

宁夏回族自治区 2013 年手足口病患者 柯萨奇病毒 A 组 10 型分离株 VP1 区 基因特征分析

马江涛 袁芳 陈慧 马学旻 詹军 李丽

【摘要】 目的 了解宁夏回族自治区(宁夏)手足口病(HFMD)患者中柯萨奇病毒 A 组 10 型(Cox A10)分离株的 VP1 区基因特征。方法 收集 2013 年 real-time PCR 检测非 EV71 和非 Cox A16 肠道病毒标本 280 份,用 RD 细胞进行肠道病毒分离培养,分离到的毒株采用 RT-PCR 扩增其 VP1 区基因并进行核苷酸序列测定,测序结果利用 BLAST 进行型别鉴定。对鉴定为 Cox A10 的所有毒株进行 VP1 区基因同源性分析和进化分析。结果 从 280 份标本中共分离到肠道病毒 36 株,其中有 6 株鉴定为 Cox A10,核苷酸和氨基酸同源性分别为 97.0%~99.8% 和 99.0%~99.7%。与 A、B、C、D 各基因亚型代表株之间的核苷酸同源性分别为 76.3%~77.2%、81.6%~83.1%、94.4%~98.9% 和 80.0%~82.3%,氨基酸序列同源性分别为 92.3%~93.0%、94.0%~95.3%、98.0%~99.7% 和 90.6%~94.0%。系统进化显示,6 株 Cox A10 宁夏株与 C 基因型代表株处于同一分支。结论 Cox A10 是引起宁夏 2013 年 HFMD 的常见病原体,本次分离到的 Cox A10 均属于 C 基因型。

【关键词】 手足口病;柯萨奇病毒 A 组 10 型;基因特征

Genetic characteristics of VP1 region of coxsackievirus A10 strains isolated from hand foot and mouth disease patients in Ningxia Hui Autonomous Region, 2013 Ma Jiangtao, Yuan Fang, Chen Hui, Ma Xuemin, Zhan Jun, Li Li. *Ningxia Hui Autonomous Region Center for Disease Control and Prevention, Yinchuan 750004, China*

Corresponding author: Ma Jiangtao, Email: majt1980@sohu.com

This work was supported by a grant from the Science Study Support Project of Ningxia Hui Autonomous Region (No. 2013ZYS119).

【Abstract】 **Objective** To study the genetic characteristics of VP1 region of coxsackievirus A10(Cox A10) strains isolated from hand foot and mouth disease (HFMD) cases in Ningxia Hui Autonomous Region (Ningxia) in 2013. **Methods** A total of 280 specimens, which were identified as non-enterovirus 71 and non-Cox A16 by real-time PCR, were collected and cultured by using RD cell, and the VP1 genes of isolated strains were amplified by using reverse transcriptase PCR (RT-PCR) with degenerated primers and sequenced. The sequencing results were aligned with the sequences in GenBank with BLAST algorithm to identify the virus genotypes. Homologous comparison and phylogenetic analysis were conducted for all the Cox A10 strains identified. **Results** Among 36 virus strains isolated from 280 clinical specimens, 6 were identified as Cox A10. The homologies of nucleotide and amino acid of the Cox A10 strains isolated in Ningxia were 97.0%–99.8% and 99.0%–99.7% respectively, and the Cox A10 strains isolated in Ningxia shared 76.3%–77.2%, 81.6%–83.1%, 94.4%–98.9% and 80.0%–82.3% nucleotide homologies respectively and shared 92.3%–93.0%, 94.0%–95.3%, 98.0%–99.7% and 90.6%–94.0% amino acid homologies respectively with the representative strains of A, B, C and D genotypes. Phylogenetic tree analysis revealed that Cox A10 strains isolated in Ningxia belonged to genotype C. **Conclusion** Cox A10 is one of the most common pathogen causing HFMD in Ningxia in 2013. All the Cox A10 stains isolated from HFMD patients in Ningxia belonged to genotype C.

