

2017 年济南市柯萨奇病毒 A16 型 VP1 基因特征分析

赵怀龙¹ 隋竑弢² 杨国樑¹ 关恒云¹ 王春荣¹ 刘岚铮¹

¹济南市疾病预防控制中心 250014; ²中国医学科学院病原生物学研究所, 北京 100730

赵怀龙和隋竑弢对本文有同等贡献

通信作者: 王春荣, Email: jncdewer@163.com, 电话: 0531-81278960; 刘岚铮, Email: jncdellz@163.com, 电话: 0531-81278811

【摘要】 目的 对济南市 2017 年手足口病(hand, foot and mouth disease, HFMD)病原中的柯萨奇病毒 A 组 16 型(coxsackievirus A16, CV-A16)分离鉴定, 分析 VP1 基因遗传进化特征。**方法** 整理分析 2017 年济南市 HFMD 监测样本, 采用简单随机抽样方法选取 CV-A16 核酸阳性样本经预处理后接种人横纹肌肉瘤(human rhabdomyosarcoma, RD)细胞, 对产生明显细胞病变效应的毒株进行鉴定, 测定 VP1 基因序列, 应用 MEGA5.2 软件构建系统进化树, 通过 Lasergene 软件对 VP1 进行核苷酸及氨基酸同源性分析。**结果** 通过细胞分离获得 10 株 CV-A16 阳性病毒株, 均属 B1b 亚型, 分别位于 3 个不同簇, 核苷酸及氨基酸序列同源性分别为 94.9%~100% 和 99.3%~100%, 与我国 CV-A16 上海株(KX871333)(同源性 99.7%)、河南株(KM260134)(99.0%)、江苏株(KP751580、KR138327)(98.7%)及广东株(MH004016)(98.5%)亲缘关系较近。与国内参考株相比, 济南市 CV-A16 分离株 VP1 存在 N14S、S59R、E145V 变异。**结论** CV-A16 病毒株 B1b 基因亚型为济南市优势毒株, VP1 蛋白发生氨基酸变异。

【关键词】 手足口病; 柯萨奇病毒 A 组 16 型; 系统进化树

基金项目: 山东省医药卫生科技发展计划项目(2017WS529)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2019.01.010

Characteristics of Coxsackievirus A16 VP1 gene in Jinan, 2017

Zhao Huailong¹, Sui Hongtao², Yang Guoliang¹, Guan Hengyun¹, Wang Chunrong¹, Liu Lanzheng¹

¹Jinan Municipal Center for Disease Control and Prevention, Jinan 250021, China; ²Institute of Pathogen Biology Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China

Zhao Huailong and Sui Hongtao are contributed equally to the article

Corresponding author: Wang Chunrong, Email: jncdewer@163.com, Tel: 0086-531-81278960; Liu Lanzheng, Email: jncdellz@163.com, Tel: 0086-531-81278811

【Abstract】 Objective To analyze the VP1 gene characteristics of Coxsackievirus A16 (CV-A16) isolated in (hand, foot and mouth disease, HFMD) patients of Jinan 2017. **Methods** The samples collected from patients with HFMD in Jinan city in 2017 were analyzed and some of the CV-A16 nucleic acid positive samples were chosen with simple random sampling method and pretreated to inoculate RD cells. The whole VP1 gene sequences of CV-A16 stains which had obvious cytopathic effect in RD cells were amplified and sequenced. MEGA5.2 software was used to constructed phylogenetic tree and Lasergene software was used to analysis the homology consistency of nucleotide and amino acid of VP1 gene. **Results** All the 10 CV-A16 strains isolated from Jinan were located 3 clusters belonged to B1b genotypes, with a nucleotide similarity of 94.9%~100% and deduced amino acid similarity of 99.3%~100%. The Jinan CV-A16 strains were nearest related with Shanghai strains KX871333 (nucleotide similarity: 99.7%), Henan strains KM260134 (99.0%), Jiangsu strains KP751580, KR138327 (98.7%) and Guangdong strains MH004016 (98.5%). Compared with some reference strains from our country, amino acid mutation were identified at positions 14, 59, and 145 in VP1 proteins of Jinan CV-A16 strains. **Conclusions** CV-A16 strains B1b genotypes were the strains prevailed in Jinan city, and 3 amino acid substitutions in VP1 proteins were happened in CV-A16 strains isolated from Jinan.

