

北京市 2007 年手足口病暴发疫情的病原学分析

李仁清 陈丽娟 张合润 王玉梅 贺雄

【摘要】 目的 对北京市 2007 年 5—7 月间发生并收集到的 8 起手足口病暴发疫情进行病原学分析及鉴定。**方法** 采用 RT-PCR 技术,对手足口病患儿的疱疹液或咽拭子标本,直接进行肠道病毒(EV)分型;采用 RD 传代细胞,对标本进行病毒分离培养,再对其阳性培养物进行 EV 分型。对其中部分原始标本和阳性分离物中的 EV VP1 区进行核苷酸序列及预测的氨基酸序列分析。**结果** 北京市 2007 年发生在大兴区的 2 起疫情由 EV71 引起,其他 4 个区的 6 起疫情均由柯萨奇病毒 A16 型(Cox A16)引起。大兴区 2 起疫情的 EV71 都属于 C 基因型的 C4 亚型,但分别处于 VP1 基因亲缘性系统发生树的不同分支,其核苷酸和氨基酸分别存在 3.7% 和 0.8% 的差异;来源于顺义区的 Cox A16 与其他病毒分别处于不同分支,其核苷酸和氨基酸分别存在 3.7% 和 0% 的差异。**结论** 北京市 2007 年手足口病疫情主要由 EV71 和 Cox A16 两种病原引起,而每种病原都存在 2 个或 2 个以上流行株病毒;且 Cox A16 的传播似乎较 EV71 更为广泛。

【关键词】 手足口病; 肠道病毒 71 型; 柯萨奇病毒 A16 型; 反转录-聚合酶链反应

Study on the etiology of hand-foot-mouth disease outbreaks in Beijing in 2007 LI Ren-qing, CHEN Li-juan, ZHANG He-run, WANG Yu-mei, HE Xiong. Beijing Municipal Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100013, China

【Abstract】 Objective To identify the etiology of 8 human hand-foot-mouth disease (HFMD) outbreaks in Beijing, during May to July 2007. **Methods** Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method was used to directly type the specimens including fluid from the herpes and throat swabs from the HFMD patients. Using RD cell lines, the collected stool specimens were cultured followed by typing. Partial VP1 region of selected EV positive specimens and cultures were sequenced and both nucleic acid sequence and predicted amino acid sequence were analyzed. **Results** The two HFMD outbreaks in Daxing region in Beijing in 2007 were caused by enterovirus 71 type (EV71), and the others were caused by Coxsackie virus A16 (Cox A16). Two EV71 strains caused epidemics in Daxing region in 2007 belonged to C4 subgenotype but on different branches in VP1 gene phylogenetic tree. The differences on nucleic acid sequence and amino acid sequence were 3.7% and 0.8% between the two EV71 strains, respectively. The Cox A16 strain in Shunyi region and the other strains were on different branches in phylogenetic tree, and the difference on nucleic acid and amino acid sequence were 3.7% and 0% respectively between the two Cox A16 stains. **Conclusion** The HFMD outbreaks occurred in Beijing in 2007 were caused mainly by EV71 and Cox A16, and there were two individual epidemic virus strains. Cox A16 seemed to spread more widely than EV71 in Beijing, 2007.

【Key words】 Hand-foot-mouth disease; Enterovirus 71; Coxsackie virus A16; Reverse transcription-polymerase chain reaction

手足口病可由多种型别肠道病毒(EV)感染所致,但以柯萨奇病毒 A16 型(Cox A16)和 EV71 最为常见,由于 EV71 能引起严重并发症因而备受关注^[1-3]。2007 年 5 月底北京市大兴区出现由 EV71 引起的手足口病疫情^[4],首都儿研所附属儿童医院在 2007 年北京市手足口病散发病例中也检测到 EV71

和 Cox A16 两种病原^[5,6],但北京市 2007 年手足口病暴发疫情的病原学组成及其分布尚不清楚。本研究对 2007 年发生的部分暴发疫情标本进行病原学分析,结果报告如下。

材料与方法

1. 材料:

(1)标本采集:由北京市各区级疾病预防控制中心采集的 2007 年 5 月底至 7 月中旬暴发的 13 起手足

口病疫情标本,对 8 起疫情(大兴区 Z001 和 Z011,海淀区 Z005、Z013 和 Z015,延庆县 Z007,顺义区 Z012 以及昌平区 Z014)患儿的疱疹液和/或咽拭子进行实验室鉴定和分析。共采集 70 例 2~9 岁手足口病患儿 130 份临床标本,其中疱疹液 23 份,咽拭子 62 份,粪便标本 45 份。

(2) 试剂及细胞:病毒 RNA 提取试剂盒、onestep RT-PCR 试剂盒和 PCR 产物纯化试剂盒均购自 QIAGEN;RNA 酶抑制剂(RNasin)等购自天根生化科技(北京)有限公司;BigDYE Terminator V3.1 Cycle Sequencing 试剂盒和 BigDYE XTerminator Purification 试剂盒均购自 ABI。人横纹肌肉瘤细胞(RD)来源于国家脊髓灰质炎实验室。

(3) 引物合成:EV 种属特异性鉴定引物为 EV1/EV2^[7];EV71 特异性鉴定引物为 EV71-S/EV71-A^[8];Cox A16 特异性鉴定引物为 Cox A16-S/Cox A16-A^[8];EV VP1 区部分核苷酸测序引物为 011/040^[9,10](表 1),由北京六合通经贸有限公司合成。

表 1 EV 鉴定和 VP1 区测序引物

引物	序列(5'~3')
EV1	TCCGGCCCTGAATGCGGCTAATCC
EV2	ACACGGACACCCAAAGTAGTCGGTCC
EV71-S	GCAGCCCAAAGAAGCTTCAC
EV71-A	ATTTCAGCAGCTTGGAGTGC
Cox A16-S	ATTGGTGCTCCACTACAGC
Cox A16-A	TCAGTGTGGCAGCTGTAGG
011	GCICCGAYTGITGICCAA
040	ATGTAYRTICCMICIGGIGC

2. 方法:

(1) EV 分离培养及分型:标本的处理和分离培养方法见文献[11]。对 2007 年部分暴发疫情(大兴区 Z001、海淀区 Z005 和延庆县 Z007)的咽拭子和疱疹液标本进行 EV 分离培养。对原始标本和病毒阳性培养物的核酸提取及 RT-PCR 分型方法见文献[11],结果判定见文献[8]。

(2) VP1 区部分核苷酸序列和预测氨基酸序列分析:将原始标本和病毒分离阳性培养物离心,取上清提取病毒 RNA,采用测序引物 011/040 扩增 VP1 区核酸片段。对 VP1 区扩增产物进行纯化和标记,用 ABI 3100 自动测序仪完成测序和校对。采用 CLUSTAL X 和 MEGA4.0 进行核苷酸和氨基酸序列的分析及系统发生树的构建,各病毒代表株的 VP1 区核苷酸序列来自美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)的 GenBank 数据库。

结 果

1. EV 的分离培养及分型:采用 RD 传代细胞,对 8 起疫情中的 37 份粪便、11 份疱疹液、12 份咽拭子进行 EV 分离培养。有 7 份粪便、1 份疱疹液和 1 份咽拭子 EV 分离阳性,阳性率为 15%,其中粪便中 EV71 的分离阳性率为 50.0%(4/8),而 Cox A16 仅为 10.3%(3/29)。

对 8 起疫情中 62 份咽拭子和 23 份疱疹液直接进行 EV 分型,有 55 份咽拭子和 22 份疱疹液分型阳性,疱疹液和咽拭子的 EV 分型阳性率分别为 88.7%(55/62)和 95.7%(22/23)。病毒阳性分离物的 EV 分型阳性率为 100.0%。

在大兴区暴发的 2 起疫情(Z001 和 Z011)的原始标本中均检测到 EV71 特异性核酸片段,其 6 份 EV 阳性分离物的分型结果也为 EV71;在海淀区、延庆县、顺义区及昌平区暴发的 6 起疫情标本中均检测到 Cox A16 特异性核苷酸片段,其 3 份 EV 阳性分离物的分型结果也为 Cox A16。

2. VP1 区部分核苷酸和氨基酸序列分析:在对 EV71 VP1 区 375 个核苷酸的序列比对结果发现,大兴区 Z001 和 Z011 分离 EV71 之间有 14 个核苷酸的差异,差异率为 3.7%;在对其预测的氨基酸序列比对结果中发现,14 个核苷酸的差异表现为第 75 位上 1 个氨基酸的差异(异亮氨酸/亮氨酸),氨基酸差异率为 0.8%(图 1)。在构建的 VP1 基因亲缘性系统发生树中,大兴区 2 起疫情分离的 EV71 都属于 C 基因型的 C4 亚型,但处于不同的分支(图 2)。

