

杭州地区新生儿至1岁患儿肠道病毒分型分析

刘伟*, 陈超, 滕淑

杭州市儿童医院, 浙江 杭州

收稿日期: 2022年5月27日; 录用日期: 2022年6月19日; 发布日期: 2022年6月29日

摘要

目的: 分析2021年杭州地区新生儿至1岁婴儿患者肠道病毒的感染情况, 了解其分子特征及流行趋势, 从而为疾病的预防提供科学依据。方法: 采集患者的肛拭子或咽拭子, 采用实时荧光定量PCR技术检测肠道病毒(EV)通用型和柯萨奇病毒A组16型(CA16型); 然后通过PCR扩增和测序验证CA16阳性样本; 对于EV阳性而非CA16样本, 则针对部分VP1区设计引物, 进行PCR扩增和测序分析以鉴定型别; 最后, 在NCBI网站利用BioEdit、MEGA4生信分析软件对PCR产物序列进行比对并构建进化树以确定肠道病毒基因分型。结果: 在2021年杭州地区临床初步诊断疑似肠道病毒感染的60例儿童患者中, 共检出EV阳性标本29份, 总阳性检出率为48%, 其中CA16阳性检出率为20%。在随机抽取的10份EV阳性标本中, CA16阳性5份, EV其他分型(CA6)阳性样本1份。结论: 2021年杭州地区EV CA16为主要感染型别, 同时也存在EV其他型别如CA6等。因此, 加强肠道病毒的监测, 对解释EV的感染趋势及疾病的防控至关重要。

关键词

新生儿至1岁内婴儿, 肠道病毒, 流行病学, 型别分析

Analysis of Enterovirus Genotyping in Newborns to Infants within 1 Year Old in Hangzhou

Wei Liu*, Chao Chen, Shu Teng

Hangzhou Children's Hospital, Hangzhou Zhejiang

Received: May 27th, 2022; accepted: Jun. 19th, 2022; published: Jun. 29th, 2022

Abstract

Objective: To analyze the infection status, molecular characteristics and epidemic trend of entero-

*通讯作者 Email: liuwei19740526@sina.com

virus in 2021 of newborns to infants within 1 year old in Hangzhou. **Methods:** Feces and throat swabs from patients were collected, and real-time RT-PCR was performed to determine the genotypes of enterovirus (EV) and group A 16 (CA16) of Coxsackievirus. CA16 positive samples were further analyzed with PCR amplification and sequencing. For samples of EV positive but CA16 negative, primers were designed based on part of VP1 and PCR amplification and sequencing were performed to identify the genotypes. Finally, BioEdit and MEGA4 softwares were used to analyze the homology of the PCR products in NCBI website and phylogenetic tree was constructed to determine the EV genotyping. **Results:** 29 EV positive samples were found in all the 60 children with suspected EV infection in Hangzhou in 2021. The constituent ratio of EV positive was 48%, and among them, the constituent ratio of CA16 positive was 20%. Among the randomly selected 10 samples, 5 were CA16 positive and 1 was CA6 positive. **Conclusion:** CA16 was the major genotyping of the enterovirus in newborns to infants within 1 year old in Hangzhou in 2021. Meanwhile, other genotyping such as CA6 was also found. Therefore, it is important to monitor the EV genotyping for explaining the infection trend of EV and for the prevention of disease.

Keywords

Newborns to Infants within 1 Year Old, Enterovirus, Epidemiology, Genotype

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 背景介绍

人类肠道病毒(Enteroviruses, EV)是一种具有约 7500 个核苷酸的单股正链无包膜的小型 RNA 病毒,属于小核糖核酸病毒属[1] [2],在人类中包括 EV-A 到 EV-D 多个亚型[3]。EV 广泛存在于自然界,主要通过粪口途径传播。EV 感染引起的症状多种多样[4],通常无症状或导致轻微疾病,如普通感冒或轻微发热。国内外许多国家将 EV 视作“普通感冒”的重要病原体,也正是这些无症状感染者在病毒的传播过程中起了关键性作用[3] [4]。EV 也与严重疾病的暴发有关,如手足口病(HFMD)、疱疹性咽峡炎、脑炎、心肌炎和败血症等,其中最为常见的是手足口病。这些疾病具有相当高的发病率,严重时会导致死亡[5]。

肠道病毒感染以柯萨奇病毒 A 组(Coxsackievirus group A, CA)16 和人肠道病毒 71 型(Enterovirus 71, EV71)最为常见[6] [7]。CA16 及 EV71 对公共卫⊥生的威胁日益严重,特别是在亚太地区,中国在 2008 年暴发的手足口病就以 EV71 和 CA16 为主要病原[8]。随着肠道病毒的不断进化,手足口病的病原体也发生了变化,因此需要对肠道病毒感染引起足够的重视,早发现,早隔离,避免爆发性流行,以保证儿童的健康成长以及生命安全。

