

手足口病监测专题



2014—2015 年湖北省手足口病肠道病毒 71 型和柯萨奇病毒 A 组 16 型 VP1 基因特征

占建波, 李静, 杨朝晖, 詹发先

摘要: **目的** 了解湖北省手足口病肠道病毒 71 型 (EV71) 和柯萨奇病毒 A 组 16 型 (Cox A16) 的 VP1 基因特点, 研究该省 EV71 和 Cox A16 的基因型别及分子进化特征。**方法** 对 2014—2015 年湖北省 26 株 EV71 和 27 株 Cox A16 流行株的 VP1 基因测序, 分析其同源性和遗传进化特征。**结果** 2014—2015 年湖北省 EV71 和 Cox A16 流行株 VP1 核苷酸和蛋白氨基酸序列同源性均较高, EV71 流行株的蛋白氨基酸和核苷酸序列同源性分别为 97.6% ~ 100.0% 和 92.3% ~ 100.0%。Cox A16 流行株的蛋白氨基酸和核苷酸序列同源性分别为 96.6% ~ 100.0% 和 92.3% ~ 100.0%。EV71 的 VP1 基因系统进化分析表明, 湖北省流行的 EV71 与我国其他地区流行的 EV71 均位于一个大的分支上, 均为 C4 基因型的 C4a 亚型。Cox A16 流行株与 B1b 亚型代表株位于同一分支上, 主要为 B1b 亚型。**结论** 2014—2015 年湖北省 EV71 和 Cox A16 流行株分别为 C4a 亚型和 B1b 亚型, 其核苷酸和氨基酸与国内外其他地区的手足口病病毒株均有较高同源性。

关键词: 肠道病毒 71 型; 柯萨奇病毒 A 组 16 型; VP1 基因

中图分类号: R373.2

文献标志码: A

文章编号: 1003-9961(2017)02-0096-06

Analysis on genetic characteristics of VP1 genes of enterovirus 71 and coxsackievirus A16 in Hubei, 2014–2015 ZHAN Jian-bo, LI Jing, YANG Zhao-hui, ZHAN Fa-xian. Division for Viral Disease Detection, Hubei Provincial Center for Disease Control and Prevention, Wuhan 430079, Hubei, China

Corresponding author: LI Jing, Email: 412836800@qq.com

Abstract: **Objective** To understand the genetic characteristics of Enterovirus 71 (EV71) and Coxsackievirus A16 (Cox A16) causing hand foot and mouth disease in Hubei province. **Methods** The genotype and molecular characteristics of VP1 genes of EV71 and Cox A16 strains circulating in Hubei from 2014 to 2015 were analyzed. **Results** The EV71 strains shared 92.3%–100.0% and 97.6%–100.0% homology respectively in nucleotide and amino acid sequences of VP1 genes. The Cox A16 strains shared 92.3%–100.0% and 96.6%–100.0% homology respectively in nucleotide and amino acid sequences of VP1 genes. Phylogenetic analysis indicated that the EV71 strains belonged to sub genotype C4a and the Cox A16 strains belonged to sub genotype B1b. **Conclusion** The genotypes of EV71 and Cox A16 strains in Hubei from 2014 to 2015 were C4a and B1b respectively. The strains' nucleotide and amino acid shared high homology with the strains isolated from other areas both at home and abroad.

Key words: Enterovirus 71; Coxsackievirus A16; VP1 gene

This study was supported by the fund for National Major Scientific Research Program (No. 2012ZX10004207)

自 2008 年 3 月安徽等地报道手足口病以来, 由肠道病毒 71 型 (Enterovirus 71, EV71) 和柯萨奇病毒 A 组 16 型 (Coxsackievirus A16, Cox A16) 引起的手足口病在我国一直流行。近年来, 手足口病在我国的发病率和病死率呈上升趋势, 可能与病毒变异

