

# 深圳市龙岗区 2017 年手足口病病原柯萨奇病毒 A16 型及肠道病毒 71 型 VP1 区基因特征分析

周健明, 邓义州, 洪泽涛, 洪敏丽, 金玉娟, 刘渠, 李静媚

深圳市龙岗区疾病预防控制中心, 广东 深圳 518172

**摘要:** **目的** 了解 2017 年深圳市龙岗区柯萨奇病毒 A16 型 (coxsackievirus A16, CVA16) 及肠道病毒 71 型 (enterovirus 71, EV71) 的分子特征, 为制定本区手足口病的防控策略提供科学依据。 **方法** 对 2017 年辖区哨点医院收集的 CVA16 及 EV71 核酸阳性样本的病毒 VP1 区基因进行扩增, 产物回收并测序, 用 DNASTAR 软件分析不同序列的核苷酸及氨基酸同源性, 应用 MEGA 6.0 软件, 以最大似然法 (maximum likelihood method) 构建系统进化树, 进行分子特征分析。 **结果** 2017 年深圳市龙岗区共报告手足口病 13 443 例, 发病率为 304.83/10 万。测序获得 26 份 EV71 及 27 份 CVA16 的 VP1 基因序列, 基因特征分析显示龙岗区 EV71 序列均属 C4a 亚型, 可分为 3 个进化分支。龙岗区 CVA16 可分为本地流行主分支 B1b 基因亚型和东南亚流行次分支 B1a 基因亚型。 **结论** 2017 年间, 龙岗区 CVA16 与 EV71 病原存在多个进化分支, 需及时对病原的基因型数据进行更新。

**关键词:** 柯萨奇病毒 A 组 16 型; 肠道病毒 71 型; 系统进化树

**中图分类号:** R512.5 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2019)03-0371-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2019.03.034

手足口病 (hand, foot and mouth disease, HFMD) 是一种由多种类肠道病毒引起的, 多发于婴幼儿肠道传染病<sup>[1]</sup>。肠道病毒 71 型 (enterovirus A71, EV71) 可引起神经系统并发症等严重症状, 是 HFMD 重症病例的主要病原, 而柯萨奇病毒 A16 型 (coxsackievirus A16, CVA16) 引起的症状较轻, 预后较好<sup>[2]</sup>。近年引起手足口病的病原越来越多样化, 但 EV71 和 CVA16 依然为手足口病的主要病原之一<sup>[3-4]</sup>。本研究系统分析了 2017 年深圳市龙岗区 HFMD 主要病原 EV71 及 CVA16 优势流行株的基因分型、遗传变异及流行情况, 阐明病原的分子流行病学特征, 为本地区手足口病的防治提供参考依据。

## 1 材料与方法

**1.1 样本及资料来源** 选取 2017 年 1-12 月期间辖区哨点医院上送的 HFMD 患者的肛拭子、咽拭子或粪便样本共 378 份。人口资料来源于国家传染病监测信息报告管理系统。

**1.2 核酸提取及检测** 采用 Roche 公司的 High Pure Viral RNA Kit 进行病毒 RNA 的提取, 以江苏硕世生物有限公司的肠道病毒通用型、CVA16 和 EV71 三重核

酸检测试剂盒进行实时荧光 RT-PCR 检测, CT 值  $\leq 38$  的样品判为阳性。

**1.3 VP1 区序列扩增及测定** 收获核酸检测结果为 EV71 或 CVA16 阳性的样品, 参照文献合成特异性引物<sup>[5-6]</sup>, 使用 Takara 公司的 PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver. 2 (Dye Plus) 进行 VP1 区基因序列扩增, 反应条件为: 逆转录 50 °C 30 min, 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 40 个循环; 延伸 72 °C 10 min。产物经 1.5% 琼脂糖电泳分析, EV71 和 CVA16 的预期扩增片段长度分别为 1 082 bp 和 1 100 bp。委托 Invitrogen (广州) 公司对其进行双向测序。

**1.4 测序结果分析** 剔除未测通及双峰序列, 用 DNASTAR 对测序成功序列进行拼接、翻译和同源性比对。应用 MEGA 6.0 软件, 以最大似然法 (Maximum likelihood method), 构建 Genbank 下载的代表株和本研究序列的系统进化树, bootstrap 值设为 1 000。

## 2 结果

**2.1 流行概况** 2017 年龙岗区累计报告手足口病病例 13 443 例, 1 例死亡病例, 发病率为 304.83/10 万。辖区内 8 个街道均有病例报告, 发病率最高为布吉街道, 其次为龙岗街道, 发病率分别为 423.38/10 万和 393.38/10 万; 横岗街道发病率最低, 为 185.17/10 万。病例集中于 5 岁以下儿童, 占总病例数 94.22%, 以 1~

