

び技術をやり取りすることによって2つの活動が回っていくことを期待している。

本年度は、2009年に発生したコレラ流行に関して、供試菌株 92 株分の疫学情報（発症日、発声地）を入手し、時間—空間推移を検討した。供試菌株の MLVA 型は、同じかその 1 遺伝子座違いのもの（SLV）であり、2007 年流行株とは 2 遺伝子座以上異なっていた（図 1）。

2009 年 4 月 15 日に初発例が出たものの 2 週間は陽性例がなかった。2 週間後の 5 月 2 日から最初のピークが発生した（第一波）。患者の多くはハノイ周辺およびタンホア省であった。5 月 17 日時点の菌陽性例は 36 であった。5 月 18 日より 2 回目のさらに大きなピークが発生した（第二波）。これ以後に発生した菌陽性例は 56 であり、うち 49 例（88%）がバクニン省で発生した。バクニン省は第一波では 36 例中 17 例（47%）を占めていた（図 2）。バクニン省はハノイに隣接しており、コレラの流行が起きやすいと言われているハイフォン省への中間にある（図 3）。

今回、菌陽性例かつほぼ同一の MLVA 型を示すもののみを抽出した形での解析ではあるが、2009 年初夏のコレラ流行が小さな第一

波と大きな第二波からなることが示唆された。各症例間のつながりなどを示す情報がないため、第一波と第二波をつなげる要素もないが、第二波が第一波から派生した汚染源、たとえば、ある地域の共通の飲料水あるいは食材が原因となって発生した可能性も十分に考えられる。

#### D. 結論

コレラ菌を解析していく上で、MLVA の結果など、菌側の情報と、患者からの情報を組み合わせることで、2009 年の流行の状況が以前より明確に示された。コレラの流行は、ヒト、食品、水など様々な経路で急速に広がっていく。NIHE におけるラボの菌株解析能力の向上もさることながら、リアルタイムに患者の疫学情報と組み合わせて対策を講じていくことの重要性も示唆された。

