

• 调查报告 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.35.026

## 洛阳市非 EV71、非 CA16 肠道病毒中优势毒株状况分析

杨晓华, 李克伟, 张广武, 仝志琴, 刘笑洁, 李莹

(河南省洛阳市疾病预防控制中心/河南省洛阳市检验中心病原微生物室 471000)

**摘要:**目的 了解洛阳市引起手足口病的普通肠道病毒的构成情况,警惕比例较高毒株发展为新的优势毒株,为洛阳市的手足口病防控提供科学依据。**方法** 采用实时荧光 PCR(RT-PCR)对洛阳市手足口病的送检粪便标本进行核酸鉴定,随机选取 9 例普通肠道病毒阳性,而柯萨奇病毒 A16 型(CA16)和新肠道病毒 71 型(EV71)阴性的标本,进行 5'UTR 测序,确定毒株的亚型。利用 CA6 的特异性引物,选取 75 例普通肠道病毒阳性标本(CA16 和 EV71 阴性),用 RT-PCR 方法鉴定 CA6 的阳性数量,分析 CA6 的构成比。**结果** 9 个普通肠道病毒 5'UTR 测序结果进行 BLAST 初筛,结果显示 CA6 为 5 株,在普通的肠道病毒中为优势毒株;75 例普通肠道病毒中,共检测出 CA6 20 例。CA6 在普通肠道病毒中的比例为 29.76%(25/84);25 例 CA6 中,男 13 例,女 12 例;引发重症的病例为 2 例;城市地区 5 例,乡村 20 例。**结论** 洛阳市引起手足口病的普通肠道病毒的构成较为复杂,在引起手足口病的普通肠道病毒中 CA6 病毒所占比例较高,对此应引起重视。

**关键词:**手足口病;普通肠道病毒属;CA6

中图分类号:R725.1

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)35-4784-03

### Status analysis of prevailing strains of non-EV71 and non-CA16 enterovirus

Yang Xiaohua, Li Kewei, Zhang Guangwu, Gong Zhiqin, Liu Xiaojie, Li Ying

(Center for Disease Control and Prevention/Pathogenic Microorganism Laboratory of Inspection Center of Luoyang City, Luoyang, Henan 471000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the constituents of enterovirus which can cause hand-foot-and-mouth disease(HFMD), and prevent against the development of new prevailing strains and provide basis for prevention and control of HFMD in Luoyang city. **Methods** Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to identify the type of RNA of stool specimen of HFMD cases in Luoyang, to distinguish the subtype of strain, 9 enterovirus-positive specimens which coxsackievirus A16(CA16)- and enterovirus 71(EV71)-negative were selected randomly for 5'UTR sequencing. strain-specific primers were used to detect positive samples in 75 CA16- and EV71-negative but other enterovirus-positive specimens by using real time RT-PCR. Composition characteristics of CA6 were further analyzed. **Results** Primary screening was conducted with the results of 5'UTR sequencing of 9 common enterovirus-positive specimens and there were 5 CA6-positive, which were prevailing strains; there were 20 CA6-positive of 75 common enterovirus-positive specimens, the proportion of CA6-positive in enterovirus-positive specimens was 29.76%(25/84). Thirteen samples were collected from male and 12 from female, 2 cases resulted in severe symptoms, 5 from city and 20 from country. **Conclusion** The composition of common enterovirus which results in HFMD was complex and the proportion of CA6 was higher, which should be pay more attention.

**Key words:** hand-foot-and-mouth disease; common enterovirus; CA6

目前,对手足口病进行病原学检测已经是疾病控制机构防控手足口病的一项重要举措。多数省份的手足口监测方案中都把手足口病病原分布特征和优势病原体变化趋势作为一项监测目的<sup>[1-2]</sup>。由于引发手足口病的病原谱较为复杂,目前多地都是重点关注新肠道病毒 71 型(EV71)和柯萨奇病毒 A16 型(CA16)的情况变化<sup>[3-5]</sup>,对于其他的人肠道病毒的研究分析不是很多。国内外也有 A10、A5、A6 等肠道病毒的报道<sup>[6-7]</sup>,任倩等<sup>[3]</sup>对手足口病 CA10 和 CA6 型进行了分子鉴定和 VP1 区 3'端的序列分析,杨赫等<sup>[8]</sup>对山东地方株型别 CA 组 2、6、8、12 型进行了鉴定并对其基因特征进行分析。但是对整个引发手足口病非 EV71、非 CA16 的其他肠道病毒病原谱构成研究则相对较少。自 2009 年以来,洛阳市手足口病病原结构变化趋势明显,手足口病 EV71 所占比例显著降低,CA16 比例稳

