

湖北省宜昌市 2019–2020 年 20 岁及以下人群水痘-带状疱疹病毒基因特征分析

尤美莹¹ 王苗苗¹ 郭宏² 王天奇^{1,3} 李旭东¹ 许松涛² 胡跃华¹ 殷大鹏⁴

¹中国疾病预防控制中心流行病学办公室,北京 102206;²中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所,国家卫生健康委员会医学病毒和病毒病重点实验室,北京 102206;³北京市卫生健康大数据与政策研究中心数据资源与统计部,北京 100034;⁴海南省疾病预防控制中心,海口 570203

尤美莹和王苗苗对本文有同等贡献

通信作者:胡跃华,Email:huyueer@163.com;殷大鹏,Email:yindapeng@hainan.gov.cn

【摘要】 目的 分析 2019–2020 年湖北省宜昌市 ≤20 岁人群水痘-带状疱疹病毒(VZV)基因特征。**方法** 依托宜昌市健康管理大数据平台,对 2019 年 3 月至 2020 年 9 月在湖北省宜昌市 3 家医院就诊并被临床诊断为带状疱疹的 ≤20 岁病例开展调查。采集病例疱疹液、咽拭子标本并完成问卷调查以获得基本信息。采用实时荧光定量 PCR 方法进行病毒阳性鉴定,采用 PCR 方法扩增 VZV 开放阅读框(ORF)并对产物进行测序,分析单核苷酸多态性位点的突变情况,确定 VZV 基因型别。**结果** 46 例带状疱疹患者中,男女性别比为 1.3:1(26:20),年龄范围 7~20 岁。15 例患者有水痘疫苗接种史,其中接种 1 和 2 剂次分别有 13 和 2 例。VZV 阳性率为 73.91%(34/46),基因型均为 Clade 2 遗传支。且 ORF22 基因核苷酸序列系统进化树分析显示,34 株标本与 Clade 2 代表株核苷酸序列匹配度为 99.0%~100.0%。**结论** 2019–2020 年宜昌市 ≤20 岁人群带状疱疹的 VZV 主要流行株型别为 Clade 2 遗传支。

【关键词】 水痘-带状疱疹病毒; 带状疱疹; 基因特征

基金项目:北京市自然科学基金(L202008)

Genetic characterization of varicella-zoster virus in people aged 20 years and under in Yichang City of Hubei Province, 2019-2020

You Meiyong¹, Wang Miaomiao¹, Guo Hong², Wang Tianqi^{1,3}, Li Xudong¹, Xu Songtao², Hu Yuehua¹, Yin Dapeng⁴

¹Office of Epidemiology, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China;

²National Health Commission Key Laboratory of Medical Virology and Viral Diseases, National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China; ³Data Resources and Statistics Department, Beijing Municipal Health Big Data and Policy Research Center, Beijing 100034, China; ⁴Hainan Center for Disease Control and Prevention, Haikou 570203, China

You Meiyong and Wang Miaomiao contributed equally to the article

Corresponding authors: Hu Yuehua, Email: huyueer@163.com; Yin Dapeng, Email: yindapeng@hainan.gov.cn

【Abstract】 Objective To analyze the genetic characteristics of varicella-zoster virus (VZV) in people aged 20 years and under in Yichang City of Hubei Province from 2019 to 2020.

DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20221027-00915

收稿日期 2022-10-27 本文编辑 斗智

引用格式:尤美莹,王苗苗,郭宏,等.湖北省宜昌市 2019-2020 年 20 岁及以下人群水痘-带状疱疹病毒基因特征分析[J].中华流行病学杂志,2023,44(4):607-610. DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20221027-00915.

You MY, Wang MM, Guo H, et al. Genetic characterization of varicella-zoster virus in people aged 20 years and under in Yichang City of Hubei Province, 2019-2020[J]. Chin J Epidemiol, 2023, 44(4): 607-610. DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20221027-00915.



Methods Based on the Yichang Health Big Data Platform, we investigated cases 20 and under clinically diagnosed as herpes zoster in three hospitals from March 2019 to September 2020. Collecting vesicle fluid and throat swab samples of the cases and completing questionnaires to obtain basic information. Real-time fluorescent quantitative PCR was used for positive identification of the virus. PCR amplification of VZV's open reading frame (ORF) and sequencing of the products to determine the VZV genotype. Analyze mutations at some specific single nucleotide polymorphism (SNP) sites. **Results** Among 46 cases of herpes zoster, the male to female ratio was 1.3:1 (26:20) and the age ranged from 7 to 20 years old. Fifteen cases had been vaccinated against varicella, including 13 and 2 cases of 1 and 2 doses, respectively. VZV strains were detected in 34 samples (73.91%), all belonging to Clade 2. Phylogenetic tree analysis of the nucleotide of ORF22 showed, compared with Clade 2 referenced strains, the sequence matching degree of nucleotide for all 34 samples was 99.0% to 100.0%. **Conclusion** The main VZV strain causing herpes zoster in people aged 20 years and under in Yichang from 2019 to 2020 was Clade 2.

