

DOI:10.13350/j.cjpb.231202

• 论著 •

2011-2020年福建省手足口病相关柯萨奇病毒 A9型基因特征及重组分析*

何文祥¹, 李林丰², 朱颖¹, 翁育伟^{1,2}, 陈炜^{1,2**}

(1. 福建省疾病预防控制中心, 福建省人兽共患病研究重点实验室, 福建福州 350001; 2. 福建医科大学公共卫生学院)

【摘要】 **目的** 了解福建地区手足口病(hand, foot and mouth disease, HFMD)相关柯萨奇病毒 A9型(coxsackievirus A9, CV-A9)的基因特征及重组情况。 **方法** 对2011-2020年福建省各地市上送的 HFMD阳性标本进行 CV-A9 筛查、VP1区全长序列测定和基因型别鉴定及分析。对 CV-A9 阳性标本利用人横纹肌肉瘤细胞(rhabdomyosarcoma, RD)及人喉癌上皮细胞(Human laryngeal carcinoma epithelial cells, HEp-2)进行病毒分离,对分离毒株进行全基因组测序及重组分析。 **结果** 2011-2020年福建省各地市上送的 HFMD阳性标本中共鉴定出 HFMD相关 CV-A9 阳性7份,获得6条 VP1区全长序列。基于 VP1序列将 CV-A9 划分为 A~O 15个基因型,其中 G基因型又可分为 G1及 G2两个基因亚型。福建省 CV-A9 均属于 G2基因亚型,在系统进化树上呈散在分布。分离并测序获得3条 CV-A9 全基因组序列,分析显示毒株 2014FJFZ463与福建地区流行的 ECHO30毒株存在重组。 **结论** G2基因亚型是我国现阶段流行的优势型别。2011-2020年福建省 HFMD相关 CV-A9 流行呈散发状态,未发现本土传播链的形成,但存在基因重组株。

【关键词】 柯萨奇病毒 A9型;基因分析;重组

【中图分类号】 R373.23

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)12-1370-05

[Journal of Pathogen Biology. 2023 Dec;18(12):1370-1374.]

Genetic characteristics and recombination analysis of HFMD related Coxsackievirus A9 in Fujian province from 2011 to 2020

HE Wenxiang¹, LI Linfeng², ZHU Ying¹, WENG Yuwei^{1,2}, CHEN Wei^{1,2} (1. Fujian Provincial Center for Disease Control and Prevention Fujian Provincial Key Laboratory of Zoonosis Research, Fuzhou 350001, China; 2. School of Public Health, Fujian Medical University)

【Abstract】 **Objective** To investigate the genetic characteristics and recombination of hand, foot, and mouth disease (HFMD) related coxsackievirus A9 (CV-A9) in Fujian province. **Methods** Screening CV-A9 from positive HFMD samples which collected from all cities in Fujian province from 2011 to 2020, then sequencing VP1 full-length region to identify genotypes and analyzing. Human rhabdomyosarcoma (RD) and Human laryngeal carcinoma epithelial cells (HEp-2) were used for virus isolation in CV-A9 positive samples, the whole genome of isolated strains was sequenced to analyze viral gene recombination. **Results** A total of 7 HFMD-associated CV-A9 positive samples were identified in Fujian province from 2011 to 2020, and obtained 6 genetic sequences of CV-A9 VP1. Base on the VP1 sequence, CV-A9 was classified into A-O genotypes, the average nucleotide difference among 15 genotypes was 15.2% - 26.1%. G genotype was further classified G1 and G2 subgenotype, the average nucleotide difference between two subgenotypes was 13.7%. All CV-A9 in Fujian province belongs to G2 subgenotype which was distributed scattered in the phylogenetic tree. Three complete genome sequences of CV-A9 were isolated and sequenced. Compared with the CV-A9 prototype Griggs, the homology in P1 region of three sequences was higher (81.0% - 81.5%) than that in P2 and P3 region, and was closest to the homology of complete sequence (80.1% - 81.2%). The Simplot analysis results showed there was recombination between CV-A9 strain 2014FJFZ463 and ECHO30, strains prevalent in Fujian region. **Conclusion** G2 subgenotype is the dominant type prevalent in China. The HFMD-associated CV-A9 epidemic in Fujian province from 2011 to 2020 was sporadic. Local transmission chain was not found, but there were gene recombination strain existed.

