

# 2015–2016 年湖南省手足口病 CV-A6 型肠道病毒 VP1 区基因特征及病毒亚型分析

黄威, 陈雨, 蔡亮, 罗恺炜, 张帆, 周帅锋, 张红

湖南省疾病预防控制中心, 湖南省微生物分子学重点实验室, 湖南 长沙 410005

**摘要:** **目的** 了解湖南省 2015–2016 年引起手足口病的 CV-A6 型肠道病毒病原学特征, 为手足口病科学防控提供依据。 **方法** 对 2015–2016 年湖南省手足口病哨点医院和地市级疾控中心上送的其他肠道病毒阳性标本进行 CV-A6 核酸检测, 选择有代表性的标本进行 CV-A6 VP1 区全长序列扩增和测序。运用 Seqman 和 MEGA 5.2 软件对获取序列与从 GenBank 下载的 CV-A6 VP1 区全长序列进行遗传进化分析。 **结果** 共对 281 份非 EV-A71 和非 CV-A16 肠道病毒阳性标本进行了 CV-A6 核酸检测, 142 份标本检测结果为 CV-A6 阳性, 阳性率为 50.53%, 对不同地区和不同年份的有代表性的 69 份标本进行 VP1 区全长序列测定, 60 份测序成功, 病毒型别均为 CV-A6 的 D1 亚型。 **结论** 湖南省存在引起手足口病的非 EV-A71 和非 CV-A16 的 CV-A6 肠道病毒感染, 其基因型别为 D1 亚型, 与我国其他地区流行的病毒亚型基本一致。

**关键词:** CV-A6; 手足口病; 基因型别; VP1 区

**中图分类号:** R512.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006–3110(2017)12–1432–04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006–3110.2017.12.007

## VP1 genetic characteristics and subgenotype of coxsackievirus A6 associated with hand, foot and mouth disease in Hunan Province, 2015–2016

HUANG Wei, CHEN Yu, CAI Liang, LUO Kai-wei, ZHANG Fan, ZHOU Shuai-feng, ZHANG Hong

Key Laboratory of Microbial Molecular Biology of Hunan Province, Hunan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Changsha, Hunan 410005, China

**Abstract:** **Objective** To investigate the pathogenic features of coxsackievirus A6 (CV-A6) associated with hand, foot and mouth disease (HFMD) in Hunan Province during 2015–2016 so as to provide a basis for scientific prevention and control of HFMD. **Methods** The positive specimens of other enteroviruses sent by HFMD sentinel hospitals and prefecture-level CDCs in Hunan Province during 2015–2016 were collected to perform CV-A6 nucleic acid detection. CV-A6 real-time PCR positive specimens were then subjected to RT-PCR for full length sequence amplification and sequencing of VP1 region. The phylogenetic analysis was performed to analyze the full-length gene sequences encoding VP1 of CVA6 isolates and sequences downloaded from GenBank by using Seqman and MEGA 5.2 software packages. **Results** A total of 281 non-EV-A71 and non-CV-A16 enterovirus positive specimens were detected by CV-A6 real-time PCR assay. 142 specimens were positive for CV-A6, with the positive rate being 50.53%. 69 specimens from different regions and different years were selected for determining the full length sequence of VP1 region and 60 were successfully determined. It was found that all sequences detected belonged to CV-A6 subtype D cluster 1.

**Conclusions** There are non-EV-A71 and non-CV-A16 enterovirus infections caused by CV-A6 in hand, foot and mouth disease in Hunan Province, and the isolates belong to the D1 subgenotype, which is consistent with the prevalent subtypes in other regions in China.