**基金项目:** 深圳市龙岗区医疗卫生科技计划项目 (编号: LGK-CYLWS2018000009, 扶持类)

**作者简介:** 周健明 (1986-), 男, 广东广州人, 硕士, 主管技师, 研究方向: 分子流行病学。

**通信作者:** 李静媚, E-mail: lijingmei10@126.com。

2 岁年龄组发病人数最多(8 843 例)。男性发病数(16 718 例)高于女性(11 010 例),男女比例为 1.52 : 1。全年存在两个发病高峰,主高峰为 10 月(3 617 例),次高峰在 5 月(1 956 例)。

2.2 EV71 VP1 区核苷酸及其编码的氨基酸序列同源性分析 获得 26 份 EV71 的 VP1 编码区片段,19 份成功上传至 Genbank (accession numbers: MH644594 ~ MH644612),用 DNASTAR 进行同源性比对,VP1 区核苷酸(Nucleotide, nt)和氨基酸(Amine acid, aa)序列同源性分别为 93.2% ~ 100.0%、96.8% ~ 100.0%。龙岗 EV71 序列与 Genbank 中各基因亚型代表株<sup>[7]</sup>进行同源性比对,发现龙岗区 EV71 序列与 C4a 亚型代表株相似性最高,核苷酸同源性为 94.6% ~ 96.9%,氨基酸同源性为 97.1% ~ 99.4%,见表 1。

2.3 CVA16 VP1 区核苷酸及其编码的氨基酸序列同源性分析 获得 27 份 CVA16 的完整 VP1 片段,19 份成功上传至 Genbank (accession numbers: MH644613 ~ MH644631),同源性分析显示,其核苷酸和推测的氨基酸序列同源性分别为 87.9% ~ 100.0%、97.8% ~ 100.0%。辖区 CVA16 序列与 Genbank 中各基因亚型的代表株<sup>[7]</sup>进行同源性比对,发现 2017 年龙岗区 CVA16 序列主要分为两大部分,分别与 B1a 和 B1b 基因型高度同源,见表 2。

表 1 龙岗区 2017 年 26 份 EV71 和 EV71 各基因亚型代表株 VP1 区核苷酸和氨基酸序列同源性分析

EV71 基因型	核苷酸同源性	氨基酸同源性
	nt(%)	aa(%)
A	79.5 ~ 81.3	92.3 ~ 94.2
B	81.1 ~ 83.6	94.6 ~ 96.8
C1	87.2 ~ 89.2	97.2 ~ 97.9
C2	86.3 ~ 88.4	95.8 ~ 98.1
C3	85.5 ~ 87.2	97.2 ~ 98.2
C4a	94.6 ~ 96.9	97.1 ~ 99.4
C4b	85.1 ~ 87.0	96.8 ~ 99.0
D	82.0 ~ 83.1	95.7 ~ 96.9

表 2 龙岗区 2017 年 27 份 CVA16 和 CVA16 各基因亚型代表株 VP1 区核苷酸和氨基酸序列同源性分析

CVA16 基因型	核苷酸同源性	氨基酸同源性
	nt(%)	aa(%)
A	75.5 ~ 76.9	91.4 ~ 92.8
B1a	89.7 ~ 94.2	98.7 ~ 99.3
B1b	88.1 ~ 97.4	97.9 ~ 99.7
B1c	89.7 ~ 92.8	98.0 ~ 99.0
B2	87.3 ~ 89.6	99.0 ~ 100.0

2.4 遗传进化树构建 将本研究监测样本序列,与

Genbank 上国内外参考株<sup>[7]</sup>进行系统进化树的构建,并设置组外对照(EV71 VP1 区进化树以 CVA16 原型株 U05676/G-10 作为组外对照,CVA16 VP1 区进化树以 EV71 原型株 U22521/BrCr 作为组外对照)。

2.4.1 EV71 进化树分析 进化树结果显示,辖区 19 份 EV71 序列均与 2008 年安徽阜阳株(EU703813)同为 C4a 基因型,且主要分布在 3 个分支,其中有 10 份位于第 1 分支呈高度聚集,与 2017 年常州流行株(MG431943)、2013 年深圳流行株(MF431793)、2014 年深圳流行株(KT428949)高度同源,为本地优势流行分支。第 2 分支序列呈高度同源,与分支 1 的同源性较高,形成一个独立的分支。分支 3 与分支 1、分支 2 有明显进化距离,与 2014 年上海流行株(KU936128)高度同源,存在异地感染的可能,见图 1。

