

李咏洁,张伟,杨凤梅,等.柯萨奇病毒 B 组 1 型感染叙利亚金黄地鼠动物模型建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(4): 50-56.

Li YJ, Zhang W, Yang FM, et al. Establishment of an animal model of Coxsackievirus B1 infecting Syrian golden hamster [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(4): 50-56.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.04.007

柯萨奇病毒 B 组 1 型感染叙利亚金黄地鼠 动物模型建立

李咏洁¹, 张伟^{1,2}, 杨凤梅¹, 李艳艳¹, 段素琴¹, 唐洁¹, 孙文亭¹, 靳玮华¹,
邓自君¹, 李明学¹, 张名¹, 马绍辉^{1*}, 和占龙^{1*}

(1.中国医学科学院/北京协和医学院 医学生物学研究所,昆明 650118;
2.西安交通大学医学部 第一附属医院,西安 710061)

【摘要】 目的 建立叙利亚金黄地鼠 CVB1(Coxsackievirus B1, CVB1)感染动物模型。**方法** 取叙利亚金黄地鼠经鼻腔滴注方式呼吸道感染 CVB1,感染剂量每只为 $10^{7.25}$ CCID₅₀。观察 14 d 体重、体温、精神状态、皮肤黏膜变化、行为、粪便状态、是否有神经症状等临床情况;每天采集咽拭子、鼻灌洗液以及粪便进行病毒载量检测,感染第 7 天取 3 只实施安乐死,采血进行病毒载量及生化检测;同时采集脑、心脏、肝等多个组织样品进行病毒载量、组织病理学和 IHC 检测。**结果** 感染 CVB1 病毒的动物在 14 d 内均出现不同程度精神萎靡、体温下降,以及口唇部出现典型的红疹及疱疹等类似人类手足口病临床表现。咽拭子、鼻灌洗液、粪便以及血液中能检测到病毒;组织中检测到病毒载量并观察到病毒抗原,同时伴有炎症、增生、出血等病理改变;血清酶中肝功、心肌酶升高。**结论** CVB1 病毒经滴鼻方式感染叙利亚金黄地鼠建立的感染模型,表现出心肌和肝等组织器官的病理损伤特征,可用于人类手足口病的研究。

【关键词】 柯萨奇病毒 B 组 1 型;叙利亚金黄地鼠;手足口病

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 04-0050-07

Establishment of an animal model of Coxsackievirus B1 infecting Syrian golden hamster

LI Yongjie¹, ZHANG Wei^{1,2}, YANG Fengmei¹, LI Yanyan¹, DUAN Suqin¹, TANG Jie¹, SUN Wenting¹, JIN Weihua¹,
DENG Zijun¹, LI Mingxue¹, ZHANG Ming¹, MA Shaohui^{1*}, HE Zhanlong^{1*}

(1. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences/Peking Union Medical College, Kunming 650118, China.
2. the First Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061)

【Abstract】 Objective To establish an animal model of infecting Syrian golden hamsters with CVB1 (Coxsackievirus B1, CVB1). **Methods** Syrian golden hamsters were infected with CVB1 by intranasal instillation at a dose of $10^{7.25}$ CCID₅₀, and were observed clinically for 14 days during which throat swabs, nasal lavage fluid and feces were

[基金项目] 云南省重大科技专项计划(202002AA100009);中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2021-I2M-1-024);国家重点研发计划(2021YFF0702804)。

[作者简介] 李咏洁(1998—),女,在读硕士研究生,研究方向:疾病动物模型。E-mail:972234810@qq.com

[通信作者] 马绍辉(1970—),男,主任技师,研究方向:肠道病毒疫苗。E-mail:shaohuima70@126.com

和占龙(1972—),男,研究员,博士,研究生导师,研究方向:非人灵长类疾病模型建立及机制研究。E-mail:hzl612@126.com

* 共同通信作者

collected and tested daily for viral load. On the 7th day of infection, 3 hamsters were euthanized, and blood samples were collected for viral load and biochemical detection. At the same time, tissue samples were collected for viral load, histopathology and IHC detection. **Results** The animals infected with CVB1 virus showed varying degrees of listlessness, decreased body temperature, and typical red rash and herpes on the mouth within 14 days, similar to the clinical manifestations of human HFMD. Viruses could be detected in throat swabs, nasal lavage fluid, stool, and blood; viral load was detected and viral antigen was observed in the tissues, accompanied by pathological changes such as inflammation, hyperplasia and hemorrhage; liver functional and myocardial enzymes in serum increased. **Conclusions** The model of infecting Syrian golden hamsters with CVB1 virus by nasal drip showed pathological damages of tissues and organs such as myocardium and liver, which indicates that the model can be used for the study of human hand-foot-mouth disease.