**Key words:** coxsackievirus A6; hand, foot and mouth disease; genotype; VP1 region

目前已知的肠道病毒血清型有 100 种以上, 分为 EV-A、EV-B、EV-C 和 EV-D 4 类, 其中 EV-A 类病毒广泛分布于人类和非人类的灵长类动物中, 有 20 种

**基金项目:** 湖南省卫计委科研项目 (C2016032); 国家科技重大专项 (2013ZX10004202001003)

**作者简介:** 黄威 (1966–), 女, 副主任技师, 主要从事肠道病毒的实验室检测工作。

**通信作者:** 张红, E-mail: 931525821@qq.com。

以上血清型。EV-A71 和 CV-A16 是引起我国手足口病的主要病原体, 可导致患者脑膜脑炎<sup>[1]</sup>。柯萨奇病毒 (coxsackievirus A6, CV-A6) 属于微小核糖核酸病毒科, 病毒核酸为单正链 RNA, 包括 A、B 两组, 其中 A 组有 23 个血清型, CV-A6 可引起人类和其他哺乳类动物多种类型的疾病<sup>[2]</sup>。

本研究对 2015–2016 年发生在湖南省的非 EV-A71 和非 CV-A16 肠道病毒感染病例进行病原学监

测,发现自 2015 年上半年起,非 EV-A71 和非 CV-A16 肠道病毒感染患者感染率逐渐升高,CV-A6 逐渐成为优势病原体,本研究针对性地对部分 CV-A6 核酸阳性标本进行序列测定和遗传进化分析。

## 1 材料与方法

**1.1 标本来源与处理** 本研究的标本来源于 2015 年 1 月-2016 年 12 月期间湖南省手足口病哨点医院和 14 个地市(州)疾控中心上送的手足口病患儿粪便、肛拭子、咽拭子。每份标本附带包括性别、年龄、地址、临床症状、生化指标等相关信息的患者个案信息调查表。地市(州)疾控中心采集的手足口病患儿标本需先进行肠道病毒、EV-A71 和 CV-A16 病毒的核酸检测(real-time PCR 法),将结果录入《中华人民共和国传染病报告卡》,每月选取 4 份手足口病毒阳性标本送至湖南省疾控中心进行复核和病毒分离。所有粪便标本取 0.1 g 用 800  $\mu$ l PBS(+)溶液进行稀释,便悬液在涡轮振荡器上混匀后,8 000 rpm/min 冷冻离心 5 min,取 200  $\mu$ l 上清液进行病毒核酸提取。肛拭子和咽拭子标本直接在涡轮振荡器上混匀后 8 000 rpm/min 冷冻离心 5 min,取 200  $\mu$ l 上清液进行病毒核酸提取。

**1.2 核酸提取** 使用病毒 DNA/RNA 提取试剂盒(磁珠法,苏州天隆)进行标本核酸提取。

**1.3 核酸检测** 使用 CV-A6 核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法,江苏硕世)进行 CV-A6 病毒的初筛。操作按试剂盒说明书进行。将 CV-A6 初筛阳性标本核酸使用 One-Step RT PCR Kit(QIAGEN)进行逆转录及扩增。引物为 CV-A6 VP1-F: 5'-TGTGCAAGGACA-CYGAYGAG-3', CV-A6 VP1-R: 5'-AGATGYCG-GTTTACCACTCT-3'。反应体系为:5 $\times$ Buffer 10  $\mu$ l, 10 mM DNTP 2  $\mu$ l, Inhibitor 0.5  $\mu$ l, Enzymer Mix 2  $\mu$ l, 20  $\mu$ M CV-A6F 1  $\mu$ l, 20  $\mu$ M CV-A6R 1  $\mu$ l, H<sub>2</sub>O 28.5  $\mu$ l, RNA 5  $\mu$ l。反应条件:50  $^{\circ}$ C 30 min $\rightarrow$ 95  $^{\circ}$ C 15 min $\rightarrow$ (94  $^{\circ}$ C 30 s $\rightarrow$ 42  $^{\circ}$ C 30 s $\rightarrow$ 72  $^{\circ}$ C 1 min) $\times$ 30 cycles $\rightarrow$ 72  $^{\circ}$ C 7 min $\rightarrow$ 4  $^{\circ}$ C  $\infty$ 。扩增产物使用 QIAxcel DNA Screening Kit(QIAGEN)进行电泳鉴定。

