·专题报道——传染病监测·

基于扩增子技术测定大连 2 例猴痘病毒全基因组特征

郎兴莹，孙楠，滕雪，刘颖丽，栾明春

大连市疾病预防控制中心，大连 116035
通信作者：郎兴莹，E-mail：yourreplysoon@163.com

【摘　要】目的　基于扩增子测序技术结合高通量测序平台和生物信息分析技术，建立猴痘病毒（MpxV）全基因组测序流程和分子溯源方法，为大连市猴痘病例分子流行病学研究提供技术支持。**方法**　以猴痘病例的痘疱液样本总核酸为模板，通过全基因组测序技术在 Ion Torrent 测序平台构建 cDNA 文库，完成模板制备和测序，通过 Ion GeneStudio S5 Plus 内置插件，以 NC_063383.1 作为内参序列，通过数据质控、碱基识别、序列比对、变异分析和全基因组序列组装，获得一致性序列，即 Fasta 文件。采用在线分析工具分析 MpxV 的全基因组特征、基因分型，遗传进化关系。**结果**　2 例患者的痘疱液样本 MpxV 基因核酸检测 *Ct* 值分别为 28.03，29.60。1 号样本获得的一致性序列全长为 197 084 bp 的 MpxV 全基因组序列，总 reads 数 3 470 722，平均测序深度 3 205，平均读长为 182 bp，覆盖率为 98.8%；2 号样本获得的一致性序列全长为 197 099 bp 的 MpxV 全基因组序列，总 reads 数 1 440 296，平均测序深度 746.7，平均读长为 105 bp，覆盖率为 97.8%。1 号样本存在 84 个单核苷酸突变和 40 个氨基酸突变，2 号样本存在 85 个单核苷酸突变和 42 个氨基酸突变。1 号和 2 号样本均属于 MpxVⅡb 分支（西非分支）的 C.1.1 亚分支。hMpxV/China/DLCDC-01 与中国广东省提交序列 EPI_ISL_18213375、EPI_ISL_19058867、EPI_ISL_18213374、EPI_ISL_19058866、EPI_ISL_19058873，中国云南省提交序列 EPI_ISL_18059184 的进化关系较近。hMpxV/China/DLCDC-02 与 hMpxV/China/DLCDC-01 及 GISAID 上传的中国 20 条有效序列不同源。**结论**　从 2 例患者痘疱液样本获得 MpxV 的一致性序列，成功构建了大连市 MpxV 全基因组测序技术和生物信息分析及分子溯源方法。

【关键词】 猴痘病毒（MpxV）；高通量测序；全基因组特征；大连市

Whole-genome sequencing of two monkeypox virus isolates from Dalian based on amplicon sequencing technology

LANG Xingying, SUN Nan, TENG Xue, LIU Yingli, LUAN Mingchun (*Dalian Center for Disease Control and Prevention*, *Dalian*, 116035, *China*)
Corresponding author: LANG Xingying, E-mail: yourreplysoon@163.com

【Abstract】 Objective To establish a whole-genome sequencing (WGS) workflow and molecular tracing method for monkeypox virus (MpxV) based on amplicon sequencing technology combined with a high-throughput sequencing platform and bioinformatics analysis techniques, providing technical support for molecular epidemiological research of monkeypox cases in Dalian city. **Methods** By taking total nucleic acid extracted from vesicle fluid samples of monkeypox cases as templates, a cDNA library was constructed on the Ion Torrent sequencing platform via WGS technology. Template preparation and sequencing were completed. Using the built-in plug-ins of Ion GeneStudio S5 Plus and NC063383.1 as the reference sequence, data quality control, base identification, sequence alignment, variant analysis, and whole-genome sequence assembly were performed to obtain consensus sequences (Fasta files). Online analysis tools were used to analyze the whole-genome characteristics, genotyping, and genetic evolutionary relationships of MpxV. **Results** The cycle threshold (Ct) values of MpxV nucleic acid detection in vesicle fluid samples from the two patients were 28.03 and 29.60, respectively. The consensus sequence obtained from sample 1 was a 197 084 bp MpxV whole-genome sequence with a total of 3 470 722 reads, an average sequencing depth of 3 205, an average read length of 182 bp, and approximately 98.8% coverage. The consensus sequence obtained from sample 2 was a 197 099 bp MpxV whole-genome sequence with a total of 1 440 296 reads, an average sequencing depth of 746.7, an average read length of 105 bp, and approximately 97.8% coverage. Sample 1 had 84 single nucleotide mutations and 40 amino acid mutations, while sample 2 had 85 single nucleotide mutations and 42 amino acid mutations. Both samples belonged to the C.1.1 sub-branch of the MpxV IIb clade (West African clade). hMpxV/China/ DLCDC-01 was closely related to the sequences EPI_ISL18213375, EPI_ISL19058867, EPI_ISL18213374, EPI_ISL19058866, and EPI_ISL19058873 submitted from Guangdong province, China, and EPIISL_18 059 184 submitted from Yunnan province, China. hMpxV/China/DLCDC-02 was not homologous to hMpxV/China/DLCDC-01 or the 20 valid sequences from China uploaded to GISAID. **Conclusions** Consensus sequences of MpxV were obtained from vesicle fluid samples of two patients, successfully establishing WGS technology, bioinformatics analysis, and molecular tracing methods for MpxV in Dalian city.

