

DOI:10.13350/j.cjpb.240608

• 论著 •

柯萨奇病毒 B 组 5 型山东分离株基因特征分析*

曹梦圆^{1,2}, 崔亚楠^{1,3,4}, 王敏⁵, 姚雪¹, 韦庆娟⁶, 胡波¹, 邢薇佳^{1,4}, 史卫峰^{7,8**}, 李娟^{1,2**}

(1. 山东第一医科大学(山东省医学科学院)山东省高等学校新发传染病重点实验室, 山东泰安 271000; 2. 山东第一医科大学(山东省医学科学院)临床与基础医学院(基础医学研究所)病原生物学系; 3. 泰安市疾病预防控制中心; 4. 山东第一医科大学(山东省医学科学院)公共卫生与健康管理学院; 5. 济南市儿童医院; 6. 泰安市妇幼保健院; 7. 上海交通大学医学院附属瑞金医院; 8. 上海交通大学医学院上海市病毒研究院)

【摘要】 目的 探明山东 11 株柯萨奇病毒 B 组 5 型(CVB5)的全基因组特征,探讨 CVB5 病毒遗传进化规律。 **方法**

采集 2020 年山东省手足口病患者的粪便样本,通过临床样本荧光定量检测、病毒分离、高通量和一代测序验证,共获得 11 株 CVB5 分离株,同时结合 GenBank 公共数据库中收录的 CVB5 病毒株全长基因组和结构蛋白 VP1 基因序列,构建最大似然系统进化树,研究 CVB5 基因特征和遗传进化规律。 **结果** 11 株 CVB5 分离株全长基因组呈高度核苷酸和氨基酸相似性(>99.9%),与多数 2008-2020 年我国流行毒株均位于全基因组进化树的 Group 4 分支,且与 2013 年江苏省分离株 417 核苷酸相似性最高,为 96.8%;11 株 CVB5 分离株与 Group 4 参考株相比,P3 区 3A、3B、3C 和 3D 基因核苷酸同源性均低于 P1 和 P2 区其他基因,且多为同义突变;11 株 CVB5 分离株 VP1 基因位于我国主要流行亚型即 C4 基因亚型中,与 2018 年山东省分离株 SWG14、SWG44、JN18120 亲缘关系较近,核苷酸同源性为 96.1%~98.2%。 **结论** CVB5 毒株在我国多地持续流行,11 株山东分离株同国内多数 CVB5 株的全基因组及 VP1 基因均位于同一进化分支,说明 11 株分离株均为近期国内流行株,它们所在 Group 4 为国内优势流行分支,C4 基因亚型为国内 VP1 基因流行亚型。

【关键词】 柯萨奇病毒 B 组 5 型(CVB5);手足口病;全基因组;VP1;遗传进化

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2024)06-0659-06

[Journal of Pathogen Biology. 2024 Jun.;19(6):659-664,670.]

Genomic characterizations of coxsackievirus B5 strains isolated from Shandong Province, China

CAO Mengyuan^{1,2}, CUI Ya'nan^{1,3,4}, WANG Min⁵, YAO Xue¹, WEI Qingjuan⁶, HU Tao¹, XING Weijia^{1,4}, SHI Weifeng^{7,8}, LI Juan^{1,2} (1. Key Laboratory of Emerging Infectious Diseases in Universities of Shandong, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences, Tai'an 271000, Shandong, China; 2. Department of Pathogen Biology, School of Clinical and Basic Medical Sciences, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences; 3. Taian Center for Disease Control and Prevention; 4. School of Public Health, Shandong First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences; 5. Jinan Children's Hospital; 6. Taian Maternal and Child Health Hospital; 7. Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine; 8. Shanghai Institute of Virology, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine)***

【Abstract】 Objective To investigate the complete genome characteristics of 11 coxsackievirus B5 (CVB5) strains isolated from Shandong Province, and to explore the genetic evolutionary patterns of CVB5. **Methods** Fecal samples from hand, foot and mouth disease patients in Shandong Province in 2020 were collected. Through RT-qPCR amplification, virus isolation, high-throughput sequencing, and Sanger sequencing, a total of 11 CVB5 isolates were identified. All complete genome sequences and the full-length VP1 gene sequences of CVB5 strains available from GenBank were downloaded as reference sequences. Multiple sequence alignment was performed with MAFFT v7.490. The maximum likelihood (ML) phylogenetic tree was constructed using RaxML v8.2.12, to analyze the viral genomic characteristics. **Results** Full-length genomes of the 11 CVB5 strains from the present study showed high nucleotide and amino acid identities (>99.9%). Phylogenetic analysis revealed that they clustered with the majority of Chinese strains within Group 4 circulating between 2008 and 2020. They shared the highest nucleotide similarity of 96.8% with the strain 417 from Jiangsu

* **【基金项目】** 国家自然科学基金(No. 81902065);山东省自然科学基金(No. ZR2018PH034);泰山学者工程专项(No. tsqn202211217);山东第一医科大学“学术提升计划”(No. 2019QL006)。

** **【通讯作者】** 史卫峰, E-mail: shiwf@ioz.ac.cn. 李娟, E-mail: lijuan@sdfmu.edu.cn

【作者简介】 曹梦圆(1999-),女,山东济南人,在读硕士研究生,主要研究方向:肠道病毒分子流行病学及致病机制。
E-mail:17861525971@163.com

Province in 2013. Compared to the CVB5 reference strains in Group 4, the nucleotide similarities of the 3A, 3B, 3C, and 3D genes in the P3 region of the 11 CVB5 strains were lower than those of other genes in the P1 and P2 regions, and there were numerous synonymous mutations in the region P3. The VP1 gene sequences of the 11 CVB5 strains were classified into the predominant branch in China over the past decade namely the subclade C4. They were closely related to the isolates SWG14, SWG44, and JN18120 from Shandong Province in 2018, with nucleotide similarities of 96.1%-98.2%.