【Key words】 Hand foot and mouth disease; Coxsackievirus A10; Genetic characteristics

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2015.07.015

基金项目:宁夏回族自治区科研支撑项目(2013ZYS119)

作者单位:750004 银川,宁夏疾病预防控制中心

通信作者:马江涛, Email: majt1980@sohu.com

手足口病(HFMD)是由人类肠道病毒引起的一种常见传染病,主要病原是肠道病毒 71 型(EV71)和柯萨奇病毒 A 组 16 型(Cox A16)。但近年来,该病原谱逐渐发生了变化,非 EV71 和非 Cox A16 的其他肠道病毒比例逐渐增加^[1-2],而且导致重症或死亡病例发生^[3]。2013 年宁夏回族自治区(宁夏)共报告 HFMD 病例 6 069 例,实验室诊断病例 796 例,其中 104 例 EV71 型,412 例 Cox A16,其他肠道病毒 280 例。为了解肠道病毒型别构成情况和常见病原体的基因特征,本研究对 2013 年分离到的柯萨奇病毒 A 组 10 型(Cox A10)毒株进行了 VP1 区基因测序和特征分析。

材料与方法

1. 标本来源:2013 年宁夏各市(县)共采集 HFMD 临床病例标本 1 155 份,其中粪便标本 272 份、咽拭子 883 份。

2. 病毒核酸提取和鉴定:标本按照国家《手足口病防治指南》(2009 版)处理后,吸取 200 μ l 上清液提取病毒 RNA,采用硕世生物科技公司生产的 EV71、Cox A16 和肠道病毒通用检测试剂进行核酸检测,步骤及条件参见试剂说明书。

3. 病毒分离:取 200 μ l 核酸检测阳性标本上清液,接种至长满单层、形态良好的 RD 细胞,置 36 $^{\circ}$ C 培养箱内,连续 7 d 观察细胞病变(CPE),当 CPE \geq 75% 时收获病毒,并置于 -20 $^{\circ}$ C 保存;若连续传 2 代仍无 CPE 出现,则判为阴性。

4. RT-PCR 检测:病毒分离阳性分离物反复冻融后,提取病毒 RNA,根据参考文献,使用兼并引物进行肠道病毒 VP1 区 RT-PCR 扩增^[4]。扩增试剂为北京全式金生物技术有限公司一步法 RT-PCR 试剂盒,反应条件:42 $^{\circ}$ C 45 min,95 $^{\circ}$ C 2 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,50 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 80 s,40 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析结果。

5. 序列测定与分析:电泳阳性 PCR 产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行核苷酸序列测

定。测序结果利用 SeqMan 软件进行拼接,拼接后的序列进行 BLAST 同源性检索。对鉴定为 Cox A10 的宁夏株与各亚型代表株利用 MegAlign 软件进行核苷酸和氨基酸同源性分析,利用 Mega 6.0 软件采用邻接法构建系统发生树,建树的可靠性通过 1 000 bootstrap 来评估。用于同源性分析和构建系统发生树的参比序列均来自 GenBank。

结 果

1. HFMD 病原构成:2013 年共采集临床 HFMD 病例标本 1 155 份,经 real-time PCR 检测,阳性标本为 796 份,阳性率为 68.92%;其中 EV71、Cox A16 和其他肠道病毒分别为 104、412 和 280 份,所占比例分别为 13.06%、51.76% 和 35.18%。

2. 其他肠道病毒的分离和鉴定:使用 RD 细胞从 280 份标本中共分离到其他肠道病毒 28 株,通过对其 VP1 区基因测序和 BLAST 分析,共鉴定出 4 个基因型别,其中 6 株(21.43%) Cox A10,4 株(14.29%) Cox A4,5 株(17.86%) Cox A6,2 株(7.14%) Cox A14,未分型肠道病毒 11 株(39.29%)。

3. Cox A10 宁夏株 VP1 区核苷酸、氨基酸序列分析:对 6 株 Cox A10 宁夏株及从 GenBank 中检索到的 Cox A10 原型株(Kowalik/USA/1950)和其他地区流行株进行 VP1 区核苷酸和氨基酸序列同源性分析^[3]。发现 6 株 Cox A10 宁夏株间具有较高的同源性,相互间核苷酸同源性为 97.0%~99.8%,氨基酸同源性为 99.0%~99.7%。与 A、B、C、D 各型别代表株的同源性比较发现,6 株 Cox A10 宁夏株与 C 型代表株的核苷酸和氨基酸同源性最高,分别为 94.4%~98.9% 和 98.0%~99.7%(表 1)。

