

DOI:10.13350/j.cjpb.230802

• 论著 •

2020-2021 年上海地区分离株柯萨奇病毒 A4 基因型的全基因组分析*

李云逸¹, 崔心怡¹, 费洁², 仲文江³, 李淑佩¹, 陈敏^{1**}

(1. 上海市疾病预防控制中心, 上海 200336; 2. 上海市嘉定区疾病预防控制中心; 3. 上海市青浦区疾病预防控制中心)

【摘要】 目的 对 2020-2021 年上海市环境污水和健康儿童粪便标本中分离的 9 株柯萨奇病毒 A4(Coxsackievirus A4, CVA4)进行全基因组特征分析。 **方法** 利用人横纹肌肉瘤细胞(human rhabdomyosarcoma, RD)和人喉癌上皮细胞(human laryngeal carcinoma, Hep-2)对污水样品和健康儿童粪便样品进行病毒分离, 抽提病毒 RNA 进行逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR), 利用 Illumina 二代测序技术进行全基因组序列测定。使用 BioEdit 7.2.5 软件对 CVA4 进行序列比对和同源性分析, 使用软件 MEGA10.0.4 运用最大似然法(Maximum likelihood, ML)构建系统进化树, 建树自展值(Bootstrap)检验 1000 次。使用 Similarity Plots3.5.1 软件对 CVA4 代表株进行重组分析。 **结果** 2021 年上海市健康儿童粪便样品共分离出 5 株 CVA4, 2020-2021 年环境污水中共分离出 4 株 CVA4。2020 年 1 月和 12 月以及 2021 年 1-2 月和 4-5 月采集的污水浓缩液均检出 CVA4。9 株 CVA4 分离株之间 VP1 区核苷酸和氨基酸相似性分别为 90.2%~100% 和 96.3%~100%, 均属于 C2 基因亚型。其中 5 个 CVA4 代表株间全基因组核苷酸和氨基酸相似性分别为 89.8%~99.3% 和 96.3%~100%。基因重组分析显示, 5 个 CVA4 代表株的基因组在 P1 区与 CVA4 原型呈现高度相似性, 而在 5'UTR 区域均与 CVA6 有重组区域, 并在 P3 的 3C 区域与 CVA5 和 CVA6 存在重组现象。 **结论** 分离自上海地区的 9 株 CVA4 均属于 C2 基因亚型, 该亚型是国内 CVA4 的优势基因亚型。其中 5 株 CVA4 在 5'UTR 和 3C 区存在重组现象。本研究可为了解上海流行株 CVA4 的遗传变异情况提供数据支撑, CVA4 的疫苗研发和相关疾病的防控具有参考意义。

【关键词】 柯萨奇病毒 A4; 环境污水监测; 全基因组

【中图分类号】 R373.2

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)08-0875-06

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Aug;18(8):875-880.]

Genome analysis of recombinant coxsackievirus A4 genotype in Shanghai from 2020 to 2021

LI Yunyi¹, CUI Xinyi¹, FEI Jie², ZHONG Wenjiang³, LI Shupai¹, CHEN Min¹ (1. Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China; 2. Jiading District Center for Disease Control and Prevention; 3. Qingpu District Center for Disease Control and Prevention)***

【Abstract】 Objective To analyze the whole-genome characteristics of 9 strains of Coxsackievirus A4 (CVA4) isolated from environmental surveillance and healthy children surveillance in Shanghai from 2020-2021. **Methods** Human rhabdomyosarcoma (RD) and human laryngeal carcinoma epithelial cells (Hep-2) were used to isolate the virus from sewage and healthy children samples. The virus RNA was extracted for reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and the whole genome was sequenced using the Illumina second-generation sequencing technology. BioEdit 7.2.5 software was used for sequence alignment and homology analysis of CVA4. MEGA10.0.4 software was used to construct the phylogenetic tree using Maximum Likelihood (ML), and the bootstrap test was 1000 times. The recombination analysis of Shanghai CVA4 representative strains was carried out using Similarity Plots3.5.1 software. **Results** A total of five CVA4 isolates were obtained from healthy children samples in 2021, and four CVA4 isolates were obtained from environmental surveillance in 2020-2021. CVA4 was detected in the sewage concentrate from January and December in 2020, January to February and April to May in 2021. The nucleotide and amino acid similarity of VP1 region among nine CVA4 isolates in Shanghai was 90.2%-100% and 96.3%-100%, respectively, which belonged to C2 genotype. The whole-genome's nucleotide and amino acid similarity of five representative CVA4 strains in Shanghai were 89.8%-99.3% and 96.3%-100%, respectively. Gene recombination analysis showed that the genome of five Shanghai CVA4 strains showed high similarity with the CVA4 prototype in P1 region, while there were recombination regions with CVA6 in 5'UTR re-

