[J]. Anaerobe, 2016, 9(2): 78-80.
[11] NAGY E. Anaerobic infections: update on treatment considerations[J]. Drugs, 2010, 70(7): 841-858.
[12] BROOK I. Spectrum and treatment of anaerobic infections[J]. J Infect Chemother, 2016, 22(1): 1-13.
[13] MADSEN I R, JUSTESEN U S. Bacteremia with Bacteroides pyogenes after a cat bite[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(8): 3092-3093.

(收稿日期: 2020-09-02　修回日期: 2020-12-23)

·个案分析·

1 株人感染柯萨奇病毒 A 组 16 型 B1b 亚型的分离和鉴定*

杜加亮, 刘　艳, 于晴川, 张　永, 赵荣荣, 赵　岩, 韩　菲, 刘悦越△
中国食品药品检定研究院, 北京 102629

关键词: 柯萨奇病毒;　手足口病;　乳鼠;　RD 细胞
DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2021.10.029　　**中图法分类号**: R446.5
文章编号: 1673-4130(2021)10-1276-05　　**文献标志码**: C

柯萨奇病毒 A16(CV-A16)是小 RNA 病毒科肠道病毒属的成员, 是引起婴幼儿手足口病(HFMD)的常见病原体之一[1]。CV-A16 是含有约 7.4 kb 基因组的正义单链 RNA 病毒, 其基因组包含 5′端非翻译区(5′UTR)、结构蛋白编码区 P1、非结构蛋白编码区 P2/P3 及 3′非翻译区(3′UTR)。P1 编码 4 种结构蛋白(VP1、VP2、VP3、VP4), P2 和 P3 分别编码 7 种非结构蛋白(2A、2B、2C、3A、3B、3C、3D)[2]。随着研究的不断深入, 在分子流行病学方面, 基于 VP1 基因的完整序列, CV-A16 可以在系统发育上分为 A、B、C 和 D 4 个基因组[3-6]。基因组 B 可以进一步分为 B1～B4 这 4 个基因亚型, 其中 B1 基因亚型还可以细分为 B1a～B1d[3,7]。在基础研究方面, 利用反向遗传学技术构建感染性克隆[8], 能够在体外对病毒基因组进行突变、缺失、嵌合等操作后, 获得表型、性状发生变化的拯救病毒, 为研究其基因的结构与功能、病毒复制机制、致病机制及筛选候选疫苗提供了崭新的途径。在疾病预防控制方面, 单价肠道病毒 71 型(EV-A71)疫苗无法预防其他病原体引起的 HFMD 及其他相关疾病, 应研发多价 HFMD 疫苗[9], 而 EV-A71 和 CV-A16 交替或共同流行可引发世界多个国家或地区 HFMD 暴发。本研究从 CV-A16 的分离、鉴定、系统进化分析、检测方法建立和全基因组克隆构建等方面进行了一系列研究, 以期为 CV-A16 病毒的分子流行病学和基础研究提供有利的工具。

1　材料与方法

1.1　细胞　RD 细胞为人恶性胚胎横纹肌瘤细胞, 为本实验室保存。细胞培养液为含有 1%(v/v)L-谷氨酰胺(200 mmol/L)、2.5%(v/v)$NaHCO_3$ 溶液(7.5%)、10%(v/v)胎牛血清和 1%(v/v)双抗的 Gibco D-MEM 培养液。

1.2　材料　一步法荧光定量 PCR 试剂盒(RR064)和一步法反转录 PCR(RT-PCR)试剂(RR057)购自 TaKaRa 公司, QIAamp Viral RNA Mini 试剂盒购自 QIAGEN 公司。粪便处理液为含有终浓度为 500 U/mL 青霉素和 500 μg/mL 链霉素的磷酸盐缓冲液(PBS)。

1.3　病毒分离　粪便标本来源于临床诊断为 HFMD 和实验室诊断为 CV-A16 感染的患者。取粪便标本 1 g 加入 10 mL 粪便处理液中, 涡旋混匀 30 s, 4 000 r/min 离心 30 min, 取上清, 除菌过滤后接种于 RD 细胞。在倒置显微镜下每日观察细胞病变情况, 7 d 后观察若未出现细胞病变, 盲传两代, 直至出现超过 75%的细胞病变后, 将其在—70 ℃以下冻存。