【Key words】 Varicella-zoster virus; Herpes zoster; Genetic characteristics

Fund program: Beijing Natural Science Foundation (L202008)

水痘-带状疱疹病毒(VZV)是一种具有高度传染性的 α 疱疹病毒和基因组为双链DNA的病毒,人是其唯一的自然宿主^[1]。病毒感染可引起两种不同的疾病,即水痘和带状疱疹。原发感染表现为水痘,为儿童常见疾病。原发感染后,病毒能够潜伏在感觉神经节内的神经细胞中,当机体免疫功能低下或者年老体弱时被重新激活发生带状疱疹。VZV仅有一种血清型且基因组相对保守^[2],但不同型别的VZV在特定单核苷酸多态性(SNP)位点上仍有较大的差异^[3]。因此,基于SNP不同位点的碱基差异可对VZV进行基因分型,在VZV流行病学研究和疫苗研发等方面具有重要意义。近年来宜昌市带状疱疹报告发病率为5.82/1 000人年,其中 ≤ 20 岁人群报告发病率为1.02/1 000人年。且研究表明近年来儿童青少年带状疱疹的发病率呈上升趋势^[4-5],应做好带状疱疹的监测工作。本研究分析2019-2020年宜昌市 ≤ 20 岁人群中带状疱疹患者的VZV流行株基因特征,补充我国带状疱疹患者的VZV基因型别数据库。

对象与方法

1. 研究对象:2019年3月至2020年9月被临床诊断为带状疱疹的病例,年龄 ≤ 20 岁、签署知情同意书、病史资料完整者。根据宜昌市健康管理大数据平台,选择带状疱疹病例集中和就诊量位居前3位(占比超过85%)的医院为研究现场,3家医院分别是宜昌市中心人民医院、宜昌市第一人民医院和宜昌市第二人民医院。带状疱疹的临床诊断标准采用WHO统一制定的国际疾病分类第10次修订本(ICD-10)中包含“B02”编码的带状疱疹。本研

究已通过中国CDC伦理审查委员会审批(批准文号:201833)。

2. 研究方法:

(1)标本采集与运送:采集病例的疱疹液和咽拭子,按照标本冷藏和冷链要求储存和转运至中国CDC病毒病预防控制所。

(2)实时荧光定量PCR检测:采用商品化VZV核酸检测试剂盒[巨吉众合(北京)生物科技有限公司]和CFX96 TouchDeepWell实时荧光定量PCR仪[伯乐生命医学产品(上海)有限公司]对46份标本进行VZV核酸检测,具体操作按说明书进行,阳性表明检出VZV。

(3)病毒分离:选择人二倍体细胞(MRC-5)进行细胞培养,细胞状态良好时进行病毒接种,并设置细胞阳性对照和阴性对照,37℃孵育每日观察并记录细胞病变(CPE),CPE达到细胞单层的75%~100%时收获、冻存病毒。

(4)核酸提取:采用病毒DNA提取试剂盒(西安天隆科技有限公司)和GeneRotex96核酸提取仪(西安天隆科技有限公司)提取DNA,具体操作按说明书进行,置-20℃低温保存待用。

(5)基因型别鉴定:应用PCR仪(Applied Biosystems ProFlex™, Thermo公司)进行VZV核酸片段扩增,引物使用特异性靶标片段开放阅读框(ORF)22和ORF38, Sanger序列测定,5+1SNP法(37902、38019、38055、38081、38177和69424)鉴定阳性疱疹液和咽拭子标本的基因型别。PCR扩增的反应条件为95℃ 2 min;95℃ 45 s,45℃ 45 s,72℃ 1 min,35个循环;72℃ 10 min。

(6)系统进化树分析:从美国国立生物技术信息中心(NCBI)核苷酸数据库中下载各型别VZV参

考株序列,利用 Snappgene 将 VZV 阳性样本测序结果与目前公认的参考株进行多序列比对, Dumas 株作为参考基因组序列。利用 Dnastar 7.1 软件进行序列同源性分析。MEGA 7 软件依托比对好的 ORF22 核苷酸序列构建系统发育进化树,在 Phylogeny 选项中选择邻接法 (neighbor-joining method, NJ 法),替代模型选择 Kimura-2-parameter model,其中 Bootstrap 值选择 1 000 次。