**1.4 序列分析** 对 PCR 产物进行纯化及序列测定,使用 Seqman 软件(Lasergene 7.0)对测序结果进行拼接与剪切,获得的最终序列通过 BLAST 进行序列比对(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)。选取法国、西班牙、台湾、日本等不同国家和我国天津、广东、山东等地区具有代表性的序列与湖南省 2015-2016 年的 VP1 区序列进行进化分析,使用 Mega 5.2 软件,选择邻接法(neighbour-joining method)构建进化树。

VP1 全长序列提交 Genbank。

## 2 结果

### 2.1 非 EV-A71 和非 CV-A16 肠道病毒检出情况

2015 年 1 月-2016 年 12 月湖南全省手足口病实验室共检出手足口病阳性标本 10 938 份,其中非 EV-A71 和非 CV-A16 肠道病毒阳性率占全部阳性标本的 55.26%(6 044/10 938),EV-A71 阳性标本占 27.30%(2 986/10 938),CV-A16 阳性标本占 17.44%(1 908/10 938)。

**2.2 CV-A6 核酸检测及病毒分离** 2015-2016 年共对 281 份非 EV-A71 和非 CV-A16 肠道病毒阳性标本进行了 CV-A6 核酸检测,142 份标本检测结果为 CV-A6 阳性,阳性率为 50.53%。其中 2015 年 CV-A6 阳性率分别为 51.03%(74/145)和 50.00%(68/136)。CV-A6 的检出率两年差异无统计学意义( $\chi^2=0.03$ ,  $P=0.86$ )。以月份为时间进行统计,CV-A6 的阳性检出率在 2016 年的 3 月和 9 月均达到 100%,在 2015 年的 4 月和 2016 年的 6 月达到最低。见图 1。

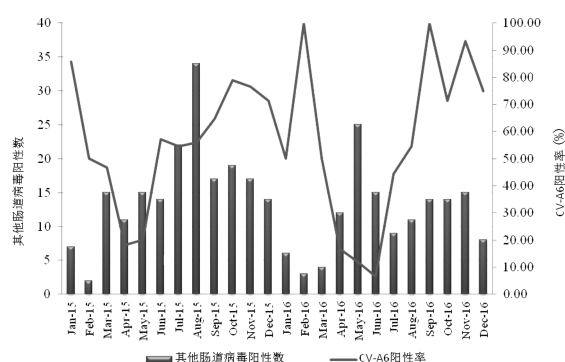
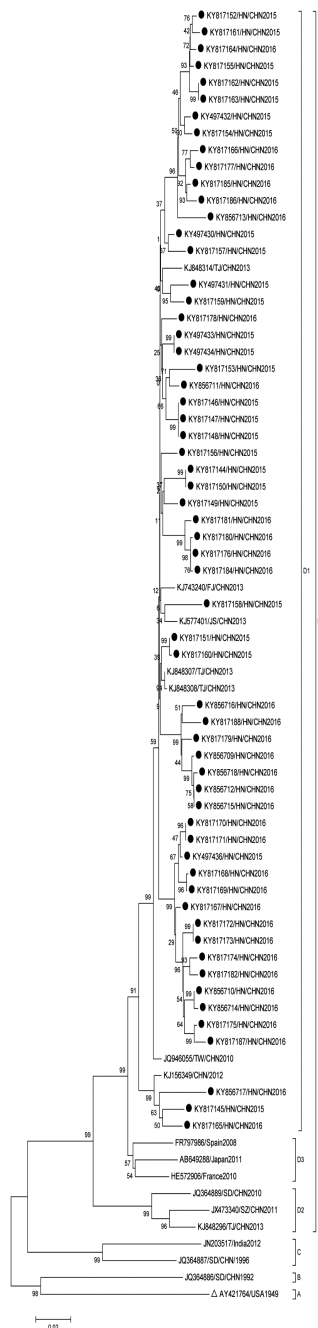


