

DOI: 10.20098/j.cnki.1001-5132.2023.0907

柯萨奇病毒 A 组 6 型中国株的分子进化和时空传播分析

贾永涛^{1,2}, 唐佳婕^{1,2}, 王 惠^{1,2}, 董长征^{1,2*}

(1. 宁波大学 医学部, 浙江 宁波 315211; 2. 浙江省病理生理学技术研究重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 柯萨奇病毒 A 组 6 型(Coxsackievirus A6, CV-A6)是手足口病的主要病原体, 可引起非典型手足口病和中枢神经系统疾病, 对儿童造成严重的疾病负担, 尚无上市的疫苗和抗病毒药物. 基于 3288 条 CV-A6 中国株 VP1 序列, 利用 Nextstrain 平台的 augur 病原体生物信息分析包, 构建了 CV-A6 的时间尺度分子进化树, 确定了进化分支和分支突变, 分析了分支突变与抗原表位之间的联系. 进一步分析了 CV-A6 中国株各分支在中国七大地理区域的时空分布和优势分支, 绘制了主要分支的时空传播路线. 结果发现, CV-A6 中国株主要分为 B、C 和 D 三个进化分支以及 D2、D3a 和 D3b 三个子分支, 抗原表位处的突变形成了新的进化分支, 促进了病毒的流行. 华南和华东是 CV-A6 中国株的主要起源地, 华南和华东相互输出、华东输出全国是中国株的主要传播模式. 对 CV-A6 中国株的分子进化和时空传播分析, 为 CV-A6 引起的手足口病等疫情的监测、预警和防控提供了重要支持.

关键词: 柯萨奇病毒 A 组 6 型; 肠道病毒; 分子进化; 时空传播分析; 生物信息学

中图分类号: R373.2; R511

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2024) 01-0084-09

人肠道病毒在物种分类上属于小 RNA 病毒科(Picornaviridae)肠道病毒属(*Enterovirus*), 分为 A、B、C 和 D 四个种型. 柯萨奇病毒 A 组 6 型(Coxsackievirus A6, CV-A6)属于肠道病毒 A 种, 是手足口病的主要病原体之一. 与同属于肠道病毒 A 种的肠道病毒 A 种 71 型(*Enterovirus* A71, EV-A71)和 CV-A16 所引起的手足口病不同的是, CV-A6 感染常表现为非典型症状, 包括全身性大疱疹、脱甲和睾丸炎等^[1-4]. CV-A6 和 EV-A71 一样, 都可引起无菌性脑膜炎和脑干脑炎等中枢神经系统疾病^[5-6], 造成严重的疾病负担. CV-A6 于 1949 年在美国首次被分离, 2008 年在芬兰引发大规模疫情^[7], 此后在欧洲^[8-9]、美洲^[10-11]和亚洲^[12-13]等全球各地引发了广泛的疫情, 并逐渐取代 EV-A71 成为手足口病流行的优势病原体. 自 2013 年以来, 我国 CV-A6 感染的病例数呈明显的上升趋势^[14], CV-A6 很快成为了上海、深圳和北京等地区手足口病的优势病原

体^[6,15-16]. 近几年, 广西^[17]、福建^[18]、江苏^[19]、四川^[20]和山东^[21]等全国大多数省区也都出现了以 CV-A6 感染为主的手足口病疫情, CV-A6 已经成为我国手足口病流行的优势病原体. 虽然手足口病疫情已经在全国高发十多年, 但是更多的研究关注时空聚集性, 即哪些地区是手足口病的高风险地区, 以 CV-A6 为代表的肠道病毒的起源和传播路线尚不清楚.

CV-A6 是一种具有单股正链 RNA 的无包膜病毒, 病毒的基因组被衣壳包裹. 病毒衣壳由四种结构蛋白(VP1、VP2、VP3 和 VP4)组成^[22], 表面分布着能与抗体和受体结合的抗原表位. 病毒与受体结合后引起构象改变, VP1 N-端从衣壳内部暴露到衣壳表面, 引发衣壳裂解, 然后病毒基因组从衣壳中释放到宿主细胞, 完成感染宿主细胞过程. EV-A71 疫苗已于 2016 年由我国研发成功并上市^[23], 为防控 EV-A71 引起的手足口病尤其是重症手足口

收稿日期: 2023-09-08.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journal.lg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 浙江省基础公益研究计划(LGF18C060001); 宁波市公益类科技计划(2021S135).

第一作者: 贾永涛, 硕士研究生, 主要研究方向: 肠道病毒生物信息学. E-mail: yongtao_jyt@163.com

*通信作者: 董长征, 博士/副教授, 主要研究方向: 肠道病毒生物信息学. E-mail: dongchangzheng@nbu.edu.cn

病做出了巨大贡献, 而包括 CV-A6 在内的其他肠道病毒均无上市疫苗, 也没有相应的抗病毒药物。因此, 持续对 CV-A6 等肠道病毒的变异进行监测和传播路线进行追踪对防控大规模手足口病疫情非常重要。

本实验室前期发展了肠道病毒抗原表位的生物信息学预测算法, 并成功地应用到肠道病毒 A 种(EV-A71、CV-A16^[24]、CV-A6^[25]和 CV-A10^[26])、B 种(CV-B1 等^[27]和 E18^[28])和 D 种(EV-D68^[29])等代表性肠道病毒的表位预测和研究中, 发现了肠道病毒抗原表位分布的基本规律。本文以前期确定的 CV-A6 抗原表位^[25]为基础, 分析其在 CV-A6 分子进化中的作用, 为病毒基因组变异监测提供参考依据。VP1 是抗原表位分布最多、突变频率最高、公共数据库中序列最丰富的结构蛋白^[24], 而全基因组序列则较少且病毒株采样地区分布严重不均衡。因此, 本文基于 CV-A6 中国株 VP1 序列, 利用 Nextstrain 平台的 augur 病原体生物信息分析包, 构建了 CV-A6 的时间尺度分子进化树, 确定了进化分支(Clade)和分支突变, 分析了分支突变与抗原表位之间的联系, 并进一步分析了 CV-A6 中国株各分支在中国七大地理区域的时空分布和优势分支, 绘制了主要分支的时空传播路线。

