

## 江苏省 2012 年柯萨奇病毒 A 组 16 型基因特征分析

单 军,嵇 红,包 林,付建光,王慎骄,祁 贤,汤奋扬,周明浩,朱叶飞\*

(卫生部肠道病原微生物重点实验室,江苏省疾病预防控制中心急性传染病防制所,江苏 南京 210009)

**[摘要]** 目的:了解江苏省 2012 年柯萨奇病毒 A 组 16 型(CA16)分离株 VP1 区基因特征。方法:选取江苏省 2012 年 14 株 CA16 病毒分离株,用 1 对特异性引物进行 VP1 区核苷酸序列扩增,对扩增产物进行测序,利用生物信息学软件对序列进行分析,结果与 CA16 参考株序列进行同源性比较并构建基因进化树。结果:14 株 CA16 分离株 VP1 区核苷酸和氨基酸同源性分别为 90.5%~100.0%和 98.7%~100.0%,与 CA16 国际标准株 G10 的核苷酸和氨基酸同源性分别为 75.5%~76.7%和 91.6%~92.3%。江苏省 2012 年的 CA16 分离株全部属于 B1 基因亚型,同时包含 B1a 和 B1b 两条进化分支。结论:江苏省 2012 年有 CA16 病毒的 B1a 与 B1b 两种进化分支共同存在与循环,且呈现以 B1b 基因亚型为优势型别、B1a 基因亚型为辅助型别的传播模式;无论是优势型别还是辅助型别,均各自呈现密切的亲缘关系。

**[关键词]** 手足口病;柯萨奇病毒 A 组 16 型;VP1 基因;基因型

**[中图分类号]** R373.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2014)01-080-04

**doi:**10.7655/NYDXBNS20140120

## Analysis on genetic character of Coxsackievirus A16 strains isolated from Jiangsu Province in 2012

Shan Jun, Ji Hong, Bao Lin, Fu Jianguang, Wang Shenjiao, Qi Xian, Tang Fenyang, Zhou Minghao, Zhu Yefei\*

(Key Laboratory of Enteric Pathogenic Microbiology, Ministry of Health, Department of Acute Infectious Disease Control and Prevention, Jiangsu Provincial Center for Disease Prevention and Control, Nanjing 210009, China)

**[Abstract]** **Objective:** To analyze the genetic characteristic of VP1 gene of coxsackievirus A16 (CA16) strains isolated from Jiangsu Province in 2012. **Methods:** A total of 14 CA16 strains isolats were selected to conduct VP1 gene amplification by using specific primers, and then sequenced and analyzed by bioinformatics software. The homology and phylogenetic analysis were conducted between the 14 isolates and other CA16 strains downloaded from Genbank, based on the sequence of VP1 gene. **Results:** The sequence analysis showed that the homogeneity of the nucleotide and amino acid of VP1 gene were 90.5%~100% and 98.7%~100% among 14 isolated CA16 strains, respectively. The homologies of nucleotide and amino acid of VP1 gene were 75.5%~76.7% and 91.6%~92.3% among the prototype (G10), respectively. All of the CA16 isolated strains from Jiangsu Prorice in 2012 were genogroup B and they were divided into 2 branches: B1a and B1b. **Conclusion:** The transmission mode was showed to be the dominant subgenotype of B1b and the secondary subgenotype of B1a, and co-circulated together. Both two subgenotypes showed close phylogenetic relationship in their own subgenotype, respectively.