在海淀(Z005、Z013 和 Z015)、延庆(Z007)、顺义(Z012)及昌平(Z014)4 个区(县)6 起疫情中,对 17 份 EV 分型阳性的原始样本和 2 份病毒阳性分离物进行 VP1 区核苷酸和氨基酸的比对。核苷酸序列比对的结果显示,Z012 的 3 份原始样本(BJ07-Z012-4、13 和 17)与其他样本有 11 个核苷酸的差异,差异率为 3.7%;Z014 的 2 份病毒阳性分离物(BJ07-Z014-7 和 BJ07-Z014-19)与 17 份原始样本有 4 个核苷酸的差异,差异率为 1.4%。其氨基酸序列比对结果显示,Z012 特有的 11 个核苷酸差异未导致氨基酸的差异,而 Z014 病毒阳性分离物特有的 4 个核苷酸差异导致第 48 位一个氨基酸的差异(缬氨酸/异亮氨酸)(图 3)。在构建的 VP1 基因亲缘性系统发生树中,顺义区 Z012 疫情分离病毒与其他病毒(包括阳性分离病毒)都属于 C 基因型,但处于不同的分支;除顺义区(Z012)疫情外,昌平区(Z014)疫

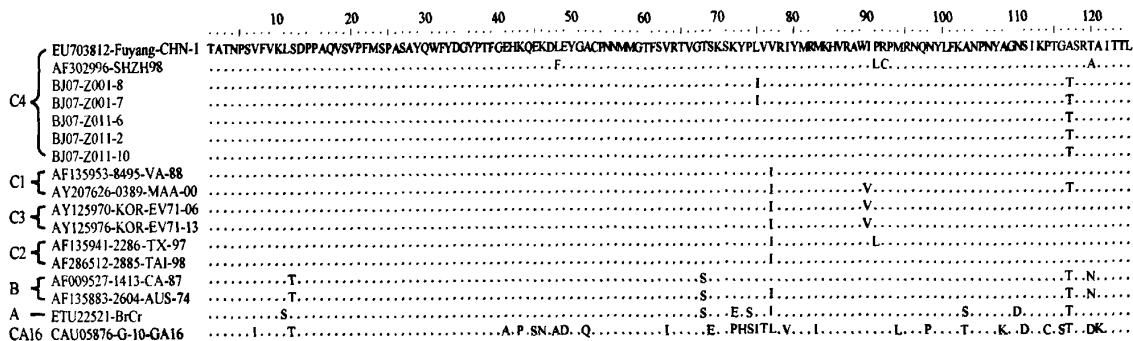


图1 EV71 VP1 区部分氨基酸序列比对

情的2份阳性分离病毒与该疫情其他原始样本不在同一分支,但其原始样本与其他疫情的原始样本呈现聚集现象(图4)。

讨论

通过对北京市2007年5—7月发生的部分(8起)手足口病暴发疫情的病原学监测,从大兴区间隔20余天发生的2起疫情标本(咽拭子和疱疹液)中,检测到EV71核酸,且从包括粪便标本中分离到EV71,经病毒基因VP1区测序分析,发现引起2起疫情的EV71,虽同属于C基因型C4亚型,但

