

论著 · 临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.17.012

贵阳地区 2013 年手足口病非 EV71、非 CVA16 型肠道病毒的检测分析*

杨兴林¹,梁跃东¹,洪章萍¹,熊金凤¹,王云芬¹,黄 海²

(1. 贵州省贵阳市第五人民医院检验科 550004;2. 贵阳医学院检验系,贵阳 550004)

[摘要] **目的** 了解贵阳地区引起手足口病(HFMD)的非肠道病毒 71 型(EV71)、非柯萨奇病毒 A(CVA)16 型肠道病毒的病原构成及优势型别,为贵阳地区 HFMD 防治工作提供依据。**方法** 收集 2013 年 4~6 月检测为非 EV71、非 CVA16 型肠道病毒的 HFMD 患者肛拭子标本共 107 例。提取病毒核酸,用巢式 RT-PCR 法扩增病毒 VP4 区序列,对 PCR 阳性扩增产物进行测序,通过与 GenBank 收录的序列 BLAST 比对确定病毒型别;并对优势型别进行序列和进化分析。**结果** 107 例标本中共有 100 例标本巢式 RT-PCR 检测为阳性(93%),其中 100 例 PCR 产物测序成功,经 BLAST 比对后,100 例标本病毒型别均得到确定:CVA6 为 46 例,CVA10 为 30 例,CVA5 为 10 例,CVA2 为 6 例,CVA3 和 CVA4 各 2 例,CVB2 和 ECHO16 各 2 例。CVA6 在型别确定的非 EV71、非 CVA16 型肠道病毒中占 42.99%,为优势肠道病毒型别。**结论** 贵阳地区引起 HFMD 的肠道病毒型别多样,CVA6 为非 EV71、非 CVA16 型肠道病毒中的优势型别。

[关键词] 手足口病;肠道病毒;基因型

[中图分类号] R512.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)17-2343-03

Etiology study of hand,foot and mouth disease related non-EV71,non-CoxA16 enteroviruses in Guiyang area during 2013*
Yang Xinglin¹,Liang Yuedong¹,Hong Zhangping¹,Xiong Jinfeng¹,Wang Yunfen¹,Huang Hai²
(1. *Department of Clinical Laboratory,the Fifth People's Hospital of Guiyang,Guiyang,Guizhou 550004,China*;2. *Department of Medical Test,Guiyang Medical College,Guiyang,Guizhou 550004,China*)

[Abstract] **Objective** To explore the prevalence of non-EV71,non-CoxA16 enteroviruses strains of hand,foot and mouth disease(HFMD) in Guiyang,and analyze the genetic evolution of these non-EV71,non-CoxA16 enteroviruses strain,and to provide a basis for preventing and controlling (HFMD) in Guiyang. **Methods** A total of 107 HFMD specimens tested positive for enteroviruses and negative for EV71 and CoxA16 were collected from April to June of 2013. The virus RNA was extracted,and the VP4 sequence was amplified by nested RT-PCR. The PCR positive products were sequenced and the enteroviruses type was identified by sequence BLAST. The sequence and phylogenetic analysis of the predominant virus type was performed. **Results** 100 out of 107 (93%)specimens were tested positive by nested RT-PCR,among which 100 PCR products were successfully sequenced. And the types of the 100 enterovirus strains were identified by sequence BLAST:46 CoxA6,30 CoxA10,10 CoxA5,6 CoxA2,2 CoxA3 and 2 CoxA6,2 CoxB2 and 2 ECHO16. CoxA6 accounted for 42.99% in typed non-EV71,non-CoxA16 enteroviruses,and was the predominant type. **Conclusion** Hand,foot and mouth disease in Guiyang was caused with diverse enteroviruses,and CoxA6 was the predominant type among non-EV71,non-CoxA16 enteroviruses.