本研究中,我们收集了 2021 年杭州地区新生儿至 1 岁婴儿患者标本,这些患者的临床初步诊断结果为手足口病、疱疹性咽峡炎、脑炎或者惊厥等。通过对临床初步诊断结果及导致其感染的主要病原体进行分型,进一步了解杭州地区肠道病毒的优势型别,有助于提高疾病诊断率,从而达到早期治疗的效果,可获得较高的社会和经济效益。

2. 实验方案设计

2.1. 研究对象

收集 2021 年杭州地区 4~10 月份临床初步诊断为手足口病、疱疹性咽峡炎、脑炎、发热性惊厥等症

状的患儿肛拭子或咽拭子标本 60 份, 患儿年龄为新生儿至 1 岁内, 均签署知情同意书。

纳入/排除标准: 纳入标准 1) 符合《手足口病诊疗指南(2018 年版)》的诊断标准; 2) 年龄为新生儿至 1 岁内。排除标准 1) 未征得家长同意; 2) 未收集到咽拭子/肛拭子标本; 3) 没有完整的病史资料; 4) 入院时合并其他感染性疾病者; 5) 既往有运动、精神发育较同龄儿落后者。

2.2. 方法

2.2.1. 肠道病毒核酸提取

取 140 μ l 样本, 根据天根的病毒 RNA 提取试剂盒(天根 DP419)提取病毒 RNA; 提取好的 RNA 用 NanoDrop 2000 (美国 Thermo)测定浓度和纯度, RNA 样本保存于 -80°C 备用。

2.2.2. 逆转录反应

用 Rever Tra Ace qPCR RT Kit 试剂盒(FSQ-101, TOYOBO), 把 RNA 逆转录成 cDNA。主要步骤简述如下: 取 4 μ l RNA 溶液加入 1 μ l Oligo (dT), 70°C 变性 5 min, 冰上静置 2 min, 然后加入 10 μ l RNase Free H_2O , 4 μ l $5\times$ RT Buffer, 1 μ l Rever Tra Ace 试剂。在 PCR 仪上按照如下程序进行逆转录: 37°C 45 min; 98°C 5 min。反应结束后, 保存于 -20°C 备用。

2.2.3. 肠道病毒筛查

用肠道病毒核酸通用型引物和探针, 对 60 份经逆转录获得的 cDNA 样品在 ABI7500 仪器上进行 qRT-PCR (探针法)检测筛查。其中试剂是 TOYOBO 公司的 THUNDERBIRDTM Probe qPCR Mix (QPS-101, TOYOBO)。

2.2.4. 肠道病毒阳性样本的 CA16 分型

筛查得到的肠道病毒阳性样本, 用柯萨奇病毒 A 组 16 型(即 CA16)设计的特异性引物在 ABI7500 仪器上进行 qRT-PCR(SYBR green 法)进行 CA16 分型检测。引物如下: CAP-F: 5'-TATGTTAATTGGGACATTGATTTGA-3', CAP-R: 5'-ACCATTGGGTTTGGCTACG-3'。使用试剂为 SYBR Green Realtime PCR Master Mix (QPK-212, TOYOBO)。

2.2.5. Sanger 测序验证 CA16 阳性样本

分型检测到的 CA16 阳性样本, 通过特异性引物 CAP-F/CAP-R 进行普通 PCR 扩增, PCR 扩增所用试剂为 HotStarTaq Master Mix (QIAGEN), 反应条件为 95°C , 15 min; 94°C , 30 sec, 50°C , 30 sec, 72°C , 30 sec, 45 个循环; 72°C , 10 min。PCR 产物送擎科生物公司进行测序。

2.2.6. Sanger 测序分析 CA16 阴性的肠道病毒阳性样本

在肠道病毒的 VP1 区设计能扩增几乎所有肠道病毒的引物: I-F: 5'-ATGTAYGT(dI)CC(dI)CC(dI)GG(dI)GG-3'; I-R:5'-GC(dI)CC(dI)GAYTG(dI)TG(dI)CCRAA-3', 进行两轮 PCR 扩增。PCR 扩增所用试剂为 HotStarTaq Master Mix (QIAGEN), 反应条件为 95°C , 15 min; 94°C , 30 sec, 50°C , 30 sec, 72°C , 30 sec, 45 个循环; 72°C , 10 min。PCR 产物送擎科生物公司进行测序。

