

## • 论 著 •

# 南通地区 2014 年肠道病毒 71 型的分子流行病学研究<sup>\*</sup>

张宏萍<sup>1</sup>,周 敏<sup>1</sup>,陆仁飞<sup>2</sup>,李雪梅<sup>2</sup>

(1. 南通市疾病预防控制中心,江苏南通 226001;2. 江苏省南通市第三人民医院,江苏南通 226001)

**摘要:**目的 分析 2014 年江苏南通地区肠道病毒 71 型(EV71)的分子流行病学特征。方法 采集 52 例手足口病患儿咽拭子标本,提取病毒核酸,采用实时荧光定量 PCR(RT-PCR)扩增病毒的 VP1 序列。获得的序列与来自其他地区的序列进行比对分析,构建系统发育树。结果 52 份临床标本中分离到 12 株 EV71 VP1 序列,12 株 VP1 序列的核苷酸、氨基酸同源性为 93.4%~99.1%,进化树分析显示 12 株 VP1 序列全部属于 C4 基因型的 C4a 亚型。结论 2014 年南通地区分离的 EV71 流行病毒株与近年来中国其他地区的流行株有相同的起源,均属于 EV71 C4 基因的 C4a 亚型。

**关键词:**肠道病毒 71 型; 基因特征; 分子流行病学

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.10.014

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)10-1354-03

## Enterovirus 71 molecular epidemiology research in Nantong, 2014<sup>\*</sup>

Zhang Hongping<sup>1</sup>, Zhou Min<sup>1</sup>, Lu Renfei<sup>2</sup>, Li Xuemei<sup>2</sup>

(1. Nantong Center for Disease Control and Prevention, Nantong, Jiangsu 226001, China;

2. Third People's Hospital of Nantong in Jiangsu Province, Nantong, Jiangsu 226001, China)

**Abstract: Objective** To analyze enterovirus 71 (EV71) molecular epidemiology characteristics in Nantong region of Jiangsu, 2014. **Methods** The pharyngeal swab samples were selected from 52 children with hand, foot and mouth disease. After extracting the virus nucleic acid, the EV71 VP1 gene of the virus were amplified by RT-PCR amplification. The phylogenetic tree was constructed between isolated and EV71 reference strains from other parts of the country. **Results** 12 strains EV71 VP1 gene were isolated from 52 cases of clinical specimens. The nucleotide and amino acid homology of 12 strains EV71 VP1 gene was 93.4%~99.1%, the phylogenetic tree analysis showed that 12 strains of VP1 gene all belong to C4 genotype C4a subgenotypes. **Conclusion** The isolated strains in Nantong in 2014 are all the EV71 C4a subgenotypes of C4 genotype, the same with the most of isolates in recent years.

**Key words:** Enterovirus 71; genetic traits; molecular epidemiology

肠道病毒 71 型 (EV71) 属于小 RNA 病毒科, 肠道病毒属, 其核酸为单股正链 RNA, 是引起婴幼儿手足口病的主要病原体, 还能引起无菌性肠膜炎、脑干脑炎和骨髓灰质炎样的麻痹与多种神经系统的疾病<sup>[1]</sup>。1969 年, 美国加州首次报道了 EV71 引起的病例<sup>[2]</sup>, 此后, 全球各地均有流行。我国各地区对 EV71 流行爆发均有报道<sup>[3~5]</sup>, 本研究对 2014 年江苏南通地区手足口病分离的 EV71 VP1 区进行扩增测序, 旨在了解本地区近段时间 EV71 的流行趋势及分子流行病学特征。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 标本来源于 2014 年南通地区各医院手足口病住院患儿, 采集患儿咽拭子标本于病毒储存液中, -80 ℃ 保存。

**1.2 引物设计** GenBank 中下载 EV71 的基因序列, 经比对选取保守序列, 设计合成 EV71 VP1 区的巢式引物: 外引物 F1 5'-CCC AAT ACA GCC TAT AAA-3', R1 5'-CGA GGC TGT CTT CCC A-3', 扩增片段 1 100 bp; 内引物 F2 5'-ACT AGC GGC AGC CCA-3', R2 5'-CCA CTC TAA AGT TGC CCA C-3', 扩增片段 1 022 bp。引物由上海捷瑞生物技术有限公司合成。

