



论文

两株不同表型的 CA16 毒株(B 基因型)的生物学性状比较分析

杨二霞^①, 赵恒^①, 张莹^①, 刘建生^①, 廖芸^①, 王丽春^①, 崔萍芳^①, 杨丽仙^①,
刘龙丁^①, 董承红^{①②}, 董少忠^②, 邵聪文^②, 姜莉^②, 孙乐^①, 李琦涵^{①*}

① 中国医学科学院&北京协和医学院医学生物学研究所, 云南省重大传染病疫苗研发重点实验室, 昆明 650118;

② 江苏康淮生物科技有限公司, 泰州 225300

* 联系人, E-mail: imbcams.lq@gmail.com

收稿日期: 2012-02-15; 接受日期: 2012-03-08

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2011CB504903)、国家自然科学基金(批准号: 81171573)、国家科技重大专项(批准号: 2009ZX10004-308)和云南省应用基础研究计划面上项目(批准号: 2011FB116)资助

摘要 CA16 病毒作为手足口病主要病原之一, 其病原学性状与感染引起的病理过程具有可能的相关意义. 对分离自一名重症手足口病(HFMD)患者咽拭子的两株呈现不同蚀斑形态的 CA16 毒株所做的生物学分析表明, 它们在增殖动力学、免疫原性等生物学性状上的差异与其对乳鼠致病能力的差异具有相关性, 而这些共同的差异与病毒基因非编码区 5'端序列及结构区的 VP1 区域中的序列之间存在着可能的对应关系, 所有这些结果提示了 CA16 病毒生物学及遗传学性状与其致病能力的相关性.

关键词

CA16 毒株
增殖动力学
免疫原性
致病能力

手足口病(HFMD)在亚洲及太平洋地区流行范围正日益增加^[1-3], 研究这一以儿童群体为感染对象的传染病病因具有重要的公共卫生意义, 迄今为止对其的病原学研究工作已经表明, EV71 和 CA16 是两个主要的致病病原^[4-7]. 初步的感染病例的病原学检测结果表明, EV71 在大多数 HFMD 报告病例中的感染比例在 49%~52% 之间^[8,9], CA16 病毒亦在 45%~48% 之间^[8,9], 尽管现有的资料表明, 大多数 HFMD 的重症及死亡病例多由 EV71 引起^[10], 但已有少量逐步深入的研究表明, CA16 除可以引起大量 HFMD 普通病例, 其通常表现为典型的口部黏膜、手足部的疱疹并伴随相关的症状, 也能引起少量的重症病例, 并同时表现为中枢神经系统受损的病理特

征^[11,12]. 因此, 在 HFMD 的公共卫生防控体系中, 进一步探讨 CA16 在 HFMD 感染中的病原学特性具有重要的意义. 本研究组在针对 2008 年中国安徽阜阳 HFMD 流行的病原学研究及随后几年中其他地区 HFMD 流行相关的 CA16 病原学分析中^[13], 分离收集了来自 HFMD 病人的不同 CA16 毒株, 并对其进行了相应的病原学研究, 其中一份来自广西 2010 年 HFMD 重症病人 CA16 病毒分离样品的生物学表型特征研究表明, 其在组织培养过程中包含了两个表型毒株, 二者在增殖动力学、致敏感动物病变能力等方面表现出较大差异, 同时这些差异与其基因的 5'端非编码区、VP1 区域和 3'端非编码区的少数碱基变异存在可能的相关性. 这种表型特征的差异是否

英文版见: Yang E X, Zhao H, Zhang Y, et al. A comparative study of the characteristics of two Coxsackie A virus type 16 strains (genotype B). *Sci China Life Sci*, 2012, 55: 336-342, doi: 10.1007/s11427-012-4313-z

具有遗传学上的结构基础, 以及是否可以导致其感染机体时相关病理过程的改变等相关问题, 将是认识 CA16 感染病理学机理及其相关的流行特征、临床治疗和疫苗研究工作的主要内容。

1 材料与方法

1.1 细胞

Vero 细胞(来自 ATCC, 经检定可用于疫苗生产), 于含有 5% 小牛血清的 DMEM 营养液中 37℃ 培养。

1.2 病毒的分离及培养

CA16 病毒分离于 2010 年广西一位 HFMD 患者的咽拭子, 标本经 0.01 mol/L PBS(PH7.2)溶液稀释后, 使用 0.22 μm 滤器(Millipore, Bedford, MA)除菌过滤后接种于 Vero 细胞, 待细胞出现典型的病变特征时收样, 并检测病毒滴度用于后续实验。

1.3 病毒株的蚀斑克隆及传代

取病毒液做适当稀释, 接种至长成单层 Vero 细胞的 6 孔板中吸附 20 min, 加入营养琼脂糖覆盖物, 培养适宜时间后, 0.5% 结晶紫染色, 可观察到明显空斑。挑取典型蚀斑, 接种至培养瓶(DMEM Medium containing 5% FBS), 当 CPE(cytopathic effect)达 95% 时收获病毒, 然后进行 2 次蚀斑筛选。将筛选出的病毒接种至单层 Vero 细胞, 连续传代培养。

