

云南省昆明地区 2022 年柯萨奇病毒 A16 型的 VP1 区分子特征

张磊¹⁾, 沈茹¹⁾, 楚昭阳²⁾, 马绍辉²⁾, 李丽¹⁾

(1) 昆明市妇幼保健院检验科, 云南昆明 650031; 2) 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, 云南昆明 650118)

[摘要] 目的 对昆明市某医院 2022 年从手足口病患儿分离的柯萨奇病毒 A 组 16 型(coxsackievirus A16, CVA16)的全 VP1 基因区分子特征分析。方法 对昆明市某医院 2022 年从手足口病(hand foot mouth disease, HFMD)患儿 200 份临床样品粪便标本进行处理, 分别通过 RD 细胞和 Vero 细胞分离, 对经 3 次培养后仍产生细胞效应(cytopathogenic effect, CPE)的细胞培养液提取病毒核酸, 然后用通用引物 222/224 经 RT-PCR 扩增并测序, 序列经 BLAST 比对确定其血清型, 对鉴定为柯萨奇病毒 A 组 16 型(coxsackievirus A16, CVA16)的再用特异引物 CA16VP1F/CA16VP1R 扩增其全 VP1 区并测序和拼接。下载 CVA16 病毒标准序列, 采用 Geneious 5.4.1 和 MEGA 6.05 等软件对本研究 CVA16 的全 VP1 区的核苷酸和氨基酸序列分析。结果 经鉴定后共检出 22 株从 Vero 细胞分离 CVA16 和 6 株 RD 细胞分离的 CVA16 毒株, 进一步通过特异引物扩增获得 21 株可用的 CVA16 VP1 全长序列, 基于全 VP1 基因系统进化分析, 这 21 株 CVA16 全属于 B1a 基因型。21 株 CVA16 全长 VP1 基因之间的核苷酸和氨基酸序列同源性均较高, 分别为 91.9%~99.6% 和 89.2%~99.3%; 与中国 CVA16 B1a 基因型的其他株的核苷酸和氨基酸序列同源性分别为 89.7%~96.3% 和 89.2%~97.0%。与 CVA16 B1b 其他参考株对比, 其核苷酸和氨基酸序列同源性分别在 84.3%~87.2% 和 89.2%~97.0%。与其它 CVA16 的 B1a 基因亚型相比较发现 21 个氨基酸位点出现变异。结论 2022 年中国云南省昆明某医院引起 HFMD 的 CVA16 毒株属于 B1a 基因型, 应继续监测以明确其流行特征。

[关键词] 柯萨奇病毒 A 组 16 型; 全 VP1 基因; 序列分析

[中图分类号] 373.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095-610X(2024)07-0073-06

Molecular Characterization of the VP1 Region of Coxsackievirus 16 in Kunming, Yunnan in 2022

ZHANG Lei¹⁾, SHEN Ru¹⁾, CHU Zhaoyang²⁾, MA Shaohui²⁾, LI Li¹⁾

(1) Dept. of Clinical Laboratory, Kunming Maternal and Child Health hospital, Kunming Yunnan 650031; 2) Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Key Laboratory for Research and Development of Major Infectious Diseases Vaccine in Yunnan, Kunming Yunnan 650118, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the molecular characteristics of the whole VP1 gene region of coxsackievirus A16 (CVA16) isolated from children with hand, foot and mouth disease (HFMD) in 2022 from a hospital in Kunming, Yunnan. **Methods** Two hundreds fecal specimens of HFMD clinical samples from 2022 in a hospital in kunming, were processed and isolated by RD cells and Vero cells, respectively, and viral nucleic acids were extracted from the cell cultures that still produced cytopathogenic effect (CPE) after three times of incubation, then amplified and sequenced by RT-PCR using universal primers 222/224, and sequenced, and the sequences were compared by BLAST to determine the serotypes, and then the full VP1 region of CVA16 was amplified with

[收稿日期] 2024-01-22

[基金项目] 云南省科技计划项目(202202AA100016); 昆明市卫生健康委科研项目(2022-11-01-001); 科技人才与平台计划(202005AD160025)