【Keywords】 Coxsackievirus B1, CVB1; Syrian golden hamster; hand-foot-mouth disease

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

柯萨奇病毒 B 组 1 型 (Coxsackievirus B1, CVB1) 属于小 RNA 病毒科肠道病毒属, 是柯萨奇病毒 B 组的主要成员。CVB1 多在新生儿及幼儿中通过粪口、呼吸道以及口口相传途径传播, 造成群体性感染^[1-3], 引起皮肤黏膜、脑、肺、肝等多器官的病变继而危害儿童健康, 部分病例甚至出现死亡^[4-5]。目前临床治疗多使用非甾体抗炎药、对乙酰氨基酚、苯海拉明等药物进行缓解疼痛控制发热的对症治疗, 针对 CVB1 尚无疫苗和特效抗病毒药物^[6-7], 构建 CVB1 感染的动物模型是开展相关研究的基础。相关研究报道, 通过腹腔注射 CVB1 建立了小鼠心肌炎模型^[8]、胰腺炎模型^[9], 以及豚鼠的多发性肌炎模型^[10]等, Hoshino 等^[11] (1982 年) 建立了通过腹腔注射感染 CVB1 的叙利亚金黄地鼠心肌疾病模型。但这些动物模型所采取的腹腔注射感染方式与人类感染途径有一定差异, 因此基于前人研究基础上, 本研究选择叙利亚金黄地鼠为实验动物, 以更类似人类感染途径的鼻腔滴注方法建立 CVB1 感染叙利亚金黄地鼠动物模型, 并对动物模型的临床变化、排毒周期、生理生化、组织病理改变等进行分析和研究, 为深入开展 CVB1 引起的一系列病理、生理机制等研究提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

叙利亚金黄地鼠, 雄性, 3 周龄, SPF 级, 体重为 80 g, 12 只, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司 [SCXK(京) 2021-0011]。实验鼠饲养于中国医学科学院医学生物学研究所屏障动物实验设施 [SYXK(滇) K2021-0001], 并利用 IVC 系统保证组间隔离饲养。本动物实验经中国医学科学院医学

生物研究所动物福利伦理委员会审查批准 (DWSP202107021), 并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.1.2 毒株

CVB1 毒株 (GenBank 登录号 7V3/YN/CHN/2019(OP917846)) 由中国医学科学院医学生物学研究所马绍辉课题组惠赠, 储存于本实验室 -80℃ 低温冰箱中。CVB1 标准品由本实验室前期构建, 冻存于 -80℃ 超低温冰箱。

1.2 主要仪器与试剂

异氟烷 (瑞沃德生命科技有限公司); RNAiso Plus (9019, TaKaRa); 三氯甲烷 (西陇科学股份有限公司); 异丙醇 (广州金华大化学试剂); 无水乙醇 (科隆化学品有限公司); 4% 多聚甲醛 (143174, Biosharp); PrimeScript One Step RT-PCR Kit (RR064A, TaKaRa); 生化指标试剂盒 (迈瑞生物医疗电子股份有限公司)。

全自动五类动物血细胞分析仪 (XT-200i, 希森美康); 自动动物血液生化分析仪 (BS-200, 迈瑞生物); 荧光定量 PCR 检测系统 (CFX96Touch, Bio-Rad)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物分组

实验共分 2 组, 其中实验组 6 只经鼻腔滴注 100 μ L 滴度为 $10^{7.25}$ CCID₅₀/mL 的 CVB1 病毒悬液, 即感染剂量每只 $10^{7.25}$ CCID₅₀ (鼻腔滴注处理组, D group); 对照组 (Control) 6 只鼻腔滴注 100 μ L 的 PBS, 并与实验组完全隔离。

1.3.2 临床观察及样品采集

在动物攻毒后 0~14 d, 每天测量体重、体温, 观察动物精神状态、皮肤黏膜变化、行为、粪便状态、是否有神经症状等临床情况, 出现疱疹等用灭菌眼

科剪采集疱疹组织进行固定后用于病理检测。每天采集咽拭子、鼻灌洗液、粪便样品用于病毒载量检测,感染后第 7 天实验组和对照组分别选取 3 只实施安乐死,采集抗凝血用于病毒载量测定、血清进行生化检测,脑、心脏、肝等多种组织样品一式两份,用于病毒载量和组织病理学检测。