3. 质量控制:由经过统一专业培训的人员开展现场流行病学调查,标本采集后储存在 2~8 °C 冰箱,并在采样后 48 h 内进行转运。病例疱疹液标本采集率达 95.65%,咽拭子标本采集率达 89.13%。

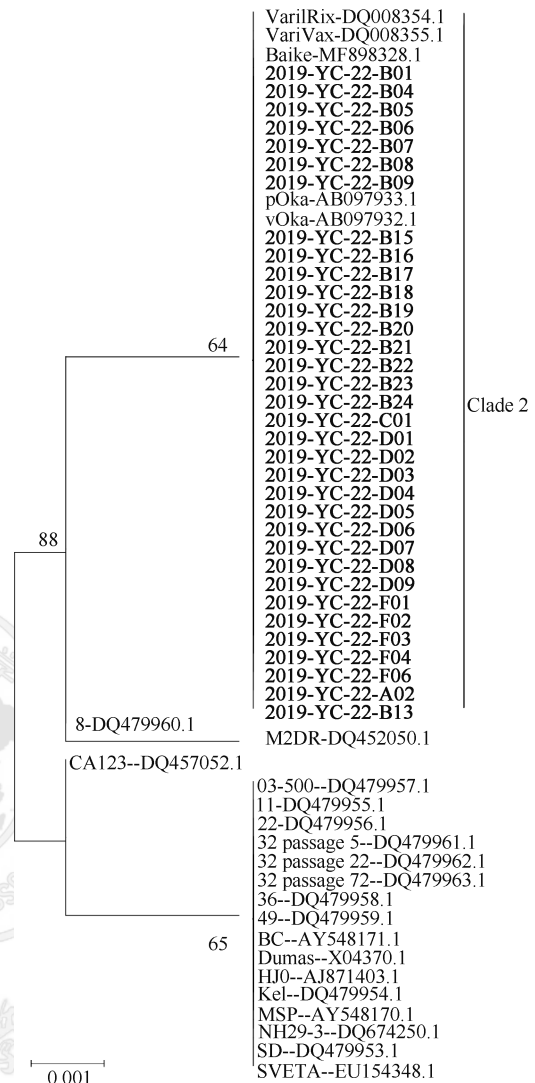
结 果

1. 基本情况:46 例带状疱疹患者中,男女性别比为 1.3:1 (26:20),年龄范围 7~20 岁;病程 (20.5±12.0)d。就诊后采样时间范围 0~3 d,就诊当天和第 3 天采样分别为 44 和 2 例。仅有 15 例有水痘疫苗接种史,其中接种 1 和 2 剂次分别为 13 例和 2 例,接种 4 周内均未发生水痘样皮疹。

2. VZV 阳性和基因型别:46 例带状疱疹患者中, VZV 阳性率为 73.91% (34/46)。SNP 分析结果显示,34 株 VZV 基因型别均为 Clade 2 遗传支,其中接种过和未接种过水痘疫苗的分别为 10 例 (29.41%) 和 24 例 (70.59%)。其中,有两份标本 2019-YC-22-F04 和 2019-YC-22-B13 分别在 108009 和 106092 位点发生 A→G 突变,另有两份标本 2019-YC-22-B04 和 2019-YC-22-B22 均在 69361 位点发生 C→T 突变。见表 1。

3. 系统进化分析:34 株 VZV 的 ORF22 片段序列与 NCBI 上参考株的对应序列进行聚类分析结果显示,核苷酸关系树分为 5 个分支。34 株与 VarilRix、VariVax、Baiké、pOka 和 vOka 均在同一分支上,且 34 株标本与 Clade 2 代表株核苷酸对比显示序列匹配度为 99.0%~100.0%,进一步证明本研

究标本序列与 Clade 2 序列为同属。见图 1。



注:黑体为本研究标本编号
图 1 湖北省宜昌市 34 株水痘-带状疱疹病毒标本 ORF22 核苷酸序列系统进化树

讨 论

VZV 基因组由 125 000 个碱基对组成,有 74 个 ORF,至少可以编码 71 种病毒基因产物^[6],根据 SNP 位点可将其划分为不同的基因型。2017 年