图 1 2015 年 1 月-2016 年 12 月 CV-A6 在湖南省其他肠道病毒阳性标本中的阳性率

**2.3 CV-A6 VP1 区序列分析** 对 2015-2016 年湖南省不同地区 and 不同年份的有代表性的 69 份标本使用 VP1 区序列专用扩增引物进行 VP1 区全长序列测定,60 份测序成功,CV-A6 获得 PCR 产物长度为 1 022 bp,经 Seqman 序列分析软件拼接后,长度为 915 bp。序列株全部为 D 基因型,VP1 区核苷酸同源性为 93.10%~100%,与 1949 年的 CV-A6 原型株 Gdula 株 (AY421764)同源性为 81.50%~86.18%。全部 77 条 CV-A6 VP1 序列的核苷酸同源性为 81.50%~100%。见图 2。

通过进化分析,A 基因群和 B 基因群分别包括在 1949 年美国报道的 CV-A6 原型株 AY421764 和 1992 年我国山东省报道的 JQ364886 株。C 基因群包括 1996 年我国山东省报道的 JQ364887 株和 2012 年印

度报道的 JN203517 株。D 基因群分为 D1、D2、D3 3 个亚群,亚群内的核苷酸同源率为 88.24%~100.00%。湖南省此次分离的 60 株 CV-A6 全部为 D1 亚型,核苷酸同源率为 95.3%~100%,与 2013 年天津株 (KJ848307, KJ848308)、2013 年福建株 (KJ743240)、2013 年江苏株 (KJ577401)、2010 年台湾株 (JQ946055)、2012 年河南株 (KJ156349) 同源性高。



注:CV-A6 VP1 序列 Genebank 序列号,地点及年份如图所示,其中 TJ:天津,SD:山东,FJ:福建,JS:江苏,TW:台湾,SZ:深圳。●为湖南 CV-A6 株,△表示 CV-A6 原型株。

图 2 湖南省 2015-2016 年 CV-A6 VP1 区全长序列系统进化树

### 3 讨论

肠道病毒可引起婴幼儿手足口病,通常呈隐性感染,临床症状可由轻症到重症,甚至导致死亡。中国大陆地区自 2008 年将手足口病纳入丙类传染病管理,各级各类医疗机构要按照《中华人民共和国传染病防治法》和《传染病信息报告管理规范》的有关规定,对符合病例定义的手足口病病例进行报告。

CV-A6 是除 EV-A71 和 CV-A16 病原体之外引起手足口病最重要的病原体<sup>[3]</sup>。2008 年新加坡手足口病疫情中 CV-A6 和 CV-A10 占全部阳性标本的 35.3%<sup>[4]</sup>。芬兰、法国、中国台湾等地均有由 CV-A6 引起的手足口病暴发的报道<sup>[5-7]</sup>。我国自 2012 年 9 月深圳地区 CV-A6 的感染发病率急速上升并成为当地的优势流行株后,北京、广东、天津也相继出现 CV-A6 引起手足口暴发疫情的报道<sup>[8-11]</sup>,目前全国范围内由 CV-A6 引起手足口病的报道也开始逐渐增多<sup>[9,12]</sup>。

本研究显示 2015-2016 年湖南全省手足口病其他肠道病毒阳性率占全部阳性标本的 55.25%,高于 EV-A71 阳性率 27.30% 和 CV-A16 阳性率 17.44%,与自 2013 年起全国范围内 15 个省份手足口病监测中其他肠道病毒的阳性率高于 50% 的结论保持一致。