#### E. 健康危機情報

特になし

#### F. 研究発表

特になし

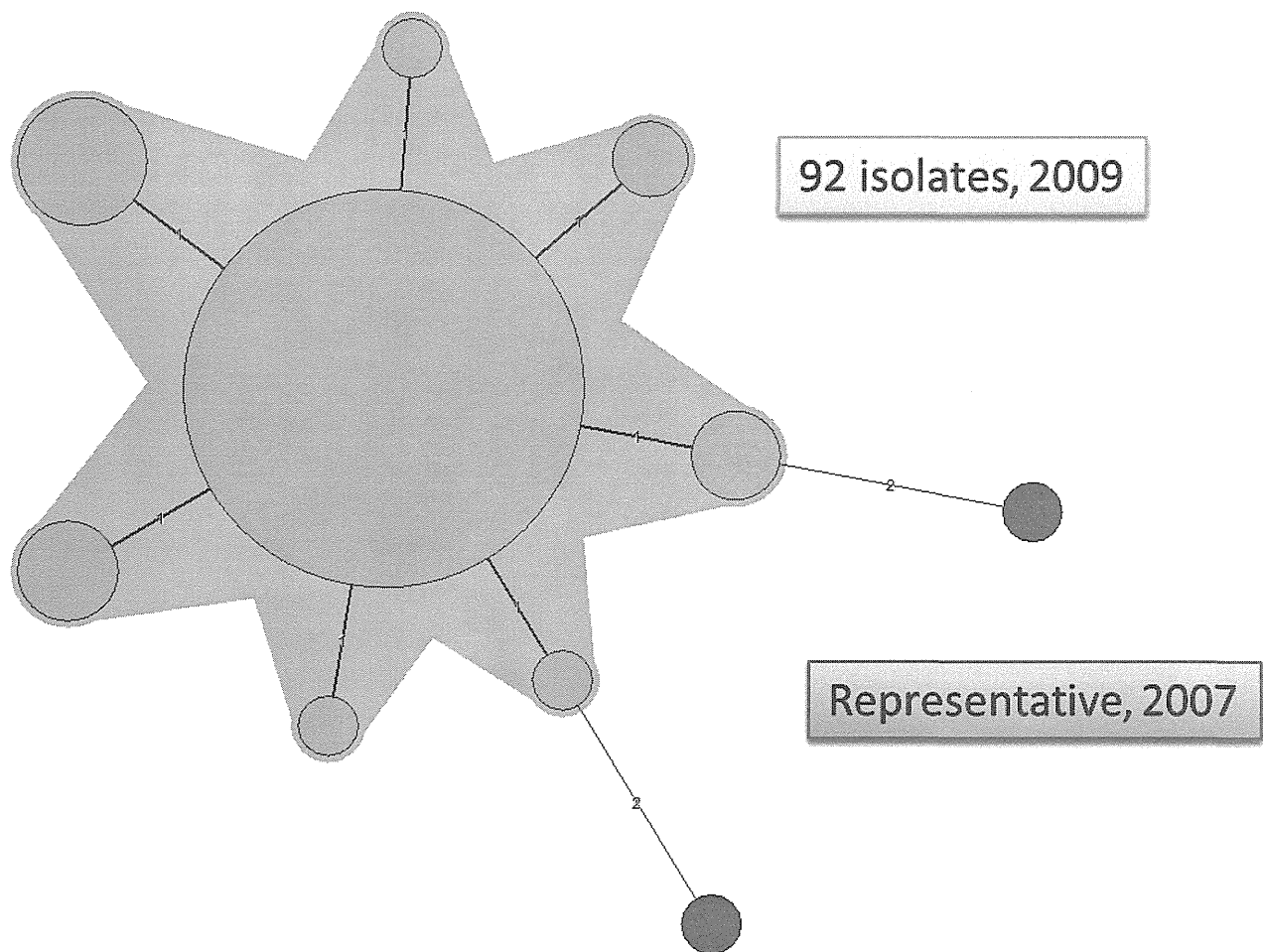


図1. 2009年4-6月コレラ流行菌株(92株)のMLVA型分布と2007年代表株(2株)の比較

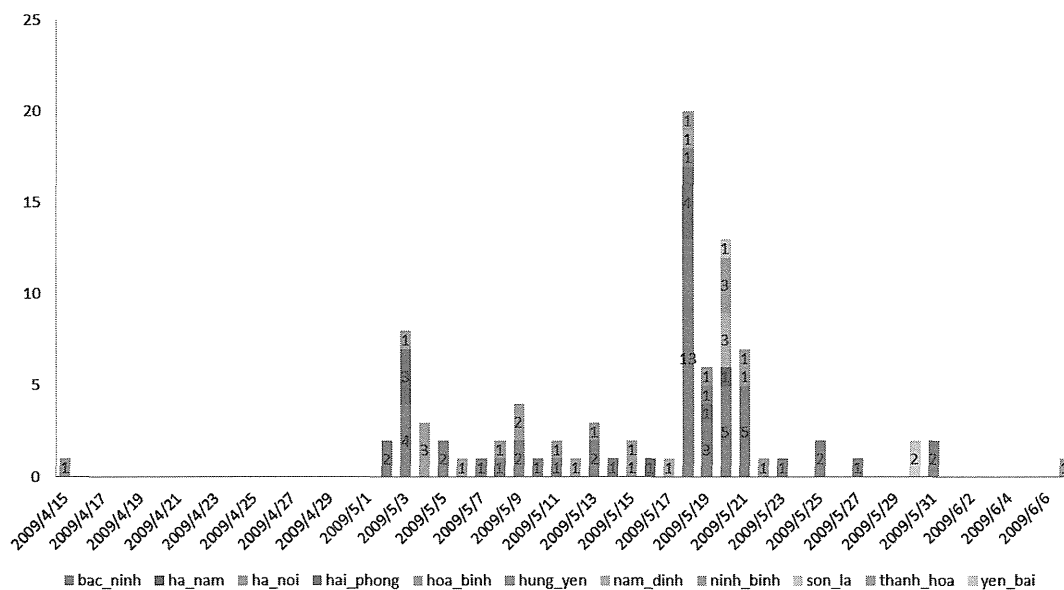


図2. 2009年4-6月コレラ発生状況

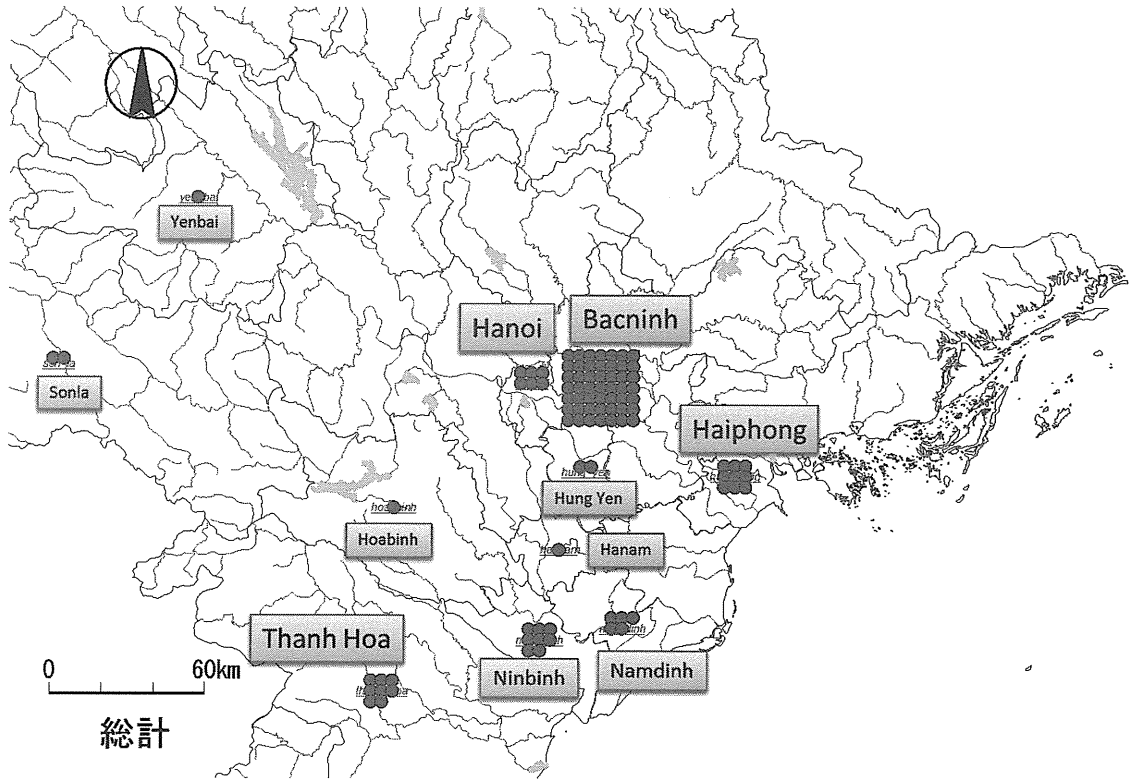


図3. 2009年4-6月コレラ発生地図（ベトナム北部拡大図）

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

アジアの感染症担当研究機関とのレプトスピラ症に関するラボラトリーネットワークの促進と  
共同研究体制の強化に関する研究

研究分担者 小泉信夫 国立感染症研究所 細菌第一部 主任研究官

研究要旨

1. 日本, フィリピンおよびベトナムで分離された *Leptospira interrogans* の分子タイピングを, multiple locus variable-number tandem repeats analysis (MLVA) により行った. MLVA は, これまでの分子タイピング法で同じタイプと分類された異なる血清群分離株を識別できることが明らかとなった. またこれらの国に分布する *L. interrogans* と保有動物の多様性および普遍性が明らかとなった.
2. 血漿から LAMP 法による簡便なレプトスピラ DNA 検出のための, DNA 抽出法を検討した. イオン交換樹脂 Chelex 100 を懸濁バッファーに加えることで, キット精製 DNA と同等の検出感度を得ることができた.

研究目的

レプトスピラ症は, 病原性レプトスピラ (*Leptospira* spp.) の感染によっておこる人獣共通感染症である. レプトスピラは, 交差凝集素吸収試験により 250 以上の血清型に分類されるが, 本試験法は非常に煩雑で実施できる機関は限られている. 近年, 血清学的分類に替わる多くの分子タイピング法が開発されてきた. 我々はこれまで国内のレプトスピラ分離株について, *flaB* シーケンスタイピング (*flaB*-ST) および multi locus sequencing typing (MLST) を行ってきたが, 異なる血清群に属するレプトスピラが同じタイプに分類されるといった問題点が明らかとなってきた. そこで本研究では, multiple locus variable-number tandem repeats analysis (MLVA) によるアジア各国で分離された *L. interrogans* の解析を行った.

またレプトスピラ症はアジアの多くの国で流行しているが, リソースが限られた途上国で実施可能な簡便な診断法は確立されていない. 我々はレプトスピラ DNA 検出法として, 尿からの簡便な DNA 調整による LAMP 法を開発したが, 血液 (血漿) からの検出にはキットを用いた DNA 精製が必要であった. 本研究ではイオン交換樹脂である Chelex 100 を用いた血漿からの簡便な DNA 調整法による LAMP 法の確立を試みた.

方法

1. レプトスピラ DNA

日本, フィリピン, ベトナムで分離されたレプトスピラ *L. interrogans* 91 株 (分離動物: アカネズミ 1 株, イヌ 30 株, オキナワハツカネズミ 1 株, ドブネズミ 23 株, ヒト 30 株, ネコ 3 株, マングース 3 株) のゲノム DNA

を DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)を用いて抽出した。

## 2. MLVA

参考文献1~3にある11種類のプライマーを用いてPCRを行った。PCR産物の塩基配列の決定およびアガロースゲル電気泳動により、各VNTRのコピー数の算定を行った。各分離株の系統解析は、各VNTRのコピー数をもとにBionumericsを用いて行い、系統樹はUPGMA法により作成した。

## 3. レプトスピラ血清群の同定

96穴マイクロタイタープレートに、PBSで希釈したレプトスピラ標準抗血清と、レプトスピラ分離株培養液をそれぞれ25 µlずつ加え、30°C、3時間インキュベートした後、暗視野顕微鏡下で観察を行った。陰性対照と比較して、凝集していないフリーの菌数が50%以下になっている場合を陽性とした。

## 4. 血漿からの *Lepto-rrs* LAMP による簡便なレプトスピラ DNA 検出

ヒト血漿 1 ml あたりレプトスピラ Akiyami B 株が  $10^1 \sim 10^3$  細胞になるように10段階希釈した。調整した血漿 1 ml を遠心分離 (4°C,  $13,000 \times g$ , 10分) にかけて、得られた沈渣を TE 20 µl あるいは 5% Chelex-100 (salt form, Bio-Rad) を含むに TE 20 µl に溶解し、10分間煮沸した (DNA 溶液)。DNA 溶液 2 µl を *Lepto-rrs* LAMP 反応液 23 µl に加え DNA 増幅を行った (参考文献 4)。判定は UV 蛍光の目視で行った。

### 参考文献

1. Majed Z et al., J Clin Microbiol. 43:539, 2005.
2. Slack A et al., J Med Microbiol. 55:1549, 2006.
3. Zuerner RL & Alt DP. J Clin Microbiol. 47:1202, 2009.

4. Koizumi N et al. J Clin Microbiol. 52:2072, 2012.

## 結果および考察

### 1. 日本、フィリピンおよびベトナムで分離された *L. interrogans* の MLVA

昨年度の解析以降に国内で新たに分離された *L. interrogans* の血清群は、標準抗血清との反応性から Australis, Autumnalis, Canicola, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Pomona と同定された。またベトナムのドブネズミから分離されたレプトスピラの血清群は、すべて血清群 Bataviae であった。フィリピンのヒトおよびドブネズミ分離株の3血清群 (Bataviae, Grippotyphosa, Pyrogenes) を加えて11種類のVNTRのコピー数を算定し、UPGMA法で系統樹を作成した (図1)。

昨年度の解析から3血清群が新たに追加されたが、これら血清群もそれぞれのクラスターを形成し、MLVAにより血清群の分類ができることがさらに実証された。一方、沖縄県とフィリピンから分離された血清群 Grippotyphosa および Pyrogenes, 本州と沖縄県の血清群 Icterohaemorrhagiae は明らかに異なるクラスターを形成した (図1)。それぞれのクラスターは血清型の違いを示している可能性があるため、今後各血清型標準株のVNTRを決定し、各クラスターと血清型との関連を明らかにする。

ドブネズミは世界中に分布しているが、地域により保有している血清群が異なることが明らかとなった (図2)。このことから、保有するレプトスピラ血清群を決定することで、ドブネズミの拡散経路に関する新たな知見が得られる可能性が示唆された。一方で、地域により保有血清群が異なることは、特定の血清群を保有したドブネズミが拡散したのではなく、その地域ごとに新たなドブネズミレプトスピラの保有関係が成立したことを示唆