[Key words] hand,foot and mouth disease;enterovirus;genotype

手足口病(hand foot and mouth disease, HFMD)主要由肠道病毒(enteroviruses, EV)引起的出疹发热急性传染病,引起 HFMD 的病毒属于小 RNA 病毒科 EV 属,引发 HFMD 的有 20 多个血清型,包括柯萨奇病毒 A 组(CVAsckievirus A, CVA)的 2、4、5、7、9、10、16 型等,B 组(CVAsckievirus B, CVB)的 1、2、3、4、5 型等;EV71 型(human enterovirus 71, EV71);埃可病毒(echovirus, ECHO)等。其中以 EV71 及 CVA16 型较为常见。尽管非 EV71 型非 CVA16 型 EV 在 HFMD 病原谱中占一定比例,但目前对其构成和分子流行病学特征尚不清楚。HFMD 的疫情有传播快、易于流行的特点,但仍以轻型普通病例为主, HFMD 常规病原学检测主要用实时荧光定量 PCR(RT-PCR)对 EV 通用型、EV71 型和 CVA16 型核酸进行检测,对于引起 HFMD 的其他型别 EV 的病原构成其报道较少,不同地区病原构成其分布情况也有不同。

对 2011 年 4~10 月在贵阳市第五人民医院住院期间临床诊断为 HFMD 病例采集肛拭子标本 1 379 份运用 RT-PCR 检出率分别为 EV 通用型 46.99%,EV71 型 5.80%,EV71 和柯萨奇病毒 A16 型 2.18%^[1]。2012 年的检测数据同样以 EV 通用型,说明本地区其 HFMD 原主要以其他型 EV 为主。为进一步了解贵阳地区引起 HFMD 的非 EV71、非 CVA16 型 EV 的病原构成,笔者针对 EV VP4 区设计的一套分型引物进行 RT-PCR,通过测序和序列比对分析对 2013 年 4~6 月其他型 EV 进行型别鉴定,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2013 年 4 月 1 日至 6 月 30 日,在贵阳市第五人民医院(贵阳市 HFMD 的定点医院)感染科住院治疗的 HFMD 患儿 1 410 例,年龄 1 个月至 15 岁,其中,男 876 例、女 534 例。诊断标准参照均符合《诸福棠实用儿科学》HFMD

* **基金项目:**贵阳市科技局项目(筑科合[2013]103)9 号;贵阳市高层次创新型青年卫生人才项目(筑卫合[2013]创 2 号)。**作者简介:**杨兴林(1976—),主管检验技师,本科,主要从事分子生物研究。 **通讯作者,** Tel:18685021938;E-mail:ldy302@163.com。

诊断标准及《手足口病诊疗指南》(2010 年版)HFMD 的诊断标准。

1.2 方法

1.2.1 标本的采集 在患儿住院当天用专用采样棉签,从患儿肛门轻轻插入,适度用力弧形左右擦拭数下,拔出后,迅速将棉签放入病毒采样管(北京友康基业生物科技有限公司)中,采样管外表贴上带有惟一识别号码的标签。于 2 h 内送实验室,−20 ℃ 低温保存,2 d 内用 RT-PCR 检测 EV 通用型、EV71、CVA16 核酸,对 EV 通用型阳性、EV71 核酸阴性、CVA16 核酸阴性的标本−80 ℃ 低温保存。

1.2.2 EV 核酸 PCR 荧光检测 采用上海之江生物科技有限公司生产的 EV71、CVA16 RT-PCR 试剂和 EV 通用型 RT-PCR 试剂。EV 通用型包括柯萨奇病毒 A 组 4、5、6、7、9、10、16 型,柯萨奇病毒 B 组 2、5、13 型,埃可病毒和 EV71 型特异性核酸片段,EV71 型只含 EV71 的特异性 RNA 核酸片段,CVA16 型只对 16 型特异性 RNA 核酸片段,采用一步法 RT-PCR 技术结合荧光探针技术进行检测。病毒 RNA 的提取,采用磁珠柱提取法,按照上海之江生物科技有限公司 RNA 抽提试剂盒说明书操作。扩增反应体系和条件按照说明书操作和设置,在罗氏 Cobas² z 480 RT-PCR 仪上进行检测。荧光通道检测选择:选用 FAM 通道。结果判断:按照说明书,检测 Ct≤38,检测结果报告为阳性;检测 Ct 值在 38~40,重复检测 1 次,如果重复检测 Ct 值仍在 38~40,则判为阴性。EV 通用型试剂检测为阳性而 EV71 和 CVA16 特异性试剂检测为阴性的标本,则判为其他血清型 EV 阳性。对判为其他血清型肠道通用阳性的标本(非 16、71 型),用上海之江生物科技有限公司生产 CVA6 型核酸测定检测试剂、CVA10 型核酸测定检测试剂检测,对其筛查阴性样本进行如下方法测序鉴定。

