

· 实验室研究 ·

# 手足口病相关柯萨奇病毒 A 组 8 型全基因组序列特征分析

王东艳 宋洋 韩振志 肖金波 路环环 严冬梅 冀天娇 杨倩 祝双利  
许文波 张勇

中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所/国家脊髓灰质炎实验室/世界卫生组织西太平洋区脊髓灰质炎参比实验室/国家卫生健康委生物安全重点实验室/国家卫生健康委医学病毒与病毒病重点实验室,北京 102206

王东艳、宋洋对本文有同等贡献

通信作者:张勇,Email:yongzhang75@sina.com

**【摘要】** 目的 研究中国 2013–2018 年手足口病病例分离的柯萨奇病毒 A 组 8 型(CV-A8)全基因组序列特征及对全基因组各编码区进行遗传进化分析。方法 对我国不同地区手足口病患者分离的 11 株 CV-A8 的全基因组序列,采用 Sequencher 5.0、MEGA 7.0 等软件对获取的全基因组序列进行比对和遗传进化分析。结果 序列比对显示 11 株 CV-A8 基因组长度在 7 393~7 400 bp 之间,与原型株比较,在编码区无碱基插入或缺失,在非编码区存在个别碱基的插入或缺失。11 株 CV-A8 毒株 VP1 区核苷酸和氨基酸同源性分别为 78.3%~98.6% 和 92.6%~99.7%;与 CV-A8 原型株的核苷酸和氨基酸序列同源性分别为 78.3%~98.2% 和 92.6%~99.7%。对 CV-A8 的 VP1 区序列进行了系统发育分析,可将 CV-A8 分为 5 个基因型:A、B、C、D 和 E,本研究 11 株 CV-A8 分属于 C(1 株)、D(2 株)、E(8 株) 3 个基因型。11 株 CV-A8 毒株全基因组序列核苷酸和氨基酸同源性分别为 81.3%~98.8% 和 95.9%~99.5%。P2 区进化树图显示,本研究的 8 株 E 基因型 CV-A8 和 CV-A4、CV-A14 和 CV-A16 原型株进化距离最近,P3 区进化树图显示,本研究 8 株 E 基因型 CV-A8 和 CV-A5、CV-A16、CV-A14 和 CV-A4 进化距离最近。结论 本研究中 11 株 CV-A8 其衣壳区呈现基因多样性,非衣壳区呈现重组多样性,提示 CV-A8 正在经历变异动态变化;CV-A8 有可能成为手足口病的重要病原体,因此需要进一步加强监测 CV-A8。

**【关键词】** 手足口病; 柯萨奇病毒 A 组 8 型; 分子进化; 重组

**基金项目:** 国家科技重大专项(2017ZX10104001-006-001)

## Genetic characterization analysis of the whole genome sequence of Coxsackievirus A8 associated with hand, foot and mouth disease in China

Wang Dongyan, Song Yang, Han Zhenzhi, Xiao Jinbo, Lu Huanhuan, Yan Dongmei, Ji Tianjiao, Yang Qian, Zhu Shuangli, Xu Wenbo, Zhang Yong

National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention/National Laboratory of Poliomyelitis/WHO West Pacific Regional Polio Reference Laboratory/Key Laboratory of Biosafety and Key Laboratory of Medical Viruses and Viral Diseases, National Health Commission, Beijing 102206, China

Wang Dongyan and Song Yang contributed equally to the article

Corresponding author: Zhang Yong, Email: yongzhang75@sina.com

**【Abstract】 Objective** To study the genomic sequence of Coxsackievirus A8 (CV-A8) associated with hand, foot and mouth disease (HFMD) from 2013 to 2018 in China and to analyze the genetic evolution of each coding region of the full-length genome. **Methods** The genome

DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20201023-01266

收稿日期 2020-10-23 本文编辑 万玉立

引用本文:王东艳,宋洋,韩振志,等.手足口病相关柯萨奇病毒 A 组 8 型全基因组序列特征分析[J].中华流行病学杂志,2021,42(8):1487-1492. DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20201023-01266.



