

黄梅县手足口病临床分离株的基因型分析

张祥明¹

[摘要] 目的:了解手足口病暴发高峰时段临床患者的咽拭子标本中分离出的人肠道病毒 71 型(EV71)和柯萨奇病毒 A16 型(CA16)的基因型,为手足口病的防治提供依据。方法:将手足口病高峰期收集的咽拭子标本 109 份进行病毒分离鉴定,对分离到的 4 株 EV71 型病毒株的 227 bp VP3-VP1 基因序列和 3 株 CA16 株的 736 bp VP1-2A 基因序列进行基因测序,并进行系统进化分析。结果:检测到的 4 株 EV71 分离毒株均属 C₄a 亚群,3 株 CA16 分离毒株均属于 B₁b 亚群。结论:2013 年黄梅县手足口病暴发高峰时段的 EV71 流行株为 C₄a 亚群,CA16 流行株为 B₁b 亚群。

[关键词] 肠道病毒;肠道病毒 71 型;柯萨奇病毒 A16 型;系统进化分析

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2015.02.015

[中图分类号] R373.2 **[文献标志码]** A

Genomic characteristics of clinical isolates from HFMD patients in Huangmei city

ZHANG Xiangming

(Huangmei County People's Hospital, Huanggang, 436500, China)

Abstract Objective: To investigate the genetic features of clinical isolates from hand-foot-mouth disease (HFMD) patients in circumjacent Huangmei city. **Method:** 4 strains of Enterovirus 71 (EV71) and 3 strains of coxsackievirus A16 (CA16) were isolated from 109 throat swab samples of HFMD cases. Sequencing were done among 227bp VP3-VP1 regions of EV71 and 736bp VP1-2A regions of CA16. Phylogenetic analysis was performed. **Result:** Phylogenetic analysis showed that 4 EV71 strains belonged to subgenotype C₄a, 3 CA16 isolates belonged to subgenotype B₁b. **Conclusion:** EV71 epidemic strains were C₄a, and CA16 epidemic strains were B₁b in the peak outbreak period of Huangmei city.

Key words hand-foot-mouth disease; Enterovirus 71; Coxsackievirus A16; phylogenetic analysis

手足口病 (Hand foot and mouth disease, HFMD) 为全球性传染病,该病由多种肠道病毒引起,多发于 5 岁以下儿童,好发于夏、秋 2 季,可引起手、足、口腔等部位的疱疹,少数患儿可发展为重症,引起心肌炎、肺水肿、无菌性脑膜脑炎等并发症,个别重症患儿如果病情发展快,可导致死亡。我国手足口病流行形势严峻,各地不断出现爆发流行并出现死亡病例的报道^[2-3]。本研究对手足口病暴发高峰时段分离的人肠道病毒 71 型 (Enterovirus 71, EV71) 和柯萨奇病毒 A16 型 (Coxsackievirus A16, CA16) 毒株进行基因测序,构建系统进化树并对其基因型进行分析,以了解我县 EV71 和 CA16 的分子流行病学情况,为该地区手足口病的防控提供病原学依据。

1 材料与方法

所有病例均来自我院 2013-04-01—2013-05-10 收治的住院患者,临床诊断为手足口病,诊断符合卫生部发布的 2010 版《手足口病诊疗指南》。采集患者发病 3~5 d 的咽拭子标本共 109 例,−20℃ 保存。

1.2 病毒分离

咽拭子肠道病毒核酸检测采用实时荧光定量 PCR 方法 (江苏默乐生物科技有限公司),严格按照试剂盒说明书操作。将 EV71 和 CA16 核酸阳性标本分别接种于非洲绿猴肾细胞 (Vero) 和单层人横纹肌肉瘤细胞 (RD),在倒置显微镜下观察细胞病变效应 (CPE),如不出现致 CPE,则判为阴性标本;如果出现了 EV 特异的 CPE 效应,待 CPE 达到十以上收集细胞。

