

# 宁夏地区 2008 年柯萨奇病毒 A 组 16 型 VP1 区基因特征分析

王东艳 陈慧 严冬梅 张勇 安军静 马江涛 祝双利 马学旻 安洪秋 许文波

**【摘要】 目的** 研究宁夏地区 2008 年引起手足口病(HFMD)暴发的柯萨奇病毒 A 组 16 型(CVA16)的基因特征。**方法** 对宁夏地区 2008 年 HFMD 患者临床标本中分离到的 CVA16, 采用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)进行 VP1 编码区基因扩增, 对扩增产物进行核苷酸序列测定和分析。根据 VP1 区核苷酸序列与国内其他省份以及国际报道的 CVA16 株序列(来源于基因库)构建基因亲缘关系树。**结果** 共分离到 70 株 CVA16, 其在 VP1 区核苷酸和氨基酸同源性分别为 90.8%~100.0% 和 98.9%~100.0%。亲缘进化树显示全部 CVA16 株可分为 A 和 B 两个基因型, B 基因型又可分为 B1 和 B2 两个基因亚型。宁夏地区 CVA16 全部属于 B1 基因亚型, 同时包含 B1a 和 B1b 两条进化分支, 提示存在两大传播链。**结论** 宁夏地区分离的 CVA16 株与国内其他地区 CVA16 株类似, 有 B1a 和 B1b 两个进化分支在共同循环, 且与周边国家和地区流行的 CVA16 在基因亲缘关系和流行时间关系上都接近, 存在共同进化和循环。

**【关键词】** 手足口病; 柯萨奇病毒 A 组 16 型; B1 基因亚型; 进化分支

**Genetic characterization of coxsackievirus A16 isolated in Ningxia Hui Municipality in 2008**  
WANG Dong-yan<sup>1</sup>, CHEN Hui<sup>2</sup>, YAN Dong-mei<sup>1</sup>, ZHANG Yong<sup>1</sup>, AN Jun-jing<sup>1</sup>, MA Jiang-tao<sup>2</sup>, ZHU Shuang-li<sup>1</sup>, MA Xue-min<sup>2</sup>, AN Hong-qiu<sup>1</sup>, XU Wen-bo<sup>1</sup>. 1 Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, State Key Laboratory Molecular Virology & Genetic Engineering, World Health Organization Western Pacific Region Regional Reference Poliovirus Laboratory, Beijing 100050, China; 2 Ningxia Hui Municipal Center for Disease Control and Prevention  
Corresponding author: XU Wen-bo, Email: wenbolab@hotmail.com  
This work was supported by grants from the National Science Foundation of China (No. 30900063) and National Science and Technology Support Projects for the "Eleventh Five-Year Plan" of China (No. 2008BAI56B00).

**【Abstract】 Objective** To study the genetic characterization of coxsackievirus A16 (CVA16) strains isolated during an epidemic of hand, foot, and mouth disease (HFMD) in Ningxia Hui Municipality in 2008. **Methods** Clinical samples were collected from HFMD patients in Ningxia Hui Municipality and CVA16 strains were isolated by viral isolation methods. Reverse transcription-polymerase chain reactions (RT-PCR), specific for CVA16 were performed with these CVA16 strains. Entire VP1 coding region amplification and sequencing were then performed and finally phylogenetic tree was constructed among Ningxia CVA16 strains and CVA16 representative strains of known genotypes and subgenotypes. **Results** 70 Ningxia CVA16 strains were isolated from HFMD patients in Ningxia in 2008 and the homology of nucleotide and amino acid were 90.8%–100.0% and 98.9%–100.0%, respectively. Phylogenetic characteristics of the strains reconfirmed that they could be divided into two distinct genotypes—A and B. Genotype B could be further divided into the subgenotypes B1 and B2, while all the 70 Ningxia CVA16 strains belonged to the co-circulated clusters B1a and B1b within subgenotype B1, which belonged to 2 viral transmission chains. **Conclusion** Our results indicated that subgenotype B1 CVA16 strains continued to circulate over a wide geographic area of mainland China since the first reported episode in Shenzhen city in 1999. Like other CVA16 strains isolated elsewhere in China, both B1a and B1b evolution branches were co-circulating in Ningxia Hui Municipality. Based on the close phylogenetic and chronological relationship with CVA16 isolated in other countries and regions near China. Our data confirmed that these strains co-evolved and co-circulated with those from neighboring countries and regions.