[Key words] Hand, foot and mouth disease; Coxsackievirus A16; Phylogenetic tree

Fund program: Shandong Provincial Medical and Healthy Science and Technology Development Project(2017WS529)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2019.01.010

手足口病(hand, foot, and mouth disease, HFMD)是导致婴幼儿,尤其是5岁以下儿童感染的主要传染病之一,通常症状较为温和,主要表现为发热伴手、足、臀部等多部位皮疹,个别重症者累及中枢神经系统及心肺系统,严重者导致死亡^[1]。引起 HFMD 的病原体有 20 多种,其中肠道病毒 71 型(enterovirus 71, EV-A71)和柯萨奇病毒 A 组 16 型(coxsackievirus A16, CV-A16)为最主要病原体。我国 HFMD 监测网络数据显示,2008 年至 2015 年共 1 370 万人感染,在实验室确诊病例中,由 EV-A71 引起的感染占 43.6%,CV-A16 其次,占 24.9%^[2]。济南市 HFMD 病原分析结果显示 CV-A16 占感染总数的 37.22%,略高于 EV-A71(33.67%)^[3]。与 EV-A71 感染相比,CV-A16 通常不引起严重的中枢神经系统相关疾病,重视程度及研究深度均不及 EV-A71^[4]。但近年来调查结果显示,在对广西、上海、江西及山东等地 HFMD 重症及/或死亡病例病原分析中,CV-A16 均占不同程度比例,是除 EV-A71 外的主要病原体^[5-8],另外,随着 EV-A71 灭活疫苗在我国的推广应用,也要重视 CV-A16 对 HFMD 流行状况的影响。

本研究根据 2017 年济南市 HFMD 病原学监测结果,对部分 CV-A16 阳性样本 VP1 基因进行序列测定及遗传进化特征分析,有助于了解济南市 CV-A16 病毒的遗传学背景及分子流行病学特点,为疫情防控和疫苗研制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样本来源 粪便样本来源于 2017 年济南市临床诊断为 HFMD 的常规监测患者,样本采集后冷藏运送至济南市疾病预防控制中心,-70℃保存。

1.2 病毒检测 采用 MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit(Roche 公司)试剂盒,经 MagNA Pure LC 2.0(Roche 公司)自动核酸提取仪提取样本中病毒 RNA。总肠道病毒及 CV-A16 的 Real time RT-PCR 检测应用相关核酸检测试剂盒(江苏硕世生物科技有限公司),根据试剂盒说明书进行操作及结果判定。