1.3 EV71 和 CA16 序列测定

采用 QIAgen 公司的 QIAamp Viral RNA Mini Kit 试剂盒提取 EV71 和 CA16 病毒的 RNA,采用 Promega 公司的 MLV 反转录酶和 RNA 酶抑制剂进行 cDNA 合成,于 PCR 仪中 95℃ 变性 5 min,而后经 95℃ 变性 1 min,退火 30 s (退火温度因 PCR 引物而异,如表 1 所示),72℃ 延伸 1 min,扩增共 30 个循环,最后于 72℃ 延伸 10 min。取 5~10 μl 扩增产物进行电泳,产物送至上海 Invitrogen 公司测序。

1.4 系统进化树分析

将测序结果与参考株序列导入 ClustalW 软件进行多序列比对,采用邻接法和 Kimura 2-param-

¹ 黄梅县人民医院检验科 (湖北黄冈, 436500)

ter 模型,用 MEGA5.05 软件构建系统发育树,自展值(bootstrap)为 1 000^[4]。所有参考株序列来

源于 GenBank,如表 2。

表 1 EV71 病毒和 CA16 病毒测序引物

引物名称	引物序列 (5'→3')	引物位置	扩增片段大小/bp	退火温度/℃
EV71-S	GCAGCCCAAAAGAACTTCAC	2372~2392	227	57.5
EV71-A	ATTTCAGCAGCTTGGAGTGC	2578~2598		
CA16-VP1-F	GCCAAACCCAATGGTGAGTTAG	2863~2884	736	57.0
CA16-2A-R	CACTAGCTTCCACAAATATCAG	3577~3598		

表 2 进化树构建和基因组重组分析中相关参考株信息表

Genotype	Strain *	Accession No.	Genotype	Strain *	Accession No.
EV71-A	BrCr/USA/1970	U22521	CA16-A	FY18/AH/CHN/2008	EU812514
EV71-A	Hubei-09/HB/CHN/2009	GU434678	CA16-A	G10/ZAF/1951	U05876
EV71-B ₁	1978/HUN/1978	AB059814	CA16-B _{1a}	069/THA/2010	JF738003
EV71-B ₂	11316/NLD/1986	AF009540	CA16-B _{1a}	028-2/ZJ/CHN/2009	HM776264
EV71-B ₂	20233/NLD/1983	AF009534	CA16-B _{1a}	KMM08/YN/CHN/2008	HQ423141
EV71-B ₃	26M/AUS/1999	AF376119	CA16-B _{1a}	SZ-HK08-3/GD/CHN/2008	GQ279368
EV71-B ₃	3799/SIN/1998	AF376073	CA16-B _{1b}	3560/FJ/CHN/2009	HQ269389
EV71-B ₄	SHA89/MYS/1997	AJ586873	CA16-B _{1b}	SZ-HK08-7/GD/CHN/2008	GQ429222
EV71-B ₄	N7008/TWN/1999	AF376084	CA16-B _{1b}	G20/YN/CHN/2010	JN590244
EV71-B ₅	S19841/MYS/2003	AB177815	CA16-B _{1b}	HN1662/HN/CHN/2010	JF695009
EV71-B ₅	35334/BRU/2006	AB177816	CA16-B _{1b}	JQ034149/SH/CHN/2009	JQ034149
EV71-C ₁	10098/NLD/2010	AF119549	CA16-B _{1b}	SHZH05-1/GD/CHN/2005	GQ429227
EV71-C ₁	S10862/MYS/1998	AF009544	EV71-C ₅	E2005125/TWN/2005	EU051147
EV71-C ₂	0964/ASU/1998	AF135948	EV71-C _{4a}	Guangdong/GD/2009	JF799986
EV71-C ₂	4643/TWN/1998	AF286525	EV71-C _{4b}	AFP2001071/GX/CHN	JQ742002
EV71-C ₃	01/KOR/2002	AY125966	EV71-C _{4b}	SHH02-17/SH/CHN/2002	AY547500
EV71-C ₃	06/KOR/2002	AY125970	EV71-C _{4b}	shzh02-62/GD/CHN/2002	AY895136
EV71-C ₅	07364/TWN/2007	EU072168			