或重组、易感人群累积和遗传敏感性有关, 已经严重威胁到患者的生命健康^[1-2]。手足口病是儿童常见的急性肠道传染病, 由人肠道病毒引起, 属于小核糖核酸病毒科、肠病毒属, 多发生于 5 岁以下婴幼儿。引起手足口病的肠道病毒有 20 多种, 其中最常见的是 EV71 和 Cox A16^[3]。EV71 引起手足口病可诱发严重并发症, 其发生比例与其他病毒相比, 不仅发生率高且病情严重。相对于 EV71, Cox A16 引起的手足口病症状较轻, 且很少有并发症发生。EV71 与 Cox A16 在遗传上有一定的相似性, 二者联合感染流行常会导致比较严重的手足口病

基金项目: 国家科技重大专项 (No. 2012ZX10004207)

作者单位: 湖北省疾病预防控制中心病毒检测部, 湖北 武汉 430079

作者简介: 占建波, 男, 湖北省武汉市人, 在读博士, 主管技师, 主要从事医学分子病毒学的研究工作

通信作者: 李静, Tel: 027-87652337, Email: 412836800@qq.com

收稿日期: 2016-09-16



疫情^[4]。

本研究根据 2014—2015 年湖北省手足口病原学监测结果,对 EV71 和 Cox A16 进行 VP1 基因序列测定和遗传进化特征分析,探明 EV71 和 Cox A16 在湖北省的主要型别以及分子流行病学特点,为疫情的预防控制提供科学的理论依据。

1 资料与方法

1.1 样本来源 标本为 2014—2015 年湖北省手足口病原学监测上送省级实验室的肛拭子、咽拭子或疱疹液。样本来自于黄石市、鄂州市、宜昌市、咸宁市、荆门市、荆州市、潜江市和神农架林区。采用实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real time polymerase chain reaction, qRT-PCR)对部分地区 212 份疑似手足口病标本进行 EV71 和 Cox A16 核酸检测,分别检出 51 份 EV71 和 32 份 Cox A16 阳性标本。

1.2 核酸提取 采用 Viral RNA Mini Extraction Kit (Qiagen)对手足口病标本进行核酸提取,具体操作步骤参考试剂盒说明书进行,提取核酸于 -70 °C 暂存,并及时检测。

1.3 PCR 检测 采用 ABI7500 荧光定量 PCR 仪器进行检测, EV71 和 CoxA16 手足口病病毒检测试剂盒购自江苏硕世生物科技有限公司。根据试剂盒说明书检测进行, qRT-PCR 扩展曲线呈典型“S”形扩增曲线且 Ct 值 ≤ 38, 则判样本为阳性。

1.4 VP1 基因扩增 对 EV71 和 Cox A16 核酸

qRT-PCR 检测阳性的样本进行 VP1 基因扩增,根据文献对 EV71 和 Cox A16 的 VP1 基因引物进行扩增^[5]。PCR 和基因测序使用 one-step RT-PCR 法 (TaKaRa 公司) 进行 VP1 基因扩增。扩增条件: 94 °C 变性 3 min, 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环, 72 °C, 7 min。PCR 产物直接测序, 基因测序在生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.5 同源性比对与遗传进化分析 所获序列与 NCBI 中 EV71 与 Cox A16 的 VP1 基因序列比对。采用 DNA Star Meg Align 5.0 与 Mega 5.0 软件构建进化树和序列同源性分析。

1.6 序列信息 本研究中 EV71、Cox A16 序列 GenBank 收录号分别为 KY100879-904、KY100905-931。

2 结果

2.1 PCR 和序列测定 使用 EV71 和 Cox A16 的 VP1 基因引物进行 PCR 扩增, PCR 产物大小分别约为 1 200 bp 和 1 100 bp, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

2.2 EV71 的 VP1 基因同源性分析 将来自湖北省 2014—2015 年 26 株 EV71 流行株与来自 NCBI 中的 EV71 病毒株进行氨基酸与核苷酸序列同源性比对。EV71 病毒株的氨基酸与核苷酸序列同源性分别为 97.6% ~ 100.0% 和 92.3% ~ 100.0%, 与我国其他地区 EV71 病毒株的核苷酸和氨基酸序列具有较高同源性, 见表 1。

