

2009—2019 年上海市闵行区手足口病病原谱及 EV-A71 和 CV-A16 病毒分离株 VP1 区基因特征分析

闫红静,甄珊珊,付贝尔,王之晗,王小光,张颖华

上海市闵行区疾病预防控制中心,上海 201101

摘要: **目的** 了解 2009—2019 年上海市闵行区手足口病的病原谱,分析肠道病毒 71 型(enterovirus 71, EV-A71)和柯萨奇病毒 A 组 16 型(coxsackievirus A16, CV-A16) VP1 区基因特征,为手足口病的综合防治提供科学依据。 **方法** 对 2009—2019 年闵行区手足口病监测点送检的标本应用实时荧光定量 PCR 进行病原学检测,分析病原学特征。EV-A71 和 CV-A16 病毒分离株进行 VP1 区核苷酸序列测定,分析其同源性并构建系统进化树。 **结果** 2009—2019 年共收集到 5 364 例手足口病病例标本,病原学检测阳性检出率为 86.74% (4 653/5 364),其中 EV-A71 检出率为 40.12% (2 152/5 364)、CV-A16 为 16.61% (891/5 364)、CV-A6 为 20.86% (1 119/5 364)、CV-A10 为 1.49% (80/5 364)。2009—2014 年主要呈 EV-A71 和 CV-A16 共同流行趋势,2015—2019 年主要以 CV-A6 和 CV-A16 共同流行为主。EV-A71 分离株均为 C4a 型,VP1 区核苷酸序列同源性为 92.1%~99.3%、氨基酸序列同源性为 98.1%~100.0%; CV-A16 分离株均为 B1 基因型,存在 B1b 和 B1a 基因亚型的共同流行,VP1 区核苷酸序列同源性为 87.2%~99.6%、氨基酸序列同源性为 97.9%~100.0%。 **结论** 2009—2019 年上海市闵行区手足口病呈现 EV-A71、CV-A16 和 CV-A6 共同流行态势,不同年份的优势毒株呈现动态变化;而 EV-A71 流行株属于 C4a 亚型、CV-A16 流行株存在 B1b 和 B1a 基因亚型的共同流行,与国内大部分地区的流行株基因亚型一致。

关键词: 手足口病;病原谱;肠道病毒 71 型;柯萨奇病毒 A 组 16 型;VP1 基因

中图分类号: R725.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2022)10-1158-05 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2022.10.002

Pathogenic spectrum of hand, foot and mouth disease and VP1 genetic characteristics of EV-A71 and CV-A16 in Minhang District, Shanghai, 2009–2019

YAN Hong-jing, ZHEN Shan-shan, FU Bei-er, WANG Zhi-han, WANG Xiao-guang, ZHANG Ying-hua

Minhang District Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 201101, China

Corresponding author: ZHANG Ying-hua, E-mail: yhzhangcdc@sina.com

Abstract: **Objective** To understand the etiological spectrum of hand, foot and mouth disease (HFMD) and analyze the VP1 genetic characteristics of enterovirus A group 71 (EV-A71) and coxsackievirus group A 16 (CV-A16) in Minhang District of Shanghai from 2009 to 2019, and to provide a scientific basis for comprehensive prevention and treatment of HFMD. **Methods** Real time PCR was used to detect HFMD specimens from surveillance hospitals in Minhang District during 2009–2019, and the pathogenic characteristics were analyzed. VP1 region nucleotide sequences of EV-A71 and CV-A16 isolates were determined, the homology was analyzed and the phylogenetic tree constructed. **Results** A total of 5,364 specimens of HFMD cases were collected during 2009–2019. Etiological detection revealed that the positive detection rate was 86.74% (4,635/5,364), of which the detection rates of EV-A71, CV-A16, CV-A6 and CV-A10 were 40.12% (2,152/5,364), 16.61% (891/5,364), 20.86% (1,119/5,364) and 1.49% (80/5,364), respectively. It mainly showed the common epidemic trend of EV-A71 and CV-A16 during 2009–2014, while during 2015–2019 it was mainly the common epidemic trend of CV-A6 and CV-A16. EV-A71 isolates were all C4a sub-genotype, and the sequences analysis displayed that EV-A71 strains shared 92.1%–99.3% nucleotide similarity and 98.1%–100.0% amino acid similarity with each other. CV-A16 isolates were all B1 genotypes, and there was a common prevalence of B1b and B1a sub-genotypes, the sequences analysis revealed that CV-A16 strains shared 87.2%–99.6% nucleotide similarity and 97.9%–100.0% amino acid similarity with each other. **Conclusion** The prevalent pathogens of HFMD in Minhang District during 2009–2019 were EV-A71, CV-A16 and CV-A6, and the dominant strains in different years showed

