

## 柯萨奇病毒B组3型天津分离株的全基因组特征分析

庄志超,雷玥,胡华清,谭昭麟,刘杨,田宏,李晓燕

天津市传染病病原微生物重点实验室,天津 300011

**摘要:** **目的** 对天津市柯萨奇病毒B组3型(Coxsackievirus B3, CVB3)分离株进行基因分型及全基因组特征分析,完善天津市CVB3病毒进化信息,为相关疾病的监测预警提供依据。**方法** 对在天津分离到的5株CVB3毒株提取病毒RNA,通过反转录酶-聚合酶链锁反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)扩增病毒全基因组序列,使用二代测序方法进行全基因组序列测定,对病毒全基因组序列进行系统进化与重组分析。**结果** 本研究中5株CVB3毒株开放阅读框1(open reading frame, ORF)均含有6 555个核苷酸,编码2 185个氨基酸,ORF2均由编码68个氨基酸大小的序列构成。核苷酸序列相似性为78.3%~100%,氨基酸序列相似性为95.7%~100%。而5株病毒与病毒原型株相比,核苷酸序列相似性为78.2%~79.1%,氨基酸序列相似性为94.9%~95.3%。5株病毒均在VP2蛋白上出现T151A位点突变,此外脑炎分离株还存在VP2蛋白K158E位点突变,1株生活污水分离株在5'非编码区存在C234T突变。5株病毒分属2个不同基因型,其中2016年的脑炎分离株属于D基因型,而2021年的外环境生活污水分离株属于E基因型,这也是我国北方地区首次报道E基因型CVB3。本研究的CVB3毒株在非结构蛋白区可能存在重组事件,其中脑炎分离株可能与1株柯萨奇病毒B组5型(Coxsackievirus B5, CVB5)毒株发生重组,而生活污水分离株与1株埃可病毒18型(ECHO virus 18, E18)毒株存在重组事件。**结论** 天津市CVB3分离株分属D与E基因型,病毒基因组在非结构蛋白区可能存在重组事件。外环境生活污水中CVB3病毒基因组分析结果提示天津市人群有CVB3感染存在,同时其流行优势基因型可能发生了转变。

**关键词:** 柯萨奇病毒B组3型;天津分离株;全基因组特征;重组;污水监测

中图分类号:R511 文献标识码:A 文章编号:1009-9727(2023)10-1114-08

DOI:10.13604/j.cnki.46-1064/r.2023.10.18

## Whole genomic features analysis of coxsackievirus B3 strains isolated in Tianjin

ZHUANG Zhichao, LEI Yue, HU Huaqing, TAN Zhaolin, LIU Yang, TIAN Hong, LI Xiaoyan

Tianjin Key Laboratory of Pathogenic Microorganisms for Infectious Diseases, Tianjin 300011, China

**Abstract: Objective** To genotype and analyze whole genomic features of Coxsackievirus B3 (CVB3) isolated in Tianjin, to improve evolution information of CVB3 virus in Tianjin, and to provide basis for surveillance and early warning of related diseases. **Methods** Viral RNA was extracted from five CVB3 strains isolated in Tianjin, whole genome sequence of the virus was amplified by RT-PCR and sequenced by next-generation sequencing method, and phylogenetic and recombinant analysis were carried out. **Results** The open reading frame 1(ORF) of the five CVB3 strains contained 6 555 nucleotides and encoded 2 185 amino acids, and ORF2 was composed of sequences encoding 68 amino acids. The nucleotide sequence similarity ranged from 78.3%~100%, and the amino acid sequence similarity ranged from 95.7%~100%. Compared with the CVB3 prototype strain, the nucleotide sequence similarity of the five viruses was between 78.2%~79.1%, and the similarity of amino acid sequences was 94.9%~95.3%. All five viruses exhibited a T151A mutation on the VP2 protein. Additionally, the encephalitis isolate showed a K158E mutation on the VP2 protein, while one of the sewage isolates had a C234T mutation in 5' noncoding region. The five strains belonged to two different genotypes, among which the encephalitis isolate in 2016 belonged to the D genotype, while the sewage isolates in 2021 belonged to the E genotype. This is also the first report of E genotype CVB3 in northern China. The CVB3 strain may have recombinant events in non-structural protein regions, in which encephalitis isolate may recombine with a Coxsackievirus B5 (CVB5) strain, while sewage isolates may have recombinant events with a strain of ECHO virus 18 (E18). **Conclusions** The CVB3 isolates in Tianjin belong to D and E genotypes, and recombination events may exist in non-structural protein region of the viral genome. The results of CVB3 virus genome analysis in sewage suggests presence of CVB3 infection in the population of Tianjin, and its epidemic dominant genotype may have changed.

**Keywords:** Coxsackievirus B3; Tianjin isolates; whole genomic features; recombination; sewage surveillance

柯萨奇病毒B组3型(Coxsackievirus B3, CVB3)是小RNA病毒科肠道病毒属的成员,为无包膜的单股正链RNA病毒<sup>[1]</sup>。CVB3于1949年在美国首次分

离,并于1989年首次报道其全基因组序列<sup>[2]</sup>。CVB3全基因组由7 400多核苷酸构成,由2个开放阅读框(open reading frame, ORF)以及5'端非编码区和3'端

非编码区构成<sup>[3]</sup>。ORF1 编码区编码 P1、P2 和 P3 三个前体蛋白,其中 P1 蛋白水解后生成 VP1~VP4 四个结构蛋白,P2 和 P3 蛋白水解后分别生成 2A、2B 和 3A、3B、3C、3D 等非结构蛋白。结构蛋白 VP1 为 CVB3 主要的抗原决定簇及免疫原性蛋白,而编码 VP1 蛋白的核苷酸序列也是病毒主要的分子分型依据<sup>[4]</sup>。