**【Key words】** Hand, foot, and mouth disease; Coxsackievirus A16; B1 subgenotype; Evolution branch

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.08.016

基金项目: 国家自然科学基金(30900063); “十一五”国家科技支撑计划(2008BAI56B00)

作者单位: 100050 北京, 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所病毒基因工程国家重点实验室 世界卫生组织西太平洋区脊髓灰质炎参比实验室(王东艳、严冬梅、张勇、安军静、祝双利、安洪秋、许文波); 宁夏回族自治区疾病预防控制中心(陈慧、马江涛、马学旻)

王东艳、陈慧同为第一作者

通信作者: 许文波, Email: wenbolab@hotmail.com

手足口病(HFMD)是由人肠道病毒(HEV)引起的小儿常见急性传染病<sup>[1]</sup>。已知有多种HEV可引起HFMD,但柯萨奇病毒A组16型(CVA16)和人肠道病毒71型(HEV71)是主要病原体<sup>[2,3]</sup>。由于CVA16感染儿童后引起的临床症状通常较轻,因此对CVA16的分子进化等的研究相对较少<sup>[2,4-6]</sup>。2008年3月安徽省阜阳市暴发HFMD<sup>[7]</sup>,同年5月宁夏回族自治区HFMD发病数也急剧上升(1-11月报告2144例,全区总发病率为35.49/10万),为此本研究对2008年宁夏地区HFMD病例分离的CVA16株进行VP1区基因特征和分子进化分析,旨在了解该地区CVA16与我国其他地区以及其他国家分离株的分子流行病学关系。

### 材料与方法

1. 标本来源:2008年5-8月宁夏回族自治区疾病预防控制中心肠道病毒实验室共收到335例HFMD患者标本439份,其中粪便标本158份,咽拭子标本203份,疱疹液标本78份(粪便标本为发病7d内采集;咽拭子标本为发病3d内采集;疱疹液标本为发病出现疱疹就诊时采集)。患者年龄范围0-30岁,主要集中在学龄前儿童。按照WHO第4版《脊髓灰质炎(脊灰)实验室手册》的操作规程<sup>[8]</sup>,粪便标本在接种细胞前使用氯仿处理(溶解于1:10的磷酸盐缓冲液),使之成为抽提物;咽拭子和疱疹液标本不需要处理直接接种细胞。

2. 病毒分离:439份临床标本使用人横纹肌肉瘤细胞系(RD)和人喉癌上皮细胞(Hep-2)进行病毒分离。每一份标本接种2支RD细胞和Hep-2细胞,每支接种0.2 ml的标本悬液,置36℃培养。每天观察细胞培养管细胞致病变效应(CPE)并记录。每份标本在2种细胞上至少传2代,如不出现CPE,则判为阴性标本。如果出现HEV特异的CPE,则冻存于-20℃备用。

3. 病毒分离物的RT-PCR鉴定:按照卫生部发布的《手足口病预防控制指南》(2008年),使用HEV通用引物、HEV71和CVA16引物对所有病毒分离物进行鉴定。病毒RNA提取使用Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA),操作按试剂盒说明书。使用Access RT-PCR System (Promega, USA)进行RT-PCR,反应条件:42℃反转录45 min,在95℃条件下预变性2 min;进行35个循环:95℃ 30 s, 52℃ 30 s, 72℃ 40 s;最后在72℃延伸10 min, 4℃保存。实验设阳性对照、阴性对照和空白对照。使用