**[Key words]** hand-foot-mouth disease; coxsackievirus A16; VP1 gene; genotype

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(01):080-083]

手足口病(hand-foot-mouth disease, HFMD)是一种常见的传染性强,可引起大规模流行的感染性疾病,其主要病原体是肠道病毒 71 型(enterovirus

71, EV71)和柯萨奇病毒 A 组 16 型(coxsackie virus A16, CA16)。由于 EV71 感染儿童后引起的手足口病可伴有严重的并发症和后遗症,对生命健康造成严重威胁,因此一直受到人们的广泛关注。CA16 是引起手足口病的第二大病原体,以往的研究认为 CA16 引起的手足口病症状较轻,且较少引起严重的并发症<sup>[1]</sup>,因此对 CA16 的研究相对较少。但近几

**[基金项目]** 江苏省临床医学中心(高技术平台)(ZX201109);江苏省医学重点人才基金(RC2011084)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail:jszyf@jscdc.cn

年的研究发现,CA16 感染可能与心肌炎、难治性休克等致死性并发症的发生有关<sup>[2]</sup>,个别地区还有引起成人致死性肺炎的报道<sup>[3]</sup>。江苏省 2010~2012 年的手足口病病原监测数据表明:CA16 在重症病例中所占的比例虽然比 EV71 低但已呈逐年上升的趋势,仅 2012 年手足口病病原构成中 CA16 所占比例已经高于 EV71。基于此,本研究对 2012 年江苏省手足口病病例分离的 CA16 毒株 VP1 区的基因特征进行分析,旨在了解江苏省 CA16 流行株与国内其他地区及其他国家分离株的遗传进化及分子流行病学关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

咽、肛拭子标本来自 2012 年江苏省各地市疾病预防控制中心和哨点医院的手足口病患者。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 病毒分离

按照《手足口病预防控制指南(2009 版)》<sup>[4]</sup>中病毒分离操作规程进行:标本接种于 RD 细胞,置于 37℃,5% CO<sub>2</sub> 条件中培养,每天观察细胞病变(CPE),当 CPE 达到 90%时收获上清液。

#### 1.2.2 病毒 RNA 的提取

采用 QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN 公司,德国)提取分离病毒的 RNA,按照说明书进行操作。

#### 1.2.3 病毒分离物的鉴定

采用 CA16 型和 EV71 型 + 肠道病毒通用型核酸检测试剂盒(2+1)(荧光定量 PCR 法,泰州硕世公司)检测肠道病毒、EV71 和 CA16。具体操作按照说明书进行,实验设置阴性和阳性对照,通过 Ct 值和扩增曲线判读结果。

#### 1.2.4 VP1 区域核苷酸序列的扩增

根据 GenBank 中收录的 VP1 基因序列,自行设计如下引物:CA16-VP1-F:5'-AGGTACTACACCC-AGTGGTCAG-3';CA16-VP1-R:5'-GCAAGGTGCCG-ATTCCTACCCT-3'。分离的病毒经鉴定是 CA16 者,采用 OneStep RT-PCR Kit(QIAGEN 公司,德国)进行 RT-PCR 扩增,PCR 条件为:50℃ 30 min 逆转录;95℃ 15 min;然后 95℃ 30 s,52℃ 45 s,72℃ 90 s,35 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。扩增产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳。

#### 1.2.5 VP1 区域的序列测定和分析

含目的基因片段的 PCR 产物送南京金斯瑞生

物科技有限公司进行双向测序。结果用 DNA Star 和 MEGA5.2 等软件进行分析,并对 VP1 区的核苷酸序列及氨基酸序列进行同源性比较和基因进化树的构建。