1.3 病毒分离 采用简单随机抽样方法选取 Real

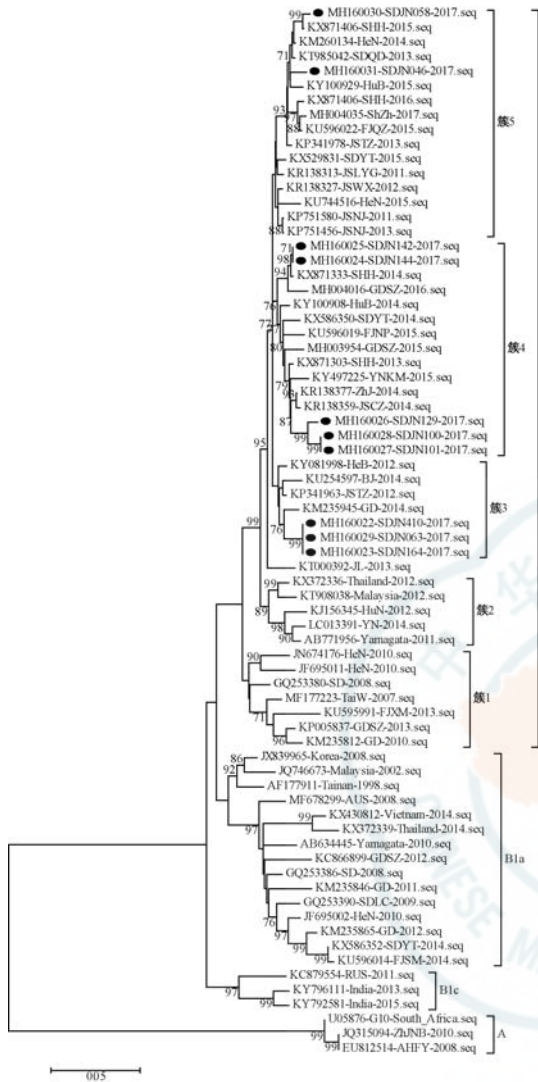
time RT-PCR 核酸检测肠道病毒及 CV-A16 均为阳性的粪便样本,按照我国《手足口病预防控制指南(2009 版)》HFMD 标本采集及检测技术方案中方法进行前处理后,接种致密单层的人横纹肌肉瘤(human rhabdomyosarcoma, RD)细胞进行病毒分离。接种 RD 细胞后每天观察并记录各样本接种细胞形态变化,连续观察 1 周。当细胞出现形态变圆,折光率增强并脱落时,认为细胞出现细胞病变效应(cytopathic effect, CPE)。若样本接种 1 周后仍无 CPE 出现,则收集病毒液,盲传 1 代(连续培养观察 1 周),当盲传 3 代仍未出现 CPE 时,则判定结果为阴性。

1.4 病毒核酸提取及 RT-PCR 鉴定 当 RD 培养细胞出现特异性 CPE 后冻融 3 次收获病毒,应用 Qiaamp Viral RNA Mini kit(Qiagen 公司)提取病毒 RNA。应用 OneStep RT-PCR Kit(Qiagen 公司)进行 VP1 基因全长序列进行扩增,扩增引物参照文献[9],反应条件为:50℃ 30 min;95℃ 15 min;94℃ 45 s;52℃ 45 s;72℃ 60 s,35 个循环;72℃ 10 min,4℃ 保存。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后阳性 PCR 产物送华大基因生物公司测序。

1.5 VP1 基因序列比对及遗传进化分析 测序结果应用 Lasergene7.1 软件包中 EditSeq 及 MegAlign 等软件进行序列拼接、比对及突变位点分析等。应用 MEGA5.2 软件进行序列比对及遗传进化分析,系统进化树采用 Neighboring joining(NJ)方法进行,Bootstrap 值进行 1 000 次重复运算。用于同源性分析和构建系统进化树的 CV-A16 病毒株参考序列均来自 GenBank。

2 结果

2.1 VP1 基因扩增及序列测定 经 RD 细胞分离培养,成功获得 10 株 CV-A16 病毒,应用 RT-PCR 对 VP1 基因进行扩增,产物大小约为 1 100 bp。测序结果通过 EditSeq 软件进行拼接后应用 BLAST 软件在 GenBank 中进行序列比对,均为 CV-A16 病毒株序列。VP1 基因序列全长为 891 bp,编码 296 个氨基酸,将序列上传至 GenBank,收录号为 MH160022~31。



注：●济南市 CV-A16 病毒株

图 1 济南市 CV-A16 病毒 VP1 基因核苷酸序列系统进化分析

Note: ● indicates CV-A16 strains in Jinan city

Fig.1 Phylogenetic analysis of complete VP1 gene sequences of CV-A16 strains in Jinan city