Conclusion Our results highlight the constant circulation of CVB5 in China. The 11 CVB5 strains from Shandong Province showed high nucleotide similarity to most domestic CVB5 strains, and were placed within the evolutionary branch with the majority of the CVB5 strains circulating in China. This suggests that they belong to the Group 4 of the complete genome and the subclade C4 of the VP1 gene, and represent the recent prevalent strains in China.

【Keywords】 Coxsackievirus B5; hand, foot and mouth disease; complete genome; VP1; phylogenetic analysis

柯萨奇病毒 B 组 5 型 (Coxsackievirus B5, CVB5) 是一种正义单链 RNA 病毒, 属于肠道病毒属 (*Enterovirus*)。CVB5 全基因组编码一个多聚蛋白, 该多聚蛋白进一步水解为 P1、P2 和 P3 三个片段, 其中 P1 区编码 VP4、VP2、VP3 和 VP1 结构蛋白, P2 区编码 2A、2B 和 2C 非结构蛋白, P3 区编码 3A、3B、3C 和 3D 非结构蛋白^[1]。

CVB5 可引起呼吸道感染、病毒性心肌炎、心包炎、无菌性脑膜炎、急性弛缓性麻痹、手足口病及 I 型糖尿病^[2]等多种疾病, 严重时可致人死亡^[3], 其所引起的无菌性脑膜炎和病毒性脑炎在亚洲、欧洲、非洲、北美洲和南美洲^[4]都有暴发或流行。2014 年本实验室在山东省无菌性脑炎患儿粪便中分离并鉴定出一株 CVB5 毒株^[5]。2014 年以后, 我国云南、福建以及贵州^[6-8]等地均有 CVB5 毒株的检出, 病例大多集中于手足口病、无菌性脑膜炎和急性弛缓性麻痹。值得注意的是, 在健康儿童^[9]和成人粪便样本^[10]中也有 CVB5 毒株的检出。因此, CVB5 依然在全世界持续流行, 加之健康婴幼儿能够携带 CVB5 病毒, 对 CVB5 持续开展病原学监测和基因组分析非常重要。

2020 年本实验室对山东省部分地区手足口病样本持续进行病原体检测, 成功分离并鉴定到 11 株 CVB5 毒株, 并通过高通量测序组装获得病毒全长基因组序列, 通过同源性比较及系统发育研究, 探究了 CVB5 分离株全基因组和结构蛋白 VP1 基因的进化特点及分子遗传特征, 增加了对 CVB5 病毒遗传变异的认识, 为防控 CVB5 等肠道病毒引起的手足口病提供了科学依据。

材料与方法

1 材料

根据卫生部发布的《手足口病预防控制指南》(2009 版)^[11], 采集 2020 年 6-10 月山东省部分地区儿童医院门诊手足口病患儿粪便标本共 228 份, 在无菌容器内冷藏运送至实验室, -80℃ 保存。

2 方法

2.1 病毒分离鉴定 取 2 g 粪便样本置于 15 mL 离心管中, 加入 10 mL 磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffer solution, PBS), 加入 1 g 磁珠和 1 mL 氯仿后剧烈震荡 20 min 直至样本完全破碎, 1 500 g 4℃ 离心 20 min 后取上清置于新无酶管中。将 200 μL 粪便悬液接种人喉鳞癌细胞 (Human laryngeal carcinoma cell line 2, Hep-2) 细胞, 待细胞病变程度达 90% 以上进行收毒。连续传代 3 次, 并取第 3 次传代后收取的病毒液通过 Real-time PCR 鉴定肠道病毒, 具体步骤为: 按照 MagaBio plus Virus DNA/RNA Kit 试剂盒 (购自中国杭州 Bioer Technology 公司) 说明书提取核酸, 使用 Rever Tra Ace qPCR RT Kit 试剂盒 (购自中国上海 TOYOBO 公司) 进行反转录获得 cDNA, 使用肠道病毒通用上游引物^[12] (5' - 3'): CCTGAATGCG-GCTAATCC; 下游引物 (5' - 3'): TTGTCACCAT-WAGCAGYCA; 探针序列: FAM-CCGACTACTTT-GGGWGTCCGTGT-BHQ1 检测; 反应体系总体积为 25 μL, 其中包括: 2×Pro Taq HS Probe Premix (购自中国上海 AG 公司) 12.5 μL, 荧光定量上游引物 F (10 μmol/L) 1 μL, 下游引物 R (10 μmol/L) 1 μL, 探针 (10 μmol/L) 1 μL, 无 RNA 酶水 7.5 μL, 待测 cDNA 模板 2 μL; 荧光定量 PCR 反应条件: 95℃ 10 min; 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 40 个循环。每个循环结束后检测荧光, 同时设立阳性和阴性对照, 通过循环阈值 (Cycle threshold, Ct) 和扩增曲线判读结果, Ct 值 ≤ 35 的样本判定为阳性^[11]。荧光定量 PCR 结果为肠道病毒阳性的细胞培养物, 送至北京诺禾致源科技股份有限公司进行高通量测序。