【Key words】 Coxsackievirus A9; phylogenetic analysis; recombination ***

* **【基金项目】** 国家科技重大专项课题(No. 2017ZX10104001);福建省卫生健康科技计划项目(No. 2021GG012)。

** **【通讯作者】** 陈炜, E-mail: fjwchen@163.com

【作者简介】 何文祥(1986-),男,福建福清人,本科,副主任技师。主要研究方向:病毒性疾病预防控制。E-mail: he_wenxiang@126.com

手足口病(hand, foot and mouth disease, HFMD)的病原种类多样,多为肠道病毒(enterovirus, EV)。EV属于小RNA病毒科肠道病毒属成员,国际病毒分类委员会将其分为12组,其中EV-A、EV-B、EV-C、EV-D四组均可感染人^[1]。柯萨奇病毒A9型(coxsackievirus A16, CV-A9)是EV-B组中最常见的血清型之一^[2],近年来因CV-A9感染所致的手足口病有增多趋势。由于引起HFMD的EV优势血清型转变为肠道病毒A组71型(enterovirus group A type 71, EV-A71)和柯萨奇病毒A16型(coxsackievirus A16, CVA16)以外的其他EV,以及福建省内出现CV-A9相关HFMD重症病例,因而开展CV-A9分子生物学特征研究,对完善福建省HFMD的防治策略具有重要的意义。

材料与方法

1 材料

1.1 资料来源 手足口病相关个案信息和人口数据来源于中国疾病预防控制中心信息系统;手足口病病毒参考序列信息来自于GenBank公共数据库;实验室资料来自福建省CDC传染病防治所病毒室。

1.2 标本 2011-2020年按照福建省HFMD监测方案(2012版)上送的HFMD病例临床标本由福建省疾病预防控制中心提供。

2 方法

2.1 病原检测及序列测定 取HFMD病例临床标本,采用全自动核酸提取试剂盒(西安天隆科技有限公司生产)提取核酸,参照文献^[3]的方法进行病毒的分型鉴定及全长VP1区核苷酸序列测定。

2.2 病毒分离及高通量测序 对CV-A9阳性病例标本利用人横纹肌肉瘤细胞(rhabdomyosarcoma, RD)及人喉癌上皮细胞(Human laryngeal carcinoma epithelial cells, HEp-2)进行病毒分离,按《手足口病实验室手册》相关流程操作。采用全自动核酸提取试剂盒提取病毒核酸,用Maxima H Minus Double-Strand cDNA Synthesis Kit(美国Invitrogen公司)将其逆转录为双链cDNA,磁珠法纯化后送诺禾致源公司(北京)进行全长基因组序列测定,使用CLC Genomic Workbench11进行序列拼接。

2.3 VP1区基因特征分析 选取GenBank上全部CV-A9 VP1区序列作为参考序列,利用BioEdit 7.2.5软件将获取的病毒基因序列及参考序列进行多序列比对;采用MEGA7.0以邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统进化树,Bootstrap值设为1000;运用

Lasergene软件中的MegAlign进行同源性分析。

2.4 重组分析 将获得的CV-A9全基因组核苷酸序列按P1、P2、P3分区在NCBI上进行BLAST搜索,选择与之一致性最高且大于90%的非CV-A9序列与挑取的部分CV-A9全长核苷酸序列共同组成参考序列,利用MEGA7.0对全基因组、P1、P2及P3区核苷酸序列进行系统进化分析。对可能重组的福建分离株全长序列利用Simplot3.5.1软件进行相似性及BootScan分析。