【Keywords】 monkeypox virus (MPXV); high-throughput sequencing; whole-genome characteristics; Dalian city

开放获取：CC BY-NC-ND 4.0 DOI：10.11847/zgggws1145912
基金项目：大连市科技创新基金（2023JJ13SN040）
第一作者：郎兴莹（1987—），副主任技师，研究方向：呼吸道病原鉴定、基因组学和生物信息分析。
收稿日期：2024-09-10　修回日期：2025-02-18　录用日期：2025-04-19
利益冲突：不存在　伦理审查：已获取　出版授权：全体作者已与编辑部签署作者贡献声明及版权转让协议

猴痘病毒（monkeypox virus, MpxV），是全长约 197 kb 的双链 DNA 病毒，属于痘病科正痘病毒属。1958 年，丹麦的研究人员首次在非洲绿猴身上分离出 MpxV。1970 年，刚果出现第一例猴痘感染病例[1]。2022 年 5 月以来，全球 100 多个国家和地区发生猴痘疫情；2022 年 6 月，中国疾病预防控制中心下发猴痘防控技术指南（2022 版）[2]；2022 年 7 月，世界卫生组织将猴痘疫情暴发列为“国际关注的突发公共卫生事件”；2022 年 9 月我国报告首例猴痘输入病例[3–4]；2023 年 6 月多省份先后报告猴痘病例，引发本土续发病例，隐匿传播的风险较高；2023 年 7 月，国家卫生健康委与国家疾病预防控制局共同制定并印发了《猴痘防控方案》；2023 年 9 月 20 日国家卫生健康委将猴痘纳入《中华人民共和国传染病防治法》规定的乙类传染病进行管理，采取乙类传染病的预防、控制措施。2023 年 7 月 4 日，大连市出现第 1 例 MpxV 感染者，经中国疾病预防控制中心全基因组测序，反馈结果显示，均属于 MpxV Ⅱb 分支（西非分支）的 C.1（全称为 B.1.3.1）亚分支。截止到 2023 年 12 月 31 日大连市共确诊 16 例 MpxV 感染者。为明确续发感染者 MpxV 的基因特征、构建大连市 MpxV 变异特征和分子溯源方法、了解 MpxV 进一步传播的可能性，本研究通过对 2 例 MpxV 感染者的痘疱液样本全基因组测序和生物信息分析，建立了大连市本土 MpxV 的基因组特征和变异特征，以助力 MpxV 的分子流行病学溯源。

1 材料与方法

1.1 样本来源　2023 年 7 月大连市 2 例 MpxV 感染者的痘疱液样本，本研究编号为 hMpxV/China/DLCDC-01 和 hMpxV/China/DLCDC-02。本研究通过大连市疾病预防控制中心医学伦理专家委员会伦理审查（伦理审查批件编号：2023009）。

1.2 核酸提取与 MpxV 核酸检测　使用核酸提取或纯化试剂（天隆）和 MpxV 核酸测定试剂盒（荧光定量 PCR，之江）。

1.3 高通量测序（Ion Torrent 测序平台）

1.3.1 基于 Ampliseq DNA 技术的 MpxV 全基因组序列测定　以提取的病毒 DNA 为模板，使用 Ion AmpliSeq™ Kit for Chef DL8 和 Ion AmpliSeq™ Monkeypox Panel（扩增子数目：1 609 个，2 个引物 pool：pool1:805，pool2:804，扩增子长度范围：125～275 bp，基因组覆盖度：覆盖猴痘基因组 99.52%，质控：内含 10 个质控扩增子，包含 AmeX 和 AmeY，8 个 sample ID，可区分样本性别，避免弄错），在 Ion Chef System（Thermo Fisher Scientific，美国）构建 MpxV 文库；采用 Ion 510™ & Ion 520™ & Ion 530™ Kit-Chef 和 Ion 530™ Chip Kit，在 Ion Chef System 制备高通量测序模板，并在 Ion GeneStudio S5 Plus（Thermo Fisher Scientific）测序。