1.3.3 病毒载量测定

取咽拭子、50 μ L 鼻灌洗液、粪便、血液以及组织提取 RNA,以 RNA 为模板,使用一步法 qRT-PCR 确定样品中病毒载量。上游 VP4 基因引物序列:(CVB1-QF) 5'-GGTGTCTACACAAAAGACGGGTG-3',下游 VP4 基因引物序列:(CVB1-QR) 5'-TGGGTCTTGTGTGAAATCTTGCC-3',Taqman 探针序列:(CVB1-QProbe) 5'-FAM-CGCATGAGAC TGGTTTGTAGTCCACCG-BHQ-3',均由生工生物工程有限公司合成。反应条件为:42 $^{\circ}$ C 5 min,95 $^{\circ}$ C 10 s;95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 30 s 为一个循环,检测 40 个循环。使用前期成功构建的 CVB1 标准品及标准曲线,计算样品中病毒载量。

1.3.4 血清生化指标检测

于攻毒后第 7 天及第 14 天采集血清样品进行心肌酶谱及肝功能学检测。

1.3.5 病理检测

动物处死后采集的组织使用 4% 多聚甲醛固定,由武汉赛维尔生物科技有限公司进行病理学检查。

1.3.6 抗原检测

使用免疫组化(IHC)方法对组织进行 CVB1 抗原的检测。

实验步骤:脱蜡水化、抗原修复、阻断内源性过氧化物酶、封闭、鼠源抗柯萨奇病毒 B 组单克隆一抗 1:200 稀释后 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育、滴加反应增强剂、滴加羊抗鼠二抗、DAB 显色、苏木素染色后脱水透明、使用中性树脂封片。

1.4 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.0.2 进行数据分析,以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)进行相关数据分析,两组间比较采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物临床症状

在攻毒第 2 天起,实验组 3 只动物在口唇部外侧皮肤出现了红色皮疹,且伴有牙龈红肿出血(图

1A),并陆续出现疱疹。出现疱疹到消退约为 2~5 d 不等,疱疹发生初期仅表现为部分轻微红肿;随后在皮肤黏膜表面出现明显红斑或疱疹以及周围皮肤的红肿,疱疹内有少量脓液(图 1B);疱疹后期逐渐消退结痂,无脓液(图 1C)。

对照组体温、体重变化平稳,精神状态稳定,皮肤黏膜无疱疹出现,粪便状态正常无腹泻或便秘,行为正常且无神经症状出现(图 1D)。而实验组体温总体呈现降低,实验组体重在感染后第 6 天开始下降(图 1E),动物食欲明显降低,精神低迷。在整个过程中,动物行为无异常,无生理功能紊乱,如:步态改变、偏头、无法行动等神经症状。

2.2 动物的血清生化指标

对攻毒后第 7 天及第 14 天的血清进行肝功酶学、心肌酶学指标检测,第 7 天实验组的肝功能中 AST、ALP 以及 ALT 升高,ALB 下降(图 1F),心肌酶谱 LDH、CK、CK-MB 升高(图 1G),第 14 天与对照组相比无明显差异。提示心、肝出现急性损伤导致血清酶指标升高。

2.3 病毒载量

2.3.1 咽拭子

攻毒后第 1 天即可检测到病毒载量,在 1~14 d 咽拭子载量总体呈现先升高后降低的趋势,在第 4 天出现第一次排毒高峰($10^{2.9}$ copies/ μ L),随后逐渐降低,于第 12 天出现第二次排毒高峰($10^{2.1}$ copies/ μ L)(图 2A),第 14 天起未检测到病毒载量。

2.3.2 鼻灌洗液

感染后鼻灌洗液病毒载量呈现降低趋势,感染第 1 天可于鼻灌洗液中检测到病毒载量,并分别在第 2 天和第 13 天出现两次值为 $10^{4.79}$ copies/ μ L 和 $10^{3.2}$ copies/ μ L 的明显排毒峰值(图 2B)。

