的特异性条带,鉴定为水痘病毒。



注:1~7: VZV-001~VZV-007; +: 阳性疫苗对照

图 1 7 份咽拭子标本扩增产物琼脂凝胶电泳图

2.2 序列分析与基因型(图 2) 对 PCR 扩增阳性的 3 株 ORF22 基因 37837~38283 之间 447 个核苷酸位点进行序列测定和分析,结果显示, VZV-002 和 VZV-005 基因序列完全一致,且在 37920 位点的碱基由 C 代替了 A; VZV-001 序列在 38036 位点和 38070 位点的碱基分别由 C 代替了 T, G 代替了 A。提示其基因可能发生了点突变。与 GenBank 上公布的 Dumas 株和 P-Oka 株序列进行比较的结果显示(图 2),与 Dumas 株序列比较,3 株分离株在 6 个关键位点上有 4 个核苷酸不同,与 P-Oka 株则完全一致,据此判定本研究鉴定的 3 株水痘-带状疱疹病毒的 ORF22 基因为 J 基因型。

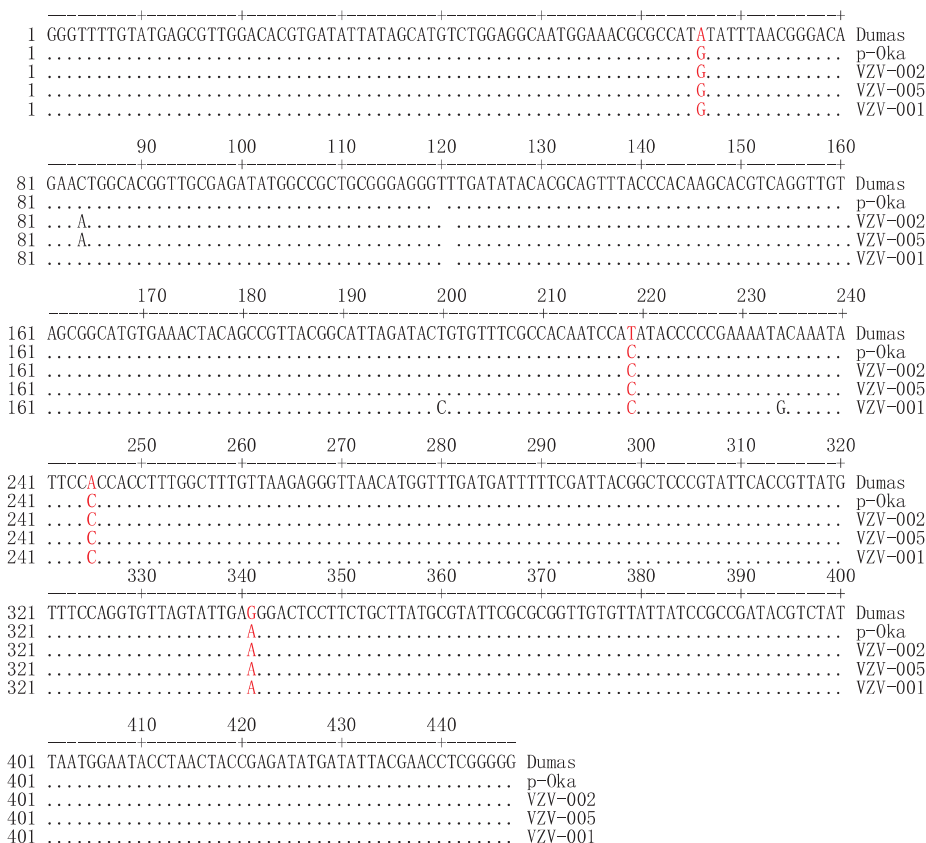


图 2 3 株水痘-带状疱疹病毒辽宁分离株与 Dumas 株、p-Oka 株核苷酸序列对比

2.3 基因亲缘性关系(图3) 将3株VZV分离株的ORF22基因序列与GenBank上4个基因型21株参考株的对应序列构建系统进化树,结果显示,系统进化树明显分为E和J2个

