

2021年济宁市柯萨奇病毒A组6型 分离株全基因组特征分析

王珊^{1,2,3}, 刘伟^{1,3}, 冯强⁴, 范莹莹^{1,3}, 刘海霞^{1,3}, 段延华¹,
温红玲², 焦伯延^{1,3}

(1.济宁市疾病预防控制中心,山东 济宁 272008; 2.山东大学公共卫生学院,山东 济南 250100;
3.济宁市传染病预防控制重点实验室,山东 济宁 272008; 4.济宁市任城区疾病预防控制中心,山东 济宁 272103)

摘要:目的 分析2021年济宁市柯萨奇病毒A组6型(Coxsackievirus A6, CVA6)流行特点和全基因组特征,为手足口病的防控提供依据。方法 采用反转录实时荧光定量PCR(reverse transcription quantitative real-time PCR, RT-qPCR)法对2021年济宁市11县市区采集的手足口病病例样本进行CVA6核酸检测;将CVA6阳性样本接种到人横纹肌瘤细胞进行病毒的细胞培养,提取病毒核酸,并采用二代测序技术进行全基因组测序;采用MEGA 7.0.14、RNAfold、NetPhos 3.1、NetNGlyc 1.0和GPS Lipid生物信息学软件进行相似性、构建内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)二级结构、磷酸化位点、糖基化位点和脂酰化位点分析。结果 核酸检测结果显示,2021年济宁市手足口病肠道病毒阳性病例中CVA6占比为35.79%(97/271)。全基因组测序结果显示,3株CVA6与原型株Gdula的核苷酸同源性为80.69%~80.95%,多聚蛋白氨基酸同源性为94.83%~94.92%。生物信息学分析结果显示,在进化树上,3株CVA6均位于D3a进化分支,但位于不同的进化簇。与原型株Gdula相比,5'UTR的IRES区共发生了7处核苷酸变异,VP1抗原表位发生了Q98L、G160S变异,VP1受体结合位点发生了S194T变异,3D聚合酶活性位点发生了T308S、L342S和K346R变异。此外编码蛋白的磷酸化位点、糖基化位点和脂酰化位点均发生多处位点的变异。结论 2021年济宁市手足口病病例中CVA6是主要病原体,向适应宿主的方向进化,应加强对CVA6的监测和防控。

关键词:手足口病;肠道病毒;柯萨奇病毒A组6型;全基因组分析

中图分类号:R183.4

文献标志码:A

Whole genome characterization analysis of Coxsackievirus A6 in Jining in 2021

WANG Shan^{1,2,3}, LIU Wei^{1,3}, FENG Qiang⁴, FAN Yingying^{1,3}, LIU Haixia^{1,3},
DUAN Yanhua¹, WEN Hongling², JIAO Boyan^{1,3}

(1.Jining Center for Disease Control and Prevention, Jining 272008, Shandong, China;

2. School of Public Health, Shandong University, Jinan 250100, Shandong, China;

3. Jining Key Laboratory of Infectious Disease Control and Prevention, Jining 272008, Shandong, China;

4. Jining Rencheng Center for Disease Control and Prevention, Jining 272103, Shandong, China)

Abstract: Objective To analyze the epidemiological characteristics and whole-genome features of Coxsackievirus A6 (CVA6) in Jining City in 2021, providing a basis for the prevention and control of hand, foot, and mouth disease (HFMD). **Methods** Reverse transcription quantitative real-time PCR (RT-qPCR) was used to detect CVA6 nucleic acid in HFMD case samples collected from 11 counties and districts in Jining City in 2021. CVA6-positive samples were inoculated into human rhabdomyosarcoma cells for viral culture, and viral nucleic acid was extracted for whole-genome

sequencing using next-generation sequencing technology. Bioinformatics analyses, including sequence similarity analysis, internal ribosome entry site (IRES) secondary structure modeling, phosphorylation site analysis, glycosylation site analysis, and lipidation site analysis, were conducted using MEGA 7.0.14, RNAfold, NetPhos 3.1, NetNGlyc 1.0, and GPS Lipid software. **Results** Nucleic acid testing showed that the positive rate of CVA6 among the confirmed HFMD cases in Jining City in 2021 was 35.79% (97/271). Whole-genome sequencing results revealed that three CVA6 strains exhibited nucleotide homology of 80.69%-80.95% and polyprotein amino acid homology of 94.83%-94.92% with the prototype strain Gdula. Bioinformatics analysis showed that all three CVA6 strains belonged to the D3a evolutionary branch but were located in different evolutionary clusters. Compared to the Gdula prototype strain, seven nucleotide mutations were observed in the 5'UTR IRES region, Q98L and G160S mutations occurred in the VP1 antigenic epitope, an S194T mutation was found in the VP1 receptor-binding site, and T308S, L342S, and K346R mutations were identified in the 3D polymerase active site. Additionally, multiple variations were observed in phosphorylation, glycosylation, and lipidation sites of the encoded proteins. **Conclusion** CVA6 was the predominant pathogen in HFMD cases in Jining City in 2021. It was evolving in the direction of adapting to the host. The monitoring and prevention efforts against CVA6 should be strengthened.

Key words: Hand, foot and mouth disease; Enterovirus; Coxsackievirus A6; Whole genome analysis

手足口病是肠道病毒感染引起的急性发热出疹性传染病,高发人群为婴幼儿及儿童^[1-2]。流行病学研究表明,我国手足口病的病原体分布呈现明显的时序变化特征:2011年前,肠道病毒71型(enterovirus A71, EV71)和柯萨奇病毒A组16型(Coxsackievirus A16, CVA16)是优势病原体^[3-4],仅有少部分是柯萨奇病毒A组6型(Coxsackievirus A6, CVA6);2012年后,CVA6逐渐成为主要病原体之一^[5-6];2021—2023年期间,CVA6已成为主要致病原,更是导致重症病例的重要病原体^[7-8]。除典型的手足口病临床表现外,CVA6感染还可引发严重的神经系统并发症(如脑膜炎和脑炎)、心肌损伤、肾病综合征等,甚至可致死亡,已成为当前公共卫生领域面临的重大挑战^[5,9]。