1 材料与方法

1.1 CV-A6 中国株 VP1 序列收集

从 ViPR 病毒数据库^[30](<https://www.viprbrc.org/brc>)和 NCBI Nucleotide 数据库^[31](<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>)下载所有长度大于 900 bp 的 CV-A6 中国株 VP1 序列, 截止时间为 2023 年 6 月 30 日, 并收集每条序列的信息, 包括 GenBank 序列号、病毒株名、病毒株分离日期和病毒株分离省市等。剔除实验室适应性毒株、克隆株和信息不全序列, 最终获得 3 288 条 CV-A6 中国株 VP1 序列, 病毒株分离日期介于 1992 年 12 月和 2022 年 11 月之间, 来自 31 个省、自治区、直辖市和特别行政区。为了清晰地表示病毒株的时空分布和避免采样偏倚, 以七大地理区域(华东、华南、西南、华北、华中、东北和西北)进行空间分类。分子进化树构建以 CV-A6 原株(Gdula 株^[32], GenBank 序列号: AF081297)的 VP1 序列作为参考株。

1.2 基于 Nextstrain 平台的 CV-A6 中国株分子进化和时空传播分析

Nextstrain^[33]是一款免费、开源的生物信息分析平台, 可针对病原体基因或基因组数据, 通过强大的生物信息分析工具和数据可视化功能, 监测和分析病原体的分子进化和时空传播路线。本研究基于本地化部署的 Nextstrain 平台, 利用 augur 病原体生物信息分析包对 CV-A6 中国株进行分子进化和时空传播分析。利用 Snakemake 流程管理工具^[34], 逐一执行 augur 分析包内的分析命令。align 命令调用内嵌的 MAFFT 软件^[35]对 CV-A6 中国株 VP1 序列进行多重序列比对, tree 命令调用 IQ-tree 工具^[36]使用最大似然法构建分子进化树(Gdula 作为参考株), refine 命令调用 TreeTime 工具^[37]构建基于时间尺度的分子进化树并优化进化树和确定时空传播路线, clade 命令标注进化分支和确定分支突变, 表位突变标注依据之前的研究结果^[25], frequencies 命令构建进化分支和突变的频率分布图。最后利用 Nextstrain 平台的 auspice 工具对分析结果进行基于 JavaScript 的网页互动可视化展示。

2 结果

2.1 CV-A6 中国株的分子进化分析

基于 3 288 条 CV-A6 中国株 VP1 序列构建的时间尺度分子进化树如图 1 所示。CV-A6 进化树分为 A、B、C 和 D 四个进化分支。A 分支为美国分离的原株 Gdula, 作为参考株; 中国株包含 B、C 和 D 三个分支。B 分支有 6 株, 其中 1 株于 1992 年从山东分离, 其余 5 株于 2004—2007 年从广东分离(表 1)。C 分支仅有 1 株, 于 1996 年从山东分离。D 分支最多, 共有 3 281 株; 绝大多数 D 分支病毒株属于 D2 和 D3 两个子分支, 而 D3 又可细分为 D3a 和 D3b。大约在 1944 年, CV-A6 进化形成 A 和 B~D 两个分支, B~D 分支是 B、C 和 D 分支的共同祖先(图 1)。B~D 分支先后在 1968 和 1979 年分歧成 B、C 和 D 三个分支。D2 和 D3 子分支于 1997 年形成, 而 D3 进一步在 2004 年分歧成 D3a 和 D3b, 其中 D3a 是近十年来我国 CV-A6 流行的优势株(3 040/3 288), 占病毒株总数的 92.5%。随着突变的累积, 新的进化分支不断形成, 并替换旧的分支成为优势分支。