2.2 全基因组扩增验证 为验证高通量测序结果, 根据组装的 JN20108H 毒株全长序列设计扩增引物 (表 1), 对保存的 CVB5 样本进行 PCR 扩增。扩增产物送擎科生物公司进行一代测序, 最终基因组序列以验证结果为准。引物设计使用软件 Primer Premier, 由上海生工生物工程技术有限公司合成。

表 1 CVB5 一代测序引物
Table 1 Sanger sequencing primers of CVB5

引物 Primer	序列(5'-3') Sequence	位置(bp) Position
F1	CCTAATCTTTATCTTAACGC	637-6587
R1	TTATCCATGGGCACACTATT	1493-1512
F2	AACCCGACCAGAAGAGCTTG	1296-1315
R2	AGCCGACACAAAACACAGGA	2289-2308
F3	GGCAACGGGTAAATTCTCTGC	2035-2054
R3	AAACTTCGCCCACCCATCAT	2958-2977
F4	AGCAGTCCACCATAACAAGGC	2754-2773
R4	GCACATCAGCAAAGCCAACA	3616-3635
F5	GTCAGTACAACCACAGCCCA	3347-3366
R5	AAGGGCGAACACTCTCTTGG	4264-4282
F6	CCATGGCTGAGCGACAAAAC	3954-3973
R6	AAGGGGGCAGCATCTTTTGA	4803-4822
F7	GACGTGTCCCTGTTCTGTCA	4526-4545
R7	TGCCATCCTTATCCACCAGC	5473-5492
F8	AGACAAGCCAAGGTGCAAGG	5273-5292
R8	ACCTTTTCCGCCGATCTGAG	6323-6342
F9	ACTGGCCACCCTAGACATCA	6091-6110
R9	AATAGGCACAGGGATCGCAC	7082-7101
F10	GTGAAGAGTCTATTGAGCTAGTTGG-	347-374
R10	TACTGTAACCACACTCCTCTGCTG	885-909

2.3 生物信息学分析 使用 BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)对本研究所获毒株进行同源检索。自 GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)公共数据库下载 CVB5 全基因组序列及 VP1 基因全长序列作为参考序列,使用 MAFFT v7.490 分别进行核苷酸和氨基酸序列比对,使用 RaxML v8.2.12 构建系统发育树,系统发育分析方法为最大似然法(Maximum likelihood, ML),最佳核苷酸替代模型为 GTR(General time reversible model),Bootstrap 值设置为 1000。

结 果

1 病毒分离与鉴定

通过对 2020 年 6~10 月山东省部分地区儿童医院门诊手足口病患儿粪便标本进行 Hep-2 细胞培养、Real-time PCR 及高通量测序分析,结果从 228 份样本中成功分离到 11 株 CVB5 病毒株。病毒株均采集于山东省内,具体地点包括德州(2 株)、济南(8 株)和菏泽(1 株),患儿性别比例为 5:6(男:女),患儿年龄均<7 岁。信息见表 2。

2 全基因组系统进化分析

通过对扩增验证后的病毒基因序列进行 BLAST 检索,鉴定本研究 11 株分离株均为 CVB5 毒株,核苷酸序列长度为 7 185~7 276 bp,5'和 3'非翻译区(Untranslated Regions, UTR)之间的开放阅读框(Open reading frame, ORF)长度均为 6 558 bp,编码一个含 2 185 个氨基酸的多聚蛋白,病毒全基因组结构符合肠道病毒特征。11 株序列间核苷酸和氨基酸同源性

均较高,达到 99.9%~100%。

以 GenBank 公共数据库中收录的 83 条 CVB5 全基因组序列为参考序列,对 11 株 CVB5 分离株进行系统发育分析(图 1)。结果显示,全基因组系统发育树可划分为 5 个 Group: Group 1(n=2)、Group 2(n=6)、Group 3(n=5)、Group 4(n=36)和 Group 5(n=45)。Group 1-3 包含 CVB5 数量较少,其中 Group 1 包括 CVB5 原型株 Faulkner(1952 年)和 1 株美国分离株(2009 年),Group 2 包括日本(2006-2007 年)、韩国(2000 年)、中国(1983 年)和罗马尼亚(1970 年)分离株,Group 3 包括中国(2009-2010 年)、澳大利亚(2007 年)和德国(2010 年)分离株。Group 4 和 Group 5 为近年来 CVB5 主要流行分支。Group 4 中 91.7%(33/36)为我国分离株(2008-2020 年),其余为美国(2015 年)、日本(2015 年)和危地马拉(2019 年)分离株;Group 5 中仅 13.3%(6/45)为我国分离株(1972-2019 年),86.7%(39/45)为澳大利亚(2008、2017 年)、法国(1984、1993 年)、瑞士(2015 年)、美国(1970-2015 年)、日本(2008-2018 年)等国家分离株。除了毒株 HB_HS,2013 年以后国内 CVB5 分离株仅位于 Group 4 分支,包括本研究分离鉴定到的 11 株山东分离株。另外,该 11 株 CVB5 分离株与 2013 年江苏省分离株 319、417,2015 年日本分离株 B509,2017 年广东省分离株 AFP229 和 2018 年国内分离株 B005 聚集于同一小分支,核苷酸同源性为 95.1%~96.8%。