CVA6基因组全长约7400碱基对(base pair, bp)。根据病毒结构蛋白1(viral structural protein 1, VP1)编码区的基因序列,CVA6可分为A、B、C和D4个主要基因型,其中D基因型又可以进一步分为D1、D2和D3基因亚型,在我国主要流行的是D3亚型^[6]。作为RNA病毒,CVA6在复制过程中具有较高的突变率,增加了其防控难度。本研究对2021年济宁市手足口病病例进行了病原学监测,并对分离获得的3株CVA6毒株进行了全基因组测序分析,旨在为手足口病的科学防控提供分子流行病学依据。

1 资料与方法

1.1 样本来源

按照《手足口病预防控制指南(2009版)》^[10]的规范要求,采集2021年济宁市辖区内11个县(市、

区)临床诊断为手足口病的门诊或住院患儿的粪便样本。诊断标准为:发热伴手、足、口、臀部皮疹,部分病例可无发热表现。所有临床诊断病例样本经肠道病毒核酸检测阳性后,确定为手足口病确诊病例。

为确保样本的代表性,每个县(市、区)每月采集至少5份临床诊断病例样本;若当月发病不足5例,则全部采集。最终纳入513份临床诊断病例样本。本研究已获得济宁市疾病预防控制中心伦理委员会批准,伦理审批编号为[2024]伦审第(伦007)号。

1.2 方法

1.2.1 样本处理与核酸提取

取2g粪便样本,加入10mL PBS、1mL氯仿和1g玻璃珠震荡20min;1500×g离心20min;取200μL上清液作为检测样本。采用SSNP-9600A型全自动核酸提取仪(江苏硕世生物科技有限公司,中国)和配套核酸快速提取试剂盒(磁珠法,货号SDKF60101)提取样本总核酸。

1.2.2 RT-qPCR检测

采用肠道病毒三重核酸检测试剂盒(CA16/EV71/通用型,荧光PCR法,货号SKY-8305,深圳市生科原生物科技有限公司,中国)和CVA6型核酸检测试剂盒(货号SKY-8308,深圳市生科原生物科技有限公司,中国)进行RT-qPCR核酸检测。以检测Ct值≤38,且扩增曲线呈典型指数增长者判定为核酸阳性。

1.2.3 病毒分离培养

将200μL CVA6核酸阳性样本处理液接种至2mL人横纹肌瘤细胞培养液中,置于36℃培养箱中培养7d。培养结束后反复冻融3次,随后盲传3

代,每代培养7 d后,均行3次冻融处理。最终取200 μ L培养物上清,提取核酸并进行CVA6核酸检测。

1.2.4 全基因组测序和生物信息学分析

1.2.4.1 测序与序列拼接

全基因组 Sanger 测序由上海伯杰医疗科技股份有限公司完成。测序机型为 ABI3730xl(赛默飞世尔科技公司,美国),测序试剂为 BigDye[®] Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit(赛默飞世尔科技公司,美国)。采用 DNASTAR 软件包的子程序 SeqMan 拼接测得序列。

1.2.4.2 序列比对与进化分析

采用美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)数据库基本局部对齐搜索工具(Basic Local Alignment Search Tool, BLAST)分析最相似序列,并在 NCBI 下载 CVA6 原型株 Gdula 全基因组序列(GenBank ID: AY421764.1)和 2008 年以来流行的 CVA6 全基因组序列(GenBank ID: MN845816.1、MN845848.1、MN845872.1、MN845868.1、MN845811.1、OQ215747.1、MF285622.1、MK967653.1、KM114057.1、MK106208.1、MT814502.1、MT814503.1、MT814534.1、OR394974.1、OR394971.1、OL830036.1、OL830034.1、OL830033.1、OL830032.1、OL839938.1、OL839942.1、OM179765.1、MT814535.1)。采用 MEGA 7.0.14 软件比对序列^[11],并进行相似性分析和氨基酸变异位点分析。采用 MEGA 7.0.14 软件的邻位相接法,参数选择 1000 bootstrap 重复,构建进化树。

1.2.4.3 结构生物信息学分析

采用 RNAfold web server(<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) 软件分析内部核糖体进入位点(Internal ribosome entry site, IRES)结构域的二级结构^[12]。采用 NetNGlyc 1.0 软件分析 N 糖基化位点^[13];采用 NetPhos 3.1 软件蛋白磷酸化位点^[14];采用 GPS Lipid 软件(<http://lipid.biocuckoo.org/>)分析蛋白棕榈酰化、肉豆蔻酰化、法尼酰化、香叶酰香叶酰化等脂酰化位点^[15]。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计学软件。计数资料采用 $n(\%)$ 描述。采用 Fisher 精确概率法比较不同月份 CVA6 的阳性率。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 CVA6 检出情况

肠道病毒检测结果显示,2021 年济宁市手足口病临床诊断病例中确诊病例 271 例;CVA6 的阳性

率为 35.79%(97/271)。不同月份手足口病确诊病例中 CVA6 的阳性率差异无统计学意义($P=0.68$)。见表 1。

表 1 济宁市 2021 年 CVA6 检出情况/ $n(\%)$
Table 1 Detection of CVA6 in Jinjing in 2021/ $n(\%)$

月份	确诊病例数	CVA6 阳性病例
1	23	6(26.09)
2	8	3(37.50)
3	7	3(42.86)
4	13	8(61.54)
5	28	11(39.29)
6	42	15(35.71)
7	33	8(24.24)
8	20	8(40.00)
9	24	11(45.83)
10	35	12(34.29)
11	23	7(30.43)
12	15	5(33.33)
合计	271	97(35.79)
<i>P</i>		0.68

2.2 全基因组测序

从 CVA6 阳性样本中共培养出 3 株 CVA6 细胞株。全基因组测序获得的 3 株 CVA6 序列均包含完整的蛋白编码区,分别命名为 Coxsackievirus A6 strain 50/JN/CHN/2021(简称 50/JN/CHN/2021; 7 435 bp)、Coxsackievirus A6 strain 70/JN/CHN/2021(简称 70/JN/CHN/2021; 7 434 bp)和 Coxsackievirus A6 strain 87/JN/CHN/2021(简称 87/JN/CHN/2021; 7 436 bp)。