结果

1 CV-A9感染概况

2011-2020年福建省共检出7份CV-A9阳性病例,占所检测的其他EV阳性样本的比例为0.38%(7/1821),其中包含一份重症病例标本。发病年龄均在6岁以下,1岁龄及以下儿童占85.71%(6/7),且以散居儿童为主(6/7),发病时间集中在5~7月份(6/7);男女比例为5:2。

2 CV-A9基因分型

CV-A9 VP1区全长基因为906 bp,共编码301个氨基酸。从GenBank上共下载完整的CV-A9 VP1区核苷酸序列98条(其中国内55条,涵盖13个省及直辖市;国外43条,覆盖11个国家)。对以包含福建株在内的104条CV-A9完整VP1序列进行系统进化分析,结果显示可将CV-A9按时间先后顺序分为A~O等15个分支,各分支间平均核苷酸差异性为15.2%~26.1%。A分支为CV-A9的原型株Griggs,包括国内全部序列在内的大部分序列聚集在G分支。G分支又可进一步分为G1和G2两个进化分支,二者间平均核苷酸差异为13.7%(图1)。

3 CV-A9分离株特征

共测序获得6条CV-A9 VP1区核苷酸全长序列,核苷酸同源性为90.4%~97.9%,氨基酸同源性为98.7%~100%。2014FJFZ463分离自重症HFMD病例,与剩余5个轻症病例的病毒序列比对显示在T177C、C348T、G747A、A888G发生了变异,氨基酸序列无明显差异。福建株序列在进化树上呈散在分布(图1),与年份相近的国内其他地区序列相互聚集,并且均处于G2分支。测序得到3个毒株的序列,将其与部分EV-B原型株进行同源性分析,结果显示3个福建株与CV-A9原型株Griggs在P1的同源性最高且均高于所选取的EV-B组原型株的同源性,与CV-A9全基因组序列的同源性也最为接近,而在P2及P3区与原型株Griggs的同源性略有降低(表1)。

表 1 福建省 3 株 CV-A9 的序列同源性分析 (%)
Table 1 Sequence homology analysis of three Fujian CV-A9 strains (%)

| 福建 CV-A9 分离株 CV-A9 strains in Fujian | 长度 (bp) Length (bp) | Griggs 同源性 Griggs Homology | P1 同源性 Homology in P1 | | P2 同源性 Homology in P2 | | P3 同源性 Homology in P3 | |
|--------------------------------------|---------------------|----------------------------|-----------------------|--|-----------------------|--|-----------------------|--|
| | | | Griggs | | Griggs | | Griggs | |
| | | | Griggs | 部分 EV-B 原型株 Partial EV-B prototype strains | Griggs | 部分 EV-B 原型株 Partial EV-B prototype strains | Griggs | 部分 EV-B 原型株 Partial EV-B prototype strains |
| 2011FJZZ056 | 7427 | 81.2 | 81.3 | 65.5~70.2 | 80.4 | 77.7~81.8 | 80.8 | 79.0~82.3 |
| 2011FJQZ126 | 7388 | 80.1 | 81.0 | 65.3~70.2 | 80.0 | 78.7~81.5 | 79.6 | 79.0~82.4 |
| 2014FJFZ463 | 7430 | 80.3 | 81.5 | 65.1~70.3 | 79.7 | 79.1~81.2 | 78.4 | 77.8~82.8 |



注:▲为本次研究中的福建省 CV-A9 序列。

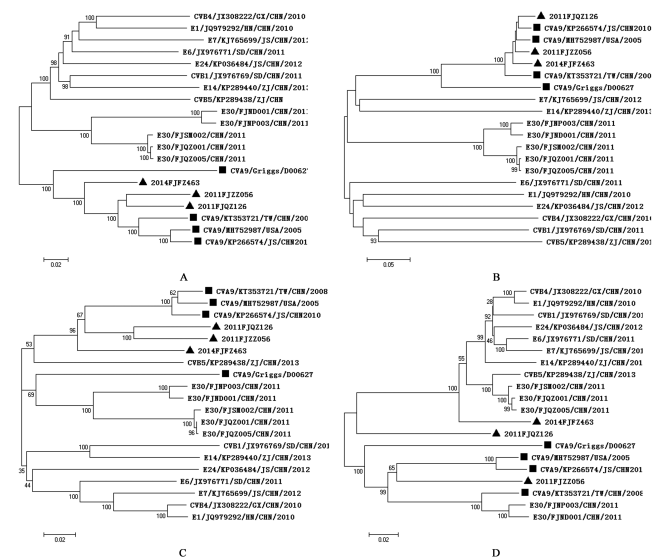
图 1 基于 VP1 区核苷酸序列的 CV-A9 系统进化树
Notes:▲CV-A9 sequence of Fujian Province in this study.