基金项目: 上海市闵行区自然科学研究课题(2019MII011);闵行区公共卫生重点学科建设(MGWXK08)

作者简介: 闫红静(1987-),女,河南人,硕士,主管技师,研究方向:分子病毒。

通信作者: 张颖华, E-mail: yhzhangcdc@sina.com。

dynamic changes. The EV-A71 strains belonged to C4a sub-genotype, and the CV-A16 strains had the common prevalence of B1b and B1a sub-genotypes. They were basically consistent with the sub-genotypes of epidemic strains in most parts of China.

Keywords: hand, foot and mouth disease; pathogenic spectrum; enterovirus 71; coxsackievirus A16; VP1 gene

手足口病是一种由肠道病毒(enterovirus, EV)感染引起的儿童常见传染病。以发热和(或)手、足、臀或口腔等特征性部位的皮疹或疱疹为主要特征,主要发生于夏、秋季节,好发于 5 岁以下儿童,重症患者可出现神经和呼吸系统症状。

引起手足口病的肠道病毒血清型有 20 多种,其中以肠道病毒 71 型(enterovirus 71, EV-A71)和柯萨奇病毒 A 组 16 型(coxsackievirus A16, CV-A16)最为常见^[1],近年来柯萨奇病毒 A 组 6 型(coxsackievirus A6, CV-A6)和柯萨奇病毒 A 组 10 型(coxsackievirus A10, CV-A10)感染也呈现上升趋势。为探索该地区手足口病的病原学特征及 EV-A71 和 CV-A16 VP1 区基因的流行情况及遗传进化特征,本研究对 2009—2019 年闵行区手足口病监测病例采集的标本核酸检测结果进行了病原谱汇总分析,并对 EV-A71 和 CV-A16 的分离株 VP1 区基因进行了序列测定和进化分析,了解该地区手足口病的分子流行病学特点,为 EV-A71 和 CV-A16 流行株的基因特征研究积累基础数据,以期为手足口病的防治提供技术指导和理论依据。

1 材料与方法

1.1 标本来源 上海市闵行区市级哨点监测医院及社区卫生服务中心在 2009—2019 年间采集的手足口病临床诊断病例标本,标本采集根据《手足口病预防控制指南(2009 年版)》^[2]中的监测方案和相关规定:以县(区)为单位,每月最少需采集 5 例首次就诊的普通病例标本;当月县(区)病例总数少于 5 例全部采集;所有重症病例均采集标本。标本在患者发病早期(自发病起 3 d 内)和抗生素使用前采集,采集后暂存于 4 ℃ 冰箱,48 h 内冷链转运至中心手足口病网络实验室进行核酸检测。

1.2 肠道病毒核酸检测 临床标本采集和病毒分离按照《手足口病预防控制指南(2009 年版)》技术方案操作,采用赛默飞公司 Kingfisher Flex Magmax Rx 核酸提取或纯化试剂盒提取病毒核酸,按仪器和试剂盒操作步骤进行。采用罗氏公司 LightCycler 480 II PCR 仪根据检测试剂盒说明书进行,首先做肠道病毒通用型的实时荧光反转录聚合酶链式反应(real-time PCR),再对肠道病毒阳性标本进行 EV-A71、CV-A16、CV-A6 和 CV-A10 的检测。所用实时荧光定量 PCR