[作者简介] 张磊(1989~), 女, 云南昆明人, 医学学士, 主管检验师, 主要从事生物化学检测工作。

[通信作者] 李丽, E-mail: zhuoyuell@163.com

specific primers CA16VP1F/CA16VP1R, then sequenced and spliced. The standard sequences of CVA16 virus were downloaded, and the nucleotide and amino acid sequences of the whole VP1 region of CVA16 in this study were analyzed using software such as Geneious 5.4.1 and Mega 6.05. **Results** 22 strains of CVA16 isolated from Vero cells and 6 strains isolated from RD cells were detected by RT-PCR using universal primers, and the available sequences of 21 strains of full-length CVA16 VP1 region were further amplified by the specific primers of CVA16, and the nucleotide and amino acid sequences of the 21 strains of full-length CVA16 VP1 genes were highly homologous to each other, with 91.9% ~ 99.6% and 89.2% ~ 99.3%, respectively. The nucleotide and amino acid sequence homology with other strains of the Chinese B1a genotype ranged from 89.7% ~ 96.3% and 94.6% ~ 99.0%, respectively; and nucleotide and amino acid sequence homology was in the range of 84.3% ~ 87.2% and 89.2% ~ 97.0%, respectively, when compared with the other reference strains of B1b. The phylogenetic analysis showed that all 21 CVA16 strains belonged to the B1a genotype. The 21 mutations were found by compared with that of other B1a strains. **Conclusions** The CVA16 strain that caused HFMD in a hospital in Kunming, Yunnan Province, China in 2022 belongs to the B1a genotype. Surveillance should be continued to clarify its epidemiological characteristics.

[**Key words**] Coxsackievirus A16; Complete VP1 gene; Sequence analysis

柯萨奇病毒 A 组 16 型 (coxsackievirus A16, CVA16) 属于肠道病毒 A 组病毒, 是引起手足口病 (hand foot mouth disease, HFMD) 的主要病原体之一^[1-2]。CVA16 是单股正链无包膜 RNA 病毒, 其基因组全长约 7400 个核苷酸, 包含 1 个 5'端非编码区、1 个单独开放阅读码区以及 1 个 3'端非编码区, 其读码区编码 P1、P2 和 P3 前蛋白, 随后分别被切割成 VP1 ~ VP4、2A ~ 2C 和 3A ~ 3D^[3]。根据 CVA16 分型标准, 依据 VP1 基因序列, 可将 CVA16 毒株分为 A 和 B 2 个基因型, 其中 B 基因型可进一步分为 3 个基因亚型 (B1a ~ B1c)^[4-6]。除 HFMD 外, CVA16 常引起疱疹性咽峡炎和无菌性脑炎, 个别也可导致死亡^[7]。近年来, 中国大陆对 CVA16 的监测发现表明 B1b 和 B1a 基因亚型共同流行^[8-9], 其中以 B1b 为优势^[10-11]。本研究对云南省昆明市 2022 年 HFMD 分离到 CVA16 病毒全 VP1 区序列扩增、拼接和分析, 了解昆明地区的流行的 CVA16 病毒分子特征, 可为我国 HFMD 预防和控制提供一定依据。

1 材料与方法

1.1 检验标本

200 份临床标本来自 2022 年 5 月至 7 月昆明市某医院临床诊断为 HFMD 的患儿粪便 (-80 °C 冻存保存)。本研究已通过昆明市妇幼保健院医学伦理委员会审核批准 (2022-02-17)。

1.2 主要试剂

RT-PCR 试剂盒: PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver.2 (大连宝生物工程有限公司); 病毒

RNA 提取试剂盒: AxyPrep Body Fluid viral DNA/RNA kit (爱思进生物技术(杭州)有限公司); 其他试剂均为分析纯。

1.3 病毒分离培养

取 1 g 粪便, 加入 5 mL PBS 振荡混匀, 2000 r/min 离心 4 °C 30 min, 上清通过 0.45 μm 滤器分别种到人横纹肌肉瘤细胞 (human rhabdomyosarcoma, RD) 和 Vero 细胞, 并置于 5% CO₂ 37 °C 培养。当出现细胞病变效应 (cytopathogenic effect, CPE) 时收集, 冻融 3 次, 盲传 3 次后仍产生细胞病变效应, 判定该样品为阳性。