HFMD 成为我国主要流行性疾病,并被列入丙类法定传染病。近年来, HFMD 在东亚及东南亚国家,如日本、马来西亚、新加坡、越南及中国等呈持续暴发流行,已成为重要的公共健康问题^[10]。

CV-A16 是引起 HFMD 的重要病原体,在亚太地区,平均每年超过 200 万儿童因 CV-A16 感染发病,与 EV-A71 相比症状较为温和,大多呈自限性,但在我国多个省份常见由 CV-A16 引起的 HFMD 暴发、重症及致死病例的报道^[11]。Zhao 等^[12] 通过 Bayesian 方法对 708 株 CV-A16 VP1 基因进行研究发现,1995 年日本及 2007 年我国 HFMD 大暴发时,VP1 基因均存在遗传多样性的突然改变,推测

HFMD 暴发与 VP1 基因相关。本研究收集整理 GenBank 收录的不同基因型(亚型)参考株及我国 2010 年以来部分 CV-A16 病毒株完整 VP1 基因序列进行分析,发现我国 CV-A16 流行株主要为 B1 亚型,其中 B1b 亚型超过 B1a 亚型,成为流行优势毒株。对 VP1 蛋白氨基酸突变分析,145 为易突变位点,在 B1a 及 B1b 亚型均有变异,其他 21 处位点均为散在变异位点。但在第 23 位点, B1a 亚型及 B1b 亚型簇 1 和 2 均为 Leu,在 B1b 亚型簇 3、4 和 5 中均已突变为 Met。进一步对该氨基酸残基编码子序列进行分析,在 B1a 亚型存在 3 种, CTG、TTG 与 TTA, B1b 亚型簇 1 和 2 中 TTG 与 TTA 共存,但在 B1b 亚型 3、4 与 5 簇中均已突变为 ATG。随着时间的推移,氨基酸编码序列由多种形式共存,进而第 1 位完成 T-A 突变后并稳定遗传进化,目前对于该变异形式及作用需进一步研究。Zhang 等^[11] 通过研究证实硫酸乙酰肝素糖胺聚糖(heparan sulfate glycosaminoglycans, HSGAGs)为 CV-A16 的粘附受体,其中 VP1 蛋白中 166^{Arg} 与 141^{Lys} 最为重要,当 R166 A 替代后可导致 CV-A16 病毒株几乎完全失去与 RD 细胞粘附的能力。对本研究 CV-A16 病毒株 B1 型 VP1 蛋白分析发现该 2 处氨基酸残基较为保守,没有出现变异。

系统进化树结果显示,2017 年济南市分离的 CV-A16 与原型株(G10),与印度、俄罗斯、泰国、越南及马来西亚等国分离株及国内部分地区 2008—2014 年早期分离株遗传距离较远,与国内 2014—2016 年分离株遗传距离较近。尽管济南 CV-A16 分离株均为 B1b 亚型,但又处于不同的进化分支,分别位于 3 个簇区,与上海、河南、湖北、江苏、广东和浙江等分离株亲缘关系较近。应用 ClustalW 方法进行同源比对分析,与系统进化树结果相一致,济南 CV-A16 分离株与上海等地同源性要高于山东省内青岛与烟台分离株。如 JN058 株与 2015 年上海分离株(KX871406)同源性为 99.6%,与 2014 年河南株(KM260134)同源性为 99.0%,与 2013 年山东青岛株(KT985043)同源性 98.7%。青岛株(KT985043)与上海株(KX871406)同源性为 99.4%,与河南株(KM260134)同源性为 99.7%。提示,尽管在山东省境内 CV-A16 病毒分离株亲缘关系较近,但并不一定是由省内传播引起,有可能分别来源于其他省市,传播的具体途径路线仍需进一步的数据支持。研究认为 CV-A16 的传播方式主要有