检测试剂皆由江苏硕世生物技术有限公司提供。

1.3 病毒分离培养 病毒分离参照《手足口病预防控制指南(2009 年版)》技术方案中肠道病毒分离操作规程,将核酸检测结果为 EV-A71 和 CV-A16 的标本用抗生素处理,用人横纹肌肉瘤细胞进行接种,接种后置于 37 ℃、5%CO₂ 培养箱中进行培养,每日观察细胞病变情况,待病变达到 75% 时收获毒株,置于 -70 ℃ 冰箱保存。

1.4 EV-A71 和 CV-A16 VP1 区测序 对分离得到的 9 株 EV-A71 和 16 株 CV-A16 毒株用一步法逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)(Takara#RR057A)进行 VP1 区序列扩增,引物序列及反应详见参考文献^[3-4],扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳确认后由伯杰公司进行测序。

1.5 序列同源性和进化分析 测序结果经 BLAST 比对后,确认是 EV-A71 和 CV-A16 的序列即进行整理拼接,获取 EV-A71 和 CV-A16 VP1 编码区全长序列,然后应用 Bioedit 7.0.4.1 进行核苷酸序列和氨基酸序列同源性分析。将本研究监测标本序列,与 GenBank 数据库中下载的 EV-A71 和 CV-A16 国内外参考序列进行 VP1 区序列比对进行型别鉴定,采用 MEGA 7.0.14 软件的邻位连接法(neighbor-joining, NJ)和 Kimura-2 参数法(Kimura 2-parameter)核苷酸进化模型构建系统进化树,建树的可靠性通过 Bootstrap = 1 000 进行评估。

2 结果

2.1 手足口病监测病例病原学构成 2009—2019 年期间共收集到 5 364 例临床诊断手足口病病例的标本,其中重症病例 1 968 例,轻症病例 3 396 例。病原学检测发现 4 653 例肠道病毒核酸阳性,阳性检出率为 86.74%(4 653/5 364),其中, EV-A71 阳性检出率为 40.12%(2 152/5 364)、CV-A16 为 16.61%(891/5 364)、CV-A6 为 20.86%(1 119/5 364)、CV-A10 为 1.49%(80/5 364)。重症病例主要由 EV-A71 感染引起;轻症病例监测中,哨点医院监测的病例主要致病原是 CV-A6(47.67%)和 CV-A16(22.75%),社区卫生服务中心监测的病例主要的致病原则是 CV-A16(34.32%)和 CV-A6(26.27%),见表 1。

对不同年份的病原构成情况进行统计,结果表明,2009—2019 年上海市闵行区手足口病病原构成中 EV-A71 总体所占比例逐年减少,其他 EV 逐渐成为优势病原。不同年份的优势病原呈现不同的流行趋势,2009—2014 年主要以 EV-A71 和 CV-A16 共同流行

趋势,以 EV-A71 为主。2014 年之后 CV-A6 逐渐增多,至 2015—2019 年主要以 CV-A6 和 CV-A16 共同流行趋势,以 CV-A6 为主,特别是 2018 年, CV-A6 所占比例范围高达 65.26%。CV-A10 呈零星散发趋势,占比较低,但亦有逐渐增长的趋势,见图 1。

表 1 2009—2019 年上海市闵行区手足口病肠道病毒型别构成情况

结果	重症病例		医院轻症病例		社区轻症病例		总病例	
	病例数	构成比 (%)	病例数	构成比 (%)	病例数	构成比 (%)	病例数	构成比 (%)
EV-A71	1 607	88.30	325	18.96	220	19.66	2 152	46.25
CV-A16	117	6.43	390	22.75	384	34.32	891	19.15
CV-A6	8	0.44	817	47.67	294	26.27	1 119	24.05
CV-A10	0	0	50	2.92	30	2.68	80	1.72
其他 EV	88	4.83	132	7.70	191	17.07	411	8.83
合计	1 820	100.00	1 714	100.00	1 119	100.00	4 653	100.00

