

2014—2015 年江苏省肠道病毒 71 型 VP1 基因特征分析

单 军¹, 夏 瑜², 付建光¹, 王慎骄¹, 汤奋扬¹, 嵇 红^{1*}

(¹江苏省疾病预防控制中心, 江苏 南京 210009; ²苏州市疾病预防控制中心, 江苏 苏州 215004)

[摘要] 目的:探讨 2014—2015 年江苏省肠道病毒 71 型(enterovirus 71, EV71)分离株的病毒基因特征。方法:用 RD 细胞对 RT-PCR 初筛 EV71 阳性的标本进行病毒分离, 成功分离到的 EV71 分离株进行 VP1 区的序列测定和分析。序列分析结果用 DNA Star 和 MEGA 6.0 软件进行分析, 并与各型参考株进行比较。结果:共分离到 35 株 EV71 型毒株, 分离阳性率为 29.17%。35 株 EV71 分离株 VP1 区的核苷酸和氨基酸序列同源性分别为 93.3%~100.0% 和 96.6%~100.0%, 与 EV71 的 C4a 亚型代表株安徽阜阳株的核苷酸和氨基酸序列同源性分别为 95.6%~97.9% 和 97.9%~100.0%; 在系统进化树上与 C4a 亚型代表株相聚在一起, 并且存在 2 个进化分支。结论:2014—2015 年江苏省分离的 35 株 EV71 毒株均属于 C4a 亚型; 江苏省 EV71 流行株可能与国内其他省市流行的病毒有着共同的祖先, 再各自进化。

[关键词] 手足口病; 肠道病毒 71 型; 基因型

[中图分类号] R373.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)07-895-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20170724

Analysis on genetic character of enterovirus 71 strains isolated from Jiangsu Province in 2014—2015

Shan Jun¹, Xia Yu², Fu Jianguang¹, Wang Shenjiao¹, Tang Fenyang¹, Ji Hong^{1*}

(¹Jiangsu Provincial Center for Disease Prevention and Control, Nanjing 210009; ²Suzhou Center for Disease Prevention and Control, Suzhou 215004, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the genic characteristic of enterovirus 71(EV71) strains isolated from Jiangsu Province in 2014—2015. **Methods:** The EV71 RNA positive samples were inoculated into RD cells to separate the EV71 isolates, which were selected for sequencing and analysis of VP1 gene. The software DNA Star and MEGA 6.0 were used for comparison between EV71 and the various types of reference strains. **Results:** A total of 35 strains of EV71 were isolated and the positive rate was 29.17%. Sequence analysis of the 35 isolates showed that the homology of nucleotides and amino acids of VP1 gene were 93.3%~100.0% and 96.6%~100.0%, respectively. There were 95.6%~97.9% nucleotide acid identity and 97.9%~100% amino acid identity among these 35 strains and representative strain of C4a genotype isolated from Fuyang City. Phylogenetic analysis showed that the 35 EV71 strains gathered together with the representative strains of C4a genotype, and belonged to 2 viral transmission chains. **Conclusion:** The 35 EV71 strains from Jiangsu Province in 2014—2015 belong to C4a genotype. The major epidemic strain of EV71 in Jiangsu Province might have a same ancestor as domestic epidemic strains of EV71, and then evolve independently.

[Key words] hand-foot-mouth disease; enterovirus 71; genotype

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(07):895-898]

手足口病(hand-foot-mouth disease, HFMD)由肠道病毒感染引起,其临床症状多为手、足、外阴部位的水泡和斑丘疹,重症可能致死^[1-2]。引发 HFMD 的肠道病毒有 20 多种(型),其中肠道病毒 71 型(en-

terovirus 71, EV71)最为常见,也是引起 HFMD 重症病例最主要的病原体之一。EV71 感染所致的儿童 HFMD 较其他病毒更易导致重症甚至死亡病例,其病死率高达 82%~94%^[3],故引起了全球的广泛关注。自 1974 年 Schmidt 等^[4]从美国加利福尼亚州患有中枢神经系统症状患者标本中分离到 EV71 病毒以来, EV71 已在全球流行了数十年。近十年来,中国大陆地区已暴发了数次以 EV71 为主的 HFMD 疫