**1.3 病毒核酸提取** 采用北京鑫诺美迪基因检测技术有限公司的病毒 DNA/RNA 提取试剂盒(磁珠吸附法), 提取方法严格按照说明书。

**1.4 EV71 实时荧光定量 PCR(RT-PCR) 鉴定** 使用 EV71、柯萨奇病毒 A 组 16 型(CoxA16) 及通用型肠道病毒核酸检测试剂盒(默乐生物) 鉴定标本的病毒 RNA 类型。严格按照说

明书操作, RT-PCR 阳性标本即可确诊为 EV71 感染标本。

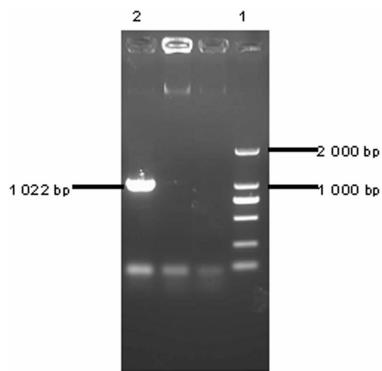
**1.5 EV71 VP1 基因的扩增** 将 EV71 阳性标本提取的 RNA 作为模板, 采用 one step RT-PCR kit(大连 Takara 公司) 进行逆转录聚合酶链反应。在 RT-PCR 反应体系中加入外引物 F1 和 R1, 取标本 RNA 4 μL, 反应总体积 20 μL, 反应条件: 50 ℃ 30 min, 95 ℃ 30 s, 50 ℃ 30 s, 72 ℃ 1.5 min, 35 个循环, 72 ℃ 10 min。第 2 轮扩增: 取第 1 步 RT-PCR 产物 1 μL 为模板, 进行第 2 轮扩增。第 2 轮 PCR 反应中加内侧引物 F2、R2, 反应总体积 50 μL, 反应条件: 95 ℃ 2 min, 95 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 70 s, 30 个循环, 72 ℃ 10 min。PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳, 观察是否扩增到约  $1.0 \times 10^3$  的产物, 阳性结果送上海迈浦生物科技有限公司测序。

**1.6 DNA 序列分析** 获得的 VP1 序列, 使用 MEGA 5.0 软件中提供的 Muscle 项进行比对, 并人工对序列进行校正。使用 MEGA V5.0 软件, 对本研究中获得的序列与国内外 EV71 代表病毒株进行进化分析, 构建系统发育树。

## 2 结 果

**2.1 EV71 VP1 片段扩增结果** 对 12 例荧光定量 PCR 检测 EV71 核酸阳性的标本进行 VP1 片段扩增。电泳检测显示, 各阳性标本均能在  $1.0 \times 10^3$  位置出现明显目的条带。将测序获得的各标本 EV71 VP1 序列, 分别命名为 Nantong01\_2014, Nantong02\_2014..., Nantong12\_2014。

\* 基金项目: 南通市科技局资助项目(HS2013028)。 作者简介: 张宏萍,女,主管检验师,主要从事微生物学检验研究。



1:DL2000 标记物;2:EV71 VP1 基因 PCR 产物。

图 1 EV71 VP1 基因的 RT-PCR 产物电泳图

**2.2 EV71 VP1 基因核苷酸、氨基酸序列同源性分析** 本实验共分离到 12 株南通地区 2014 年流行的 EV71, 根据测序的全部 12 条 EV71 VP1 基因序列, 进行同源性比对。12 条序列间具有较高的同源性(93.4%~99.1%)。同源性比对结果见图 2(见《国际检验医学杂志》网站论文附件)。