2%琼脂糖凝胶对PCR产物进行电泳分析。

4. 全长VP1区基因扩增:将所有鉴定为CVA16的病毒分离物,包括不同类型的临床标本的病毒分离物,进行全长VP1区核苷酸序列测定和分析,引物由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所国家脊灰实验室提供,上游引物CVA16-VP1-S(5'-ATT GGT GCT CCC ACT ACA GC-3')和下游引物CVA16-VP1-A(5'-GCT GTC CTC CCA CAC AAG AT-3')<sup>[9]</sup>。使用Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)提取病毒的RNA,从140 μl的病毒分离物中可获得50 μl总RNA溶液,提取的RNA保存在-20℃备用。使用TaKaRa One step RNA PCR Kit (TaKaRa, Dalian)进行RT-PCR反应,采用25 μl反应体系:病毒RNA 2 μl, 10×One step RNA PCR buffer 2.5 μl, dNTP 2.5 μl, MgCl<sub>2</sub>(25 mmol/L) 5 μl, RNA酶抑制剂(40 U/μl) 0.5 μl, AMV RTase XL 0.5 μl, AMV-optimized Taq(5 U/μl) 0.5 μl, 上游、下游引物各1 μl,加H<sub>2</sub>O至25 μl。RT-PCR反应条件:50℃反转录30 min,在94℃条件下预变性2 min;进行32个循环:94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 80 s;最后在72℃延伸10 min, 4℃保存。实验设阴性对照。使用2%琼脂糖凝胶对PCR产物进行电泳分析。

5. 核苷酸序列测定与分析:PCR产物经使用AxyPrep PCR Clean-up Kit (Axygen Biosciences)纯化后,采用末端终止法进行标记反应(BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, Foster City, USA),标记反应产物再经葡聚糖凝胶G-50(Pharmacia, Sweden)纯化后,于ABI 3100型序列测定分析仪上(Applied Biosystems, Hitachi, Japan)自动测序<sup>[10]</sup>。

6. 序列分析和构建系统进化树:序列分析校正软件采用Sequencher 4.0.5软件(Gene-Code, Ann Arbor, Michigan, USA);多序列比对和邻接法(Neighbor-Joining)构建系统发生树使用Mega 4.0软件(Sudhir Kumar, Arizona State University, Arizona, USA),建树的可靠性通过1000 bootstrap来评估<sup>[11]</sup>。

### 结 果

1. 病毒分离与阳性分离物的RT-PCR鉴定:439份临床标本(158份粪便标本、203份咽拭子标本、78份疱疹液标本)共分离到190株病毒分离物,其中104株(54.75%)经RT-PCR鉴定为HEV71, 70株(36.84%)经RT-PCR鉴定为CVA16,另外16株经RT-PCR鉴定为其他HEV(以柯萨奇病毒B组5型和

埃可病毒24型为主)。在分离到CVA16的临床标本中,粪便、咽拭子和疱疹液标本分别为41、22和7份。

2. CVA16分离株VP1编码区核苷酸和氨基酸同源性分析:将所有不同类型临床标本中分离鉴定为CVA16的病毒分离物,进行全长VP1区核苷酸序列测定和分析。结果显示70株CVA16分离株的VP1区核苷酸序列的长度都是891个核苷酸,编码297个氨基酸。并与基因数据库(GenBank Database)检索到的CVA16各个基因型及亚型代表株的VP1区核苷酸序列,进行核苷酸序列同源性分析。结果显示,本研究的70株CVA16分离株在VP1区核苷酸水平和氨基酸水平上有一定差异,全长VP1区的核苷酸和氨基酸同源性分别在90.8%~100.0%和98.9%~100.0%之间,说明除了HEV71引起的HFMD外,宁夏地区疫情还由多个CVA16传播链引起。进一步分析发现,这70株CVA16分离株与B基因型的B1基因亚型在核苷酸水平上同源性最高,全部属于B1基因亚型。其中38株CVA16分离株与以2008—2009年中国山东CVA16、2008年福建CVA16和2007—2008年日本富山CVA16株为代表的B1a进化分支的核苷酸同源性最高(97.0%~98.0%);另32株CVA16分离株与以2008年山东CVA16、2003年北京CVA16和2008年广东CVA16的核苷酸为代表的B1b进化分支核苷酸同源性最高(93.0%~97.0%)。可见这些CVA16分离株分别属于B1a和B1b两大进化分支。