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金(81402732);江苏省预防医学课题(Y2012071);苏州市科技局应用基础研究课题(SYS201262)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: jihong1982@sina.cn

情。江苏省 HFMD 发病率较高,重症病例时有发生,疫情形势较为严峻。已知 EV71 是单股正链 RNA 病毒,基因组由 7 400 个核苷酸组成,仅有 1 个开放读码框,目前对 EV71 VP1 基因、VP4 基因和 5'-UTR 变异的研究是其分子流行病学的关注热点。其中,VP1 基因不仅直接决定病毒的抗原性,其编码蛋白还是病毒中和决定因子,其核酸序列还可作为不同血清型分类的依据^[5],最具有研究价值。为了解 2014—2015 年江苏省 EV71 型的分子流行病学特征,现选取 2014—2015 年部分 EV71 阳性标本,对其进行病毒分离和鉴定,对 EV71 型病毒分离株的 VP1 编码区进行扩增、序列测定和遗传进化分析,结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

选取 2014—2015 年江苏省各地市疾控中心报送的部分 PCR 初筛 EV71 阳性的 HFMD 患者急性期采集的咽拭子和肛拭子标本,共 120 份。

1.2 方法

1.2.1 病毒分离

根据卫生部制定的《手足口病预防控制指南》(2009 年版),对选取的 EV71 阳性标本进行病毒分离。将 200 μ L 标本接种于 RD 细胞,在细胞培养箱中以 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 条件培养 5~7 d,每天观察细胞病变(CPE),在 CPE \geq 90%或 7 d 收获培养上清液。盲传 2 代后收毒。

1.2.2 提取病毒 RNA

使用 MagMAX™-96 Viral RNA Isolation Kit(Life technologies 公司,美国)提取培养物 RNA,按照说明书进行具体操作,提取好的 RNA 置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

1.2.3 病毒分离物的鉴定

以多重荧光定量 PCR 法,应用柯萨奇病毒 A16 型、肠道病毒 71 型和肠道病毒通用型核酸检测试剂盒(江苏硕世生物科技有限公司)对病毒分离物 RNA 进行检测,扩增体系的配置、扩增以及结果判定均按试剂盒说明书进行。

1.2.4 EV71 VP1 区 PCR 扩增

以病毒分离物鉴定为 EV71 的病毒核酸为模板,根据文献^[6]对 VP1 编码区进行扩增,产物以 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检验,目标片段约为 1 100 bp。

1.2.5 EV71 VP1 区的序列测定和分析

将上述 VP1 编码区 RT-PCR 扩增产物送南京金斯瑞生物科技有限公司进行双向测序。以 DNA

Star 和 MEGA 6.0 等软件对序列测定结果进行分析,对 VP1 区的核苷酸和氨基酸序列进行同源性分析并构建基因进化树。

2 结果

2.1 VP1 区的 RT-PCR 结果

120 份 RT-PCR 初筛为 EV71 型阳性的标本,共分离出 35 株毒株,分离阳性率为 29.17%,经多重荧光定量 RT-PCR 鉴定均为 EV71 型。其中 2014、2015 年分别为 17 株、18 株。对毒株核酸进行 VP1 编码区的 RT-PCR 扩增,1%琼脂糖凝胶电泳均有特异、唯一性条带出现,扩增产物约为 1 100 bp,与理论预测值一致。

2.2 VP1 区基因系统进化分析

将本研究中 35 株 EV71 分离株与近年来中国大陆其他地区的分离株以及 EV71 各基因型、亚型的国际代表株进行系统进化树的构建,结果显示:35 株 EV71 分离株均与安徽阜阳代表株(Fuyang-Anhui-17.08-1)和其他省市近年来的 EV71 分离株处于同一分支,均为 C4 亚型中的 C4a 亚型。进一步分析显示:35 株分离株分为 2 个小分支,其中 2014 年的 7 株和 2015 年的 8 株与安徽阜阳株、浙江株、山东株等国内其他省市的分离株同属一支,亲缘关系最为密切;其余的 20 株分离株属于另一分支,与国内其他省市的分离株亲缘关系稍远,但仍属于 C4a 亚型(图 1)。