病毒性脑炎是由多种病毒引起的以发热、头痛、意识障碍和脑膜刺激症为主要临床表现的中枢神经系统感染性疾病。在我国,一直有 CVB3 感染引起的病毒性脑炎暴发或者散发病例出现,其中 15 岁以下儿童可占绝大多数<sup>[5]</sup>,严重影响人群健康。

本研究通过对从病毒性脑炎病例中分离得到的 1 株 CVB3 毒株以及外环境生活污水中分离得到的 4 株 CVB3 毒株进行全基因组序列分析,完善天津市 CVB3 病毒进化信息,为相关疾病的监测预警提供依据。

## 1 材料与方法

1.1 样本来源 本研究所用 CVB3 毒株分别分离自 2016 年天津市病毒性脑炎监测病例脑脊液以及 2021 年天津市东丽区张贵庄污水处理厂生活污水,病毒分离所用细胞株为人横纹肌肉瘤(human rhabdomyosarcoma, RD)细胞和喉表皮样癌(Hep-2)细胞。

1.2 主要试剂 QIAamp Viral RNA Mini Kit 购自德国 QiaGen 公司;Prime Script™II High Fidelity One Step RT-PCR Kit 购自北京宝日医生物技术有限公司;Qubit 定量检测试剂与 1.0 N NaOH 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;Agencourt AMPure XP 核酸纯化试剂盒购自美国 BECKMAN COULTER 公司;Nextera XT DNA Library Preparation Kit 与 Mini Seq™High Output Reagent Cartridge 购自美国 Illumina 公司;引物的合成由苏州金唯智生物科技有限公司完成。

1.3 病毒核酸提取与序列测定 吸取 140 μL 病毒培养液,使用 QIAamp Viral RNA Mini Kit 试剂盒提取病毒 RNA,具体操作步骤按照试剂盒说明书进行。

使用文献中 B 组肠道病毒通用扩增引物<sup>[6]</sup>,使用 Prime Script™II High Fidelity One Step RT-PCR Kit 对 CVB3 全基因组序列进行 RT-PCR 扩增。反应条件为 45 °C 15 min;94 °C 2 min;98 °C 10 s,55 °C 15 s,68 °C 1 min,共 50 个循环;4 °C 保持。

扩增产物使用 Agencourt AMPure XP 核酸纯化试剂进行纯化,利用 Nextera XT DNA Library Preparation Kit,按照试剂盒说明书进行文库制备。构建好的文库使用 Illumina MiniSeq 平台进行二代测序。测序结果使用 CLC Genomic Workbench 21.0.3 进行序列拼接。

1.4 序列比对分析 从 GenBank 数据库下载全球不同基因型别的 CVB3 全基因组及 VP1 基因序列,使用

MEGA X 软件,采用邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统进化树,自展值(Bootstrap)为 1 000,以 Kimura 2 参数模型计算遗传距离。

1.5 重组分析 将 CVB3 天津株基因组各段序列使用 BLAST 进行比对,对数据库中相似度大于 85% 的毒株下载至本地,使用 SimPlot 3.5.1 软件进行基因组序列的重组分析。

## 2 结果

2.1 CVB3 天津分离株全基因组特征 2016 年天津市病毒性脑炎病例监测中分离得到 1 株 CVB3,命名为 TJ-BN-2016-129N,2021 年天津市张贵庄污水处理厂生活污水肠道病毒监测分离得到 4 株 CVB3,分别命名为 TJ-Sewage-210602R、TJ-Sewage-210603R、TJ-Sewage-210604H 及 TJ-Sewage-210706H。其中脑炎分离株基因组长度为 7 266 bp,4 株污水分离株基因组长度均为 7 306 bp,5 株病毒 ORF1 均含有 6 555 个核苷酸,编码 2 185 个氨基酸,ORF2 均由编码 68 个氨基酸大小的序列构成。5 株病毒 GC 含量分别为 47.67%、47.14%、47.14%、47.14% 及 47.25%,均符合 CVB3 基因组基本特征。

2.2 CVB3 天津分离株基因同源性及毒力位点分析 5 株 CVB3 天津分离株核苷酸序列同源性为 78.3%~100%,氨基酸序列同源性为 95.7%~100%。而 5 株天津分离株与 CVB3 原型株 Nancy 株(GenBank: M16572)相比,核苷酸序列同源性为 78.2%~79.1%,氨基酸序列同源性为 94.9%~95.3%。从不同区段上来看,5 株天津分离株在 VP3 段核苷酸序列与 Nancy 株同源性最高,达 80.8%~81.5%;而在 3B 段同源性最低,仅为 75.8%~77.3%。见表 1。

对比 5 株 CVB3 天津分离株与 CVB3 原型株 Nancy 株在病毒基因编码区与非编码区上存在的多个毒力位点,结果显示,CVB3 天津分离株在 VP1 蛋白第 126 位和 155 位氨基酸,VP2 蛋白第 165 位、240 位、254 位氨基酸及 VP3 蛋白第 60 位等 6 个氨基酸位点均与 Nancy 株相同。在 VP2 蛋白第 151 位氨基酸位点上,5 株天津分离株均出现 T151A 突变。而在 VP2 蛋白第 158 位氨基酸位点上,4 株污水分离株均与 Nancy 株相同,脑炎分离株 TJ-BN-2016-129N 则存在 K158E 突变。此外,在病毒 5' 端非编码区(non-translated region, NTR),TJ-Sewage-210706H 存在 T234C 突变。