表 1 湖北省 EV71 和 Cox A16 与其他 EV71 病毒株 VP1 同源性分析

Table 1 Homology of nucleotide and amino acid sequence of EV71 strains in Hubei with other EV71 strains in VP1 genes

基因型 (GenBank No.)	亚型	核苷酸同源性 (%)	氨基酸同源性 (%)
Cox A16 G-10 (U05876)	Cox A16	62.5 ~ 63.3	71.7 ~ 72.4
BrCr (ETU22521)	A	80.6 ~ 82.8	93.6 ~ 94.9
0915-MA-87 (AF009549)	C1	87.8 ~ 89.2	97.6 ~ 99.3
933V/VNM/2005 (AM490161)	C5	85.6 ~ 86.8	97.6 ~ 99.0
Chongqing3-09 (GQ994991)	C4a	95.5 ~ 96.7	98.3 ~ 100.0
2885-TAI-98 (AF286512)	C2	88.1 ~ 89.2	97.6 ~ 99.3
3254-TAL/1998 (AF286531)	C4b	90.6 ~ 92.6	98.0 ~ 99.3
Fuyang17.08 (EU703813)	C4a	97.0 ~ 98.3	98.6 ~ 100.0
Shenzhen-SZ42-2014 (KT428648)	C4a	95.5 ~ 99.3	98.0 ~ 99.7
BJ08-Z011 (FJ606448)	C4a	96.0 ~ 98.3	99.0 ~ 100.0
SHZH98/CHN/1998 (AF302996)	C4b	89.9 ~ 91.9	96.0 ~ 97.3
SH12-276-2012 (KC570453)	C4a	95.2 ~ 96.3	98.7 ~ 100.0
Ningbo-2010 (JN001860)	C4a	96.6 ~ 97.9	98.7 ~ 100.0
419-GD-2009 (JF519698)	C4a	96.4 ~ 97.8	98.3 ~ 100.0
KOR-EV-71-06 (AY125970)	C3	86.9 ~ 88.0	97.4 ~ 99.0
Jiangsu07.08 (fj600325)	C4a	95.2 ~ 96.4	98.0 ~ 99.0
Henan10-08 (GU366191)	C4a	95.8 ~ 97.3	98.3 ~ 99.3
Zhejiang08 (EU864507)	C4a	94.8 ~ 97.2	98.3 ~ 99.7
N-905 (JN204037)	D	69.6 ~ 71.4	81.8 ~ 83.2
1413-CA-87 (AF009527)	B	82.9 ~ 84.6	95.6 ~ 97.0

2.3 Cox A16 的 VP1 基因同源性分析 对湖北省 2014—2015 年 26 株 Cox A16 的流行株进行 VP1 基因核苷酸序列测定和分析。发现湖北 Cox A16 病毒株的核苷酸与氨基酸序列同源性分别为 92.3% ~ 100.0% 和 96.6% ~ 100.0%; 与 A 基因型代表株 Cox A16 G-10 核苷酸和氨基酸同源性分别为 75.3% ~ 77.2% 和 89.6% ~ 92.3%; 与 B 基因型各亚型同源性比较见表 2。

表 2 湖北省 Cox A16 流行株与其他 Cox A16 的 VP1 核苷酸与氨基酸同源性分析

Table 2 Homology of nucleotide and amino acid sequence of Cox A16 strains in Hubei with other Cox A16 strains in VP1 genes

Cox A16 基因型	核苷酸同源性 (%)	氨基酸同源性 (%)
A	75.3 ~ 77.2	89.6 ~ 92.3
B1a	90.7 ~ 94.7	97.0 ~ 100.0
B1b	91.6 ~ 95.6	96.6 ~ 100.0
B1c	91.5 ~ 93.3	96.3 ~ 99.0
B2	87.2 ~ 91.2	97.0 ~ 100.0

2.4 EV71 和 Cox A16 的 VP1 进化分析 根据 EV71 全长 VP1 基因核苷酸序列,以 Cox A16 G-10 为外类群,对 2014—2015 年湖北省 EV71 流行株的 VP1 进行进化分析,见图 1。发现 EV71 与我国其他地区流行 EV71 均位于一个大的分支上,均为 C4 基因型的 C4a 亚型。