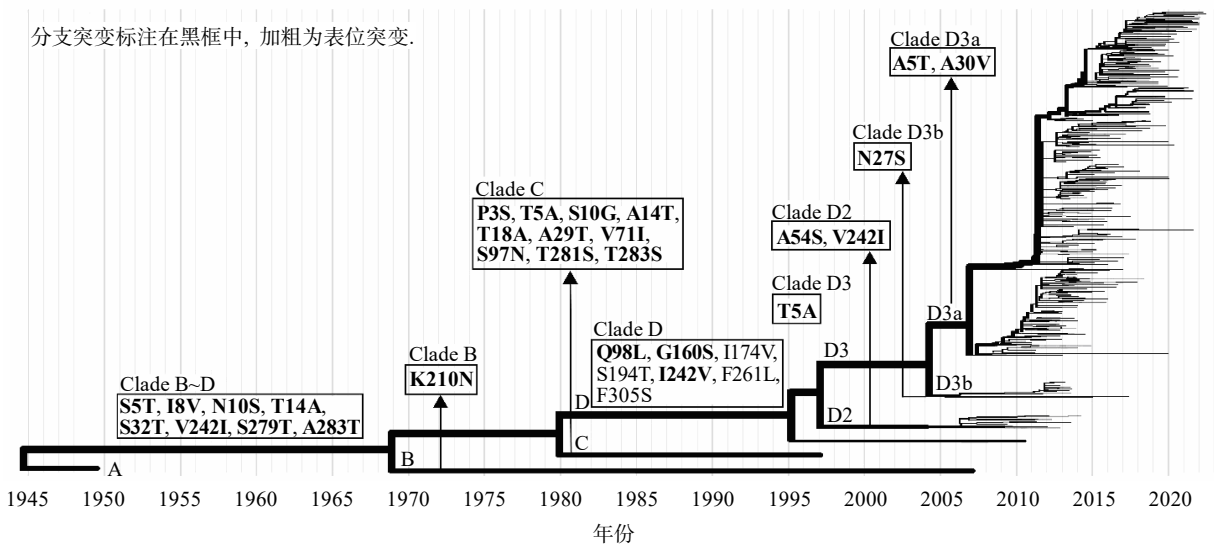


图 1 基于 CV-A6 中国株 VP1 序列的时间尺度分子进化树

表 1 CV-A6 中国株的时空分布

地理区域	VP1 数目(构成比/%)	时间范围	进化分支(序列数/条)
华东地区	1 134 (34.5)	1992—2022 年	B(1), C(1), D(7), D2(31), D3a(1 059), D3b(35)
华南地区	743 (22.6)	2004—2018 年	B(5), D2(22), D3a(636), D3b(80)
西南地区	684 (20.8)	2013—2021 年	D2(1), D3a(681), D3b(2)
华北地区	380 (11.6)	2010—2020 年	D2(22), D3a(343), D3b(15)
东北地区	161 (4.9)	2011—2021 年	D2(5), D3a(155), D3b(1)
华中地区	130 (3.9)	2010—2019 年	D2(14), D3a(116)
西北地区	56 (1.7)	2011—2018 年	D2(5), D3a(50), D3b(1)
合计	3 288 (100)	1992—2022 年	B(6), C(1), D(7), D2(100), D3a(3 040), D3b(134)

每个进化分支上都存在分支突变. 对比本实验室之前的表位预测结果, 可以发现 CV-A6 大多数分支突变都位于表位上. B~D 分支突变包括 S5T、I8V、N10S、T14A、S32T、V242I、S279T 和 A283T, 其中 S5T、I8V、N10S、T14A 和 S32T 位于 N-端“呼吸表位”区域^[25,27], V242I 位于 HI 环表位, S279T 和 A283T 位于 C-端表位. B 分支突变为 GH 环表位的 K210N. C 分支突变包括位于“呼吸表位”的 P3S、T5A、S10G、A14T、T18A、A29T 和 V71I, BC 环表位的 S97N, C-端表位的 T281S 和 T283S. D 分支突变包括 BC 环表位的 Q98L, EF 环表位的 G160S 和 HI 环表位的 I242V. D2(A54S 和 V242I)、D3(T5A)、D3a(A5T 和 A30V) 和 D3b(N27S)都位于“呼吸表位”或 HI 表位(V242I). 可以发现, 每个进化分支都有位于表位的独特的分支突变.

2.2 CV-A6 中国株的时空分布

3 288 株 CV-A6 中国株中, 华东地区分离的病毒株数最多, 有 1 134 株, 占 34.5%; 华南和西南次之, 各有 743 和 684 株, 分别占 22.6%和 20.8%. 华东、华南和西南共分离了约 80%病毒株, 是全国主要的分离地区. 华北、东北和华中地区各有 380、161 和 130 株, 分别占 11.6%、4.9%和 3.9%. 西北地区最少, 只有 56 株(1.7%). 病毒株分离年份介于 1992—2022 年这 31 年间, 其中 1992—2001 年这 10 年间只有 2 株, 2002—2011 年这 10 年间有 296 株, 2012—2022 年这 11 年间有 2 990 株, 大多数病毒株都是近十年分离的. 华东地区不仅病毒株数最多, 进化分支类型也最多, 每一种分支都在华东地区获得分离; 华南地区 B 和 D3b 分支分离数最多; 其他地区主要分离 D2、D3a 和 D3b 这几种常见分支, 尤其是 D3a 这种优势分支.

通过频率分布图, 可以简便地观察 CV-A6 各分支的时空分布、优势分支以及在全国七大地理区域的分布(图 2(a)). 2005 年前, B 和 C 分支是主要流行分支, 病毒株从华东和华南分离. 2005 年后, D 分支取代了 B 和 C 分支成为流行分支. D 分支除了主要子分支 D2 和 D3 外, 还有少量其他分支(仍用 D 分支命名)病毒株, 主要从华东分离. D2、D3a 和 D3b 是我国主要分离的 CV-A6 分支, D2 出现最早, 短暂地成为全国多个地区的优势分支后就被 D3a 替代, 直到 2015 年后未再分离到. D3a 约在 2008 年先后出现在华南、华东和华中地区, 很快就成为这几个地区的优势分支, 然后成为了全国的优势分支直至目前. 其间出现了 D3b, 在全国低水平地流行.

同样可以采用频率分布图监测变异的时空分布(图 2(b)). 以 VP1 第 242 个氨基酸残基为例, B 和 C 分支的残基为 I; D 分支发生了突变 I242V, 但 D2 分支又发生了回复突变 V242I, 因此 D2 分支与 B 和 C 分支一样残基都为 I, 其他分支(包括 D、D3a 和 D3b)的优势残基均为 V(D3a 其中一簇发生回复

突变 V242I). 从全国范围看, 1990—2005 年期间流行的是残基 I, 2005 年后优势残基从 I 逐渐变成 V. 从地区看, 残基 V 最先在华东成为优势残基, 然后是华中和华南, 最后是全国其他地区, 这是因为 D3a 分支最先在这几个地区成为优势分支, 而华东在 D3a 分支流行之前, 还流行了一段时间 D 分支. 华南虽然比华中更早出现残基 V, 但因为此时 D2 分支是华南的优势株, 所以残基 I 仍是优势残基, 直至 D2 分支被 D3a 代替, 残基 V 才在华南成为优势残基.