2.3 相似性分析

相似性分析结果显示,与 CVA6 原型株 Gdula 相比,50/JN/CHN/2021 全基因核苷酸相似性为 80.69%;70/JN/CHN/2021 全基因核苷酸相似性为 80.95%;87/JN/CHN/2021 全基因核苷酸相似性为 80.75%。NCBI BLAST 分析结果显示,50/JN/CHN/2021 与中国 2018 年分离株 Coxsackievirus A6 isolate 22/HLJ/CHN/2018(GenBank ID: MN845848.1)相似性最高,为 98.82%;70/JN/CHN/2021 与吉林省 2020 年分离株 Coxsackievirus A6 strain CVA6/20005/CC/CHN/2020(GenBank ID: OR394974.1)相似性最高,为 99.16%;87/JN/CHN/2021 与中国 2018 年分离株 Coxsackievirus A6 isolate 21/CQ/

CHN/2018 (GenBank: MN845816.1) 相似性最高,为 98.36%。

MEGA 软件序列比对分析结果显示,与 CVA6 原型株 Gdula 相比,济宁市 3 株 CVA6 序列编码多聚蛋白氨基酸的同源性为 94.83%~94.92%。核苷

酸方面,5' UTR 核苷酸相似性最高,为 88.59%~89.40%;3B 蛋白编码区核苷酸相似性最低,为 74.24%~75.76%。氨基酸方面,2C 蛋白氨基酸相似性最高,为 97.54%~98.16%;结构蛋白 VP4 氨基酸相似性最低,为 82.63%。见表 2。

表 2 与原始株 Gdula 相比的核苷酸和氨基酸相似性分析
Table 2 Similarity analysis of nucleotide and amino acid compared to Gdula

名称	核苷酸位置	核苷酸相似性/%	氨基酸相似性/%
5'UTR	1~745	88.59~89.40	—
VP4	746~952	77.29~78.26	82.63
VP2	953~1 720	83.07~83.72	96.02~96.83
VP3	1 721~2 440	81.11~82.36	96.61~97.47
VP1	2 441~3 355	83.31~83.72	95.64~95.99
2A	3 356~3 805	78.44~79.56	94.52~95.22
2B	3 806~4 102	79.50~79.80	94.82
2C	4 103~5 089	79.12~79.53	97.54~98.16
3A	5 090~5 347	75.97~77.14	90.24~91.51
3B	5 348~5 413	74.24~75.76	90.47
3C	5 414~5 962	77.60~78.51	94.96~95.53
3D	5 963~7 348	76.62~77.13	92.12~92.59
3'UTR	7352~7434	82.35~83.53	—

注:“—”表示不编码蛋白。

2.4 系统进化分析

进化树构建结果显示,在 VP1 进化树上,济宁市 3 株 CVA6 序列均位于 D3a 进化分支。其中 50/JN/CHN/2021 与河南省郑州市 2019 年分离的毒株 Coxsackievirus A6 strain JLS10/HeN/CHN/2019 亲缘性较高,相似性为 99.23%;70/JN/CHN/2021 与吉林省长春市 2020 年、2021 年分离株 Coxsackievirus A6 strain CVA6/20005/CC/CHN/2020 和 Coxsackievirus A6 strain CVA6/21003/CC/CHN/2021 等亲缘性较高,相似性分别为 98.69% 和 98.58%;87/JN/CHN/2021 与北京市 2018 年 Coxsackievirus A6 isolate 21/CQ/CHN/2018 和山东省泰安市 2018 年分离株 Coxsackievirus A6 isolate DN2687 polyprotein gene 亲缘性较高,相似性均为 98.69%。见图 1。

5' UTR、VP4、VP2、VP3、2A、2B、2C、3A、3B、3C、3D、3'UTR 进化树结果与 VP1 基本一致。但在 3B 进化树上,50/JN/CHN/2021 与河南省郑州市 2019 年分离的毒株 Coxsackievirus A6 strain JLS10/

HeN/CHN/2019 亲缘性较低;70/JN/CHN/2021 与吉林省长春市 2020 年、2021 年分离株 Coxsackievirus A6 strain CVA6/20005/CC/CHN/2020 和 Coxsackievirus A6 strain CVA6/21003/CC/CHN/2021 等亲缘性较低。在 3'UTR 进化树上,87/JN/CHN/2021 与北京市 2018 年 Coxsackievirus A6 isolate 21/CQ/CHN/2018 和山东省泰安市 2018 年分离株 Coxsackievirus A6 isolate DN2687 polyprotein gene 亲缘性较低。

2.5 5'UTR 变异分析

5'UTR 变异分析结果显示,济宁市 3 株 CVA6 序列的 IRES 区共发生了 7 处核苷酸变异。见表 3,图 2。与 CVA6 原型株 Gdula 的 IRES 结构域二级结构相比,3 株 CVA6 序列的 3 处茎结构发生改变:茎结构 1 由 4 个碱基对改变为 3 个碱基对;茎结构 2 由 5 个碱基对改变为 6 个碱基对;茎结构 3 由 3 个碱基对改变为 4 个碱基对。IRES 结构域二级结构详见图 2。