目前对于 CV-A6 的基因分型没有公认的标准,根据 VP1 序列差异大于 15% 可作为区分不同基因型的依据<sup>[9,13]</sup>,CV-A6 可分为 A、B、C、D 4 个基因型,其中 CV-A6D 型分为 D1、D2、D3 3 个亚群。本文对获得的 60 株 CV-A6 序列进行病毒型别分析,全部为 D1 亚型,未发现 D2、D3 亚型,表明目前湖南省 CV-A6 流行的基因型别主要为 D1 亚型。

本研究证实了湖南省手足口病感染病原谱中 CV-A6 的构成及其亚型,但仍有部分非 EV-A71、非 CV-A16 和非 CV-A6 感染的病原体未能得到检测,在一定程度上为手足口病防控策略的制定及疫苗株的挑选提供了基础数据。

### 参考文献

- [1] Solomon T, Lewthwaite P, Perera D, et al. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71 [J]. Lancet Infect Dis, 2010, 10(11):778-790.
- [2] Knowles NJ, Hovi T, Hyypia T, et al. Family Picornaviridae [A]. In Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 2012:855-880.
- [3] Chen YJ, Chang SC, Tsao KC, et al. Comparative genomic analysis of coxsackievirus A6 strains of different clinical disease entities [J]. PLoS One, 2012, 7(12):e52432.
- [4] Wu Y, Yeo A, Phoon MC, et al. The largest outbreak of hand, foot and mouth disease in Singapore in 2008: the role of enterovirus 71 and coxsackievirus A strains [J]. Int J Infect Dis, 2010, 14(12):e1076-1081.

(下转第 1538 页)

被淋巴细胞浸润,导致局部导管和腺体上皮细胞增生。继而退化、萎缩、破坏,被纤维组织代之,丧失其分泌功能,导致泪液分泌减少,角膜上皮剥落,泪膜不稳定,直至干眼的发生。

干眼危害严重,随着社会发展,环境的变化,生活习惯的改变,大学生步入干眼患病危险人群之列,但大学生群体的干眼相关知识知晓率较低,不知而无从预防,因此建议高校有关部门加强干眼知识的宣传并采取一定的措施预防,同时定期对学生进行问卷自评,让其对自己的眼部健康有基本的了解,注意用眼卫生,减少干眼发生。

#### 参考文献

- [1] Garry N, Foulks MD. The definition and classification of dry eye disease; report of the definition and classification subcommittee of the international dry eye workshop[J]. *Ocular Surf*, 2007, 5(2): 75-92.
- [2] 刘祖国, 彭娟. 干眼的诊断与治疗规范[J]. *眼科研究*, 2008, 26(3): 161-162.
- [3] 潘诚, 董京利. 干眼症筛查及相关因素的调查分析[J]. *中国医药导报*, 2011, 31(8): 158-159.
- [4] 王赞, 湛丁艳, 熊华威, 等. 我国青少年近视影响因素与防治措施研究[J]. *实用预防医学*, 2016, 23(3): 380-381.
- [5] 刘冰, 丁琪瑛, 杨春兰, 等. 某大学教师干眼症患病调查[J]. *中国校医*, 2014, 28(12): 901-902.
- [6] 彭焯. 大学生干眼情况调查[J]. *健康必读*, 2013, 12(7): 125-126.
- [7] 刘菲菲, 芮东升, 邵明月, 等. 石河子大学在校生干眼患病状况及影响因素分析[J]. *现代预防医学*, 2016, 43(1): 91-94.
- [8] 胡小坤, 庄鹏. 视屏终端干眼症的研究进展[J]. *医学综述*, 2010, 16(5): 714-716.
- [9] 林晨, 杨敏敏, 郑虔. 眼表疾病指数量表中文版的研制和性能评价[J]. *眼科新进展*, 2013, 33(1): 38-40.
- [10] 杨京京, 尹素凤. 干眼症的研究现状与进展[J]. *大家健康(学术*

版), 2014, 30(9): 334.