1.2.3 其他血清型 EV 检测 采用 QIAGEN 公司的 QIAamp Viral RNA Mini Kit 试剂盒,按照说明书操作从 140 μL 肛拭子病毒保存液提取 RNA,提取的 RNA 最终溶解在 50 μL 无菌无核酸酶水中备用。参考 Ishiko 等^[2]针对 EV VP4 区设计的一套分型引物进行 RT-PCR。以 OL68-1/MD91 为引物,按 OneStep RT-PCR Kit(购自 QIAGEN 公司)说明书配制第 1 轮 PCR 体系,反应条件如下:50 ℃ 30 min;95 ℃ 15 min;94 ℃ 50 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,40 个循环;72 ℃ 10 min。取第 1 轮 PCR 产物 5 μL,以 OL68-1/EVP4 为引物,进行第 2 轮 PCR,反应条件为:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,40 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。其他血清型 EV 检测引物序列见表 1。得到的 PCR 产物经 1% TAE 琼脂糖凝胶电泳。PCR 阳性产物送北京诺赛基因公司切胶纯化回收后测序。将测序结果与 GenBank 中的 EV 核苷酸序列进行 BLAST 比对,确定病毒型别。

表 1 其他血清型 EV 检测引物序列

引物	序列(5'-3')
OL68-1	GGTAA(C/T)TTCCACCACCA (A/T/G/C)CC
EVP4	CTACTTTGGGTGTCCGTGTT
MD91	CCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAAT

2 结 果

2.1 临床 EV RT-PCR 检测结果 在 1 410 例临床标本中, EV 通用型的阳性为 702 例,检出率为 49.79%。其中 EV71

75 例,占 5.32%;CVA16 阳性 73 例,占 5.18%;EV71 与 CVA16 同时阳性 2 例,占 0.14%,其他血清型 EV552 例,占 39.15%,分布比例见表 2,检测 EV 部分标本荧光 RT-PCR 曲线见图 1。

表 2 1 410 例标本 PCR 荧光检测 EV 结果

EV 型	阳性数 (n)	检出率(%) (阳性/总阳性数)	构成比(%) (阳性/总阳性数)
EV71	75	5.32(75/1 410)	10.68(75/702)
CVA16	73	5.18(73/1 410)	10.40(73/702)
EV71+CVA16	2	0.14(2/1 410)	0.28(2/702)
其他 EV	552	39.15(552/1 410)	78.63(552/702)
合计	702	49.79(702/1 410)	100.00(702/702)

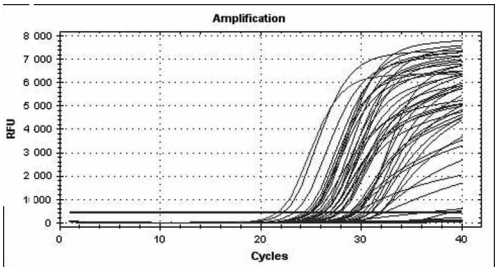


图 1 EV 通用型 RT-PCR 检测

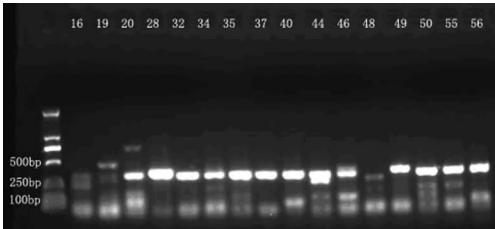


图 2 电泳图

表 3 107 例其他型 EV 检测结果

EV 型别	阳性数(n)	检出率(%) (阳性/标本总数,n/n)
CVA6	46	42.99(46/107)
CVA10	30	28.04(30/107)
CVA2	6	5.61(6/107)
CVA3	2	1.87(2/107)
CVA4	2	1.87(2/107)
CVA5	10	9.35(10/107)
CVB2	2	1.87(2/107)
ECHO16	2	1.87(2/107)
无扩增	7	6.54(7/107)
总计	107	100.00(107/107)