2.3.3 粪便样品

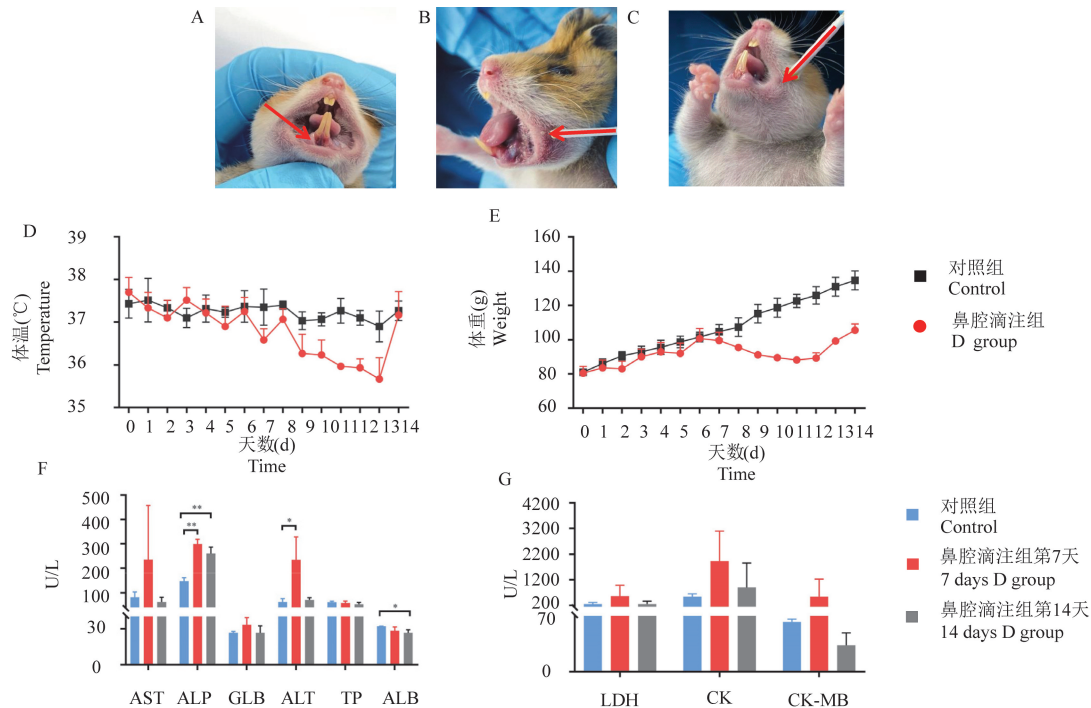
粪便样品在感染第 1 天至第 13 天均可检测到病毒载量,第 2 天出现排毒高峰($10^{5.15}$ copies/mg),随后逐渐降低(图 2C)。

2.3.4 血液载量

第 7 天血液病毒载量为 $10^{1.73}$ copies/100 μ L,第 14 天血液中均未检测到病毒载量(图 2D)。

2.3.5 组织载量

对第 7 天组织样品进行病毒载量检测结果显示,在实验组的脑、淋巴结、肌肉等多个组织中均能检测到病毒核酸,在嗅球中病毒载量最高($10^{9.26}$ copies/mg)(图 3)。

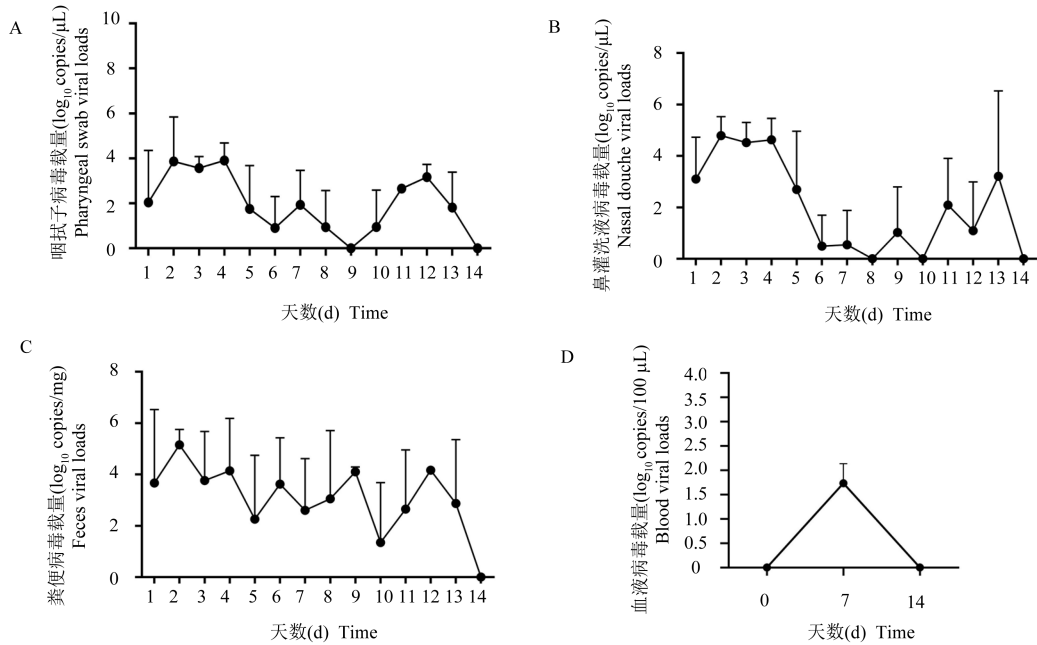


注:A:牙龈红肿出血(红色箭头);B:口唇部疱疹(红色箭头);C:疱疹预后色素沉积(红色箭头);D:体温;E:体重;F:肝功能血清酶;G:心肌酶谱。与正常对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图1 临床及生化指标变化