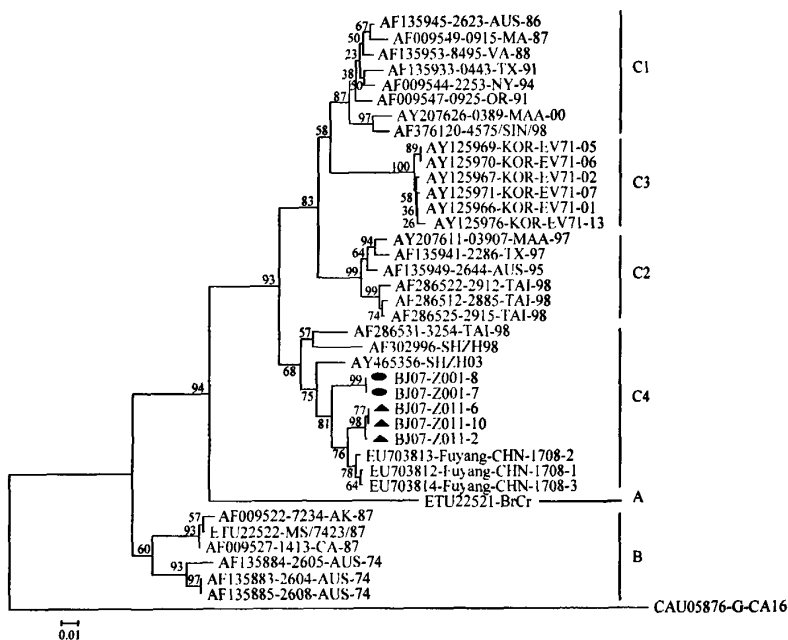


图2 EV71的VP1基因亲缘性系统发生树

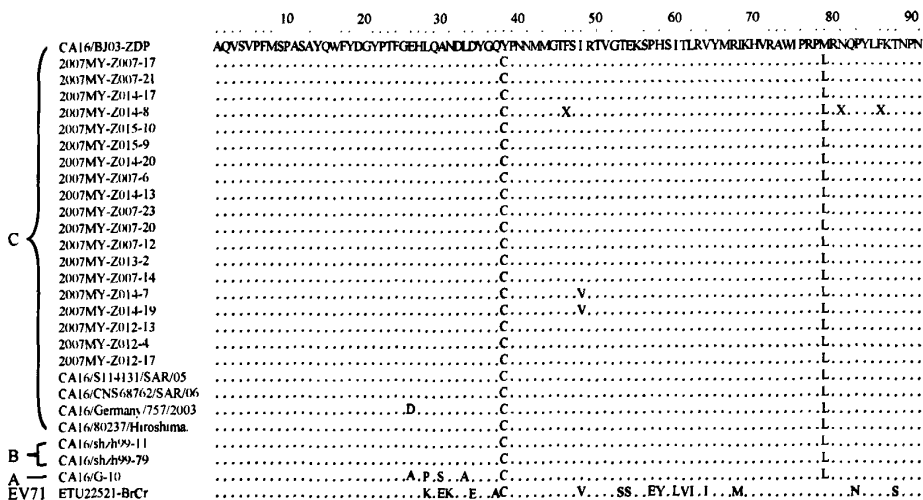


图3 Cox A16 VP1 区部分氨基酸序列比对

分别处于进化树的不同分支,提示为两个不同的流行株病毒。而在海淀、延庆、顺义和昌平 4 个区(县)6 起疫情标本(咽拭子和疱疹液)中均检测到 Cox A16 核酸,且从昌平区(Z014)疫情粪便中分离到 Cox A16 病毒,经 VP1 区测序分析,发现引起顺义(Z012)疫情的 Cox A16 与引起其他 3 个区(县)5 起疫情的 Cox A16,虽同属于 C 基因型,但分别处于进化树的不同分支,提示为两种不同的流行株病毒。以上结果表明:导致北京市 2007 年手足口病暴发疫情病原主要有两种,即 EV71 和 Cox A16,且

每种病原都存在两个或以上流行株病毒;其中 EV71 主要分布在北京南部的大兴区,而 Cox A16 则分布在北部的 4 个区(县),提示两种病原存在一定区域性分布,且 Cox A16 似乎较 EV71 传播更为广泛。

粪便检测结果显示, Cox A16 的阳性分离率(10.3%)明显低于 EV71(50.0%),且分离株病毒 VP1 区核苷酸序列与该疫情其他原始咽拭子和疱疹液中病毒存在 1.4% 的差异,其中的 4 个核苷酸差异表现为一个氨基酸(缬氨酸/异亮氨酸)的差异,这是 Cox A16 在人肠道(细胞)上增殖所致还是在 RD 传代细胞上增殖所致,有待进一步研究。本研究还发现,部分 Cox A16 核酸检测阳性咽拭子和疱疹液标本,在其病毒连续分离培养时,增殖能力存在逐渐减弱的趋势,即细胞在出现 50%~60% CPE 时,又随传代次数的增加 CPE 逐渐消失,表明 Cox A16 对 RD 细胞的不适应性。提示在病原学监测上,尤其在病毒核苷酸序列特征分析时,采用原始疱疹液或/和咽拭子标本直接进行 EV 分型和测序鉴定可能更有意义。

综上所述,北京市 2007 年手足口病疫情主要由 EV71 和 Cox A16 两种病原引起,而每种病原都存在 2 个或 2 个以上流行株病毒;且 Cox A16 的传播似乎较 EV71 更为广泛。

参 考 文 献

[1] Komatsu K. Outbreak of severe neurologic involvement associated with enterovirus 71 infection. *Pediatr Neurol*, 1999, 20 (1): 17-23.