sequences of 11 CV-A8 strains isolated from patients with HFMD in different regions of China from 2013 to 2018 were determined. Sequence alignment and genetic evolution analysis were performed by Sequencher 5.0 and MEGA 7.0 software, etc. **Results** Sequence alignment showed that the genome length of 11 CV-A8 strains ranged from 7 393 bp to 7 400 bp. There was no base insertion or deletion in the coding region compared with the prototype strain, but there were individual base insertion or deletion in the non-coding region. The nucleotide and amino acid similarities in the VP1 region of 11 CV-A8 strains were 78.3%-98.6% and 92.6%-99.7%, respectively, and the nucleotide and amino acid sequences identities with the CV-A8 prototype strain were 78.3%-98.2% and 92.6%-99.7%, respectively. Based on the phylogenetic analysis of VP1 region sequences, the CV-A8 can be divided into five genotypes: A, B, C, D and E. The 11 CV-A8 strains in this study belonged to genotypes C (1 strain), D (2 strains) and E (8 strains). The nucleotide and amino acid similarities of 11 CV-A8 full-length genomes were 81.3%-98.8% and 95.9%-99.5%, respectively. The phylogenetic tree of the P2 region showed that the eight E genotypes CV-A8 had the closest evolutionary distance with CV-A4, CV-A14, and CV-A16. The phylogenetic tree of the P3 region showed that the eight E genotypes CV-A8 had a close evolutionary distance with CV-A5, CV-A16, CV-A14 and CV-A4. **Conclusions** The 11 CV-A8 stains in this study showed significant intra-genotype diversity in capsid region and recombinant diversity in non-capsid region which indicated that CV-A8 quaspecies were still undergoing dynamics variation. CV-A8 may become an important pathogen of HFMD and the monitoring of CV-A8 needs to be further strengthened.

**【 Key words 】** Hand, foot and mouth disease; Coxsackievirus A8; Molecular evolution; Recombination

**Fund program:** National Science and Technology Major Project of China (2017ZX10104001-006-001)

人肠道病毒(enterovirus, EV)感染导致多种疾病,如手足口病(hand, foot and mouth disease, HFMD)、疱疹性咽峡炎、急性弛缓性麻痹、无菌性脑膜炎、急性心肌性炎等<sup>[1-6]</sup>,临床症状包括轻型发热及严重并发症等。其中 HFMD 是由多种 EV 引起的一种儿童常见传染病,常引起 5 岁以下婴幼儿发病,属于国家丙类法定报告传染病。临床特征引起病例发热,手、足、口腔和臀部等部位出现皮疹,还可以引起个别患儿脑炎、心肌炎、肺水肿、弛缓性麻痹等症状,甚至导致死亡<sup>[7]</sup>。根据其亲缘关系可将感染人的 EV 分为 A、B、C、D 共 4 组,柯萨奇病毒 A 组 8 型(Coxsackievirus A8, CV-A8)属于 A 组<sup>[8]</sup>。近年来 EV-A 和 HFMD 之间的关系是 EV 研究热点之一。本研究旨在对中国 2013-2018 年分离自 HFMD 病例中 CV-A8 进行全基因组序列和分子进化特征分析,阐明目前存在的 CV-A8 优势基因型,探讨 CV-A8 全基因组及各个编码区遗传信息在病毒溯源方面的关系。

## 材料与方法

1. 毒株:来自我国 2013-2018 年 HFMD 监测系统病例分离株。毒株在 -80 °C 冰箱中冻存,实验前为提高病毒滴度,使用人横纹肌肉瘤(RD)细胞和人喉癌上皮(HEp-2)细胞进行病毒扩增,待出现特异致细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)后收获,

于 -80 °C 冰箱保存待用<sup>[9]</sup>。

2. 核酸提取:试剂采用杭州博日公司生产的商品化试剂盒(Simple P Total RNA Extraction Kit, BiFlux),对病毒分离物进行核酸提取,提取步骤及试剂配制均严格按照说明书要求进行操作。

3. 全基因组扩增:从 GenBank 下载 CV-A8 全基因组序列,采用 Primer 5.0 软件设计引物,序列见表 1。PCR 扩增试剂采用日本 TaKaRa 公司的 DRRO057A One-step RT-PCR Kit,反应条件:50 °C 30 min, 95 °C 15 min; 95 °C 30 s, 50 °C 40 s, 72 °C 70 s, 32 个循环; 72 °C 10 min, 4 °C 保存。扩增的特异核酸片段采用 2% 琼脂糖凝胶电泳分析,每次实验均设阴性对照。