1.4 病毒的滴度测定

将用于检测滴度的病毒样品用无血清病毒稀释液做连续 10 倍稀释, 取 100 μL 不同稀释度病毒液加入 80% Vero 细胞汇合的 96 孔板中, 每个稀释度做 8 个平行孔。将 96 孔板置于 37℃, 5% CO_2 培养箱中 5~7 天后观察细胞病变情况。用 Reed-Muench 法计算 CCID_{50} 值。

1.5 病毒的交叉中和实验

利用蚀斑克隆得到的 G20-M 和 G20-D 病毒株免疫小鼠制备特异性抗血清。取 G20-M 和 G20-D 病毒收获液, 用维持液将病毒稀释为 2×10^3 $\text{CCID}_{50}/\text{mL}$, 取 50 μL 稀释好的病毒液加入 96 孔板中; 同时将抗 G20-M 和抗 G20-D 血清作对倍稀释, 即按 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512 和 1:1024 比例稀释。

将 G20-M 稀释血清分别加入已有 G20-M 毒株和 G20-D 毒株病毒液的 96 孔板中, 每孔 50 μL , 将病毒与血清混匀孵育 2 h 后加入 Vero 细胞, 培养 5~7 天后观察中和效果。G20-D 稀释血清也同样操作。

1.6 乳鼠实验及其相关的病理学检测

一日龄 SPF 级 ICR 乳鼠(体重 1.8~2.0 g, 由中国医学科学院医学生物学研究所实验动物中心提供), 随机分为空白对照组, G20-M 病毒组, G20-D 病毒组, 每组 3 窝, 每窝 10~13 只乳鼠。病毒组乳鼠分别经脑内注射两个不同毒株(10^4 CCID_{50}), 对照组乳鼠注射 PBS, 于接种后 7 天之内观察乳鼠的食量变化、活动情况、精神状态、四肢麻痹、濒死或死亡等症状。对有明显病理特征的死亡乳鼠分别取其脑组织和肺组织置 10% 甲醛溶液中固定 3~5 天, 经脱水、石蜡包埋、切片、HE 染色、封固后, 显微镜下观察乳鼠脑组织病变情况。

1.7 动物免疫血清制备

使用纯化的两个病毒株($10^{6.5}$ CCID_{50}), 混合以弗氏不完全佐剂, 腹部皮下多点注射免疫, 同时以注射 PBS 作为对照组。按 0 和 4 周程序免疫小鼠, 2 次免疫后于尾部采血, 收集血清。

1.8 病毒基因的 PCR 及序列测定

病毒收获液及病变组织总 RNA 提取按 TIANGEN 公司 TRNzol-A⁺ 总 RNA 提取说明操作。

分别应用 Human coxsackievirus A16 strain KMM/08(gi330375630)的 5'端、3'端和 VP1 区设计引物, PCR 反应按照 TaKaRa 公司提供的 PremSTAR MAX Premix 说明进行操作。分别获得 3 个区域的 PCR 序列, 由北京 TIANGEN 公司对得到 G20-M 和 G20-D 3 个区段的 PCR 产物分别进行双向测序, 并应用 OMIGA 软件进行序列比对分析, 同样的方法进行 3 次重复测序。PCR 所用引物序列分别为:

G20 5'端非编码区引物: 5'-UNRf(1~23), 5'-TG-AAACAGCCTGTGCCTTGTTTC-3'; 5'-UNRr(835~856) 5'-TATGCATCCTTG TAGTAGTTTA-3'。

G20 3'端非编码区引物: 3'-UNRf(6981~7004), 5'-AGAACTGGTAAAGAGTATGGATTG-3'; 3'-UNRr(7397~7416), 5'-GCTATTCTGGTTATAACAAA-3'。

VP1 结构蛋白引物: VP1f(2320~2350), 5'-TGTC-GTACCCATTGGTGCTCCCACT-3'; VP1r(3440~3470),

5'-AGTGGTGGAAGAGACTAACAAGTCCCTAGA-3'.

定量 PCR: 反应体系及反应条件按 TaKaRa 公司 One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit 试剂盒说明书操作. 同时系列稀释 CA16 核酸标准品至 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 拷贝/ μ L 加入同一反应板中进行 PCR 反应. 利用 G20 株基因序列 VP1 保守区设计引物及探针为: Vp1f, 5'-CTAGTAGTCACAGATTAGGCACTGGTG-3'; Vp1r, 5'-CATTGTGATGATGCTGACAAGACC-3'; Probe(2411-2438), 5'-FAM-CGTCTAATGCTAGCGACAATAMRA-3'.