表 1 湖北省宜昌市 34 株水痘-带状疱疹病毒的单核苷酸多态性基因型与参考毒株各型别

毒株基因型别	Clade 遗传支	ORF22 基因位点					ORF38 基因位点
		37902	38019	38055	38081	38177	69424
Dumas/MSP	1	A	G	T	A	G	G
pOka/vOka	2	G	G	C	C	A	G
HJ0/03-500	3	A	G	T	A	G	A
8/M2DR	4	A	G	C	C	A	G
CA123	5	A	G	T	C	G	G
2019-YC-22 ^a	2	G	G	C	C	A	G

注:^a本研究标本编号

通过对 VZV 全基因组序列的比较分析,将 VZV 划分为 8 个基因型:7 个已确立的基因型(Clade 1、Clade 2、Clade 3、Clade 4、Clade 5、Clade 6 和 Clade 9)及 1 个临时基因型 Clade VIII。新分型方案在 2008 年分型方案的基础上^[7],结合了 Sanger 测序与二代测序技术,提高了 VZV 基因组测序的效率和完整性^[8]。VZV 在全球范围内均有传播,其基因型显示出独特的地理分布。其中 Clade 1 主要分布在俄罗斯及部分温带国家或地区,以 Dumas 株为代表;Clade 2 主要分布在我国和蒙古国等亚洲国家,以 pOka、vOka 株为代表;Clade 3 主要分布在欧美地区,以 HJ0、03-500 株为代表;Clade 4 以 8、M2DR 株为代表,Clade 5 以 CA123 株为代表,主要分布在非洲和赤道附近的热带、亚热带地区^[9]。

本研究分析 ORF22 和 ORF38 核苷酸序列判断 VZV 基因型别,2019–2020 年宜昌市 VZV 基因型别均为 Clade 2,既往文献对吉林省、辽宁省、四川省、山东省、北京市和西安市研究发现 VZV 均以 Clade 2 为主^[10-13],说明与我国流行的 VZV 基因型一致。宜昌市位于湖北省西南部,VZV 基因型较单一,符合其地理分布特点。根据 VZV 基因分型新方案,确定宜昌市 VZV 基因型及基因特征,有助于掌握 VZV 分子流行病学特征,为 VZV 感染的防控提供实验室依据。

目前我国对 VZV 基因特征分析中,研究对象多为水痘患者,较少选用带状疱疹患者^[14-15]。带状疱疹的发病率随着年龄的增长而升高,多见中老年人,儿童青少年罕见,但近年来儿童带状疱疹的发病率呈上升趋势^[4-5]。

本研究存在局限性。一是医院因新型冠状病毒感染疫情停诊 3 个月造成病例收集和标本采集遇到困难;二是低年龄人群带状疱疹的发病率较低且样本量不足。

综上所述,2019–2020 年宜昌市 ≤20 岁人群带状疱疹的 VZV 主要流行株型别为 Clade 2 遗传支。需进一步开展后续研究,建立我国较为全面的 VZV 基因数据库。本研究基于宜昌市健康管理大数据平台,及时发现和采集 ≤20 岁带状疱疹病例标本,依托中国 CDC 病毒病预防控制所对 VZV 基因型进行鉴定,丰富了我国 ≤20 岁人群带状疱疹 VZV 基因数据库,为低年龄人群的带状疱疹防控工作提供参考依据。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 尤美莹、王苗苗: 论文撰写、论文修改、数据分析及

解释;郭宏、王天奇: 数据收集与整理、参与实验实施;李旭东: 英文校对、审阅文章;许松涛: 研究设计、论文修改、实验指导;胡跃华、殷大鹏: 设计实验、审阅文章、经费支持