1.4 病毒核酸提取和肠道病毒鉴定

将病毒分离获得的阳性样品 (细胞培养上清) 按 AxyPrep Body Fluid viral DNA/RNA kit 操作步骤提取病毒核酸, 根据文献以提取 RNA 为模板, 用通用引物 222 和 224 进行肠道病毒部分 VP1 扩增和测序, 并将序列通过 Blast 比对确定其血清型 (核苷酸序列大于 75% 为相同血清型)^[9]。

1.5 CVA16 全长 VP1 基因的扩增和测序

将鉴定为 CVA16 样品, 并基于课题组前期设计 CVA16 引物 CA16VP1F: 5'GGCYTTGGCAGCA-GCTCARG 3' 和 CA16VP1R: 5'ACCACCCTATAG-TTGCCAC-3'。按 PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver.2 说明书进行试验, 其反应体系为: 2 × reaction buffer 25 μL, RT-PCR MIX 2 μL, CVA16-VP1F 20 pmol, CVA16VP1R 20 pmol, RNA 模板 5 μL, 加水至 50 μL。反应条件为: 先逆转录为 cDNA, 50 °C 30 min, 变性: 94 °C 2 min; 然后以 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 和 72 °C 1 min 为 35 个循环。最后经 1% 琼脂糖凝胶电泳判为, 阳性即送

昆明擎科生物技术有限公司测序。

1.6 序列分析

利用 NCBI BLAST 对所测定的节段序列进行比对和拼接; 利用 Mega 6.06 软件对 CVA16 分离株和 GenBank 中登录的 21 株 CVA16, 通过邻近法构建全 VP1 基因核苷酸系统进化树, 并与 21 个参考株的序列进行比较。

2 结果

2.1 CVA16 毒株分离培养与鉴定

从 2022 年 HFMD 临床样品经细胞分离培养并经 RT-PCR、测序和 Blast 比对发现 22 株和 6 株 CVA16 分别分离于 Vero 细胞和 RD 细胞。其中 6 株 RD 细胞分离的 CVA16 与相对应 Vero 细胞分离的样品一致。21 株昆明 CVA16 属于 B1a 与最近中国大陆流行的 B1a 在同一分枝, 见图 1。这提示本次分离 CVA16 株为中国流行株。

2.2 基于全 VP1 基因的系统进化分析

为了确定 CVA16 的遗传特征, 经比对和序列拼接全 VP1 基因序列, 21 株 CVA16 的全 VP1 序列可用, 基因登录号为 OQ942646-OQ942666。通过 MEGA 6.05 软件分析发现, 21 株昆明 CVA16 属于 B1a 与最近中国大陆流行的 B1a 在同一分枝, 见图 2。这提示本次分离 CVA16 株为中国流行株。

2.3 CVA16VP1 基因核苷酸序列的同源性

本次分离的 21 株 CVA16 的全 VP1 的核苷酸序列同源性在 91.9%~99.6% 之间, 而 KM199/YN/CHN/2022 和 KM200/YN/CHN/2022 株之间同源性最低(91.9%)。KM156/YN/CHN/2022 和 KM157/YN/CHN/2022 株之间最高(99.6%); 与 CVA16 其他 B1a 参考病毒的核苷酸序列同源性为 89.7%~96.3%, 其中与 Tainan/5079/98(AF177911) 分离株较低; 与 CVA16 其他 B1b 病毒株的核苷酸序列同源性在 84.3%~87.2% 之间。

2.4 CVA16 VP1 氨基酸序列的同源性

本次分离的 21 株 CVA16 VP1 之间的氨基酸序列同源性较高, 在 89.2%~99.3% 之间; 与 CVA16 其他 B1a 病毒株的氨基酸序列同源性为 89.2%~99.1%, 其中与 Tainan/5079/98 株最低; 与 CVA16 其他 B1b 病毒株的氨基酸序列同源性在 89.2%~97.0% 之间。