3. 亲缘进化树分析:根据CVA16的VP1编码区核苷酸序列,将本研究的70株CVA16分离株与各个基因型和基因亚型的CVA16代表株构建亲缘进化树。与目前国内外的研究结果一致,进化树(图1)显示所有CVA16株分为2个不同的基因型——A和B基因型<sup>[5]</sup>。CVA16的原型株(G-10/RSA/1951)是A基因型唯一成员,与其他CVA16代表株存在明显差异;B基因型目前可分为B1和B2基因亚型(B2基因亚型主要由1981—2000年的CVA16分离株构成,代表了早期流行的CVA16,但在2000年之后,B1基因亚型逐渐取代了B2基因亚型,衍变成为近期的流行优势株)。宁夏地区2008年CVA16分离株均属于B1基因亚型,70株CVA16分离株明显分为两大簇,分属于B1a和B1b两大进化分支,其中B1a包含38株宁夏CVA16分离株及6株2008—2009年中国山东CVA16、1株2008年福建CVA16和2株2007—2008年日本富山CVA16;B1b包含其余32株宁夏CVA16分离株及5株2008年山东CVA16、1株2003

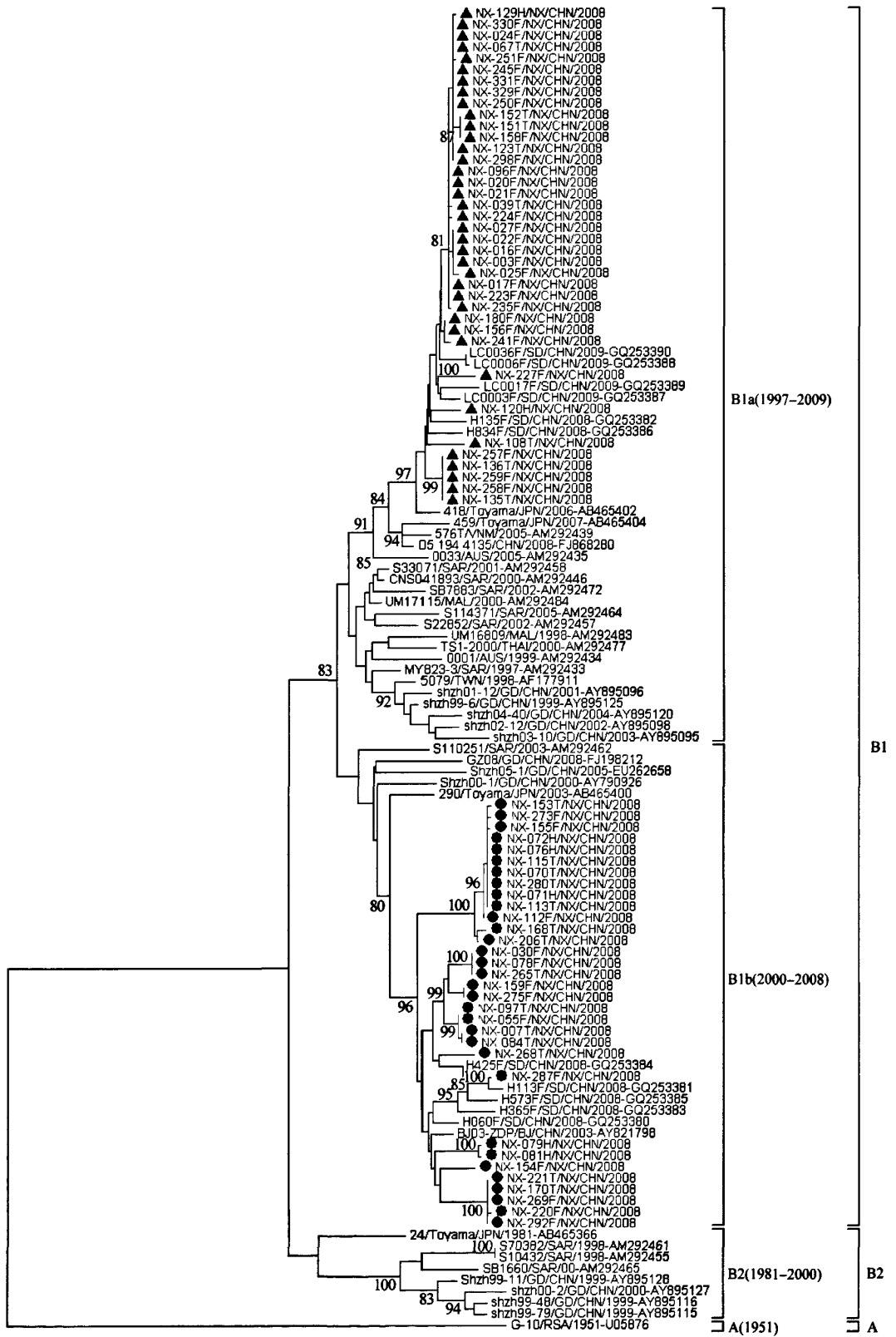
年北京CVA16和1株2008年广州CVA16。70株CVA16分离株中B1a和B1b两大进化分支间的平均基因差异为9.8%。