Fig.1 Phylogenetic tree of CV-A9 based on nucleotide sequence in VP1 region

4 重组分析

将 3 个福建株全长序列与 NCBI 上获取的参考株序列依据不同编码区进行系统进化分析,结果如图 2。基于全长及 P1 区核苷酸序列的进化树将 3 个福建株序列与 CV-A9 参考序列划为同一分支;基于 P2 区核苷酸序列的进化树中福建株同原型株 Griggs 外的其他 CV-A9 序列划分在同一分支上;在基于 P3 区的进化树中,2014FJFZ463 处于 CV-A9 参考株外的其他分支,与 Echo30 福建 2011 年分离株遗传距离相近,Bootstrap 值为 100,疑似为重组株。对 2014FJFZ463 用软件 Simplot 进一步进行重组分析:挑选图 2 中的参考序列作为 6 个对照组,其中 E30 Group 1 包含福

建三明及泉州地区的 3 个分离株 (E30/FJSM002/CHN/2011、E30/FJQZ001/CHN/2011、E30/FJQZ005/CHN/2011),E30 Group 2 包含福建南平及宁德分离株 (E30/FJNP003/CHN/2011、E30/FJND001/CHN/2011)。将所有 CV-A9 参考株设为 CV-A9 Group。SimPlot 相似性分析显示:在 2B 及 2C 连接区,2014FJFZ463 与 CV-A9 Group 的相似性显著降低,与 E30 Group 1 的相似性明显增加,在 P3 区二者相似性在 90% 以上。BootScan 分析显示,在 2B 及 2C 连接区之前,2014FJFZ463 与 CV-A9 Group 分为一簇,而在 P3 区 2014FJFZ463 与 E30 Group 1 分为同一簇(图 3)。



注:▲为福建省 3 株 CV-A9 全基因组序列;■为 CV-A9 参考序列。

图 2 福建省 3 株 CV-A9 全基因(a)、P1 区(b)、P2 区(c)、P3 区(d)核苷酸序列系统进化分析

Note:▲ represents the complete genome sequence of 3 CV-A9 strains in Fujian Province;■ Represents the reference sequence of CV-A9

Fig.2 Phylogenetic analysis of nucleotide sequences in the whole gene (a), P1 (b), P2 (c), P3 (d) of three CV-A9 strains from Fujian Province