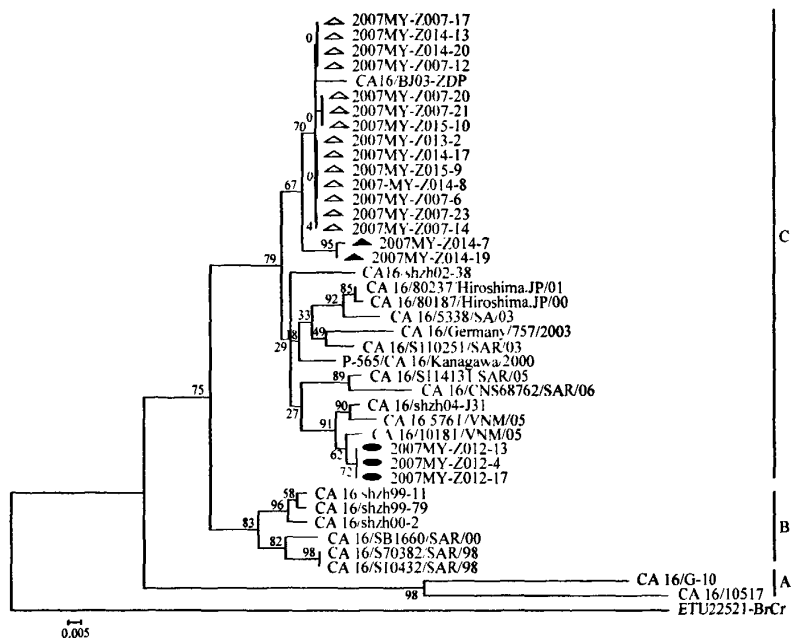


图 4 Cox A16 的 VP1 基因亲缘性系统发生树

[2] Ho M, Chen ER, Hsu KH, et al. An epidemic of enterovirus 71 infection in Taiwan. *N Engl J Med*, 1999, 341 (13): 929-935.

[3] Shih SR, Ho MS, Lin KH, et al. Genetic analysis of enterovirus 71 isolated from fatal and non-fatal cases of hand, foot and mouth disease during an epidemic in Taiwan, 1998. *Virus Res*, 2000, 68(2): 127-136.

[4] 李仁清, 陈丽娟, 张合润, 等. 北京市 2007 年从手足口病疫情标本中分离到肠道病毒 71 型. *中国疫苗与免疫*, 2009, 15(1): 41-44.

[5] 朱汝南, 钱渊, 邓洁. 北京市儿童手足口与肠道病毒 71 型和柯萨奇病毒 A 组 16 型感染相关. *中华流行病学杂志*, 2007, 28 (10): 1004-1008.

[6] 赵惠欣, 张艳玲, 张奕, 等. 2007 年北京儿童中流行的手足口病病原学及临床特点. *临床儿科杂志*, 2008, 26(6): 467-469.

[7] Yang CF, De L, Yang SJ, et al. Genotype-specific in vitro amplification of sequences of the wild type 3 polioviruses from Mexico and Guatemala. *Virus Res*, 1992, 24(3): 277-296.

[8] 卫生部. 手足口病预防控制指南(2008 年版)[EB/OL]. 北京. http://www.gov.cn/gzdt/2008-05/03/content_960347.htm, 2008.

[9] Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, et al. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J Virol*, 1999, 73(3): 1941-1948.

[10] Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, et al. Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J Clin Microbiol*, 1999, 37(5): 1288-1293.

[11] 李仁清, 陈丽娟, 王玉梅, 等. 北京地区 2006-2008 年肠道病毒 71 型 VP1 区基因特征分析. *中华流行病学杂志*, 2009, 30(1): 45-49.

(收稿日期: 2009-03-30)

(本文编辑: 张林东)