4. 全基因组序列测定与分析:应用 ABI3130 型全自动序列分析仪完成序列测定,采用 Sequencher 5.0 软件对序列进行拼接比对,采用 MEGA 7.0 软件对核苷酸及氨基酸多序列进行同源性比对<sup>[10]</sup>,采用邻接法构建亲缘进化树<sup>[11]</sup>,通过 1 000 bootstrap 评估建树可靠性。本研究获得的 11 株 CV-A8 毒株的全基因序列已上传 GenBank,编号为 MT648778~MT648788。见表 1。

## 结 果

1. 病毒基因组测定:共获得 11 株 CV-A8 毒株的全基因序列, GenBank 编号为 MT648778~

表1 CV-A8 全基因组引物序列

名称	序列(5'~3')	产物大小(bp)
CV-A8-0001S48-FP	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT TAA AAC AGC TCT GGG GTT	548
CV-A8-548-RP	AAC ACG GAC ACC CAA AGT AGT C	
CV-A8-446-FP	TAG TAG TCC TCC GGC CCC TGA A	923
CV-A8-1369-RP	TTT TGC AGT GTT GGG CTT GGG	
CV-A8-1150-FP	ATG TCT ACG CAA ATG TGG CAG GA	1 203
CV-A8-2353-RP	GCA GCT CCC AAT GCT ATT AT	
CV-A8-1882-FP	GTC AAT AAT GTG ACT GRG CAA G	980
CV-A8-2862-RP	ATC ACC CTG GGA GTT GTG	
CV-A8-2707-FP	GGG GTG ATC AAT GTG CAA GA	1 045
CV-A8-3752-RP	TTG CTC CAT CGC CTC CTC AT	
CV-A8-3943-FP	TGC CAA ACT GGA GTG TA	1 002
CV-A8-4945-RP	ACC TTR GAT TTC CTG TCT CT	
CV-A8-4663-FP	TTC ATY CCT CCA ATG GCT TC	1 047
CV-A8-5710-RP	CCT ACY GGC ACA AAC ATT GA	
CV-A8-5344-FP	CTC AAG AAA CCT GTT CTC CGC AC	1 114
CV-A8-6458-RP	GAG TCA TTC AAG CTG CTA GCT T	
CV-A8-6207-FP	TCA GAT GAG CAT GGA GGA GG	889
CV-A8-7096-RP	TCC TTC ATT GGC ATR GTR GGG TG	
CV-A8-6759-FP	CAA CAA AAC CTA TTG CGT RCT TGG TG	741
CV-A8-7500-RP	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG G(T)24*	

注:\*此处为回文序列,对应位置为 polyA 尾巴

MT648788。11 株 CV-A8 毒株相关实验室信息及基因型信息见表 2。

表2 11 株 CV-A8 相关信息汇总

CV-A8 GenBank 编号	实验室编号	患者性别	年龄(岁)	分离省份/年份	临床表现	基因型
MT648778	CQ-15-Y-120	男	3	重庆/2015年	轻症	E
MT648779	GS-13-467	男	4	甘肃/2013年	轻症	D
MT648780	GS-14-481	男	3	甘肃/2014年	轻症	E
MT648781	GS-14-943	男	7	甘肃/2014年	轻症	E
MT648782	HeN-18-96	男	1	河南/2018年	轻症	E
MT648783	SD-HZ040	女	1	山东/2015年	轻症	D
MT648784	SaX-17-77	女	2	陕西/2017年	轻症	E
MT648785	TJ-16-0148	男	9	天津/2016年	轻症	E
MT648786	TJ-18-38	男	3	天津/2018年	轻症	C
MT648787	JX-17-115	男	3	江西/2017年	轻症	E
MT648788	JX-17-97	男	3	江西/2017年	轻症	E

11 株 CV-A8 毒株中, 6 株基因组长度为 7 394 bp, 5'-UTR 为 743 bp; 2 株(97/JX, 115/JX)的基因组长度为 7 393 bp, 5'-UTR 为 742 bp; 1 株(HZ040/SD)基因组长度为 7 400 bp, 5'-UTR 为 749 bp; 1 株(13-467/GS)基因组长度为 7 399 bp, 5'-UTR 为 748 bp; 1 株(13-38/TJ)基因组长度为 7 397 bp, 5'-UTR 为 746 bp。与 CV-A8 原型株比较, 6 株没有缺失与插入, 2 株(97/JX, 115/JX)在 574 位点有 1 个碱基缺失; 1 株(HZ040/SD)在 105~108 位点、129~130 位点有 6 个碱基插入; 1 株(13-467/GS)在 106~108 位点、129~130 位点有 5 个碱基插入; 1 株(18-38/TJ)在 108 位点、129~130 位点有 3 个碱