* **【基金项目】** 上海市卫生健康委员会青年项目(No. 20204Y0210)。

** **【通讯作者】** 陈敏, E-mail: chenmin@scdc.sh.cn

【作者简介】 李云逸(1986-), 女, 上海人, 硕士研究生, 副主任技师, 主要从事疫苗可预防疾病监测及研究。E-mail: liyunyi@scdc.sh.cn

gion, and there were recombination phenomena with CVA5 and CVA6 in 3C region of P3. **Conclusion** The 9 isolates of CVA4 in Shanghai all belong to C2 genotype, which is the dominant genotype of CVA4 in China. Among them, 5 strains of CVA4 have recombination in the 5'UTR and 3C regions. This study provides data support for understanding the genetic variation of CVA4 in Shanghai, and has reference significance for the research and development of CVA4 vaccine and the prevention and control of related diseases.

【Key words】 Coxsackievirus A4; environmental surveillance; whole-genome

柯萨奇病毒 A4 (Coxsackievirus A4, CVA4) 属于小 RNA 病毒科 (picornaviridae), 肠道病毒属 (enterovirus, EV), 是 A 组 EV 中常见的一种病毒。人感染 CVA4 后与其他 EV 感染相似, 大多数无症状, 但也会导致广泛的临床疾病, 如疱疹性咽峡炎 (herpangina, HA)、手足口病 (hand, foot and mouth disease, HFMD)、发热伴上呼吸道感染、急性弛缓性麻痹 (Acute Flaccid Paralysis, AFP) 和病毒性心肌炎 (viral myocarditis, VMC) 等^[1-4]。

自 2012 年上海开展环境污水肠道病毒监测网络以来, CVA4 检出率较低, 分离到的毒株很少, 而在 2020-2021 年作者多次在污水中分离到 CVA4 毒株。近年来, 江苏盐城^[5]、山东^[6]、浙江杭州^[7] 等多个地区报道 CVA4 导致的 HFMD、HA 病例。2020 年北京^[8]、2021 年广东省深圳市^[9] 和山东省泰安市^[10] 报道发生 CVA4 导致的流感样聚集性发热疫情。本研究通过对 2020-2021 年上海市环境污水监测和健康儿童肠道病毒监测中分离的 9 株 CVA4 进行全基因组和遗传特征分析, 为上海市预警 CVA4 引起的相关疾病提供参考。

材料与方法

1 样品的采集和处理

1.1 环境污水的采集和浓缩 选择上海市两个污水处理厂作为本污水采样点, 每月底采集 1 份 1 000 mL 处理前沉淀池的污水样品。2020 年 1 月至 2021 年 12 月在嘉定区污水处理厂和青浦区污水处理厂每月采集 1 份污水样品。共计 48 份污水样品, 采集后 24 h 内冷藏条件下运送到实验室, 采用阴离子膜吸附-超声波震荡法进行病毒富集^[11], 第一次洗脱和第二次洗脱的污水浓缩液样品 -20 °C 保存, 用于病毒分离和 PCR 检测。

1.2 健康儿童粪便样品的采集和处理 2020-2021 年, 每年在 EV 感染高发季节 (6-8 月), 选择 2 个区, 随机采集健康儿童粪便样品 240 份, 在冷藏条件下运送至实验室。粪便样品按照世界卫生组织 (WHO) 的《脊髓灰质炎实验室手册》^[12] 推荐的方法处理, -20 °C 保存, 用于病毒分离。

2 病毒分离和鉴定

2.1 病毒分离 人横纹肌肉瘤细胞 (human rhabdomyosarcoma, RD) 和人喉癌上皮细胞 (human laryngeal carcinoma, Hep-2) 由中国疾病预防控制中心病毒预防控制所国家脊灰实验室提供。将第一次洗脱的污水浓缩液分别接种到 RD、Hep-2 细胞各 4 孔, 每孔 200 μ L。将第二次洗脱的污水浓缩液分别接种到 RD、Hep-2 细胞各 3 孔, 每孔 200 μ L。将培养板置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 连续观察细胞病变 (Cytopathic effect, CPE) 7 d。当 CPE 达到 75% 以上时, 将阳性分离物保存于 -20 °C 备用。无 CPE 者连续传代 2 次, 若仍无 CPE, 则视作病毒分离阴性。

2.2 病毒 RNA 提取 将阳性分离物和 48 份第一次洗脱的污水浓缩液样品依照 QIAamp Viral RNA Mini Kit 试剂盒 (德国 QIAGEN 公司生产) 说明书进行核酸抽提。