Note. A, Gingiva is red, swollen and bleeding (red arrow). B, Herpes on the lips (red arrow). C, Herpes prognostic pigmentation (red arrow). D, Temperature. E, Weight. F, Serum enzymes in liver function. G, Myocardial enzyme profile. Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 1 Clinical and biochemical changes



注:A:咽拭子;B:鼻灌洗液;C:粪便;D:血液。

图2 病毒载量检测

Note. A, Throat swabs. B, Nasal douche. C, Feces. D, Blood.

Figure 2 Viral load detection

2.4 组织学检查

HE 染色后进行镜检,实验组的心脏出现明显的组织损伤后的炎性反应、细胞坏死;肝细胞出现水样变性、气球样变,胞质空泡化等(图 4)。脑内可见中性粒细胞及少量的炎性细胞浸润,结构松散、疏松,局部血管炎性细胞包绕性浸润,胶质细胞增生变多(图 5)。嗅球组织内结构疏松细胞坏死,并伴有胶质细胞浸润(图 6)。免疫组化结果显示,实验组的心、肝、脑、嗅球等组织内均有抗原结合反应,说明该病毒感染有多组织嗜性,对多种器官造成损伤。

3 讨论

肠道病毒可以通过消化道、呼吸道等途径感染患者,引起手足口等多部位皮肤黏膜出现疱疹,部分患者可能还伴有痉挛抽搐、后肢瘫痪等神经系统症状或感染脑膜炎^[12-13]。目前 CVB1 动物模型有通过腹腔注射感染方式构建的肌炎、胰腺炎、心肌炎等表征模型,但尚未见有构建 CVB1 手足口病模型,相关感染模型均为腹腔注射感染模型。因此根据前期日本学者利用叙利亚金黄地鼠以腹腔注射方式开展心肌炎模型的研究背景,以及叙利亚金黄地鼠与小鼠相比体型大更易观察和实验操作特点,同时模拟人类呼吸道感染途径,选择其作为 CVB1 动物模型进行手足口病研究实验。

本实验经鼻腔滴注感染 3 周龄叙利亚金黄地鼠,在 14 d 内口唇部都陆续有红疹或疱疹,破溃结

痂,体温降低、精神萎靡等症状,咽、鼻及粪便出现排毒情况,部分动物表现出早期心肌、肝等组织损伤,以及脑部出现炎性细胞浸润等表征,表明叙利亚金黄地鼠通过呼吸道感染可以构建手足口病模型,表现出与儿童手足口病典型的临床症状、病毒复制以及病理改变等^[14]。

柯萨奇病毒感染后引发病毒性脑炎等并发症近年来报道较多^[15]。Wang 等^[16]在柯萨奇病毒感染急性中枢神经系统疾病模型中发现海马区神经元和大脑皮层细胞受损,有炎性细胞浸润。COVID-19 病毒感染嗅球引发神经系统症状^[17]等的研究证明许多病毒感染与嗅球和神经系统之间有多密