しているのかもしれない。

国内の血清群 *Autumnalis* はアカネズミおよびイヌに特異的なクラスターを形成するが、今年度の解析からヒト患者分離株はイヌと同じクラスターに分類されることが明らかとなった。本研究で解析を行った *L. interrogans* は、急性発症したイヌからの分離株である。したがって、未知の動物がこのレプトスピラ血清群の維持宿主となっていることが示唆されるが、イヌがこの血清群の維持宿主となり、ヒトへの感染源となっている可能性も考えられる。今後、健常イヌの本血清群レプトスピラの保有調査を行い、ヒトへの感染源としての重要性を明らかにする必要がある。

今回の結果から、MLVA はこれまでの分子タイピング法よりも解像度が高いことが明らかとなった。今後、台湾のレプトスピラの解析を行い、東アジアにおけるレプトスピラ分布、保有動物とレプトスピラ分子タイプの関係性を明らかにしていく。

## 2. 血漿からの *Lepto-rrs* LAMP による簡便なレプトスピラ DNA 検出法の開発

LAMP 法は、PCR とは異なり一定の温度で DNA を増幅できるため、高価な機器を必要とせず、リソースが限られた途上国でも適用可能な診断法としてのポテンシャルをもつ。これまで我々は、尿から簡便にレプトスピラ DNA を検出するための *Lepto-rrs* LAMP 法を開発したが、血漿からの DNA 検出にはキットを用いた DNA 精製が必要であった。そこで血漿からも簡便に DNA 検出を行うための DNA 抽出法の検討を行った。その結果、血漿の遠心沈渣を懸濁するバッファーにイオン交換樹脂である Chelex 100 を 5% 加えることによって、検出感度が向上した。Chelex 100 を加えない場合の検出限界は反応系あたり 2000 レプトスピラ細胞であったが、加えることにより反応あたり 2 レプトスピラ細胞と向上し、この検出限界値は、キットを用いて精

製した DNA を使用した場合と同等であった。今後この方法をベトナムで評価する予定である。

## *Lepto-rrs* LAMP のための血漿からの DNA 調整法

血漿

↓ 遠心分離(16,000×g, 10 分間)

遠心沈渣

↓ 5% Chelex 100 を含む TE 20 μl に懸濁

↓ 熱処理 (100°C, 10 分間)

↓ 急冷

↓ 遠心分離(16,000×g, 1 分間)

上清を DNA 検体として使用

MLVA を行うにあたってご協力いただいた泉谷秀昌博士 (国立感染症研究所・細菌第一部) に深謝いたします。

## 論文発表

Koizumi N, Nakajima C, Harunari T, Tanikawa T, Tokiwa T, Uchimura E, Furuya T, Mingala CN, Villanueva MA, Ohnishi M, Suzuki Y. A new loop-mediated isothermal amplification method for rapid, simple, and sensitive detection of *Leptospira* spp. in urine. *J Clin Microbiol* 50: 2072-2074, 2012.

## 学会発表

小泉信夫. レプトスピラ症の現状. 第 12 回人と動物の共通感染症研究会学術集会. 2012 年 11 月.

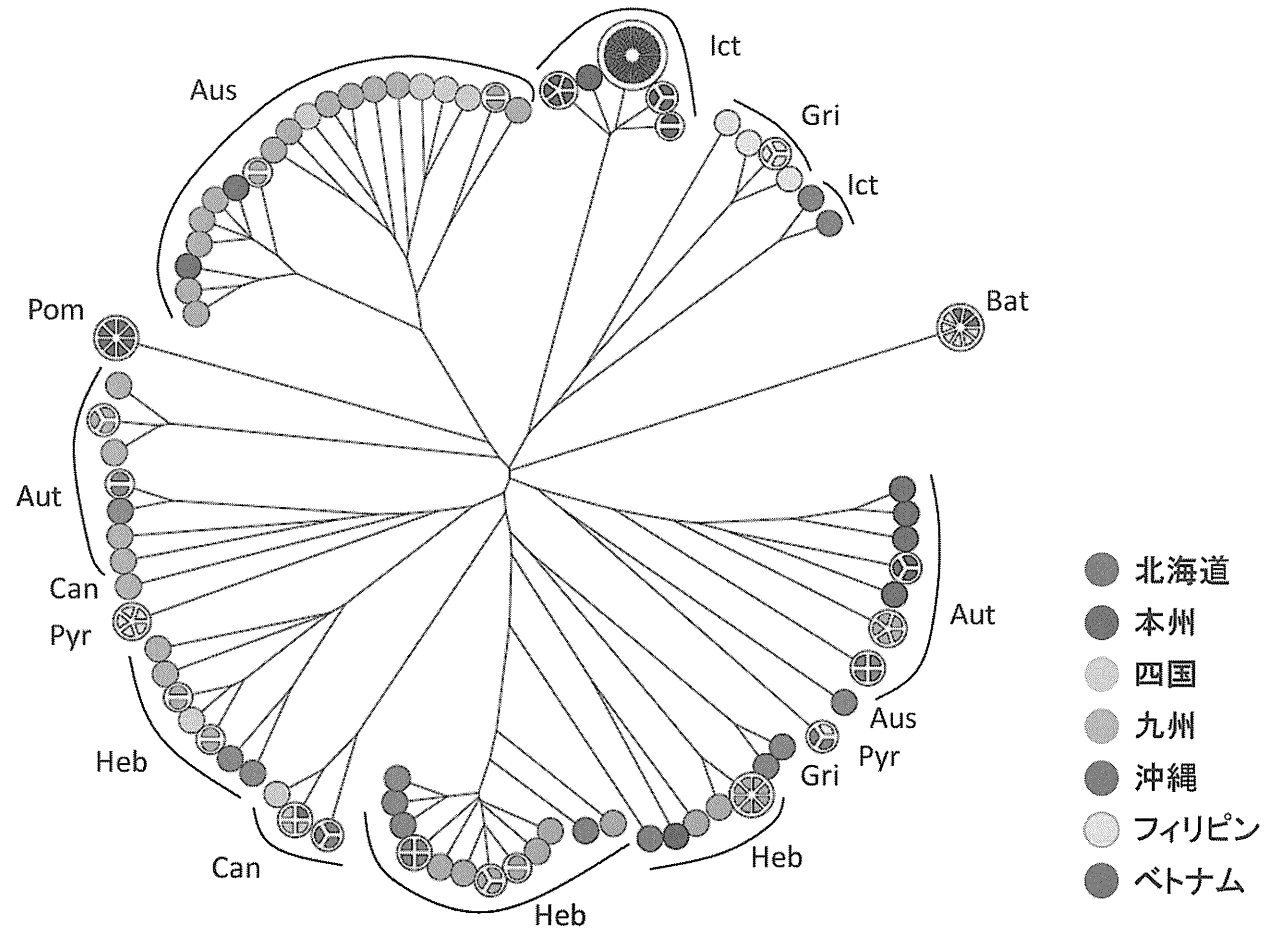


図1. MLVAによる日本、フィリピン、ベトナムで分離された *L. interrogans* の系統樹  
各アルファベットは血清群を表す: Aus; Australis, Aut; Autumnalis, Bat; Bataviae, Can; Canicola, Gri; Grippotyphosa, Heb; Hebdomadis, Pom; Pomona, Pyr; Pyrogenes.

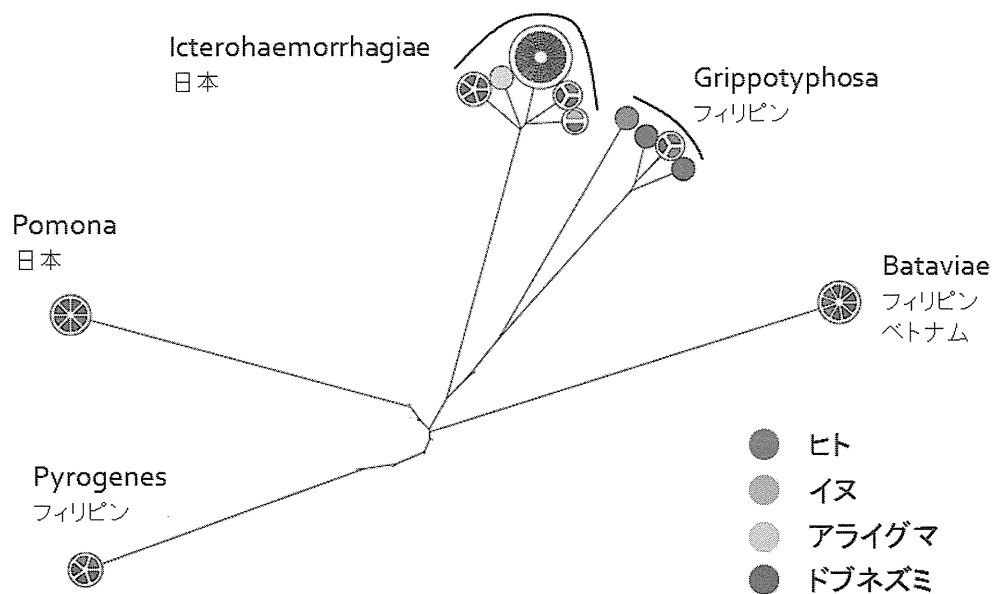


図 2. MLVA による日本, フィリピン, ベトナムのドブネズミから分離された *L. interrogans* の系統樹 (図 1 より抜粋).