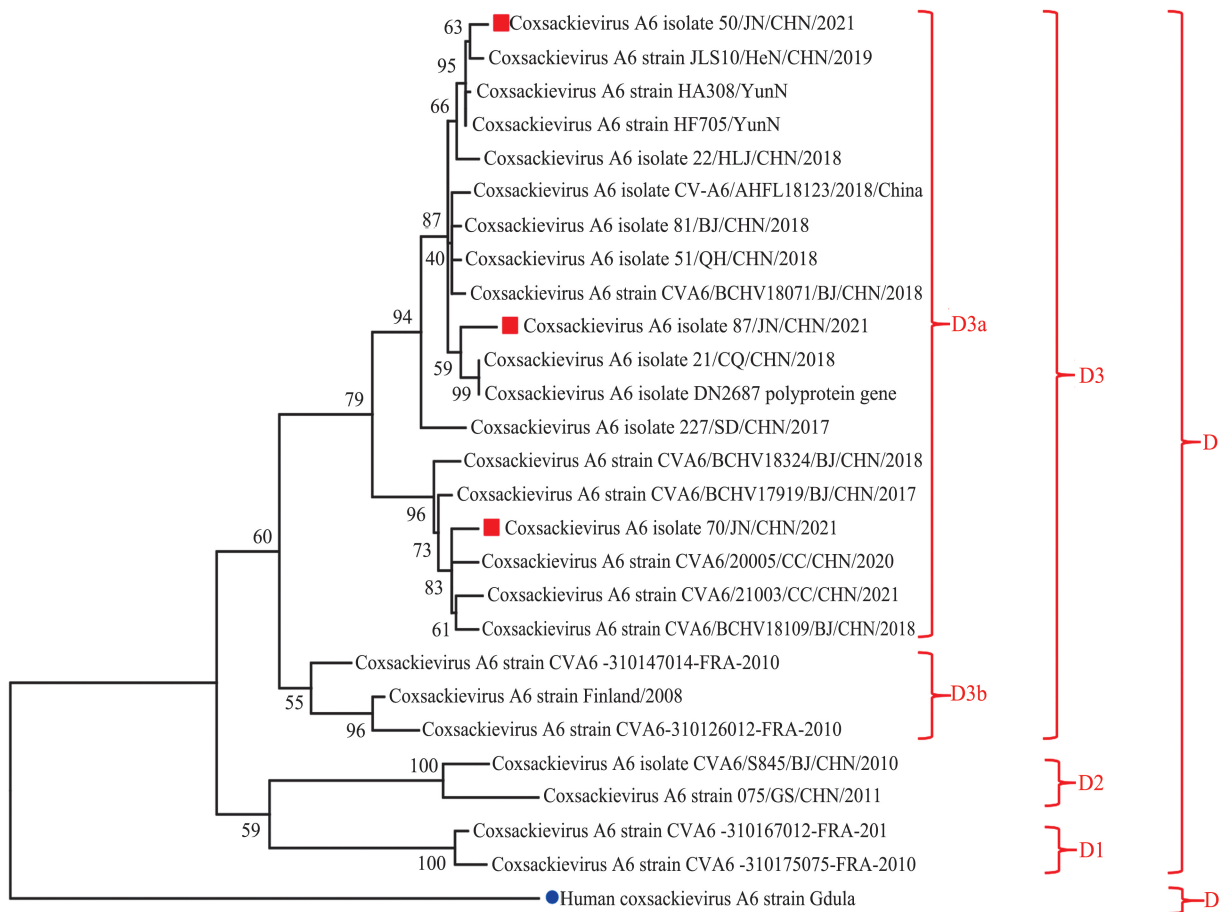


图1 济宁市 CVA6 VP1 进化树分析

●表示 CVA6 原型株 Gdula; ■表示济宁市 CVA6 毒株。

Figure 1 Phylogenetic tree of VP1 of CVA6 in Jining

● represents CVA6 prototype strain Gdula; ■ represents CVA6 strain in Jining City 3'UTR.

表3 IRES 结构域核苷酸变异位点分析
Table 3 Analysis of nucleotide variation sites in the IRES domain

名称	核苷酸位点						
	482	498	500	502	506	511	515
50/JN/CHN/2021	C	G	T	T	T	A	T
70/JN/CHN/2021	C	G	C	T	T	G	T
87/JN/CHN/2021	C	G	T	T	T	A	T
原型株 Gdula	T	A	C	C	A	G	C

2.6 氨基酸变异分析

2.6.1 蛋白变异位点分析

蛋白变异位点分析结果显示,与原型株 Gdula 相比,济宁市 3 株 CVA6 的 11 个蛋白均发生了不同程度的变异,其中 3D 和 VP1 变异位点个数最多,分别有 36 处和 13 处氨基酸位点发生变异。见

表 4。

2.6.2 磷酸化变异位点分析

蛋白磷酸化位点分析结果显示,与原型株 Gdula 相比,济宁市 3 株 CVA6 序列编码的蛋白 24 处磷酸化位点发生改变,其中增加磷酸化位点 11 处,丢失磷酸化位点 13 处。见表 5。

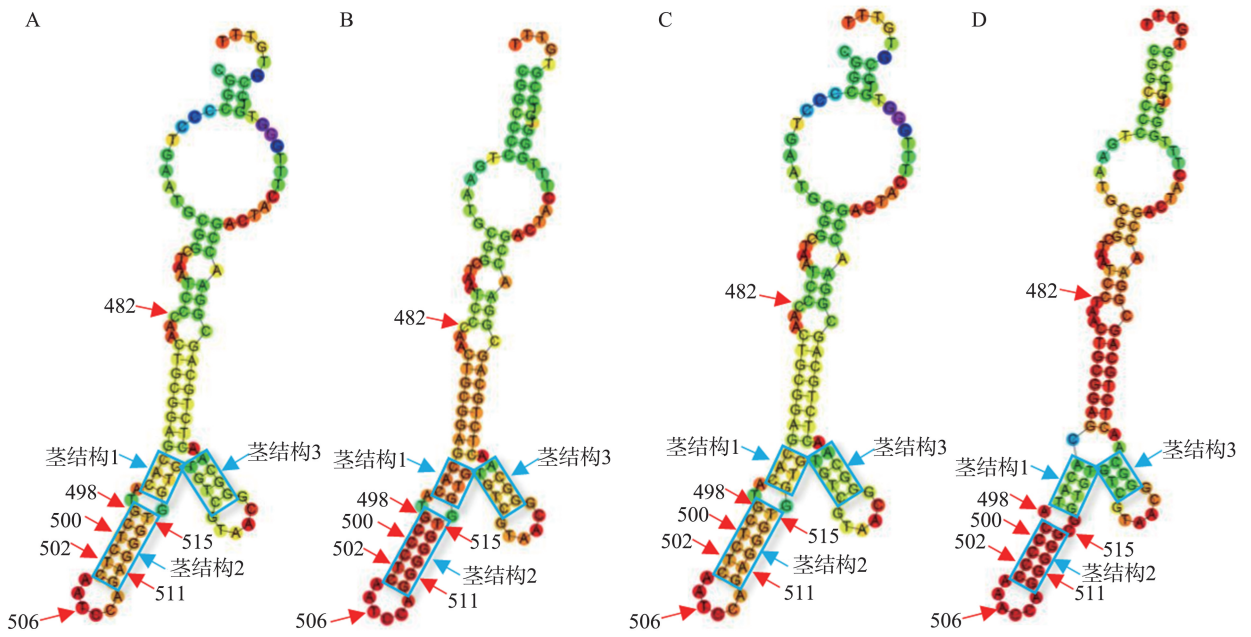


图2 济宁市CVA6 IRES结构域二级结构分析

A: 50/JN/CHN/2021; B: 70/JN/CHN/2021; C: 87/JN/CHN/2021; D: 原型株 Gdula.