2.5 CVA16 VP1 氨基酸突变分析

本次分离的 21 株 CV-A16 毒株全长 VP1 基因均为 891 bp, 推测的氨基酸为 297 个, 符合

CVA16VP1 氨基酸标准。VP1 氨基酸序列分析结果表明, 2022 年 21 株病毒与其它 CVA16 的 B1a 基因亚型发现总计 21 个氨基酸位点出现变异, 但在 164 和 251 位点与 2021 年分离株 CVA16-2021-71-TY-SX-CHN 相比较未发生变异, 但在第 25 位点上发生变异(A25V)。CVA16 的 B1b 基因亚型病毒易变异位点(第 23 位)未发现变异。

3 讨论

3.1 系统进化分析

自 2008 年阜阳 HFMD 暴发和 2016 年 EV71 灭活疫苗广泛接种以来, CVA16 仍为引起中国大陆 HFMD 的主要病原体之一^[12-17]。并且在 HFMD 死亡病例中, CVA16 仍占优势地位^[18]。由于 CVA16 的 VP1 编码区包含了病毒主要的中和抗原决定簇和比较保守, 目前普遍以 VP1 基因作为 CVA16 分子流行病学调查和变异分析。目前根据 CVA16VP1 基因序列分析, 发现中国大陆流行的 CVA16 基因型稳定, 主要为 B1a 和 B1b 亚: 如在 2019 年冬季青岛地区 CVA16 的 B1a 与 B1b 亚型同时流行^[19], 陕西省 2019 年手足口病病原以 CVA16 为流行优势病原, 其基因亚型以 B1a 和 B1b 共存^[20]。在江苏省 2009—2017 年^[21], 2018—2019 年北京市^[22] 和安徽省 2018—2019^[23] 引起 HFMD 的 CVA16 为 B1a 和 B1b 亚型共同循环, 但 B1b 亚型占为优势, 但安徽省 2019 年 CVA16 B1a 基因亚型毒株占比高于 2018 年^[23]。而昆明市 2021 年 HFMD 病例的 CVA16 优势亚型为 B1a 亚型, 极少量属于 B1b 亚型^[24]。而本研究是基于全 VP1 基因序列系统进化分析发现, 2022 年云南省昆明地区分离到的全部 CVA16 流行株均为 B1a 基因亚型, 未检测到 CVA16 的 B1b 基因亚型病毒, 这与云南省昆明地区 CVA16 B1a 和 B1b 基因亚型共同流行报道不一致。另外也发现 2022 年云南省保山市引起手足口病的 CVA16 属于 B1a 亚型, 未检测到 CVA16 的 B1b 基因亚型病毒^[25]。但由于目前 CVA16 序列数有限, 目前尚不清楚 B1a 是否也已成为云南省或昆明地区流行期间的优势基因型或以 B1b 转化为 B1a 亚型单独流行模式, 这需要进一步监测以证实。