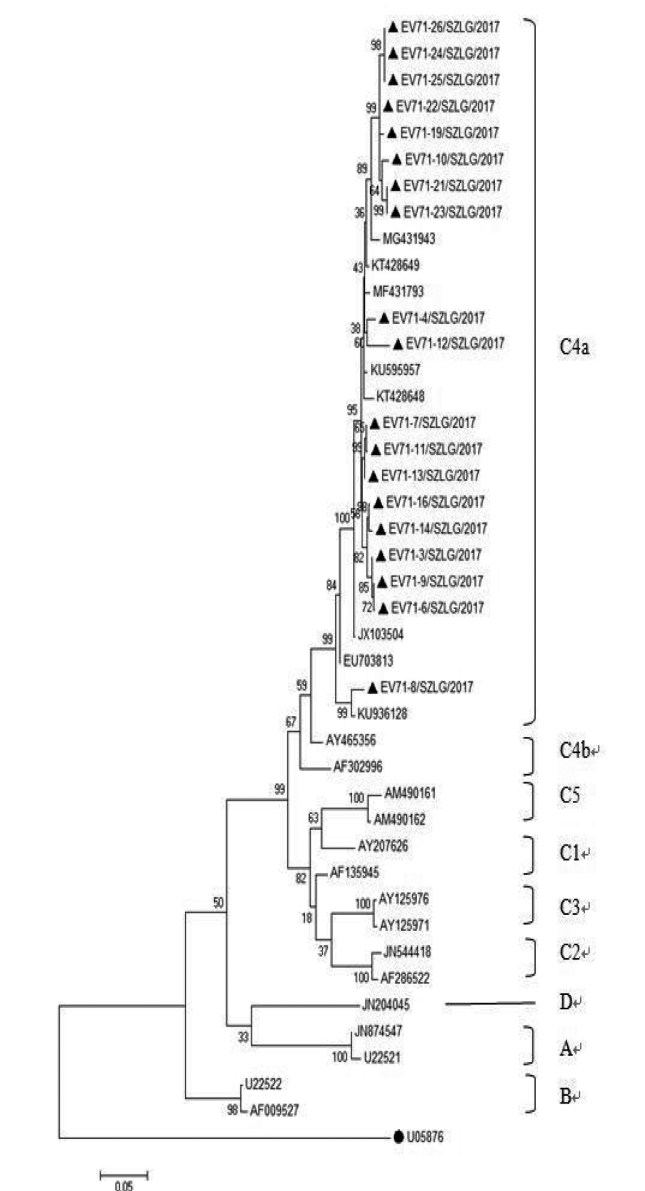


图 1 EV71 VP1 区系统进化树

2.4.2 CVA16 进化树分析 本区的 CVA16 序列至少可分为 2 个分支,主要分支为 B1b 基因型,有 12 份序列,相互同源性较高,与 2014 年深圳流行株 (KM215267)、2013 年湖南流行株 (KM402020) 高度同源,为本辖区的优势病原分支。次分支为为 B1a 型,共有 6 份,其中有 3 份与 2014 年越南流行株 (KX430814)、2011 年泰国流行株 (JF738003) 的亲缘关系较近。序列 CA16-24/SZ/2017 与 B1、B2 基因亚型都存在遗传进化距离,见图 2。

2.5 EV71 的 VP1 区氨基酸位点变异分析 将用于遗传进化分析的 19 份龙岗区 EV71 序列与 2008-2014 年中国大陆流行株进行 VP1 区 7 个氨基酸位点的比较<sup>[8]</sup>,结果显示,有 18 份龙岗 EV71 序列的 293 位丙氨酸 (A) 变异为丝氨酸 (S),19 份第 98 位均为谷氨酸,与 2014 年深圳株 (KT428649)、2014 年上海株 (KU936128) 相同。序列 EV71-4/SZLG 的氨基酸 26 位丙氨酸 (A) 变异为苏氨酸 (T),第 31 位天冬酰胺 (N) 变异为天冬氨酸 (D),见表 3。

