

青岛地区 2007—2009 年人肠道病毒 71 型的分子流行病学研究

刘晓琳 汪照国 杨婷婷 弋英

【摘要】 目的 了解 2007—2009 年青岛地区引起手足口病的人肠道病毒 71(EV71)型 VP1 基因编码区(CDS)分子流行病学特征。方法 采用荧光定量 PCR 对咽拭子标本进行总肠道病毒(EV)、柯萨奇病毒 A16(CA16)和 EV71 检测。选取部分 EV71 检测阳性的标本进行 VP1 基因 CDS 序列的扩增及测序,对所获得的序列进行进化树分析。结果 青岛市 2007—2009 年的 51 株 EV71 病毒核苷酸和氨基酸的差异性分别为 5.3%和 1.7%,所有病毒均属于 C4 亚型中的 C4a 簇。2008 和 2009 年的基因进化树均有多个分支产生,但每年都有一个主要分支(即优势株)。2008 年的优势株与 2007 年山东省临沂市优势株高度同源,2008 年的次优势株和 2009 年的优势株同与 2008 年安徽省阜阳市优势株高度同源。2007 年的 2 株 EV71 与 2007 年山东省临沂市流行株高度同源。结论 青岛市 2008 和 2009 年的 EV71 均有多个传播链存在,2008 年的主传播链至 2009 年变为次传播链,但 2008 年的次传播链至 2009 年发展为传播链。

【关键词】 手足口病;人肠道病毒 71 型;VP1 基因;分子流行病学

Molecular epidemiology of human enterovirus 71 strains in Qingdao region, Shandong province, 2007–2009 LIU Xiao-lin, WANG Zhao-guo, YANG Ting-ting, Yi Ying. Laboratory of Pathogenic Microorganism, Qingdao Municipal Center for Disease Control and Prevention, Qingdao 266033, China
Corresponding author: WANG Zhao-guo, Email: wzg-003@163.com

This work was supported by a grant from the Science and Technology Bureau of Qingdao City (No. 08–2–1–nsh).

【Abstract】 Objective To study the molecular epidemiology of human enterovirus 71 (EV71) isolated from patients with hand-foot-mouth disease (HFMD) in Qingdao region between 2007 and 2009. Methods Throat swabs of HFMD were detected for total enterovirus (EV), EV71 and CA16 by fluorescence reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The VP1 region was amplified from positive EV71 specimens and 51 nucleotide sequences of VP1 gene were successfully sequenced. EV71 genotypes were characterized by phylogenetic analysis. Results 51 Qingdao EV71 strains identified between 2007 and 2009 belonged to C4a cluster of subgenotype C4 and 5.3% nucleotide divergence and 1.7% amino acid divergence were found among them. The strains in 2008 and 2009 were respectively divided into several lineages on phylogenetic trees but there was a main lineage (namely prominent strain) every year. The Qingdao prominent strains identified in 2008 had high identities with the Linyi prominent strains in 2007. The Qingdao prominent strains in 2009 and the secondary prominent strains in 2008 had high identities with the Fuyang prominent strains in 2008. Two Qingdao strains in 2007 had high identities with the Linyi popular strains in 2007. Conclusion Data showed that several EV71 transmission chains were co-circulating in Qingdao between 2008 and 2009. The main transmission chain in 2008 became the minor one but the minor transmission chain in 2008 was transferred into the main transmission chain in 2009.

【Key words】 Hand-foot-mouth disease; Enterovirus 71; VP1 gene; Molecular epidemiology

手足口病(HFMD)是婴幼儿常见的肠道传染病,多表现为发热、口腔溃疡及特征性出疹。引起 HFMD 的主要病原体是人肠道病毒 71(EV71)和柯萨奇病毒 A16(CA16)^[1-4]。自 2007 年山东省临沂市暴发 HFMD 以后,青岛地区开始加强对 HFMD 的监测,本研究对 2007—2009 年青岛地区 EV71 病毒株的 VP1 基因进行研究。

对象与方法

1. 标本的采集:自哨点医院采集临床诊断的 HFMD 病例(包括门诊轻症病例和住院重症病例,其中:2007 年轻症病例 145 例;2008 年轻症病例 706 例,重症病例 21 例;2009 年轻症病例 1057 例,重症病例 202 例,2007—2009 年均无死亡病例)的咽拭子标本。