表 2 11 株 CVB5 分离株流行病学信息
Table 2 Epidemiological information of the 11 CVB5 isolates

毒株名 Strains	采集地点 Collected location	采集日期 Collected date	患儿性别 Sex	患儿年龄 Age
DZ20198H	德州	2020/9/1	男	1 岁
JN20203H	济南	2020/9/3	男	2 岁
DZ20006H	德州	2020/8/21	男	2 岁
JN20050H	济南	2020/10/11	女	7 岁
JN20108H	济南	2020/9/22	女	3 岁
JN20048H	济南	2020/6/26	女	2 岁 3 月
JN20047H	济南	2020/7/25	女	2 岁 3 月
JN20044H	济南	2020/7/8	女	1 岁 11 月
JN20040H	济南	2020/6/24	女	1 岁 4 月
JN20045H	济南	2020/10/5	男	1 岁 3 月
HZ20110H	菏泽	2020/9/3	男	1 岁

3 同源性分析

比较本文分离株与 Group 4 中参考序列同源性,结果显示,11 株 CVB5 分离株与 2013 年江苏省分离株 417(GenBank 序列登录号:KY303900)核苷酸同源性最高,为 96.8%。我们进一步比较了 11 株分离株与 Group 4 中参考序列各个 ORF 区段的核苷酸和氨基酸同源性(表 3)。结果表明,P3 区 3A、3B、3C 和 3D 基因核苷酸同源性均低于 P1 和 P2 区其他基因,分别

为 78.3%~98.1%、80.3%~100%、76.5%~96.4%、79.8%~96.2%，氨基酸同源性分别为 94.4%~98.9%、95.5%~100%、95.6%~100%、96.3%~99.6%。

4 VP1 基因系统进化分析

结合 GenBank 公共数据库中收录的 921 条 CVB5 VP1 参考序列,对本研究分离鉴定的 11 株 CVB5 病毒 VP1 基因进行系统发育分析。参考前期研究中我们对 CVB5 毒株 VP1 基因系统进化树的分支划分,本研究中 VP1 进化树仍划分为 A~D 4 个基因型(图 2)。4 个基因型核苷酸的组间距离分别为:21.2%±1.7%(A 与 B)、21.8%±1.7%(A 与 C)、28.1%±2.2%(A 与 D)、19.4%±1.4%(B 与 C)、26.4%±2.0%(B 与 D)、26.2%±1.9%(C 与 D)(表 4)。其中基因型 A 包括 CVB5 原型株 Faulkner、2001 年欧洲分离株以及 2009 年北美洲分离株;基因型 B 主要包括 1983-2011 年亚洲分离株以及 1970-2006 年欧洲分离株;基因型 C 主要包括 1998-2020 年亚洲分离株、1996-2015 年欧洲分离株、2015-2019 年北美洲分离株、2007 年大洋洲分离株以及 2017 年南美洲分离株;基因型 D 主要包括 1972-2018 年亚洲分离株、1973-2019 年欧洲分离株,1970-2019 年北美洲分离株、1991-2017 年大洋洲分离株以及 2007-2016 年南美洲分离株(表 5)。上述结果表明,CVB5 在全球广泛流行,欧洲和亚洲分离株数量最多(90.4%);2015 年后

在亚洲和北美洲持续流行的 CVB5 VP1 基因型包括基因型 C 和 D,国内多为基因型 C,2015 年后欧洲仅为基因型 D。



Fig. 1 Phylogenetic tree of CVB5 based on whole genome sequences

表 3 11 株 CVB5 分离株与其他参考毒株基因组各区段同源性 (%)
Table 3 Genetic identities of the 11 CVB5 isolates and other reference strains across different gene regions