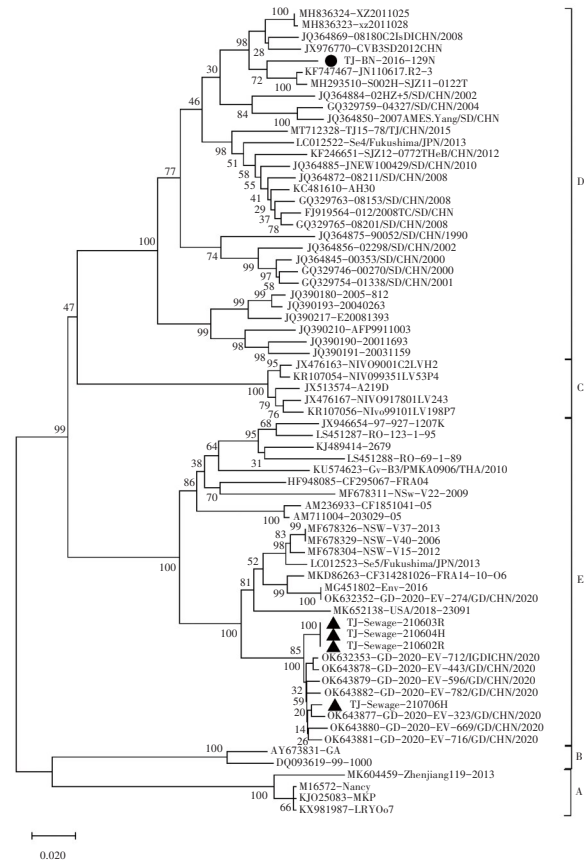
2.3 CVB3 天津分离株系统进化分析 本研究从 GenBank 数据库中选取具有代表性的 CVB3 全长 VP1 编码区序列,与天津分离株一同构建系统发生树。结果显示,根据 VP1 编码区序列,CVB3 可分成 5 个不同的基因型(A~E)。其中,TJ-BN-2016-129N 与 2017

年前我国山东、安徽、河北、广东等地的分离株聚成一簇,均属D基因型,与组内其他毒株平均遗传距离为3.76%~14.87%,与其他型别毒株平均遗传距离为20.50%~24.15%。而 TJ-Sewage-210602R、TJ-Sewage-210603R、TJ-Sewage-210604H 及 TJ-Sewage-210706H 则与澳大利亚、法国株等以及2020年后广东分离株一同属于E基因型,与组内其他毒株平均遗传距离为1.07%~14.73%,与其他型别毒株平均遗传距离为20.54%~28.42%。见图1。

将5株天津分离株的P1区、P2区和P3区与肠道病毒B组其他血清型原型株构建系统发生树,结果显示,5株天津分离株的P1区与CVB3原型株聚成一簇,这个结果与VP1片段的系统发生树结果类似。基于P2区核苷酸序列构建的系统发生树中,TJ-BN-2016-129N与1株肠道病毒(enterovirus, EV)106型毒株KF990476聚为一支,而TJ-Sewage-210602R、TJ-Sewage-210603R、TJ-Sewage-210604H 及 TJ-Sewage-210706H 则与E30毒株AF162711聚在一起。在P3非编码区, TJ-BN-2016-129N 仍与EV106毒株KF990476聚为一支, TJ-Sewage-210602R、TJ-Sewage-210603R、TJ-Sewage-210604H 及 TJ-Sewage-210706H 与1株EV86毒株AY843304关系更近。这一结果提示,在病毒P2区及P3区,5株天津分离株均有重组事件发生。见图2。

**2.4 CVB3天津分离株重组分析** 通过 Simplot 软件进行 simplot 相似性以及 bootstrap 重组分析,结果显示, CVB3天津分离株均提示有重组事件发生。其中,5株天津分离株在结构蛋白区P1区均与CVB3原型株 Nancy 株相似性最高,在非结构蛋白P2和P3区, TJ-BN-2016-129N 与1株 CVB5 毒株 KP266587 发生重组

的可能性较高,而 TJ-Sewage-210602R、TJ-Sewage-210603R、 TJ-Sewage-210604H 及 TJ-Sewage-210706H 则与1株埃可病毒(ECHO virus)18型 MG720260可能存在重组事件。见图3。



注:本研究中的CVB3脑炎分离株用●标出,污水分离株用▲标出。Note: Virus isolated from an encephalitis case was labeled ●, viruses isolated from sewage were labeled ▲.