2. 病毒核酸的提取:采用瑞士 Roche 公司生产的高纯度 RNA 提取试剂盒,按照说明书从 200 μl 咽拭子采样液中提取病毒核酸,提取的核酸溶解于

50 μ l 无核酸酶的水中,于-80 $^{\circ}$ C中保存。

3. 荧光定量PCR:对咽拭子标本中总肠道病毒(EV)、CA16和EV71进行检测,采用中国疾病预防控制中心研发、北京中吉预医科技发展有限公司生产的2种RT-PCR荧光探针法核酸检测试剂盒,1种检测EV,另1种检测CA16和EV71。首先进行EV的检测,阳性标本再进行CA16和EV71的检测,按试剂盒操作说明书进行。

4. EV71全长VP1基因RT-PCR扩增:选取荧光定量PCR检测为EV71阳性的标本,采用Access RT-PCR System试剂盒(美国Promega公司)对VP1基因全长序列进行扩增,引物序列⁵:FP:5'-GCA GCC CAA AAG AAC TTC AC-3',RP:5'-AAG TCG CGA GAG CTG TCT TC-3'。反应条件:42 $^{\circ}$ C 45 min,94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 45 s,50 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 80 s,35个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR产物经2%凝胶电泳后进行分析,阳性PCR产物送南京金瑞思生物公司测序。

5. 序列分析:采用Sequencher软件进行核苷酸序列的校正整理,用BioEdit软件进行核苷酸和氨基酸同源性分析,通过GenBank中的Blast比对进行基因型别鉴定。采用Mega 4.0软件中的邻接(NJ)法构建进化树。

结 果

1. EV71 VP1基因序列测定:通过对EV71阳性标本VP1基因全长序列的扩增及测序,共获得51株病毒VP1序列。其中包括2007年轻症病例2株,2008年轻症病例16株、重症病例6株,2009年轻症病例15株、重症病例12株。测序结果通过Blast比对后发现,所有序列与EV71 VP1基因高度同源,与荧光定量PCR检测结果一致,并与EV71病毒C4亚型高度同源。

2. EV71 VP1基因亲缘性关系分析:将2008和2009年EV71病毒株的VP1序列分别进行进化树分析,2008年进化树(图略)可分为4个分支,4个分支间的核苷酸和氨基酸的差异分别为5.3%和1.4%。73%(16/22)病毒株属于分支1。结合Blast结果分析,分支1中的病毒株与2007年山东省临沂市优势株的同源性很高^[5],与其代表株523-10T/SD/CHN/2007(GenBank: EV753400)的同源性为97.9%~99.4%。其中4株(H611、H936、H215和HS1147)集中形成1个簇,簇内同源性为98.8%~99.8%。这个簇与2008年安徽省阜阳市优势株的同源性更高,与其代表株Fuyang/17.08/17(GenBank: GQ121438)的同源性达99.1%~99.8%。分支2中