1.9 G20-M 和 G20-D 基因距离分析

从 GenBank 获取 9 株 CA16 病毒基因序列, 用于 G20-M 和 G20-D 5'端非编码区基因距离分析. 选择的每种毒株来自不同地方手足口病流行的代表株^[14-16].

应用 DNASTAR 中的 EditSeq 和 MegAlign 分析基因序列和绘制进化树.

1.10 数据处理

对 37℃ 和 39.5℃ 条件下 3 次重复实验的 G20-D 和 G20-M 的生长动力学数据进行统计分析, 其中 37℃ 条件下的数据采用非参检验, 感染性滴度检测的 P 值为 0.00, 定量 PCR 的 P 值为 0.0058, 39.5℃ 条件下的数据采用 t 检验分析, 得到 t 值为 -13.2873、 P 值为 0.00. 以上数据统计分析的 P 值均 <0.05 , 具有统计学意义.

2 结果

2.1 两株 CA16 病毒的分离及其生物学表型特征

在对来自中国大陆各地共 40 余株 CA16 病毒的初步分析中, 本研究对其中的 31 份适应了 Vero 细胞的样品做传代增殖. 在对这些毒株的基本生物学特性分析中, G20 株病毒具有明显高于其他毒株的增殖能力. 对这几株来自 Vero 细胞增殖一代后的病毒收获液进行蚀斑表型分析表明, 其中的 G20 株明显包括两个不同的表型株(图 1), 其中的一个毒株呈现为较大且不规则状态, 而另一个形态却较小(图 1). 对这两个表型不同的毒株分别挑取蚀斑各 10 个进行 5'端非编码区、3'端非编码区及 VP1 编码区进行序列分

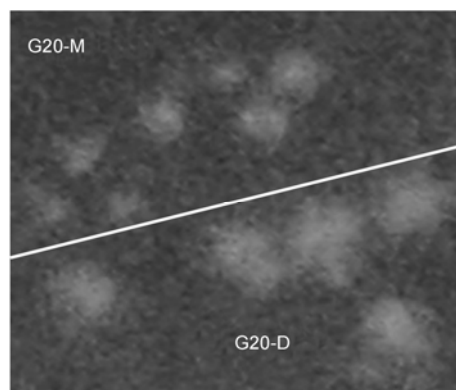


图 1 两个不同 CA16 毒株 G20-D 株和 G20-M 株的表型差异

G20-D 株(蚀斑较大)和 G20-M 株(蚀斑较小)蚀斑形态观察, 0.5%结晶紫染色

析, 结果表明它们属于两个有差异的毒株, 这两个毒株分别名为: G20-D 和 G20-M.

2.2 两个 CA16 毒株的生长动力学

基于上述的病毒分离及表型分析结果, 本研究将上述两个毒株的克隆, G20-D 和 G20-M 在 Vero 细胞上扩增后分别进行了相应的增殖动力学分析. 按同样的 MOI(0.05)接种 Vero 细胞并定时取样后进行感染性滴度测定表明, G20-D 株在 Vero 细胞上的增殖速度要快于 G20-M 株, 并形成了较后者在感染 24 h 以后高约一个对数值的差异(图 2A), 利用 qRT-PCR 检测进行的感染动力学分析也支持这一结果(图 2B). 同时, 为进一步确证这两个毒株增殖过程的差异与其生物学性状差异的关系, 本研究根据肠道病毒强弱毒株在较高培养温度具有增殖差异的现象^[17]对在 39.5℃ 条件下生长的两株病毒做了增殖动力学的观察, 结果表明, G-20M 毒株在 39.5℃ 条件下无明显增殖, 而 G-20D 株仍然呈明显增殖(图 2C).

2.3 两个毒株致乳鼠病理变化能力的比较

此前的研究表明 CA16 病毒具有相应的乳鼠致病能力^[18], 这种致病能力作为 CA16 病毒的表型特征^[16], 可以同时作为不同基因型或不同毒株之间的特性比较指标^[17]. 利用这一方法对 G20-D 和 G20-M 两个毒株进行比较, 可以为认识这两个毒株的生物学特性提供基础. 分别对新生乳鼠的脑内注射(10^4 CCID₅₀)两个不同毒株, 观察结果表明, G20-D 株具