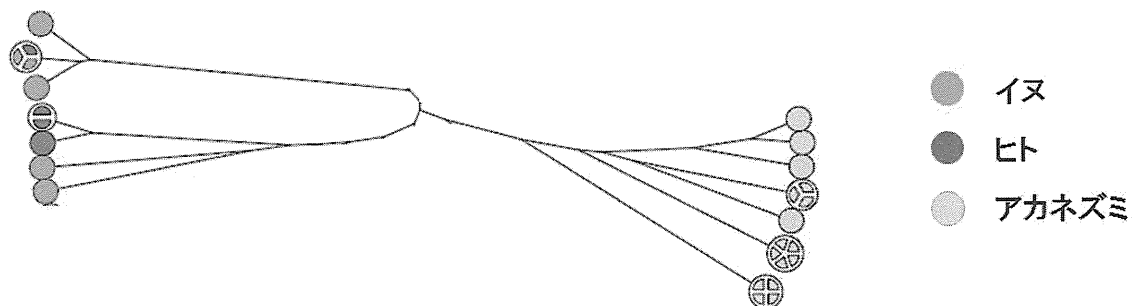


図 3. MLVA による日本のヒト, イヌおよびアカネズミから分離された *L. interrogans* 血清群 Autumnalis の系統樹 (図 1 より抜粋).



厚生労働科学研究費補助金

平成 24 年度 新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業 (アジア指定研究)  
アジアの感染症担当研究機関とのラボラトリーネットワークの促進と共同研究体制の強化に関する研究

Epidemiology and molecular characteristics of the hand, foot, and mouth disease in the North of Vietnam  
北部ベトナムにおける手足口病の疫学とウイルス遺伝子解析

研究分担者： 清水博之

国立感染症研究所 ウイルス第二部

研究分担者： Nguyen Thi Hien Thanh

National Institute of Hygiene and Epidemiology

研究要旨

ベトナムでは、近年、死亡例・重症例を含む手足口病あるいはエンテロウイルス 71 (EV71) 感染症の流行が報告されている。2011-2012 年には、ベトナム全土で多くの死亡例を含む大規模な手足口病流行が発生し、公衆衛生上の大きな問題となっている。2011 年の手足口病流行期における、北部ベトナムにおける手足口病患者由来検体から、エンテロウイルスの検出・同定を行った。エンテロウイルス陽性検体の半数弱からエンテロウイルス 71 が検出され、その他のエンテロウイルスの中ではコクサッキーA6 型およびコクサッキーA16 型が比較的多く検出された。2011 年のエンテロウイルス 71 分離株の分子疫学的解析を行ったところ、遺伝子型 C4 が比較的多く検出されたが、遺伝子型 B5 と C5 も同時期に伝播していたことが明らかとなった。重症エンテロウイルス 71 感染症の流行が発生しているベトナムでは、手足口病関連エンテロウイルスの病原体サーベイランスは引き続き重要であり、エンテロウイルス 71 遺伝子型の推移と重症例を含む手足口病流行との関連について、今後も注視が必要である。

A. 研究目的

手足口病は、発疹を特徴とした発熱性疾患で、予後の良い一般的なエンテロウイルス感染症のうちの 1 つである。しかし、1990 年代後半以降、とくに東アジア地域で、エンテロウイルス 71 (EV71) による小児の急性死症例を含む重症エンテロウイルス感染症の大規模な流行が多発し、大きな社会問題となっている。1990 年代後半には、マレーシアおよび台湾で EV71 脳炎による多数の死亡例を伴う大規模な手足口病流行が発生し、2000 年代に入ってから、シンガポール、オーストラリア、香港、ベトナム、日本等アジア各国で、EV71 等による手足口病流行が報告されている。ベトナムでは近年、重症例・死亡例を含む手足口病流行が報告されている。南部を中心としたベトナムでは、2005 年以来、中枢神経系合併症を伴う手足口病流行が報告されており、2011-2012 年に発生した大規模な手足口病流行の際には、200 例以上の死亡例が報告されている。また、隣国カンボジアで 2012 年に発生した小児急性死症例流行の際には、死亡例から高頻度に EV71 が検出されており、他のベトナム同様、EV71 急性脳炎がカンボジアにおける小児急性死症例の流行に関与していた可能性が高い。

カプシド VP1 領域の塩基配列をもとにした分子系統解析によると、近年、東アジア地域で分離された EV71 は、すべての分離株が、2 種類の遺伝子型である genogroup B および genogroup C に大きく分かち、さらに subgenogroup B1~B5 および C1~C5 に細分類される。1990 年代後半以降、おもに、B3 および B4、C1 および C2 が、東アジアの多くの地域で分離されており、1997 年のマレーシア、1998 年の台湾における EV71 脳炎をともなう大規模な手足口病流行では、それぞれ、B3 および C2 が主要な流行株であった。ベトナムでは、従来、地域固有の C5 が主要な遺伝子型であったが、2011-2012 年の手足口病流行の主要な原因ウイルスは遺伝子型 C4 であり、2012 年にカンボジアで死亡例から検出された EV71 も遺伝子型 C4 と報告されている。中国の EV71 分離株 C4 と分子疫学的関連性の高い C4 株は、台湾、日本、オーストラリア等でも報告されているが、いまのところ EV71 重症例の大規模流行には関与していない。ベトナム北部で伝播している EV71 の分子疫学的解析は、今のところほとんど報告されていない。

東アジアの多くの地域からは、多様な遺伝子型を有し、かつ、他の地域で分離されるウイルスと分子疫学的関連性の高い EV71 が多く分離されている。EV71 分離株の分子系

統解析によると、特定の EV71 遺伝子型と疾患の重篤化との明確な関連性は認められていないが、2011-2012 年に重症例・死亡例を伴う大規模な手足口病流行が発生したベトナムで分離された EV71 分離株の分子疫学的解析およびウイルス学的解析は重要である。本研究では、ベトナム National Institute of Hygiene and Epidemiology (NIHE) および感染研ウイルス第二部とのあいだの疫学および実験室診断技術に関する情報共有を基盤として、ベトナム北部における手足口病の疫学的解析および EV71 分離株の分子疫学的解析を行う。

## B. 研究方法

北部ベトナムでは、重症例を含む手足口病疾患サーベイランス体制は十分確立されていない。また、疾患サーベイランスも基づく実験室診断体制も完全には整備されていないが、NIHE では、北部ベトナムの手足口病症例に由来する臨床検体を用いたエンテロウイルス遺伝子検出およびシーケンス解析によるエンテロウイルス同定および分子疫学的解析を実施している。NIHE における手足口病実験室診断の概要を以下に示す(図 1. Dr Nguyen Thi Hien Thanh 提供資料)。

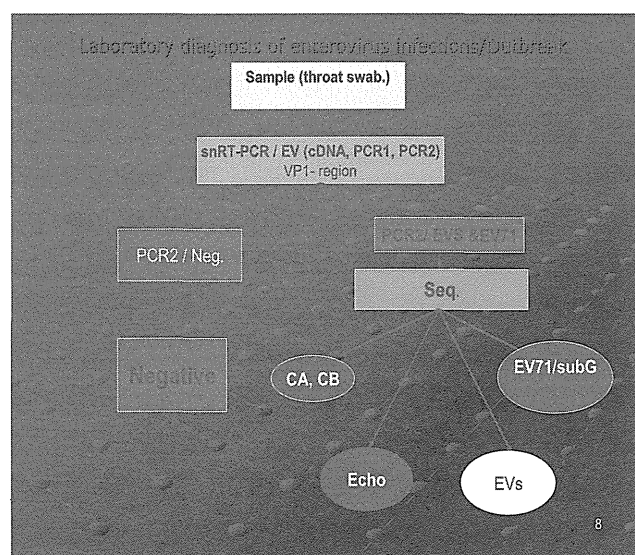


図 1

NIHE において、主として 2011 年の手足口病患者から検出されたエンテロウイルス VP1 領域の塩基配列解析によりウイルス型別を同定し、一部の EV71 株について分子系