- [11] 杨永明, 马林昆. 干眼的流行病学进展. *国际眼科杂志*, 2010, 10(10): 1944-1946.
- [12] 杨真龙, 李培红. 西藏干眼症发病情况的调查与分析[J]. *西北民族大学学报(自然科学版)*, 2006, 27(3): 85-87.
- [13] Xiao XL, Wei FB, Li YW, et al. Epidemiological investigation and study of dry eye in common crowd of Liuzhou[J]. *Ophthalmic*, 2009, 9: 947-949.
- [14] 田玉景, 刘焰, 邹海东, 等. 上海市北新泾社区 60 岁及以上人群干眼的流行病学调查[J]. *中国实用眼科杂志*, 2009, 27(7): 776-780.
- [15] Zhang Y, Chen H, Wu X. Prevalence and risk factors associated with dry eye syndrome among senior high school students in a county of Shandong Province, China[J]. *Ophthalmic Epidemiol*, 2012, 19(4): 226-230.
- [16] 蒋凯婷, 谢亚男, 叶宇峰. 杭州某校大学生干眼病患病及相关因素分析[J]. *中国学校卫生*, 2015, 36(10): 1570-1571.
- [17] 霍丽君, 廖瑞瑞, 刘祖国. 干燥综合征[J]. *中国眼耳鼻喉科杂志*, 2004, 4(4): 262-264.
- [18] 钟雄越. 干眼症筛查及相关因素的调查分析[J]. *中国当代医药*, 2014, 21(11): 153-154.
- [19] 邵明月, 芮东升, 刘菲菲, 等. 石河子大学学生干眼患病现状及影响因素分析[J]. *中国学校卫生*, 2015, 36(2): 303-305.
- [20] Moon JW, Shin KC, Lee HJ, et al. The effect of contact lens wear on the ocular surface changes in keratoconus[J]. *Eye Contact Lens*, 2006, 32(2): 96-101.
- [21] 宋念艺, 朱炎华. 干眼症研究新进展[J]. *医学综述*, 2012, 18(1): 113-115.
- [22] 何玲芬. 对于干眼症发病情况的调查及病因分析[J]. *当代医药论丛*, 2014, 4(9): 286-286.
- [23] Tong L, Tan J, Thumboo J, et al. Dry eye[J]. *BMJ*, 2012, 345: 1-3.
- [24] 李倩文, 张仲臣, 张佳楠. 干眼病患病相关因素的研究进展[J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2013, 7(18): 8364-8367.

收稿日期: 2017-01-07

(上接第 1434 页)

- [5] 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.
- [6] 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[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2012, 18(5): E110-E118.
- [7] Taiwan CDC website. Available: <http://www.cdc.gov.tw/professional/list.aspx?treeid=4C19A0252BBEF869&nowtreeid=34330F1263D5F7E4>. Accessed 2012 Nov 21.
- [8] He YQ, Chen L, Xu WB, et al. Emergence, circulation, and spatio-temporal 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.
- [9] Lu J, Zeng H, Zheng H, et al. Hand, foot and mouth disease in Guang-

dong, China, in 2013: new trends in the continuing epidemic[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2014, 20(7): 0442-0445.

- [10] Hongyan G, Chengjie M, Qiaozhi Y. Hand, foot and mouth disease caused by coxsackievirus A6, Beijing, 2013[J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2014, 33(12): 1302-1303.
- [11] Li JL, Yuan J, Yang F, et al. Epidemic characteristics of hand, foot, and mouth disease in southern China, 2013: coxsackievirus A6 has emerged as the predominant causative agent[J]. *J Infect*, 2014, 69(3): 299-303.
- [12] Han JF, Xu S, Zhang Y, et al. Hand, foot, and mouth disease outbreak caused by coxsackievirus A6, China, 2013[J]. *J Infect*, 2014, 69(3): 303-305.
- [13] Brown BA, Steven OM, Alexander JP, et al. Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998[J]. *J Virol*, 1999, 73(12): 9969-9975.

收稿日期: 2017-05-16