2.2.7. 序列分析

测序得到的序列与 NCBI 数据库中标准序列进行比对, 初步确定肠道病毒型别后, 进一步通过 BioEdit 和 MEGA4 生物软件, 采用邻近法进行多序列比对构建进化树, 对初筛结果进行审核, 从而确定肠道病毒基因分型。

3. 结果

3.1. 新生儿至 1 岁内婴儿患者肠道病毒检出情况

本研究共收集杭州地区 2021 年度 4~10 月份新生儿至 1 岁内婴儿患者标本 60 份, 共检出 EV 阳性样本 29 例, 总阳性检出率为 48%。其中在 19 例患者的咽拭子标本中, EV 阳性有 12 例, 占 63%, 是总样本数的 20%, 而肛拭子标本检测出 EV 阳性的为 17 个, 占肛拭子标本数的 41%, 是总样本数的 28%。具体检出情况如表 1 所示。

Table 1. EV detection summary

表 1. EV 具体检出情况

样本类型	检测数	EV 阳性数	EV 阴性数	EV 阳性率(%)
咽拭子	19	12	7	63%
肛拭子	41	17	24	41%
总数	60	29	31	48%

3.2. 新生儿至 1 岁内婴儿患者肠道病毒 CA16 检出情况

针对 EV 阳性的 29 例样本, 通过 CA16 特异性引物初步筛选出 CA16 阳性样本 12 例。CA16 的阳性检出率为 41.3%。

3.3. 测序分析 CA16 阳性样本情况

随机选取 CA16 阳性样本 6 例, 测序得到序列经与 NCBI 标准序列 Blast 比对后, 确定肠道病毒 CA16 有 5 例, 其中 1 例为假阳性, Blast 结果如图 1 所示。

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Coxsackievirus A16 isolate 03EI-03-0-229 viral protein 1 gene, partial cds	Coxsackievirus A16	178	178	82%	1e-40	98.06%	891	MZ043549.1
Human coxsackievirus A16 isolate THA-CA16-079 polyprotein gene, partial cds	Coxsackievirus A16	178	178	82%	1e-40	98.06%	428	JN097823.1
Coxsackievirus A16 CV- A16/HVN08.064/Lai_Chou/VNM2008 gene for VP1 protein, partial cds	Coxsackievirus A16	174	174	83%	2e-39	97.12%	867	LC438160.1
Coxsackievirus A16 E77-DL-YN-CHN-2019 VP1 gene for capsid protein, partial cds	Coxsackievirus A16	174	174	93%	2e-39	93.97%	891	LC555976.1
Coxsackievirus A16 strain 16/YN/2012 VP1 protein gene, partial cds	Coxsackievirus A16	172	172	82%	6e-39	97.09%	324	KY440796.1

Figure 1. Diagram of sequencing comparison results on CA16 positive samples

图 1. CA16 阳性标本测序比对结果演示图

3.4. 测序分析 CA16 阴性的肠道病毒阳性分型情况

随机选取 CA16 阴性的 EV 阳性样本 6 例, 测序得到序列经与 NCBI 标准序列 Blast 比对后, 发现是肠道病毒 CA6 型, 比对结果如图 2 所示。

3.5. 树图分析测序序列比对结果的准确性

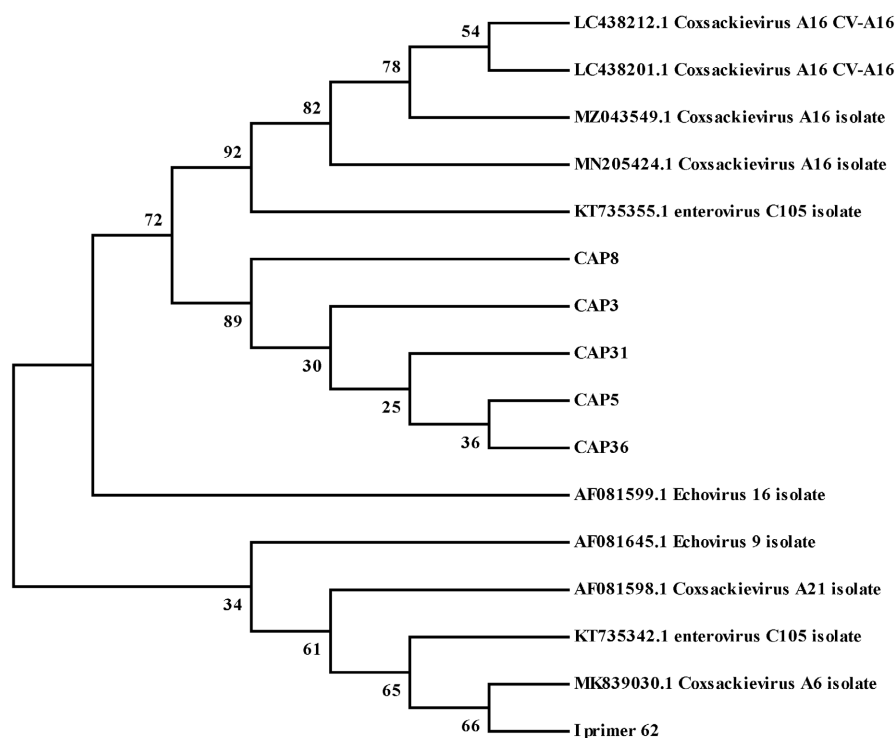
通过测序获得 CA16 阳性标本 5 例的序列分别标记为: CAP3、CAP5、CAP8、CAP31 和 CAP36; EV 其他分型 CA6 序列标记为 I-primer62-1; 这些序列与 NCBI 数据库中公布的代表序列构建进化树。结