統解析を行った。

ベトナムにおける手足口病流行およびエンテロウイルス病原体サーベイランスに関する最新情報は、ベトナム NIHE 側研究分担者である Dr Nguyen Thi Hien Thanh から情報提供を受けた。詳細な研究方法については、NIHE 側研究分担者による研究報告書(添付資料)に記載した。

本年度は、主として 2011 年に発症したベトナム北部の手足口病患者由来臨床検体(咽頭拭い液、発疹拭い液、糞便)を用いた解析を行った。検体は常法に従って調整し、遺伝子検査およびウイルス分離試験に供した。検体から抽出した RNA を鋳型にした semi-nested RT-PCR 法により VP1 部分領域を増幅し、電気泳動によるサイズを確認後ゲルから増幅 DNA を精製した。増幅 DNA を鋳型として塩基配列解析を行い、RNA 配列の相同性により、エンテロウイルス血清型(serotype)あるいは型(type)を同定した。EV71 分離株のうち、代表的な株について VP1 遺伝子をもとにした分子系統解析により、EV71 遺伝子型を判別した。

## C. 研究結果

- 1) エンテロウイルス遺伝子検出・遺伝子解析によるベトナム北部の手足口病患者由来臨床検体(2011 年)から検出されたエンテロウイルスの型別

ベトナム北部の手足口病患者に由来する 912 検体のうち、pan-enterovirus snRT-PCR による遺伝子検出により、603 検体(64%)がエンテロウイルス遺伝子陽性であり、エンテロウイルス陽性検体のうち、275 検体(エンテロウイルス陽性検体中 46%)が EV71 と同定された。塩基配列解析によりエンテロウイルス型別を行った EV71 以外の 328 検体のうち、177 検体(54%)がコクサッキーウイルス A6 型(CVA6)、102 検体(31%)がコクサッキーウイルス A16 型と同定された。その他、コクサッキーウイルス A 群および B 群ウイルス等、多様な型のエンテロウイルスが同定された。

- 2) ベトナム北部の手足口病患者検体(2011 年)から検出された EV71 の遺伝子型

検出された EV71 株のうち 49 株について VP1 領域の塩基配列解析を行い、分子系統解析を行った。2011 年の手足口病流行時に北部ベトナムの手足口病症例から検出された EV71 株では、異なる 3 種類の遺伝子型(EV71

subgenogroup B5, C4, C5) が認められた。2011 年の EV71 株で、もっとも高頻度で検出された EV71 遺伝子型は (EV71 全体の 74%)、中国で伝播している EV71 株と分子系統学的に近縁である C4 型であった。遺伝子型 B5 (20%) および 2005 ~ 2009 年にかけて北部ベトナムにおける EV71 分離株の主要な遺伝子型であった遺伝子型 C5 (6%) も少数例から検出された。遺伝子型 C4 は、2010 年から高頻度に検出され、2011 年の手足口病流行時には主要な原因ウイルスとなった。

感染研ウイルス第二部では、ベトナム固有の遺伝子型である遺伝子型 C5 株 (209-VN 株、2006 年分離株) についてウイルスストックを作製し、分子系統解析およびウイルス学的性状を解析した。また、日本で分離された C4 株 (75-Yamagata) は、ベトナムおよび中国本土で伝播している C4 株と分子系統学的に近縁であることから、遺伝子型 C4 株標準株としてウイルス学的性状の解析に用いている。

#### D. 考察および今後の研究方針

ベトナムでは、2005 年以来、重症例・死亡例を含む手足口病流行が断続的に報告されている。北部ベトナムでは、重症例を含む手足口病病原体サーベイランス体制は十分確立されておらず、重症例を含む手足口病原因ウイルスは、これまで明らかになっていなかった。2011 年のベトナム北部の手足口病患者由来臨床検体から検出されたエンテロウイルス型別により、始めて、この地域の手足口病原因ウイルスのトレンドが明らかとなった。手足口病原因ウイルスとして、EV71 が高頻度に検出されたが、近年、日本を含めた東アジア地域でも広範な伝播が報告されている CVA6 型も比較的高頻度に検出された。CVA6 は、日本では従来、他のコクサッキー A 群ウイルスとともに、ヘルパンギーナの主要な原因ウイルスであったが、2008 年以降、手足口病事例からの検出頻度が増加し、2011 年には大規模な手足口病の主要な原因ウイルスとなった。手足口病および爪甲脱落症の発症に関与する最近の CVA6 と、従来、ヘルパンギーナ発症に関与していた CVA6 は、異なる病原性を有することが示唆されることから、日本およびベトナムで分離された CVA6 の分子疫学的解析が、今後必要とされる。

ベトナムで近年伝播している EV71 分離株の分子疫学的解析を行ったところ、半数以上の 2011 年分離株が、中国で継続的に伝播している遺伝子型 C4 と同じ遺伝子型に属

することが明らかとなった。遺伝子型 C4 の EV71 株と分子系統学的に近縁な EV71 分離株は、中国本土以外、台湾、日本、ベトナム等でも近年報告されている。また、2012 年にカンボジアで流行した重症エンテロウイルス感染症流行事例の多くから検出された EV71 も遺伝子型 C4 と報告されている。2005 ~ 2009 年にかけて北部ベトナムにおける EV71 分離株の主要な遺伝子型はベトナム固有の遺伝子型 C5 だったが、2010 年から遺伝子型 C4 が高頻度に検出され、2011 年の手足口病流行時には主要な原因ウイルスとなった。ベトナムでは、近年、主要な EV71 遺伝子型が C5 から C4 に入れ替わった可能性が示唆された。しかし、2011 年には、遺伝子型 B5 および従来型の C5 も検出されており、EV71 遺伝子型の推移と重症例を含む手足口病流行との関連について、今後も注視が必要である。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表 (分担執筆した報告書等を含む)

- 1) Burns CC, Shaw J, Jorba J, Bukbuk D, Adu F, Gumede N, Pate MA, Abanida EA, Gasasira A, Iber J, Chen Q, Vincent A, Chenoweth P, Henderson E, Wannemuehler K, Naeem A, Umami RN, Nishimura Y, Shimizu H, Baba M, Adeniji A, Williams AJ, Kilpatrick DR, Oberste MS, Wassilak SG, Tomori O, Pallansch MA, Kew O. Multiple Independent Emergences of Type 2 Vaccine-Derived Polioviruses during a Large Outbreak in northern Nigeria. *J Virol* (in press)
- 2) Fukuhara M, Iwami S, Sato K, Nishimura Y, Shimizu H, Aihara K, Koyanagi Y. Quantification of the dynamics of enterovirus 71 infection by experimental-mathematical investigation. *J Virol* 87: 701-705, 2012
- 3) Nishimura Y, Shimizu H. Cellular receptors for human enterovirus species a. *Front Microbiol* 3: 105, 2012
- 4) Nakajima N, Kitamori Y, Ohnaka S, Mitoma Y, Mizuta K, Wakita T, Shimizu H, Arita M. Development of a transcription-reverse transcription concerted reaction method for specific detection of human enterovirus 71 from clinical specimen. *J Clin Microbiol* 50: 1764-1768, 2012
- 5) Wong KT, Ng KY, Ong KC, Ng WF, Shankar SK, Mahadevan A, Radotra B, Su JI, Lau G, Ling AE, Chan KP, Macorelles P, Desai AS, Ravi V, Nagata N, Shimizu H, Takasaki T. Enterovirus 71 encephalomyelitis and Japanese encephalitis

can be distinguished by topographic distribution of inflammation and specific intraneuronal detection of viral antigen and RNA in the central nervous system. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 38: 443-453, 2012