1.4　分离毒株的分子生物学鉴定　步骤 1.3 中的冻存液反复冻融 3 次后, 吸取 200 μL, 按照 QIAamp Viral RNA Mini 试剂盒说明书的步骤提取病毒 RNA。按照一步法反转录 PCR 试剂(RR057)说明书, 利用 CV-A16 特异性引物 CA-VP1-F 和 CA-VP1-R(终浓度均为 10 μmol/L), 进行一步法反转录 PCR 扩增 VP1 基因(反应条件为 94 ℃预变性 5 min; 94 ℃变性 30 s、50 ℃退火 30 s、72 ℃延伸 1 min、35 个循环; 72 ℃充分延伸 7 min), 探针引物信息见表 1。目的条带经 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定后测序验证, 并参照文献与 GenBank 中的已知基因型和亚型的毒株序列进行比对, 利用 Mega 软件构建 Neighbour-joining 系统进化树。

1.5　病毒滴度检测　将长成致密单层的 Vero 细胞

*　**基金项目**: 国家科技重大专项(2018ZX09739-002)。
△　**通信作者**, E-mail: yyliu@nifdc.org.cn。
本文引用格式: 杜加亮, 刘艳, 于晴川, 等. 1 株人感染柯萨奇病毒 A 组 16 型 B1b 亚型的分离和鉴定[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(10): 1276-1280.

用 0.25%胰蛋白酶消化，制成浓度为 2×10^5/mL 的细胞悬液备用；同时将待测病毒进行 10 倍系列稀释，取稀释度为 $10^{-10}\sim10^{-3}$ 的病毒液按每孔 50 μL 接种细胞，每个稀释度设置 8 个复孔；然后立即将细胞悬液按每孔 50 μL 加入 96 孔板；同时设置细胞对照（100 μL 细胞悬液＋100 μL 病毒稀释液），36 ℃培养 7 d 后观察细胞病变。以能使细胞发生病变的病毒最高稀释度作为终点。在显微镜下观察到细胞病变记为“＋”，否则记为“－”。按 Behrens-KÄrber 公式计算出分离病毒株的病毒滴度（log CCID50）＝L—d（S—0.5），其中：L＝实验中使用的最低稀释度的 log 值；d＝稀释梯度的 log 值；S＝终判时阳性部分的总和（即出现 CPE 的细胞孔所占的比例之和）。

1.6　分离毒株对乳鼠的致病性　将增殖后的病毒悬液反复冻融 3 次，然后在 4 ℃、12 000 r/min 条件下离心 10 min，取上清液。实验用 7 d 龄 Balb/c 乳鼠由中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所提供，同时设实验组和对照组，5 只/组，实验组注射病毒液 20 μL（100 CCID50），对照组注射等量培养液，颅内注射，逐日观察并记录乳鼠发病情况。

1.7　全基因组克隆构建　参照步骤 1.4 中的方法提取病毒 RNA，利用分片段引物（见表 1），扩增全长基因。目的条带经 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定回收后，与 pEASY-T3 载体连接。转化 DH5α 大肠埃希菌感受态后，经过蓝白斑筛选、酶切鉴定和测序验证，提交 GenBank。根据全长序列酶切位点分析，选择合适的酶切位点将全长序列分两段扩增克隆至 pVAX 载体，构建全基因组克隆，酶切鉴定和测序验证。

1.8　检测方法建立

1.8.1　RT-PCR 方法建立　针对 VP1 设计引物探针，见表 1，设计一步法 RT-PCR。1× Taqman universal master mix Ⅱ 25 μL；CA-F（20 μmol/L）、CA-R（20 μmol/L）和 CA-P（20 μmol/L）各 5 μL，RNA 5 μL；反应条件：50 ℃ 2 min；95 ℃ 10 min；95 ℃ 15 s，55 ℃ 1 min；40 个循环。