2.2 其他型 EV 的检测结果 在 RT-PCR 检测 EV 通用型阳性,而 EV71 和 CVA16 检测阴性的标本 1 410 例样本中,抽取 107 例样本,用 RT-PCR 法进行 CVA6、CVA10 检测,对 CVA6、CVA10 检测性样本用 EVVP4 区设计的一套分型引物进行 RT-PCR,PCR 产物测序结果与 GenBank EV 核苷酸序列经 BLAST 比对。107 例标本病毒型别得到结果:CVA10 型 30 例,CVA6 型 46 例,CVA5 型 10 例,CVA2 型 6 例,CVA3 型 2

例,CVA4 型 2 例,CVB2 型 2 例,ECHO16 型 2 例,另有 7 份 PCR 产物没有扩增,需进一步研究(表 3),部分条带电泳图,见图 2。

3 讨 论

HFMD 自 1957 年在新西兰首次报道后呈世界范围内流行,1958 年在加拿大分离并鉴定出 CVA16 为本病病原,1959 年将本病命名为“手足口病”,同时发现早期 HFMD 的主要病原以 CVA16 为主要病原。1974 年 Kennett 等^[3]对 1969~1974 年美国加利福尼亚地区 20 例脑膜炎或脑炎的患者进行病原学检测,首次从 1 例脑炎患儿(1969 年)的粪便标本中分离出病毒并鉴定为 EV71。1981 年 HFMD 首次在我国上海报道,以后相继在北京、河北、天津、福建、吉林、上东、湖北和广东等十几个省(市)发现此病。而且自 2008 年安徽阜阳出现大范围暴发和流行以来,引起了社会的广泛关注。2008 年 5 月,原国家卫生部将 HFMD 归为国家法定丙类传染病管理。

本研究运用 RT-PCT 对 2013 年贵阳地区的 1 410 例临床 HFMD 病例进行核酸检测,发现病原体主要为其他 EV 为主,其次为 EV71 和 CVA16。其检测数据与贵阳地区 2010 年报道数据 EV 通用型阳性率为 68.27%,CVA16 阳性率为 6.73%,EV71 阳性率为 13.46%^[1]。2011 年报道 EV 通用型核酸、EV71 和 CVA16 核酸检出率分别为 46.99%、5.80%、2.80%相比变化不大^[4]。通过近年来对本地区 EV 病原监测,说明本地区的 HFMD 病原体主要是非 EV71、非 CVA16 型其他型 EV 感染,对这些未分型 EV 进一步分型鉴定,将有助于全面了解本地区 HFMD 的病原谱,同时有助于分析是否存在非 EV71、非 CVA16 的其他优势病毒型别,为 HFMD 防控工作提供明确的病原学依据。在目前常规的病原学核酸检测除用 EV 通用引物进行检测外,只进行 EV71 和 CVA16 的分型检测。李静等^[5]报道南京 2010 年 EV71 阳性率为 44.35%,CVA16 阳性率为 11.29%,其他 EV 阳性率为 3.23%,胡海葵等^[6]报道上海 2009~2011 年检出 EV71 阳性率为 31.8%,CVA16 阳性率为 30.5%,其他 EV 阳性率为 10.0%。王彦霞等^[7]报道河南省 2008~2010 年普通病例中 EV71、CVA16 和其他 EV 感染分别占 51.06%、14.89%、34.05%。现已明确引起 HFMD 的 EV 有多种,以 EV71 和 CVA16 最为常见,但各地报道其病原构成也不一样,其病原构成具有明显的地域性。