- 6) Fujimoto T, Iizuka S, Enomoto M, Abe K, Yamashita K, Hanaoka N, Okabe N, Yoshida H, Yasui Y, Kobayashi M, Fujii Y, Tanaka H, Yamamoto M, Shimizu H: Hand, Foot, and Mouth Disease Caused by Coxsackievirus A6, Japan, 2011. *Emerg Infect Dis* 18: 337-339, 2012
- 7) 清水博之: 東アジア地域を中心とした手足口病流行の現状、感染症 2013 (印刷中)
- 8) 清水博之: 手足口病、特集「感染症動向 2013」、*メディカル朝日* 1、28-30, 2012
- 9) 清水博之: 手足口病の問題点. *小児科* 53: 751-758, 2012
- 10) 増本久人、南亮仁、野田日登美、江口正宏、古川義朗、鶴田清典、中田恵子、左近(田中)直美、山崎謙治、高尾信一、Tao Zexin, Xu Aiqiang, Zhang Yong, Xu Wenbo, 藤本嗣人、花岡希、小長谷昌未、吉田弘、清水博之. 国内外における手足口病流行に関与するコクサッキーウイルスA6型の遺伝子解析. *病原微生物検出情報* 33: 60-61, 2012
- 11) 藤本嗣人、花岡希、小長谷昌未、岡部信彦、榎本美貴、小林正明、吉田弘、清水博之. 2011年に手足口病患者から検出されたコクサッキーウイルスA6型の遺伝子配列. *病原微生物検出情報* 33: 61-62, 2012
- 12) 武知茉莉亜、乾未来、福島若葉、中野貴司、清水博之. 手足口病・ヘルパンギーナおよび関連合併症の入院症例に関する全国調査(2010年分) —中間集計結果. *病原微生物検出情報* 33: 63-64, 2012
- 13) 清水博之. 手足口病(エンテロウイルス71) ワクチン開発の現状. *病原微生物検出情報* 33: 65-66, 2012
- 14) A Guide to Clinical management and Public

Health Response for Hand Foot Mouth Disease (HFMD), WHO report, 2011 (分担執筆)

## 2. 学会発表等

- 1) 町田早苗、清水博之: 小児無菌性髄膜炎患者から検出されたエンテロウイルスの分子疫学的解析. 第60回 日本ウイルス学会学術集会. 大阪、11月14日, 2012
- 2) Shimizu H. Hand, foot, and mouth disease and Enterovirus 71 infection. NIID-China CDC meeting on Collaborative Research meeting, 21 November, Tokyo, 2012
- 3) Shimizu H. Genetic and Phenotypic Diversity of Enterovirus 71. Current Progress in Enterovirus 71 Research in the Asia-Pacific Region, Tokyo, 30 August, 2012
- 4) Lee H, Cifuentes JO, Carnegie MS, Markoff A, Conway J, Shimizu H, Tano Y, Nishimura Y, Hafenstein S. The cryoEM structure of EV71 bound by fragments of neutralizing antibody predicts a mechanism of neutralization by crosslinking and competition with PSGL-1. EUROPIC 2012. Saint Raphaël, France, 3-7 June, 2012
- 5) Umami RN, Hosomi T, Nishimura Y, Shimizu H. Genetic analysis of PSGL-1-tropic enterovirus 71 isolates from clinical samples. EUROPIC 2012. Saint Raphaël, France, 3-7 June, 2012

## Laboratory diagnosis of enteroviruses from cases with Hand, Foot, and Mouth Disease in 2011-2012 in Vietnam North

Name of researcher: Nguyen Thi Hien Thanh

Tran Nhu Duong

### Specific objectives:

1. Identification of causative agents and epidemiological characteristics of HFMD
2. Identification of molecular characteristics of EV71,

### Virological Investigation of Hand, Foot, and Mouth Disease, Northern Vietnam, 2011

#### Abstract

603 / 912 clinical samples from patients with hand, foot and mouth disease in 2011 collected from Northern provinces of Vietnam are positive with enteroviruses including 275 positive samples with HEV71 (45,6%) and 328 positive samples with other enteroviruses (54,4%). As the result of 328 sequenced PCR products, 177 samples were identified as Coxsackievirus A6 (53,9%), 102 as Coxsackie A16 (31,3%), 4,6% as other CoxsackieA viruses including type 3, 10, 12 and 13; 0,6% as Coxsackievirus type B; 4,3% as echo viruses; and 0,9% as Polio-Sabin virus and enteroviruse typ 96, 15 samples were identified as Rhinovirus (4,6%). Phylogenetic analysis of 49 HEV71 strains showed 2 genogroups B and C with 3 subgenogroups B5, C4 and C5 that cocirculated in norththern Vietnam in 2011. However, viruses belonging to subgenogroup C4 predominated with 73.5% and after is 20.4 % as B5, only 6.1% as subgenogroup C5 that circulated during a long period before. Disease was mainly detected in children under 3 years of age

**Keywords:** Hand, Foot and Mouth Disease, enterovirus, human enterovirus 71, coxsackie virus A6, A16; coxsackie virusB5; Echo virus30

#### Introduction

Hand, foot, and mouth disease (HFMD) is a common febrile illness of early childhood, characterized by 3–4 days of fever and the development of a vesicular enanthem on the buccal mucosa, gums, and palate and a papulovesicular exanthem on the hands, feet, and buttocks (*1*). HFMD is caused by acute enterovirus infections, particularly by viruses belonging to the human enterovirus A (HEVA) species

The genus *Enterovirus* of the family *Picornaviridae* is divided into 9 species, 5 of which infect humans. These viruses include the prototype species poliovirus, as well as HEVA, HEVB, HEVC, and HEVD. Viruses belonging to the HEVA species include 11 serotypes of coxsackievirus A (CVA; serotypes 2–8, 10, 12, 14, and 16), and human enterovirus 71 (HEV71)

Since the discovery of HEV71 in 1969 , numerous outbreaks of this infection have occurred throughout the world, the prevalence of HEV71 infection in the Asia-Pacific region has greatly increased since 1997, concurrent with an increase in the prevalence of HFMD, HFMD outbreaks have been recorded in Japan, Malaysia, Singapore, South Korea, the People's Republic of China, and Australia, The most extensive epidemic of HEV71 occurred in Taiwan in 1998, with  $\approx 1,3 \times 10^5$  cases of HFMD, 405 cases related to severe neurologic syndrome , and 78 deaths, The deaths were due primarily to the development of brainstem encephalitis and neurogenic pulmonary edema

In 2003, we isolated HEV71/C4 from 01 patient with HFMD and have relation to severe neurologic syndrome, In 2008, a HFMD outbreak happened in the north of Vietnam and we isolated HEV71/C5 from 7 patients in this outbreak, Although laboratory surveillance has been shown to provide adequate warning of impending outbreaks of enteroviruses associated HFMD, laboratory surveillance for enteroviruses from patient with HFMD has not yet been established

A reverse transcription-semi-nested PCR (RT-snPCR) assay was developed for the detection RNA of EVs and EV71 from clinical specimens. The VP1 RT-snPCR assay was slightly more sensitive, and was used to identify EVs in clinical specimens. A product of the expected size was successfully amplified and sequenced from clinical samples, The VP1 sequences derived from the RT-snPCR products allow rapid phylogenetic and molecular epidemiologic analysis of strains circulating during the EV season and comparison with EV sequences from past seasons or from different locations around the world,.

## Materials and Methods

### Specimen Collection

A total of 922 specimens were collected from the children with HFMD. Each child had at least 1 specimen collected from vesicle fluid, throat swab, or stool. 20% of specimens in PBS (+) were treated with chloroform (1:10 in phosphate-buffered saline) before use for virus isolation in cell culture and molecular biology

Table 1, Primer used for research

AN32	5-GTYTGCCA	cDNA	3009- 3002	
AN33	5-GAYTGCCA		3009- 3002	
AN34	5-CCRTCRTA		3111- 3104	
AN35	5-RCTYTGCCA		3009- 3002	
SO224-F	5-GCIATGYTIGGIACICAYRT	PCR1	2207- 2226	762

SO222R	5-CICCIGGIGGIAYRWACAT		2969- 2951	
AN89F	5-CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG	<i>PCR2/EVs</i>	2602- 2627	375
AN88R	5-TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACAT		2977- 2951	
MAS01S	5'- ATAATAGCA(C/T)T(A/G)GCGGCAGCCCA -3')	<i>PCR2/EV71</i>	2352- 2375	376
MAS02A	5' – AGAGGGAG(A/G)TCTATCTC(C/T)CC -3')		2709- 2728	

**RNA extraction,** Stool suspensions were prepared by adding 5 ml of phosphate-buffered saline (+), 1 g of glass beads (Corning Inc., Corning, NY), and 0,5 ml of chloroform to 1 g of stool sample, shaking the mixture vigorously for 20 min in a mechanical shaker, and centrifuging at 1,500  $\times$  g for 20 min at 4°C (33), the supernatant was transferred to a fresh tube, (10% stool suspensions),

140  $\mu$ l of the specimen extract was combined with an equal volume of Vertrel XF (Miller-Stephenson Chemical Co., Danbury, CT), shaken vigorously, and then centrifuged at 13,000  $\times$  g for 1 min at room temperature, The aqueous phase was transferred to a fresh tube, Other specimen types (including blister fluid; throat swab samples) were processed without pretreatment, Twenty micrograms of proteinase K (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) was added to 140  $\mu$ l of each liquid specimen or fecal extract, and the mixture was then incubated for 30 min at 37°C, Nucleic acid was extracted from the digested specimen with a QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN, Inc., Valencia, CA), which was used according to the manufacturer's instructions, The eluted RNAs were passively dried in a benchtop desiccator under vacuum, The dried RNA was resuspended in 16  $\mu$ l of sterile nuclease-free water and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use,

### **RT-snPCR and sequencing.**

- Synthesis of cDNA was carried out in a 5 µl reaction mixture containing 4 µl of RNA and 1 pmol each cDNA primer (primers AN32, AN33, AN34, and AN35; Table 1), heat mix in a 70°C heat block for 5 min and immediately chill in ice water for at least 5 min.