## 讨 论

自从1951年在南非分离到CVA16以来,其流行范围已遍布全球。不同基因型或基因亚型的CVA16和HEV71交替循环或共循环于东亚和东南亚地区,导致近20年HFMD在该地区反复暴发<sup>[12-15]</sup>。由于CVA16和HEV71都是引起HFMD的主要病原体,所以在一起HFMD暴发中经常同时检测到这两种病原体,但实验室检测结果显示,2008年引起的HFMD大规模流行的主要病原体仍然是HEV71,同时也有相当比例的CVA16,且很多病例同时感染这两种病原体<sup>[7]</sup>。2008年宁夏HFMD暴发的病原学检测结果与全国大部分地区类似,临床标本中分离的HEV71仍然属于我国正在流行的HEV71优势基因型——C4a基因亚型<sup>[16]</sup>;同时由于2008年宁夏地区HFMD病例以轻症病例为主,全年仅报告了4例重症病例,且无死亡病例报告,推测CVA16的流行在该地区HFMD暴发中起到重要角色。由于CVA16的基因组仅有一个开放读码框架(ORF),该ORF包含P1、P2和P3三个区,其中P1区编码病毒的结构蛋白VP1~VP4<sup>[17]</sup>,而VP1编码区全长891个核苷酸,编码含297个氨基酸残基的VP1结构蛋白,具有与病毒血清型基本对应的遗传多样性。很多研究表明,VP1区的核苷酸序列可作为HEV血清型鉴定和基因分型的依据<sup>[18,19]</sup>。故本研究分析CVA16分离株的VP1编码区基因特征。

本研究与GenBank数据库中的CVA16毒株核苷酸序列比对,表明宁夏地区2008年HFMD病例分离的70株CVA16分离株均为B基因型B1基因亚型,与我国正在流行的基因亚型相同。这70株在VP1区核苷酸和氨基酸水平上有一定差异,全长VP1区的核苷酸和氨基酸同源性分别在90.8%~100.0%和98.9%~100.0%,明显分为两大簇,分属于B1a和B1b两条进化分支,提示目前有两进进化分支的CVA16在宁夏地区共循环,两条进化分支在发病地区上有交叉现象,即进化分支内有同一地区呈现聚集性的特点,也有不同地区基因型核苷酸序列具有很大的相似性;同时两个进化分支中又细分为多条小分支,提示HFMD流行期间存在多个小传播链。

从图1可见,两大进化分支上的CVA16,分别与



注: ▲代表属于B1基因亚型B1a进化分支的38株宁夏CVA16; ●代表属于B1基因亚型B1b进化分支的32株宁夏CVA16

图1 70株宁夏CVA16分离株和其他46株各个基因型CVA16代表株全长VP1区的进化树分析

近年来在我国其他省份及周边国家和地区流行的 CVA16 亲缘关系较为接近,其中 B1a 进化分支的 CVA16 在我国山东省以及日本富山市也有分离到, B1b 进化分支的 CVA16 在我国山东、北京和广州地区都有发现。说明 B1 亚型在我国其他地区及周边国家广泛分布和流行,宁夏地区的 CVA16 株与我国其他省市和周边国家地区的 CVA16 株存在共同进化。

从已有的研究结果看,目前在中国大陆的 CVA16 分离株均为 B1 基因亚型,显示其为中国大陆 CVA16 的优势基因亚型,并有着广泛的分布和传播,自从 1999 年在深圳市首次报道分离到 CVA16 分离株以来, B1 基因亚型的 CVA16 株在中国大陆持续循环;宁夏 CVA16 分离株与我国其他地区分离株类似,有 B1a 和 B1b 两个进化分支在共同循环,且与我国周边国家和地区流行的 CVA16 在基因亲缘关系和流行时间关系上都很接近,说明宁夏 CVA16 和它们存在共同进化和循环,因此应加强 CVA16 的网络监测,进一步了解其在我国的流行情况。

参 考 文 献

[1] Komatsu H, Shimizu Y, Takeuchi Y, et al. Outbreak of severe neurologic involvement associated with enterovirus 71 infection. *Pediatr Neurol*, 1999, 20(1): 17-23.