4. Cox A10 宁夏株亲缘进化分析:VP1 区基因系统发生树分析显示,Cox A10 被划分为 4 个基因型(A~D),我国目前分离到的 Cox A10 毒株均属于 B 基因型和 C 基因型,其中 B 基因型主要包括山东省 2004—2008 年分离株,C 基因型主要包括山东省和江苏省 2008—2012 年分离株和河北省 2013 年分离

表 1 6 株 Cox A10 宁夏株与各基因型代表株间 VP1 区核苷酸和氨基酸序列同源性分析(%)

基 因	A	B	C	D
YC13-075T-NX-CHN-2013	77.2(93.0)	81.8~83.0(94.3~95.0)	94.4~97.2(98.0~99.0)	80.9~82.3(91.3~94.0)
YC13-076T-NX-CHN-2013	77.1(92.6)	81.7~82.9(94.0~94.6)	94.5~97.4(98.3~99.3)	80.8~82.1(91.0~93.6)
SZS13-011T-NX-CHN-2013	76.5(92.6)	81.7~82.9(94.3~95.0)	95.0~98.9(98.7~99.7)	80.0~81.2(90.6~93.3)
SZS13-012T-NX-CHN-2013	76.5(92.3)	81.6~82.8(94.0~94.6)	94.7~98.7(98.3~99.3)	80.0~81.2(90.6~93.3)
SZS13-025T-NX-CHN-2013	76.3(92.3)	81.6~82.8(94.3~95.0)	94.4~98.2(98.3~99.0)	80.1~81.2(91.0~93.6)
SZS13-034T-NX-CHN-2013	76.5(92.6)	81.9~83.1(94.6~95.3)	94.6~98.5(98.3~99.3)	80.1~81.4(91.0~93.6)

注:各基因型代表株与用于进化树构建的代表株相同,括号内数据为氨基酸同源性

株, A 基因型仅有美国一株 Kowalik 原型株, 与其他型别同源性差别较大, D 基因型主要包括国外一些国家分离到的毒株, 如西班牙 2008 年分离株、法国 2010 年分离株和俄罗斯 2010 年分离株。从基因进化关系来看, 2009 年以后我国流行的 Cox A10 主要以 C 基因型为主。本次分离到的 6 株宁夏株与 C 型代表株处于同一分支, 属于 C 型 Cox A10, 与 2009 年以后我国其他地区流行型别一致^[3,5]。6 株宁夏株之间, 银川地区分离株(YC13-075T 和 YC13-075T3) 与石嘴山地区分离株(SZS13-012T、SZS13-025T 和 SZS13-025T) 同源差距较大, 具有明显的地域性, 形成了不同支系, 表明有多条传播链在宁夏地区共循环。

讨 论

除了 EV71 和 Cox A16 之外, 近年来 Cox A10、Cox A6 和 Cox B3 等病毒也逐渐演变成成为 HFMD 的常见病原体^[1,6-9]。新加坡学者在 2009 年提出^[10], Cox A10 是除 EV71 外可单独引起重症病例的病原体, 在疾病防控中, 与 EV71 和 Cox A16 地位同等重要。

本次研究使用兼并引物对宁夏非 EV71 和非 Cox A16 肠道病毒进行了 RT-PCR 鉴定, 结果显示, 在宁夏 HFMD 病例的病原中, Cox A10 构成了除 EV71 和 Cox A16 之外的最主要的病原体, 与我国河北、广东、山东等省份监测结果一致^[3,5,11-12]。针对 2013 年我国各省份 HFMD 病原中其他肠道病毒所占比例大幅度增高的现象, 希望引起有关部门的重视。

通过对病毒基因进化和同源性分析发现, Cox A10 病毒划分为 4 个基因型(A ~ D), 与 Tian 等^[3]研究结果一致。我国流行 Cox A10 具有明显的时间进化特征, 2004—2008 年主要以 B 基因型流行为主, 2009 年以后主要以 C 基因型为主。根据不同年度毒株进化关系来看, 相比较 2008—2010 年山东、江苏等地流行的 Cox A10,