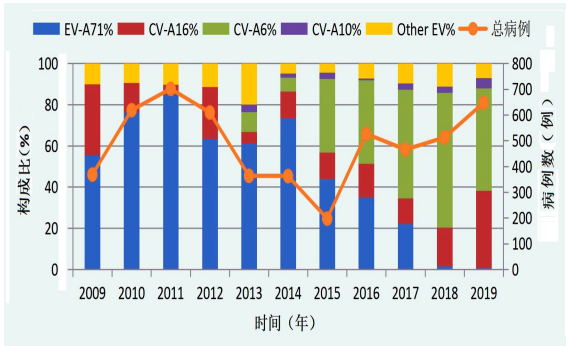


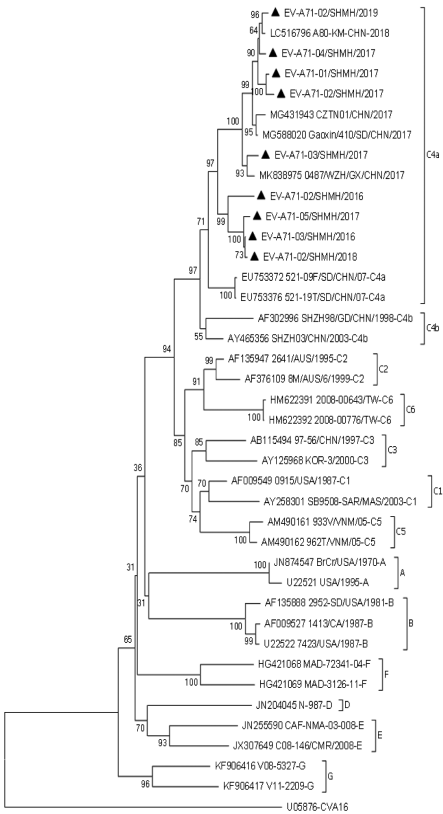
图 1 2009—2019 年上海市闵行区不同年份手足口病病原构成情况

2.2 EV-A71 VP1 区基因特征

2.2.1 基于 VP1 基因序列同源性分析 对病毒分离培养获得的 9 株 EV-A71 进行 VP1 区全长扩增,并进行核苷酸序列分析。9 株 EV-A71 的 VP1 区核苷酸序列长度均为 891 bp,编码 297 个氨基酸。用 BioEdit 进行同源性分析,9 株 EV-A71 VP1 编码区全长序列间的核苷酸同源性为 92.1%~99.3%,其编码的氨基酸同源性为 98.1%~100.0%。

2.2.2 基于 VP1 基因的进化树分析 使用 MEGA7.0 软件采用 NJ 法,将该区 9 株 EV-A71 与国内外 EV-A71 各基因型和基因亚型代表株进行比对,构建系统进化树,并设置组外对照(EV-A71 VP1 区进化树以 CV-A16 原型株 U05676 作为组外对照)。从进化树上看, EV-A71 分为 A~G 七个基因型,根据亲缘关系,将各基因型进一步划分为不同亚型。进化树结果显示,辖区 9 株 EV-A71 序列均与 C4a 基因亚型代表株聚集为一簇,且与国内近年各地流行株的核苷酸方面差别

不大,见图 2。



注:▲表示上海市闵行区 EV-A71。

图 2 基于各个基因型 EV-A71 VP1 全长的进化树

2.3 CV-A16 VP1 基因特征

2.3.1 基于 VP1 基因同源性分析 对获得的 16 株 CV-A16 阳性分离株进行 VP1 区全长扩增,并进行核苷酸序列分析。16 株 CV-A16 的 VP1 区核苷酸序列