[2] 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 Clin Microbiol*, 2005, 43(8): 3835-3839.

[3] Chang LY, Lin TY, Huang YC, et al. Comparison of enterovirus 71 and coxsackie-virus A16 clinical illnesses during the Taiwan enterovirus epidemic, 1998. *Pediatr Infect Dis J*, 1999, 18(12): 1092-1096.

[4] 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 Clin Microbiol*, 2007, 45(1): 112-120.

[5] Perera D, Yusof MA, Podin Y, et al. Molecular phylogeny of modern coxsackievirus A16. *Arch Virol*, 2007, 152(6): 1201-1208.

[6] Iwai M, Masaki A, Hasegawa S, et al. Genetic changes of coxsackievirus A16 and enterovirus 71 isolated from hand, foot, and mouth disease patients in Toyama, Japan between 1981 and 2007. *Jpn J Infect Dis*, 2009, 62(4): 254-259.

[7] Yang F, Ren L, Xiong Z, et al. Enterovirus 71 outbreak in the People's Republic of China in 2008. *J Clin Microbiol*, 2009, 47

(7): 2351-2352.

[8] World Health Organization. *Polio laboratory manual*. 4th ed. Document World Health Organization/IVB/04.10. Geneva, Switzerland, 2004.

[9] 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 Clin Microbiol*, DOI: 10.1128/JCM. 02338-09.

[10] Zhang Y, Zhu SL, Zhao R, et al. Genetic analysis of VP1 region of vaccine-associated polioviruses from AFP case in China. *Chin J Virol*, 2004, 20(1): 28-33. (in Chinese)

张勇, 祝双利, 赵蓉, 等. 中国急性弛缓性麻痹病例中脊髓灰质炎病毒疫苗株 VP1 区基因变异的研究. *病毒学报*, 2004, 20(1): 28-33.

[11] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*, 2007, 24(8): 1596-1599.

[12] Zhang Y, Tan XJ, Wang HY, et al. An outbreak of hand, foot, and mouth disease associated with subgenotype C4 of human enterovirus 71 in Shandong, China. *J Clin Virol*, 2009, 44(4): 262-267.

[13] Yan JJ, Wang JR, Liu CC, et al. An outbreak of enterovirus 71 infection in Taiwan 1998; a comprehensive pathological, virological, and molecular study on a case of fulminant encephalitis. *J Clin Virol*, 2000, 17(1): 13-22.

[14] Shah VA, Chong CY, Chan KP, et al. Clinical characteristics of an outbreak of hand, foot and mouth disease in Singapore. *Ann Acad Med Singapore*, 2003, 32(3): 381-387.

[15] Liu CC, Tseng HW, Wang SM, et al. An outbreak of enterovirus 71 infection in Taiwan, 1998: epidemiologic and clinical manifestations. *J Clin Virol*, 2000, 17(1): 23-30.

[16] Ma JT, Chen H, Ma XM, et al. Genetic characterization of enterovirus 71 stains isolated in Ningxia province in 2008. *Chin J Epidemiol*, 2009, 30(7): 726-728. (in Chinese)

马江涛, 陈慧, 马学旻, 等. 宁夏地区 2008 年肠道病毒 71 型分离株基因特征分析. *中华流行病学杂志*, 2009, 30(7): 726-728.

[17] Brown BA, Pallansch MA. Complete nucleotide sequence of enterovirus 71 is distinct from poliovirus. *Virus Res*, 1995, 39(2-3): 195-205.

[18] Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, et al. Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J Clin Microbiol*, 1999, 37(5): 1288-1293.

[19] Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, et al. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J Virol*, 1999, 73(3): 1941-1948.

(收稿日期: 2010-02-02)

(本文编辑: 张林东)