基插入。11 株 CV-A8 基因组编码区长度均为 6 657 bp, 共编码含 2 189 个氨基酸多聚蛋白, 3'-UTR 长度为 80 bp 序列。与 CV-A8 原型株(Donovan 株)比较, 11 株 CV-A8 在编码区没有碱基缺失与插入, 但在 3'-UTR 的 7 333~7 334 位点 11 株均存在 2 个碱基缺失。见表 3。

2. 遗传进化分析: 同源性进化分析结果显示, 11 株 CV-A8 毒株全基因组序列核苷酸和氨基酸同源性分别为 81.3%~98.8% 和 95.9%~99.5%; 各区段比对发现, 5'-UTR、P1、P2、P3 各区域核苷酸同源性分别为 82.8%~99.2%、79.4%~99.0%、81.2%~98.8%、82.7%~98.7%; 编码区 P1、P2、P3 各区域氨基酸同源性分别为 95.1%~99.6%、97.0%~99.8%、95.2%~99.5%; VP1 区核苷酸和氨基酸同源性分别为 78.3%~98.6% 和 92.6%~99.7%; 与 CV-A8 原型株的核苷酸和氨基酸序列同源性分别为 78.3%~98.2% 和 92.6%~99.7%。

为了解本研究 11 株 CV-A8 遗传进化情况, 从 GenBank 下载所有国内外 22 条 CV-A8 全长 VP1 区核苷酸序列, 与 CV-A8 原型株构建 VP1 区系统进化树, 见图 1; 同时从 GenBank 下载所有国内外包含 CV-A8 原型株在内的 12 条 CV-A8 全基因序列, 与 EV-A 的原型株构建全基因组及 P1、P2、P3 区系统进化树, 见图 2、3。VP1 区进化树显示, 所有 CV-A8 划分为 5 个基因型: CV-A8 原型株(Donovan 株)为基因型 A 的唯一成员, 于 1949 年分离于美



表 3 11 株 CV-A8 毒株全基因组各区域核苷酸及氨基酸数目

功能区	位置 <sup>a</sup>	位置 <sup>b</sup>	位置 <sup>c</sup>	位置 <sup>d</sup>	位置 <sup>e</sup>	核苷酸数目	氨基酸数目
5'-UTR	1~743	1~742	1~749	1~748	1~746	742, 743, 746, 748, 749	
VP4	744~950	743~949	750~956	749~955	747~953	207	69
VP2	951~1 715	950~1 714	957~1 721	956~1 720	954~1 718	864	288
VP3	1 716~2 435	1 715~2 434	1 722~2 441	1 721~2 440	1 719~2 438	720	240
VP1	2 436~3 317	2 435~3 316	2 442~3 323	2 441~3 322	2 439~3 320	882	294
2A	3 318~3 767	3 317~3 766	3 324~3 773	3 323~3 772	3 321~3 769	450	150
2B	3 768~4 064	3 767~4 063	3 774~4 070	3 773~4 069	3 770~4 067	297	99
2C	4 065~5 051	4 064~5 050	4 071~5 057	4 070~5 056	4 068~5 054	987	329
3A	5 052~5 309	5 051~5 308	5 058~5 315	5 057~5 314	5 055~5 312	258	86
3B	5 310~5 375	5 309~5 374	5 316~5 381	5 315~5 380	5 313~5 378	66	22
3C	5 376~5 924	5 375~5 923	5 382~5 930	5 381~5 929	5 379~5 927	549	183
3D	5 925~7 310	5 924~7 309	5 931~7 316	5 930~7 315	5 928~7 313	1 386	264
3'-UTR	7 314~7 394	7 313~7 393	7 320~7 400	7 319~7 399	7 317~7 397	80	-

注：<sup>a</sup>对应 CV-A8 分离株分别为 CV-A8Y-120/CQ、14-481/GS、14-943/GS、18-96/HeN、17-77/SaX、16-0148/TJ；<sup>b</sup>对应 CV-A8 分离株分别为 CV-A897/JX、115/JX；<sup>c</sup>对应 CV-A8 分离株为 CV-A8HZ040/SD；<sup>d</sup>对应 CV-A8 分离株为 CV-A813-467/GS；<sup>e</sup>对应 CV-A8 分离株为 CV-A818-38/TJ