宁夏流行株与 2012 年河北省石家庄市流行株具有更高的同源性, 说明宁夏地区流行的 Cox A10 与国内同一时期流行 Cox A10 一致。但通过病毒系统进化分析发现, 宁夏株进化又相对独立, 与同源性最高的石家庄株相比, 核苷酸同源性为 97.0% ~ 98.9%, 氨基酸同源性为 99.0% ~ 99.7%, 形成了较为独立的进化分支, 说明可能宁夏地区性流行时间较长, 为更加清楚地阐述其在宁夏地区的流行情况, 需要做好连续性监测。

6 株宁夏株之间也具有明显的地域特征, 2 株银川分离株与 4 株石嘴山分离株形成了两支明显的传播链 Lineage 1 和 Lineage 2(图 1)。同一传播链毒株之间核苷酸同源性较高, Lineage 1 毒株间的同源性为 99.3% ~ 99.8%, Lineage 2 毒株间的同源性为 99.3%; 不同传播链毒株之间同源性也有差异, Lineage 1 和 Lineage 2 毒株间的同源性为 97.0% ~ 97.3%。而且不同地区之间毒株形成了两支明显的传播链。表明宁夏流行 Cox A10 具有明显的地域性, 存在至少两条传播链发生共循环。

引起 HFMD 的病原体种类繁多, 其主导病原体

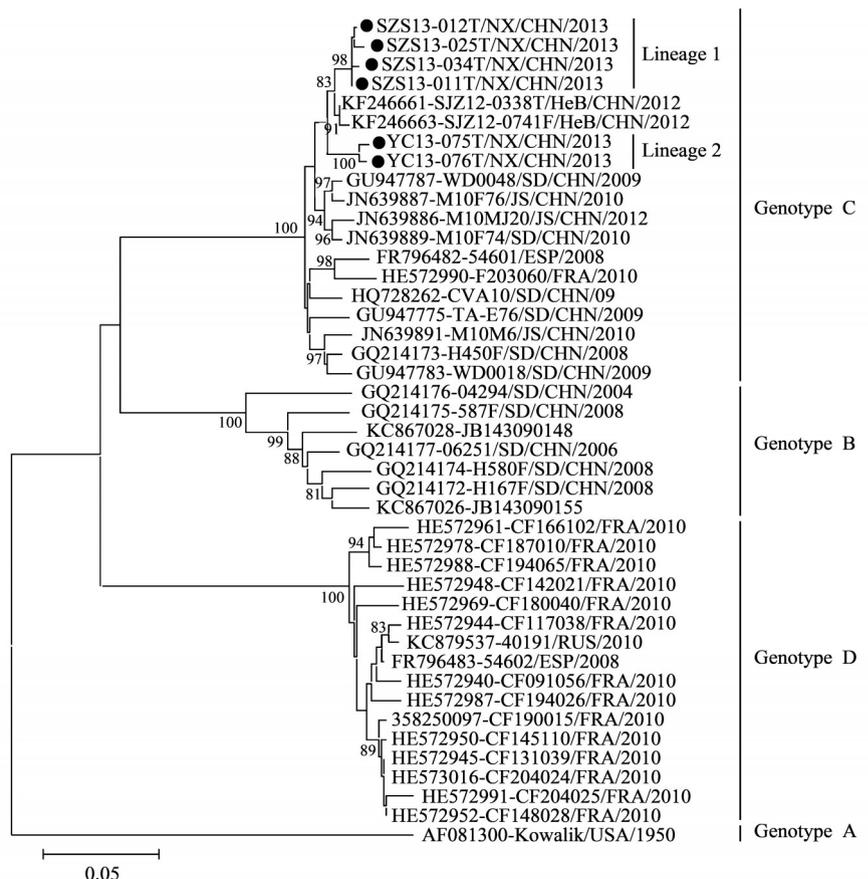


图 1 6 株宁夏 Cox A10 分离株与各型代表株的 VP1 基因(894nt)系统发生树

在不断地发生着变化。随着主要引起HFMD病原体——EV71和Cox A16的广泛流行,其通过自然感染而建立的免疫屏障达到一定的保护水平后,另外一种病原体的危害性会凸显出来。因此,加强不同时间、不同地区其他肠道病毒的监测,全面了解其基因进化特征和遗传信息,对于当地HFMD的防控具有重要的意义。