Figure 2 Secondary structure of IRES domain of CVA6 in Jining

A: 50/JN/CHN/2021; B: 70/JN/CHN/2021; C: 87/JN/CHN/2021; D: Prototype strain Gdula.

表4 氨基酸变异位点分析
Table 4 Analysis of amino acid variation sites

名称	变异位点
VP4	A7T、Q8E、T12S、G16K、I18V、T47A、T51A、S55R、A60T、K62R、A64V
VP2	G40E、V110I [#] 、V125A、V126A、T151A [#] 、E158S ^Δ 、E158N ^{**} 、V161E、I172V、F180Y
VP3	L2F、R48Q、N65S ^{*Δ} 、T142A、A177T ^Δ 、S208T、E220R ^{*Δ} 、E220K [#] 、R234Q
VP1	S5T、I8V、N10S、T14A、A29V [#] 、S32T、Q98L、G160S、I174V、S194T、F261L、S279T、F305S
2A	K2R ^{*Δ} 、D35S、T52I [#] 、N57D、R68K、S80G [#] 、V102K、V121I、N136D
2B	S22A、H31Y、V47I、S85A、M95I
2C	L18F、I21V [*] 、D23N、K41R、I60V ^Δ 、F90Y、I96T、L258V ^Δ 、S271T ^Δ 、I320V [#]
3A	N11S、K15A、A20V、R38K [#] 、E39D、N56S、V61I、V65I、V69I [*]
3B	A10V、V15I
3C	A18V、I36V ^{**} 、I49V、V56I、L75I、A93N、T95S、G96A、I157V
3D	I6V ^{*Δ} 、V33R、N37S ^{*Δ} 、T44H、N53D、L67I、V74I、T75K、Q76E、L79SA、D89N、N91D、K94Q、E105D、Y106N、A134T、T138V、K140R [#] 、L143F、L165I、T190A、V197T、I205V、T259G、E260N ^{**} 、E260D ^Δ 、V263I、T308S、L342S、K346R、S362P、T368N、H383E、R396K、E428Q、T436A、F451Y

注: *代表 50/JN/CHN/2021 发生变异; #代表 70/JN/CHN/2021 发生变异; Δ代表 87/JN/CHN/2021 发生变异; 未标注代表 3 株 CVA6 均发生变异。

表5 磷酸化位点变异分析
Table 5 Analysis of Phosphorylation variation sites

名称	磷酸化位点	
	增加	丢失
VP4	T60	T47
VP2	S158 ^Δ	—
VP3	—	T142
VP1	S305	T14、S194
2A	—	S80 [#]
2B	—	S22
3A	S11、S56	—
3D	S37 ^{*Δ} 、S79 ^Δ 、T134、T197、S308、Y451	T44、T75、Y106、T138、T308、S362、T436

注: *代表 50/JN/CHN/2021 发生变异; #代表 70/JN/CHN/2021 发生变异; Δ代表 87/JN/CHN/2021 发生变异; 未标注代表 3 株 CVA6 均发生变异; —表示未发生变异。

2.6.3 糖基化变异位点分析

糖基化变异位点分析结果显示,与原型株 Gdula 相比,济宁市 3 株 CVA6 序列的 3C 发生了 AIT93-

95NIS 变异,增加 N93 糖基化位点。见图 3。3D 发生 NTS91-93DTS 变异,丢失 N91 糖基化位点。见图 4。

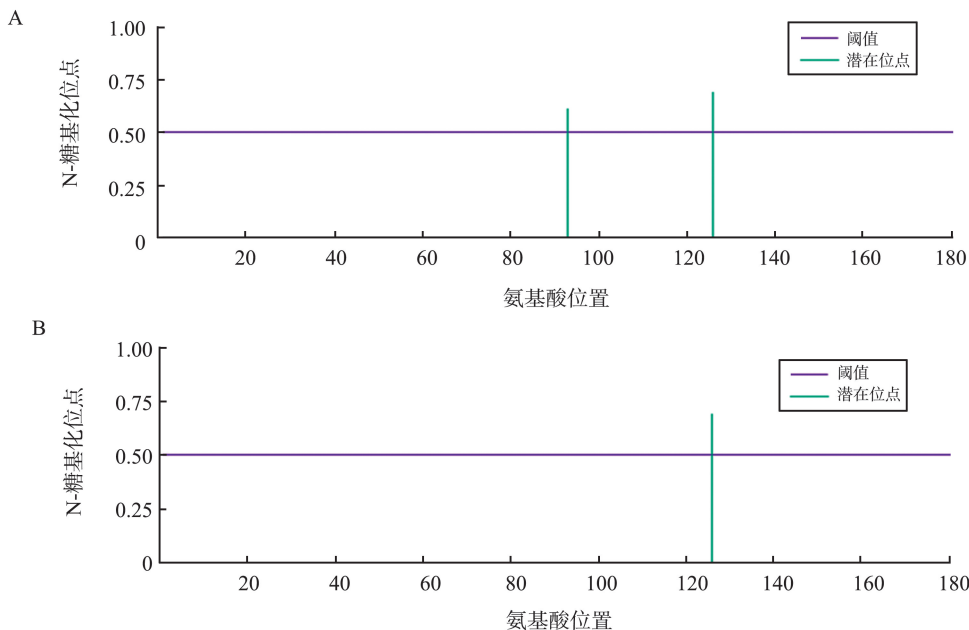


图 3 济宁市 CVA6 序列 3C 糖基化位点分析

A: 济宁市 3 株 CVA6 序列 3C 糖基化位点分析; B: 原型株 Gdula 序列 3C 糖基化位点分析。

Figure 3 Glycosylation sites of 3C of CVA6 in Jining

A: Glycosylation sites of 3C of three CVA6 strains in Jining; B: Glycosylation sites of 3C of prototype strain Gdula.