3.2 VP1 区氨基酸变异

CVA16 属于 RNA 病毒, 其复制缺乏校正功能, 容易突变, 而变异是其进化的重要机制之一。本次分离株的 VP1 编码区的氨基酸出现多个突变,

OP373967/CVA16-2021-71-TY-SX-CHN	GDFIADMIDQ	TVNNQVNRSL	TALQALPTAA	NTEASSHRLG	TGVVFPALQAA	ETGASSNASD	RNLIETRCVL	NHHSTQETAI	GNFFSRAGLV	SIITMPTTGI
OP373936/CVA16-2019-365-TY-SX-CHNV.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....
MW197369/CVA16-R856a_GD-CHN_2018-06V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....
JX068829/TS10/08V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....
HQ423141/RMM/08V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....
KY425536/V37/YN/CHN/2014V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....
MT663414/K23/YN/CHN/2019T.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....
KY425538/R254/YN/CHN/2010V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....
RM200/YN/CHN/2022F.....V.....V.....V.....V.....V.....F.....L.....V.....V.....
RM227/YN/CHN/2022F.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....
RM199/YN/CHN/2022F.....V.....V.....V.....L.....N.....V.....V.....V.....V.....
RM218/YN/CHN/2022F.....V.....V.....V.....L.....V.....F.....V.....V.....V.....
RM195/YN/CHN/2022F.....T.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....
RM39/YN/CHN/2022F.....K.....K.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....
RM174/YN/CHN/2022F.....K.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....
RM167/YN/CHN/2022F.....V.....V.....V.....V.....V.....F.....V.....V.....V.....
RM231/YN/CHN/2022F.....T.....V.....V.....V.....N.....V.....V.....V.....V.....
RM217/YN/CHN/2022F.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....
RM209/YN/CHN/2022F.....V.....V.....V.....V.....V.....F.....V.....V.....V.....
RM237/YN/CHN/2022F.....S.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....
RM270/YN/CHN/2022F.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....
RM183/YN/CHN/2022F.....V.....V.....V.....V.....V.....F.....V.....V.....V.....
RM185/YN/CHN/2022F.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....
RM226/YN/CHN/2022F.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....
RM224/YN/CHN/2022F.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....
RM294/YN/CHN/2022F.....H.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....
RM150/YN/CHN/2022F.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....
RM156/YN/CHN/2022F.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....
RM157/YN/CHN/2022F.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....V.....

图 1 CVA16 全 VP1 区推测氨基酸序列的比对

Fig. 1 Comparison of putative amino acid sequences of the full VP1 region of CVA16 strains

这符合与其易变异的特点。这也提示 CVA16 B1a 毒株在环境压力下也在不断的进化。另外，以前研究认为 B1a 毒株存在 VP1-164T251V 型和 VP1-164K/N251I 两种形式^[24]。本研究对 2022 年昆明的 21 株分离株发现均为 VP1-164K/251I 流行模式。这与近年流行株中主要呈 VP1-164K/251I 氨基酸模式相一致^[25]。而 VP1-164 位点位于中和抗原表位，这提示该位点该流行的基因型的抗原位点保

守，未发生变异。这与早期 B1a 毒株不同(VP1 164T)。因此，本次研究的 CVA16 VP1 氨基酸位点变异是否引起 CVA16 流行株抗原性的变化，还有待研究。并且这些变异是毒株本身的变异位点，还是由于病毒在适应性传代过程中发生突变也需进一步研究。