**图1 基于病毒VP1区序列构建的CVB3系统进化树**  
Fig. 1 Phylogenetic tree constructed based on the VP1 region of CVB3

**表1 5株天津CVB3分离株与CVB3原型株Nancy株核苷酸及氨基酸同源性比较 %**

位点 Region	TJ-BN-2016-129N		TJ-Sewage-210602R		TJ-Sewage-210603R		TJ-Sewage-210604H		TJ-Sewage-210706H	
	核苷酸 Nucleotide	氨基酸 Amino acid	核苷酸 Nucleotide	氨基酸 Amino acid	核苷酸 Nucleotide	氨基酸 Amino acid	核苷酸 Nucleotide	氨基酸 Amino acid	核苷酸 Nucleotide	氨基酸 Amino acid
VP4	77.8	97.1	79.7	97.1	79.7	97.1	79.7	97.1	78.3	97.1
VP2	80.1	96.6	79.8	97.3	79.8	97.3	80.0	97.3	80.0	97.3
VP3	81.5	97.9	81.0	97.1	81.0	97.1	81.0	97.1	80.8	96.6
VP1	80.0	97.2	78.0	95.1	78.0	95.1	78.0	95.1	78.0	95.1
2A	79.8	90.5	77.3	91.8	77.3	91.8	77.1	91.2	76.9	91.8
2B	78.5	92.9	79.1	91.9	79.1	91.9	79.1	91.9	78.5	91.9
2C	80.6	96.7	80.3	98.5	80.3	98.5	80.4	98.5	79.3	98.5
3A	77.9	95.5	77.9	97.8	77.9	97.8	77.9	97.8	76.8	96.6
3B	77.3	86.4	75.8	90.9	75.8	90.9	75.8	90.9	75.8	90.9
3C	80.7	96.2	78.1	92.3	78.1	92.3	78.1	92.3	78.5	92.3
3D	80.1	94.8	77.9	93.5	77.9	93.5	77.8	93.5	78.0	93.7

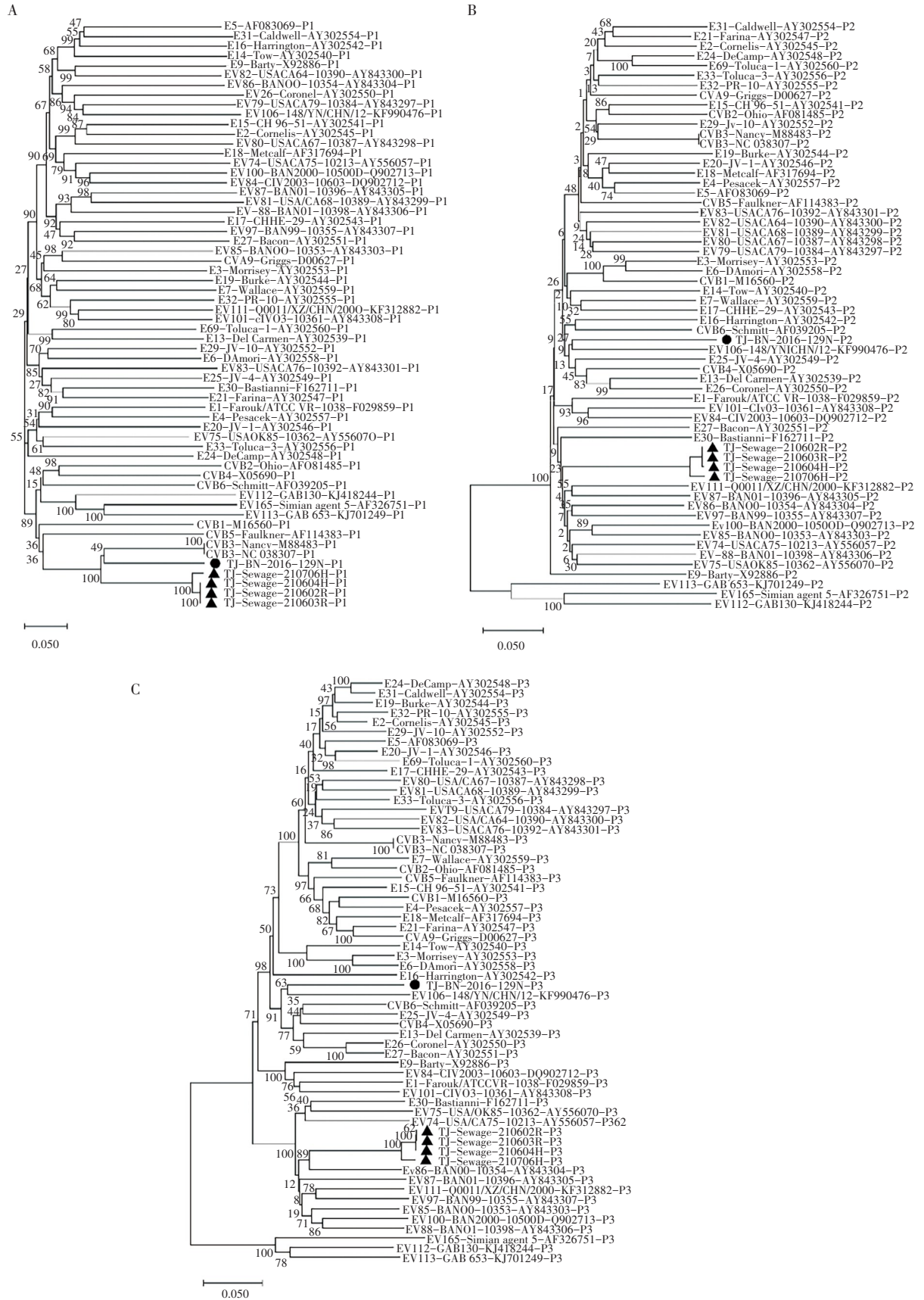
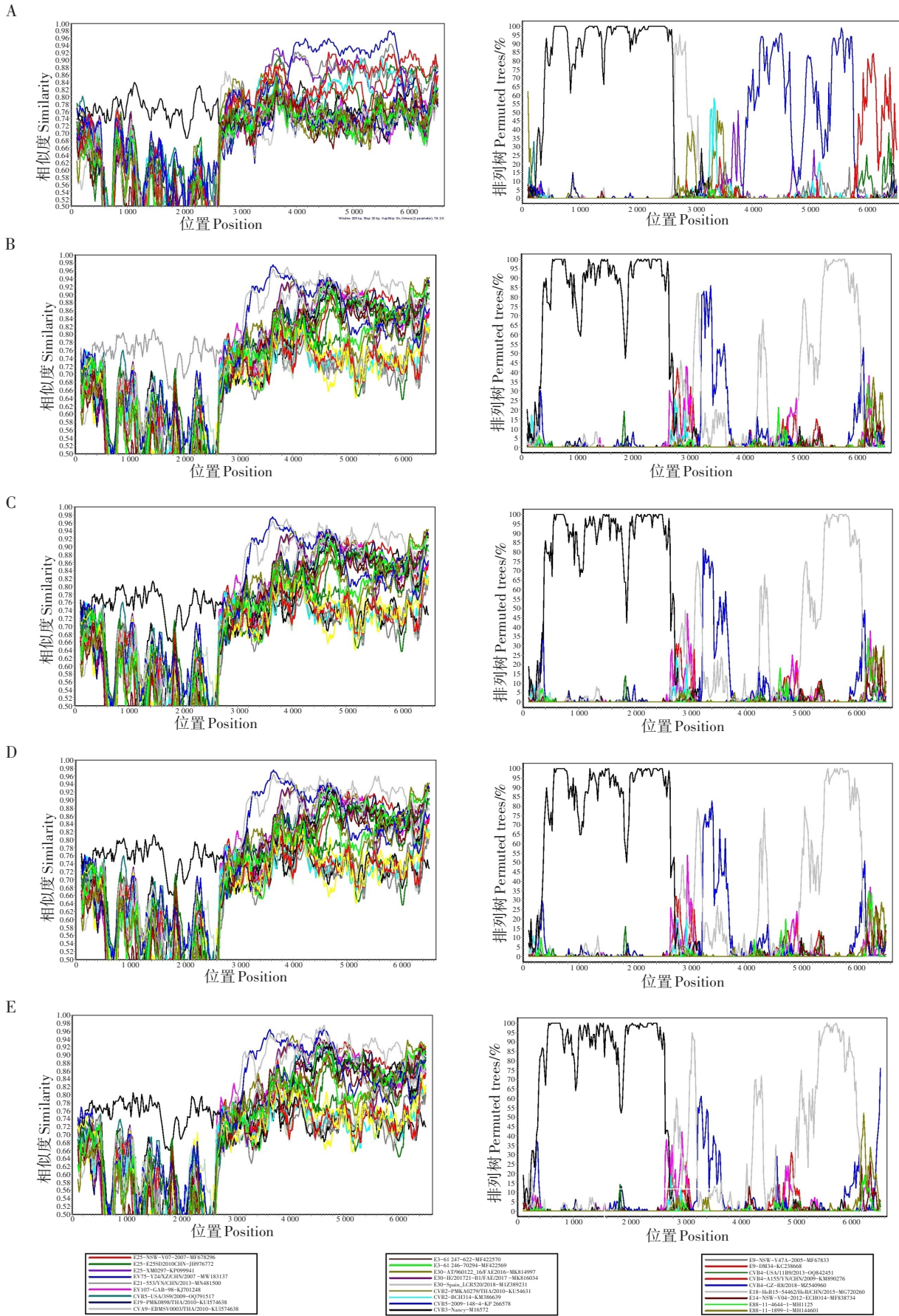