In a 20 µl reaction mixture containing 05 µl RNA reaction mixture, 100 µM each deoxynucleoside triphosphate (dNTP; Invitrogen), 4 µl of 5 x reaction buffer (GoStrip, Promega), 1.5 µl MgCl<sub>2</sub>, 20 U of RNasin (Promega Corp., Madison, WI), and 100 U of GoScript reverse transcriptase (Rocke), incubation at 25°C for 05 min, 42°C for 60 min, and 70°C for 15 min

- Synthesis of PCR1: Following incubation, the entire 05 µl RT reaction mixture was then used in the first PCR (final volume, 25 µl) (PCR1), consisting of 5 µl of 10 x PCR buffer (Roche Applied Science), 200 µM each dNTP, 50 pmol each of primers 224 and 222 (Table 1), and 2,5 U of *Taq* DNA polymerase (Roche Applied Science), with 40 cycles of amplification (95°C for 30 s, 42°C for 30 s, 60°C for 45 s),

One microliter of the first PCR was added to a second PCR (PCR2/EV71) for seminested amplification, PCR2/EV71 contained 40 pmol each of primers MAS01S and MAS02A (Table 1), 200 µM each dNTP, 5 µl of 10 x FastStart *Taq* buffer (Roche Applied Science), and 2,5 U of FastStart *Taq* DNA polymerase (Roche Applied Science) in a final volume of 50 µl, The FastStart *Taq* polymerase was activated by incubation at 95°C for 6 min prior to 40 amplification cycles of 95°C for 30 s, 60°C for 20 s, and 72°C for 15 s, The reaction products were separated and visualized on 2% agarose gels containing 0,5 µg ethidium bromide per ml

One microliter of the first PCR was added to a second PCR (PCR2/EV) for seminested amplification, PCR2 contained 40 pmol each of primers AN89 and AN88 (Table 1), 200 µM each dNTP, 5 µl of 10 x FastStart *Taq* buffer (Roche Applied Science), and 2,5 U of FastStart *Taq* DNA polymerase (Roche Applied Science) in a final volume of 50 µl, The FastStart *Taq* polymerase was activated by incubation at 95°C for 6 min prior to 40 amplification cycles of 95°C for 30 s, 60°C for 20 s, and 72°C for 15 s, The reaction products were separated and visualized on 1,2% agarose gels containing 0,5 µg ethidium bromide per ml and were purified from the gel by using a QIAquick gel extraction kit (QIAGEN), Slight variations in the sizes of the PCR products (350 to 400 bp) were observed due to VP1 gene length differences in the different serotypes, as described previously (12–14, 19), The resulting DNA templates were sequenced with a BigDye Terminator v1,1 ready reaction cycle sequencing kit on an ABI Prism 3100 automated sequencer (both from Applied Biosystems, Foster City, CA) by using primers AN89 and AN88 (Table 1),

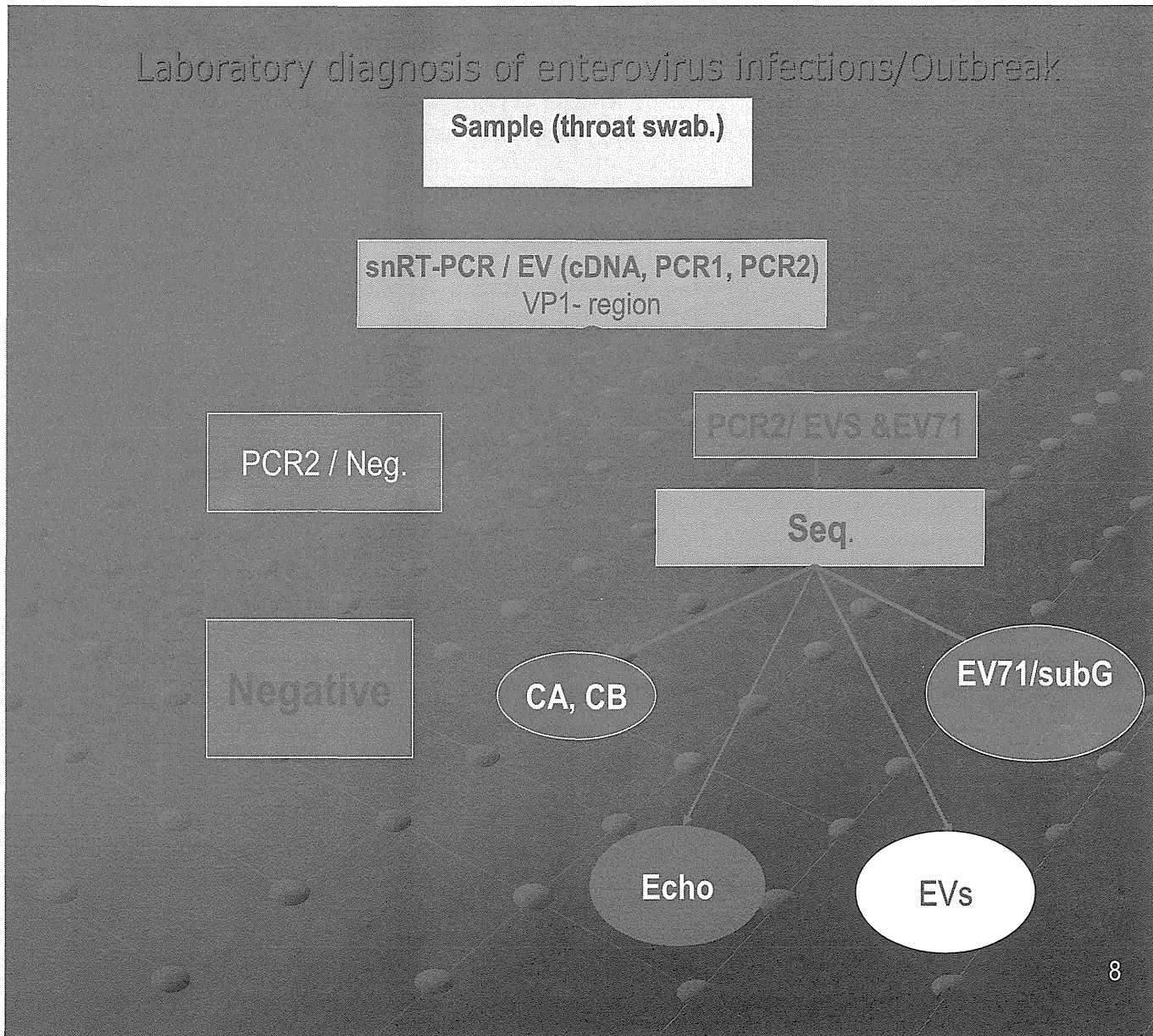
**Sequence analysis:** The amplicon sequences were compared with the VP1 sequences of EV reference strains, including at least one representative of each recognized serotype, by script-driven sequential pair wise comparison with the program Gap (Wisconsin Sequence Analysis Package, version 10,2; Accelrys, Inc., San Diego, CA), as described previously (15, 18, 19), In cases where the result was not unequivocal (highest score less than 75% or second-highest score greater than 70%), the deduced amino acid sequences were compared by a similar method,

### **Statistical Methods**

Differences between proportions were tested by using the  $\chi^2$  test with Yates correction or Fisher exact test, Epi Info version 6 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA) was used for the analysis,