以 EV71-BrCr 株为外类群,对 2014—2015 年湖北省 Cox A16 流行株的 VP1 进行进化分析,发现 2014—2015 年流行的 Cox A16 病毒株位于同一分支上,主要为 B1b 亚型,见图 2。系统发育分析显示,湖北省省内流行的 EV71 和 Cox A16,在进化树上聚类在一个分支,本研究中阳性标本来自于省内不同地区,说明 2014—2015 年间省内流行的毒株在遗传进化上无较大差异,具有较近的亲缘关系,但未发现 B1a 亚型的 Cox A16 的流行。

3 讨论

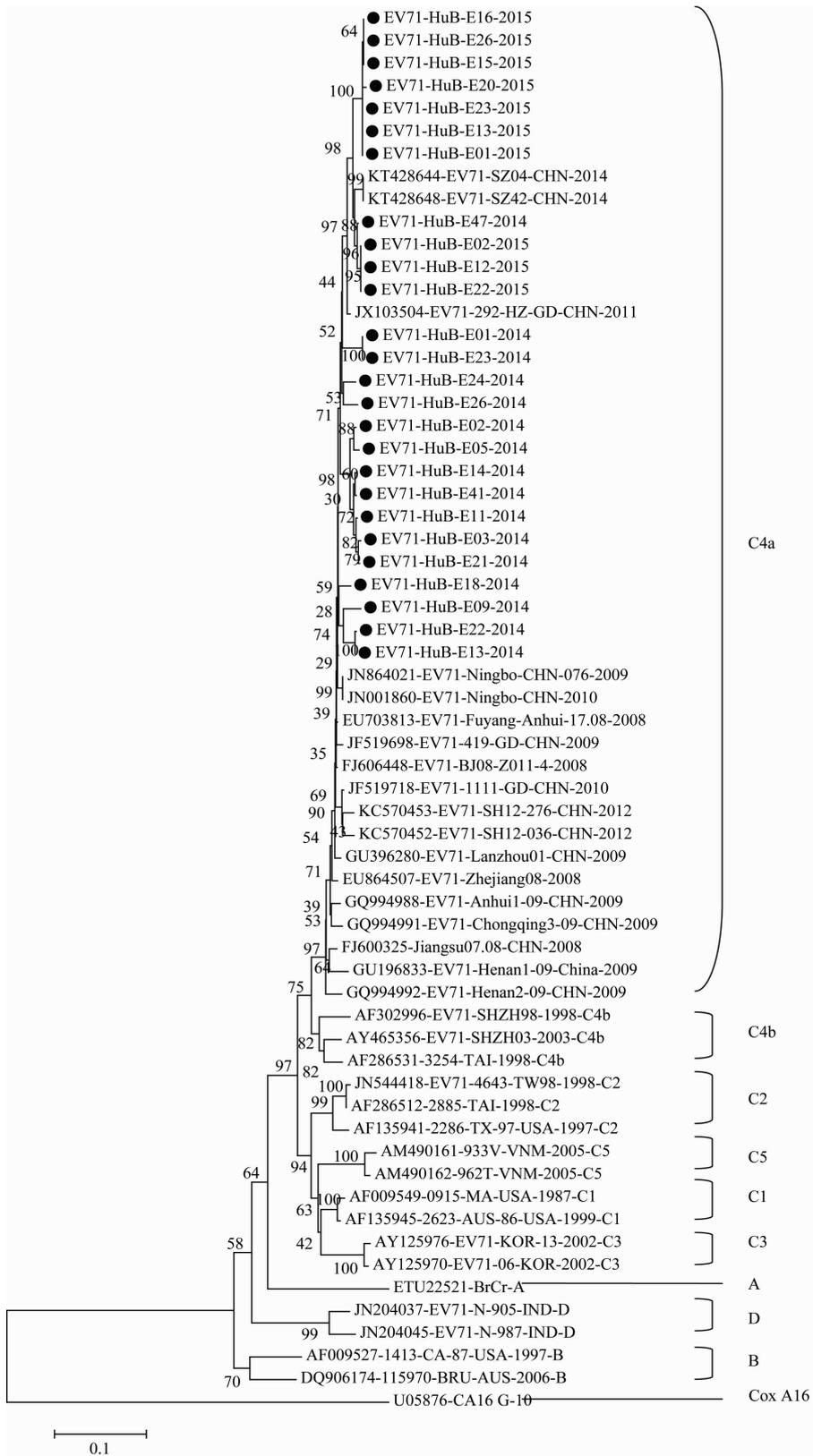
引起手足口病的肠道病毒有 20 多种,以 EV71 和 Cox A16 最为普遍,而 EV71 危害较重^[6-7],严重者可以引起死亡。VP1 基因是 EV71 分子流行病学研究的主要内容之一,VP1 基因不仅是病毒主要抗原性基因,其编码的蛋白也是病毒中和决定因子,并且与病毒血清型完全对应^[8],也是肠道病毒血清