图2 基于肠道病毒B组P1区(A)、P2区(B)及P3区(C)基因序列构建的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic trees constructed based on the P1(A), P2(B) and P3(C) regions of enterovirus B

注:本研究中的CVB3脑炎分离株用●标出,污水分离株用▲标出。Note: Virus isolated from an encephalitis case was labeled ●, viruses isolated from sewage were labeled ▲.



注 Note: A. TJ-BN-2016-129; B. TJ-Sewage-210602R; C. TJ-Sewage-210603R; D. TJ-Sewage-210604H; E. TJ-Sewage-210706H。

图3 天津CVB3分离株与B组肠道病毒流行株编码区序列重组分析

Fig. 3 Recombination analysis of the coding region among Tianjin CVB3 isolates and EV-B strains

### 3 讨论

肠道病毒感染能够引起多种疾病,许多型别的肠道病毒曾引起较大规模的暴发流行,导致在人群中尤其是5岁以下儿童的疾病负担较重。例如2008年在安徽阜阳,肠道病毒71型(enterovirus 71, EV71)感染导致的手足口病(hand, foot and mouth disease, HFMD)暴发,就曾引起多名患儿死亡<sup>[7]</sup>。目前,对肠道病毒的监测主要依托于对手足口病、急性弛缓性麻痹(acute flaccid paralysis, AFP)等疾病的实验室监测网络,在此基础上,多种肠道病毒的分子流行病学特征得到了充分的研究。