长度为 891 bp,编码 297 个氨基酸。同源性分析显示,16 株 CV-A16 VP1 编码区全长序列间的核苷酸同源性为 87.2%~99.6%,其编码的氨基酸同源性为 97.9%~100.0%。

2.3.2 基于 VP1 基因的进化树分析 将该区的 16 株 CV-A16 序列与国内外 CV-A16 各基因型和基因亚型代表株进行系统进化树的构建,并设置组外对照 (CV-A16 VP1 区进化树以 EV-A71 原型株 U22521 作为组外对照),结果见图 3。从进化树上看,CV-A16 分为 A 和 B 两个基因型,根据亲缘关系,将各基因型进一步划分为不同亚型,其中 A 型只有一个亚型,B 型分为 B1~B2,B1 基因亚型又可分为三个进化分支:B1a、B1b 和 B1c。进化树结果表明该区的 CV-A16 均为 B1 基因型,存在 B1b 和 B1a 基因亚型的共同流行,主要分支为 B1b 基因型,9 个序列间相互同源性较高,与 2013 年湖南流行株 (KM402020)、2014 年深圳流行株 (KM215267) 高度同源,为该区的优势病原分支。次要分支为 B1a 基因型,有 7 个序列,相互同源性很高,与 2005 年越南流行株 (AM292441)、2006 年日本流行株 (AB465402) 的亲缘关系较近。