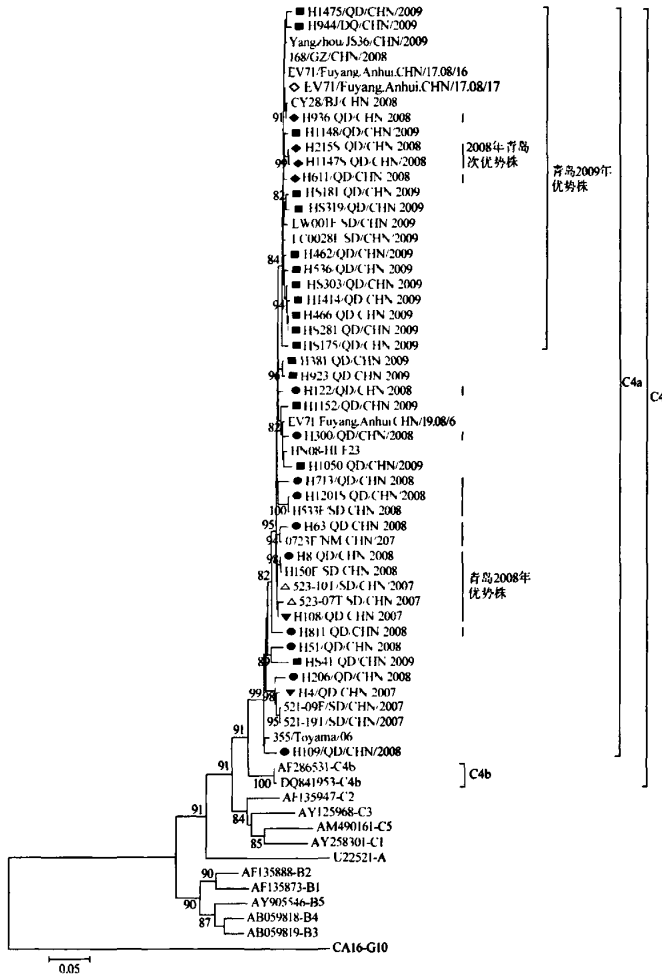
的病毒株与1株深圳株(GenBank: FJ607337)高度同源。分支3(H109)与2006—2007年日本富山流行株高度同源。分支4与2007年山东省临沂市流行株分支2(代表株521-09F/SD/2007)高度同源。

2009年EV71病毒株的进化树(图略)可分为4个分支,85%(22/26)病毒株属于分支1。4个分支间核苷酸和氨基酸的差异性分别为2.5%和0.7%。结合Blast结果进行分析,2009年分支1作为优势株与2008年安徽省阜阳市优势株高度同源,与其代表株Fuyang/17.08/17(GenBank: GQ121438)的同源性达96.2%~99.6%。分支2与2007年山东省临沂市优势株代表株523-10T/SD/CHN/2007高度同源。分支3与2008年另一安徽省阜阳市病毒株Fuyang/19.08/6(非优势株)高度同源。分支4与2007年山东省临沂市病毒株分支2(非优势株)的同源性很高。

2007—2009年青岛市51株EV71病毒核苷酸和氨基酸的差异性分别为5.3%和1.7%,选取其中的35株EV71病毒的代表株及GenBank上已公布序列的28株EV71代表株进行进化树分析(图1)。所有亚型的代表株均按照其型别分布在A、B和C3个型别当中。青岛市2007—2009年所有EV71病毒株皆属于C4亚型。C4亚型又可分为C4a和C4b簇^{5]}。青岛市2007—2009年病毒株均属于C4a簇。2008年、2009年的病毒株相对比较集中,基本按照年份进行分布。但2008年的4株病毒(H611、H936、H215和HS1147)分布在2009年的优势病毒株中,与2009年的优势病毒株及2008年安徽省阜阳优势株(代表株Fuyang/17.08/17)高度同源。即2008年的这簇病毒在2009年成为优势病毒株,且分布相对独立,即2008和2009年各有自己的优势病毒株。2007年的2株病毒,H108与2007年临沂市优势株高度同源,H4与2007年临沂市非流行株高度同源。2007—2009年总树图中病毒株的分布与2008和2009年各自进化树中病毒株的分布一致。

讨 论

VP1蛋白是EV71主要的病毒中和决定因子,具有与病毒血清型对应的遗传多样性,因此VP1基因是EV71基因分型和遗传进化分析的重要研究对象^[6,7]。Brown等^[8]将EV71分为A、B和C3个基因型。EV71的原型株——BrCr株是A基因型中的唯一代表。目前,B和C基因型均可分为5个基因亚型B1~B5和C1~C5。C4基因亚型自1998年首次于深圳市发现以来一直在中国持续流行,是中国大陆



注：▼、●和■分别表示 2007、2008 和 2009 年的 EV71 病毒株；◆2008 年的 4 株病毒 (H936、H215S、H1147S 和 H611)；△和◇分别表示 2007 年山东省临沂市优势株和 2008 年安徽省阜阳市优势株；未标注的为 GenBank 上的其他 28 株 EV71；进化树分支可靠性评估数值以百分数标注于节点处