2.3 CV-A6 中国株的时空传播路线

由于早期的一些进化分支(如 B、C 和 D 分支)病毒株数都非常少, 因此本研究重点关注 D3a、D2 和 D3b 这三种主要流行分支的时空传播路线(图 3 和图 4). 图 3 展示了 D3a 分支从华南和华东输出到全国的时空传播路线. 2008 年, 华南开始出现 D3a 病毒株, 2010 年华东也开始出现 D3a 病毒株, 这一时期传播路线主要表现为华南输出到华东. 2013 年, 华南和华东形成相互输出的模式, 华南往华东方向输出的病毒株数更多; 华东开始往西南、华北、

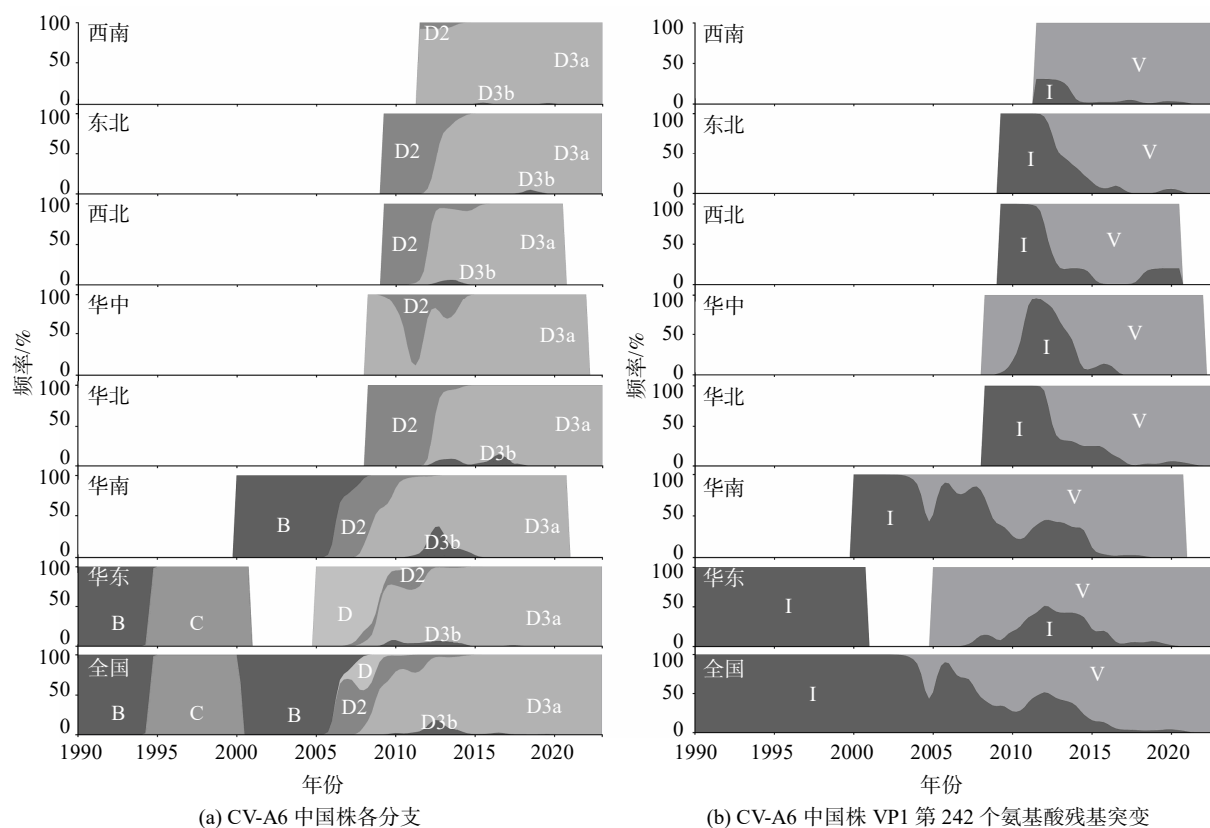


图2 CV-A6 中国株各分支及 VP1 第 242 个氨基酸残基突变的时空分布

圆形代表七大地理区域, 圆形面积表示病毒株数;
曲线代表病毒株传播路线, 曲线宽度表示病毒株传
播数量, 曲线的右手螺旋指尖方向(逆时针方向)表
示传播方向.