国；基因型 B 由印度、俄罗斯和美国的 6 株 CV-A8 组成，分离年代为 2004–2008 年；基因型 C 由 1 株 2007 年分离于土库曼斯坦 CV-A8 和本研究 1 株 2018 年分离于中国的 CV-A8 组成；基因型 D 由 14 株中国 CV-A8 组成，分离时间为 2011–2015 年，包括本研究的 2 株 CV-A8；基因型 E 由最新分离的中国 CV-A8 和澳大利亚 CV-A8 组成，分离时间为 2014–2018 年，包括本研究 8 株 CV-A8 和 2 株澳大利亚 CV-A8，以上内容提示 E 基因型为目前中国及全球 CV-A8 优势基因型。

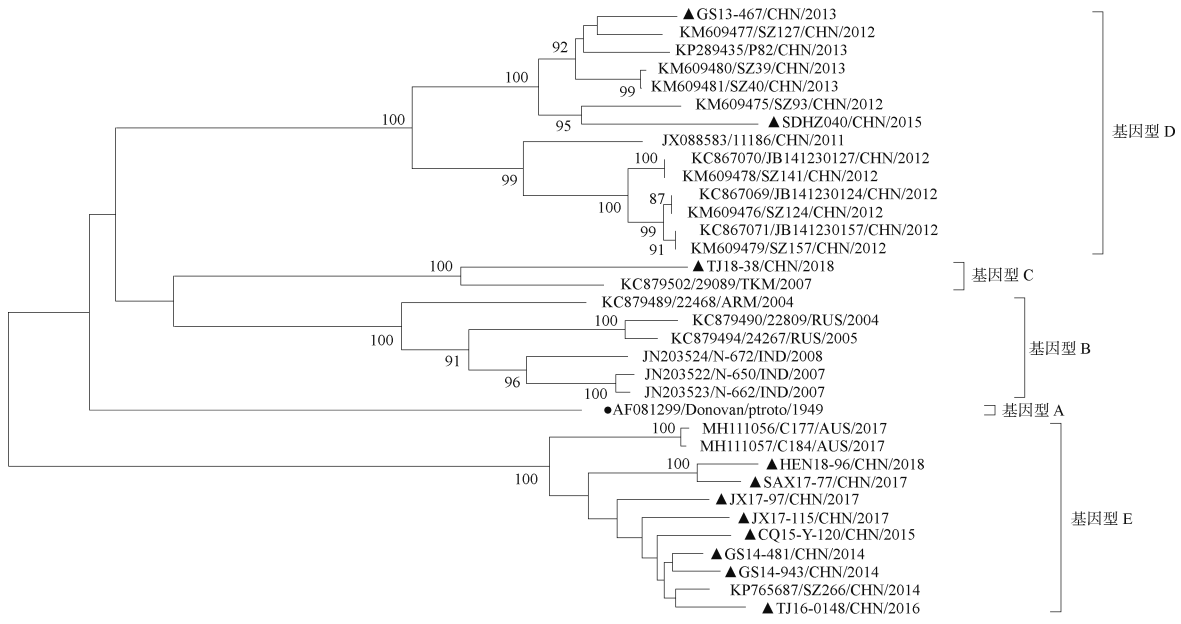
全基因组系统进化树显示，本研究 11 株 CV-A8 与 GenBank 所有 12 株 CV-A8 在进化树中和 VP1 区基因型别一致，C、D、E 3 个基因型分别处于 3 个分支共同进化。各编码区均构建亲缘进化树，遗传进化分析显示，P1 衣壳编码区亲缘进化树显示所有 CV-A8 与其原型株同源性最高，独立成簇，单源进化；P2 非衣壳编码区亲缘进化树显示所有 CV-A8 均和 CV-A5 进化距离最近，其中本研究的 8 株 E 基因型 CV-A8 和 CV-A4、CV-A14 和 CV-A16 原型株进化距离最近，提示存在基因重组现象；P3 非衣壳编码区亲缘进化树显示所有 E 基因型 CV-A8 和 CV-A5、CV-A16、CV-A14 和 CV-A4 进化距离较近，也提示存在和其他 EV-A 发生重组，另本研究 1 株 C 基因型和 2 株 D 基因型 CV-A8 和其他 CV-A8 独立成簇并 2 个分支共同进化。