毒株 Strains		编码区 Open reading frame										
		VP4	VP2	VP3	VP1	2A	2B	2C	3A	3B	3C	3D
DZ20006H	核苷酸	89.96~98.55	90.42~96.42	88.66~97.76	89.87~97.29	88.67~96.89	90.91~97.98	83.99~97.16	78.65~98.13	80.30~100	76.50~96.36	79.80~96.18
	氨基酸	97.10~100	97.70~100	88.66~100	96.47~99.29	95.33~99.33	94.95~100	97.26~99.70	94.38~98.88	95.46~100	95.63~100	96.32~99.57
JN20040H	核苷酸	89.96~98.55	90.42~96.42	88.66~97.76	89.87~97.29	88.67~96.89	90.91~97.98	83.99~97.16	78.65~98.13	80.30~100	76.50~96.36	79.80~96.18
	氨基酸	97.10~100	97.70~100	88.66~100	96.47~99.29	95.33~99.33	94.95~100	97.26~99.70	94.38~98.88	95.46~100	95.63~100	96.32~99.57
HZ20110H	核苷酸	89.96~98.55	90.42~96.42	88.66~97.76	89.75~97.17	88.67~96.89	90.91~97.98	83.99~97.16	78.65~98.13	80.30~100	76.50~96.36	79.80~96.18
	氨基酸	97.10~100	97.70~100	88.66~100	96.11~98.94	95.33~99.33	94.95~100	97.26~99.70	94.38~98.88	95.46~100	95.63~100	96.32~99.57
JN20044H	核苷酸	89.96~98.55	90.42~96.42	88.66~97.76	89.87~97.29	88.67~96.89	90.91~97.98	83.99~97.16	78.65~98.13	80.30~100	76.50~96.36	79.80~96.18
	氨基酸	97.10~100	97.70~100	88.66~100	96.47~99.29	95.33~99.33	94.95~100	97.26~99.70	94.38~98.88	95.46~100	95.63~100	96.32~99.57
JN20045H	核苷酸	89.96~98.55	90.42~96.42	88.66~97.76	89.87~97.29	88.67~96.89	90.91~97.98	83.99~97.16	78.65~98.13	80.30~100	76.50~96.36	79.80~96.18
	氨基酸	97.10~100	97.70~100	88.66~100	96.47~99.29	95.33~99.33	94.95~100	97.26~99.70	94.38~98.88	95.46~100	95.63~100	96.32~99.57
JN20047H	核苷酸	89.96~98.55	90.42~96.42	88.66~97.76	89.75~97.17	88.67~96.89	90.91~97.98	83.99~97.16	78.65~98.13	80.30~100	76.50~96.36	79.80~96.18
	氨基酸	97.10~100	97.70~100	88.66~100	96.11~98.94	95.33~99.33	94.95~100	97.26~99.70	94.38~98.88	95.46~100	95.63~100	96.32~99.57
JN20108H	核苷酸	89.96~98.55	90.42~96.42	88.66~97.76	89.87~97.29	88.67~96.89	90.91~97.98	83.99~97.16	78.65~98.13	80.30~100	76.50~96.36	79.80~96.18
	氨基酸	97.10~100	97.70~100	88.66~100	96.47~99.29	95.33~99.33	94.95~100	97.26~99.70	94.38~98.88	95.46~100	95.63~100	96.32~99.57
JN20203H	核苷酸	89.96~98.55	90.42~96.42	88.66~97.76	89.87~97.29	88.67~96.89	90.60~97.65	83.99~97.16	78.28~97.75	80.30~100	76.50~96.36	79.80~96.18
	氨基酸	97.10~100	97.70~100	88.66~100	96.47~99.29	95.33~99.33	93.94~98.99	97.26~99.70	94.38~98.88	95.46~100	95.63~100	96.32~99.57
DZ20198H	核苷酸	89.96~98.55	90.42~96.42	88.66~97.76	89.81~97.23	88.67~96.89	90.91~97.98	83.82~96.97	78.65~98.13	80.30~100	76.50~96.36	79.80~96.18
	氨基酸	97.10~100	97.70~100	88.66~100	96.13~98.96	95.33~99.33	90.91~97.98	82.89~85.25	94.38~98.88	95.46~100	95.63~100	96.32~99.57
JN20050H	核苷酸	89.96~98.55	90.42~96.42	88.66~97.76	89.81~97.11	88.67~96.89	90.91~97.98	83.99~97.16	78.65~98.13	80.30~100	76.50~96.36	79.80~96.18
	氨基酸	97.10~100	97.70~100	88.66~100	96.11~98.94	95.33~99.33	94.95~100	97.26~99.70	94.38~98.88	95.46~100	95.63~100	96.32~99.57
JN20048H	核苷酸	89.96~98.55	90.42~96.42	88.66~97.76	96.11~98.94	88.67~96.89	90.91~97.98	83.99~97.16	78.65~98.13	80.30~100	76.50~96.36	79.80~96.18
	氨基酸	97.10~100	97.70~100	88.66~100	96.11~98.94	95.33~99.33	94.95~100	97.26~99.70	94.38~98.88	95.46~100	95.63~100	96.32~99.57

将基因型 C 进一步划分为 C0~C45 个基因亚型^[5],国内分离株主要分布在 C3 和 C4 基因亚型中,但 2015 年以后国内未再检出 C3 基因亚型。本研究所分离到的 11 株 CVB5 毒株 VP1 序列均位于 C4 基因亚型,且聚集于同一小分支,核苷酸同源性为 99.8%~100%,它们与 2018 年山东省分离株 SWG14、SWG44、JN18120 亲缘关系较近,核苷酸同源性为 96.1%~98.2%。

表 4 CVB5 VP1 序列基因型 A-D 间的核苷酸遗传距离
Table 4 Nucleotide genetic distances between genotypes A-D of CVB5 VP1 gene sequences

基因型 Genotype	A	B	C	D
A		0.017	0.017	0.022
B	0.212		0.014	0.020
C	0.218	0.194		0.019
D	0.281	0.264	0.262	

注(Notes):斜体数字为标准误(Italic numbers are standard errors)。

表 5 CVB5 VP1 序列基因型 A-D 相关序列的年份、地点及数量信息
Table 5 Year, location, and quantity information of genotypes A-D related sequences of CVB5 VP1 gene