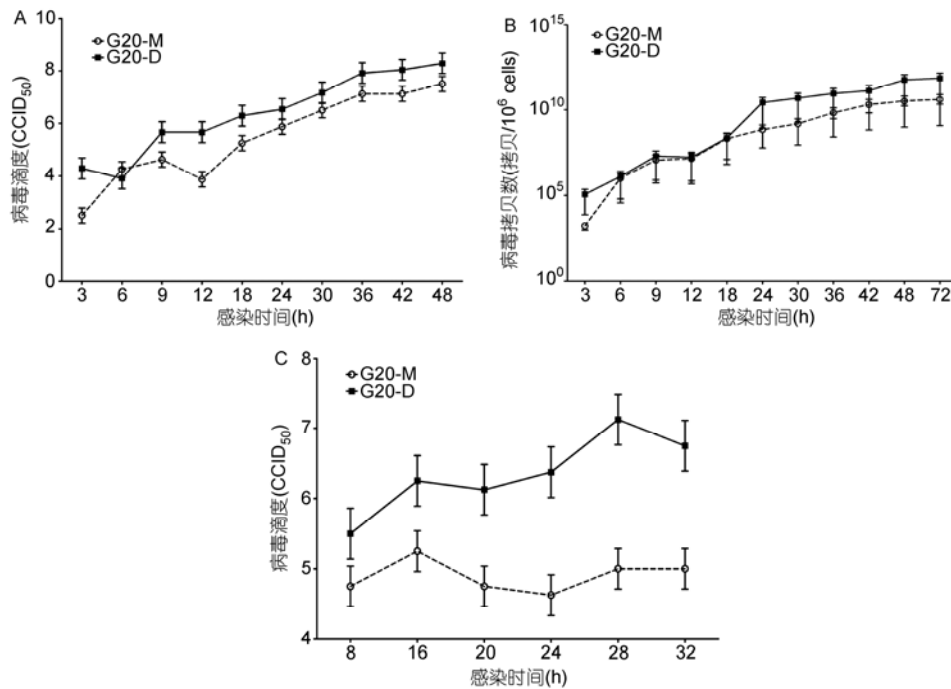


图2 G20-D和G20-M毒株在Vero细胞上的感染动力学比较

A: 37°C条件下, 在Vero细胞上G20-D和G20-M的生长动力学曲线(3次重复实验感染性滴度检测); B: 37°C条件下, 在Vero细胞上G20-D和G20-M的生长动力学曲线(3次重复实验定量PCR检测); C: 39.5°C条件下, 在Vero细胞上G20-D和G20-M的生长动力学曲线(3次重复实验感染性滴度检测)。以MOI=0.05病毒感染Vero细胞, 不同时间点收集病毒液样品, 检测病毒滴度或病毒拷贝数, 绘制病毒生长动力学曲线

有较强的乳鼠致病能力, 注射后7天内的乳鼠死亡率超过50%(图3A)。相比较G20-D毒株, G20-M毒株仅表现了低于5%的致死率(图3A)。这些死亡乳鼠通常都首先表现为动物的后肢麻痹, 继而在1天之内死亡。对此病理改变的进一步组织学检查表明, G20-D株的感染可以引起乳鼠脑组织中的胶质细胞溶解、胞核破裂、脑室内出血、胶质小结的形成(图3B和C)。该毒株对乳鼠脑内的感染还可以引起动物肺部的明显组织病变, 其包括肺泡腔的肿胀出血, 以及肺泡组织的破坏(图3D和E)。为确证这些病变与病毒感染相关的病毒检测(病毒滴度测定和定量PCR检测)表明, G20-D株感染乳鼠的脑内病变出血伴有病毒的增殖(图3F), 表现有肺部充血、肺泡出血的组织中有 $10^{1.5}$ CCID₅₀的病毒存在(图3F)。相较而言, 在3窝感染G20-M乳鼠中(10~13只/窝)仅出现了2只乳鼠的死亡。对这2只乳鼠的脑部组织及肺部组织的病理学检查仅发现脑部组织的轻度炎性细胞聚集和肺泡壁轻度充血及少量炎细胞浸润(图3G和H), 同时, 脑内组织有 $10^{2.5}$ CCID₅₀病毒存在, 而肺组织中未检出

病毒(图3I)。这些结果表明, 两个毒株的致动物病变的能力特性有较大的差异。

2.4 两个毒株的免疫原性及其诱导抗体的交叉中和能力

为了进一步了解G20-D和G20-M两个毒株的生物学表型特征, 本研究使用纯化的同样剂量的病毒($10^{6.5}$ CCID₅₀), 混合以弗氏不完全佐剂, 肌肉注射并按0和4周程序免疫小鼠, 2次免疫后取血清, 使用100 CCID₅₀病毒剂量分别测定血清中和效价, 结果表明, 这两个病毒株诱导的中和抗体, 在分别针对本毒株病毒时表现出不同的效价, 但在以同样效价相互中和两个毒株时, 则表现更为明显的差别。其中, G20-D株病毒诱导的中和抗体, 在针对同样为100 CCID₅₀剂量的G20-D和G20-M株病毒时, 在对前者表现为1:16的中和效价之时, 对后者则表现为1:512的中和效价。同时, G20-M株所诱导的中和抗体, 在对其本株表现为1:16中和效价时, 对G20-D株亦表现为1:8的中和效价。这些结果表明, 两个毒株具有