讨论

基因型划分作为 EV 研究的一项重要内容,能够为病毒的流行传播及遗传进化提供可靠依据。作为 HFMD 的一类病原体,CV-A9 的分子分型研究倍受

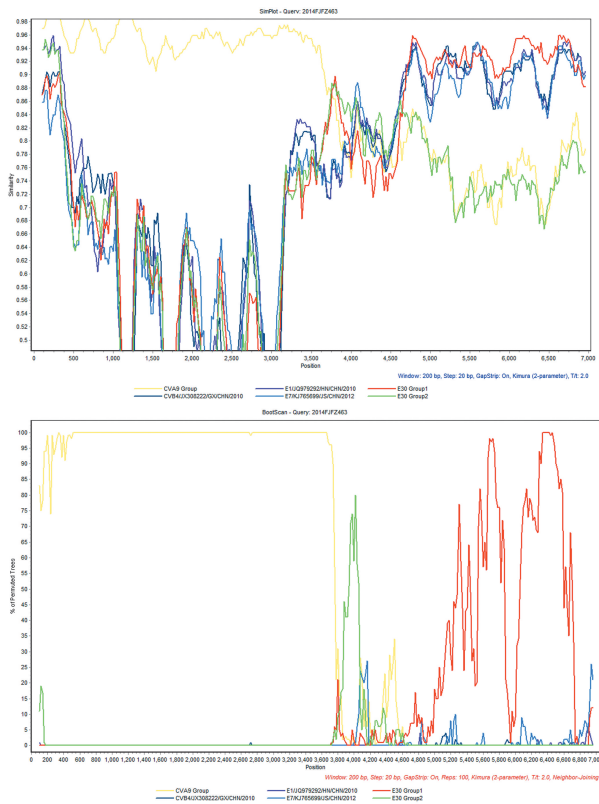


图3 毒株 2014FJFZ463 Simplot 相似性(a)和 BootScan 扫描(b)分析
Fig.3 Simplot similarity (A) and BootScan scanning (B) analysis of strain 2014FJFZ463

关注^[4-7],但因分型所基于的核苷酸区域以及所选取的毒株序列的覆盖范围的不同,使分型结果存有差异。相关研究表明,VP1区含有最多的型特异性中和位点,适用于EV的型别鉴定和进化分析^[8]。本研究依据CV-A9完整VP1区核苷酸序列进行分型,可更准确地反映CV-A9的基因分型情况。参照EV不同基因型完整VP1区核苷酸差异至少大于15%、不同基因型差异至少大于8%的标准^[9],将CV-A9毒株序列划分为15个基因型,其中G基因型又可划分为G1和G2两个基因亚型。遗传进化分析表明,所有选取的中国地区CV-A9序列均属于G基因型,是中国地区流行的优势型别,与文献^[10-11]的研究结果一致。2010年后未再发现新的G1亚型,国内CV-A9呈现由G1及G2亚型共存过渡到以G2亚型单一型别流行的态势。相较于其他EV, CV-A9型别众多,可能具有更高的核苷酸变异率,并且G2亚型的分布范围广,时间跨度大,可能导致病毒基因型发生一定程度的变异^[12],因此应警惕域外病毒重组及迁入的风险。

福建CV-A9分离株在进化树上散在分布,同相近年份的国内其他毒株聚集在一起,提示CV-A9在福建地区呈散发态势,以地区外输入为主且未形成本土传播链。尽管HFMD重症病例感染的CV-A9 VP1区核苷酸序列在T177C、C348T、G747A、A888G出现特

异改变,但由于获得序列较少且氨基酸序列上未发现有特征性蛋白改变,因而这些位点的改变与HFMD病情严重程度相关性还有待进一步观察。福建省不同区域CV-A9分离株的同源性及其进化分析表明,基于编码结构蛋白P1区的进化分析结果同全基因组的结果具有一致性,相较于P2及P3区更适合用于进行病毒基因型鉴定,这与肠道病毒重组多发生在非结构蛋白区^[13]有关。福建株2014FJFZ463在P3区不同于其他CV-A9序列与ECHO30分离株处于同一进化分支, Bootstrap值为100。ECHO30是本省过往暴发流行的EV-B病原,2014FJFZ463很可能为ECHO30的重组株。SimPlot重组分析结果证实2014FJFZ463在P3区与ECHO30发生重组,尤其在3C及3D连接区及部分3D区。尽管已有研究观察到CV-A9非编码区的重组^[14],但由于本次研究仅仅检测HFMD相关CV-A9,而CV-A9亦可引起脑炎、心肌炎、腹泻等症状^[15-16],且当地对相关CV-A9的监测较为薄弱,现有的数据还不足以判定CV-A9在非编码区与其他EV-B的重组是否活跃,因此需要加强对本地区CV-A9的监测,以便获得更全面的信息。

本研究基于VP1区全长核苷酸序列对CV-A9分子分型进行了系统梳理,将其分为15个基因型,明确G2基因亚型是我国现阶段流行的优势型别。2011—2020年,福建地区HFMD相关CV-A9流行强度呈散发态势,可见重组事件。