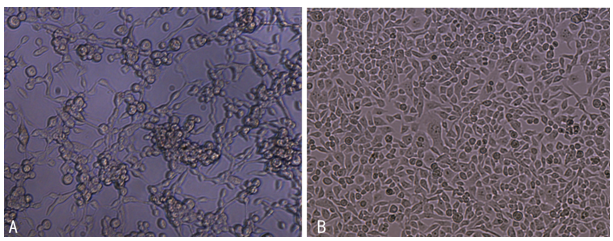
1.8.2　质粒参考品制备　将 VP1 编码基因克隆入 pEASY-T3 载体作为质粒参考品。质粒纯度符合要求吸光度（A）$_{260/280}$ 为 1.8～2.0）后作为备用参考品原液。质粒拷贝数（copy/μL）按照以下公式计算：$(6.02\times10^{23})\times$（质粒浓度 ng/μL$\times10^{-9}$）/（质粒长度 bp$\times$660）。本研究中使用稀释至 10^6、10^5、10^4、10^3、10^2 copy/μL 的质粒作为参考品。

表 1　探针引物信息

名称	碱基序列（5′—3′）	位置	长度（bp）	作用
CV-A16-F1	TTAAAACAGCCTGTGGGTTGT	1-21	1 425	全长扩增
CV-A16-R1	GCACCAACCTGACCAGGCTG	1406-1425	1 425	全长扩增
CV-A16-F2	GCTCAGTTCCACTACCTGTAT	1238-1258	1 905	全长扩增
CV-A16-R2	GATGCTAAAAGTGCCCATCAT	3122-3142	1 905	全长扩增
CV-A16-F3	ACCCGCCAGCTCAAGTGTCAG	2994-3014	1 832	全长扩增
CV-A16-R3	CACCTCTATATCGCAGTCCAT	4805-4825	1 832	全长扩增
CV-A16-F4	AGAGAAAGGAGTGTCTTTCAC	4696-4716	1 495	全长扩增
CV-A16-R4	TAGCTGGTTTGCATAGTGGAG	6170-6190	1 495	全长扩增
CV-A16-F5	ATTCTATGATGTGTTTGAGGG	6022-6042	1 385	全长扩增
CV-A16-R5	GCTATTCTGGTTATAACAAAT	7386-7406	1 385	全长扩增
CV-A16-1	GCGTTTAAACTTAAAACAGCCTGTGGGT（PmeI）	1-18	3 631	全基因组克隆构建
CV-A16-3631	AGCAAGCATGAGATGGGATTGATAT	3607-3631	3 631	全基因组克隆构建
CV-A16-3575	TTTGTGGGAGCTAGTGAGTATTACC	3575-3599	3 857	全基因组克隆构建
CV-A16-7406	GGGCGGCCGCTTTTTTTTTTTTTTTGC-TATTCTGGTTATAACAAA（NotI）	7387-7406	3 857	全基因组克隆构建
CA-VP1-F	GGGGATCCTATTGCAGATATG	2441-2461	891	质粒参考品
CA-VP1-R	TCCCAATGTTGTTATCTTGTC	3311-3331	891	质粒参考品
CA-F	TCGCTCCTTGACTGCGTTGC	2491-2510	107	检测方法建立
CA-R	CTGTCTCCGCAGCTTGTAGTGC	2576-2597	107	检测方法建立
CA-P	FAM-CAAGTACTGCCTACAGCTGCCAACACTG-TAMARA	2509-2537	107	检测方法建立

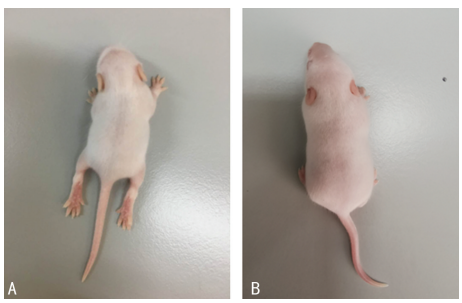
2　结　　果

2.1　人感染 CV-A16 分离株的生物学特征　成功地从 HFMD 患者的粪便标本中分离到 1 株 CV-A16(BJ1208)。该病毒在 RD 细胞中培养时可以观察到明显的致细胞病变现象，见图 1；在 RD 细胞增殖后的病毒滴度为 6.8 log CCID 50/mL；以 100 CCID50(20 μL)的病毒量在 Balb/c 乳鼠颅内注射后可以观察到典型的后肢瘫痪症状，见图 2。