果显示, 6 株 EV 与相对应的原型株系聚在一起, 该结果与 NCBI 比对结果一致。具体结果见图 3:

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Coxsackievirus A6 strain CV-A6/SWG79/SD/CHN/2018 polyprotein gene, partial cds	Coxsackievirus A6	800	800	94%	0.0	97.45%	3692	MN541047.1
Coxsackievirus A6 isolate AS521/NC/CHN/2018 capsid protein gene, partial cds	Coxsackievirus A6	787	787	92%	0.0	97.40%	915	MW075641.1
Coxsackievirus A6 isolate CVA6/S3481/BJ/CHN/2016, complete genome	Coxsackievirus A6	784	784	94%	0.0	96.81%	7434	MF285672.1
Coxsackievirus A6 isolate 2856_WZH_GX_CHN_2017 VP1 gene, partial cds	Coxsackievirus A6	782	782	92%	0.0	97.19%	915	MK839030.1
Coxsackievirus A6 isolate 2017-CA6-1413 VP1 gene, partial cds	Coxsackievirus A6	782	782	92%	0.0	97.19%	915	MG385789.1

Figure 2. Diagram of sequencing comparison results on CA6 positive samples

图 2. CA6 阳性标本测序比对结果演示图



注: 该图采用邻近法(Neighbor-joining, NJ)制作病毒株系的基因进化树, bootstrap 值为 525, 树状图的数值表示邻近株系的相似度, CAP36 及 I primer 62 的 CAP 及 I primer 代表 PCR 扩增所用引物, 其后数字表示本研究所用标本号, 其他均为参考株系。

Figure 3. Phylogenetic tree of enterovirus sequences in Hangzhou in 2021

图 3. 2021 年杭州地区肠道病毒序列进化树

4. 讨论

肠道病毒是人类疾病的一个主要来源, 主要发生在婴幼儿身上, 而成年人感染较少[8]。肠道病毒感染主要以 CA16 及 EV71 为主, 但是最近几年, CA6 及 CA10 病毒感染的患者日益增多[7]。肠道病毒主要通过粪口途径及呼吸道方式传播[4]。肠道病毒感染通常无症状或引起轻微临床症状, 也可导致严重的并发症, 包括心肌炎、脑炎、肝炎, 甚至死亡[5]。肠道病毒感染存在着时间性、区域性甚至是季节性等特点, 不同年份、不同地区、不同季节流行的病毒型别都可能会有所区别, 它们可能存在着交替和循环

的现象。因此,对肠道病毒进行分型,从而了解肠道病毒的优势型别显得尤为重要。本研究收集新生儿至1岁内婴儿患者标本60份,分析肠道病毒CA16型及其他病毒的构成情况,收集的标本具有广泛性,包括杭州各个区的医院,在某种程度上能够反应2021年杭州地区肠道病毒的感染情况,了解该地区EV流行趋势,为疾病的诊断及早期治疗提供一定的帮助。

本研究发现肠道病毒CA16阳性数居多,其他肠道病毒阳性所占比例较小,从某种程度上可以说明,2021年杭州地区CA16肠道病毒为优势型别。在本研究中,只发现了一例CA6阳性标本。CA6阳性率低的确切原因还不清楚,样本例数不够或样本采集地区的覆盖率不够广泛可能是部分原因。近年来的数据显示,CA6的感染率在升高,它在很多呼吸道疾病中发挥越来越重要的作用[4]。如重庆2013至2014年的检测结果为CA6阳性率67.2%,其他未分型EV阳性率26.6%,相比之下CA16仅占1.5% [9]。除此之外,在本研究中尚未发现EV71阳性标本,甚至还存在一些EV阳性标本难以判定型别,这也提示在以后的研究中,要更加关注非CA16其他EV型别的扩增实验,对其他型别进一步筛查和鉴定,以更加深入了解EV病毒流行规律,及时发现新的EV型别,从而提高诊断符合率,避免造成大范围的暴发。