2.3 VP1 区核苷酸和氨基酸序列的同源性比较

35 株 EV71 分离株之间 VP1 区核苷酸同源性为 93.3%~100.0%,氨基酸同源性为 96.6%~100.0%;与安徽阜阳株的核苷酸同源性为 95.6%~97.9%,氨基酸同源性为 97.9%~100.0%;与 A、B 基因型代表株的核苷酸和氨基酸同源性分别为 81.1%~84.6%和 91.1%~93.8%。VP1 区核苷酸和氨基酸序列的同源性比较结果见表 1。

3 讨论

HFMD 是我国法定报告管理的丙类传染病,多发于 5 岁及以下的儿童和婴幼儿^[7]。自 1998 年以来,我国大陆地区流行的 EV71 以 C4 亚型为主,其中 1998—2004 年的分离株以 C4b 亚型为主,2004 年以后逐渐被 C4a 亚型取代^[8-9]。本研究显示,2014—2015 年江苏省 35 株 EV71 型肠道病毒均为 C4a 亚型,与广州市 2011 年、南京市 2012—2013 年、珠海市 2013 年以及东莞市 2014 年的分离株属于同一亚

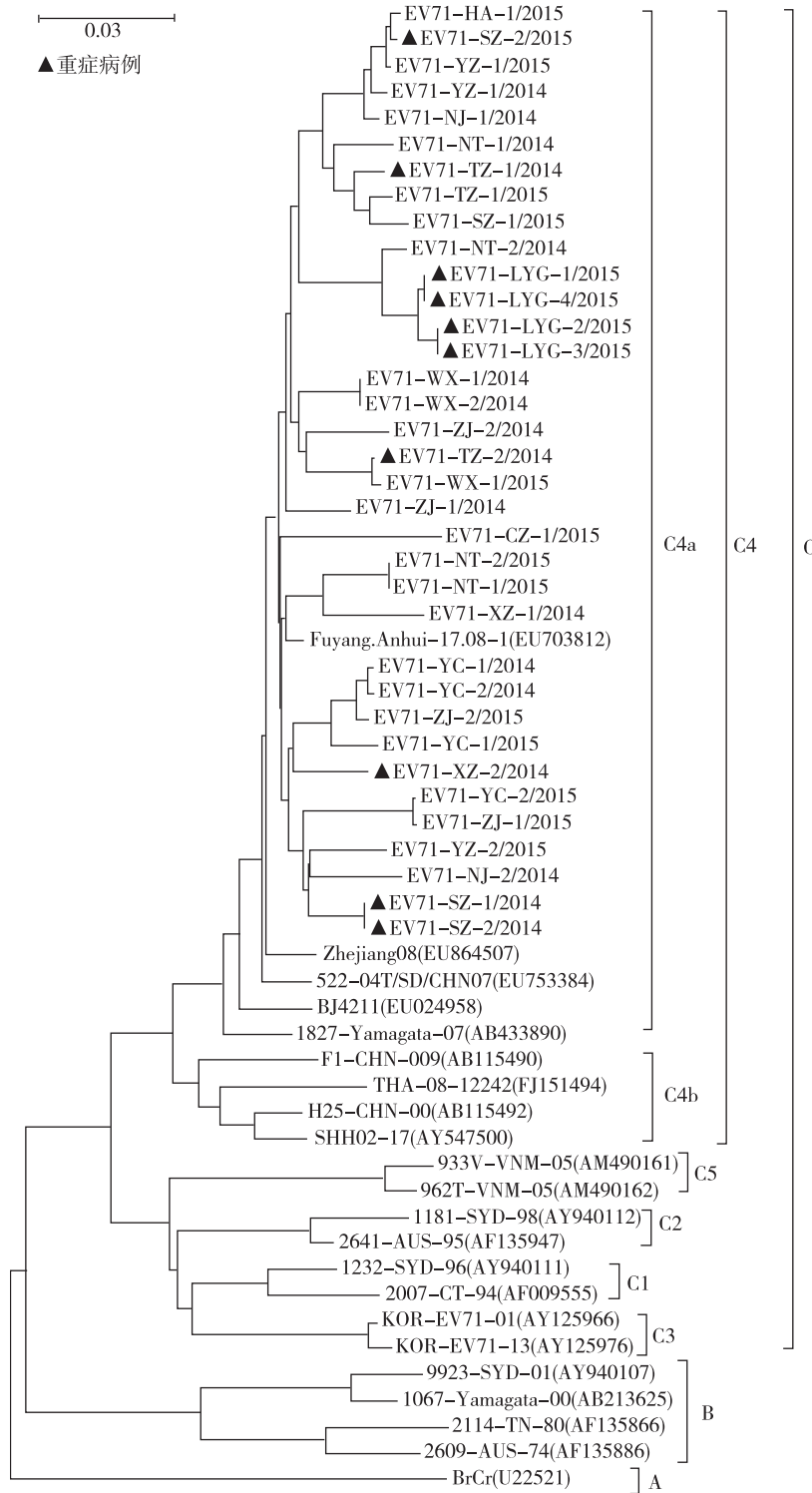


图 1 35 株 EV71 毒株与 EV71 各亚型参考株之间 VP1 基因的进化树

Figure 1 The phylogenetic tree of VP1 gene between 35 strains and the representative strains of EV71

型^[10-13]。35 株 EV71 分离株有 2 个进化分支,其中 15 株与国内其他省市的分离株同属 1 支,另外 20 株则属于另 1 分支,与国内其他省市的分离株亲缘关系稍远。提示本省 EV71 存在多个传播链,可能与国内流行的病毒有共同祖先,再各自进化而来。

不同基因型、亚型的 EV71 型 HFMD 可在同一