注：A 为人感染 CV-A16 接种 RD 细胞；B 为细胞对照。

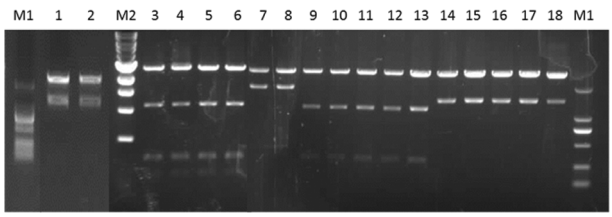
图 1　人感染 CV-A16 分离株在 RD 细胞上的细胞病变现象(×10)



注：A 为人感染 CV-A16 感染小鼠；B 为正常小鼠对照。

图 2　Balb/c 小鼠注射人感染 CV-A16 分离株后的肢瘫痪症状

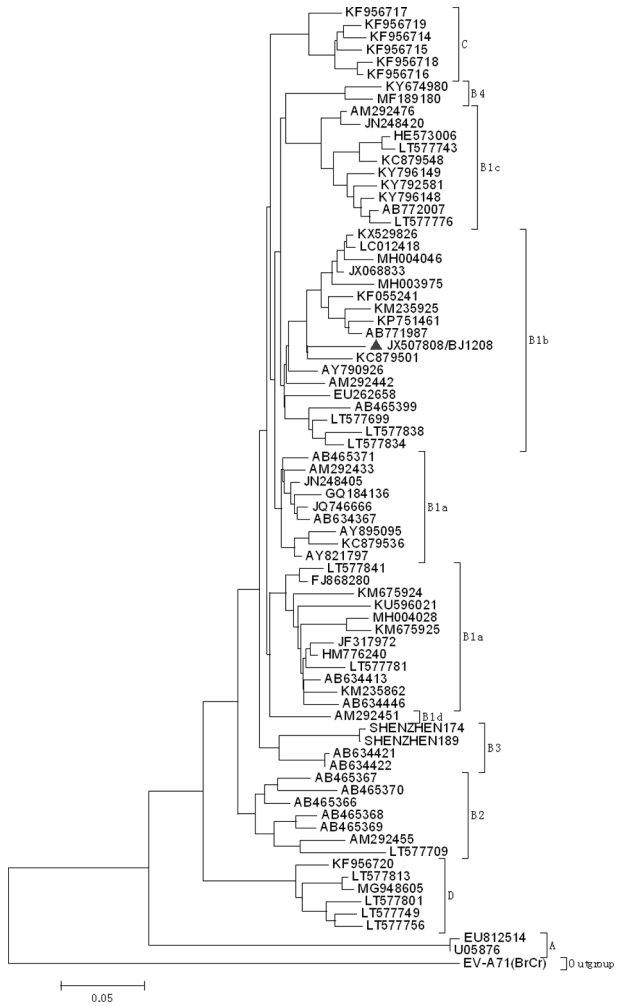
2.2　人感染 CV-A16 分离株的分子生物学特征　分段扩增(图 3)测序后拼接获得该病毒的完整基因组序列(GenBank Accession No.：JX507808)，全长 7 406 bp，包括 745 bp 的 5′UTR、6 579 bp 的蛋白编码区(编码 2 193 个氨基酸)及 82 bp 的 3′UTR。根据 CV-A16 VP1 序列构建的系统进化树显示，该病毒分离株为 B1b 亚型，且与俄罗斯 2007 年分离株(KC879501)具有最近的亲缘关系，见图 4。但是与其他病毒相比，明显不同的是该分离株在 VP1 编码蛋白中(688～690 bp 处)缺少一个蛋氨酸，见图 5。但从其生物学特征来看，该缺失并不影响病毒复制和感染能力。



注：M1 为 DL2000 DNA 标记物；M2 为 1 kb ladder；泳道 1-2、3-6、7-8、9-13、14-18 分别是 CV-A16 F1～F5 5 个 PCR 扩增片段 TA 克隆的酶切鉴定结果。

图 3　CV-A16 BJ1208 全基因组分段扩增片段 TA 克隆的酶切鉴定结果

2.3　全基因组克隆构建　对全基因组进行酶切位点分析，利用一个单酶切位点(EcoR V)及基因组中未含有的两个酶切位点(Pme I 和 Not I)，将基因组分成两个片段依次扩增克隆和连接至载体 pVAX1 中，构建全基因组克隆 pVAX1-CA16。经酶切(Pme I＋EcoR V)(约 3.6 和 6.9 kb 两个片段，见图 6)和测序验证了基因组克隆后未发生基因突变。