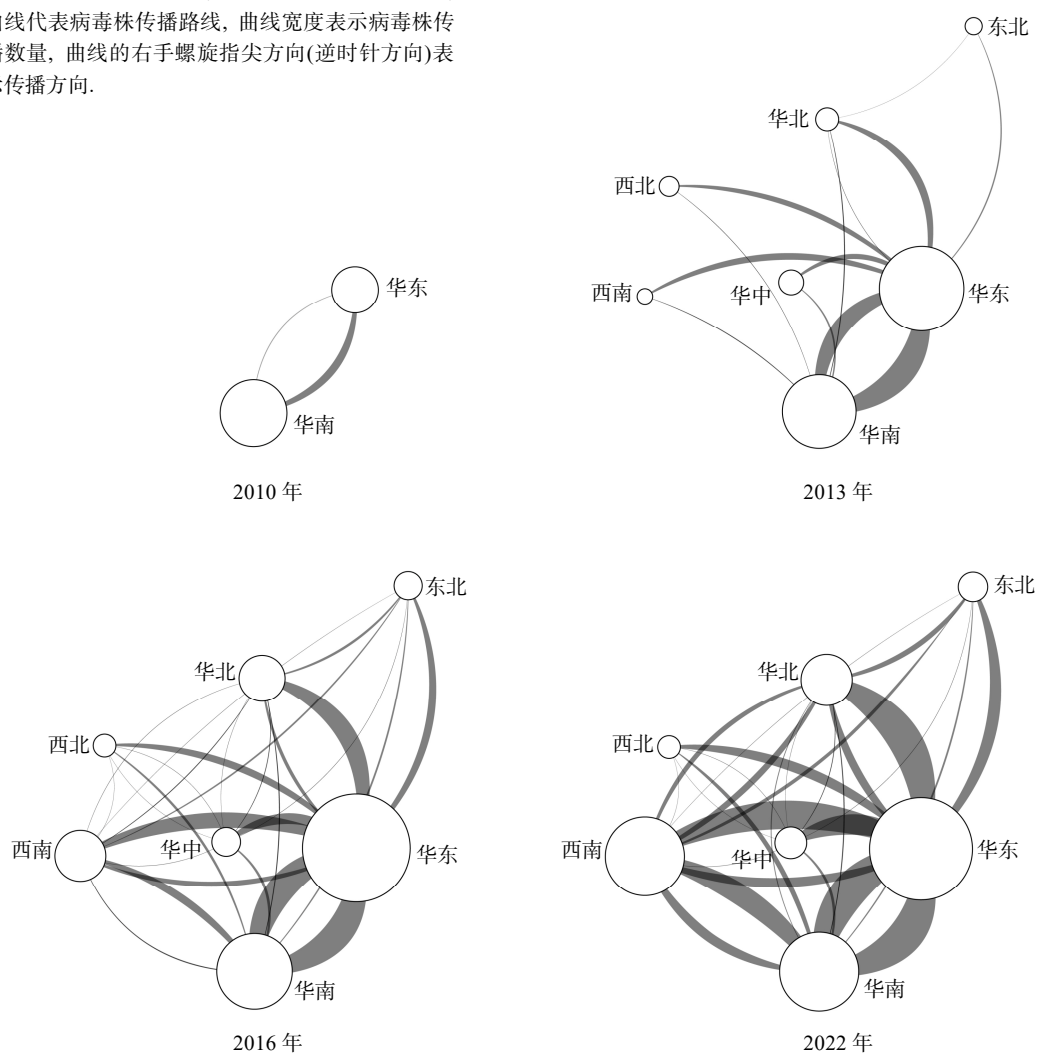


图3 CV-A6 中国株 D3a 分支的时空传播路线

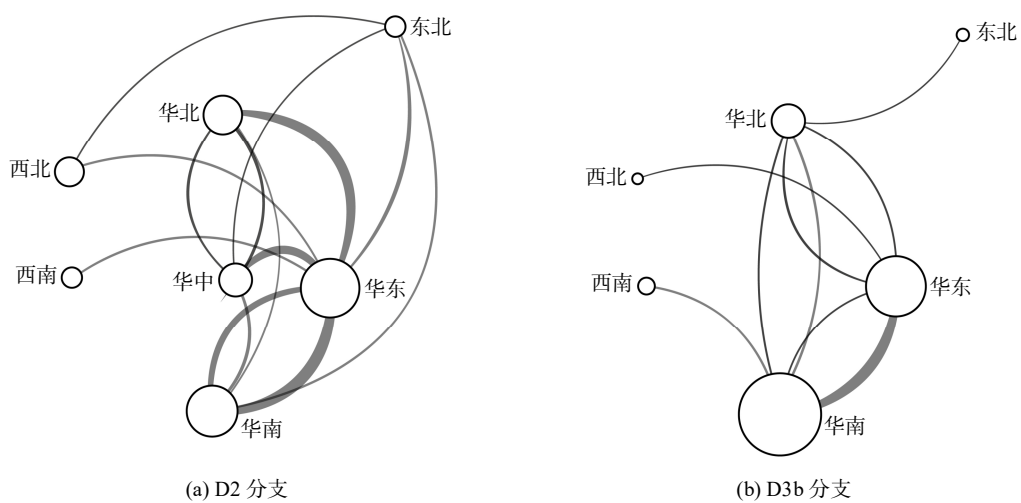


图4 CV-A6 中国株 D2 分支和 D3b 分支的传播路线

华中和西北输出病毒株. 2016 年, 华南和华东相互输出、华东输出全国的传播模式得到完全建立. 2022 年, 西南成为第三大病毒株分离地区, 全国建立相互传播网络.

虽然病毒株数较少, 但 D2 分支同样显示了华南和华东相互输出、华东输出全国尤其是华北和华中的传播模式(图 4(a)). D3b 分支由于病毒株集中在华南、华东和华北三地且病毒株数较少, 全国性的传播模式还不显著, 主要表现为华南向华东输出、华南和华东向全国各地少量输出的传播特征(图 4(b)). 频率分布图上各地区 CV-A6 分支的出现、流行和成为优势分支的过程也间接地反映了这种时空传播路线(图 2).