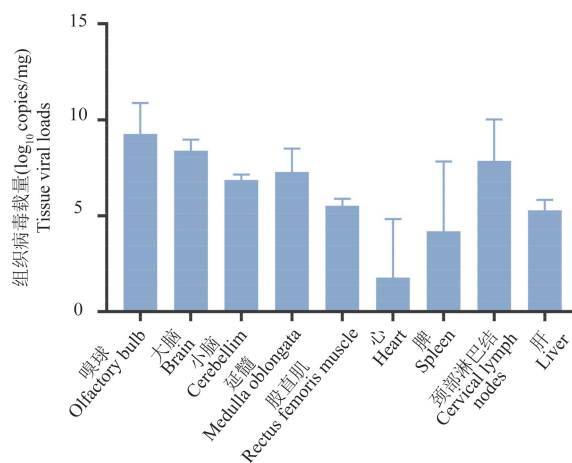
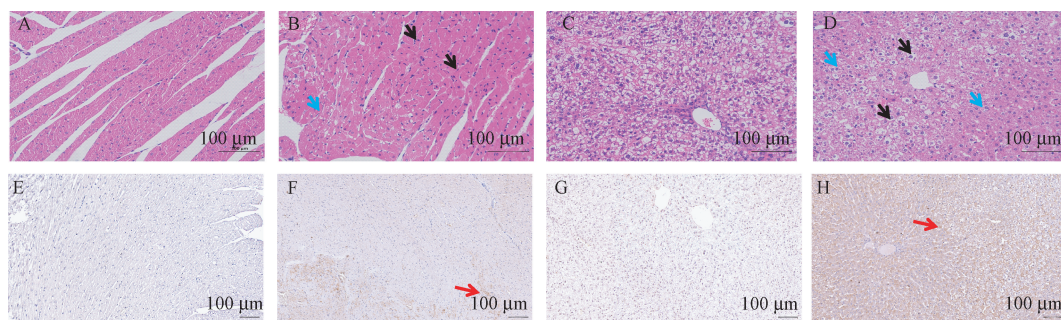


图 3 第 7 天组织内病毒载量

Figure 3 Intratissue viral load on day 7

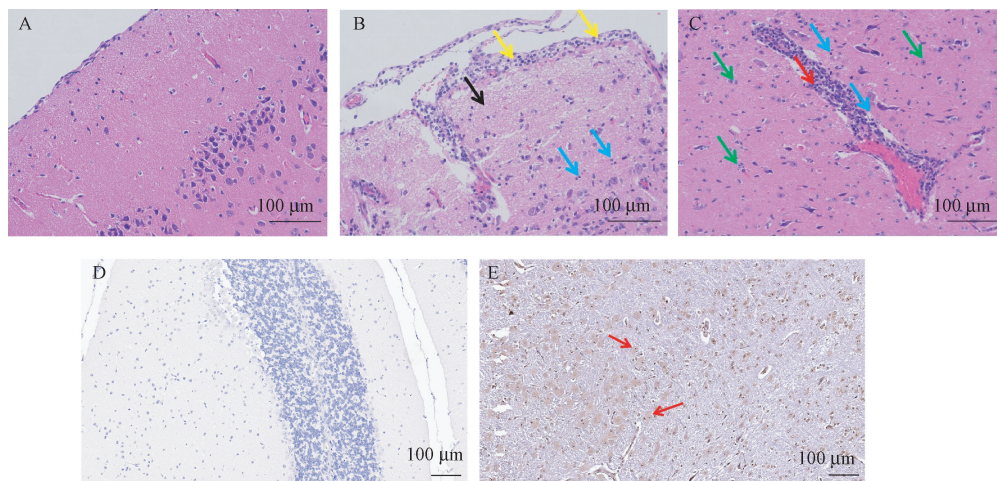


注: A: HE 心脏对照; B: 心肌细胞灶状坏死(黑色箭头), 心肌细胞胞质空泡化改变(蓝色箭头); C: HE 肝对照; D: 肝细胞不同程度水样变性(蓝色箭头), 气球样变(黑色箭头), 肝窦狭窄; E: IHC 心脏对照; F: 实验组心脏可见 DAB 染色呈现抗原阳性, 显示为棕褐色; G: IHC 肝对照; H: 实验组肝组织中可见 DAB 染色呈现抗原阳性, 显示为棕褐色。

图 4 心、肝组织 HE 染色及 IHC 反应

Note. A, HE heart control. B, Focal necrosis of cardiomyocytes (black arrow) and changes in vacuolation of cardiomyocytes (blue arrow). C, HE liver control. D, different degrees of watery degeneration of hepatocytes (blue arrow), balloon-like degeneration (black arrow), stenosis of hepatic sinuses. E, IHC heart control. F, DAB staining on heart of D group was antigen positive and showed a tan color. G, IHC liver control. H, DAB staining on liver of D group was antigen positive and showed a tan color.