注：* 国内参考株统一命名规则为：毒株名称/省份/中国/分离年代；国外参考株统一命名规则为：毒株名称/三位字母国家名称代码/分离年代。

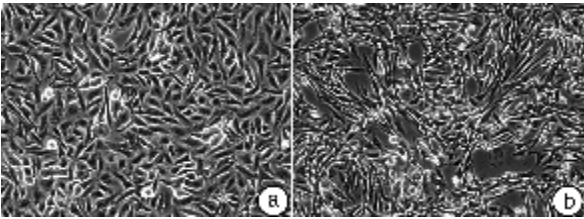
2 结果

2.1 实时荧光定量检测及病毒分离

109 例手足口病例中, EV71 病毒阳性 63 例, 阳性率为 57.8%; CA16 病毒阳性 19 例, 阳性率为 17.4%。从 63 例 EV71 阳性患儿中分离出 4 株病毒, 从 19 例 CA16 阳性患儿中分离出 3 株病毒。Vero 细胞接种 EV71 阳性咽拭子标本后呈现的 CPE 效应如图 1 所示, RD 细胞接种 CA16 阳性咽拭子标本后呈现的 CPE 效应如图 2 所示。

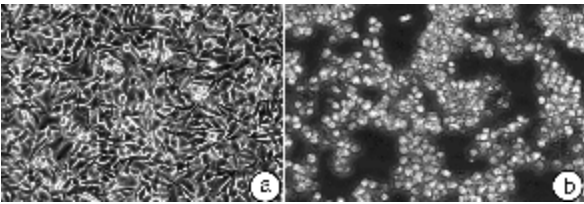
2.2 4 株 EV71 分离株的基因型分析

本研究选取 7 株中国大陆地区已知基因亚型的 EV71 毒株和 20 株其他国家和地区的已知基因亚型的 EV71 毒株作为参考株, 这 27 株参考株代表 A 型、C₁~C₅ 型和 B₁~B₅ 型这 11 种包含 C_{4a} 和 C_{4b} 在内的基因亚型, 所有参考株序列均来自于 GenBank 数据库。将本研究中分离的 4 株 EV71 毒株的 227 bp VP3-VP1 基因序列与 27 株参考株进行比对重排, 采用 MEGA5.05 构建亲缘进化树, 所有 4 株 EV71 分离毒株均属于 C_{4a} 亚群。



a: Vero 细胞阴性对照; b: Vero 细胞感染 EV71 病毒后 CPE 效应。

图 1 Vero 细胞接种 EV71 阳性咽拭纸标本后呈现的 CPE 效应(100×放大)



a: RD 细胞阴性对照; b: RD 细胞感染 CA16 病毒后的 CPE 效应。

图 2 RD 细胞接种 CA16 阳性咽拭子标本后呈现的 CPE 效应(100×放大)

2.3 3株CA16分离株的基因型分析

本研究选取11株中国大陆地区已知基因亚型的CA16毒株和3株其他国家和地区的已知基因亚型的CA16毒株作为参考株,这14株参考株代表A、B_{1a}和B_{1b}3种基因亚型,由于GenBank数据库暂未收录与736 bp VP1-2A基因相对应的B_{1c}和B₂基因亚型参考株,故构建的亲缘进化树中没有B_{1c}和B₂进化分支。亲缘进化树结果表明,3株CA16分离毒株均属于B_{1b}亚型,并且与2009年在上海,福建省厦门市流行的CA16毒株亲缘关系较近^[2]。

3 讨论

目前已发现的可引起HFMD的肠道病毒有20多种,均属微小核糖核酸病毒科,人肠道病毒属,其中EV71和CA16往往是HFMD暴发流行的最主要病原体,两者在遗传学上密切相关^[5]。通常情况下,EV71与CoxA16引起的HFMD在临床症状上难以区别,但EV71感染除了引起HFMD以外,还能引起无菌性脑膜炎、脑干脑炎和脊髓灰质炎样麻痹,易致严重的神经系统疾病,甚至危及生命,因而具有更大的危害性。为深入了解我县HFMD的临床流行病学和分子流行病学规律,本课题组收集了2013年手足口病高峰时段在我院住院的HFMD患者的咽拭子标本,对EV71和CA16核酸阳性标本进行病毒分离,并基于VP1区进行系统进化分析,以了解手足口病流行株的分子流行病学特征。