地区、同一时期共同流行,如马来西亚在 1997—2005 年间出现过 3 次 EV71 的暴发流行,其中包括了 B3、B4、C1、C2 亚型^[14];悉尼 1983—2001 年间先后流行过以 C1 亚型为主导的 B2、B4、C1、C2 等多种亚型^[15]。不同基因型和亚型对于流行的“贡献”可能发生了改变,如我国台湾地区的主导基因型从

表1 35株EV71毒株与各型参考株之间VP1基因的核苷酸和氨基酸同源性分析

Table 1 The homogeneity of nucleotide acid and amino acid of VP1 gene between 35 strains and the representative strains of EV71 (%)

参考株	核苷酸同源性	氨基酸同源性
C4a(EU703812)	95.6~97.9	97.9~100
C4b(AY547500)	91.3~93.7	97.6~99.7
C1(AF009555)	87.3~88.1	96.2~97.9
C2(AY940112)	86.5~88.2	94.8~96.9
C3(AY125966)	87.2~88.7	96.2~98.3
C5(AM490161)	85.6~87.8	95.9~97.9
B(AB213625)	83.5~84.6	92.8~93.8
A(U22521)	81.1~82.9	91.1~93.1

1998年的C2型变为2000年的B4型^[16]。不同基因型的共存可能导致基因型内部及与其他肠道病毒之间重组的发生,与病毒株变异共同作用^[17-18],使得肠道病毒的检测与分型更加困难。病毒株的变异、易感人群的累积、环境病毒量的增加、缺乏预警等多种因素最终可能导致EV71的暴发。

值得注意的是,本研究中35株EV71毒株分离自重症病例和轻症病例标本,标本类型也不唯一,咽拭子和肛拭子都有,但其VP1区的核苷酸和氨基酸均高度同源,提示EV71的毒力决定簇可能不在VP1区域内。而EV71众多的病毒基因型别的形成原因,其基因组序列的结构差别和病毒功能的关系尚不明确,其致病机制还有待进一步探讨^[3]。