2.3 病毒分子分型 使用 EVP4/OL68-1^[13] 引物扩增阳性分离物 VP4-VP2 编码区片段, 通过 TaKaRa One-step RT-PCR 试剂盒 (大连宝生物公司) 进行 RT-PCR 扩增。反应程序: 50 °C 反转录 30 min, 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 90 s, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定, 约 600 bp 左右的 PCR 产物送生工生物工程 (上海) 有限公司进行序列测定。原始序列信息使用 Sequencer 5.4.5 软件进行拼接, 与 GenBank 数据库中的 EV 参考株进行 BLAST, 鉴定 EV 型别。

另取第一次洗脱的污水浓缩液样品经提取核酸后使用 CVA4 荧光检测试剂盒 (购于江苏硕世生物科技有限公司) 进行核酸检测, 扩增体系及程序按照说明书设置和操作, 检测仪器为 LightCycler 480 型荧光定量 PCR 仪 (美国 Roche 公司生产)。

2.4 CVA4 VP1 区全长序列测定和全基因组序列扩增 通过分子定型, 鉴定出 9 株阳性分离物为 CVA4。使用 CVA4 特异性引物 CVA4-2336S/3421A^[3] 对病毒进行 VP1 区全长序列 RT-PCR 扩增和测序, PCR 反应体系及程序同方法 2.3。

对鉴定为 CVA4 的毒株选取 5 株作为代表株进行全基因组序列扩增。采用 ULSEN 超灵敏度肠道病毒全基因组捕获试剂盒 A 组试剂盒 (购于北京微未来科技有限公司) 进行逆转录-聚合酶链反应 (reverse

transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR), 获得的产物纯化后进行二代测序建库。建库试剂盒采用 Nextera DNA Flex Library Prep Kit(美国 Illumina 公司产品)。二代测序试剂为 Miseq v3 Reagent Kit (美国 Illumina 公司产品),测序仪为 Miseq(美国 Illumina 公司生产)。

2.5 序列分析 CVA4 分离株 VP1 全长原始序列使用 Sequencher5.4.5 软件进行拼接。从 GenBank 中下载 428 条 1948-2021 年 8 个国家的 CVA4 分离株 VP1(915 bp)全长序列(HFMD 病例 163 条、AFP 病例 92 条、HA 病例 54 条、发热病例 18 条、健康儿童 10 条)。删除具有高同源性(相同或超过 99%的核苷酸同源性)的 CVA4,共纳入 164 条 CVA4 的 VP1 全长序列(包括 9 条本研究中的 CVA4 分离株和 155 条其它国家和我国其他省的分离株),使用 BioEdit 7.2.5 软件对上海 CVA4 分离株和参考序列进行 VP1 区序列比对和同源性分析,通过软件 MEGA10.0.4 运用最大似然法(Maximum likelihood, ML)构建系统进化树,建树自展值(Bootstrap)检验 1000 次。

从 GenBank 下载 17 条 EVA 原型株全基因参考序列,使用 CLC 软件分析二代测序数据以获得上海 CVA4 分离株全基因组序列。使用 BioEdit 7.2.5 软件对上海 CVA4 代表株和 EV-A 原型株进行全基因序列比对和同源性分析。通过软件 MEGA10.0.4 运用 ML 法构建全基因组和 P1、P2 和 P3 区系统进化树,建树自展值(Bootstrap)检验 1 000 次。使用 Similarity Plots3.5.1 软件分析上海 CVA4 代表株和其他 EVA 原型株之间的潜在重组。

结 果

1 CVA4 检测情况

2020 年采集的 240 份健康儿童粪便样品未分离到 CVA4 毒株,2021 年采集的 240 份健康儿童粪便样品共分离出 5 株 CVA4。2020-2021 年环境污水中共分离出 4 株 CVA4,其中 2020 年 1 月和 12 月以及 2021 年 1-2 月和 4-5 月的污水浓缩液均有 CVA4 检出(表 1)。

表 1 2020-2021 年上海市环境污水中 CV4 检测情况

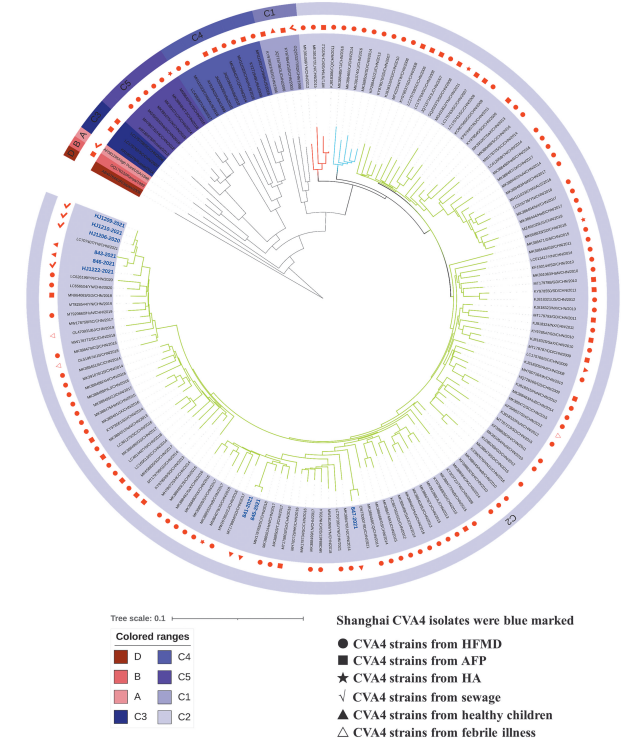
Table 1 Detection of CV4 in sewage in Shanghai from 2020 to 2021