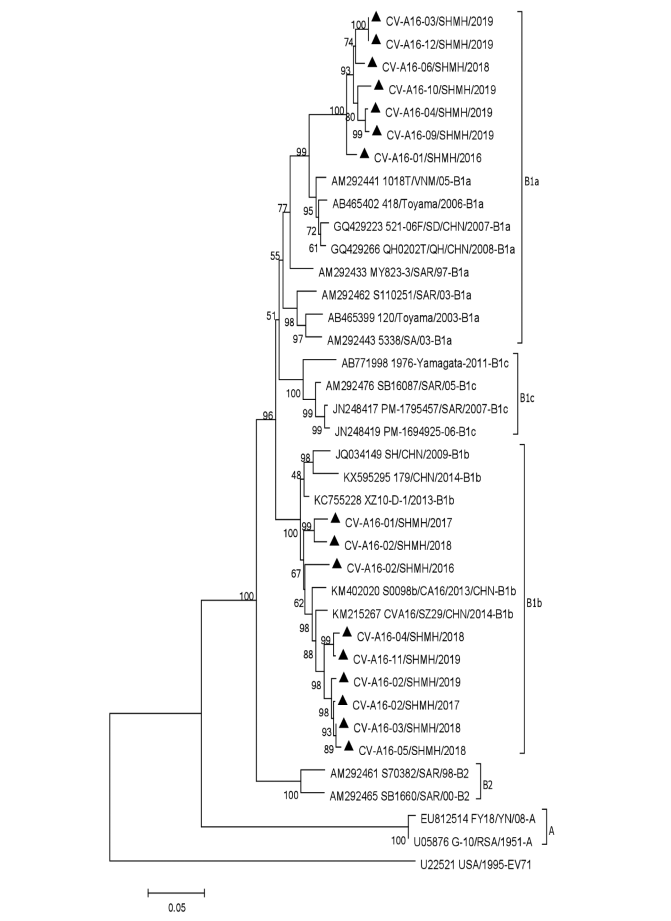


图 3 基于各个基因型 CV-A16 VP1 全长的进化树

3 讨论

本研究对 2009—2019 年上海市闵行区的 5 364 例临床诊断手足口病病例进行病原学检测,结果显示 4 653 例肠道病毒检测阳性,阳性检出率高达 86.74%。其中,EV-A71 为导致该区手足口病的主要致病原,尤其在重症病例中 EV-A71 更是绝对优势致病原,其次是 CV-A16 和 CV-A6。同时监测数据也提示闵行地区手足口病病原一直在发生变化,不同年份的优势病原呈现不同的流行趋势,2009—2014 年该区手足口病病原主要呈现 EV-A71 和 CV-A16 共同流行的趋势,以 EV-A71 为主;2015—2019 年 EV-A71 大幅减少,主要呈现 CV-A6 和 CV-A16 共同流行趋势,CV-A6 逐渐增多成为优势毒株,这与上海市及其他地区的报道一致^[5-10]。这可能部分归因于免疫保护,2016 年上半年 EV-A71 型手足口病疫苗在国内上市,在 EV-A71 疫苗尚未接种之前,由于 EV-A71 已流行多年,因此已逐步建立对 EV-A71 的免疫屏障^[11-13];另外灭活 EV-A71 疫苗已证明在婴儿中具有良好的安全性和免疫原性^[14-15],对 EV-A71 相关疾病的保护率相对较高。上海市自 2016 年 11 月逐渐展开 EV-A71 疫苗接种,有效控制了 EV-A71 型病毒感染;随着 EV-A71 在受影响人群中的免疫压力增加,其他肠道病毒可能取代他,成为手足口病的主要病原体,这可能解释了连续几年手足口病多病因的共同循环;另一方面,多地研究显示,CV-A6 型毒株首次暴发之后会逐渐演变为该地手足口病的主要病原体^[10,16],提示应持续监测手足口病病原谱的变化,此外,流行的复杂性和病原的多样性为该地手足口病的防控带来了挑战,因此及时掌握病毒的变异趋势亦显得尤为重要。在对手足口轻症病例监测中,哨点医院监测的病例主要致病原是 CV-A6 (47.67%) 和 CV-A16 (22.75%),而社区卫生服务中心监测的病例主要的致病原则是 CV-A16 (34.32%) 和 CV-A6 (26.27%),两者主要致病原相同但占比不同,这可能与 0~3 岁儿童是 Cox A6 感染手足口病高危人群^[17],低年龄组的儿童更倾向于在大型医院就诊有关。

肠道病毒 VP1 区是编码病毒主要的中和抗原决定簇的部位,也是肠道病毒基因分型及分子进化研究的重要区域,常作为肠道病毒进化分析的标准^[18]。本研究通过对该区 EV-A71 和 CV-A16 分离株进行 VP1 区测序,与从 GeneBank 上下载整理的各参考株进行比较,分析 EV-A71 和 CV-A16 的 VP1 编码区核苷酸和氨基酸的同源性及其分子进化特征。根据 VP1 基因核苷酸序列的差异,EV-A71 被分为 A~G 7 个基因型,B 基因型又可以分为 B0~B7,C 基因型又可以分为 C1~C6

基因亚型。2005 年后我国大陆地区流行的 EV-A71 基因型主要为 C4a 基因亚型^[19],本研究分离到的 9 株 EV-A71 同源性和系统进化分析显示,该区的 EV-A71 基因型均为 C4a 亚型,与国内其他地区一致,各毒株之间的核苷酸同源性为 92.1%~99.3%,其编码的氨基酸同源性为 98.1%~100.0%。提示该地 EV-A71 亲缘性关系较近,近年来未出现较大变异。CV-A16 的 VP1 区基因分型根据核苷酸差异至少为 15% 的原则分为 A、B 两个基因型,B 基因型可进一步分为 B1 和 B2 亚型,B1 又可以分为 B1a、B1b 和 B1c^[20]。该区分离到的 16 株 CV-A16 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,且与该地及国内其他省市的往年流行株具有较近的亲缘关系,没有发生明显变化;但 B1a 亚型分支的序列部分与越南、日本等邻国的流行株具有进化关系,提示该区 CV-A16 来源的多样性,与上海是我国的国际化特大城市,外来人口众多,且该区的哨点监测医院为上海市的三甲级儿童医院有关。