注：▲表示本研究中的病毒分离株 BJ1208。

图 4　进化树分析

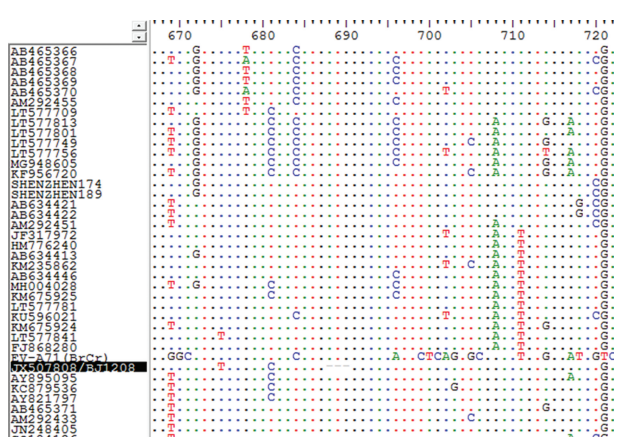
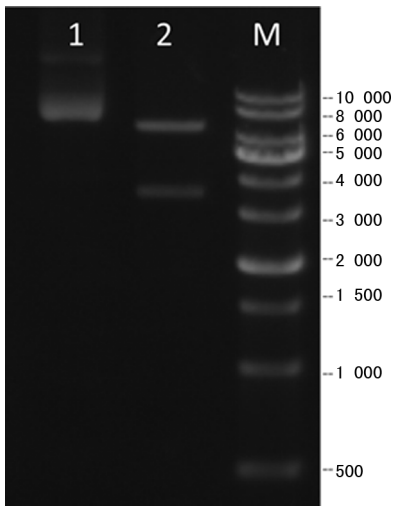


图 5　CV-A16 BJ1208 VP1 编码区核苷酸比较(部分)

2.4　检测方法　由 4 次重复检测结果可见，质粒标准品的浓度对数与循环阈值(Ct 值)在 10^2～10^6 cop-

y/μL 呈现明显的线性相关($Y=-1.602\ \ln(X)+36.873$, $R^2=0.999\ 9$),可用作该毒株的定性检测和病毒增殖滴度定量检测。



注:1 为未酶切质粒对照;2 为质粒经 Pme I+EcoR V 双酶切;M 为 DNA 标记物。

图 6　酶切鉴定电泳图

3　讨　论

本研究成功从 HFMD 患者的粪便标本中分离到 1 株在体内(Balb/c 乳鼠)和体外(RD 细胞)均具有典型生物学特征的 B1b 亚型 CV-A16(BJ1208)病毒。建立了一套从病毒分离、鉴定、系统进化分析、全基因组扩增和克隆到荧光定量检测方法建立的技术平台,为该类病毒的后续研究提供了参考。

虽然 CV-A6、CV-A10 等病原体在亚洲、美洲和欧洲逐渐取代 EV-A71 和 CV-A16 成为引起 HFMD 暴发或流行的主要病原体,但是传统的病原体仍然不能被忽视[10]。CV-A16 感染可导致多种疾病,从轻度 HFMD、疱疹性咽峡炎、上下呼吸道疾病到严重并发症,如脑炎、瘫痪、脊髓炎、脑膜炎,甚至死亡。CV-A16 的基因型和基因亚型众多,但是型别与疾病严重程度之间的关系尚不十分明确。CV-A16 病毒 B1b 亚型在我国多个省份均有报道[11],并且田晓灵等[12]发现内蒙古自治区不同临床症状患者中分离出的 CV-A16 代表株在分子基因型/基因亚型及亲缘进化关系树分布上虽无明显差异,但大部分的重症病例和死亡病例感染病毒都分布在 B1b 分支中。本研究中分离到的 B1b 亚型 CV-A16(BJ1208)病毒来源于重症患者的粪便标本,这提示在疾病监测过程中应重视收集基因型/亚型与疾病严重程度的关系数据,为疾病的治疗及疫苗毒株的选择提供依据。