本研究发现,我院手足口病收治的这段高峰期为2008年爆发于安徽省阜阳市手足口病疫情发病高峰期时间较一致^[6]。这期间收治的109例手足口病例中,EV71病毒阳性63例,阳性率为57.8%;CA16病毒阳性19例,阳性率为17.4%,表明收治高峰时段流行亚型以EV71为主,这与国内山东、安徽、浙江和广东等地的报道一致^[7-9]。

根据EV71病毒VP1基因序列,可将EV71病毒分为A型、B型和C型3个基因型。根据VP1基因序列的相似度,这3个基因型又可分为11种不同的基因亚型,其中B基因型可分为B₁~B₅五种基因亚型,C基因型可分为C₁~C₅五种亚型。C₄亚型根据亲缘关系的远近,又可分为C_{4a}亚群和C_{4b}亚群。据文献报道,在我国大陆地区于1997年在黑龙江省分离到1株C₃亚型EV71毒株^[7],其他各地报道的手足口病EV71流行株均为C₄亚型^[8-9]。特别是1998年以来,C₄亚型在我国大陆的地方性循环模式由2个流行期组成,1998—2004年间EV71的流行优势株以C_{4b}亚群为主,2004年以

后大陆流行株被C_{4a}所取代并且伴随着很高的发病率和病死率^[8-9]。本研究分离到的4株EV71临床株的基因分型结果表明,此次HFMD的主要病原体是EV71病毒中的C_{4a}亚群,与国内其他地区的研究结果一致^[8-9]。

CA16病毒有A和B₂种基因型,B基因型又分为B₁和B₂亚型,B₂亚型只在1981—2000年的日本和马来西亚流行过,B₁亚型则从1997年以来,在亚太地区广泛流行。B₁亚型又可分为B_{1a}、B_{1b}和B_{1c},其中B_{1c}最近才有报道^[10-11]。中国大陆地区流行的CA16病毒除2008年发现一株属于A型外,其他都属于B_{1a}和B_{1b},并且B_{1a}和B_{1b}在2000—2008年呈共同流行状态^[11]。本研究对分离出的3株CA16临床株进行基因分型发现均属于B_{1b}亚群,与2009年在厦门和上海的CA16流行株亲缘关系非常接近^[2],推测有可能是这2个地方的输入性传播。

综上所述,2013年我县手足口病暴发高峰时段的EV71流行株为C_{4a}亚群,CA16流行株为B_{1b}亚群,这与自2006年以来国内其他报道一致。了解该地区手足口病的病原体的分子流行病学特征,能够为本地手足口病的防控和即将上市的手足口病疫苗的临床应用提供病原学依据。

参考文献

- [1] Zheng ZM, He PJ, Caueffield D, et al. Enterovirus 71 isolated from China is serologically similar to the prototype EV71 BrCr strain but differs in the 5' ~2 noncoding region [J]. J Med Virol, 1995, 47: 161—167.
- [2] Zhang J, Sun J, Chang Z, et al. Characterization of hand, foot, and mouth disease in China between 2008 and 2009 [J]. Biomed Environ Sci, 2011, 24: 214—221.
- [3] Tan X, Huang X, Zhu S, et al. The persistent circulation of enterovirus 71 in People's Republic of China: causing emerging nationwide epidemics since 2008 [J]. PLoS One, 2011, 6: e25662.
- [4] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Mol Biol Evol, 2011, 28: 2731—2739.
- [5] Chang LY, Lin TY, Huang YC, et al. Comparison of enterovirus 71 and coxsackie-virus A16 clinical illnesses during the Taiwan enterovirus epidemic, 1998 [J]. Pediatr Infect Dis J, 1999, 18: 1092—1096.
- [6] 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 [J]. Virol J, 2010, 7: 94—94.