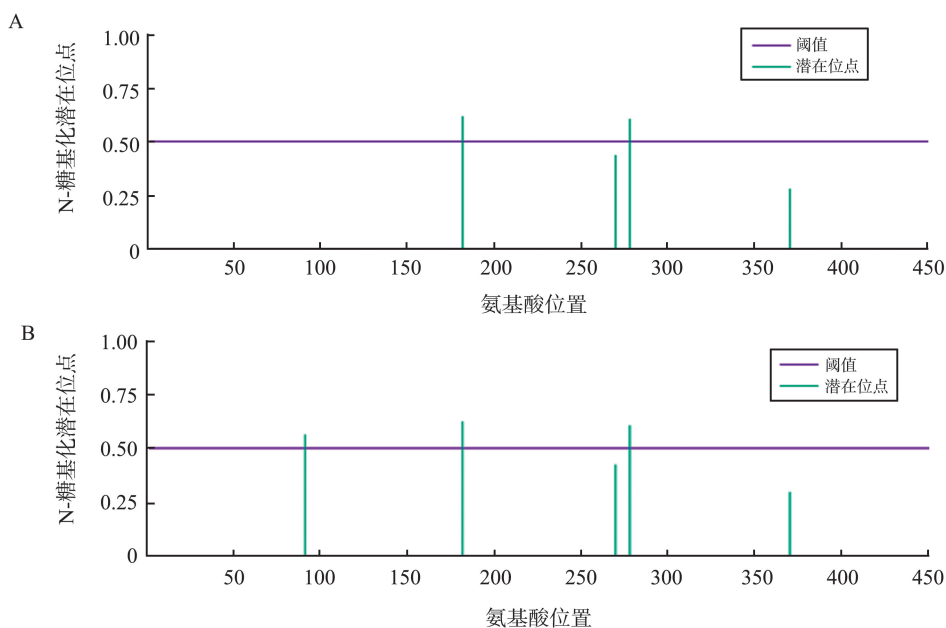


图 4 济宁市 CVA6 序列 3D 糖基化位点分析。

A: 济宁市 3 株 CVA6 序列 3C 糖基化位点分析; B: 原型株 Gdula 序列 3C 糖基化位点分析。

Fig 4 Glycosylation sites of 3D of CVA6 in Jining

A: Glycosylation sites of 3D of three CVA6 strains CVA6 in Jining; B: Glycosylation sites of 3D of prototype strain Gdula.

2.6.4 脂酰化位点分析

脂酰化位点分析结果显示,与原型株 Gdula 相比,70/JN/CHN/2021 的 VP2 的 C107 增加棕榈酰

化修饰。见图 5。3 株 CVA6 序列的肉豆蔻酰化、法尼酰化、香叶酰香叶酰化等脂酰化位点均未发生改变。

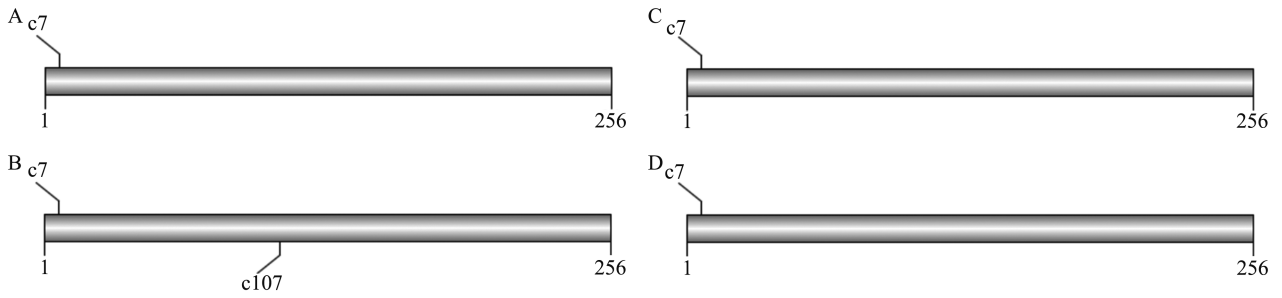


图5 济宁市 CVA6 序列 VP2 棕榈酰化修饰位点分析

A: 50/JN/CHN/2021; B: 70/JN/CHN/2021; C: 87/JN/CHN/2021; D: 原型株 Gdula。

Figure 5 Palmitoylation sites of VP2 of CVA6 in Jining

A: 50/JN/CHN/2021; B: 70/JN/CHN/2021; C: 87/JN/CHN/2021; D: Prototype strain Gdula.

3 讨论

手足口病范围内广泛流行的儿童传染病,在我国已被纳入法定丙类传染病管理。流行病学监测显示,近年来我国手足口病的病原谱发生显著变化:CVA6 已逐步取代 CVA16 和 EV71,成为当前最主要的流行株之一^[16-19]。这一转变可能与肠道病毒固有的高变异特性相关:其 RNA 聚合酶缺乏校对功能,导致病毒在复制过程中容易发生基因变异。本研究通过对 2021 年济宁市手足口病的系统监测,发现 CVA6 的阳性率为 35.79%,且各月份阳性率无显著差异($P>0.05$),证实了其在区域流行中的主导地位。此外,本研究还首次在 CVA6 分离株中发现 C107 位点棕榈酰化修饰,为探索该病毒蛋白翻译后修饰的生物学意义提供了新线索。