作为B组肠道病毒的一员,CVB3的感染在人群中较为多见,其引起的疾病谱广泛,常见疾病如心肌炎、手足口病、无菌性脑膜炎、病毒性脑炎、急性弛缓性麻痹等<sup>[8-10]</sup>,此外,CVB3感染还与糖尿病、胰腺炎、孕妇流产、肌痛等疾病密切相关<sup>[11-14]</sup>。在我国,CVB3已引起多次疾病的暴发流行,如2008年在北京引起急性心肌炎的暴发<sup>[15]</sup>,通过基因分析表明是由重组的CVB3毒株引起的;2008年在山东郯城引起无菌性脑膜炎的暴发<sup>[16]</sup>,进化分析证实中国大陆存在多个CVB3的共流行传播链;2012年在河北石家庄引起手足口病的流行,通过进化动力学分析表明地域驱动的适应性在CVB3多样化和进化中起到重要作用<sup>[17]</sup>。目前没有专门针对CVB3感染进行监测的网络,但上述报道均对引起疾病暴发的CVB3构建系统发育树进行了基因组分析,阐述我国CVB3的地域流行分支的持续传播情况和病毒的分子进化路径。在敏感细胞系中培养肠道病毒并根据中和试验血清分型是在分子血清分型时代到来之前诊断肠道病毒感染的推荐方法。目前公认编码VP1蛋白的核苷酸序列是肠道病毒主要的分子分型依据<sup>[4]</sup>。基于VP1区全长基因序列可将CVB3分为A~E 5个不同的基因型,不同基因型别间引起的疾病有所差异<sup>[18]</sup>。A基因型CVB3感染主要导致心肌炎发生,而C基因型与D基因型中AFP病例来源数量要显著高于其他基因型,同时D基因型中HFMD来源占比也是5种基因型中最高的,而E基因型的CVB3感染则主要与HFMD、糖尿病以及无菌性脑膜炎等疾病相关。

本研究中天津CVB3分离株分属2个不同基因型,从进化分析结果来看,2020年之前中国大陆流行的CVB3优势基因型为D基因型,而天津2016年分离到的毒株TJ-BN-2016-129N属于D基因型,这与同时期国内报道的流行株型别一致<sup>[8]</sup>。广东省2020年首次在中国大陆检出E基因型的CVB3毒株<sup>[9]</sup>,同时基于环境监测的结果也显示,在2020年之前,D基因型

的CVB3在环境中占绝对优势,而在2020年之后,环境中CVB3的优势基因型转变为了E基因型<sup>[9]</sup>。而2021年的分离株TJ-Sewage-210602R、TJ-Sewage-210603R、TJ-Sewage-210604H及TJ-Sewage-210706H均属于E基因型,这是我国北方地区首次报道E基因型CVB3,环境中病毒监测结果与广东省的研究结果相似<sup>[9]</sup>,说明在天津市可能也发生了CVB3优势基因型的转变。

CVB3引起不同疾病的发生也可能与病毒毒力不同有关。在CVB3导致的临床症状与病毒序列中存在的核苷酸以及氨基酸位点的突变存在一定的关联性。在病毒VP1区P126M和D155G两个氨基酸位点的突变,可能导致病毒对心肌损伤的能力减弱,减少心肌炎的发生<sup>[20]</sup>。而VP2蛋白K158R以及VP3蛋白E60G两个位点的突变同样能够减弱病毒对心肌的毒力<sup>[21]</sup>。研究发现CVB3病毒5'NTR区第234位氨基酸的突变可能与克山病的发病相关<sup>[22]</sup>。在本研究中,3株污水分离株TJ-Sewage-210602R、TJ-Sewage-210603R及TJ-Sewage-210604H仅存在VP2蛋白T151A突变,而其他主要毒力位点与CVB3原型株Nancy以及出现心肌炎、无菌性脑膜炎以及重症HFMD等严重临床表现患者的分离株一致<sup>[23]</sup>,提示这3株病毒毒力可能较强,有引起严重疾病发生的风险。TJ-Sewage-210706H在5'NTR区出现T234C突变,提示该毒株毒力与其他3株污水分离株相比可能较弱。而脑炎分离株TJ-BN-2016-129N在VP2蛋白上除T151A突变外还存在K158E突变,而该氨基酸位点突变情况相对较多,其对病毒毒力的影响目前仍需要进一步的研究。

由于不同的肠道病毒型别在人群中共同流行,会导致病毒间频繁地发生基因重组现象,目前已有国内外多个研究对CVB3重组情况进行了报道<sup>[3,9,24-27]</sup>。对西藏地区2株CVB3分离株进行分析后发现,病毒在部分的P2与P3编码区与1株CVB5毒株发生了重组<sup>[27]</sup>。YANG等<sup>[18]</sup>系统性阐述了全球CVB3流行株在P2与P3区存在的23种不同的重组模式,表明CVB3的重组事件通常发生在非结构蛋白区。在本研究中,CVB3天津分离株也被证实可能发生了重组。其中TJ-BN-2016-129N可能与CVB5分离株KP266587发生重组,这一重组模式与西藏CVB3分离株的重组模式类似。而污水分离株TJ-Sewage-210602R、TJ-Sewage-210603R、TJ-Sewage-210604H及TJ-Sewage-210706H则与E18分离株MG720260类似株可能发生了重组事件,这与YANG等<sup>[18]</sup>研究中Lineage J的重组模式一致。由于CVB3 P3区中3D蛋白为RNA依赖的

RNA聚合酶,对病毒的复制起到关键作用<sup>[28]</sup>,目前对肠道病毒重组的研究也多集中于该编码区<sup>[29]</sup>,因此在该片段处的重组对CVB3的持续性传播可能起到一定作用。

我们在天津分离的到CVB3毒株,仅有1例是2016年从脑炎患者样本中分离得到的,另外4株均来自2021年生活污水样本。而2017至2022年间,在天津市手足口病、病毒性脑炎以及急性弛缓性麻痹等疾病的监测中均未有CVB3病毒的检出。不同地区人群中CVB3毒株的分离情况存在差异,山东、江苏连续多年均能够分离到CVB3<sup>[30-31]</sup>,而四川、贵州、广东CVB3分离存在周期性<sup>[10,31]</sup>。有基于血清中和抗体调查的研究显示, CVB3在5岁儿童中中和抗体阳性率可达50%以上<sup>[32]</sup>。因此,如何准确判断CVB3在人群中的传播流行情况,仍需进一步的研究。