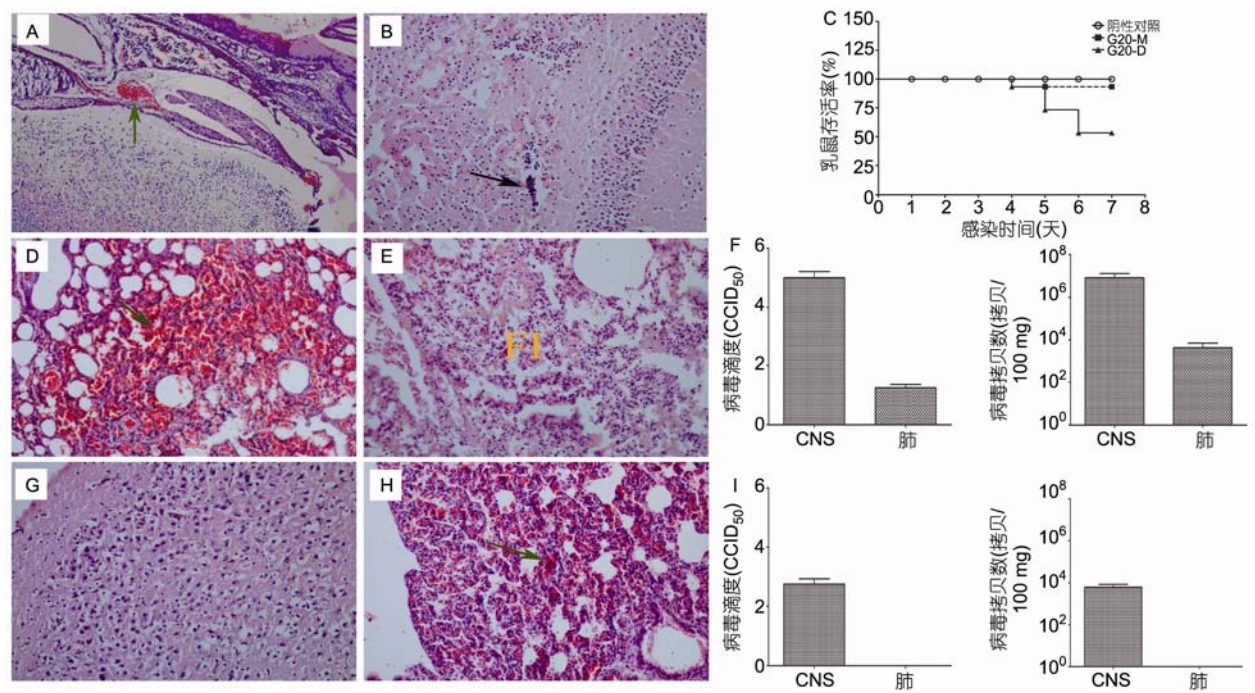


图3 G20-D和G20-M致乳鼠病变效应的分析

A, B: G20-D株致乳鼠脑组织病理改变(200×), 脑室出血(绿色箭头), 胶质小结形成(黑色箭头); C: G20-D和G20-M致乳鼠死亡率的比较; D, E: G20-D株致乳鼠肺部组织病理改变(200×), 肺泡壁、腔充血、出血(绿色箭头), 肺泡组织轻度自溶(FI); F: G20-D株致死乳鼠的脑组织和肺组织中病毒滴度检测, 分别应用感染性滴度和定量PCR的方法对30只致死乳鼠脑组织和肺组织进行病毒滴度检测、绘图; G: G20-M株致乳鼠脑组织病理改变(200×), 轻度炎性细胞聚集; H: G20-M株致乳鼠肺组织病理改变(200×), 肺泡壁轻度充血及少量炎细胞浸润(绿色箭头); I: G20-M株致死乳鼠的脑组织和肺组织中病毒滴度检测, 分别取2只致死乳鼠脑组织和肺组织进行病毒滴度检测、绘图。B~E, G和H为HE染色结果

免疫原性的明显差别。

2.5 两个不同表型病毒的基因序列比较

基于对G20-D和G20-M株病毒不同生物学特性的分析, 根据肠道病毒生物学特性与其基因序列相关的基本原则^[19~21], 重点以这两株病毒5'端非编码区和3'端非编码区及VP1编码区基因做了3次重复测序并进行序列比较(图4A)。分别对两个病毒株3个基因区域的比较表明, 二者在3个区域中, 均存在个别核苷酸的差异。首先, 在5'端非编码区, 两个毒株出现了7个碱基的差异(图4A), 其中第33位, G20-D株表现为A而G20-M株为G, 第35位亦是同样的差异, 第36位G20-D株为T而G20-M株为G; 第37位G20-D株为T而G20-M株为A; 第44位, 则G20-D株出现了一个碱基缺失; 第110位G20-D株为T而G20-M株为C; 在第112位G20-D株为C而G20-M