## 讨 论

病毒性传染病的预防和控制、尤其是病毒性传染病突发公共卫生事件的应对，需要快速对致病病

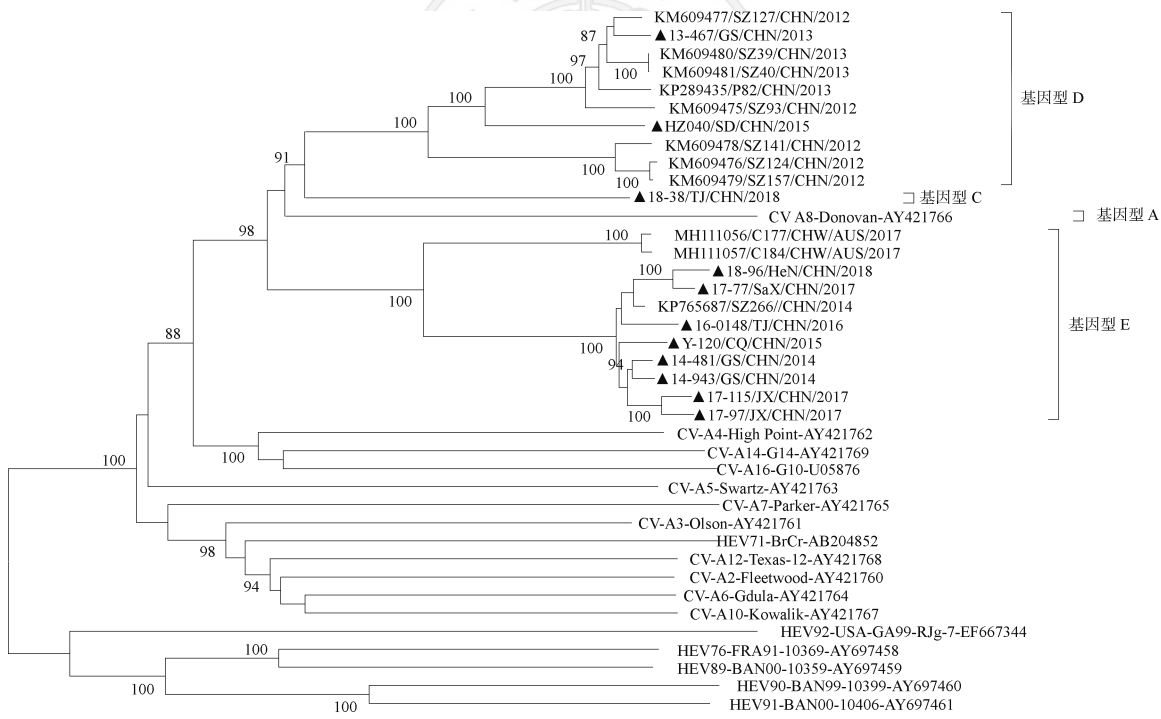
原体进行鉴定和溯源。目前多数传染病的溯源技术仍是基于经验性评估或基于描述性流行病学数据推测，病原体本身的基因组学特征在预测模型中难以体现。随着基因组学技术和生物信息学以及大数据管理技术的迅速发展，新一代基因组 DNA 测序技术可以对标本中致病微生物实现更加详细的分析，通过生物信息学分析和大型服务器的高速运算对全基因组序列数据进行加工整理，可以准确进行病毒溯源，洞悉病原体的进化过程。

本研究依托国家重大专项课题《艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治》之子课题基于宏基因组的病毒网络化监测和溯源技术体系研究分析，对我国 2013–2018 年中国 HFMD 网络分离的 11 株 CV-A8 分离株全基因组及各个编码区遗传进化分析。VP1 区进化树显示，所有 CV-A8 划分为 5 个基因型(A~E)，其中 E 基因型为目前中国 CV-A8 优势基因型。但在 2008–2012 年，全国 HFMD 实验室网络没有发现 CV-A8，可能是因为它们传播率较低；从 2013 年开始，鉴定出 11 个 CV-A8 样本，这可能是因为在在这段时间内，CV-A8 的遗传率开始增加。全基因组系统进化树显示，本研究中的 8 株 E 基因型 CV-A8 与 CV-A4、CV-A14 和 CV-A16 原型株进化距离最近，提示存在基因重组现象。重组是 EV 中经常观察到的现象，更重要的是，通过消除有害突变，重组一直被认为是 EV 进化的驱动力，这可能产生新的具有更高毒力和传播能力的重组体，如疫苗衍生脊髓灰质炎病毒。E 基因型的 CV-A8 株可能通过重组获得一些有利的非衣壳区特性，并以某种方式赋予更高的遗传率。尽管 CV-A8 在 HFMD 病原体中检出较少，且目前病例临床表现以