1.3.2 全基因组序列拼接与突变分析　利用 Ion GeneStudio S5 Plus 内置插件（virus_coverageAnalysis、generateConsensus 和 variantCaller MpxV），以 NC_063383.1 作为内参序列，通过数据质控，完成原始数据的处理，包括碱基识别、序列比对、变异分析和全基因组序列组装，获得一致性序列，即 Fasta 文件。同时获得测序深度、比对率和均一性等指标。

1.4 病毒分型及基因组特征分析　利用在线网站 Nextclade（https://clades.nextstrain.org/），对一致性序列进行基因组谱系分型和突变位点分析。

1.5 构建系统发育进化树　通过 NCBI 网站下载参考基因组 NC_063383.1，GISAID 网站下载 MpxV 的Ⅰa 分支、Ⅰb 分支、Ⅱa 分支和Ⅱb 分支，包括中国上传的全部序列 28 条，采集时间 2022 年 9 月 14 日—2023 年 10 月，上传时间 2022 年 9 月 17 日—2024 年 7 月 20 日。使用 MAFFT 软件比对多序列。以 NC_063383.1 作为参考基因组，使用 Iqtree 软件（最大似然法 ML，Bootstrap 值定为 1 000）构建系统发育进化树。

2 结　果

2.1 MpxV 的核酸检测结果　对 2 例患者的痘疱液样本进行 MpxV 的荧光 RT-PCR 核酸检测，结果均为阳性；*Ct* 值分别为 1 号样本 28.03、2 号样本 29.60。

2.2 MpxV 的全基因组测序质量分析　2 份阳性核酸通过全基因高通量测序，1 号样本获得一致性序列全长 197 084 bp 的 MpxV 全基因组序列，总 reads 数 3 470 722，平均测序深度 3 205，平均读长 182 bp（Ion AmpliSeq™ Monkeypox Panel 的扩增子长度范围：125～275 bp），覆盖率约 98.8%；2 号样本获得一致性序列全长 197 099 bp 的 MpxV 全基因组序列，总 reads 数 1 440 296，平均测序深度 746.7，平均读长 105 bp，覆盖率约 97.8%。

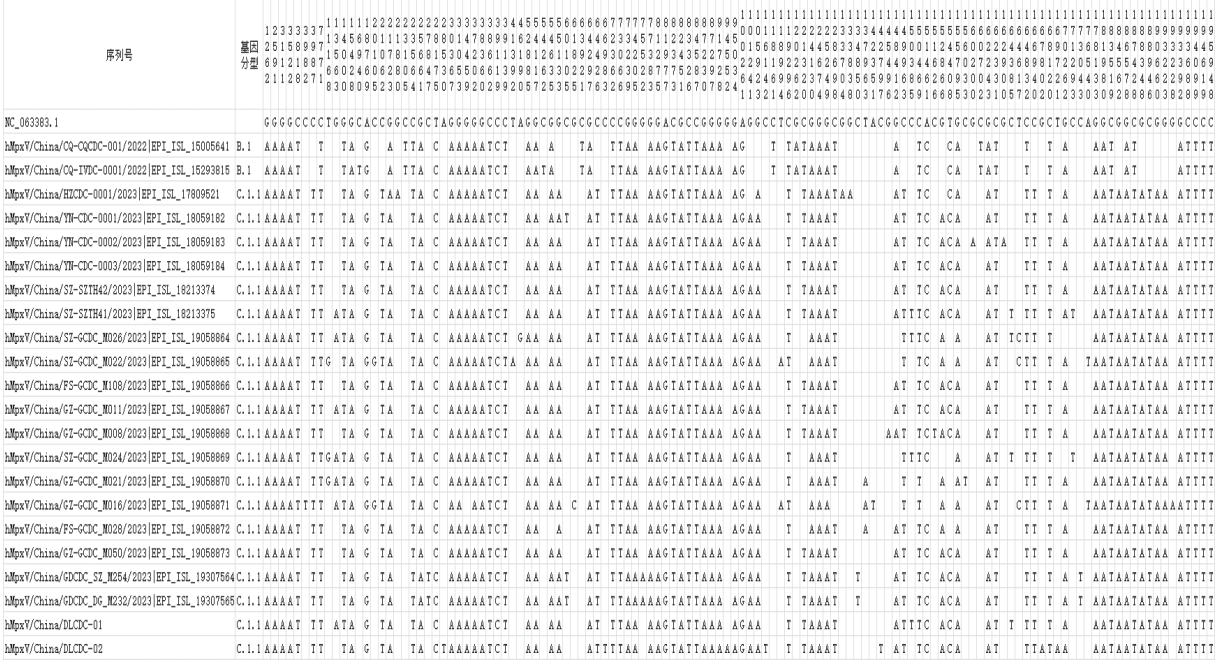
2.3 MpxV 的全基因组学特征分析　通过在线分析工具 Nextclade 分析，1 号和 2 号样本均属于 MpxV Ⅱb 分支（西非分支）的 C.1.1 分支，1 号样本存在 84 个单核苷酸突变和 40 个氨基酸突变；2 号样本存在 85 个单核苷酸突变和 42 个氨基酸突变。在 GISAID 下载中国上传的全部 MpxV 基因序列 28 条，其中 20 条为 QC 质控优秀有效序列，包括 2 条 B.1