Lu 等^[8]研究发现,2012—2023 年我国流行的 CVA 毒株主要归属于 D3a 分支。本研究结果显示,济宁市的 3 株 CVA6 分离株均位于 D3a 进化分支,与上述研究一致。有研究表明,D3a 基因亚型具有更强的传播能力和更快的进化速度,且更容易发生基因重组,其变异趋势正向增强传播力和导致多样化临床症状的^[5]。建议对 CVA6 病毒(特别是 D3a 分支)实施持续性动态监测,同时加快推进针对 D3a 分支的疫苗研制工作,并着力加强相关抗病毒药物的研发力度。

既往研究表明,5'UTR 的 IRES 结构与是肠道病毒蛋白翻译的关键调控区域^[16,20-21],其二级结构的改变可能影响宿主翻译起始因子与病毒 RNA 的结合效率,进而调控病毒蛋白的翻译水平。本研究发现,济宁市 3 株 CVA6 毒株的 IRES 结构域存在 7 个核苷酸变异位点,导致其茎环结构发生显著改变。这些变异可能通过改变 IRES 的空间构象,影响翻译起始因子的识别和结合以及调控病毒蛋白的翻译

效率,进而影响病毒复制能力等机制影响病毒的致病性和传播力,需要通过反向遗传学实验等方式进一步验证其具体功能和意义。

Xu 等^[22]研究发现,VP1 蛋白的 Q98 和 G160 位点是 CVA6 最重要的抗原表位,参与抗体 Fab 结构域的识别;VP3 蛋白 N 端氨基酸在病毒复制过程与结病毒基因组 RNA 结合。研究发现,VP1 蛋白的 135、137、138、150、154、158、194、216、217、219、288-291、295、297 位氨基酸参与构成含 kringle 的跨膜蛋白 1 (kringle containing transmembrane protein 1, KREMEN1) 受体结合域^[23-24]。本研究发现,济宁市 3 株 CVA6 的序列 VP1 和 VP3 蛋白均发生了氨基酸变异,可能影响病毒抗原表位的免疫原性、VP3 与基因组 RNA 的结合能力以及病毒与 KREMEN1 受体的结合效率,进而影响病毒的传播适应性和宿主的免疫识别效率,需要通过假病毒实验等方式进一步验证。

Guo 等^[25]研究发现,2A 蛋白的 V121 位于锌指结构域,该位点对维持 2A 蛋白的空间构象和功能具有关键作用。本研究发现,济宁市 3 株 CVA6 毒株的 2A 蛋白均存在 V121I 氨基酸变异,可能通过调节 2A 蛋白酶的切割效率,进而影响病毒多蛋白前体的加工过程。

Wang 等^[26]研究发现,2C 蛋白 N 端 21-45 位氨基酸参与病毒 RNA 结合,在病毒复制过程中发挥关键作用;且 269-286 位氨基酸形成的锌指结构域对 2C 蛋白的正确折叠至关重要。Wu 等^[27]研究发现,3D 聚合酶的基序 B 和基序 D 是其催化活性的关键功能域。本研究发现,济宁市 3 株 CVA6 毒株的 2C 蛋白发生的所有变异 RNA 结合域或锌指结构域;87/JN/CHN/2021 存在位于锌指结构核心区域的 S271T 变异;而 3D 聚合酶的变异位点均位于功能基序 B 或 D 区域。上述变异可能通过调节病毒 RNA 的复制效率和聚合酶的保真度,进而影响

病毒复制能力的适应性、突变速率以及对抗病毒药物的敏感性。

有研究表明,翻译后修饰在调控病毒蛋白功能、亚细胞定位及稳定性等方面发挥关键作用^[28-29]。刘洪波等^[30]研究发现,VP1受体结合位点的S194是重要的磷酸化位点;Lin等^[31]研究发现,3D聚合酶的磷酸化状态直接影响其催化活性。本研究发现,济宁市3株CVA6毒株均存在S194磷酸化位点缺失,且3D聚合酶活性中心存在磷酸化相关变异。上述突变可能通过调节病毒与KREMEN1受体的结合亲和力及核苷酸聚合效率,影响病毒的入侵效率和复制保真度。此外,本研究首次发现C107位点的棕榈酰化修饰,为CVA6蛋白翻译后修饰研究提供了新线索。

本研究尚存在局限性:①仅对2021年济宁市手足口病病例样本的肠道病毒阳性率进行分析,监测时间跨度较短,且样本量及地域覆盖范围有限;②仅获得3株CVA6全基因组序列,测序毒株数量不足反映群体遗传多样性,难以全面评估病毒进化动态。

综上,CVA6是导致2021年济宁市手足口病流行的主要病原体,其基因突变可能协同增强病毒的复制效率、传播能力、致病性及免疫逃逸特性。建议建立系统的CVA6基因变异监测体系,以掌握其进化动态;并据此及时调整和完善防控策略,降低该病毒对个体健康和公共卫生造成的威胁。

参考文献:

- [1] Chen Y, Dai BW, Han SJ, et al. Arising concerns of atypical manifestations in patients with hand, foot, and mouth disease [J]. *Vaccines (Basel)*, 2023, 11(2): 405. doi: 10.3390/vaccines11020405
- [2] Solomon T, Lewthwaite P, Perera D, et al. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71 [J]. *Lancet Infect Dis*, 2010, 10(11): 778-790
- [3] Mustafa FH, Ismail I, Ahmad Munawar AAZ, et al. A review on current diagnostic tools and potential optical absorption spectroscopy for HFMD detection [J]. *Anal Biochem*, 2023, 683: 115368. doi: 10.1016/j.ab.2023.115368
- [4] 王珊, 焦伯延, 冯强, 等. 2021年济宁市柯萨奇病毒A16型流行特点及全基因组特征 [J]. *山东大学学报(医学版)*, 2023, 61(5): 90-95.
WANG Shan, JIAO Boyan, FENG Qiang, et al. Epidemic and whole genome characteristics of coxsackievirus A16 in Jining in 2021 [J]. *Journal of Shandong University (Health Sciences)*, 2023, 61(5): 90-95.
- [5] 宋洋. D3基因亚型CV-A6引起中国手足口病大规模暴发的研究 [D]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2017.
- [6] 郝晓甜, 李克坚, 周诚, 等. 柯萨奇病毒A组6型的研究进展 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2023, 36(10): 1271-1275.
HAO Xiaotian, LI Kejian, ZHOU Cheng, et al. Progress in research on coxsackievirus A6 [J]. *Chinese Journal of Biologicals*, 2023, 36(10): 1271-1275.
- [7] Chen Y, Chen SH, Shen YF, et al. Molecular evolutionary dynamics of coxsackievirus A6 causing hand, foot, and mouth disease from 2021 to 2023 in China: genomic epidemiology study [J]. *JMIR Public Health Surveill*, 2024, 10: e59604. doi: 10.2196/59604
- [8] Lu HH, Xiao JB, Wang WH, et al. Evolutionary diversity of coxsackievirus A6 causing severe hand, foot, and mouth disease - China, 2012-2023 [J]. *China CDC Wkly*, 2024, 6(20): 442-449.
- [9] Shi YY, Chen PQ, Bai YJ, et al. Seroprevalence of coxsackievirus A6 and enterovirus A71 infection in humans: a systematic review and meta-analysis [J]. *Arch Virol*, 2023, 168(2): 37. doi: 10.1007/s00705-022-05642-0
- [10] 卫生部办公厅关于印发《手足口病预防控制指南(2009版)》的通知 [J]. *中华人民共和国卫生部公报*, 2009(9): 64.
- [11] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. *Mol Biol Evol*, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [12] Mattei E, Pietrosanto M, Ferrè F, et al. Web-Beagle: a web server for the alignment of RNA secondary structures [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(W1): W493-W497.
- [13] Gupta R, Brunak S. Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function [J]. *Pac Symp Biocomput*, 2002: 310-322. doi: 10.1142/9789812799623_0029
- [14] Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites [J]. *J Mol Biol*, 1999, 294(5): 1351-1362.
- [15] Xie YB, Zheng YY, Li HY, et al. GPS-Lipid: a robust tool for the prediction of multiple lipid modification sites [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 28249. doi: 10.1038/srep28249
- [16] 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 [J]. *Arch Virol*, 2011, 156(11): 2007-2013.
- [17] Han JF, Xu S, Zhang Y, et al. Hand, foot, and mouth disease outbreak caused by coxsackievirus A6, China, 2013 [J]. *J Infect*, 2014, 69(3): 303-305. doi: 10.1016/j.jinf.2014.03.015

- [18] Xiao KL, Duan L, Peng Y, et al. Epidemiologic features of enterovirus associated with hand, foot and mouth disease in 2013 and 2014 in Shenzhen, China [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 3856. doi: 10.1038/s41598-019-40402-2
- [19] Wang J, Zhang S. Epidemiological characteristics and trends of hand-foot-mouth disease in Shanghai, China from 2011 to 2021 [J]. *Front Public Health*, 2023, 11: 1162209. doi: 10.3389/fpubh.2023.1162209
- [20] Thompson SR, Sarnow P. Enterovirus 71 contains a type I IRES element that functions when eukaryotic initiation factor eIF4G is cleaved [J]. *Virology*, 2003, 315(1): 259-266.
- [21] 卢杰, 张珈敏, 林美娟, 等. RNA 病毒翻译调控元件: 内部核糖体进入位点(IRES) [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2007, 23(7): 513-518.
LU Jie, ZHANG Jiamin, LIN Meijuan, et al. IRES: translation element of RNA viruses [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2007, 23(7): 513-518.
- [22] Xu LF, Zheng QB, Li SW, et al. Atomic structures of Coxsackievirus A6 and its complex with a neutralizing antibody [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 505. doi: 10.1038/s41467-017-00477-9
- [23] Staring J, van den Hengel LG, Raaben M, et al. KREMEN1 is a host entry receptor for a major group of enteroviruses [J]. *Cell Host Microbe*, 2018, 23(5): 636-643.
- [24] Zhao YG, Zhou DM, Ni T, et al. Hand-foot-and-mouth disease virus receptor KREMEN1 binds the canyon of Coxsackie Virus A10 [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 38. doi: 10.1038/s41467-019-13936-2
- [25] Guo Y, Wang YX, Cao L, et al. A conserved inhibitory mechanism of a lycorine derivative against enterovirus and hepatitis C virus [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 60(2): 913-924.
- [26] Wang SH, Wang K, Zhao K, et al. The structure, function, and mechanisms of action of enterovirus non-structural protein 2C [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 615965. doi: 10.3389/fmicb.2020.615965
- [27] Wu Y, Lou ZY, Miao Y, et al. Structures of EV71 RNA-dependent RNA polymerase in complex with substrate and analogue provide a drug target against the hand-foot-and-mouth disease pandemic in China [J]. *Protein Cell*, 2010, 1(5): 491-500.
- [28] 单骄宇, 赵彬彬, 李斌. 翻译后修饰在病毒感染过程中的作用 [J]. *中国病毒病杂志*, 2017, 7(1): 67-72.
SHAN Jiaoyu, ZHAO Binbin, LI Bin. Post-translational modifications in viral infection [J]. *Chinese Journal of Viral Diseases*, 2017, 7(1): 67-72.
- [29] 易李, 郑春福. 蛋白质棕榈酰化修饰在病毒感染过程中的作用 [J]. *中国科学: 生命科学*, 2020, 50(8): 836-848.
YI Li, ZHENG Chunfu. The roles of protein palmitoylation during viral infection [J]. *Scientia Sinica (Vita)*, 2020, 50(8): 836-848.
- [30] 刘洪波, 阳广菲, 欧维琳, 等. 柯萨奇病毒 A6 型 VP1 蛋白的生物信息学分析 [J]. *中国免疫学杂志*, 2016, 32(4): 536-541.
LIU Hongbo, YANG Guangfei, OU Weilin, et al. Bioinformatics analysis of VP1 protein of coxsackievirus A6 [J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2016, 32(4): 536-541.
- [31] Lin DD, Dong XJ, Xiao X, et al. Proteomic and phosphoproteomic analysis of responses to enterovirus A71 infection reveals novel targets for antiviral and viral replication [J]. *Antiviral Res*, 2023, 220: 105761. doi: 10.1016/j.antiviral.2023.105761

(编辑: 郑潇)