HFMD 病毒分离培养是 HFMD 病原诊断的金标准,但因其分离鉴定繁琐、费力、耗时长,给快速检测和早期诊断工作带来困难,也无法满足疾病流行期间同时处理大量标本的需要,近年来 PCR 技术已成为诊断 EV 感染最常用的一种方法,目前主要用于检测 EV 通用、EV71 和 CVA16 的分型。本研究通过 VP4 序列鉴定方法对 1 410 例临床 HFMD 病例非 EV71、非 CVA16 型的其他型 EV 随机选出的 107 例进行 PCR 扩增及序列分析,结果为 CVA6 46 例,CVA10 30 例,CVA5 10 例,CVA2 6 例,分别占其他 EV 的 42.99%、28.04%、9.35%、5.61%;CVA3 2 例、CVA4 2 例、CVB2 2 例、ECHO16 2 例分别占其他 EV 的 1.87%。有 7 例没有扩增成功,可能是病毒含量低,或者是病毒扩增区序列变异,没有进行设计 VP1 引物检测。在已检测的 107 株 EV 中,有 46 株为 CVA6,有 30 株为 CVA10,说明本地区非 EV71、非 CVA16 型 EV 中的优势型别主要为 CVA6,其次为 CVA10。近年来 CVA6 与 CVA10 引起

的报道较多,芬兰 2008 出现全国范围的 HFMD 大暴发,病原为 CVA6 和 CVA10^[8],在新加坡,CVA10 在 HFMD 病原中也占较高比例^[9],2005 年日本 HFMD 流行期间,CVA6 和 CVA10 传播性比 EV71 强,但毒力比 EV71 弱^[10],2009 年,我国山东省也发现了由 CVA10 引起的 HFMD 暴发^[11],且近年来报道 CVA6 和 CVA10 流行的文献陆续出现,提醒人们需加强对 CVA6 和 CVA10 的监测工作。

因此,在以后的 HFMD 病原学监测中应加强对 EV 的分型鉴定,以全面动态地了解其病原谱及优势病毒型别的变化,并进一步研究其生物学特性和分子流行病学特征,为 HFMD 的预测、预警和防治工作提供科技支撑。

参考文献

- [1] 杨兴林,李丽,熊金凤,等. 2011 年贵阳地区手足口病病原学检测结果分析[J]. 实用医学杂志,2012,28(12):2080-2082.
- [2] Ishiko H, Shimada Y, Yonaha M, et al. Molecular diagnosis of human enteroviruses by phylogeny-based classification by use of the VP4 sequence[J]. J Infect Dis, 2002, 185(6):744-754.
- [3] Kennett M, Birch C, Lewis F. Enterovirus type 71 infection in Melbourne[J]. Bull WHO, 1974, 51(6):609-615.
- [4] 杨兴林,熊金凤,李丽,等. 贵阳地区 2010 年手足口病病原体检测分析[J]. 中国卫生检验杂志,2012,22(11):2734-2736.
- [5] 李静,金玉,檀晓娟,等. 2010 年南京市手足口病患儿的病原构成及肠道病毒 71 型分子流行病学特征分析[J]. 中华儿科杂志,2012,50(4):267-270.
- [6] 胡海葵,乔蓉,沈琦,等. 2009~2011 年上海市手足口病病原学检测及其临床特点分析[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2012,26(5):341-343.
- [7] 王彦霞,许汴利,陈豪敏,等. 河南省 2008~2010 年手足口病流行趋势及病原学分析[J]. 中华预防医学杂志,2012,46(8):761-762.
- [8] Blomqvist S, Klemola P, Kaijalainen 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.
- [9] Ang LW, Koh BK, Chart KP, et al. Epidemiology and Control of Hand, Foot and Mouth Disease in Singapore, 2001-2007[J]. Ann Acad Med Singapore, 2009, 38(2):106-112.
- [10] Yamashita T, Ito M, Taniguchi A, et al. Prevalence of coxsackievirus A5, A6, and A10 in patients with herpangina in Aichi Prefecture[J]. Jpn J Infect Dis, 2005, 58(6):390-391.
- [11] 杨赫,陶泽新,王海岩,等. 手足口病患儿柯萨奇病毒 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.