Figure 4 HE and IHC of heart and liver tissues

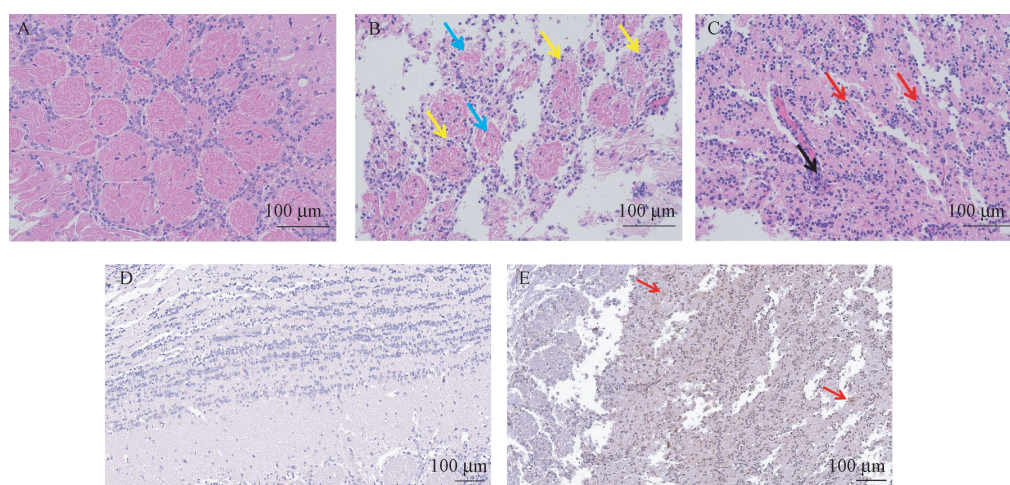


注:A:HE 脑对照;B:脑膜炎性细胞浸润(黄色箭头),结构疏松(黑色箭头),实质炎性细胞浸润(蓝色箭头);C:血管炎性细胞袖套(红色箭头);胶质细胞增生(绿色箭头);D:IHC 脑组织对照;E:实验组脑组织可见 DAB 染色呈现抗原阳性,显示为棕褐色。

图 5 脑组织 HE 染色及 IHC 反应

Note. A, HE brain control. B, Meningeal inflammatory cell infiltration (yellow arrow), loose structure (black arrow), parenchymal inflammatory cell infiltration (blue arrow). C, Vascular inflammatory cell cuff (red arrow); Glial proliferation (green arrow). D, IHC brain tissue control. E, DAB staining on brain tissues of D group was antigen positive and showed a tan color.

Figure 5 HE and IHC of brain tissues



注:A:HE 嗅球对照;B:实验组神经纤维结构疏松(蓝色箭头),小胶质细胞浸润(黄色箭头);C:实验组颗粒细胞胞核固缩(红色箭头);D:IHC 嗅球对照;E:实验组嗅球可见 DAB 染色呈现抗原阳性,显示为棕褐色。

图 6 脑嗅球组织 HE 染色及 IHC 反应

Note. A, HE olfactory bulb control. B, HE loose nerve fiber structure (blue arrow), microglial infiltration (yellow arrow). C, HE Granulosa cell nucleolysis (red arrow). D, IHC olfactory bulb control. E, DAB staining on olfactory bulb of D group was antigen positive and showed a tan color.

Figure 6 HE and IHC of olfactory bulb tissues

切联系。在本实验中,部分动物感染后脑内胶质细胞增生,脑膜及脑实质出现炎性细胞浸润,血管周围淋巴细胞浸润现象。同时嗅球出现较高的病毒载量分布,且组织结构受损严重伴有出血和炎症反应,表明 CVB1 可以通过呼吸道黏膜经嗅神经和嗅球入侵脑部引起病毒性脑炎。

Wang 等^[18]发现新生儿感染 CVB1 后肝受累

并迅速发展为新生儿黄疸和凝血病。本实验中 CVB1 感染地鼠后,肝出现水样变性并发展为气球样变,肝窦狭窄,结合血清酶中 AST/ALT 的比值^[19],表明感染后肝细胞受损,出现急性病毒性肝炎临床表征。

在目前的 CVB1 动物模型中,大部分都为腹腔注射的方式感染啮齿类动物^[20],而研究证实肠道病

毒感染可通过气溶胶形式经呼吸道进行传播^[21],腹腔注射的感染方式虽能很快在动物体内感染成功,但难以研究病毒的自然传播后在体内的感染机制。本实验证明鼻腔滴注感染方式更为接近人类呼吸道感染情况,且能够成功感染动物机体,根据机体排毒情况、病理表征以及生理数据也能对感染机制进行初步探究。根据临床统计结果显示,CVB1 病毒感染后患者主要出现手足口病症状,重症患者会伴有多器官损伤,而腹腔注射方式建立的不同品种动物模型所出现的临床症状皆有所不同且均未出现人类临床最常见的手足口病症状^[22]。因此,与腹腔注射相比,鼻腔滴注方式所构建的啮齿类动物模型能够更全面地复制人类感染后出现的疾病,且有较好的重复性。