【参考文献】

- [1] Zell R, Delwart E, Gorbalenya AE, et al. ICTV virus taxonomy profile: picornaviridae [J]. J Gen Virol, 2017, 98(10): 2421-2422.
- [2] Pulli T, Koskimies P, Hyypia T. Molecular comparison of coxsackie A virus serotypes [J]. Virology, 1995, 212(1): 30-38.
- [3] Chen W, Weng YW, He WX, et al. RT-nPCR assays for amplification and sequencing of VP1 genes in human enterovirus A-D from clinical specimens [J]. Biomed Environ Sci, 2020, 33(11): 829-838.
- [4] Santti J, Harvala H, Kinnunen L, et al. Molecular epidemiology and evolution of coxsackievirus A9 [J]. J Gen Virol, 2000, 81(5): 1361-1372.
- [5] Zhao H, Wang J, Chen J, et al. Molecular epidemiology and evolution of coxsackievirus A9 [J]. Viruses, 2022, 14(4): 822.
- [6] Cui AL, Yu DS, Zhu Z, et al. An outbreak of aseptic meningitis caused by coxsackievirus A9 in Gansu, the People's Republic of China [J]. J Virol, 2010, 7(1): 72.
- [7] Othman I, Mirand A, Slama I, et al. Enterovirus migration patterns between France and Tunisia [J]. PLoS One, 2015, 10(12): e0145674.
- [8] 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.

- [9] Brown BA, Oberste MS, Alexander JP, et al. Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998[J]. J Virol, 2000, 73(12):9969-9975.
- [10] 赵鹤鹤, 韩振志, 张勇, 等. 柯萨奇病毒 A 组 9 型的基因分型方法的建立[J]. 病毒学报, 2022, 38(2):264-270.
- [11] 黄蓉蓉, 林小娟, 李漫时, 等. 柯萨奇病毒 A9 型山东地方株的进化遗传学特征[J]. 病毒学报, 2021, 37(6):1333-1338.
- [12] Pabbaraju K, Wong S, Chan E, et al. Genetic characterization of a coxsackie A9 virus associated with aseptic meningitis in Alberta, Canada in 2010[J]. Virol J, 2013, 10(1):93.
- [13] Yip C, Lau S, Zhou B, et al. Emergence of enterovirus 71 "double-recombinant" strains belonging to a novel genotype D originating from southern China; first evidence for combination of intratypic and intertypic recombination events in EV71[J]. Arch Virol, 2010, 155(9):1413-1424.
- [14] Liu JS, Zhu YJ, Pan Y, et al. Complete genome sequence analysis of two human coxsackievirus A9 strains isolated in Yunnan, China, in 2009[J]. Virus Genes, 2015, 50(3):358-364.
- [15] Trallero G, Casas I, Tenorio A, et al. Enteroviruses in Spain: virological and epidemiological studies over 10 years (1988-1997) [J]. Epidemiol Infect., 2000, 124(3):497-506.
- [16] 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.

【收稿日期】 2023-07-29 【修回日期】 2023-10-15

(上接 1369 页)