3 讨论

自 2008 年安徽阜阳大规模暴发以 EV-A71 为主的手足口病疫情以来, 手足口病发病率和死亡率长期位居丙类法定传染病之首, 对儿童造成严重的疾病负担. 但随着感染造成的群体免疫和 EV-A71 疫苗于 2016 年上市, 手足口病的病原谱发生大幅转变: 病原体从 EV-A71 和 CV-A16 为主转变成 CV-A6 和 CV-A16 为主, 重症病例的主要病原体也从 EV-A71 转变成 CV-A6^[23,38]. 因此, 持续对 CV-A6 和 CV-A16 等肠道病毒的变异进行监测和传播路线进行追踪, 加强疫苗和抗病毒药物的研发成为防控手足口病等疫情的关键措施. 由于全基因组测序尚未在病毒监测中得到常规应用, ViPR 和 NCBI 等公共数据库中 CV-A6 中国株基因组序列较少, 其地区分布严重不均衡, 会严重干扰传播路线分析, 因此本研究采用序列比较丰富、分布比较均衡的 VP1 进行变异监测和传播路线分析.

CV-A6 中国株分子进化树主要包括 B、C、D 三个分支以及 D2、D3a 和 D3b 三个子分支, 进化树的拓扑结构与 Song 等^[14]对全球病毒株分析的结果一致, 只是中国未分离到 A 分支和 D1 等少数子分支. 对分支突变的分析发现, 绝大多数突变都位于抗原表位或者 VP1 N-端“呼吸表位”上, 这提示 CV-A6 通过表位突变形成了新的进化分支, 改变了病毒抗原性, 从而突破了宿主的免疫屏障, 促进了病毒分支的流行. 监测表位上的变异及其流行趋势, 对于传染病监测和预警具有较大价值. 有意

思的是, CV-A6 “呼吸表位”集中了最多的分支突变, 这与对肠道病毒 B 种的研究结果^[27-28]相一致, 提示肠道病毒通过“呼吸表位”的突变影响病毒的脱衣壳和感染宿主细胞过程, 同时逃避抗体的中和作用, 增强病毒的适应性. 最典型的是 D3a 迅速压倒 D2 和 D3b 成为优势株, 与“呼吸表位”突变的作用密不可分(图 2). 另外, VP1 有几处氨基酸残基发生多次突变, 可能这些突变对病毒抗原性影响较大, 值得进一步深入研究. 例如, VP1 第 5 个残基, B~D 分支发生 S5T 突变, C 和 D3 分支发生 T5A 突变, D3a 发生 A5T 突变. 此类位点还包括第 10、14、242 和 283 等残基.

CV-A6 中国株第一株是 1992 年采样的. 2008 年安徽阜阳大规模手足口病疫情暴发后, 全国各地才开始普遍采样病毒株. 直到近 5 年 CV-A6 才成为肠道病毒的常规监测血清型. 因此, CV-A6 中国株分离时间集中在近十年. D2、D3a 和 D3b 分支是全国各地区主要流行的进化分支, 但 D2 分支只在全国部分地区短时间内成为优势分支, D3b 分支则一直只占少数, 只有 D3a 分支长期成为优势分支, 这说明 D3a 分支在进化上具有独特优势, 是否是 VP1 表位上的残基差异造成了病毒适应性的差异值得实验研究验证. 另外, 除了 VP1, 衣壳上的其他结构蛋白如 VP2 和 VP3 上的表位变异或者基因组上的其他重要突变也可能是潜在原因. 对病毒变异适应性影响的研究有助于对病毒变异的风险进行评估, 从而帮助预警传染病疫情.

由于全球对 CV-A6 早期的进化分支(如 A、B 和 C 等分支)缺乏监测, 许多分支的病毒株数都非常少, 病毒株采样国家也严重不均衡(中国采样数最多, 超过总数的 80.0%), 难以确定各个分支在全球范围内的起源和传播关系, 因此本研究重点关注 CV-A6 尤其是病毒株数非常充足的 D3a 分支(占病毒株总数的 92.5%)在国内七大地理区域之间的时空传播关系, 帮助各地区监测 CV-A6 及其他肠道病毒的流行情况. 传播路线的确定基于亲缘地理图(phylogeographic map), 基本原理是根据时间尺度的分子进化树上分支之间的亲缘关系推断不同地区病毒株之间的亲缘关系, 它在新冠病毒、流感病毒和西尼罗河病毒的进化和传播研究中已经得到应用^[39-41]. 虽然采样偏倚可能会对亲缘关系

和传播路线的确定造成干扰,但整体上不会对时空传播路线分析造成严重影响,尤其是对 D3a 分支.图 3 很清晰地反映了华南和华东是 D3a 分支在中国的起源地.2008—2010 年间,华南和华东开始出现 D3a 病毒株并开始相互传播,全国其他地区直到 2012 年才出现病毒株.这是因为温暖湿润、日照数较少的气候有利于肠道病毒繁殖,促进手足口病疫情的发生,因此我国东部和南部地区一直是手足口病高发地区,而西部和北部等干燥少雨地区相对来说疫情较轻^[42].特别值得注意的是,只有华东是全国各个地区病毒株的主要输入地,而华南主要输出到华东和西南,具体原因尚不清楚,需要后续深入研究.可能一方面华东与全国人流往来比较密切,另一方面华东的病毒株具有更高的适应性且不断地进化,因此在人群传播中具有优势,更容易成为优势株.传统上西南并不是手足口病疫情的高发地区,但近十年,西南的手足口病报告发病率和病死率都迅速上升^[43],病毒株分离数也排在全国第三位,提示要加强对西南疫情的监测和防控,提高医疗救治水平.华南和华东相互输出、华东输出全国这种传播模式不仅在 D3a 中表现得非常典型,在 D2 和 D3b 中也得到一定程度的反映.这种传播模式是否反映了肠道病毒甚至其他一些病原体的传播模式值得深入研究. EV-A71 和 CV-A6 是不同血清型的肠道病毒,研究证实 EV-A71 疫苗和 CV-A6 不会出现交叉免疫^[23],不会对 CV-A6 的时空分布和传播路线造成直接影响.但 EV-A71 和 CV-A6 等血清型在肠道病毒生态中竞争成为优势血清型,而 EV-A71 疫苗的广泛接种会抑制 EV-A71 的流行,因此会对 CV-A6 的时空分布和传播路线造成间接影响,今后的研究将探索这种间接影响.