3.3 细胞敏感性分析

本研究中，200 份 HFMD 样品经巢式 RT-

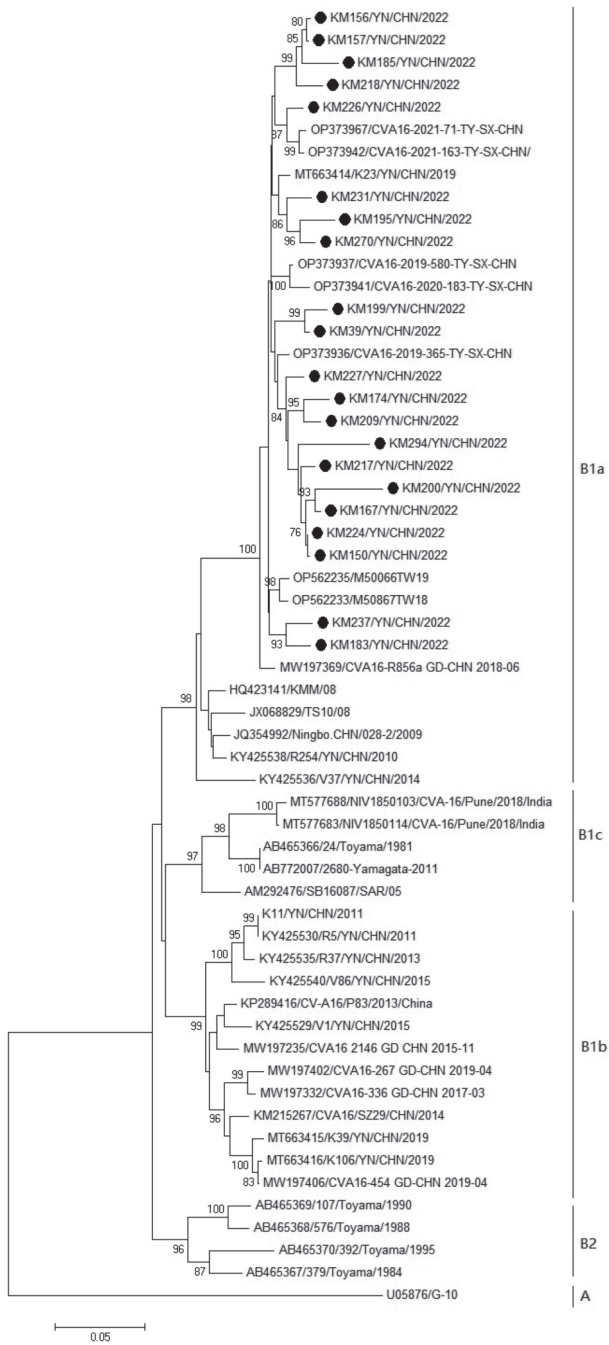


图 2 基于全 VP1 区核苷酸序列的 CVA16 的系统进化树
 Fig. 2 Phylogenetic tree based on full VP1 sequences of CVA16 strains

PCR、测序和比对, 共检查到 54 份 CVA16(27.0%), 而细胞分离仅为 22 株(11.0%), 这也进一步验证细胞分离不如 RT-PCR 敏感。同时也发现 CVA16 对 Vero 细胞要比 RD 细胞敏感, 这提示分离 CVA16 毒株优先选择 Vero 细胞。

综上所述, 需要继续监测 CVA16 VP1 的变异情况, 对 CVA16 全基因序列分析不仅利于掌握中国大陆 CVA16 的进化, 也可为相关疾病的防控和疫苗的研究提供一定参考。

[参考文献]

[1] Liu Y, Chen J, Zhang M, et al. Coxsackievirus B: the important agent of hand, foot, and mouth disease [J]. *Journal of Medical Virology*, 2023, 95(3): e28669.

[2] Fu X, Wan Z, Li Y, et al. National epidemiology and evolutionary history of four hand, foot and mouth disease-related enteroviruses in China from 2008 to 2016 [J]. *Virologica Sinica*, 2020, 35(1): 21–33.

[3] 冯骁, 李琦涵. 柯萨奇病毒 A16 型疫苗的研究进展 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2021, 34(3): 357–361.

[4] Noisumdaeng P, Korkusol A, Prasertsopon J, et al. Longitudinal study on enterovirus A71 and coxsackievirus A16 genotype/subgenotype replacements in hand, foot and mouth disease patients in Thailand, 2000 – 2017 [J]. *International Journal of Infectious Diseases*, 2019, 80(1): 84–91.

[5] Hoa-Tran T N, Dao A T H, Nguyen A T, et al. Coxsackieviruses A6 and A16 associated with hand, foot, and mouth disease in Vietnam, 2008 – 2017: Essential information for rational vaccine design [J]. *Vaccine*, 2020, 38(52): 8273–8285.

[6] Ji H, Fan H, Lu P, et al. Surveillance for severe hand, foot, and mouth disease from 2009 to 2015 in Jiangsu province: epidemiology, etiology, and disease burden [J]. *BMC Infectious Diseases*, 2019, 19(1): 1–18.

[7] Cai K, Wang Y, Guo Z, et al. Clinical characteristics and managements of severe hand, foot and mouth disease caused by enterovirus A71 and coxsackievirus A16 in Shanghai, China [J]. *BMC infectious diseases*, 2019, 19(1): 1–8.

[8] Zhang M, Zhao Y, Zhang H, et al. Molecular characterization of Coxsackievirus A16 strains isolated from children with severe hand, foot, and mouth disease in Yunnan, Southwest China, during 2009 - 2015 [J]. *Journal of Medical Virology*, 2019, 91(1): 155–160.