参 考 文 献

- [1] 伊兴旭,甘霖,陈敬贤,等.水痘-带状疱疹病毒疫苗的评价与研究进展[J].微生物与感染,2014,9(4):256-260. Yi XX, Gan L, Chen JX, et al. Evaluation and research progress on varicella-zoster virus vaccines[J]. J Microbes Infect, 2014, 9(4):256-260.
- [2] World Health Organization. Varicella and herpes zoster vaccines: WHO position paper, June 2014[J]. Wkly Epidemiol Rec, 2014, 89(25):265-287.
- [3] 郭宏. 2018-2020 年我国四省份水痘-带状疱疹病毒基因特征分析[D].呼和浩特:内蒙古医科大学,2021. DOI: 10.27231/d.cnki.gnmyc.2021.000308. Guo H. Genetic characterization of varicella-zoster virus analysis in four provinces of China from 2018 to 2020[D]. Hohhot: Inner Mongolia Medical University, 2021. DOI: 10.27231/d.cnki.gnmyc.2021.000308.
- [4] You MY, Wang TQ, Wang MM, et al. Identifying the optimal age for herpes zoster vaccination - Yichang City, Hubei Province, China, 2017-2019[J]. China CDC Wkly, 2022, 4(29):631-634. DOI:10.46234/ccdcw2022.137.
- [5] Mitra B, Chopra A, Talukdar K, et al. A clinico-epidemiological study of childhood herpes zoster [J]. Indian Dermatol Online J, 2018, 9(6): 383-388. DOI: 10.4103/idoj.IDOJ_107_18.
- [6] Zerboni L, Sen N, Oliver SL, et al. Molecular mechanisms of varicella zoster virus pathogenesis[J]. Nat Rev Microbiol, 2014, 12(3):197-210. DOI:10.1038/nrmicro.3215.
- [7] Breuer J, Grose C, Norberg P, et al. A proposal for a common nomenclature for viral clades that form the species varicella-zoster virus: summary of VZV Nomenclature Meeting 2008, Barts and the London School of Medicine and Dentistry, 24-25 July 2008[J]. J Gen Virol, 2010, 91(Pt 4): 821-828. DOI: 10.1099/vir.0.017814-0.
- [8] Jensen NJ, Rivaller P, Tseng HF, et al. Revisiting the genotyping scheme for varicella-zoster viruses based on whole-genome comparisons[J]. J Gen Virol, 2017, 98(6): 1434-1438. DOI:10.1099/jgv.0.000772.
- [9] Pontremoli C, Forni D, Clerici M, et al. Possible European origin of circulating varicella zoster virus strains[J]. J Infect Dis, 2020, 221(8):1286-1294. DOI:10.1093/infdis/jiz227.
- [10] 吴秋华,王爽,从宪玲,等. 2014 年吉林省水痘-带状疱疹病毒基因特征分析[J]. 中华预防医学杂志, 2016, 50(8):738-742. DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2016.08.013. Wu QH, Wang S, Cong XL, et al. Genetic characterization of varicella zoster virus in Jilin province in 2014, China[J]. Chin J Prev Med, 2016, 50(8):738-742. DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2016.08.013.
- [11] 杨励,甘霖,陈敬贤,等. 西安地区 44 例水痘-带状疱疹病毒临床分离株基因特征分析[J]. 中国皮肤性病杂志, 2015, 29(7): 667-669, 703. DOI: 10.13735/j. cjdv. 1001-7089. 201412055. Yang L, Gan L, Chen JX, et al. Genotyping of 44 clinical varicella-zoster virus collected in Xi'an[J]. Chin J Derm Venereol, 2015, 29(7): 667-669, 703. DOI: 10.13735/j. cjdv.1001-7089.201412055.
- [12] 郭宏,郝爽,扈瑞平,等. 2019 年辽宁省水痘-带状疱疹病毒基因特征分析[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2021, 35(1): 57-61. DOI: 10.3760/cma. j. cn112866-20201116-00288. Guo H, Hao S, Hu RP, et al. Genetic characterization of varicella-zoster virus in Liaoning province in 2019, China [J]. Chin J Exp Clin Virol, 2021, 35(1):57-61. DOI:10.3760/cma.j.cn112866-20201116-00288.
- [13] Xu ST, Chen MK, Zheng HY, et al. Nationwide distribution of varicella-zoster virus clades in China[J]. BMC Infect Dis, 2016, 16(1):542. DOI:10.1186/s12879-016-1863-x.
- [14] 师伟,刘建红,梁红萍. 2013 年太原市迎泽区水痘-带状疱疹病毒基因型分析[J]. 实用医技杂志, 2015, (4):352-354. DOI:CNKI:SUN:SYJ.0.2015-04-003.
- [15] Shi W, Liu JH, Liang HP. Genotype analysis of varicella-zoster virus in Yingze of Taiyuan in 2013[J]. J Pract Med Tech, 2015, (4): 352-354. DOI: CNKI: SUN: SYJ.0.2015-04-003.
- [15] 李媛,杨贵清,张振,等. 2013-2017 年深圳市水痘暴发疫情分析及水痘-带状疱疹病毒基因型分型研究[J]. 实用预防医学, 2019, 26(6):649-652. DOI:10.3969/j.issn.1006-3110.2019.06.003. Li Y, Yang GQ, Zhang Z, et al. Epidemic analysis of varicella outbreaks and genotype of varicella-zoster virus in Shenzhen City, 2013-2017[J]. Pract Prev Med, 2019, 26(6): 649-652. DOI: 10.3969/j. issn. 1006-3110.2019.06.003.