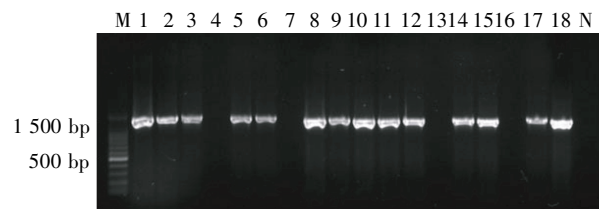
## 2 结果

### 2.1 病毒分离与鉴定结果

2012 年江苏省各地市送检的手足口病标本经病毒分离后进行荧光定量 PCR 鉴定,18 株分离株 CA16 阳性。

### 2.2 VP1 区的 RT-PCR 结果

对 18 株 CA16 分离株进行 RT-PCR 扩增,电泳结果显示 14 株有约 1 400 bp 大小的含 VP1 区域的目的条带(图 1)。



M:DNA 分子量标记;1~3、5、6、8~12、14、15、17、18:18 株分离株中的 14 株阳性株;N:阴性对照。

图 1 CA16 分离株 VP1 区域的 RT-PCR 扩增

Figure 1 RT-PCR of VP1 gene of CA16 strains

### 2.3 VP1 区核苷酸和氨基酸序列同源性分析

14 株 CA16 分离株 VP1 区全部测序成功。从 GenBank 中检索到 CA16 各型参考株 VP1 序列以及部分中国大陆 CA16 分离株 VP1 序列共 23 株。将本次测序的 14 株 CA16 分离株 VP1 序列与上述序列进行核苷酸和氨基酸的同源性比较分析后发现:14 株江苏分离株的核苷酸和氨基酸同源性分别为 90.5%~100.0%和 98.7%~100.0%,其中 10 株分离株的氨基酸序列完全一致。14 株江苏分离株与 G-10 国际标准株(CAU05876)的核苷酸和氨基酸同源性较低,分别为 75.5%~76.7%和 91.6%~92.3%;与安徽阜阳株 FY18(EU812514)的核苷酸和氨基酸同源性也较低,分别为 75.0%~76.3%和 90.2%~90.9%;与其余 21 株 CA16 参考株的核苷酸和氨基酸同源性分别为 89.7%~98.9%和 99.0%~100.0%(表 1)。

### 2.4 基于 VP1 区的 CA16 系统进化分析

利用 MEGA5.2 软件对 14 株 CA16 江苏分离株和 GenBank 中的 23 株 CA16 及 1 株 EV71 国际标准株进行系统进化分析,方法为 Neighbor-Joining。结果显示:14 株江苏分离株在进化树中分别归属于两支,其中 12 株与 Macheng0117-HuB-CHN-2011

表 1 14 株 CA16 分离株与部分参考株 VP1 基因的核苷酸和氨基酸同源性

Table 1 The homogeneity of nucleotide acid and amino acid of VP1 gene between 14 strains and the representative strains of CA16 (%)

与江苏分离株比较的参考株	核苷酸同源性	氨基酸同源性
G-10(CAU05876)	75.5~76.7	91.6~92.3
FY18(EU812514)	75.0~76.3	90.2~90.9
其余 21 株 CA16 参考株	89.7~98.9	99.0~100.0
BrCr(EV71)	65.1~66.0	70.7~71.0

(JX975802.1)、JB14080521 (HM776271)、MAS02-AH-CHN-2010 (JQ409498)、Ningbo.CHN-044-2010 (JQ315101) 以及 SZ-HK08-7(GQ279371) 等中国内地分离株构成亲缘关系较近的一支,同属于 B1b 亚型;其余 2 株无锡分离株 CA16/WUXI-1/2012 和 CA16/WUXI-2/2012 则与日本、马来西亚、泰国等周边国家的一系列分离株亲缘关系较近,同属于 B1a 亚型(图 2)。

### 3 讨论

引起手足口病的病毒属于小 RNA 病毒科肠道

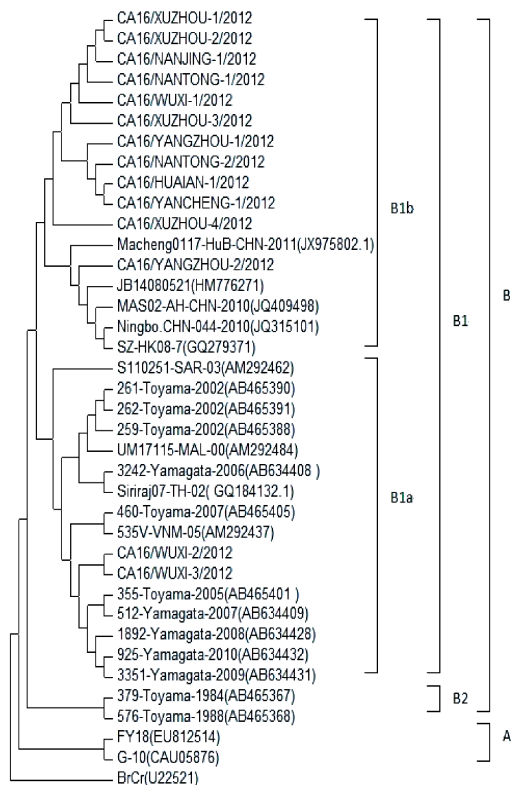


图 2 14 株 CA16 分离株与各亚型参考株之间 VP1 基因的进化树

Figure 2 The phylogenetic tree of VP1 gene between 14 strains and the representative strains of CA16