综上所述,利用叙利亚金黄地鼠不仅可以用于病毒性心肌炎的研究,还可以通过鼻腔滴注的呼吸道感染方式构建出与人类儿童相似的手足口病、病毒性脑炎等动物模型,为后续开展相关疾病的发病机制、病理生理以及药物和疫苗研究等提供较好的实验平台。

参考文献:

- [1] Tracy S, Gauntt C. Group B coxsackievirus virulence [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2008, 323: 49-63.
- [2] Ghosh S, Kumar M, Santiana M, et al. Enteric viruses replicate in salivary glands and infect through saliva [J]. *Nature*, 2022, 607(7918): 345-350.
- [3] 王欣, 李宁. 肠道病毒在反复呼吸道感染住院患儿中的分子流行病学意义 [J]. *山西卫生健康职业学院学报*, 2022, 32(2): 5-6.
- [4] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Increased detections and severe neonatal disease associated with coxsackievirus B1 infection--United States, 2007 [J]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2008, 57(20): 553-556.
- [5] Kim H, Kang B, Hwang S, et al. Molecular characteristics of human coxsackievirus B1 infection in Korea, 2008-2009 [J]. *J Med Virol*, 2013, 85(1): 110-115.
- [6] Rasti M, Khanbabaie H, Teimoori A. An update on enterovirus 71 infection and interferon type I response [J]. *Rev Med Virol*, 2019, 29(1): e2016.
- [7] Coates SJ, Davis MDP, Andersen LK. Temperature and humidity affect the incidence of hand, foot, and mouth disease; a systematic review of the literature-a report from the International Society of Dermatology Climate Change Committee [J]. *Int J Dermatol*, 2019, 58(4): 388-399.
- [8] Ray CG, Minnich LL, Johnson PC. Selective polymyositis induced by coxsackievirus B1 in mice [J]. *J Infect Dis*, 1979, 140(2): 239-243.
- [9] Dalldorf G, Gifford R. Susceptibility of gravid mice to Cocksackie virus infection [J]. *J Exp Med*, 1954, 99(1): 21-27.
- [10] 王强, 虞勇, 莫惠芳, 等. 柯萨奇病毒 B 诱导的免疫性多发性肌炎模型的建立 [J]. *中国临床医学*, 2006, 13(6): 1012-1015.
- [11] Hoshino T, Matsumori A, Kawai C, et al. Electrocardiographic abnormalities in Syrian golden hamsters with coxsackievirus B1 myocarditis [J]. *Jpn Circ J*, 1982, 46(12): 1305-1312.
- [12] Romero JR. Pediatric group B coxsackievirus infections [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2008, 323: 223-239.
- [13] Shah J, Liu S, Zhao H, et al. Neurological complications of hand, foot and mouth disease in children: a review [J]. *J Ayub Med Coll Abbottabad*, 2020, 32(4): 562-569.
- [14] Saguil A, Kane SF, Lauters R, et al. Hand-foot-and-mouth disease: rapid evidence review [J]. *Am Fam Physician*, 2019, 100(7): 408-414.
- [15] Tao Z, Wang H, 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.
- [16] Wang L, Dong C, Chen DE, et al. Cocksackievirus-induced acute neonatal central nervous system disease model [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(3): 858-869.
- [17] Strauss SB, Lantos JE, Heier LA, et al. Olfactory bulb signal abnormality in patients with COVID-19 who present with neurologic symptoms [J]. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2020, 41(10): 1882-1887.
- [18] Wang SM, Liu CC, Yang YJ, et al. Fatal coxsackievirus B infection in early infancy characterized by fulminant hepatitis [J]. *J Infect*, 1998, 37(3): 270-273.
- [19] De ritis F, Coltorti M, Giusti G. An enzymic test for the diagnosis of viral hepatitis; the transaminase serum activities [J]. *Clin Chim Acta*, 1957, 2(1): 70-74.
- [20] Fairweather D, Rose NR. Cocksackievirus-induced myocarditis in mice: a model of autoimmune disease for studying immunotoxicity [J]. *Methods*, 2007, 41(1): 118-122.
- [21] Zou L, Yi L, Song Y, et al. A cluster of coxsackievirus A21 associated acute respiratory illness: the evidence of efficient transmission of CVA21 [J]. *Arch Virol*. 2017, 162(1): 1057-1059.
- [22] Zhong Z, Li X, Zhao W, et al. Mutations at nucleotides 573 and 579 within 5'-untranslated region augment the virulence of coxsackievirus B1 [J]. *Virus Res*, 2008, 135(2): 255-259.

[收稿日期]2022-12-22