型的分型依据^[3]。因此,对 EV71 和 Cox A16 的 VP1 区的分子进化研究,能够全面了解湖北省 EV71 和 Cox A16 的流行规律,以便指导湖北省手足口病疫情预防和控制。

本研究通过对 2014—2015 年湖北省部分地区 Cox A16 与 EV71 流行株进行 VP1 基因序列扩增、测序、同源性比对与遗传进化分析,发现湖北省 EV71 均为 C4a 基因亚型,与我国其他地区的 EV71 同源性较高,EV71 进化分析与湖北省既往研究相似^[5],省内各地区间无较大差异。遗传进化分析显示湖北省 EV71 与我国其他地区近年 EV71 具有相同的进化来源。2014—2015 年湖北省 EV71 流行株与我国 2013 年和 2014 年的 EV71 毒株在一个分支上,与 2008 年和 2009 年等早年的 EV71 不同,说明湖北省流行的 EV71 在不断进化。

湖北省 Cox A16 病毒株的核苷酸与氨基酸序列同源性分别为 92.3% ~ 100.0% 和 96.6% ~ 100.0%; 与 A 基因型代表株 Cox A16 G-10 和 B1a、B1b、B1c 和 B2 各亚型 VP1 区核苷酸同源性有一定差异,但是氨基酸同源性较高,可能存在一定程度的同义突变。目前 Zhang 等^[7]将中国 Cox A16 病毒株分为 A、B 基因型,并根据核苷酸差异和进化特征又将 B 基因型分为 B1、B2 两个亚型,B1 亚型又分为 B1a、B1b 和 B1c 三个亚型别,B1c 和 B1a、B1c 和 B1b 之间的核苷酸差异分别为 7.0% 和 6.8%; B1a 和 B1b 之间的核苷酸差异为 6.5%。2014—2015 年湖北省部分 Cox A16 病毒株进化分析发现主要为 B 基因型的 B1b 基因亚型;而 2012—2013 年间湖北省的 Cox A16 的基因型主要为 B1b,也发现少量 B1a 基因亚型^[7,9],近年来 Cox A16 以 B1b 为优势流行的基因亚型,而曾在 2013 年出现的 Cox A16 的 B1a 亚型未发现^[10];表明湖北省 Cox A16 的基因型别流行是不断变化的。