肠道病毒感染是一个严重的全球公共卫生问题,尤其多发于婴幼儿时期,严重威胁着婴幼儿的健康及生命安全。肠道病毒主要通过粪-口途径感染(这个已多次提到,显得有些重复),并在其生命周期早期以胃肠道上皮为目标,还可通过呼吸道传播,如肠道病毒D68,不干净的卫生环境及不良的卫生习惯对肠道病毒的传播过程非常重要[10]。婴幼儿尚无安全卫生意识,且各部分器官尚未完全发育成熟,自身免疫力较差,对EV的抵抗力也相对较低,感染机会也就相对增多。所以,本项目的研究对象主要是新生儿至1岁内婴儿患者,旨在阐明其感染肠道病毒的种类及其流行特点,提示家长加强对婴幼儿的监护与管理,降低病毒的感染率,进一步保证婴幼儿的健康成长。

本研究存在一定局限性:由于肠道病毒的种类很多,而且保守序列很短,所以本研究的通用引物筛查肠道病毒阳性病例有一定的假阴性可能;另外本次研究虽然收集杭州多个区的样本,但入组的样本例数还是比较少的,得到的结论可能反映不了整个肠道病毒流行季的趋势;将来有关新生儿不同型别肠道病毒感染还需要增大样本量进行深入研究,以便为临床预防和治疗肠道病毒感染提供有力依据。

基金项目

浙江省医药卫生科技计划项目2019KY524; 杭州市农业和社会发展科研计划20191203B122。

参考文献

- [1] Jiao, M.M.A., Apostol, L.N., de Quiroz-Castro, M., *et al.* (2020) Non-Polio Enteroviruses among Healthy Children in the Philippines. *BMC Public Health*, **20**, Article No. 167. <https://doi.org/10.1186/s12889-020-8284-x>
- [2] 陆利君, 杨丽华, 乔雪飞, 等. 上海市松江区急性呼吸道感染儿童肠道病毒感染状况[J]. 感染病防治, 2017, 29(9): 712-714.
- [3] Gao, C., Ding, Y., Zhou, P., *et al.* (2016) Serological Detection and Analysis of Anti-VP1 Responses against Various Enteroviruses (EV) (*EV-A*, *EV-B* and *EV-C*) in Chinese Individuals. *Scientific Reports*, **6**, Article No. 21979. <https://doi.org/10.1038/srep21979>
- [4] Pogka, V., Emmanouil, M., Labropoulou, S., *et al.* (2020) Molecular Characterization of Enteroviruses among Hospitalized Patients in Greece, 2013-2015. *Journal of Clinical Virology*, **127**, Article ID: 104349. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104349>
- [5] 邓红, 张璇, 宋欣欣, 等. 新疆手足口病非EV-A71非CV-A16肠道病毒的基因分型[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2019, 33(1): 61-63.
- [6] 钟家禹, 李柏生, 朱冰, 等. 2016年至2017年广州市手足口病流行病学及非肠道病毒A组71型非柯萨奇病毒A组16型肠道病毒型别分析[J]. 中华传染病杂志, 2018, 36(12): 747-751.
- [7] 石明芳, 余夏, 钟莹, 等. 手足口病相关病原学研究现状[J]. 医学检验与临床, 2019, 30(9): 34-36.

- [8] Yin, X.G., Yi, H.X., Shu, J., *et al.* (2014) Clinical and Epidemiological Characteristics of Adult Hand, Foot, and Mouth Disease in Northern Zhejiang, China, May 2008-November 2013. *BMC Infectious Diseases*, **14**, Article No. 251. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-251>
- [9] Yan, X., Zhang, Z.Z., Yang, Z.H., *et al.* (2015) Clinical and Etiological Characteristics of Atypical Hand-Foot-and-Mouth Disease in Children from Chongqing, China: A Retrospective Study. *BioMed Research International*, **2015**, Article ID: 802046. <https://doi.org/10.1155/2015/802046>
- [10] Wells, A.I. and Coyne, C.B. (2019) Enteroviruses: A Gut-Wrenching Game of Entry, Detection, and Evasion. *Viruses*, **11**, 460. <https://doi.org/10.3390/v11050460>