病毒属,包括柯萨奇病毒 A 组的 2、4、5、7、9、10、16 型等,B 组的 1、2、3、4、5 型等,埃可病毒, EV71 及 EV 新的血清型,其中以 EV71 及 CA16 最为常见<sup>[5]</sup>。二者常相伴引起手足口病的暴发或流行,但每次流行中两种病毒所占比例有所不同。近几年来, EV71 成为手足口病尤其是重症病例的优势病原。有关 EV71 的流行病学和分子基因特征研究比较广泛,而关于 CA16 的报道相对较少。自 1951 年南非分离到 CA16 原型株以来,日本、马来西亚和中国台湾等国家和地区都展开了对 CA16 的研究<sup>[6-7]</sup>。1999 年深圳学者从手足口病患者中首次分离到中国的 CA16 毒株,随后国内对 CA16 的研究逐步展开。但迄今为止,中国的 CA16 病毒学监测还比较薄弱,相关的研究及资料积累仍不够丰富。

目前,国内外对 CA16 病毒的分子流行病学研究主要集中在外壳蛋白 VP1 上,因为 VP1 蛋白不仅是病毒主要的免疫原性蛋白和抗体特异性中和位点,而且其核苷酸序列具有显著的基因多态性,还与病毒血清型密切相关,是病毒基因分型和遗传进化分析的最重要靶标,并可作为小 RNA 病毒科内不同属的分类参考<sup>[8]</sup>。2005 年 Li 等<sup>[9]</sup>对 1999~2004 年我国深圳 CA16 分离株进行了基于 VP1 的系统进化分析,将 CA16 分为 A、B、C 3 个基因型,B 和 C 基因型之间的核苷酸差异在 5.8%~11.0% 之间。2007 年 Perera 等<sup>[10]</sup>对亚太地区分布于 5 个国家 10 年间的 52 株 CA16 分离株进行了系统进化分析,将 CA16 分为 A、B 两个基因型,B 基因型又可分为 B1、B2 两个亚型,并认为 Li 等<sup>[9]</sup>划分的 B、C 基因型即其研究中的 B1、B2 两个亚型。

基于 Perera 的分型标准,本研究从 GenBank 中选取 23 株代表不同国家不同年份的 CA16 代表株和 1 株 EV71 国际标准株 BrCr 作为组外对照,与 14 株 CA16 江苏分离株 VP1 序列进行比对。结果显示:14 株 CA16 江苏分离株的 VP1 区核苷酸和氨基酸序列高度同源,同属于 B1 基因型;其中 12 株与湖北、安徽、浙江和深圳等国内其他分离株构成亲缘关系较近的一支,同属于 B1b 亚型;另外 2 株与日本、泰国和马来西亚等周边国家分离株亲缘关系较近,同属于 B1a 亚型。这提示江苏在 2012 年有 CA16 病毒的 B1a 与 B1b 两种进化分支共同存在与循环,且呈现以 B1b 基因亚型为优势型别、B1a 基因亚型为辅助型别的传播模式;无论是优势型别还是辅助型别,均各自呈现密切的亲缘关系。14 株 CA16 分离株与同属于 A 基因型的 G-10 国际标准株和安徽阜

阳株 FY18 相比在核苷酸水平和氨基酸水平都已经发生了较大的变化,但与同一时期同一基因型别国内国际 CA16 分离株的同源性较高,提示 CA16 分离株与分离时间的关系可能比地域的关系更密切。