骨折患者血浆 D-二聚体水平升高影响因素探讨

任庆远¹

[摘要] 目的:探讨骨折患者血浆 D-二聚体(D-dimer)升高及其影响因素。方法:采集 235 例骨折患者的血浆标本,在 Sysmex CA-7000 型全自动血凝仪上采用胶乳增强的免疫比浊法检测血浆 D-dimer,并分析性别、年龄及病情严重程度与 D-dimer 之间的关系。结果:骨折患者组 D-dimer 增高与正常对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。性别与 D-dimer 增高无关($P>0.05$)。年龄小于 25 岁的骨折患者血浆 D-dimer 增高与正常对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$);随着年龄的增加,D-dimer 增高明显,特别是大于 50 岁的骨折患者其血浆 D-dimer 含量是对照组的 8~10 倍,差异有统计学意义($P<0.05$)。根据骨折部位、伤情分轻、中、重 3 度,单纯闭合性较轻微的骨折患者其 D-dimer 变化与健康对照组相比差异无统计学意义,随着骨折病情严重程度增加,血浆 D-dimer 增高较对照组差异有统计学意义($P<0.05$),尤其是肢体 2 处及 2 处以上骨折伴有血管损伤或脏器损伤的严重骨折患者。结论:骨折患者应例行测定血浆 D-dimer,对于年龄较大、病情比较严重的骨折患者应特别注意其血浆 D-dimer 的升高,及时抗凝,预防深静脉血栓形成。

[关键词] 骨折;D-二聚体;影响因素

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2015.02.016

[中图分类号] R274.1 **[文献标志码]** A

Discussion on influencing factors of increased plasma D-dimer level in patients with bone fracture

REN Qingyuan

(Fei County People's Hospital of Shandong Province, Linyi, 273400, China)

Abstract Objective: To discuss the influencing factors of increased plasma D-dimer level in patients with bone fracture. **Method:** Plasma D-dimer levels of 235 fracture patients were detected using latex enhanced immune turbidimetric method on Sysmex CA-7 000 type automatic blood coagulation analyzer, and the relationship between gender, age and disease severity and the D-dimer were analyzed. **Result:** Plasma D-dimer levels in fracture patients group were significantly higher than that in normal control group ($P<0.05$). Plasma D-dimer in age less than 25 years old fracture patients had no obviously difference compared with normal control group ($P>0.05$). Along with the increase of age, D-dimer significantly increased, especially in patients older than 50 years ($P<0.05$). According to the fracture site, injury was classified into 3 degrees, namely slight, medium and heavy. In simple closed slight fracture patients, the D-dimer change had no obvious difference compared with healthy controls. With the increase of fracture serious degree, plasma D-dimer was higher than control group ($P<0.05$), especially

¹ 山东省费县人民医院 (山东临沂, 273400)

- [7] Shimizu H, Utama A, Onnimala N, et al. Molecular epidemiology of enterovirus 71 infection in the Western Pacific Region[J]. *Pediatr Int*, 2004, 46: 231—235.
- [8] Mao LX, Wu B, Bao WX, et al. Epidemiology of hand, foot, and mouth disease and genotype characterization of Enterovirus 71 in Jiangsu, China[J]. *J Clin Virol*, 2010, 49: 100—104.
- [9] Liu W, Wu S, Xiong Y, et al. Co-circulation and genomic recombination of coxsackievirus A16 and enterovirus 71 during a large outbreak of hand, foot, and mouth disease in Central China[J]. *PLoS One*, 2014, 28, 9: e96051.
- [10] Zhou F, Kong F, Wang B, et al. Molecular characterization of enterovirus 71 and coxsackievirus A16 using the 5' untranslated region and VP1 region[J]. *J Med Microbiol*, 2011, 60: 349—358.
- [11] Zhang Y, Wang D, Yan D, et al. Molecular evidence of persistent epidemic and evolution of subgenotype B1 coxsackievirus A16-associated hand, foot, and mouth disease in China[J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48: 619—622.

(收稿日期: 2014-05-16; 2014-08-13)