**2.3 EV71 VP1 基因系统发育树的构建和分析** 为了探寻 2014 年南通市 12 株 EV71 病毒株的传播来源, CoxA16 原型株 G-10 作为外群序列, 搜集中中国其他城市分离的 EV71 病毒序列和国外流行的病毒株序列, 使用邻接法构建系统发育树。根据构建的系统发育树显示, 中国所有的 EV71 病毒序列聚集在一起, 位于 C4 亚型参考序列的内侧, 与国外流行的其他亚型病毒序列有较远的进化距离。南通地区 2014 年分离的 12 株 EV71 和中国其他大部分城市分离的 EV71 序列有更近的进化距离, 并组成 EV71 的 C4a 进化簇, 而来自上海 2000 年分离的 3 株病毒株则单独聚在一起, 组成了 EV71 的 C4b 进化簇。在 C4a 进化簇中, 来自南通 2014 年采集的 12 条 EV71 序列, 根据核酸的进化距离, 主要形成 5 个不同的进化分支或进化簇, 与全国其他地区的病毒序列有很近的亲缘关系, 显示南通市流行的 EV71 是来源于中国本地主要流行的病毒株。根据现有的序列进一步分析显示, 12 条南通地区的 EV71 序列均位于主要由江苏省病毒株组成的进化簇内。其中, 8 条流行于南通地区的 EV71 序列与镇江 2010 年流行的病毒序列聚集在一起或位于镇江序列的进化簇内, 表明这些病毒株由镇江地区传入南通地区。剩余的 4 条南通 EV71 序列单独聚在一起, 但均位于主要由江苏省序列组成的进化簇内。综上所述, 南通地区 2014 年流行的 EV71 病毒株序列与江苏本省流行的 EV71 病毒株有更近的亲缘关系, 表明南通地区 2014 年流行的病毒株为江苏省本省流行的病毒株。另外, 南通地区 2009 年流行的 EV71 病毒序列同样与江苏省内其他城市的病毒序列聚集在一起, 表明南通地区多次流行的 EV71 病毒株, 均来自江苏省内南通地区 2014 年 12 株 EV71 病毒株与其他地区病毒株的系统发育关系见图 3(见《国际检验医学杂志》网站论文附件)。

### 3 讨 论

手足口病是指手足口腔等部位出现红色斑丘疹, 伴有或不伴有发热的一种急性传染病, 可由多种肠道病毒感染引起, 如 EV71、CoxA、B 型或埃可病毒等其他肠道病毒。EV71 感染是引起手足口病的主要病原体, 且可引起严重的中枢神经系统并发症, 主要的发病人群集中在 1~4 岁年龄组<sup>[6-7]</sup>。VP1 蛋白是 EV71 病毒主要的病毒抗原决定簇, 是肠道病毒血清型分型的主要依据。根据 VP1 基因序列的差异, 全球的 EV71 病毒株

被划分为 A、B 和 C 三个基因型。除 A 基因型仅含有 EV71 原型株外, B、C 基因型又可进一步划分为含有一定数量的亚型<sup>[8-10]</sup>。

根据已分离的 EV71 病毒株分析显示, C4 亚型为中国各地区最主要流行的病毒株<sup>[11]</sup>。C4 亚型的序列又主要形成两个进化分支, C4a 和 C4b。其中, C4b 病毒株仅在少数地区的早期阶段流行, 如于上海 2000 年分离的病毒株<sup>[12]</sup>。来自近年来中国各地区流行的病毒株序列组成了 C4a 分支, 这是当前中国最主要流行的病毒株。在 C4a 分子内, 不同地区和不同时间分离的序列有很近的遗传关系, 表明它们来自共同的祖先。为了解 EV71 的亚型分布, 本研究收集了 2014 年南通地区各医院的手足口病患儿标本, 成功获取到 12 份 EV71 标本的 VP1 基因序列。根据构建的系统发育树显示, 南通地区 2014 年分离的病毒株均属于 C4a 病毒株, 表明当前南通地区流行的 EV71 病毒株为相同的亚型病毒株。

2008 年安徽省阜阳市暴发较大规模的手足口病流行, 随后山东、江苏、北京、上海等全国各地均出现了手足口病疫情。分子流行病学的分析显示, 来自江苏的 EV71 病毒株与同时期安徽阜阳流行的病毒株聚集在 C4a 分支, 其遗传距离较小。因此, 流行在江苏相邻省市(如上海, 山东)的 EV71 病毒应该均由阜阳传入。在本研究中, 数据库中南通地区 2009 年的 EV71 病毒序列也被用于构建系统发育树, 以便鉴定南通地区 EV71 病毒的序列差异。然而分析显示, 无论是 2009 年分离的病毒序列还是 2014 年分离的病毒序列, 它们相互间的遗传距离均较近, 均属于 C4a, 显示南通地区流行单一的 EV71 亚型病毒株。同时, 其他地区 EV71 序列构建的系统发育树显示, 南通地区不同时期分离的病毒株均流行于江苏省内其他城市, 如镇江、南通等的病毒序列聚集在一起, 表明南通地区 EV71 的病毒株主要受流行于江苏省内的病毒株影响。然而, 由于样本数量的限制, 因此本研究的分析结果尚不能完全代表南通地区 EV71 的实际流行情况。更多样本的分析将有助于进一步了解南通地区 EV71 的实际流行情况。