图 1 EV71 分离株 VP1 基因进化树

EV71 流行的优势基因亚型。C4 基因亚型又可分为 C4a 和 C4b 2 个基因簇^[5]。导致 2007 年临沂市大规模 HFMD 疫情的主要病原是 EV71 的 C4a 簇，其流行株可分为至少 3 个分支，分支 1 是优势株，包括了绝大多数病毒株^[5]。2008 年安徽省阜阳市 HFMD 疫情的主要病原同样是 EV71 病毒的 C4a 簇^[9]。

青岛地区 2007—2009 年的流行株通过核酸同源性及其基因亲缘性关系分析，所有病毒株均属于 C4 基因亚型的 C4a 簇。2008 和 2009 年的基因进化树均可划分出 4 个分支，提示这两年 EV71 病毒均有多个传播链同时存在。在 2008—2009 年 EV71 病毒 VP1 基因的基因进化树中，每年均有一个分支包含了大多数的病毒株，这些病毒株也就是当年的 EV71 优势病毒株。2008 年的优势株 (分支 1) 与 2007 年临沂市优势株高度同源，2008 年的次优势株和 2009 年

的优势株 (分支 1) 同与 2008 年阜阳市优势株高度同源。分析青岛地区 2007—2009 年的 EV71 传播链可以发现，2008 年的主传播链 (与 2007 年临沂优势株高度同源) 至 2009 年已变为次传播链；但 2008 年的次传播链至 2009 年已发展为主传播链 (与 2008 年阜阳市优势株高度同源)。根据 GenBank 已登录的中国大陆地区 EV71 的 VP1 基因序列，2008 年全国很多省 (市) EV71 VP1 基因与 2007 年临沂市优势株高度同源，2009 年全国很多地区 EV71 VP1 基因与 2008 年阜阳市优势株高度同源，这也提示与 2007 年临沂市优势株和 2008 年阜阳市优势株高度同源的病毒株在全国各地引起了流行。山东省同年的地方株之间也保持着高度的同源性，说明 EV71 在山东省各地的分子流行病学状况很相似。2007 年的 2 株 EV71 病毒 VP1 序列与 2007 年临沂市流行株高度同源，说明 2007 年临沂市流行株同时在青岛市传播。另外，通过对 2008 和 2009 年轻症病例和重症病例之间的 EV71 分离株 VP1 基因的核苷酸和氨基酸序列进行比较，未发现轻重症病例间特征性差异，这与以往的研究较为相似^[5]。轻重症病例在基因进化树上分布均匀，无聚集性分布。

[本研究得到青岛市科技局项目 (08-2-1-1-nsh) 的支持]

参 考 文 献

[1] Chang LY, Lin TY, Huang YC, et al. Comparison of enterovirus 71 and coxsackievirus A16 clinical illness during the Taiwan enterovirus epidemic, 1998. *J Pediatr Infect Dis*, 1999, 18(2):1092-1096.

[2] Yan JJ, Su JJ, Chen PF, et al. Complete genome analysis of enterovirus 71 isolated from an outbreak in Taiwan and rapid identification enterovirus 71 and coxsackievirus A16 by RT-PCR. *J Med Virol*, 2001, 65(2):331-339.

[3] McMinn PC. An overview of the evolution of enterovirus 71 and its clinical and public significance. *FEMS Microbiol Rev*, 2002, 26(1):91-107.

[4] Singh S, Poh CL, Chow VT. Complete sequence analyses of enterovirus 71 strains from fatal and non-fatal cases of the hand, foot and mouth disease outbreak in Singapore (2000). *Microbiol Immunol*, 2002, 46(11):801-808.

[5] Zhang Y, Tan XJ, Wang HY, et al. An outbreak of hand, foot, and mouth disease associated with subgenotype C4 of human enterovirus 71 in Shandong, China. *J Clin Microbiol*, 2009, 44(4):262-267.

[6] Obeste 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.

[7] Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:742-768.

[8] Brown BA, Oberste MS, Alexander JP, et al. Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998. *J Virol*, 1999, 73(12):9969-9975.

[9] Zhang Y, Zhu Z, Yang W, et al. An emerging recombinant human enterovirus 71 responsible for the 2008 outbreak of hand, foot and mouth disease in Fuyang city of China. *Virology*, 2010, 7:94-102.

(收稿日期: 2010-12-07)

(本文编辑: 王玉立)