定上升,其他肠道病毒的构成比例逐年快速增长,目前其他肠道病毒所占构成比例已经接近 50%。在这种背景下,有必要对洛阳市其他肠道病毒引起的手足口病的病原谱构成有一个更清晰的认识,并着力研究其中的优势毒株。本研究选取非 EV71 和非 CA16 肠道病毒标本 9 份,进行 5'UTR 核酸测序,用 BLAST 分型后,发现优势株为 CA6,随后扩大标本量,随机选取肠道病毒阳性而非 EV71、非 CA16 的标本 75 份,检测 CA6 的数量,统计 CA6 患者的流行病学状况。

### 1 材料方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 标本来源** 按照洛阳市手足口病防控要求,每月要求洛阳市下辖 9 县 6 区的定点医院采集一定量手足口病粪便标本。

表 1 BLAST 初筛结果用系统进化树对比复合结果

标本编号	病例号								
	3	5	6	10	15	17	21	28	29
BLAST 结果	A6	A6	B4/A9	A6	A5	A6	A2/A4	A6	AK26/13
进化树结果	A6	A6	B4	A6	A5	A6	A2/A4	A6	AK26/13
复核结果	A6	A6	B4	A6	A5	A6	A2/A4	A6	AK26/13

**1.1.2 标本采集** 由医院医务工作人员按照无菌要求采集手足口病患者新鲜粪便 5~10 g,置于洛阳市疾病预防控制中心统一发放的无菌粪便保存盒中,-20℃冷冻保存。由县区疾病预防控制中心专业人员收取粪便标本,并 4℃保存,按生物安全运输要求迅速送入洛阳市疾病预防控制中心病原微生物实验室,并置于-80℃冷冻保存。

**1.1.3 病例资料收集** 县区疾病预防控制中心专业人员对患者进行流行病学调查,按照要求填写病原微生物实验室设计的送样单,病原微生物实验工作人员用 Excel2007 进行数据整理。

**1.1.4 主要试剂和仪器设备** 核酸提取试剂:病毒核酸提取试剂盒(西安天龙科技股份有限公司)。核酸检测试剂盒:普通肠道病毒核酸检测试剂盒(PE)、CA16 核酸检测试剂盒、EV71 核酸检测试剂盒、CA6 核酸检测试剂盒(上海之江生物科技有限公司)。主要实验仪器:Bio-RadIQ™ 5、Sigma3-18K 低温高速离心机、天龙核酸自动提取仪。

**1.2 方法**

**1.2.1 标本前处理** 取 15 mL 离心管,标记标本编号;各离心管中加入 9 mL PBS,1.5 g 细玻璃珠,1 mL 三氯甲烷;在生物安全柜内取粪便标本约 2 g,加入到标记好的离心管中,剩余标本-20℃保存;用振荡器充分震荡 20 min;将震荡过的离心管放于离心机中,8 000 r/min 离心 20 min;离心后取上清液 200 μL,利用天龙提取试剂盒按照核酸自动仪要求提取病毒 RNA 并以此为模版进行实时荧光 PCR(RT-PCR)扩增。

**1.2.2 RT-PCR 反应条件及扩增体系** PCR 反应条件:45℃ 10 min;95℃ 15 min;95℃ 15 s,60℃ 60 s,循环 40 次;单点荧光检测在 60℃,反应体系为 25 μL,检测通道为 FAM 通道。按照试剂盒说明书要求,进行体系构建。

**1.2.3 5'UTR 核酸测序** 测序委托上海之江生物科技有限公司代为完成。

**1.3 统计学处理** 5'UTR 测序序列在 NCBI 中 BLAST 分型初筛,鉴定型别。然后用 MEGA 5.0 建立系统进化树辅助初筛结果进行复核,进而确定分型。

**2 结 果**

**2.1 9 份普通肠道病毒标本 5'UTR 测序情况** 对随机选取的 9 份普通肠道病毒标本进行 5'UTR 核酸测序,把所得到的序列在 NCBI 中 BLAST 初筛鉴定型别,然后建立系统进化树,进行结果复合。见表 1、图 1。

**2.2 实验室诊断 CA6 的情况** 在普通肠道病毒中扩大标本数量,随机选取 75 例,用 CA6 专用引物鉴定 CA6 的构成情况,共检测出 CA6 阳性标本 20 例。结合测序普通肠道病毒标本中 5 例 CA6 标本,构成比为 29.76%。CA6 实验室确诊病例共 25 例,其中男 13 例,女 12 例,男女性别比为 1.08:1.00;发病年龄集中在 4 岁以下,其中最小 6 个月,最大 3 岁 10 个