分支,其中3株分离株与J基因型参考株最为接近,与水痘-带状疱疹病毒P-Oka株的同源性为99.56%~99.78%,进一步表明辽宁省目前流行的VZV为J基因型。

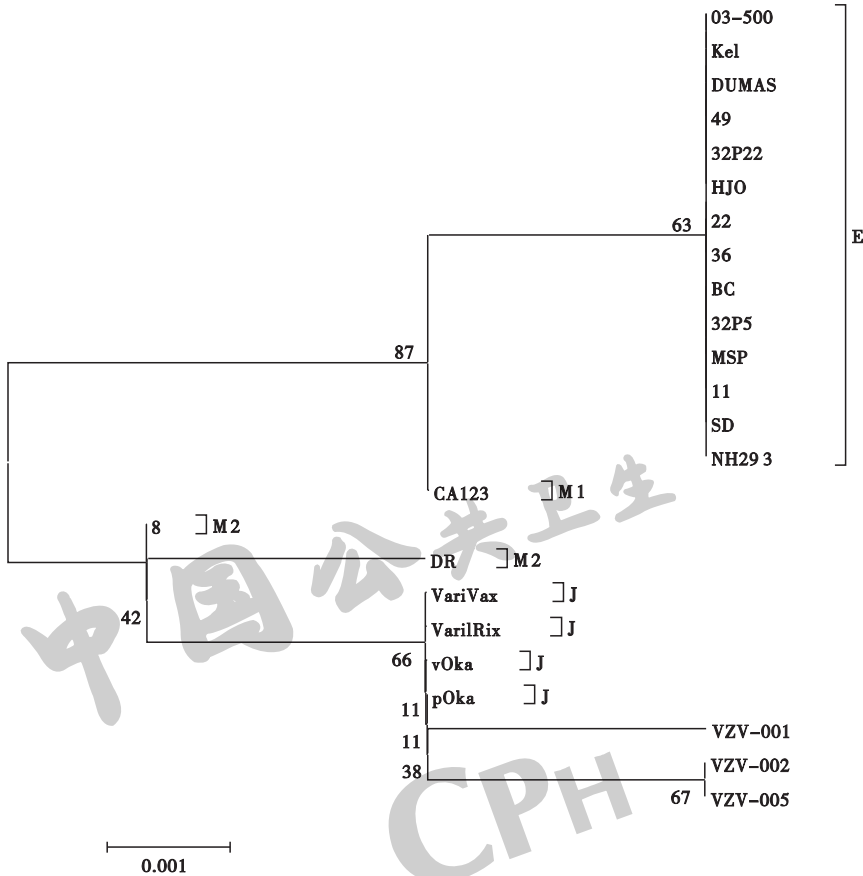


图3 2009年辽宁省水痘-带状疱疹病毒与参考株的基因亲缘关系

3 讨论

VZV属于疱疹病毒科(herpes) α -疱疹病毒属,人类疱疹病毒3型,即HHV-3型。其引起的水痘在世界范围内均有发生⁽³⁾,易在无免疫力的儿童中形成爆发流行⁽⁴⁾。水痘至今仍未纳入我国法定传染病管理,因此实验室缺乏VZV病原学资料,特别对VZV的基因型别研究基本上处于空白阶段。

不同VZV株间的遗传变异主要表现为单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)⁽⁵⁾。世界上各实验室在SNP分析的基础上选择不同的方法对VZV的基因型进行命名^(2,6-7),因此对VZV基因型的命名至今仍不统一。目前公认的将VZV基因分为E(European型)、M(mosaic型)和J(Japanese型)⁽²⁾。近2年来Loparev等人⁽⁸⁾又将ORF22结合ORF21或ORF50的序列进行SNP分析将E基因型分为E1和E2两个亚型,将M基因型进一步划分为M1、M2、M3、M4等4个亚型。中国关于VZV基因型的报道很少,仅Loparev等⁽²⁾人2004年报道从中国南方(广东等地)收集的3份临床标本均为M型,从中国北方(山东等地)收集的3份临床标本均为E型。杨吉星等⁽⁹⁾人2008年报道的上海地区1株VZV基因型为J型,周小勇等⁽¹⁰⁾人2009年报道的武汉地区78株VZV基因型也为J型。本研究分离的辽宁省3份临床标本均为J型,与上海和武汉地区流行株基因型别一致。虽然3个地区均检测出有J基因型VZV,但并不排除之前报道的E和M基因型仍在流行。流行病学调查结果表明,本研究中的3例阳性患者在发病前1个月均无水痘疫苗接种史,因此认为,目前J基因型野病毒正在辽宁省流行。

本研究结果显示,3份阳性标本基因序列中,有3个位点出现碱基代替提示该基因可能发生了点突变,也可能是由于限制性内切酶(Taq酶)缺少3'-5'校对功能导致复制出现错误⁽⁹⁾。其原因还有待更深入的研究。

参考文献

- Quinlivan M, Breuer J. Molecular studies of varicella-zoster virus [J]. Rev Med Virol 2006, 16(4): 225-250.
- Loparev VN, Gonzalez A, Deleon-Carnes M, et al. Global identification of three major genotypes of varicella-zoster virus: longitudinal clustering and strategies for genotyping [J]. J Virol 2004, 78(15): 8349-8358.
- 姜昌龙, 陈琪, 白冰, 等. 部队医院法定传染病住院病例流行特征分析 [J]. 中国公共卫生 2009, 25(9): 1144-1145.
- 武晶, 祖荣强, 梁祁, 等. 江苏省传染病突发公共卫生事件特征分析 [J]. 中国公共卫生 2010, 26(3): 364-365.
- 刘静静, 王明丽, 杨森, 等. 水痘-带状疱疹病毒基因型的研究进展 [J]. 国际生物制品学杂志 2008, 31(5): 215-220.
- Barrett-Muir W, Nichols R, Breuer J. Phylogenetic analysis of varicella-zoster virus: evidence of intercontinental spread of genotypes and recombination [J]. J Virol 2002, 76(4): 1971-1979.
- Fags B, Maury W, Bruckner DA, et al. Identification and mapping of single nucleotide polymorphisms in the varicella-zoster virus genome [J]. Virology 2001, 280(1): 1-6.
- Loparev VN, Rubtcova EN, Bostik V, et al. Identification of five major and two minor genotypes of varicella-zoster virus strains: a practical two-amplicon approach used to genotype clinical isolates in Australia and New Zealand [J]. J Virol 2007, 81(23): 12758-12765.
- 杨吉星, 居丽雯, 施强. 上海地区水痘带状疱疹病毒基因型研究 [J]. 中国卫生检验杂志 2008, 18(2): 223-224.
- 周小勇, 曾志良, 冯永芳. 武汉地区水痘带状疱疹病毒基因型分析 [J]. 中华皮肤科杂志 2009, 42(10): 688-690.