大洲 Continent	A			B			C			D		
	最早记录 Earliest record	最新记录 Latest Record	序列数 Sequence number	最早记录 Earliest record	最新记录 Latest Record	序列数 Sequence number	最早记录 Earliest record	最新记录 Latest Record	序列数 Sequence number	最早记录 Earliest record	最新记录 Latest Record	序列数 Sequence number
亚洲				1983	2011	27	1998	2020	383	1972	2018	28
欧洲	1998	2001	2	1970	2006	36	1996	2015	84	1973	2019	271
北美洲	2009	2009	1				2015	2019	8	1970	2019	25
大洋洲							2007	2007	1	1991	2017	14
南美洲							2017	2017	1	2007	2016	38

注(Notes):大洲顺序按照英文首字母排序,以上统计结果以本研究中纳入 VP1 系统进化树的序列为准(The order of continents is sorted alphabetically in English. The present statistical results are based on the sequences included in the VP1 phylogenetic tree in this study)。



▲ 代表实验室分离株 ● 标注为 SWG14、SWG44、JN18120 毒株
▲ represents laboratory isolates ● marked as SWG14, SWG44, JN18120 strains
图 2 基于 VP1 序列的 CVB5 进化树
Fig. 2 Phylogenetic tree based on CVB5 VP1 gene sequences

讨论

CVB5 因可导致人类神经系统疾病如无菌性脑膜炎、急性弛缓性麻痹、病毒性脑炎以及手足口病、心肌炎和糖尿病等而引起广泛关注,是 B 组柯萨奇病毒中的主要血清型之一^[13]。CVB5 在全球范围内流行,1999-2011 年韩国一项检测表明 CVB5 已经成为韩国第三位常见肠道病毒基因型^[14],在法国^[15]等地也持续有 CVB5 检出报道。在中国, CVB5 与多次儿童无菌性脑炎、病毒性脑炎等聚集性和散发性病例的发生相关。2005 和 2009 年山东省内两次暴发主要由 CVB5 引起的无菌性脑膜炎疫情^[16-17];2011 年河南省^[18]、2016-2018 年河北省^[19]和 2023 年云南省^[20]等地散发的脑炎病例中均有 CVB5 检出。2014 年本实验室^[5]在山东省无菌性脑炎患儿粪便中也曾鉴定到 CVB5 毒株感染。在本研究中自 2020 年 6~10 月在山东省采集的手足口病患儿粪便样本中分离出了 11 株 CVB5 毒株。因此, CVB5 在山东省尤其在婴幼儿中长期持续流行。

2008-2014 年 GenBank 数据库收录的 CVB5 全基因组仅 20 条^[5],到目前为止收录数量已增加至 83 条。基于病毒全基因组系统发育分析表明,全球流行的 CVB5 毒株已呈现一定的遗传多样性,演化为 Group 1-Group 5 分支,这五个分支毒株分离地点均覆盖多个国家或地区,提示存在 CVB5 毒株频繁跨地区传播,

导致各分支 CVB5 毒株在全球范围内流行。中国 CVB5 毒株全基因组在 Group 3、Group 4 和 Group 5 中均有分布。包括本研究发现的 11 株分离株在内的 2008-2020 年国内毒株大多位于 Group 4 中,说明 Group 4 为国内 CVB5 毒株全基因组优势流行分支。不同的是,Group 5 分支多为澳大利亚、法国、瑞士、美国、日本等国家分离株(86.7%),在国内或为有限传播(13.3%)。但考虑到 CVB5 毒株全基因组序列数量仍然有限,因此对 Group 5 分支 CVB5 毒株在国内的流行情况还需进一步关注。

CVB5 基因组为单股正链 RNA,结构蛋白 VP1-VP4 均由 P1 区编码,而病毒复制所需的非结构蛋白由 P2 和 P3 区编码^[1]。He 等^[4]发现相较于 P1 区,CVB5 毒株 P2 和 P3 区表现出显著差异。本研究 CVB5 分离株与 Group 4 中其他 CVB5 基因组比较,P3 区 3A、3B、3C 和 3D 基因明显不同,核苷酸同源性均低于其他蛋白编码区,即在 CVB5 毒株 P3 区表现出核苷酸遗传距离大于氨基酸遗传距离的现象,推测 CVB5 在 P3 区的核苷酸差异多为同义突变。非结构蛋白编码区频繁观察到同义突变这一现象,已在 CVA2、CVA4、CVA6、CVA10 和 CVA12 等多种亚型肠道病毒^[21]被观察到。许丹茵等^[22]在国内大陆 CVB5 流行株全基因组中也发现其进化过程有同义突变的积累。