综上所述,本研究基于该区连续 10 余年收集的手足口病实验室监测数据,分析了其病原构成特点及 EV-A71 和 CV-A16 病毒流行株的基因特征,为手足口病的防控和相关疫苗的研究提供了基础数据。虽然该区手足口病病原体 EV-A71 和 CV-A16 的 VP1 序列较为稳定,未出现新的亚型,但仍需进行持续监测,以防发生基因突变或重组导致手足口病大规模暴发流行。随着非 EV-A71、非 CV-A16 肠道病毒变多,特别是 CV-A6 已成为该地手足口病的优势毒株,提示应注意手足口病病原谱的变化趋势,严密监测 CV-A6 的流行态势和重组变异情况,加强对新流行毒株属性和应对措施的研究,做好新形势下手足口病的防控工作。

参考文献

- [1] Zhuang ZC, Kou ZQ, Bai YJ, et al. Epidemiological research on hand, foot, and mouth disease in mainland China [J]. *Viruses*, 2015, 7(12):6400-6411.
- [2] 中华人民共和国卫生部. 手足口病预防控制指南(2009 年版) [M]. 北京:中华人民共和国卫生部,2009:5-6.
- [3] 张正君,杨兴林,黄海. 贵阳市 2013—2015 年手足口病患儿童 EV71 病毒 VP1、VP4 基因特征分析[J]. *中国公共卫生*, 2016, 32(6): 828-831.
- [4] 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.
- [5] 赵博兰,崔立周,王春艳,等. 2014—2019 年保定市手足口病流行特征及病原学特征分析[J]. *实用预防医学*, 2021, 28(7):877-880.
- [6] 孙箐爽,董兆鹏,臧昊,等. 2011—2018 年上海市金山区手足口病病原学监测结果及柯萨奇病毒 A6 型分离株 VP1 基因特征分析[J]. *实用预防医学*, 2020, 27(1):33-37.
- [7] 段蓉,周毅彬,朱奕奕,等. 2009—2019 年上海市徐汇区 HFMD 流行病学特征分析[J]. *职业与健康*, 2021, 34(14):1910-1915.
- [8] Chang LY. Enterovirus 71 in Taiwan[J]. *PEDN*, 2008, 49(4):103-112.
- [9] 史军,牛卫东,许太彬,等. 2016—2020 年郑州市儿童手足口病优势毒株变化趋势[J]. *河南预防医学杂志*, 2021, 32(8):645-647.
- [10] 王希峰,周丽敏,郑天驰. 2018—2019 年北京市大兴区手足口病病原学特征及影响因素分析[J]. *中国现代医生*, 2020, 58(22): 143-147.
- [11] 杨克江,许玲玉,李婷婷,等. 2014—2018 年昆明市官渡区手足口病流行特征分析[J]. *职业与健康*, 2020, 36(12):1650-1654.
- [12] 于宏杰,倪胜男,钟培松. 上海市嘉定区 2007—2016 年手足口病流行特征及病原学分析[J]. *上海预防医学*, 2018, 30(12):1005-1008.
- [13] 张晓玲,俞慧菊,宋志刚,等. 上海地区 2011—2014 年手足口病的病原谱变化及流行规律分析[J]. *上海预防医学*, 2018, 30(5): 380-385.
- [14] 韩亦非,高洁,张久丁,等. 2014—2018 年汉中市手足口病病原学监测结果分析[J]. *职业与健康*, 2020, 36(1):66-69.
- [15] 王瑞琴,蔡旭,李飒,等. 2018 年北京市昌平区手足口病流行特征及经济负担分析[J]. *职业与健康*, 2020, 36(18):2533-2536, 2541.
- [16] 高芳旭. 2009—2018 年天津市和平区手足口病流行特征分析[J]. *现代预防医学*, 2019, 46(18):3294-3296, 3318.
- [17] 吴燕飞,陈旭光,刘东妹,等. 2017—2019 年广东省 Cox A6 感染手足口病流行特征分析[J/OL]. *疾病监测*. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2928.R.20210928.1830.003.html>.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 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:2022-03-04