综上,本研究发现 CV-A6 通过抗原表位上的突变产生了新的进化分支,促进病毒的流行;华南和华东是 CV-A6 中国株的主要起源地,华南和华东相互输出、华东输出全国是 CV-A6 中国株的主要传播模式,这为 CV-A6 引起的手足口病等疫情的监测、预警和防控提供了重要信息.

参考文献:

- [1] BIAN L, WANG Y, YAO X, et al. Coxsackievirus A6: a new emerging pathogen causing hand, foot and mouth disease outbreaks worldwide[J]. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 2015, 13(9):1061-1071.
- [2] FUJIMOTO T, IIZUKA S, ENOMOTO M, et al. Hand, foot, and mouth disease caused by coxsackievirus A6, Japan, 2011[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2012, 18(2):337-339.
- [3] LI Y, CHANG Z, WU P, et al. Emerging enteroviruses causing hand, foot and mouth disease, China, 2010–2016[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2018, 24(10):1902-1906.
- [4] CHEN Y, DAI B, HAN S, et al. Arising concerns of atypical manifestations in patients with hand, foot, and mouth disease[J]. *Vaccines*, 2023, 11(2):405.
- [5] ZHAO T S, DU J, SUN D P, et al. A review and meta-analysis of the epidemiology and clinical presentation of coxsackievirus A6 causing hand-foot-mouth disease in China and global implications[J]. *Reviews in Medical Virology*, 2020, 30(2):e2087.
- [6] CUI Y, YANG Y N, ZHENG R R, et al. Epidemiological characteristics of hand, foot, and mouth disease clusters during 2016–2020 in Beijing, China[J]. *Journal of Medical Virology*, 2022, 94(10):4934-4943.
- [7] BLOMQUIST S, KLEMOLA P, KAIJALAINEN S, et al. Co-circulation of coxsackieviruses A6 and A10 in hand, foot and mouth disease outbreak in Finland[J]. *Journal of Clinical Virology*, 2010, 48(1):49-54.
- [8] 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]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2012, 18(5):E110-E118.
- [9] MARTÍNEZ-LÓPEZ N, MUÑOZ-ALMAGRO C, LAUNES C, et al. Surveillance for enteroviruses associated with hand, foot, and mouth disease, and other mucocutaneous symptoms in Spain, 2006–2020[J]. *Viruses*, 2021, 13(5):781.
- [10] CISTERNA D M, LEMA C L, MARTINEZ L M, et al. Atypical hand, foot, and mouth disease caused by Coxsackievirus A6 in Argentina in 2015[J]. *Revista Argentina de Microbiología*, 2019, 51(2):140-143.
- [11] LUCHS A, DE AZEVEDO L S, DE SOUZA E V, et al. Coxsackievirus A6 strains causing an outbreak of hand-foot-and-mouth disease in Northeastern Brazil in 2018[J]. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 2022, 64:e16.

- [12] FORONDA J L M, JIAO M M A D, CLIMACOSA F M M, et al. Epidemiological and molecular characterization of Cocksackievirus A6 causing hand, foot, and mouth disease in the Philippines, 2012–2017[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2023, 114:105498.
- [13] PUENPA J, SAENGDAO N, KHANARAT N, et al. Evolutionary and genetic recombination analyses of coxsackievirus A6 variants associated with hand, foot, and mouth disease outbreaks in Thailand between 2019 and 2022[J]. *Viruses*, 2022, 15(1):73.
- [14] SONG Y, ZHANG Y, JI T, et al. Persistent circulation of Cocksackievirus A6 of genotype D3 in mainland of China between 2008 and 2015[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 5491.
- [15] XIAO K, 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]. *Scientific Reports*, 2019, 9:3856.
- [16] WANG J, ZHANG S. Epidemiological characteristics and trends of hand-foot-mouth disease in Shanghai, China from 2011 to 2021[J]. *Frontiers in Public Health*, 2023, 11:1162209.
- [17] CHEN M, ZUO X, TAN Y, et al. Six amino acids of VP1 switch along with pandemic of CV-A6-associated HFMD in Guangxi, southern China, 2010–2017[J]. *Journal of Infection*, 2019, 78(4):323-337.
- [18] HE S, CHEN M, WU W, et al. An emerging and expanding clade accounts for the persistent outbreak of Cocksackievirus A6-associated hand, foot, and mouth disease in China since 2013[J]. *Virology*, 2018, 518:328-334.
- [19] QIAO M, YONG W, WANG X, et al. Identification of recombinant coxsackievirus A6 variants in hand, foot and mouth disease in Nanjing, China, 2013[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2018, 67(8):1120-1129.
- [20] YANG Q, LIU F, CHANG L, et al. Molecular epidemiology and clinical characteristics of enteroviruses associated HFMD in Chengdu, China, 2013-2022[J]. *Virology Journal*, 2023, 20(1):202.
- [21] SU Z, SHI X, ZHANG F, et al. Genome sequence of a human coxsackievirus A6 strain isolated from a severe hand, foot, and mouth disease case in Qingdao, China, in 2017[J]. *Microbiology Resource Announcements*, 2020, 9(17):e01449-19.
- [22] BÜTTNER C R, SPURNÝ R, FÜZIK T, et al. Cryo-electron microscopy and image classification reveal the existence and structure of the coxsackievirus A6 virion[J]. *Communications Biology*, 2022, 5(1):898.
- [23] WANG J, JIANG L, ZHANG C, et al. The changes in the epidemiology of hand, foot, and mouth disease after the introduction of the EV-A71 vaccine[J]. *Vaccine*, 2021, 39(25):3319-3323.
- [24] WANG L, ZHU M, FANG Y, et al. Bioinformatics-based prediction of conformational epitopes for enterovirus A71 and coxsackievirus A16[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1):5701.
- [25] 王丽萍, 戎浩, 方雨露, 等. 柯萨奇病毒 A 组 6 型构象表位的生物信息学预测[J]. *病毒学报*, 2020, 36(6): 1075-1084.
- [26] 戎浩, 王丽萍, 高柳莺, 等. 柯萨奇病毒 A 组 10 型构象表位的生物信息学预测[J]. *病毒学报*, 2019, 35(5):762-769.
- [27] WANG H, FANG Y, JIA Y, et al. In silico epitope prediction and evolutionary analysis reveals capsid mutation patterns for enterovirus B[J]. *PloS One*, 2023, 18(8):e0290584.
- [28] 王惠, 贾永涛, 方雨露, 等. 埃可病毒 18 型构象表位的生物信息学研究[J]. *宁波大学学报(理工版)*, 2023, 36(1):75-83.
- [29] FANG Y, CHEN Q, WANG H, et al. The role of conformational epitopes in the evolutionary divergence of enterovirus D68 clades: a bioinformatics-based study[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2021, 93:104992.
- [30] PICKETT B E, SADAT E L, ZHANG Y, et al. ViPR: an open bioinformatics database and analysis resource for virology research[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(D1):D593-D598.
- [31] BENSON D A, CAVANAUGH M, CLARK K, et al. GenBank[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(D1):D36-D42.
- [32] DALLDORF G. The coxsackie virus group[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1953, 56(3):583-586.
- [33] HADFIELD J, MEGILL C, BELL S M, et al. Nextstrain: real-time tracking of pathogen evolution[J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(23):4121-4123.
- [34] MÖLDER F, JABLONSKI K P, LETCHER B, et al. Sustainable data analysis with Snakemake[J]. *F1000Research*, 2021, 10:33.
- [35] KATO H, STANDLEY D M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(4):772-780.
- [36] MINH B Q, SCHMIDT H A, CHERNOMOR O, et al.