结构蛋白 VP1 暴露在肠道病毒衣壳表面,是主要的表面抗原决定簇区,通常将编码 VP1 的基因作为肠道病毒分子分型的靶标序列^[23]。在前期研究中^[5],根据 CVB5 毒株 VP1 基因的系统进化特征,将该病毒 VP1 基因划分为 A~D 四个基因型,又将基因型 C 划分为 C0~C4 5 个基因亚型,这一分支命名系统同样适用于本研究 VP1 基因系统进化树。研究发现,截止目前,GenBank 数据库收录的全球 931 条 CVB5 毒株 VP1 基因以亚洲和欧洲分离株居多,这之前研究一致^[4],2003 年以后基因型 C 和基因型 D 在亚洲和欧洲持续流行,基因型 C 中 80.3%为亚洲分离株序列,基因型 D 中 72.1%为欧洲分离株序列,提示亚洲和欧洲 CVB5 毒株 VP1 基因或具有明显的基因型特征。近几年国内 CVB5 新分离株 VP1 基因也多位于基因型 C 中,最新序列记录截止到 2020 年,说明基因型 C 为当前国内 VP1 基因主要流行亚型,尤其近十年国内 CVB5 毒株 VP1 基因几乎全部分布在 C4 基因亚型中,这与前期研究所揭示的 C4 基因亚型为我国主要流行亚型的结论一致^[5]。前期研究还发现 C3、C4 在山东省共同流行^[5],而本研究结果显示,2011 年后 C3 基因亚型病毒在山东省及国内其他省份均没有再被检

出,提示山东省当前流行亚型或仅为 C4 基因亚型。另外,本研究所分离得到的 11 株山东分离株与近十年国内分离株的全基因组和 VP1 基因均在同一分支,表明本研究 11 株分离株为近期国内流行株。

综上,本研究基于 2020 年 11 株山东省 CVB5 临床样本分离株的遗传特征,总结了目前公共数据库所收录全球所有 CVB5 全基因组及 VP1 基因的系统进化特征,丰富了 CVB5 毒株的基因组库信息,增加了对 CVB5 毒株遗传进化特征的了解,为深入研究 CVB5 遗传变异机制及为相关疾病的防控提供了理论参考。

【参考文献】

- [1] Bedard KM, Semler BL. Regulation of picornavirus gene expression[J]. *Microbes Infect*, 2004; 6(7): 702-713.
- [2] Mone K, Lasrado N, Sur M, Reddy J. Vaccines against group B Coxsackieviruses and their importance[J]. *Vaccines*, 2023, 11(2): 274.
- [3] Flewett TH. Histological study of two cases of Coxsackie B virus pneumonia in children[J]. *J Clin Pathol*, 1965, 18(6): 743-746.
- [4] He Y, Wei H, Wei L, et al. Molecular epidemiology reveals the co-circulation of two genotypes of coxsackievirus B5 in China[J]. *Viruses*, 2022, 14(12): 2693.
- [5] 王敏, 韦庆娟, 李娟, 等. 2014 年山东省 1 株柯萨奇病毒 B5 分离株全基因组序列分析[J]. *中华预防医学杂志*, 2018, 52(2): 185-187.
- [6] 朱艳菊. 2009-2010 年云南省肠道病毒相关无菌性脑炎的分子流行病学研究[D]. 北京协和医学院, 2016.
- [7] 何春荣, 吴水新, 何云, 等. 2011-2013 年龙岩市手足口病流行病学及病原学特征分析[J]. *现代预防医学*, 2015, 42(17): 3079-3081.
- [8] 李俞亭. 贵州省部分地区手足口病流行病学及病原学研究[D]. 贵州医科大学, 2018.
- [9] 何云, 李美华, 廖亦红, 等. 2013、2014 年龙岩市健康儿童肠道病毒携带状况调查[J]. *预防医学论坛*, 2017, 23(4): 251-253.
- [10] 田会方, 张勇, 李秀娟, 等. 河北省石家庄市手足口病流行中健康人肠道病毒带毒情况及病原分析[J]. *病毒学报*, 2017, 33(3): 395-403.
- [11] 中华人民共和国卫生部. 手足口预防控制指南(2009 年版)[J]. *全科医学临床与教育*, 2010, 16(2): 125-127.
- [12] Zhang Z, Dong Z, Li J, et al. Protective efficacies of formaldehyde-inactivated whole-virus vaccine and antivirals in a murine model of coxsackievirus A10 infection[J]. *J Virol*, 2017, 91(13): e00333-17.
- [13] Rezig D, Fares W, Seghier M, et al. Update on molecular characterization of coxsackievirus B5 strains[J]. *J Med Virol*, 2011, 83(7): 1247-1254.
- [14] Hyeon JY, Hwang S, Kim H, et al. Accuracy of diagnostic methods and surveillance sensitivity for human enterovirus, South Korea, 1999-2011[J]. *Emerg Infect Dis*, 2013, 19(8): 1268-1275.
- [15] Antona D, Leveque N, Chomel JJ, et al. Surveillance of enteroviruses in France 2000-2004[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2007, 26(6): 403-412.

(下转 670 页)

全市监测阳性样本未能都获得全基因序列信息,因此进行本次分析的 11 株 CVA4 并不能揭示厦门市 2022 年所有该型病毒的分子生物学特征,故在以后的工作中应继续对其他肠道病毒进行血清分型和基因测序,以期能更好的了解厦门地区肠道病毒的病原谱组成及时发现重组株,为手足口病的防控预警工作提供数据支撑。

【参考文献】

- [1] Mirand A, Henquell C, Archimbaud C, et al. Outbreak of hand, foot and mouth disease/herpangina associated with coxsackievirus A6 and A10 infections in 2010, France: A large citywide, prospective observational study[J]. Clin Microbiol Infect, 2012, 18(5): E110-E118.