月;患者类型以散居儿童为主,有 20 例,入托儿童 5 例;重症患者 2 例,其他为普通患者,见表 2。

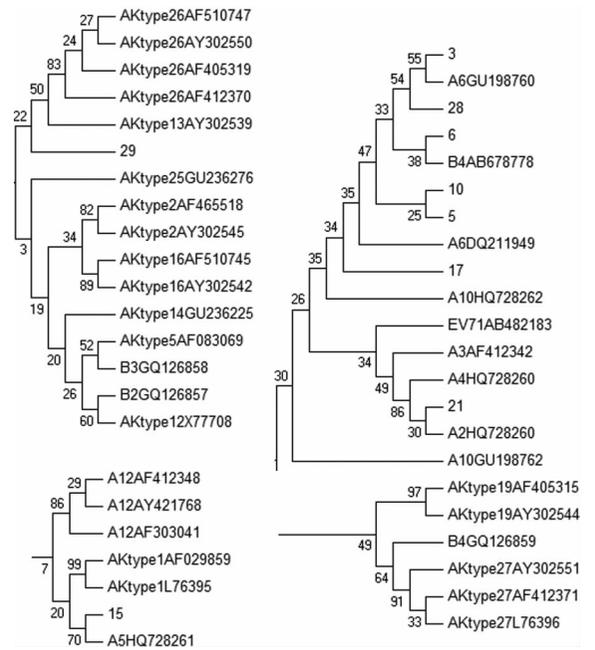


图 1 在 MEGA5.0 中构建系统进化树截图

表 2 实验室诊断 CA6 的社会人口学特征

项目	例数(n)	构成比(%)
性别		
男	13	52
女	12	48
年龄(岁)		
≤1	5	20
<1~2	9	36
<2~3	6	30
<3~4	5	20
职业 <sup>a</sup>		
散居	20	80
入托	5	20
是否重症		
是	2	8
不是	23	92
居住地		
城区	5	20
乡村	20	80

<sup>a</sup>:职业分布按照“中国疾病预防控制中心信息系统”中规定的职业分类方法。

### 3 讨 论

手足口病的病原谱构成较为复杂<sup>[9-10]</sup>,其中 EV71 和 CA16 为这些年引发手足口病的优势毒株<sup>[5]</sup>。近 2 年多地方其他肠道病毒的构成比例呈上升趋势<sup>[11-12]</sup>,因其病原构成较为复杂,无报道对此做过系统的研究。本研究先从普通肠道病毒中选取一定的标本进行 5'UTR 核酸测序,对毒株所在型别进行鉴定,发现洛阳本地其他肠道病毒中的优势株为 CA6。为了减少小样本随机抽样的误差,进而又扩大随机抽样的样本量,进一步证明了 CA6 在洛阳本地其他肠道病毒中所占比例较高,为 29.76%。对于 CA6,国内外近几年有所报道<sup>[13-14]</sup>。有研究报道 CA6 引发了美国的重症手足口病,自 2011 年 11 月至 2012 年 2 月,预防疾病控制中心人员与 63 名手足口病或伴发热及罕见皮疹且需辅助诊断的人联系。这些病例发生于阿拉巴马州、加利福尼亚州、康涅狄格州和内华达州。3/4 的临床样本经检测显示 CA6 阳性,其余均为肠道病毒阴性。这与洛阳本地有 CA6 导致的重症情况有所不同,洛阳市经实验室诊断的重症比例较低,25 例实验室确诊病例中仅有 2 例重症。另一研究报道,对 CA6 感染引起非典型手足口病中广泛皮损的考虑可能有助于临床医师的诊断和治疗<sup>[15]</sup>,研究者试图描述与 CA6 感染相关的非典型手足口病的临床特征及其有诊断价值的实验室鉴定。由于本研究没有获得相关的临床资料,没能对 CA6 感染引起的手足口病进行临床特征分析。有研究显示 2012 年和 2013 年其他肠道病毒占整个手足口发病的比例分别为 43.97%、46.26%<sup>[16]</sup>。其中 2013 年 CA6 在其他肠道病毒中的比例为 29.76%,CA6 的感染发病比例在整个手足口病发病比例在 13.00%左右,稍低于洛阳本地 CA16 的发病水平。但不能排除洛阳本地 CA6 的趋势不会朝着较高发病水平发展,提示应更加关注该病原的流行特征和临床特征。国内也有研究对 CA6 的全基因序列或是 VP13'端序列分析<sup>[17]</sup>,本研究没有针对 CA6 进行全基因测序或是 VP1 区测序分析,因为本研究设计的是先发现优势毒株,所以只是进行了 5'UTR 的测序,没能在核酸水平做同源性等分析。此外,本研究在调查洛阳本地的其他肠道病毒病原谱的过程中,选取的标本量不大,不足以全面展现洛阳本地引发手足口病的所有肠道病毒的发病情况,但对找出优势毒株并没有太大影响。