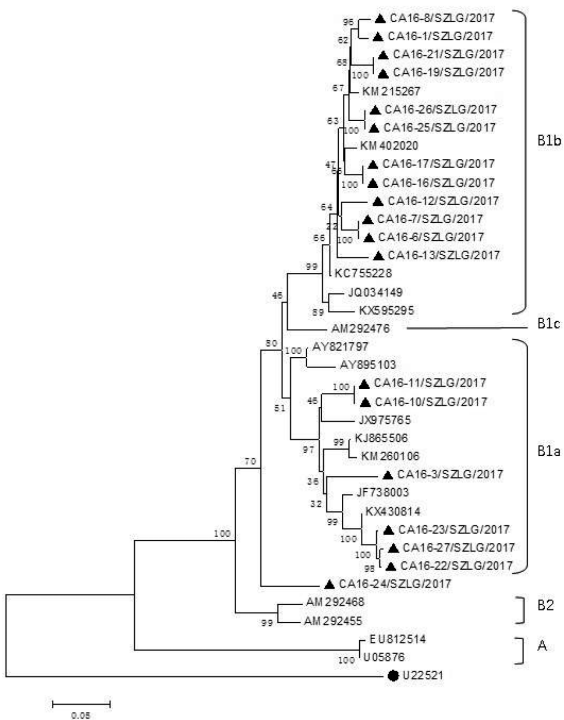


图 2 CVA16 VP1 区系统进化树

表 3 龙岗区 EV71 与 C4a 亚型代表株氨基酸位点变异分析

毒株	时间	来源	VP1						
			22	26	31	98	170	282	293
EV71-3/SZLG	2017	深圳	H	A	N	E	A	N	S
EV71-4/SZLG	2017	深圳	H	T	D	E	A	N	S
EV71-6/SZLG	2017	深圳	H	A	N	E	A	N	S
EV71-7/SZLG	2017	深圳	H	A	N	E	A	N	S
EV71-8/SZLG	2017	深圳	H	A	N	E	A	N	A
EV71-9/SZLG	2017	深圳	H	A	N	E	A	N	S
EV71-10/SZLG	2017	深圳	H	A	N	E	A	N	S
EV71-11/SZLG	2017	深圳	H	A	N	E	A	N	S
EV71-12/SZLG	2017	深圳	H	A	N	E	A	N	S
EV71-13/SZLG	2017	深圳	H	A	N	E	A	N	S
EV71-14/SZLG	2017	深圳	H	A	N	E	A	N	S
EV71-3/SZLG	2017	深圳	H	A	N	E	A	N	S
EV71-16/SZLG	2017	深圳	H	A	N	E	A	N	S
EV71-21/SZLG	2017	深圳	H	A	N	E	A	N	S
EV71-22/SZLG	2017	深圳	H	A	N	E	A	N	S
EV71-23/SZLG	2017	深圳	H	A	N	E	A	N	S
EV71-3/SZLG	2017	深圳	H	A	N	E	A	N	S
EV71-24/SZLG	2017	深圳	H	A	N	E	A	N	S
EV71-26/SZLG	2017	深圳	H	A	N	E	A	N	S
EU703813	2008	安徽	H	A	N	K	A	N	A
MF431793	2013	深圳	H	A	N	K	A	N	S
KT428649	2014	深圳	H	A	N	E	A	N	S
KU936128	2014	上海	H	A	N	E	A	N	A

注:A:丙氨酸;H:组氨酸;Q:谷氨酰胺;T:苏氨酸;N:天冬酰胺;D:天冬氨酸;E:谷氨酸;K:赖氨酸;S:丝氨酸 R:精氨酸。

### 3 讨论

手足口病在我国大部分地区呈现夏季和秋冬季的双峰流行模式<sup>[9-10]</sup>,与本文的监测结果相符,这可能与温湿度的变化及托幼机构的开学,儿童的返校时间表有关。监测数据显示龙岗区手足口病高发人群为 5 岁以下儿童,其中 1~2 岁年龄组发病数最多,这与冀天娇等<sup>[11]</sup>研究中提及的抗体水平随年龄的变化趋势相符,即新生儿 EV71 和 CVA16 抗体水平较高,1 岁后下降至最低水平,随年龄增长伴随着感染,抗体水平逐渐升高,到 5 岁之后可达成人的 80%~95%。

肠道病毒 VP1 区是编码病毒主要的中和抗原决定簇的部位,对肠道病毒 VP1 区进行研究,是基因分型及分子进化研究的主要方法<sup>[12]</sup>。2005 年后,我国大陆地区的 EV71 流行基因型主要为 C4a 基因亚型<sup>[13]</sup>,2017 年本辖区的 EV71 的基因型与其保持一致。进化树与关键氨基酸位点分析可见,辖区 EV71 大部分序列与 2013、2014 年的深圳流行株高度同源,与 2008 年安徽流行株存在一定进化距离,提示本地 EV71 病原可能存在共同的祖先,共同进化,且近年来未出现较大变异。