株为T。另外, 在3'端非编码区的测序比较中, 观察到3个核苷酸变异(图4A), 包括第52位处, G20-D株为C而G20-M株为G; 第90位G20-D株出现了一个核苷酸的缺失; 另外, 在第312位的差异为G20-D株表现为T而G20-M株为C。在VP1编码区基因序列分析中, 两个毒株出现的差异导致了3个氨基酸的差异(图4A), 它们分别为: 第98位G20-D为M而G20-M株为T; 第240位G20-D为T而G20-M株为I; 第248位G20-D为T, 而G20-M株为A。这些位于编码区及非编码区中的基因位点的差异(图4A)表明, 两个毒株之间的生物学特性差别具有其基因结构上的基础, 同时为进一步确定不同毒株所表现的增殖效率、动物致病能力、免疫原性等症状的相关基因决定位点提供了研究线索。利用VP1和5'端非编码区绘制的进化树提示, 尽管两株病毒出现了一定的差异, 但仍属B基因型中的不同基因亚型(图4B和C)。

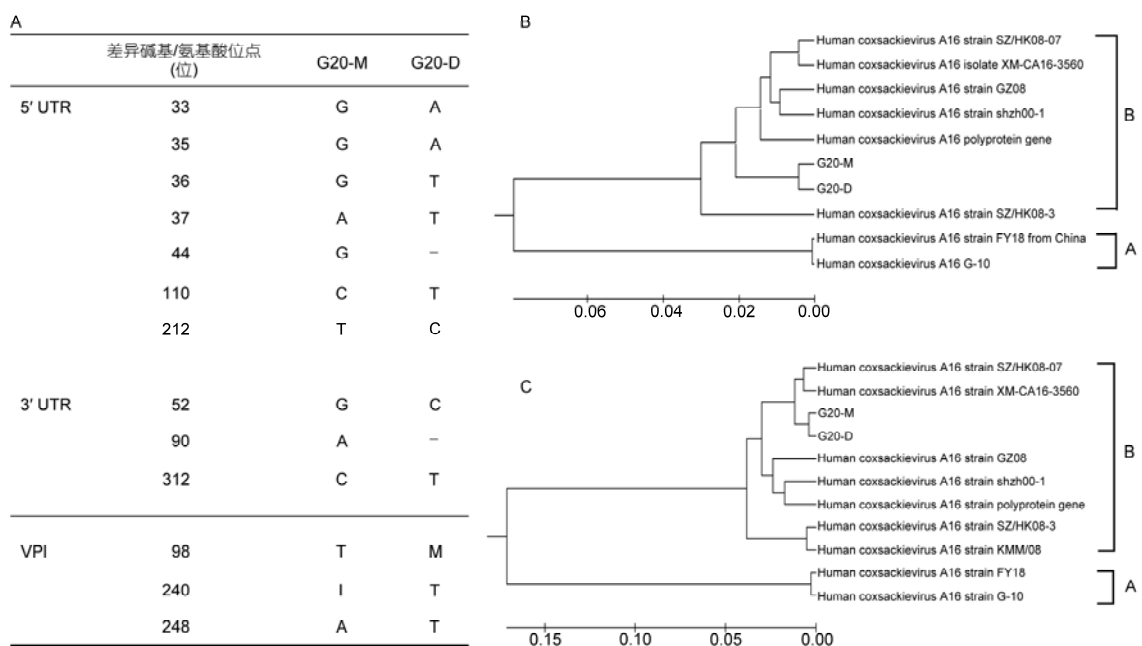


图 4 G20-D 和 G20-M 两个毒株 5'端、3'端及 VP1 编码区域的基因序列比较

A: G20-M 和 G20-D 在 5'端非编码区、3'端非编码区核酸序列差异位点比较以及 VP1 结构蛋白氨基酸差异位点比较(3 次独立的重复实验分别对两个毒株每个区域进行 3 次测序和比对得到相同的差异位点); B: G20-M 和 G20-D 进化距离分析. 基于 CA16 5'端非编码区核酸序列绘制; C: G20-M 和 G20-D 进化距离分析用. 基于 CA6 VP1 核酸序列绘制

3 讨论

先前有关肠道病毒的研究已表明, 作为肠道病毒的 CA16 病毒是对人类具有致病能力的病原^[22,23], 它可以引起包括疱疹性咽峡炎、HFMD 和某些情况下的病毒性脑炎^[12,24]. 该病毒具有 3 个基因型 A、B 和 C^[9]. 在相关的流行病学分析中认为, 中国大陆目前主要以 B 基因型为主^[16]. 在近年来的分析中, CA16 作为与 EV71 共同引起 HFMD 大规模流行的病原受到了进一步的关注^[25,26]. 多数报道认为, CA16 所引起的 HFMD 表现为较普通的以手足口疱疹和类感冒症状为主的轻症^[27], 但亦有报道认为, CA16 能够引起一些重症病例, 其主要表现为神经系统的症状, 但其感染及其病理后果的机理尚不清楚^[28]. 因此, 首先从病原学角度探讨 CA16 不同毒株的生物学性状的差异, 则有可能为了解该病毒感染所致疾病的差异, 及其病理学机理提供线索.