时间 Time	污水采集点 Sewage plant	CVA4 Ct 值 CVA4 Ct value	病毒分离 Virus isolation
2020 年 01 月	青浦污水厂	36.19	-
2020 年 12 月	嘉定污水厂	33.35	CVA4 1 株
2021 年 01 月	嘉定污水厂	29.08	CVA4 2 株
2021 年 02 月	嘉定污水厂	34.36	-
2021 年 04 月	嘉定污水厂	34.23	-
2021 年 04 月	青浦污水厂	31.12	CVA4 1 株
2021 年 05 月	嘉定污水厂	32.1	-

2 CVA4 的同源性及遗传进化分析

CVA4 的 VP1 全长为 915 个核苷酸,共编码 305 个氨基酸。比较 164 条 CVA4 VP1 区核苷酸和氨基酸序列,9 个上海 CVA4 分离株间核苷酸和氨基酸相似性分别为 90.2%~100%和 96.3%~100%;9 个上海 CVA4 分离株与原型株 High Point(GenBank 号: AF081295)的核苷酸和氨基酸相似性分别为 83.1%~85.1%和 95.7%~98%。

根据 VP1 区基因型>15%核苷酸差异为分型标准^[14],使用 ML 法构建系统发生树,将 CVA4 分为 A~D 4 个基因型(图 1)。A、B 和 D 基因型分别包括 1948 年从美国北卡罗来纳州城市污水中分离的 CV-A4 原型 High Point 毒株、1999 年的东非肯尼亚毒株和 2008 年的日本毒株。C 基因型分为 C1-C5 基因亚型,大部分中国 CVA4 株聚集在 C2 基因亚型,时间跨度为 2006-2021 年,可分成 3 个 Cluster(Cluster1-3)。Cluster1(红色)和 Cluster2(蓝色)自 2016 年后传播可能已经中断。而 Cluster3(绿色)是地理分布最广泛的最大的 Cluster,本研究中的 9 个上海 CVA4 分离株均属于 C2 基因亚型的 Cluster3 分支中。



注:蓝色标记为上海 CVA4 分离株;●分离自 HFMD 病例的 CVA4 株;■分离自 AFP 病例的 CVA4 株;★分离自 HA 病例的 CVA4 株;√分离自污水的 CVA4 株;▲分离自健康儿童粪便的 CVA4 株;△分离自发热病例的 CVA4 株

图 1 上海 CVA4 分离株与各基因型代表株完整 VP1 序列系统进化树

Notes:Shanghai CVA4 isolates were blue marked.●CVA4 strains from HFMD;■CVA4 strains from AFP;★CVA4 strains from HA;√CVA4 strains from sewage;▲CVA4 strains from healthy children;△CVA4 strains from febrile illness.

Fig. 1 Phylogenetic analysis based on complete VP1regions of CVA4 isolates from Shanghai with each representative strain

3 全基因组序列特征分析

选取5个上海CVA4代表株进行全基因组测序,获取的序列长度在7 432~7 434 bp,编码区长度均为6 606 bp,编码2 202个氨基酸,无碱基缺失和插入。将5个上海CVA4代表株和EV-A原型株进行全基因组核苷酸和氨基酸序列比对,相似性分别为89.8%~99.3%和96.3%~100%;与CVA4原型株全基因组序列的核苷酸和氨基酸相似性分别为84.2%~