本研究分析了江苏省2014—2015年流行的EV71毒株VP1基因的分子流行病学特征,并对其系统进化情况进行了趋势分析,完善了EV71型肠道病毒的流行病学资料,对有效防控HFMD和研发HFMI疫苗具有重要的公共卫生意义。

[参考文献]

- [1] 陈国清,邵荣标,王海燕,等. 2010年盐城地区手足口病例肠道病毒型别调查[J]. 江苏预防医学,2012,23(2): 21-22
- [2] 蔡永彬,嵇红. 2012—2014年太仓市手足口病流行病学和病原学特征[J]. 江苏预防医学,2016,27(2): 198-200
- [3] Koroleva GA, Lukashov AN, Khudiakova LV, et al. Encephalomyelitis caused by enterovirus type 71 in children [J]. *Vopr Virusol*, 2010, 55(1): 4-10
- [4] Schmidt NJ, Lennette EH, Ho HH. An apparently new enterovirus isolated from patients with disease of the cen-

tral nervous system[J]. *J Infect Dis*, 1974, 129(3): 304-309

- [5] 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]. *Virology*, 1999, 73(3): 1941-1948
- [6] 单军,李显,唐震,等. 2008—2009年江苏省肠道病毒71型分子流行病学研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2010, 26(10): 979-981, 985
- [7] 封卫群. 泰州市海陵区2009—2011年手足口病疫情分析[J]. 江苏预防医学, 2013, 24(3): 38-39
- [8] Yu H, Chen W, Chang H, et al. Genetic analysis of the VP1 region of enterovirus 71 reveals the emergence of genotype A in central China in 2008 [J]. *Virus Genes*, 2010, 41(1): 1-4
- [9] Zhu J, Luo Z, Wang J, et al. Phylogenetic analysis of Enterovirus 71 circulating in Beijing, China from 2007 to 2009 [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56318
- [10] 谢华萍,耿进妹,张颖,等. 广州市2011年肠道病毒71型VP1基因特征分析[J]. 中国病毒学杂志, 2013, 3(2): 96-101
- [11] 乔梦凯,雍玮,石利民,等. 南京市2012—2013年肠道病毒71型分离株VP1基因特性分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(2): 157-160
- [12] 周兰兰,魏泉德,张丽荣,等. 珠海市2013年肠道病毒71型和柯萨奇病毒A16型基因特征[J]. 中国热带医学, 2014, 14(12): 1429-1434
- [13] 李艳芬,黄勇,黎景全,等. 东莞市2014年手足口病原检测与基因特征分析[J]. 中国热带医学, 2015, 15(11): 1306-1311
- [14] Podin Y, Gias EL, Ong F, et al. Sentinel surveillance for human enterovirus 71 in Sarawak, Malaysia; lessons from the first 7 years [J]. *BMC Public Health*, 2006, 6(180): 127-131
- [15] Sanders SA, Herrero LJ, McPhie K, et al. Molecular epidemiology of enterovirus 71 over two decades in an Australian urban community [J]. *Arch Virol*, 2006, 151(5): 1003-1013
- [16] Lin KH, Hwang KP, Ke GM, et al. Evolution of EV71 genogroup in Taiwan from 1998 to 2005: an emerging of subgenogroup C4 of EV71 [J]. *J Med Virol*, 2006, 78(2): 254-262
- [17] Bible JM, Pantelidis P, Chan PK, et al. Genetic evolution of enterovirus 71: epidemiological and pathological implications [J]. *Rev Med Virol*, 2007, 17(6): 371-379
- [18] Yoke-Fun C, AbuBakar S. Phylogenetic evidence for intertypic recombination in the emergence of human enterovirus 71 subgenotypes [J]. *BMC Microbiol*, 2006, 6: 74

[收稿日期] 2016-04-21