通常认为,CV-A16 的 VP1 编码区氨基酸序列相对于其他肠道病毒较为保守,且与其抗原性密切相关[13]。因此,这一区域发生的氨基酸特性改变可能对蛋白质空间结构有一定的影响,从而导致毒力的改变[14-17]。本研究中的分离株 BJ1208 虽然在 VP1 编码蛋白中(688～690 bp 处)缺少一个蛋氨酸。但从其生物学特征和临床来看,该缺失并不影响病毒复制和感染能力。得益于反向遗传操作技术的成功应用,可以从基因型的改变来研究表型的变化。以往研究多是利用 T7 聚合酶系统以线性化的重组质粒为模板进行体外转录反应得到 CA16 病毒基因组 RNA,并将 CAl6 基因组 RNA 转染至适宜细胞获得拯救病毒。而以 CMV 为启动子实现病毒拯救的策略可以利用哺乳动物细胞内天然的Ⅱ类 RNA 聚合酶来实现转录,在操作上更为简捷[18],可以用于研究基因突变、缺失或插入等改变对病毒性状的影响。

pVAXl 是在载体 pcDNA3.1 的基础上改建而成的一种新型真核表达载体,是美国食品药品监督管理局(FDA)批准的唯一一个可以用于 DNA 疫苗的载体。该质粒含有的强启动子 pCMV 和 BGH poly A 信号可以在哺乳动物细胞中高水平表达重组蛋白[19]。与经典的 T7 启动子相比,少了体外转录的步骤。本研究利用 pVAXl 作为载体构建了全基因组克隆,下一步工作是在此基础上对全基因组克隆进行改造,如在 5′和 3′端增加核酶来提高剪切精确度等[20],实现病毒拯救,以期为病毒基因型和表型关系的研究提供更便捷的工具。

本研究建立了一个基于 CV-A16 病毒的分离鉴定体系,以期为复杂多样的 HFMD 病原体的相关研究提供更多的参考。

参考文献

[1] 赵云,蔡晶娟,彭程,等. 手足口病病毒核酸及抗体检测的比较研究及应用[J]. 国际检验医学杂志,2020,41(14):1678-1681.

[2] MAO Q Y, WANG Y P, YAO X, et al. Coxsackievirus A16: epidemiology, diagnosis, and vaccine[J]. Hum Vaccin Immunother, 2014, 10(2): 360-367.

[3] PERERA D, YUSOF M A, PODIN Y, et al. Molecular phylogeny of modern coxsackievirus A16[J]. Arch Virol, 2007, 152(6): 1201-1208.

[4] CARRION G, HUAMAN J L, SILVA M, et al. Molecular epidemiology of coxsackievirus A16 strains from four sentinel surveillance sites in Peru[J]. Int J Infect Dis, 2016, 52: 83-85.

[5] 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.

[6] WANG J, TENG Z, CHU W, et al. The emergence and spread of one Coxsackievirus A16 Genogroup D novel recombinant strain that caused a clustering HFMD outbreak in Shanghai, China, 2016[J]. Emerg Microbes Infect, 2018, 7(1): 131.