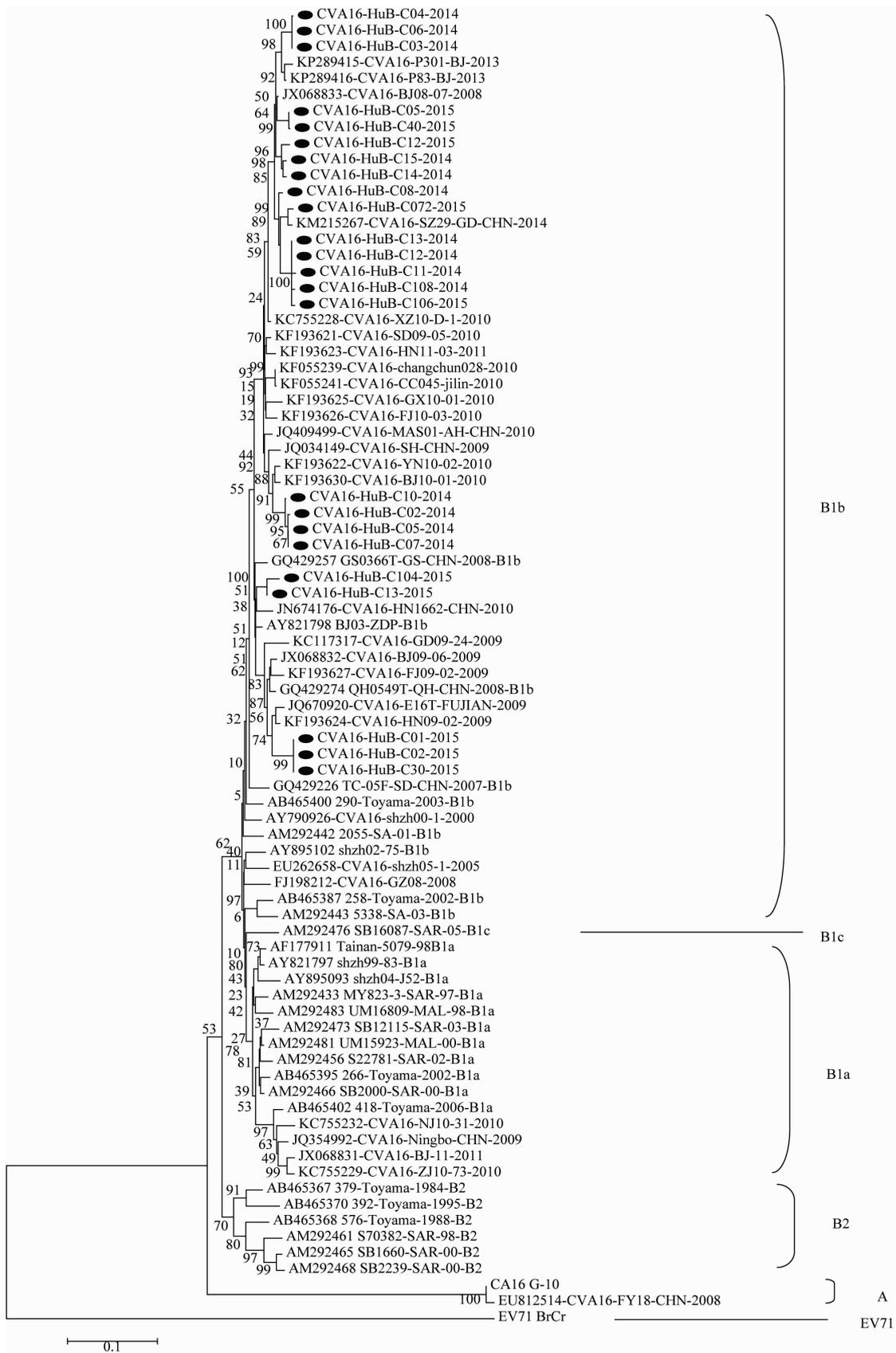
从进化树中可以看到 2014—2015 年的 Cox A16 病毒株形成不同的分支,大部分 Cox A16 病毒株与来自于 2013 年北京市和 2014 年广东省的 Cox A16 位于同一个分支上,具有较近的亲缘关系,也有部分 Cox A16 病毒株分别与 2009 年和 2010 年的我国其他地区的 Cox A16 病毒株具有较近的亲缘关系,说明虽然 2014—2015 年 Cox A16 流行的基因型别主要为 B1b,但流行的 Cox A16 病毒株的起源不同,增加了对 Cox A16 流行防控的复杂性和艰难性。