注: ▲ 本研究分离株

图1 11株 CV-A8 和 GenBank 23 株 CV-A8 VP1 区基因系统进化树

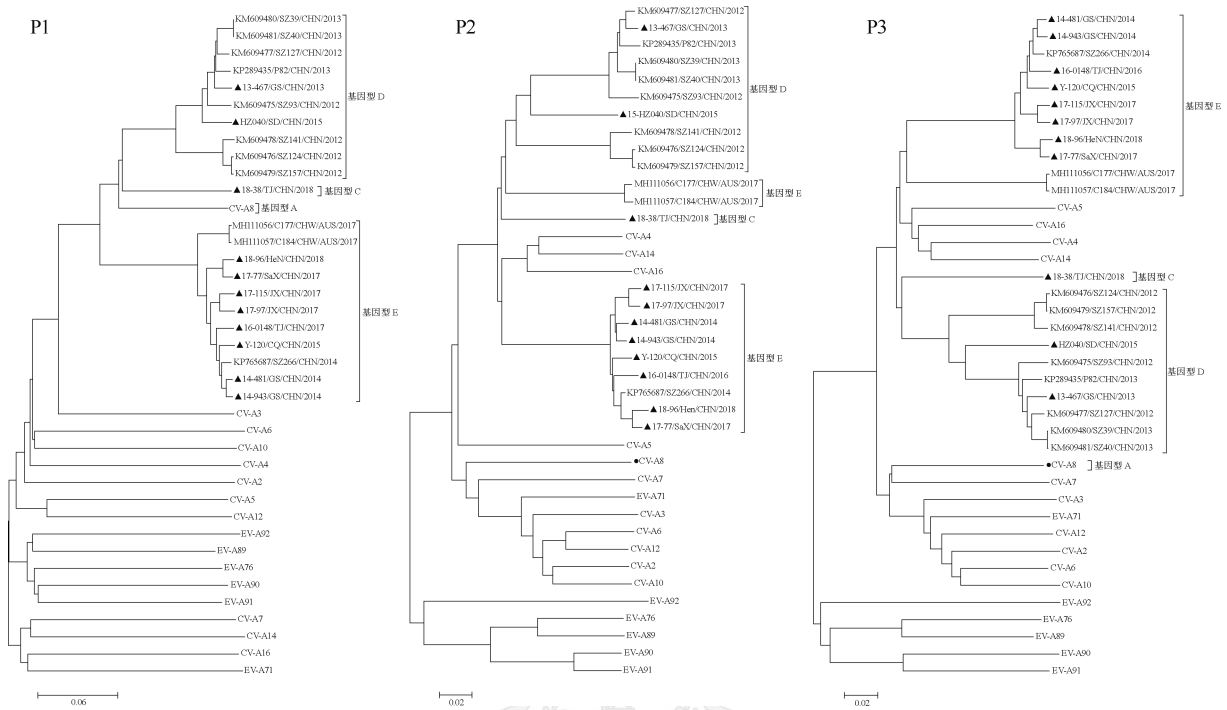


注: ▲ 本研究分离株

图2 11株 CV-A8 和 GenBank 12 株 CV-A8 全基因组系统进化树

轻症为主,但在 CV-A8 的衣壳区基因多样性和非衣壳区重组多样性表明, CV-A8 准种仍在经历变异动态变化。它们可能是 EV-A 基因库中重要的重组交换体,有助于自身或其他 EV 获得优势特性。以上内容提示 CV-A8 全基因组及各个编码区在病毒溯源方面提供更多数据支撑。

目前我国尚未建立专门的 EV 监测系统, EV 监测主要依赖于我国 AFP 和 HFMD 两大网络监测系统。虽然 EV-A71、CV-A16 和 CV-A6 已被普遍认为是世界范围内 HFMD 的主要病原体,但近年来,包括 CV-A8 在内的其他 EV 也被频繁报道。本研究 EV-A 组 11 株 CV-A8 均来自 HFMD 监测网络;已有



注: ▲ 本研究分离株  
**图 3** 23 株 CV-A8 和 EV-A 原型株 (11 株来自本研究和 12 株来自 GenBank) 和 EV-A 原型株 P1、P2、P3 区系统进化树