- [4] Khanam A, Gutierrez-Barbosa H, Lyke KE, et al. Immune-mediated pathogenesis in dengue virus infection [J]. Viruses, 2022, 14(11):2575.
- [5] Kok BH, Lim HT, Lim CP, et al. Dengue virus infection—a review of pathogenesis, vaccines, diagnosis and therapy [J]. Virus Res, 2023, 324:199018.
- [6] Veggi D, DelloIacono L, Malito E, et al. Effective multivalent oriented presentation of meningococcal NadA antigen trimers by self-assembling ferritin nanoparticles [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(7):6183.
- [7] Song N, Zhang J, Zhai J, et al. Ferritin: A multifunctional nanoplatform for biological detection, imaging diagnosis, and drug delivery [J]. Acc Chem Res, 2021, 54(17):3313-3325.
- [8] Kang S, Oltrogge LM, Broomell CC, et al. Controlled assembly of bifunctional chimeric protein cages and composition analysis using noncovalent mass spectrometry [J]. J Am Chem Soc, 2008, 130(49):16527-16529.
- [9] 李丹. 基于铁蛋白自组装技术的 PPRV-H 纳米颗粒抗原的表达及初步评价[D]. 北京: 中国农业科学院, 2021.
- [10] Pantopoulos K, Porwal SK, Tartakoff A, et al. Mechanisms of mammalian iron homeostasis [J]. Biochemistry, 2012, 51(29):5705-5724.
- [11] Khoshnejad M, Parhiz H, Shuvaev VV, et al. Ferritin-based drug delivery systems: Hybrid nanocarriers for vascular immunotargeting [J]. J Control Release, 2018, 282:13-24.
- [12] Uchida M, Kang S, Reichhardt C, et al. The ferritin superfamily: Supramolecular templates for materials synthesis [J]. BiochimBiophys Acta, 2010, 1800(8):834-845.
- [13] Wang Z, Xu L, Yu H, et al. Ferritin nanocage-based antigen delivery nanoplatforms: epitope engineering for peptide vaccine design [J]. Biomater Sci, 2019, 7(5):1794-1800.
- [14] Rong H, Qi M, Pan J, et al. Self-assembling nanovaccine confers complete protection against zika virus without causing antibody-dependent enhancement [J]. Front Immunol, 2022, 13:905431.
- [15] Castells M, Cristina J, Colina R. Evolutionary history and spatiotemporal dynamic of GIII norovirus: From emergence to classification in four genotypes [J]. Transbound Emerg Dis, 2022, 69(4):1872-1879.
- [16] Cao J, Deng H, Ye L, et al. Epidemiological and clinical characteristics of Dengue virus outbreaks in two regions of China, 2014-2015 [J]. PLoS One, 2019, 14(3):e0213353.
- [17] Zhang J, Shu Y, Shan X, et al. Co-circulation of three dengue virus serotypes led to a severe dengue outbreak in Xishuangbanna, a border area of China, Myanmar, and Laos, in 2019 [J]. Int J Infect Dis, 2021, 107:15-17.
- [18] Coronel-Martinez DL, Park J, Lopez-Medina E, et al. Immunogenicity and safety of simplified vaccination schedules for the CYD-TDV dengue vaccine in healthy individuals aged 9-50 years (CYD65): a randomised, controlled, phase 2, non-inferiority study [J]. Lancet Infect Dis, 2021, 21(4):517-528.
- [19] Manoff SB, George SL, Bett AJ, et al. Preclinical and clinical development of a dengue recombinant subunit vaccine [J]. Vaccine, 2015, 33(50):7126-7134.
- [20] Zaneti AB, Yamamoto MM, Sulczewski FB, et al. Dendritic cell targeting using a DNA vaccine induces specific antibodies and CD4(+) T cells to the dengue virus envelope protein domain III [J]. Front Immunol, 2019, 10:59.
- [21] Govindarajan D, Meschino S, Guan L, et al. Preclinical development of a dengue tetravalent recombinant subunit vaccine: Immunogenicity and protective efficacy in nonhuman primates [J]. Vaccine, 2015, 33(33):4105-4116.
- [22] Zhao L, Seth A, Wibowo N, et al. Nanoparticle vaccines [J]. Vaccine, 2014, 32(3):327-337.
- [23] Li Y, Gao H, Nepovimova E, et al. Recombinant ferritins for multimodal nanomedicine [J]. J Enzyme Inhib Med Chem, 2023, 38(1):2219868.
- [24] 刘嘉欣. 以铁蛋白纳米颗粒为载体的 Aβ 表位疫苗的设计及免疫原性评价[D]. 长春: 吉林大学, 2022.
- [25] 李凯. 基于铁蛋白的多表位流感纳米疫苗的构建及免疫效果评价[D]. 扬州: 扬州大学, 2021.

【收稿日期】 2023-07-21 【修回日期】 2023-10-10