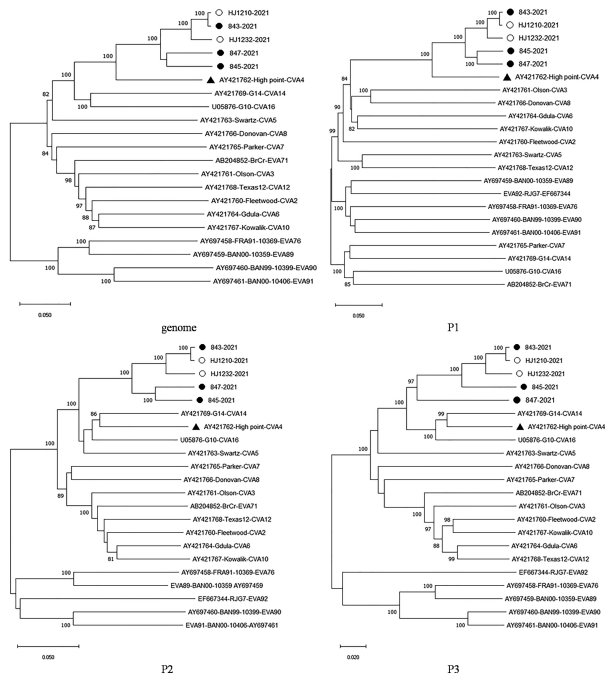
84.7%和97.1%~99.6%。在编码结构蛋白的P1区,5个上海代表株与CVA4原型株的核苷酸相似性为84.6%~85.5%,与其他EV-A原型株的核苷酸相似性为59.9%~67.3%。而在非结构蛋白的P2和P3区,5个上海CVA4代表株与CVA4、CVA5、CVA14和CVA16原型株的核苷酸相似性均较高(表2)。基于全基因组、P1、P2和P3区构建的上海CVA4代表和EV-A原型株系统进化树如图2A、B、C和D。

表2 5个上海CVA4代表株与CVA原型株间的核苷酸序列相似性
Table 2 Nucleotide identities between 5 sequences of CVA4 in Shanghai and prototype strains of EV-A species

区域	核苷酸相似性 (%)																
	CVA2	CVA3	CVA4	CVA5	CVA6	CVA7	CVA8	CVA10	CVA12	CVA14	CVA16	EVA71	EVA76	EVA89	EVA90	EVA91	
Genome	73.5	74.2	84.2	74.5	74.5	72.6	74	74.1	73	75.2	76	72.4	69.1	69.6	68.1	68.3	
	-73.7	-74.6	-84.7	-75.2	-74.8	-72.9	-74.4	-74.5	-73.6	-75.8	-76.2	-73	-69.3	-69.8	-68.4	-68.6	
5-UTR	82.3	83.4	86.9	82.9	86.5	82.9	81.8	82.1	81.8	83.5	85.9	83.4	78	77.8	70.4	70.7	
	-83.3	-83.8	-87.5	-83.6	-87.7	-84.1	-82.3	-84.8	-83.2	-84	-86.8	-84.1	-79.1	-78.6	-71.9	-71.3	
P1	65.7	66.5	84.6	63.0	65.7	62.2	66.4	66.5	63.8	59.9	61.4	60.8	63.5	64.3	63.7	63.3	
	-66.1	-67.1	-85.5	-64.2	-66	-62.5	-66.7	-67.3	-64.5	-60.3	-61.7	-62.1	-64	-64.6	-63.9	-63.8	
VP4	65.7	66.6	94.2	68.5	68.5	68.1	69.5	68.1	68.5	67.1	63.7	65.7	69.5	67.6	69	67.6	
	-67.6	-70.5	-100	-72.4	-71.9	-70	-70	-71.9	-71.9	-68.5	-66.1	-68.1	-73.9	-69.5	-72.4	-69.5	
VP2	69.2	69.6	84.8	67.9	65.2	69.7	65.8	68.6	66.2	65.6	64.6	64.4	67.3	66.7	69	66.5	
	-70.3	-70.8	-86	-68.6	-65.8	-70.5	-67	-68.8	-66.7	-66.8	-66.8	-65.3	-69.7	-68.7	-69.6	-67.5	
VP3	71.5	70.6	85.8	67.2	68.6	65.9	70	69.4	68	62.8	62.6	65	65.4	66.3	66.5	66.9	
	-72	-72	-86.6	-68.7	-69.4	-66.9	-72	-70.6	-69.3	-64.7	-63.6	-66.2	-66.6	-66.9	-67.2	-68.2	
VP1	57.9	59.4	83	56.5	56.5	52.6	59.5	61.6	56.8	50.9	54.5	53.4	55.6	56.2	55	56.1	
	-58.7	-60.5	-85	-58.8	-57.8	-54	-60.3	-62.8	-57.9	-51.7	-56.7	-55.2	-56.1	-57.1	-55.8	-56.7	
P2	77.1	78.4	82.3	81	77.8	78.2	77.9	77.3	77.7	82.2	81.8	78.6	70.8	72.6	70.4	70.5	
	-77.9	-79.1	-82.6	-81.8	-79.1	-78.7	-79.2	-78	-78.6	-83.1	-82.8	-79.4	-71.9	-72.7	-70.9	-71.1	
2A	75.7	75.7	79.3	75.3	76.6	75.5	77.1	75.7	76.6	80	77.7	77.5	65.1	69.5	65.7	68.2	
	-76.6	-78.8	-81.1	-79.5	-79.5	-77.5	-78.8	-76.6	-78.2	-83.3	-79.3	-79.5	-67.1	-71.1	-68.2	-68.8	
2B	73.4	77.7	80.1	79.1	77.4	76.7	77.1	74	73.7	79.1	80.1	77.7	62.9	64.6	68.3	68.3	
	-76	-79.4	-83.5	-81.8	-79.4	-79.7	-78.1	-74.7	-75.4	-82.1	-83.5	-79.7	-65.3	-65.9	-70.7	-69	
2C	78.6	79.4	83.3	83.4	78.4	78.6	78.4	78.9	79.3	83.8	84.1	78.7	75.2	75.8	72.5	72.2	
	-79.3	-79.9	-84.3	-84	-79.6	-79.9	-80.4	-80.3	-80.1	-84.3	-84.9	-79.8	-77.1	-76.2	-73	-73	
P3	77	77.4	83.2	79.3	77	77.4	77.5	77.3	77.1	83.2	83	77.2	72.5, 73.2		72.7	72.5	72.8
	-77.5	-78.2	-83.9	-79.9	-78.3	-77.9	-78.7	-78.4	-78.7	-84	-83.2	-78.1			-73.4	-73.1	-73.8
3A	77.9	78.2	84.4	78.6	77.1	75.9	76.7	79.8	77.5	82.1	81	77.5	71.7	73.6	74.8	71.7	
	-81.3	-80.2	-87.2	-84.4	-79.8	-77.9	-77.5	-82.1	-79	-83.7	-82.9	-79.4	-74	-75.5	-75.1	-74.4	
3B	69.6	68.1	80.3	78.7	69.6	71.2	71.2	71.2	71.2	84.8	78.7	66.6	65.1	72.7	56	54.5	
	-72.7	-71.2	-84.8	-84.8	-71.2	-77.2	-75.7	-74.2	-74.2	-90.9	-84.8	-72.7	-69.6	-75.7	-62.1		
3C	75.9	75.9	80.3	77.9	75.4	75.2	75.4	75.9	75.5	80.6	80.6	75.7	72.4	71.4	71.9	72.8	
	-77.5	-78.8	-82.6	-82.5	-79.2	-77.4	-77	-79.2	-79.7	-83.7	-82.5	-79.9	-73.5	-74.1	-73.7	-73.7	
3D	76.9	77.6	83.6	78.2	77.1	78.2	78.6	77.5	77.7	83.7	83.8	77.4	72.2	72.9	73	73.3	
	-77.6	-79	-84.6	-79.2	-79.1	-78.9	-80	-78.2	-78.8	-84.1	-84.6	-78.2	-73.3	-73.2	-73.3	-74.6	