### 参 考 文 献

- [1] Li L, He YQ, Yang H, et al. Genetic characteristics of human Enterovirus 71 and Coxsackievirus A 6 circulating from 1999 to 2004 in Shenzhen, People's Republic of China [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(8):3835-3839.
- [2] Huang SC, Hsu YW, Wang HC, et al. Appearance of intratypic recombination of enterovirus 71 in Taiwan from 2002 to 2005 [J]. Virus Res, 2008, 131(2):250-259.
- [3] 中华人民共和国卫生部. 手足口病预防控制指南(2008 年版)[J]. 首都公共卫生, 2008, 2(4):1-3.
- [4] Ryu WS, Kang B, Hong J, et al. Enterovirus 71 infection with central nervous system involvement, South Korea [J]. Emerg Infect Dis, 2010, 16(11):1764-1776.
- [5] 常宏伟, 汤仁树, 陈伟, 等. 六安地区手足口病患儿肠道病毒分离鉴定及临床表现[J]. 安徽医科大学学报, 2009, 44(2):154-158.
- [6] Herrero LJ, Lee CSM, Hurrelbrink RJ, et al. Molecular epidemiology of enterovirus 71 in Malaysia, 1997-2000 [J]. Arch Virol, 2003, 148(7):1369-1385.
- [7] Shimizu H, Utama A, Onnimala N, et al. Molecular epidemiology of enterovirus 71 infection in the Western Pacific Region [J]. Pediatr Int, 2004, 46(2):231-235.
- [8] 李文先, 叶冬青. EV71 病毒感染并发神经源性肺水肿研究进展 [J]. 疾病控制杂志, 2008, 12(3):188-192. (下转第 1357 页)

动脉全血与静脉血浆钾、钠、氯离子检测结果比较见表 2。

表 1 动脉全血与动脉血浆电解质检测结果  
比较( $\bar{x} \pm s$ , mmol/L)

组别	n	钾离子	钠离子	氯离子
动脉全血	100	3.608 ± 0.709	138.30 ± 7.17	95.35 ± 9.05
动脉血浆	100	3.606 ± 0.748	138.63 ± 7.29	97.84 ± 9.77
t	—	0.185	-3.092	-12.561
P	—	0.854	0.003	0.001

—: 无数据。

表 2 动脉全血与静脉血浆电解质检测结果  
比较( $\bar{x} \pm s$ , mmol/L)

组别	n	钾离子	钠离子	氯离子
动脉全血	100	3.608 ± 0.709	138.30 ± 7.17	95.35 ± 9.05
静脉血浆	100	3.657 ± 0.739	136.59 ± 6.49	96.50 ± 8.54
t	—	0.269	-8.976	-3.118
P	—	0.789	0.001	0.002

—: 无数据。

### 3 讨 论

有学者采用 GEM PREMIER 3000 型血气分析仪和罗氏公司 9180 型电解质分析仪分别检测 85 例患者动脉全血和静脉血浆钾、钠离子浓度,结果显示动脉全血和静脉血浆钾离子浓度比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),动脉全血、动脉血浆和静脉血浆钠离子浓度比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),动、静脉血浆钾、钠离子浓度比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),并且动脉全血和静脉血浆钾离子浓度呈线性相关<sup>[3]</sup>。王素平等<sup>[4]</sup>采用 IS-100 型钾、钠、氯自动分析仪检测 33 例呼吸科患者动脉血气分析标本和常规静脉血标本血浆钾离子水平,结果显示二者比较差异有统计学意义<sup>[4]</sup>。有研究表明全血、血浆钾离子水平低于血清,主要原因是非抗凝静脉血在凝固过程中,红细胞和血小板释放部分钾离子,而纤维蛋白原的存在可增加氯离子水平<sup>[5-7]</sup>。因此,检测标本的不同是引起检测结果存在差异的原因之一。笔者认为,各仪器之间本身存在着测量差异,因此以不同仪器检测动、静脉血钾、钠、氯离子浓度的结果来分析其间的差异,所得到的结论缺乏说服力。此外,笔者认为电解质检测结果易受标本放置时间的影响,所以必须同时进行配对检测。未抗凝外周血凝固过程中血小板释放出钾离子,而且血清标本常受到纤维蛋白的干扰,所以利用血浆标本进行钾、钠、氯离子检测更准确、更方便。AVL9180 型电解质分析仪可对全血和血浆等标本进行测定。本研究配对检测 100 份标本,结果显示动脉全血与动脉血浆标本钠、氯离子检测结果比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),其中动脉全