CVB3可通过多种途径传播,且隐性感染比例较高,对病毒的监测以及疾病的防控难度较大。而基于外环境生活污水监测的结果显示, CVB3检出率在水体中的检出率较高<sup>[19]</sup>。由于肠道病毒在水体中存活时间可达6~9个月,因此污水作为传染源有引起疾病暴发的风险<sup>[33]</sup>。而通过外环境生活污水监测可初步了解病毒的流行趋势,并且能够对疾病的发生起到提示作用。2018年河南省外环境生活污水监测中,阳性毒株的检出时间较同型别毒株在AFP病例样本中检出时间要提前1~3个月<sup>[33]</sup>。外环境生活污水中肠道病毒的监测敏感性与及时性均要高于同时期AFP病例监测的结果<sup>[34]</sup>。而广东省的相关研究同时在外环境污水与HFMD病例中监测到CVB3毒株,并在国内首次报道了E基因型的流行<sup>[9,19]</sup>。因此,系统完善的外环境污水监测手段,是疾病监测之外重要的补充手段。本研究从2021年环境污水中分离到4株E基因型CVB3毒株,表明该病毒在天津已经存在人群中传播的可能性,需加强人群中的监测。

本研究通过对天津市不同来源的CVB3毒株进行全基因组序列测定与分析,首次在我国北方地区报道E基因型CVB3,提示天津市人群有E基因型CVB3感染存在,同时其流行优势基因型可能发生了转变,需要进一步加强人群中CVB3的监测。同时系统的外环境污水监测可作为病例监测的重要补充,为疾病的发生提供预警。

**伦理审查与知情同意** 本研究不涉及伦理,患者基本信息的采集和各项检测均获得受检者或其家属的知情同意

**利益冲突声明** 所有作者声明不存在利益冲突

## 参考文献

[1] TRACY S, CHAPMAN N M, DRESCHER K M, et al. Evolution of

virulence in picornaviruses[M]//Current Topics in Microbiology and Immunology. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2006: 193-209.

[2] LINDBERG A M, STALHANDSKE P O K, PETERSSON U. Genome of coxsackievirus B3[J]. Virology, 1987, 156(1): 50-63.

[3] GUO H R, LI Y, LIU G C, et al. A second open reading frame in human enterovirus determines viral replication in intestinal epithelial cells[J]. Nat Commun, 2019, 10: 4066.

[4] OBERSTE M S, MAHER K, KILPATRICK D R, 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.

[5] MASSILAMANY C, GANGAPLARA A, REDDY J. Intricacies of cardiac damage in Coxsackievirus B3 infection: implications for therapy[J]. Int J Cardiol, 2014, 177(2): 330-339.

[6] 杨倩, 曾汉日, 郑焕英, 等. 广东省2020年首次报道E基因型柯萨奇病毒B组3型的鉴定及基因特征分析[J]. 病毒学报, 2022, 38(1): 57-63.

YANG Q, ZENG H R, ZHENG H Y, et al. Novel analyses of the genetic characteristics and identification of genotype E Coxsackievirus B3 strains in Guangdong Province, China, in 2020[J]. Chin J Virol, 2022, 38(1): 57-63.(in Chinese)

[7] 陈娜, 马小珍, 王成, 等. 柯萨奇病毒B组3型四川分离株的基因特征分析[J]. 预防医学情报杂志, 2022, 38(1): 120-124.

CHEN N, MA X Z, WANG C, et al. Genetic characteristics of coxsackievirus B3 strains isolated in Sichuan Province[J]. J Prev Med Inf, 2022, 38(1): 120-124.(in Chinese)

[8] WU Z Q, DU J, ZHANG T, et al. Recombinant human Coxsackievirus B3 from children with acute myocarditis in China[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(9): 3083-3086.

[9] 樊庆莹, 周晓琳, 杨赫, 等. 无菌性脑膜炎暴发中柯萨奇B3病毒的基因特征分析[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2009, 23(6): 455-457.

[10] HAN Z, ZHANG Y, HUANG K, et al. Two Coxsackievirus B3 outbreaks associated with hand, foot, and mouth disease in China and the evolutionary history worldwide [J]. BMC infectious diseases, 2019, 19(1): 466.

[11] TAO Z X, SONG Y Y, LI Y, et al. Coxsackievirus B3, Shandong Province, China, 1990-2010[J]. Emerg Infect Dis, 2012, 18(11): 1865-1867.

[12] 谭昭麟, 吕莉琨, 李力, 等. 天津市致病性脑炎柯萨奇病毒B组5型全基因组序列分析[J]. 病毒学报, 2021, 37(1): 97-105.

TAN Z L, LYU L K, LI L, et al. Complete genome analysis of coxsackievirus B5 causing viral encephalitis isolated in Tianjin, China [J]. Chin J Virol, 2021, 37(1): 97-105.(in Chinese)

[13] ZHANG Y, ZHU Z, YANG W Z, 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.

[14] HWANG J H, KIM J W, HWANG J Y, et al. Coxsackievirus B infection is highly related with missed abortion in Korea[J]. Yonsei Med J, 2014, 55(6): 1562-1567.

[15] WIYATNO A, ANTONJAYA U, MA'ROEF C N, et al. Detection and identification of Coxsackievirus B3 from sera of an Indonesian patient with undifferentiated febrile illness[J]. J Infect Dev Ctries, 2016, 10(8): 880-883.