报道 CV-A8 也是导致疱疹性咽峡炎的常见病因<sup>[1]</sup>, 但中国疾病监测报告系统中并未纳入疱疹性咽峡炎; 此外, 多种临床表型, 包括 AFP、板层鱼鳞病、呼吸系统疾病等, 都与 CV-A8 感染有关, 因此, CV-A8 相关疾病的负担可能被低估了。本研究发现 CV-A8 具有衣壳多样性 (多基因型) 和频繁的重组 (不同的基因型内重组谱系), 说明 CV-A8 准种仍在不断发生变异和重组。从表面上看, CV-A8 正在选择一种能适应宿主环境的毒株。CV-A8 有可能成为 HFMD 的重要病原体, 所以, 需要加强 CV-A8 监测力度, 以补充不同时间、不同地区 CV-A8 分离株基因特征信息, 进一步全面动态解析 CV-A8 流行及遗传进化趋势; 同时, 鉴于 EV 之间基因重组现象越来越普遍<sup>[12]</sup>, 必然引发病毒毒力或传播力的改变, 为病毒溯源提供更多精准信息, 我国应尽快建立专门的 EV 监测系统, 为 EV 引起相关疾病的防控工作提供全面精准的实验室数据支撑。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

[1] Puenpa J, Mauleekoonphairoj J, Linsuwanon P, et al. Prevalence and characterization of enterovirus infections among pediatric patients with hand foot mouth disease, herpangina and influenza like illness in Thailand, 2012[J]. PLoS One, 2014, 9(6): e9888. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0098888.  
 [2] Tian BJ, Yoshida H, Wu Y, et al. Molecular typing and epidemiology of non-polio enteroviruses isolated from Yunnan province, the People's Republic of China[J]. J Med

Virol, 2008, 80(4):670-679. DOI:10.1002/jmv.21122.  
 [3] Pallansch MA, Roos RP. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses and newer enteroviruses [M]//Knipe DM, Howley PM. Fields virology. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins, 2007:840-893.  
 [4] Brown B, Oberste MS, Maher K, et al. Complete genomic sequencing shows that polioviruses and members of human enterovirus species C are closely related in the noncapsid coding region[J]. J Virol, 2003, 77(16): 8973-8984. DOI:10.1128/JVI.77.16.8973-8984.2003.  
 [5] Chen L, Yang H, Wang C, et al. Genomic characteristics of coxsackievirus A8 strains associated with hand, foot, and mouth disease and herpangina[J]. Arch Virol, 2016, 161(1):213-217. DOI:10.1007/s00705-015-2646-1.  
 [6] 陈鹏, 陶泽新, 王海岩, 等. 柯萨奇病毒 A 组 2、6、8、12 型山东地方株型别鉴定及其基因特征分析[J]. 病毒学报, 2012, 28(5):522-526. DOI:10.13242/j.cnki.bingduxuebao.002315.  
 Chen P, Tao ZX, Wang HY, et al. Identification and genetic characterization of Coxsackieviruses A2, 6, 8 and 12 Isolated in Shandong province[J]. Chin J Virol, 2012, 28(5): 522-526. DOI: 10.13242/j. cnki. bingduxuebao. 002315.  
 [7] 许文波, 檀晓娟. 手足口病: 中国儿童传染病防控面临的新挑战[J]. 疾病监测, 2009, 24(9):649-650. DOI:10.3784/j. issn.1003-9961.2009.09.001.  
 Xu WB, Tan XJ. Hand-foot-and-mouth disease: the new challenge of the infectious disease control and prevention among the children in P.R. of China[J]. Dis Surveill, 2009, 24(9):649-650. DOI:10.3784/j.issn.1003-9961.2009.09.001.  
 [8] Oberste MS, Peñaranda S, Maher K, et al. Complete genome sequences of all members of the species Human enterovirus A[J]. J Gen Virol, 2004, 85(6):1597-1607. DOI: 10.1099/vir.0.79789-0.  
 [9] WHO. Polio laboratory manual[M]. 4<sup>th</sup> ed. Geneva: WHO, 2004:81-100.  
 [10] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA 6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. Mol Biol Evol, 2013, 30(12):2725-2729. DOI:10.1093/molbev/mst197.  
 [11] Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(30):11030-11035. DOI:10.1073/pnas.0404206101.  
 [12] Santti J, Hyypää T, Kinnunen L, et al. Evidence of recombination among enteroviruses[J]. J Virol, 1999, 73(10): 8741-8749. DOI: 10.1128/JVI. 73.10.8741-8749. 1999.