注:●代表湖北省 EV71 流行株。

图 1 EV71 的 VP1 进化分析

Figure 1 Phylogenetic tree of EV71 in VP1 genes



注: ●湖北省 EV71 流行株。

图2 Cox A16 的 VP1 区进化分析
Figure 2 Phylogenetic tree of Cox A16 in VP1 genes

参考文献

- [1] Qin QQ, Jin Y. Related research progress of hand foot mouth disease [J]. *Chinese Journal of Infectious Diseases*, 2015, 33 (9):575-576. (in Chinese)
覃秋琴, 金玉. 手足口病的相关研究进展 [J]. *中华传染病杂志*, 2015, 33 (9):575-576.
- [2] Yang YL, Tan AY, Xi PW, et al. Effect of early diagnose and treat severe hand foot and mouth disease control study [J]. *Medical Information*, 2015 (44):71-72. (in Chinese)
杨永礼, 谭安云, 习培文, 等. 重症手足口病早期识别及临床诊治研究 [J]. *医学信息*, 2015 (44):71-72.
- [3] Hou WY, Chen HL, Li Y, et al. Analysis on etiology and epidemiology for 16 964 cases of hand-foot-mouth disease [J]. *Shaanxi Medical Journal*, 2014, 43 (5):626-628. (in Chinese)
侯文郁, 陈海龙, 李焱, 等. 手足口病 16 964 例流行病学及病原学分析 [J]. *陕西医学杂志*, 2014, 43 (5):626-628.
- [4] Yang F, Du J, Hu YF, et al. Enterovirus coinfection during an outbreak of hand, foot, and mouth disease in Shandong, China [J]. *Clin Infect Dis*, 2011, 53 (4):400-401.
- [5] Li J, Lei YK, Jiang XQ, et al. Genetic structural and functional characteristics of VP1 gene of enterovirus 71 strains in Hubei province [J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2013, 29 (11):1099-1104. (in Chinese)
李静, 雷亚克, 蒋晓清, 等. 湖北肠道病毒 EV71 型流行株 VP1 基因以及蛋白结构特征分析 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2013, 29 (11):1099-1104.
- [6] Li J, Zhan JB, Yang ZH, et al. VP1 gene of Coxsackie virus A16 from Hubei province, China, 2013 [J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2015, 31 (4):320-324. (in Chinese)
李静, 占建波, 杨朝晖, 等. 湖北 2013 年部分柯萨奇 A16 型肠道病毒 VP1 基因分子特征分析 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2015, 31 (4):320-324.
- [7] Zhang Y, Wang DY, Yan DM, et al. Molecular evidence of persistent epidemic and evolution of subgenotype B1 coxsackievirus A16-associated hand, foot, and mouth disease in China [J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48 (2):619-622.
- [8] Li XT, Liu BW, Jia L, et al. Study on the risk factors of hand-foot-mouth disease deaths in Beijing 2010 [J]. *Chinese Journal of Disease Control and Prevention*, 2012, 16 (5):408-411. (in Chinese)
李锡太, 刘白薇, 贾蕾, 等. 北京市 2010 年手足口病死亡危险因素分析 [J]. *中华疾病控制杂志*, 2012, 16 (5):408-411.
- [9] Yao XJ, Jin PF, Ji H, et al. A comparison of the characteristics of diseases caused by enterovirus 71 or coxsackievirus A16 [J]. *Chinese Journal of Disease Control and Prevention*, 2015, 19 (14):385-388. (in Chinese)
姚学君, 金鹏飞, 嵇红, 等. 肠道病毒 71 型和柯萨奇病毒 A 组 16 型所致手足口病相关特征分析 [J]. *中华疾病控制杂志*, 2015, 19 (14):385-388.
- [10] Xia YP, Li SJ, Zhang C, et al. Epidemiological characteristics of handfoot and mouth disease cases and close contacts in Fenghua, Zhejiang, 2013-2014 [J]. *Disease Surveillance*, 2016, 31 (8):642-646. (in Chinese)
夏颖苹, 李寿俊, 张川, 等. 2013-2014 年浙江省奉化市手足口病患者及其密切接触者监测结果分析 [J]. *疾病监测*, 2016, 31 (8):642-646.



占建波

ORCID:0000-0002-5885-1970

作者贡献:

占建波:项目设计、监测数据统计分析
李静:负责基因测序、病原检测
杨朝晖:参与病毒分离等工作
詹发先:提出论文修改意见、审核论文