为了进一步阐明上海CVA4代表株可能存在重组,使用Similarity Plots软件将EV-A原型毒株作为参考序列和5株上海CVA4代表株进行重组分析。结果显示上海CVA4代表株在P1区域与CVA4原型毒株表现出高度相似性,而在5'UTR区、P2和P3区,除了CVA4原型株外,上海CVA4代表株与CVA5、CVA6、CVA14和CVA16也有高度相似性(图3A)。bootscan分析也证实在5'UTR区与CVA6原型株存在约250 bp的重组区域(图3B)。bootscan分析在3C

区存在3种模式的重组现象:1个健康儿童(843-2021)CVA4代表株和2个环境污水(HJ1210-2021, HJ1232-2021)CVA4代表株在3C区的前半段与CVA5原型株约250 bp的重组,在3C区的后半段与CVA6存在约200 bp的重组;1个健康儿童(845-2021)CVA4代表株与CVA5原型株间存在约300 bp的重组区域(图3B);1株健康儿童(847-2021)CVA4代表株与CVA6原型株间存在约250 bp的重组区域。



注:○分离自污水的 CVA4 代表株;●分离自健康儿童粪便的 CVA4 代表株;▲CVA4 High Point 原型株。

图 2 基于上海 CVA4 代表株和 EV-A 原型株构建的全基因组(A)和 P1(B)、P2(C)、P3(D)区系统进化树

Notes: ○CVA4 representative strain isolated from sewage in this study; ●CVA4 representative strain isolated from healthy children in this study; ▲CVA4 prototype High Point strain.

Fig. 2 The phylogenetic tree based on the whole genome (A) and P1 (B), P2 (C), P3 (D) regions constructed by 5 representative Shanghai strains of CVA4 and EV-A prototype strains

讨论

近年来随着研究的不断深入,越来越多的报道表明 CVA4 可引起 HFMD、HA、AFP 等疾病,还能引起一定比例的流感样病例^[8,15]。本次从 GenBank 下载的全球 428 条 CVA4 参考序列中有 18 条来自发热病例。EV 也被认为是我国儿童呼吸道感染的重要病原体之一。目前对于 EV 的监测主要来自于 EV 相关的疾病监测(HFMD、HA 和 AFP)和环境污水监测。环境污水监测即定期监测污水中 EV 的循环情况和流行趋势。2003 年,世界卫生组织(World Health Organization, WHO)在全球脊灰消灭计划(Global Polio Eradication Initiative, GPEI)中提出将环境污水监测作为 AFP 病例监测的一种补充方法^[16],用以评估人群中 EV 流行特征,对可能出现的流行或暴发的 EV 优势毒株提供数据参考。