本文描述的工作中所分离到的两个有差异的毒株来自同一病人的咽拭子分泌物, 尽管观察基于病毒仅在 Vero 细胞增殖 2 代的生物学特性, 但这两株

病毒的来源仍存在其因来自同一感染个体或是在体外增殖时所出现的基因突变的两种可能性. 虽然还未能证明这两种可能性及其相关的感染生物学机理, 但对两个毒株的全面比较仍可表明, CA16 即使在同一基因型内亦存在其生物学性状差别较大的毒株, 这些差异至少在 5'端和 3'端非编码区及 VP1 编码区的特定位点具有基因结构的基础, 这些差异首先表现在二者之间在 Vero 细胞上的增殖动力学差异, 以往的资料提示, 肠道病毒基因的 5'端及 3'端非编码区的特定序列元件对病毒的增殖具有明确的调控意义, 有关脊灰病毒的研究表明, 其 5'端非编码区的第 480 位核苷酸的变化可以直接影响病毒致病能力, 尤其是神经毒力^[29]. 本实验中 G20-D 株在 5'端非编码区的 7 个碱基及 3'端非编码区的 3 个碱基与 G20-M 株的差异和以往类似的报道不尽相同. 其是否作为 CA16 病毒基因组中影响及调控病毒增殖效率的主要元件虽然尚不能确定, 但本实验的结果为进一步的研究提供了明确的线索. 另外, 两个毒株免疫原性的差异及其在 VP1 编码区中特定位点的变化, 为进一步的 CA16 病毒的免疫原性研究及其基因控制位点的

研究提供了基础. 对这些基因序列变化的观察表明, 这些差异很可能导致了病毒对动物病理损伤产生的明显差别, G20-D 株在脑内注射感染乳鼠时, 不仅可以使脑内的神经组织产生明显的神经细胞损伤、胶质小结的形成, 因此导致乳鼠的后肢麻痹, 同时在感染过程中, 还能引起乳鼠肺部组织的充血水肿, 使得肺泡腔为分泌液所充满而丧失其功能. 虽然从病理检查中尚不能确定乳鼠死亡的直接原因, 但肺泡严重充血水肿的病理状况, 显然是不能忽视的因素, 而脑组织和肺部组织的病毒检查提示后者仅见较低的病毒载量, 则使我们联系到 CA16 及 EV71 感染所致的重症 HFMD 病人所表现的直接死因—神经源性肺水肿及心肺功能丧失^[30]. 如果这样一种逻辑上的联系

可以得到肯定的话, 那么, 从病原学的角度认识 CA16 在感染并引起人体 HFMD 所出现的轻度和重度病理表现的原因就应该是可能的. 基于这种可能性, 可以为进一步认识 CA16 感染流行病学中无明显规律的血清抗体反应的原因提供病原学依据, 同时, 也能由此探讨 CA16 疫苗的应用方式. 更有意义的是, 在这项工作中所观察到的这两个毒株的生物学性状, 很可能是具有二者的基因序列比较所提供的结构差异具有相关性, 尽管还不能确定具体基因位点与相关症状变化的直接联系, 但这些资料已提供了下一步工作的线索. 利用突变体定位 CA16 生物学性状, 尤其是其致动物病理改变特征的相关基因位点的工作已在进行.