Hosoya 等<sup>[11]</sup>在研究中指出,CA16 的变异是一个随时间迁移逐渐呈现遗传多样性的长期过程。在一个流行阶段内以某个基因群的毒株为主,下一个流行阶段又由新的基因群代替成为新的优势流行株。目前在中国大陆的 CA16 分离株与我国周边国家和地区的 CA16 流行株在基因亲缘关系和流行时间关系上都很接近<sup>[12]</sup>,江苏省 2012 年 CA16 病毒与我国宁夏、河南和上海等省近几年的 CA16 病毒流行情况基本一致<sup>[13-15]</sup>,占流行趋势的 CA16 病毒属于 B1 基因型,有 B1a 和 B1b 两种亚型共同存在和流行。

本研究丰富了国内 CA16 毒株的基因库和流行病学资料,为进一步深入阐明和认识 CA16 病毒的起源和进化奠定了基础,同时为 HFMD 的综合防治和 CA16 病毒的动态监测提供了参考依据。

#### [参考文献]

- [1] 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(12):1092-1096
- [2] Wang CY, Li Lu F, Wu MH, et al. Fatal coxsackievirus A16 infection[J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2004, 23(3):275-276
- [3] Legay F, Leveque N, Gacouin A, et al. Fatal coxsackievirus A 16 pneumonitis in adult [J]. *Emerg Infect Dis*, 2007, 13(7):1084-1086
- [4] 中华人民共和国卫生部. 手足口病预防控制指南(2009 年版)[J]. *全科医学临床与教育*, 2010, 8(2):11-13, 19
- [5] Chong CY, Chan KP, Shah VA, et al. Hand, foot and mouth disease in Singapore: a comparison of fatal and non-fatal cases [J]. *Acta Paediatrica*, 2003, 92 (10): 1163-1169
- [6] Wu PC, Huang LM, Kao CL, et al. An outbreak of coxsackievirus A16 infection: comparison with other enteroviruses in a preschool in Taipei [J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2010, 43(4):271-277
- [7] Yamayoshi S, Iizuka S, Yamashita T, et al. Human SCARB2-dependent infection by coxsackievirus A7, A14, and A16 and enterovirus 71 [J]. *J Virol*, 2012, 86(10): 5686-5696
- [8] Shlmizu H, Utama A, Onnimala N, et al. Molecular epidemiology of enterovirus 71 infection in the Western Pacific Region[J]. *Pediatr Int*, 2004, 46(2):231-235
- [9] Li L, He Y, Yang H, et al. Genetic characteristics of human enterovirus 71 and coxsackievirus A16 circulating from 1999 to 2004 in Shenzhen, People's Republic of China[J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 439(3):3835-3839
- [10] Perera D, Yusof MA, Podin Y, et al. Molecular phylogeny of modern coxsackievirus A16[J]. *Arch Virol*, 2007, 152 (6):1201-1208
- [11] Hosoya M, Kawasaki Y, Sato M, et al. Genetic diversity of coxsackievirus A16 associated with hand, foot, and mouth disease epidemics in Japan from 1983 to 2003[J]. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(1):112-120
- [12] 李琳琳, 何雅晴, 朱俊萍, 等. 科萨奇病毒 A 组 16 型中国分离株 (CoxA16 SHZH00-1) 全基因组序列测定与分析[J]. *病毒学报*, 2005, 21(3):217-222
- [13] 王东艳, 陈 慧, 严冬梅, 等. 宁夏地区 2008 年科萨奇病毒 A 组 16 型 VP1 区基因特征分析[J]. *中华流行病学杂志*, 2010, 31(8):904-908
- [14] 许玉玲, 卫海燕, 穆玉姣, 等. 河南省 2010 年柯萨奇病毒 A 组 16 型 VP1 区基因特征分析[J]. *中国病毒病杂志*, 2011, 1(3):200-203
- [15] 崔爱利, 许文波, 李秀珠, 等. 上海市 2002 年柯萨奇病毒 A 组 16 型基因特征分析 [J]. *中国疫苗和免疫*, 2009, 26(2):135-140

[收稿日期] 2013-07-12