[7] 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.
[8] WANG X, SHEN C, CHEN T, et al. Improved plasmid-based recovery of coxsackievirus A16 infectious clone driven by human RNA polymerase I promoter[J]. Virol Sin, 2016, 31(4): 339-341.
[9] ASWATHYRAJ S, ARUNKUMAR G, ALIDJINOU E K, et al. Hand, foot and mouth disease (HFMD): emerging epidemiology and the need for a vaccine strategy[J]. Med Microbiol Immunol, 2016, 205(5): 397-407.
[10] XIE J, YANG X H, HU S Q, et al. Co-circulation of coxsackieviruses A-6, A-10, and A-16 causes hand, foot, and mouth disease in Guangzhou city, China[J]. BMC Infect Dis, 2020, 20(1): 271.
[11] 魏雷雷, 王岙, 吴东林, 等. 2015—2017 年吉林省柯萨奇病毒 A 组 16 型基因特征分析[J]. 中国生物制品学杂志, 2020, 33(5): 535-539.
[12] 田晓灵, 张勇, 宋壮志, 等. 柯萨奇病毒 A16 型的 B1a 和 B1b 两个分支在内蒙古自治区共同流行[J]. 病毒学报, 2013, 29(4): 426-430.
[13] 高红, 顾文珍, 倪红霞, 等. 宁波市手足口病优势毒株肠道病毒 A 组 VP1 编码区基因进化分析[J]. 中国疫苗和免疫, 2016, 21(3): 278-282.
[14] 张建群, 罗学辉, 李永东. 浙江省余姚市手足口病病原谱和 EV71 VP1 基因分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(21): 3167-3169.
[15] 邱晓枫, 祝水芬, 濮小英, 等. 杭州市肠道病毒 71 型分离与 VP1 区域序列分析[J]. 中国预防医学杂志, 2011, 12(12): 1014-1018.
[16] 刘佳, 夏玛丽, 郭秀华, 等. 我国部分省市手足口病 EV71 VP1 基因特征分析[J]. 现代预防医学, 2015, 42(14): 2626-2629.
[17] 司鲁莹. 肠道病毒 71 型全基因组序列分析及 VP1 基因毒力位点研究[D]. 济南: 山东大学, 2013.
[18] INOUE K, SHOJI Y, KURANE I, et al. An improved method for recovering rabies virus from cloned cDNA[J]. J Virol Methods, 2003, 107(2): 229-236.
[19] MASAVULI M G, WIJESUNDARA D K, UNDERWOOD A, et al. A hepatitis C virus DNA vaccine encoding a secreted, oligomerized form of envelope proteins is highly immunogenic and elicits neutralizing antibodies in vaccinated mic[J]. Front Immunol, 2019, 10: 1145.
[20] 魏国超, 田文洪, 王刚, 等. CMV 与 T7 启动子对仙台病毒微小基因组拯救效率的比较[J]. 病毒学报, 2012, 28(3): 237-245.

(收稿日期: 2020-08-26　修回日期: 2021-01-03)

(上接第 1273 页)

种有效工具, 通过长期的横向和纵向比较, 可帮助实验室监测质量水平。LIS 系统使得实验室收集数据统计质量指标变得简单易行, 为实验室质量改进提供了依据和可能, 能够客观分析实验室质量风险来源, 促进实验室信息化建设持续加强[8]。通过对检验报告不正确率的监控可及时发现检验质量的偏离, 确保检测工作的质量, 尽量在实验室分析前或在检验结果审核中识别出标本错误, 结合既往结果及时与临床沟通, 避免存在干扰因素。如果在临床反馈结果不符时调查分析出的标本错误, 应及时汇总, 必要时保存相关临床联系/咨询/投诉三联表或不良事件/不合格工作二联表, 请医务处和护理部等部门协助解决, 在工作实践中不断探索, 寻找有效的持续改进方法, 提高质量。

参考文献

[1] 中国合格评定国家认可委员会. 医学实验室质量和能力认可准则: CNAS-CL02[S]. 北京: 中国合格评定国家认可委员会, 2012.
[2] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 临床检验专业 15 项医疗质量控制指标(2015 版): 国卫办医函[2015]252 号[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.
[3] International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) Working Group on Laboratory Errors and Patient Safety (WG-LEPS). International federation of clinical chemistry and laboratory medicine working group" laboratory errors and patient Safety". MQI support-revision 1[EB/OL]. (2017-01-01)[2020-03-16]. http://www.ifcc-mqi.com/MqiWeb/resources/doc/Quality Indicators_Support_Processes.Pdf.
[4] 郭翀, 刘子杰, 宋贵波, 等. 对 15 项临床检验专业质控指标 5 年统计与分析[J]. 中华检验医学杂志, 2016, 39(1): 29-33.
[5] 黄钰竹, 王薇, 赵海建, 等. 临床检验结果解释性注释的研究进展[J]. 临床检验杂志, 2018, 36(12): 920-922.
[6] 张鸿伟, 李芜婷, 吴菊芬, 等. 急诊检验不正确报告管理措施的探索[J]. 实验与检验医学, 2019, 37(4): 649-651.
[7] 王治国, 费阳, 王薇, 等. 理解临床检验质量指标, 抓质量从实验室内部做起[J]. 中华检验医学杂志, 2016, 39(1): 4-6.
[8] 郭野, 陈倩, 吴卫, 等. 实验室信息管理系统在检验质量关键指标管理中的应用[J]. 中华医学杂志, 2015, 95(12): 898-902.

(收稿日期: 2020-09-16　修回日期: 2020-12-29)