3 种:(1)本区域内,来源于不同地区的病毒株在本区域内共同传播共存。(2)省际区域或国境区域,如山东省与周边省份河南、江苏等区域,台湾与福建、广东等区域,云南与泰国、马来西亚等国家。(3)远距离传播,如济南市 CV-A16 病毒株可能来源于上海、广东等地。CV-A16 的传播方式,尤其是外来病毒株的传入可能是导致 HFMD 暴发一个重要原因,另外可能影响 CV-A16 在本区域内的进化动力。这就需要加大监测的敏感性,关注外来病毒株及本地病毒株突变分析。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 赵怀龙,关恒云:实验操作、论文撰写;隋竣骏、杨国樑:数据整理、生物信息学分析;王春荣、刘岚铮:研究指导、论文审阅、经费支持

参考文献

- [1] Ganorkar NN, Patil PR, Tikute SS, et al. Genetic characterization of enterovirus strains identified in Hand, Foot and Mouth Disease (HFMD): Emergence of B1c, C1 subgenotypes, E2 sublineage of CV-A16, EV-A71 and CVA6 strains in India[J]. *Infect Genet Evol*, 2017, 54:192-199. DOI: 10.1016/j.meegid.2017.05.024.
- [2] Yang B, Liu F, Liao Q, et al. Epidemiology of hand, foot and mouth disease in China, 2008 to 2015 prior to the introduction of EV-A71 vaccine[J]. *Euro Surveill*, 2017, 22(50):16-00824. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.50.16-00824.
- [3] 耿兴义,王蔚茹,常彩云,等. 2009—2016 年济南市手足口病发病热点及流行特征分析[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2017, 31(6):492-497. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2017.06.003.
- [4] Sun Z, Zhang G, Guo P, et al. Epidemiological characterizations, pathogen spectrum and molecular characteristics of Coxsackievirus A16 from patients with HFMD in Yantai, Shandong, China between 2011 and 2015 [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2017, 13(8):1831-1838. DOI: 10.1080/21645515.2017.1318233.
- [5] Lin W, Su Y, Jiang M, et al. Clinical features for 89 deaths of hand, foot and mouth disease in Guangxi, China, 2014[J]. *Int J Infect Dis*, 2017, 64:15-19. DOI: 10.1016/j.ijid.2017.08.016.
- [6] Li J, Pan H, Wang X, et al. Epidemiological surveillance of hand, foot and mouth disease in Shanghai in 2014-2016, prior to the introduction of the enterovirus 71 vaccine [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2018, 7(1):37. DOI: 10.1038/s41426-018-0035-z.
- [7] Yu W, Xu H, Yin C. Molecular epidemiology of human coxsackievirus A16 strains[J]. *Biomed Rep*, 2016, 4(6):761-764. DOI: 10.3892/br.2016.663.
- [8] Wang J, Hu T, Sun D, et al. Epidemiological characteristics of hand, foot, and mouth disease in Shandong, China, 2009-2016 [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):8900. DOI: 10.1038/s41598-017-09196-z.
- [9] 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. DOI: 10.1128/JCM.02338-09.
- [10] Hassel C, Mirand A, Farkas A, et al. Phylogeography of coxsackievirus A16 reveals global transmission pathways and recent emergence and spread of a recombinant genogroup[J]. *J Virol*, 2017, 91(18):e00630-17. DOI: 10.1128/JVI.00630-17.
- [11] Zhang X, Shi J, Ye X, et al. Coxsackievirus A16 utilizes cell surface heparan sulfate glycosaminoglycans as its attachment receptor[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2017, 6(7):e65. DOI: 10.1038/emi.2017.55.
- [12] Zhao G, Zhang X, Wang C, et al. Characterization of VP1 sequence of Coxsackievirus A16 isolates by Bayesian evolutionary method[J]. *Virol J*, 2016, 13:130. DOI: 10.1186/s12985-016-0578-3.

(收稿日期:2018-07-10)

(本文编辑:吕新军)