参考文献

- 1 Chan L G, Parashar U D, Lye M S, et al. Deaths of children during an outbreak of hand, foot, and mouth disease in Sarawak, Malaysia: clinical and pathological characteristics of the disease. *Clin Infect Dis*, 2000, 31: 678
- 2 Shimizu H, Utama A, Yoshii K, et al. Enterovirus 71 from fatal and nonfatal cases of hand, foot and mouth disease epidemics in Malaysia, Japan and Taiwan in 1997–1998. *Jpn J Infect Dis*, 1999, 52: 12
- 3 Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Deaths among children during an outbreak of hand, foot, and mouth disease—Taiwan, Republic of China, April–July 1998. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 1998, 47: 629–632
- 4 王利花, 李军. 手足口病的流行病学及病原学研究进展. *中国卫生事业管理*, 2010, 6: 419–421
- 5 孙军玲, 张静. 手足口病流行病学研究进展. *中华流行病学杂志*, 2009, 9: 973–976
- 6 Chan K P, Goh K T, Chong C Y, et al. Epidemic hand, foot and mouth disease caused by human enterovirus 71, Singapore. *Emerg Infect Dis*, 2003, 9: 78
- 7 Wang Z G, Liu X L, Yang T T, et al. Etiology of hand, foot and mouth disease in Qingdao during 2008–2009. *Chin J Virol*, 2011, 27: 438
- 8 贾蕾, 赵成松, 张莉, 等. 肠道病毒 71 型和柯萨奇病毒 A 组 16 型感染的手足口患儿的相关特征对比研究. *中国当代儿科杂志*, 2011: 635–637
- 9 Li L, He Y, Yang H, et al. Genetic characteristics of human enterovirus 71 and coxsackievirus A16 circulating from 1999 to 2004 in Shenzhen, People's Republic of China. *J Clin Microbiol*, 2005, 43: 3835
- 10 Zhang Y, Cui W, Liu L, et al. Pathogenesis study of enterovirus 71 infection in rhesus monkeys. *Lab Invest*, 2011, 91: 1337–1350
- 11 杨智宏, 朱启镭, 李秀珠. 2002 年上海儿童手足口病病例中肠道病毒 71 型和柯萨奇病毒 A 组 16 型的调查. *中华儿科杂志*, 2005, 43: 648–652
- 12 Chang L Y, Lin T Y, Huang Y H, et al. Comparison of enterovirus 71 and coxsackievirus A16 clinical illnesses during the Taiwan enterovirus epidemic, 1998. *Pediatr Infect Dis J*, 1999, 18: 1092
- 13 Li R, He H, Zhao X. Etiology analysis and the clinical characteristics of 1073 children with hand-foot-mouth disease. *Beijing Med J*, 2011, 09
- 14 Ma S H, Chen J Y, Li H, et al. Genetic characters of Coxsackievirus A16 strain in 2009 in Kunming Region, Yunnan Province, China. *Chin J Biol*, 2012, 2: 9–12
- 15 Yip C C Y, Lau S K P, Zhou B, et al. Emergence of enterovirus 71 “double-recombinant” strains belonging to a novel genotype D originating from southern China: first evidence for combination of intratypic and intertypic recombination events in EV71. *Arch Virol*, 2010, 155: 1413–1424
- 16 Zong W, He Y, Yu S, et al. Molecular Phylogeny of Coxsackievirus A16 in Shenzhen during 2005–2009. *J Clin Microbiol*, 2011, 4: 1659
- 17 Liu Y X. Proliferation dynamics research of EV71 different strains in different temperature condition. Dissertation for Doctoral Degree. Kunming: Kunming Medical University, 2010
- 18 Dai G Z. Coxsackievirus. *Microbiology*, 1977, 4: 49–51

- 19 Puenpa J, Theamboonlers A, Korkong S, et al. Molecular characterization and complete genome analysis of human enterovirus 71 and coxsackievirus A16 from children with hand, foot and mouth disease in Thailand during 2008–2011. *Arch Virol*, 2011: 1–7
- 20 Zhou F, Kong F, Wang B, et al. Molecular characterization of enterovirus 71 and coxsackievirus A16 using the 5' untranslated region and VP1 region. *J Med Microbiol*, 2011, 60: 349–358
- 21 Brown B, Oberste M S, Maher K, et al. Complete genomic sequencing shows that polioviruses and members of human enterovirus species C are closely related in the noncapsid coding region. *J Virol*, 2003, 77: 8973–8984
- 22 Kadurugamuwa J L, Shaheen E. Inactivation of human enterovirus 71 and coxsackie virus A16 and hand, foot, and mouth disease. *American J Infect Control*, 2011, 39: 788–789
- 23 Yang F, Zhang T, Hu Y, et al. Survey of enterovirus infections from hand, foot and mouth disease outbreak in China, 2009. *Virol J*, 2011, 8: 508
- 24 Goto K, Sanefuji M, Kusuhara K, et al. Rhombencephalitis and coxsackievirus A16. *Emerg Infect Dis*, 2009, 15: 1689
- 25 Tan E L, Tak Kwong Chow V, Quak S H, et al. Development of multiplex real-time hybridization probe reverse transcriptase polymerase chain reaction for specific detection and differentiation of Enterovirus 71 and Coxsackievirus A16. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2008, 61: 294–301
- 26 Zhao K, Han X, Wang G, et al. Circulating coxsackievirus A16 identified as recombinant type A human enterovirus, China. *Emerg Infect Dis*, 2011, 17: 1537–1540
- 27 Ang L W, Koh B K W, Chan K P, et al. Epidemiology and control of hand, foot and mouth disease in Singapore. *Ann Acad Med Singapore*, 2009, 38: 106–112
- 28 Wang C Y, Li Lu F, Wu M H, et al. Fatal coxsackievirus A16 infection. *Pediatr Infect Dis J*, 2004, 23: 275
- 29 Kawamura N, Kohara M, Abe S, et al. Determinants in the 5'noncoding region of poliovirus Sabin 1 RNA that influence the attenuation phenotype. *J Virol*, 1989, 63: 1302
- 30 易容松. 重症手足口病合并脑炎 9 例临床分析. *右江民族医学院学报*, 2009, 31: 66–67
- 31 Yang Z H, Zhu Q R, Li X Z. Detection of enterovirus 71 and coxsackievirus A16 from children with hand, foot and mouth disease in Shanghai, 2002. *Chin J Pediatr*, 2005, 43: 648–652