- IQ-TREE 2: new models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2020, 37(5):1530-1534.
- [37] SAGULENKO P, PULLER V, NEHER R A. TreeTime: maximum-likelihood phylodynamic analysis[J]. *Virus Evolution*, 2018, 4(1):vex042.
- [38] 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.
- [39] HADFIELD J, BRITO A F, SWETNAM D M, et al. Twenty years of West Nile virus spread and evolution in the Americas visualized by Nextstrain[J]. *PLoS Pathogens*, 2019, 15(10):e1008042.
- [40] KOHLER C, KING J, STACKER L, et al. Neighbourhood watch: genomic epidemiology of SARS-CoV-2 variants circulating in a German federal state, Mecklenburg-Western Pomerania, in 2020–2022[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2023, 12(2):2245916.
- [41] LEE J, HADFIELD J, BLACK A, et al. Joint visualization of seasonal influenza serology and phylogeny to inform vaccine composition[J]. *Frontiers in Bioinformatics*, 2023, 3:1069487.
- [42] GUI J, LIU Z, ZHANG T, et al. Epidemiological characteristics and spatial-temporal clusters of hand, foot, and mouth disease in Zhejiang Province, China, 2008–2012[J]. *PloS One*, 2015, 10(9):e0139109.
- [43] 张静. 2008—2017 年中国手足口病流行趋势和病原变化动态数列分析[J]. *中华流行病学杂志*, 2019, 40(2): 147-154.

Molecular evolution and spatiotemporal transmission analysis of Chinese isolates of coxsackievirus A6

JIA Yongtao^{1,2}, TANG Jiajie^{1,2}, WANG Hui^{1,2}, DONG Changzheng^{1,2}

(1.Health Science Center, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2.Zhejiang Provincial Key Laboratory of Pathological and Physiological Technology, Ningbo 315211, China)

Abstract: Coxsackievirus A6 (CV-A6) is the main pathogen of hand-foot-mouth disease (HFMD), which can cause atypical HFMD and central neurological diseases. It imposes a significant disease burden on children, and there are currently no licensed vaccines or antiviral drugs available. Based on 3288 VP1 sequences of CV-A6 isolates from China, a time-scaled molecular evolution tree of CV-A6 was constructed with the augur package on the Nextstrain platform. Evolutionary clades and clade mutations were identified, and the relationship between clade mutations and antigenic epitopes was analyzed. Furthermore, the spatiotemporal distribution and dominant clades of CV-A6 isolates in seven geographical regions of China were analyzed, and the spatiotemporal transmission routes of the main clades were mapped. The results revealed that CV-A6 isolates in China were mainly divided into three evolutionary clades, B, C, and D. Three sub-clades were D2, D3a, and D3b. Mutations at antigenic epitopes have formed new evolutionary clades, promoting the spread of the virus. Southern China and Eastern China are the main origins of CV-A6 isolates, and the major transmission pattern involves mutual dissemination between Southern and Eastern China. Eastern China serves as a nationwide source of transmission. The molecular evolution and spatiotemporal transmission analysis of CV-A6 isolates in China provides important support for the surveillance, early warning, and prevention of outbreaks of HFMD and other diseases caused by CV-A6.

Key words: coxsackievirus A6; enterovirus; molecular evolution; spatiotemporal transmission analysis; bioinformatics

(责任编辑 韩 超)