在上海环境污水监测中发现,2013-2018 年只分离出 1 株 CVA4^[11,17],而 2020-2021 年多次检测到 CVA4,并获得 4 株 CVA4。本研究将 2020-2021 年上海环境污水和健康儿童粪便标本中分离获得的 9 株 CVA4 进行全基因组序列分析,了解 CVA4 在人群中的流行情况,探讨环境污水和健康儿童监测中 CVA4

的基因特征。

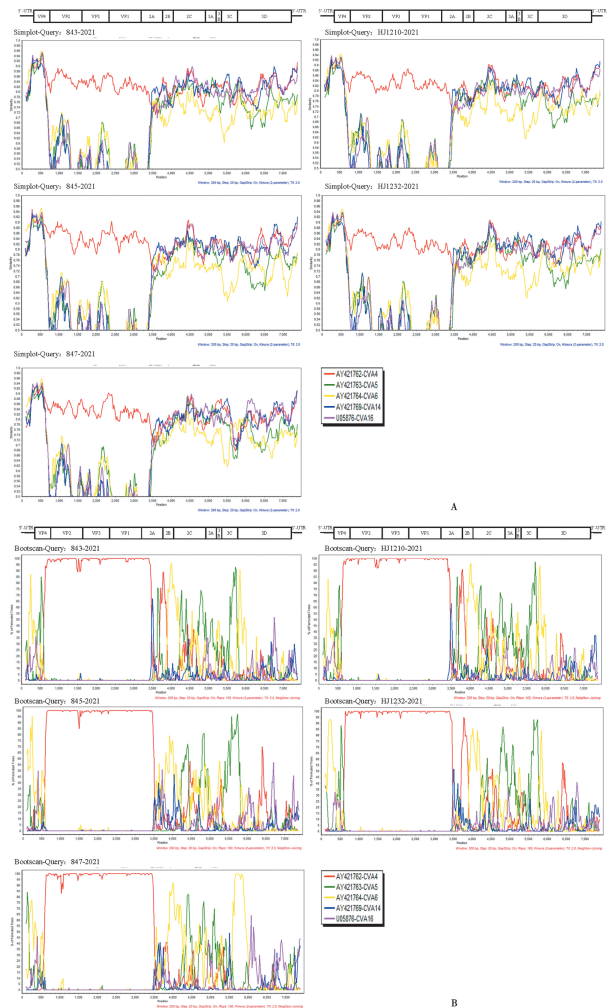


图 3 上海 CVA4 代表株与 CVA4、CVA5、CVA6 和 CVA16 原型株的相似性图(A)和 bootscan 分析图(B)

Fig. 3 Similarity plot(A) and bootscan(B) analysis of representative strains of Shanghai CVA4 with prototype strains of CVA4, CVA5, CVA6 and CVA16

基于全长 VP1 构建的系统进化树显示,我国 CVA4 的优势基因亚型为 C2 基因亚型,而自 2006 年以后 C2 基因亚型中的 Cluster3 (绿色)成为国内的优势分支。在 Cluster3 分支中已经有多个小分支,提示 CVA4 的遗传多样性。本研究中的 5 个健康儿童 CVA4 分离株和 4 个环境污水 CVA4 分离株均为 C2 基因亚型,与部分 HFMD、AFP 和 HA 病例的亲缘关系较近。C2 基因亚型 CVA4 的 VP1 参考序列中 HFMD 病例相关的 CVA4 占 62.7%(81/129),AFP 病例相关的 CVA4 占 17.8%(23/129),而 GenBank 中 HA 病例和健康人的 CVA4 数据信息较少。本研究中的 CVA4 分离株序列可以丰富我国 CVA4 数据库不同标本类型的数据信息。

研究表明,属于小 RNA 病毒的 EV 容易发生基因重组和突变,尤其是在编码非结构蛋白(如小活性分子和酶)区域发生重组,可能导致病毒对环境适应性和

疾病严重程度的改变^[18-20]。本研究中,5株CVA4基因组在P1区与CVA4原型呈现高度的相似性,表明P1区是EV中相对保守的区域,根据VP1区进行型别划分仍然比较可靠。然而,在非结构区域发现了与其他EV的重组现象。3个健康儿童CVA4代表株和2个环境污水CVA4代表株在5'UTR区域均与CVA6有重组区域,并在P3的3C区域与CVA5和CVA6有3种模式的重组。有研究显示C2基因亚型的重症病例HFMD存在3C和3D区域与CVA5发生重组^[2]。提示要加强关注和研究CVA4重组与疾病的相关性。