[2] Saguil A, Kane S, Lauters R, et al. Hand-foot-and-mouth disease: Rapid evidence review[J]. Am Fam Physician, 2019, 100(7): 408-414.

[3] Nayak G, Bhuyan SK, Bhuyan R, et al. Global emergence of enterovirus 71: A systematic review[J]. BeniSuef Univ J Basic Appl Sci, 2022, 11(1): 78.

[4] Wu Y, Yeo A, Phoon MC, et al. The largest outbreak of hand, foot and mouth disease in Singapore in 2008: the role of enterovirus 71 and coxsackievirus A strains[J]. Int J Infect Dis, 2010, 14(12): e1076-1081.

[5] Li JS, Dong XG, Qin M, et al. Outbreak of febrile illness caused by coxsackievirus A4 in a nursery school in Beijing, China[J]. Virol J, 2015, 18(12): 92.

[6] Li J, Ni N, Cui Y, 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.

[7] 董泽丰, 徐智, 慧王笛, 等. 苏州市一起聚集性人感染柯萨奇病毒 A 组 4 型基因特征[J]. 中华疾病控制杂志, 2023, 27(3): 363-367.

[8] 董泽丰, 徐智, 慧王笛, 等. 苏州市一起聚集性人感染柯萨奇病毒 A 组 4 型基因特征[J]. 中华疾病控制杂志, 2023, 27(3): 363-367.

[9] 董泽丰, 徐智, 慧王笛, 等. 苏州市一起聚集性人感染柯萨奇病毒 A 组 4 型基因特征[J]. 中华疾病控制杂志, 2023, 27(3): 363-367.

[10] 董泽丰, 徐智, 慧王笛, 等. 苏州市一起聚集性人感染柯萨奇病毒 A 组 4 型基因特征[J]. 中华疾病控制杂志, 2023, 27(3): 363-367.

[11] 董泽丰, 徐智, 慧王笛, 等. 苏州市一起聚集性人感染柯萨奇病毒 A 组 4 型基因特征[J]. 中华疾病控制杂志, 2023, 27(3): 363-367.

[12] 聂陶然. 手足口病重症及死亡病例流行特征及病原谱的研究[D]. 北京: 中国疾病预防控制中心. 2020.

[13] 张超, 曾竣, 王晶, 等. 2014-2019 年广西手足口病重症病例流行特征[J]. 医学动物防制, 2022, 38(6): 594-597.

[14] 杨溪, 姜黎黎, 周晓芳, 等. 2018-2021 年云南省手足口病病例柯萨奇病毒 A4 型流行株基因特征[J]. 中国疫苗和免疫, 2022, 28(6): 690-694.

[15] Muslin C, Mac Kain A, Bessaud M, et al. Recombination in enteroviruses, a multi-step modular evolutionary process[J]. Viruses, 2019, 11(9): 859.

[16] Nikolaidis M, Mimouli K, Kyriakopoulou Z, et al. Large-scale genomic analysis reveals recurrent patterns of intertypic recombination in human enteroviruses[J]. Virology, 2019, 526: 72-80.

[17] Zhang Y, Zhu Z, Yang W, et al. An emerging recombinant human enterovirus 71 responsible for the 2008 outbreak of hand foot and mouth disease in Fuyang City of China[J]. Virol J, 2010, 7: 94.

[18] 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.

【收稿日期】 2024-01-17 【修回日期】 2024-04-08

(上接 664 页)

[16] Liu N, Jia L, Yin J, et al. An outbreak of aseptic meningitis caused by a distinct lineage of coxsackievirus B5 in China[J]. Int J Infect Dis, 2014, 23: 101-104.

[17] 王海岩, 李岩, 徐爱强, 等. 柯萨奇 B5 病毒引起山东省一起无菌性脑膜炎暴发的鉴定及其亲缘进化分析[J]. 中华流行病学杂志, 2010, 31(1): 64-68.

[18] 马红霞, 潘静静, 康锴, 等. 2011 年河南省脑炎患者柯萨奇病毒 B5 型分离株基因组序列分析[J]. 中华流行病学杂志, 2013, 34(12): 1213-1215.

[19] 雷延岭, 褚秀芳, 褚丽敏, 等. 2016-2018 河北地区儿童病毒性脑炎流行特征调查[J]. 中国病原生物学杂志, 2019, 14(12): 1433-1437.

[20] Tan M, Suo J, Zhang Z, et al. Molecular characterization of coxsackievirus B5 from the sputum of pneumonia children patients of Kunming, Southwest China[J]. Virol J, 2023, 20(1): 74.

[21] 姚雪, 谢彬, 韦庆娟, 等. 柯萨奇 A2、A4、A6、A10 和 A12 型病毒的密码子使用偏好性分析[J]. 病毒学报, 2023, 39(1): 75-86.

[22] 许丹蕊, 郭伟, 张名, 等. 一株柯萨奇病毒 B 组 5 型分离株 V1641/YN/CHN/2016 的全基因序列分析[J]. 病毒学报, 2022, 38(3): 573-580.

[23] Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, et al. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification[J]. J Virol, 1999, 73(3): 1941-1948.

【收稿日期】 2024-01-02 【修回日期】 2024-03-25