[9] Chen L, Yao X J, Xu S J, et al. Molecular surveillance of coxsackievirus A16 reveals the emergence of a new clade in mainland China [J]. *Archives of virology*, 2019, 164(3): 867–874.

[10] Han Z, Song Y, Xiao J, et al. Genomic epidemiology of coxsackievirus A16 in mainland of China, 2000 – 18 [J]. *Virus evolution*, 2020, 6(2): 1–15.

- [11] Yi L, Zeng H, Zheng H, et al. Molecular surveillance of coxsackievirus A16 in southern China, 2008 - 2019[J]. *Archives of Virology*, 2021, 166(6): 1653-1659.
- [12] Guo J, Cao Z, Liu H, et al. Epidemiology of hand, foot, and mouth disease and the genetic characteristics of Coxsackievirus A16 in Taiyuan, Shanxi, China from 2010 to 2021[J]. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2022, 12(1): 1040414.
- [13] Jiang L, Jiang H, Tian X, et al. Epidemiological characteristics of hand, foot, and mouth disease in Yunnan Province, China, 2008 - 2019[J]. *BMC infectious diseases*, 2021, 21(1): 1-8.
- [14] Kang Y J, Shi C, Zhou J, et al. Multiple molecular characteristics of circulating enterovirus types among paediatric hand, foot and mouth disease patients after EV71 vaccination campaign in Wuxi, China[J]. *Epidemiology & Infection*, 2022, 150(1): 1-19.
- [15] Jiang H, Zhang Z, Rao Q, et al. The epidemiological characteristics of enterovirus infection before and after the use of enterovirus 71 inactivated vaccine in Kunming, China[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2021, 10(1): 619-628.
- [16] Wang M, Chen T, Peng J, et al. The spatial - temporal distribution and etiological characteristics of hand-foot-and-mouth disease before and after EV-A71 vaccination in Kunming, China, 2017-2020[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12(1): 17028.
- [17] Song C, Li Y, Zhou Y, et al. Enterovirus genomic load and disease severity among children hospitalised with hand, foot and mouth disease[J]. *E Bio Medicine.*, 2020, 62(1): 103078.
- [18] 杨溪, 曹亿会, 寸建萍, 等. 2015—2019年云南省手足口病流行及病原学特征分析 [J]. *职业卫生与病伤*, 2022, 37(5): 278-282.
- [19] 姜法春, 赵超, 董鸿铭, 等. 2019年冬季青岛市手足口病患者感染柯萨奇病毒 A 组 16 型基因特征分析 [J]. *疾病监测*, 2022, 37(6): 755-759.
- [20] 杜燕华, 关路媛, 冯瑄, 等. 2019年陕西省手足口病的病原构成及柯萨奇 A16 型病毒的 VP1 区序列分析 [J]. *现代预防医学*, 2022, 49(7): 1289-1293.
- [21] 嵇红, 鲍倡俊, 祁贤, 等. 2009-2017年江苏省手足口病病原谱及柯萨奇 A16 型的分子流行病学研究 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2019, 35(2): 113-119.
- [22] 黄京京, 韦欢欢, 陈飞, 等. 2018—2019年北京市柯萨奇病毒 A 组 16 型分子流行病学研究 [J]. *微生物学免疫学进展*, 2023, 51(1): 40-48.
- [23] 史永林, 葛盈露, 马婉婉, 等. 2018-2019年安徽省柯萨奇病毒 A 组 16 型 B1 基因亚型分离株分子特征分析 [J]. *疾病监测*, 2022, 37(8): 1026-1031.
- [24] 刘艳艳, 姜黎黎, 李文龙, 等. 2021年昆明市手足口病流行病学和肠道病毒病原谱特征 [J/OL]. *中国疫苗和免疫*, 2023, 29(1): 64-70.
- [25] 李希尚, 赵丽娟, 伏晓庆, 等. 云南省保山市 2022 年手足口病病例柯萨奇病毒 A16 型基因特征分析 [J]. *中国热带医学*, 2023, 23(10): 1104-1108.