本研究从环境污水和健康儿童粪便中检出的C2基因亚型CVA4重组株,虽尚未有本市暴发或聚集性疫情的报道,但该重组株已经在上海存在了一段时间。除了监测EVA71和CVA16外,需要加强对CVA4在内的其他日益流行的EV病原体的监测。在开展CVA4引起的相关疾病研究中,应关注非结构蛋白区域的重组现象,优势是P3区域的监测,进一步研究健康人和病例之间的CVA4全基因特征。环境污水监测仍是补充病例监测中无法检测到的隐性感染的较好方式,从而更好地了解EV的遗传进化动态,为疫苗的研发、相关疾病的防控提供数据支撑。

【参考文献】

- [1] 刘嘉婧,王嘉瑜,周艳秋,等. 2017-2019年上海市疱疹性咽峡炎病原学分析[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2021,35(4):437-440.
- [2] Ji TJ,Guo Y,Lv LK,et al. Emerging recombination of the C2 sub-genotype of HFMD-associated CV-A4 is persistently and extensively circulating in China[J]. Sci Rep,2019,9(1):13668.
- [3] 王东艳,徐艺,张勇,等. 陕西省急性弛缓性麻痹病例中柯萨奇病毒A组4型的基因特征[J]. 病毒学报,2016,32(2):145-149.
- [4] Akuzawa N,Harada N,Hatori T,et al. Myocarditis,hepatitis, and pancreatitis in a patient with coxsackievirus A4 infection:a case report[J]. Virol J,2014,11(1):3.
- [5] Guo WP,Chen GQ,Xie GC,et al. Mosaic genome of Human Coxsackievirus A4 associated with herpangina and HFMD in Yancheng,China,2016 and 2018[J]. Int J Infect Dis,2020,96:538-540.
- [6] Wang M,Li J,Yao MX,et al. Genome analysis of Coxsackievirus

- A4 isolates from hand,foot, and mouth disease cases in Shandong,China[J]. Front Microbiol,2019,10:1-10.
- [7] Li W,Gao HH,Zhang Q,et al. Large outbreak of herpangina in children caused by enterovirus in summer of 2015 in Hangzhou, China[J]. Sci Rep,2016,18(6):e35388.
- [8] 张燕,王冬月,张华,等. 一起柯萨奇病毒A4型引起的幼儿园流感样暴发疫情[J]. 江苏预防医学,2021,32(5):620-621.
- [9] 连宪强,王文祥,余玲玲. 一起由柯萨奇病毒A组引起的呼吸道感染疫情病原分子特征分析[J]. 河南预防医学杂志,2021,32(2):100-103.
- [10] Li J,Ni N,Cui YN,et al. An outbreak of a novel recombinant Coxsackievirus A4 in a kindergarten,Shandong province,China, 2021[J]. Emerg Microbes Infect,2022,11(1):2207-2210.
- [11] 李云逸,陆菁,杨玉颖,等. 2015-2018年上海市环境污水中非脊髓灰质炎肠道病毒的分布及柯萨奇病毒B5的分子特征[J]. 疾病监测,2019,34(12):1089-1095.
- [12] WHO. Polio laboratory manual [M]. Geneva,Switzerland, 2004.
- [13] Rotbart HA. Enzymatic RNA amplification of the enteroviruses [J]. J Clin Microbiol,1990,28(3):438-442.
- [14] Rico-Hesse R,Pallansch MA,Nottay BK,et al. Geographic distribution of wild poliovirus type 1 genotypes[J]. Virol,1987,160(2):311-322.
- [15] Garcia J,Espejo V,Nelson M,et al. Human rhinoviruses and enteroviruses in influenza-like illness in Latin America[J]. Virol J, 2013,10(1):1-10.
- [16] WHO. Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation [M]. Switzerland,2003.
- [17] 李云逸,陆菁,王秀芝,等. 2013-2014年上海市污水中人类肠道病毒的基因型分布[J]. 中华预防医学杂志,2017,51(2):154-159.
- [18] Hu YF,Yang F,Du J,et al. Complete genome analysis of coxsackievirus A2, A4, A5, and A10 strains isolated from hand, foot, and mouth disease patients in China revealing frequent recombination of human enterovirus A[J]. J Clin Microbiol,2011, 49(7):2426-2434.
- [19] Claire M,Marie-Line J,Isabelle P,Joffret,et al. Evolution and Emergence of Enteroviruses through Intra- and Inter-species Recombination;Plasticity and phenotypic impact of modular genetic exchanges in the 5' untranslated region[J]. Plos pathog,2015, 11(11):e1005266.
- [20] Santti J,Hyypia T,Kinnunen L,et al. Evidence of recombination among enteroviruses[J]. J Virol,1999,73(10):8741-8749.

【收稿日期】 2023-02-21 【修回日期】 2023-05-06