- [16] HOBER D, SANE F, JAÏDANE H, et al. Immunology in the clinic review series; focus on type 1 diabetes and viruses: role of antibodies enhancing the infection with Coxsackievirus-B in the pathogenesis of type 1 diabetes[J]. Clin Exp Immunol, 2012, 168(1): 47-51.
- [17] YAN K P, YANG J E, QIAN Q A, et al. Pathogenic role of an IL-23/ $\gamma\delta$ T17/neutrophil axis in coxsackievirus B3 - induced pancreatitis [J]. J Immunol, 2019, 203(12): 3301-3312.
- [18] YANG Q, YAN D, SONG Y, et al. Whole-genome analysis of Coxsackievirus B3 reflects its genetic diversity in China and worldwide [J]. Virology journal, 2022, 19(1): 69.
- [19] HUANG S F, ZHANG Y, ZHANG W, et al. Prevalence of non-polio enteroviruses in the sewage of Guangzhou city, China, from 2013 to 2021[J]. Microbiol Spectr, 2023, 11(3): e0363222.
- [20] DAN M, CHANTLER J K. A genetically engineered attenuated Coxsackievirus B3 strain protects mice against lethal infection[J]. J Virol, 2005, 79(14): 9285-9295.
- [21] STADNICK E, DAN M, SADEGHI A, et al. Attenuating mutations in coxsackievirus B3 map to a conformational epitope that comprises the puff region of VP2 and the knob of VP3[J]. J Virol, 2004, 78(24): 13987-14002.
- [22] REN L Q, LI X J, LI G S, et al. Coxsackievirus B3 infection and its mutation in Keshan disease[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(22): 3299-3302.
- [23] 卞莲莲, 姚昕, 毛群颖, 等. 江苏省2012年柯萨奇病毒B组3型分离株全基因组序列分析[J]. 中国病毒病杂志, 2014, 4(4): 255-260.  
BIAN L L, YAO X, MAO Q Y, et al. Sequence analysis of Coxsackievirus B3 strains isolated from Jiangsu Province of China in 2012[J]. Chin J Viral Dis, 2014, 4(4): 255-260.(in Chinese)
- [24] WANG H, QIAN Y J, QIAN C H, et al. Two Natural Recombination gave rise to the Coxsackievirus B3 GV that triggered outbreaks in China in 2006 - 2012[J]. Infect Dis NOW, 2021, 51(1): 81-85.
- [25] ZHANG W Q, LIN X J, JIANG P, et al. Complete genome sequence of a Coxsackievirus B3 recombinant isolated from an aseptic meningitis outbreak in Eastern China[J]. Arch Virol, 2016, 161(8): 2335-2342.
- [26] LAXMIVANDANA R, CHERIAN S S, YERGOLKAR P, et al. Genomic characterization of Coxsackievirus type B3 strains associated with acute flaccid paralysis in south-western India[J]. J Gen Virol, 2016, 97(3): 694-705.
- [27] 韩振志, 张勇, 红梅, 等. 两株西藏CV-B3的全基因组特征及溯源分析[J]. 病毒学报, 2018, 34(6): 828-838.  
HAN Z Z, ZHANG Y, HONG M, et al. Genetic characteristics of two CV-B3 sequences from Tibet, China, and analysis of trace[J]. Chin J Virol, 2018, 34(6): 828-838.(in Chinese)
- [28] DOMINGO E, MARTIN V, PERALES C, et al. Coxsackieviruses and quasispecies theory: evolution of enteroviruses[M]//TRACY S, OBERSTE MS, DRESCHER KM. Group B Coxsackieviruses. Berlin, Heidelberg: Springer, 2008: 3-32.
- [29] TAN Y, HASSAN F, SCHUSTER J E, et al. Molecular evolution and intraclade recombination of enterovirus D68 during the 2014 outbreak in the United States[J]. J Virol, 2015, 90(4): 1997-2007.
- [30] TAO Z X, WANG H Y, LI Y, et al. Molecular epidemiology of human enterovirus associated with aseptic meningitis in Shandong Province, China, 2006-2012[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e89766.
- [31] FU X M, MAO L X, WAN Z Z, et al. High proportion of Coxsackievirus B3 genotype A in hand, foot and mouth disease in Zhenjiang, China, 2011 - 2016[J]. Int J Infect Dis, 2019, 87: 1-7.
- [32] TAO Z X, LI B, XU A Q, et al. Seroprevalence of Coxsackievirus B3 in Yantai, China[J]. Jpn J Infect Dis, 2013, 66(6): 537-538.
- [33] 张明瑜, 杨建辉, 路环环, 等. 2018年河南省肠道病毒环境监测结果分析[J]. 病毒学报, 2021, 37(5): 1112-1118.  
ZHANG M Y, YANG J H, LU H H, et al. Analyses of environmental-monitoring results of enteroviruses in Henan Province, China, in 2018[J]. Chin J Virol, 2021, 37(5): 1112-1118.(in Chinese)
- [34] 李彩霞, 郑焕英, 祝双利, 等. 2015—2017年广州市生活污水肠道病毒监测[J]. 中国疫苗和免疫, 2021, 27(4): 382-386.  
LI C X, ZHENG H Y, ZHU S L, et al. Surveillance for enteroviruses in Guangzhou sewage from 2015 to 2017[J]. Chin J Vaccines Immun, 2021, 27(4): 382-386.(in Chinese)

收稿日期:2023-07-10 编辑:黄艳