Laboratory diagnosis of enterovirus infections/Outbreak



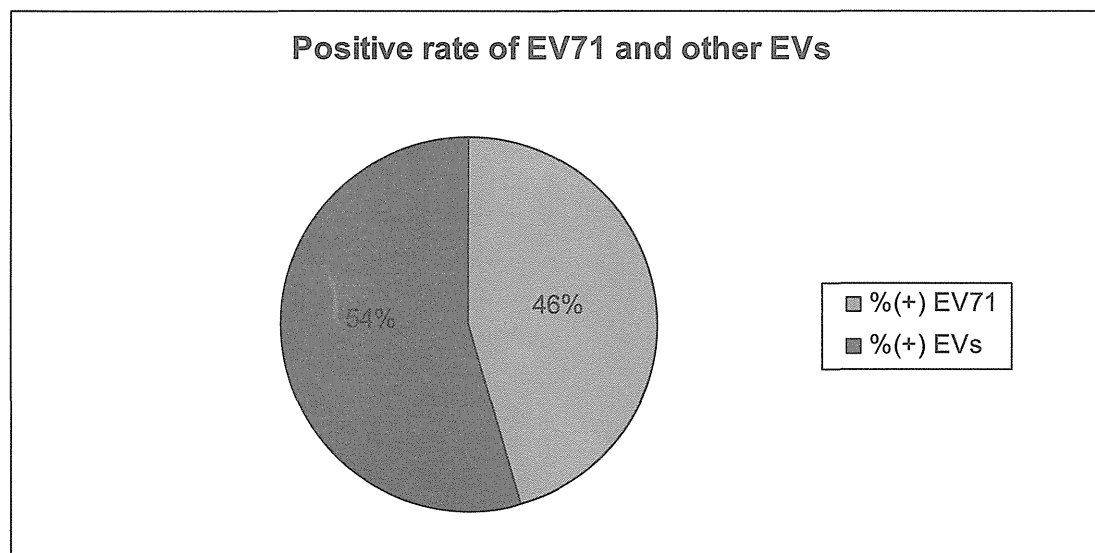
Flow chart for detection of all enterovirus serotypes from clinical samples

## RESULTS

### 1. Enteroviruses was protected by snRT-PCR and Seq.

**Table1. Result of Enteroviruses anf EV71 by snRT-PCR in 2011**

N report	N collected samples	% tested	N (+)	% (+)	(+ EV71		(+ Enterovirus	
					N(+)	%(+)	N(+)	%(+)
20.529	912	4.4	603	63.5	275	45.6	328	54.4

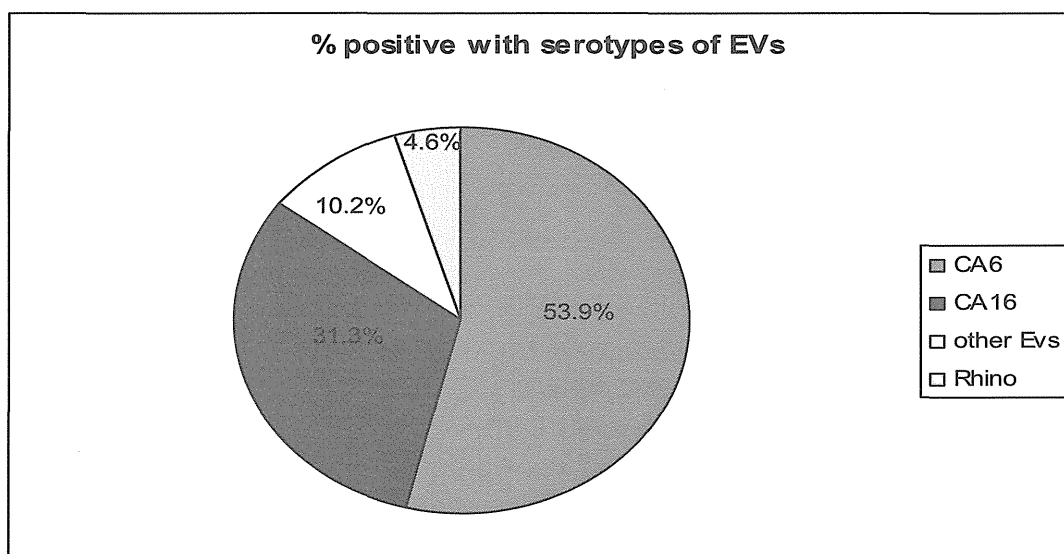


**Figure 1. HEV-71 and EVs was protected by snRT-PCR**

In 2011, 603 of 912 HFMD cases (63.5%) were found positive for HEV by using enterovirus general primers, and snRT-PCR method. HEV-71 and EVs occupied 46% (275) and 54% (328) respectively. (Figure 1).

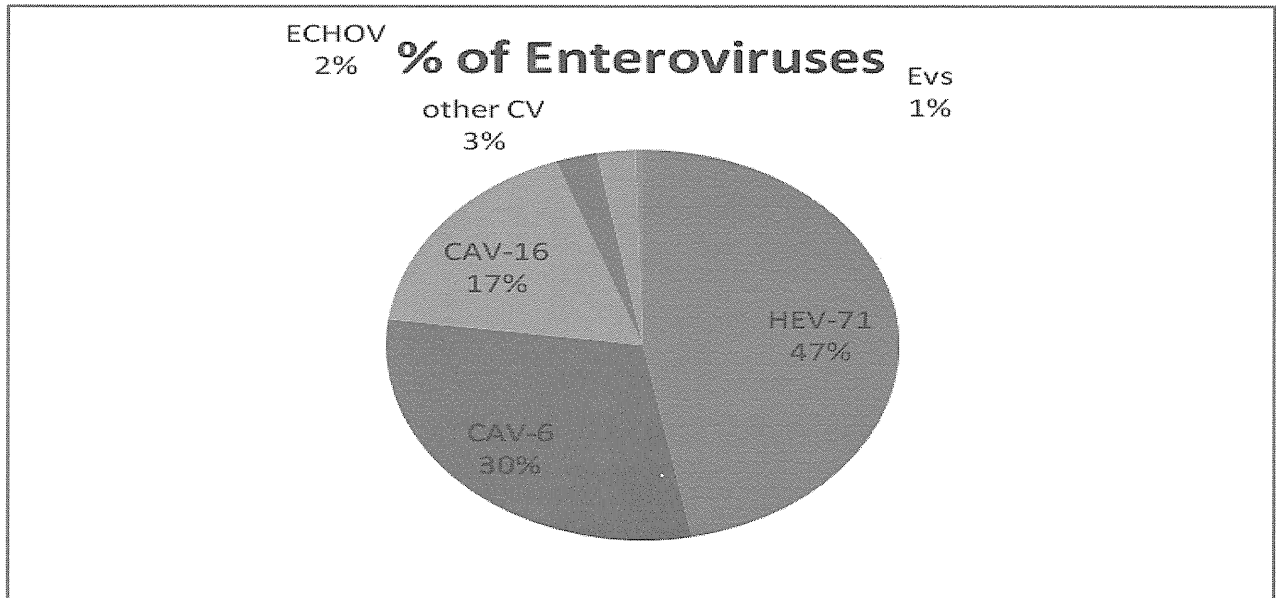
**Table2. Result of enterovirus serotypes by sequencing in 2011**

N enterovirus by snRT- PCR	Result of Enterovirus serotypes by seq.						
	(+) Coxsackievirus - A			(+) CB	(+) Echo	(+) Other EV	Rhinovirus
	CAV- 6	CAV-16	Other CAV				
328	177 53,9%	102 31,3%	15 4,6%	2 0,6%	14 4,3%	3 (EV96 & Polio) 0,9%	15
	89,6%			5,8%			4,6%



**Figure 2. Enterovirus Serotypes was confirmed by Sequencing**

328 of other EVs PCR-2 products were sequenced with primer pairs at position of primer F 2602-2627 or primer R 2977-2951 (375nt). The result showed with 53,9% of CoxsackieA 6; 31,3% of CoxsackieA16. The other enteroviruses containing 10.2% with CV-A3(1), A10(4), A12 (8), và A13 (2); CV-B3, B4 (2);14 echovirus type 30 and 2 Polio, 1 EV96 were also detect (Figure 2)



**Figure 3. HEV-71 and Enterovirus Serotypes was confirmed by snRT-PCR and Sequencing**

In total of enteroviruses caused HFMD in 2011, HEV-71 was 47%, CAV-6 with 30% and CAV -16 was 17%, The rest was other CAV, CB, Echovirus and other EVs as Sabin poliovirus and EV96.

**Table 3. Enterovirus type 71's subgenogroups**

TT of PCR products/EV71	TT of EV71 PCR products sequenced	C4	C5	B5
275	49	36	3	10
% of each EV71 subgenogroup		73.5	6.1	20.4