参 考 文 献

- [1] Lu QB, Zhang XA, Wo Y, et al. Circulation of Coxsackievirus A10 and A6 in hand-foot-mouth disease in China, 2009–2011 [J]. PLoS One, 2012, 7(12): e52073.
- [2] Hu YF, Yang F, Du J, et al. Coxsackievirus B5, associated with neurological hand, foot and mouth disease, China [J]. J Infect, 2012, 65(2): 189–191.
- [3] Tian HF, Zhang Y, Sun Q, et al. Prevalence of multiple enteroviruses associated with hand-foot-mouth disease in Shijiazhuang city, Hebei province in China: Outbreaks of Coxsackieviruses A10 and B3 [J]. PLoS One, 2014, 9 (1) : e84233.
- [4] Oberste MS, Maher K, Williams AJ, et al. Species-specific RT-PCR amplification of human enteroviruses: a tool for rapid species identification of uncharacterized enteroviruses [J]. J Gen Virol, 2006, 87(1): 119–128.
- [5] He YQ, Chen L, Xu WB, et al. Emergence, circulation, and spatiotemporal phylogenetic analysis of Coxsackievirus A6- and Coxsackievirus A10-associated hand, foot, and mouth disease infections from 2008 to 2012 in Shenzhen, China [J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(11): 3560–3566.
- [6] Blomqvist S, Klemola P, Kaijalainen S, et al. Co-circulation of Coxsackieviruses A6 and A10 in hand, foot and mouth disease outbreak in Finland [J]. J Clin Virol, 2010, 48(1): 49–54.
- [7] Chen C, Xie HP, Cui M, et al. An investigation on a case of hand-foot-mouth disease caused by Coxsackie-virus A6 associated with a vaccine-derived poliovirus co-infection [J]. Chin J Epidemiol, 2014, 35(1): 61–65. (in Chinese)
- 陈纯, 谢华萍, 崔敏, 等. 柯萨奇 A6 型手足口病耦合脊髓灰质炎疫苗衍生株感染一例调查 [J]. 中华流行病学杂志, 2014, 35 (1): 61–65.
- [8] Mirand A, Henquell C, Archimbaud C, et al. Outbreak of hand, foot and mouth disease herpangina associated with Coxsackievirus A6 and A10 infections in 2010, France: a large citywide, prospective observational study [J]. Clin Microbiol Infect, 2012, 18(5): E110–118.
- [9] Hu YF, Yang F, Du J, et al. Complete genome analysis of Coxsackievirus A2, A4, A5, and A10 strains isolated from hand, foot and mouth disease patients in China revealing frequent recombination of human enterovirus A [J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(7): 2426–2434.
- [10] Anq LW, Koh BK, Chan KP, et al. Epidemiology and control of hand, foot and mouth disease in Singapore, 2001–2007 [J]. Ann Acad Med Singapore, 2009, 38(2): 106–112.
- [11] Yang H, Tao ZX, Wang HY, et al. The genetic characterization of VP1 region of Coxsackie virus A10 isolated from hand, foot and mouth disease cases in Shandong province of China [J]. Chin J Infect Dis, 2010, 28(7): 385–389. (in Chinese)
- 杨赫, 陶泽新, 王海岩, 等. 手足口病患者柯萨奇病毒 A10 型山东地方株 VP1 区基因特征分析 [J]. 中华传染病杂志, 2010, 28 (7): 385–389.
- [12] Zhen RN, Zhang Y, Xie HP, et al. Sequence analysis of VP1 region of Coxsackievirus A4 and Coxsackievirus A10 in Guangzhou city, 2010–2012 [J]. Chin J Prev Med, 2014, 48(6): 445–450. (in Chinese)
- 甄若楠, 张颖, 谢华萍, 等. 2010–2012 年广州市柯萨奇病毒 A4、A10 型 VP1 基因特征分析 [J]. 中华预防医学杂志, 2014, 48 (6): 445–450.

(收稿日期: 2014–12–03)

(本文编辑: 王岚)