目前 CVA16 的 VP1 区基因分型没有统一的分型标准,常用方法有两种,一种分为 A、B、C 三个基因型,C 基因型可进一步分为 C1、C2、C3 亚型,该方法 B、C 基因型之间核苷酸差异较小<sup>[14]</sup>;另一种为本研究参考方法,其根据核苷酸差异至少为 15%的原则分为了 A 和 B 两个基因型,B 基因型可进一步分为 B1 和 B2 亚型,B2 亚型流行于 2000 年以前,2000 年以后主要为 B1 亚型,B1 基因亚型又可分为 B1a、B1b、B1c 三个进化分支<sup>[15]</sup>。2017 年龙岗区 CVA16 病例均为 B1 基因型,存在 B1b 和 B1a 基因亚型的共同流行,以 B1b 为优势流行基因亚型,且与本地及临省的往年流行株具有较近的亲缘关系。B1a 亚型分支的序列部分与大陆地区往年分离株有较高的同源性,部分与泰国、越南等邻国的毒株具有进化关系,提示本区 CVA16 来源的多样性,与深圳是我国最大的移民城市和重要的对外窗口城市有关。另有一株分离株(CA16-24/SZLG/2017)可分为 B 基因型,但与 B1、B2 亚型同源性无明显差异,该分离株与亚型代表株之间核苷酸差异为 10.0%~13.2%。根据 Zhang 等<sup>[15]</sup>研究,B1 与 B2 之间核苷酸差异为 11.8%,B1a 与 B1b 之间、B1a 与 B1c 之间、B1b 与 B1c 之间核苷酸差异分别为 6.5%、7.0%、6.8%。提示该分离方法或许不够完善或存在新的基因亚型的可能。

本研究对 2017 年龙岗区 EV71 和 CVA16 的 VP1 区进行了分子流行病学特征分析,了解病原的基因特征和流行情况,为本辖区手足口病防控提供了基础资料。

### 参考文献

- [1] Xing W, Liao Q, Viboud C, et al. Hand, foot, and mouth disease in China, 2008–2012: an epidemiological study [J]. *Lancet Infect Dis*, 2014, 14(4): 308–318.
- [2] 周伯平. 肠道病毒 71 型手足口病 [M]. 第 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 2.
- [3] Zhuang ZC, Kou ZQ, Bai YQ, et al. Epidemiological research on hand, foot, and mouth disease in mainland China [J]. *Viruses*, 2015, 7(12): 6400–6411.
- [4] 廖玉学, 路滢, 梅树江, 等. 2009–2013 年深圳市手足口病流行特征分析 [J]. *实用预防医学*, 2015, 22(1): 69–71.
- [5] 张正君, 杨兴林, 黄海. 贵阳市 2013–2015 年手足口病患者 EV71 病毒 VP1、VP4 基因特征分析 [J]. *中国公共卫生*, 2016, 32(6): 828–831.
- [6] 黎俊宏, 嵇红, 樊欢, 等. 江苏省 2015 年柯萨奇病毒 A 组 16 型 VP1 基因特征 [J]. *病毒学报*, 2016, 32(6): 689–693.
- [7] 占建波, 李静, 杨朝晖, 等. 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 [J]. *疾病监测*, 2017, 32(2): 96–101.
- [8] 马建敏, 卫海燕, 于贺军, 等. 新乡地区 2011 年肠道病毒 71 型 VP1 基因特征分析及手足口病流行特点 [J]. *病毒学报*, 2012, 28(6): 675–680.
- [9] 常昭瑞, 张静, 孙军玲, 等. 中国 2008–2009 年手足口病报告病例流行病学特征分析 [J]. *中华流行病学杂志*, 2011, 32(7): 676–680.
- [10] 龙海艺, 庞秀然, 黄飞, 等. 2010–2015 年防城港市手足口病病原学监测结果分析 [J]. *实用预防医学*, 2018, 25(3): 321–324.
- [11] 冀天娇, 谭小华, 刘冷, 等. 广东省 2008–2015 年手足口病流行病学特征及病原学监测分析 [J]. *病毒学报*, 2016, 32(6): 713–720.
- [12] Oberste MS, Maber K, Kilpatrick DR, et al. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification [J]. *J Virol*, 1999, 73(3): 1941–1948.
- [13] 谢群, 谭徽, 刘爱平, 等. 2011 年郴州市手足口病病原学及 EV71 型分离株基因特征研究 [J]. *实用预防医学*, 2013, 20(3): 291–297.
- [14] Masae I, Akio M, Sumiyo H, 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 [J]. *Jpn J Infect Dis*, 2009, 62(4): 254–259.
- [15] 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]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(2): 619–622.

收稿日期: 2018-06-04