#### 参考文献:

- [1] 王连森,毕振强,房玉英,等. 2008 年山东省手足口病流行病学分析[J]. 山东医药,2009,49(19):45-47.
- [2] 韩剑峰,安康,刘洪,等. 河南新乡 2008 年手足口病病原分离鉴定及病毒基因组特征[J]. 军事医学科学院院刊,2008,32(6):523-526.
- [3] 任倩,马丽霞,张乐海. 肠道病毒 71 致病机制的研究进展[J]. 国际流行病学传染病学杂志,2011,38(3):197-200.
- [4] 杨智宏,朱启镛,李秀珠,等. 2002 年上海儿童手足口病病

例中肠道病毒 71 型和柯萨奇病毒 A 组 16 型的调查[J]. 中华儿科杂志,2005,43(9):648-652.

- [5] Thao NT,Ngoc NT,Tú PV,et al. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous identification of human enterovirus 71 and coxsackievirus A16[J]. J Virol Methods,2010,170(1/2):134-139.
- [6] Blomqvist S,Klemola P,Kajjalainen S,et al. Co-circulation of coxsackieviruses A6 and A10 in hand,foot and mouth disease outbreak in Finland[J]. J Clin Virol,2010,48(1):49-54.
- [7] Hu YF,Yang F,Du J,et al. Complete genome analysis of coxsackievirus A2,A4,A5,and A10 strains isolated from hand,foot,and mouth disease patients in China revealing frequent recombination of human enterovirus A[J]. J Clin Microbiol,2011,49(7):2426-2434.
- [8] 杨赫,陶泽新,王海岩,等. 手足口病患者柯萨奇病毒 A10 型山东地方株 VP1 区基因特征分析[J]. 中华传染病杂志,2010,28(7):385-389.
- [9] 李静. 2010 年南京市手足口病流行病学和病原学特征分析[D]. 兰州:兰州大学,2012.
- [10] 王琦,王子军. 2008 年中国手足口病流行特征分析[J]. 疾病监测,2010,25(3):181-184.
- [11] 朱俊萍,徐子刚,陈辉,等. 2007 年北京地区儿童手足口病病原的初步筛查[J]. 病毒学报,2009(1):23-28.
- [12] 李洪杰,庞琳,王琦,等. 2010 年度北京地区儿童手足口病住院患者病原学分布分析[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版,2012,6(1):10-14.
- [13] Fujimoto T,Iizuka S,Enomoto M,et al. Hand,foot,and mouth disease caused by coxsackievirus A6,Japan,2011 [J]. Emerg Infect Dis,2012,18(2):337-339.
- [14] Osterback R,Vuorinen T,Linna M,et al. Coxsackievirus a6 and hand,foot,and mouth disease,Finland[J]. Emerg Infect Dis,2009,15(9):1485-1488.
- [15] Lott JP,Liu K,Landry ML,et al. Atypical hand-foot-and-mouth disease associated with coxsackievirus A6 infection [J]. J Am Acad Dermatol,2013,69(5):736-741.
- [16] 张广武,李克伟,杨晓华,等. 洛阳市 2009~2013 年手足口病病原学分析[J]. 现代医药卫生,2014,30(19):2933-2935.
- [17] 任倩,张乐海,马丽霞,等. 手足口病柯萨奇病毒 A10 和 A6 型的分子鉴定及其 VP1 区 3'端序列分析[J]. 中国病原生物学杂志,2011(8):561-564,570.

(收稿日期:2014-05-05 修回日期:2014-07-25)

欢迎投稿
欢迎订阅