血钠离子水平低于动脉血浆,动脉全血氯离子水平高于动脉血浆。导致上述差异的原因可能包括:(1)全血与血浆标本类型不同<sup>[8]</sup>;(2)同一个体动脉血与静脉血本身固有的钾、钠、氯离子浓度的差异,这种差异可能与外周血 pH 值、血液流动、物质代谢等因素有关;(3)采血不规范导致组织液混入外周血标本及微小溶血、微小凝集等;(4)病理因素,如糖尿病、非代偿性代谢酸(或)碱中毒等;(5)治疗措施,如近期输液或输注胰岛素;(6)操作者和仪器等因素引起的随机误差。

在进行钾、钠、氯离子检测时,应注意标本类型,意识到动脉全血与静脉血浆,以及血浆与全血等不同类型标本间客观存在的差异,正确评价患者钾、钠、氯离子的真实水平<sup>[9]</sup>。血气分析在急救和监护医学中发挥着重要作用,新型血气分析仪增加了电解质、血红蛋白、血糖等重要指标的检测功能,但应注意验证不同分析系统检测结果间的一致性,并加强与临床科室的及时沟通,注意解释血气分析仪检测标本为肝素锂抗凝全血,结果与传统生化分析有差异<sup>[10]</sup>。钾、钠、氯检测结果应以静脉血浆标本测定值为准,以动脉全血标本测定值为参考。钾、钠、氯离子检测的分析前质量控制尤为重要,需注意包括患者准备、抗凝剂选择、标本采集、标本运输等在内的多种影响因素。

### 参 考 文 献

- 吴连杰,任继欣,李雪梅,等.探讨多种抗凝血浆对急诊生化离子指标的影响[J].国际医学检验杂志,2013,34(13):1939-1940.
- 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].3 版.南京:东南大学出版社,2006:371-378.
- 田强,沈云峰,张洪波.动脉全血和静脉血浆中钾和钠比较分析[J].江汉大学学报:自然科学版,2011,39(2):73-75.
- 王素平,鲁小燕,许卓伦,等.动脉血气标本常规静标本钾离子测定值的对比分析[J].湖北医科大学学报,1995,16(1):41-42.
- 李志平,谢灿茂,程东升,等.血清与全血及血浆电解质葡萄糖测定结果存在重大差异[J].临床检验杂志,2007,125(12):15-16.
- 王松华.血清钾与血浆钾测定差异的观察[J].检验医学与临床,2002,2(2):56-57.
- Toffaletti J, Ernst P, Hunt P. Dry electrolyte-balanced heparinized syringes evaluated for determining ionized calcium and other electrolytes evaluated for determining ionized calcium and other electrolytes in whole blood[J]. Clin Chem, 1991, 37(12):1730-1733.
- 吴巧萍,陈兵华,谢服役,等.动脉血气与静脉血中的电解质测定及比较分析[J].浙江检验医学,2012,10(2):43-44.
- 彭界,冯湘玲.动脉血和静脉血检测电解质结果的比较分析[J].大家健康,2013,7(12):66-67.
- 张东玲,朱博,高越.不同生化检测系统测定同种项目的结果比对与临床可接受性价[J].现代检验医学杂志,2006,21(3):37-39.

(收稿日期:2015-02-28)

(上接第 1355 页)

- Wu D, Ke C, Li W, et al. A large outbreak of hand, foot, and mouth disease caused by EV71 and CAV16 in Guangdong, China, 2009[J]. Arch Virol, 2011, 156(6): 945-953.
- Mao LX, Wu B, Bao WX, et al. Epidemiology of hand, foot, and mouth disease and genotype characterization of Enterovirus 71 in Jiangsu, China [J]. J Clin Virol, 2010, 49(2): 100-104.
- Wu KX, Ng MM, Chu JJ. Developments towards antiviral thera-

pies against enterovirus 71[J]. Drug Discov Today, 2010, 15(23-24):1041-1051.

- Chang LY, Huang LM, Gau SS, et al. Neurodevelopment and cognition in children after enterovirus 71 infection[J]. N Engl J Med, 2007, 356(12):1226-1234.

(收稿日期:2015-01-02)