分支、18 条C.1.1 分支。将上述20 条MpxV 基因有效序列和 2 条大连 MpxV 基因有效序列的 SNP 比较(22 条 MpxV 基因有效序列的覆盖率 97.8%～100.0%)。

2.4 MpxV 的溯源结果分析(图 1)

2.4.1 hMpxV/China/DLCDC-01 的溯源结果分析 hMpxV/China/DLCDC-01 比 hMpxV/China/SZ-SZTH41/2023'EPI_ISL_18213375 序列少了 C171293T。hMpxV/China/DLCDC-01 比 hMpxV/China/GZ-GCDC_M011/2023'EPI_ISL_19058867 新增 C150385T 和 C164385T。hMpxV/China/DLCDC-01 比 hMpxV/China/YN-CDC-0003/2023'EPI_ISL_18059184、hMpxV/China/SZ-SZTH42/2023'EPI_ISL_18213374、hMpxV/China/FS-GCDC_M108/2023'EPI_ISL_19058866 和 hMpxV/China/GZ-GCDC_M050/2023'EPI_ISL_19058873 序列新增 G13563A、C150385T 和 C164385T。hMpxV/China/DLCDC-01 与我国广东省的猴痘全基因组序列高度同源。

2.4.2 hMpxV/China/DLCDC-02 的溯源结果分析 hMpxV/China/DLCDC-02 比 hMpxV/China/YN-CDC-0003/2023'EPI_ISL_18059184、hMpxV/China/SZ-SZTH42/2023'EPI_ISL_18213374、hMpxV/China/FS-GCDC_M108/2023'EPI_ISL_19058866、hMpxV/China/GZ-GCDC_M050/2023'EPI_ISL_19058873 和 hMpxV/China/DLCDC-01 新增 A28530T、C66983T、G94552A、C116142T、C142797T、G167802A 和 T169721A。除上述外，hMpxV/China/DLCDC-01 比 hMpxV/China/DLCDC-02 新增 G13563A、C150385T 和 C164385T，hMpxV/China/DLCDC-01 与 hMpxV/China/DLCDC-02 不同源。hMpxV/China/DLCDC-02 比 hMpxV/Portugal/INSA-PT0715/2023'EPI_ISL_18553823 和 hMpxV/USA/CA-LACPHL-MA00586/2023'EPI_ISL_18993183 新增 A28530T、C66983T、G94552A、C116142T、G167802A 和 T169721A，比前者少了 G150753A，比后者少了 G32120A 和 C73431T。



注：比较大连 2 条 MpxV 全基因组序列与参考基因组(NC_063383. 1)和 GISAID 下载 20 条来自中国 MpxV 全基因组序列单核苷酸变异情况。

图 1 MpxV 全基因组单核苷酸变异分析

Fig. 1 Genome-wide single nucleotide variation analysis of MpxV

2.5 MpxV 的遗传进化分析(图 2) 在 GISAID 下载中国上传的全部序列 28 条，采集时间从 2022 年 9 月 14 日—2023 年 10 月，上传时间 2022 年 9 月 17 日—2024 年 7 月 20 日。通过 Nextclade 分析，选择 Mpox virus (All clades)模块，参考基因组为 NC_063383.1(Isolate MpxV-M5312_HM12_Rivers)。获得 27 条序列，1 条未能获得序列(可能由于提供的序列质量低，或者使用了不正确的参考序列)。27 条序列的 Clade 分型均属于Ⅱb 分支，其中 6 条为 B.1 分支、1 条 C.1 分支、20 条 C.1.1 分支。27 条序列的覆盖率为 98.2%～100.00%，2 条 B.1 分支和 18 条 C.1.1 分支的基因序列 QC 质控优秀，4 条 B.1 分支、1 条 C.1 分支和 2 条 C.1.1 分支的基因序列存在移码 Frame shifts，QC 质控不合格。在 NCBI 下载 1 条参考基因组 NC_063383.1，在 GISAID 下载 2 条Ⅰa 分支、2 条Ⅰb 分支、2 条Ⅱa 分支、19 条Ⅱb 分支、中国的 20 条 QC 质控优秀有效序列和大连 2 条 QC 质控优秀有效序列，共计 48 条，基于 MpxV 全基因组序列构建遗传进化树如图 2。

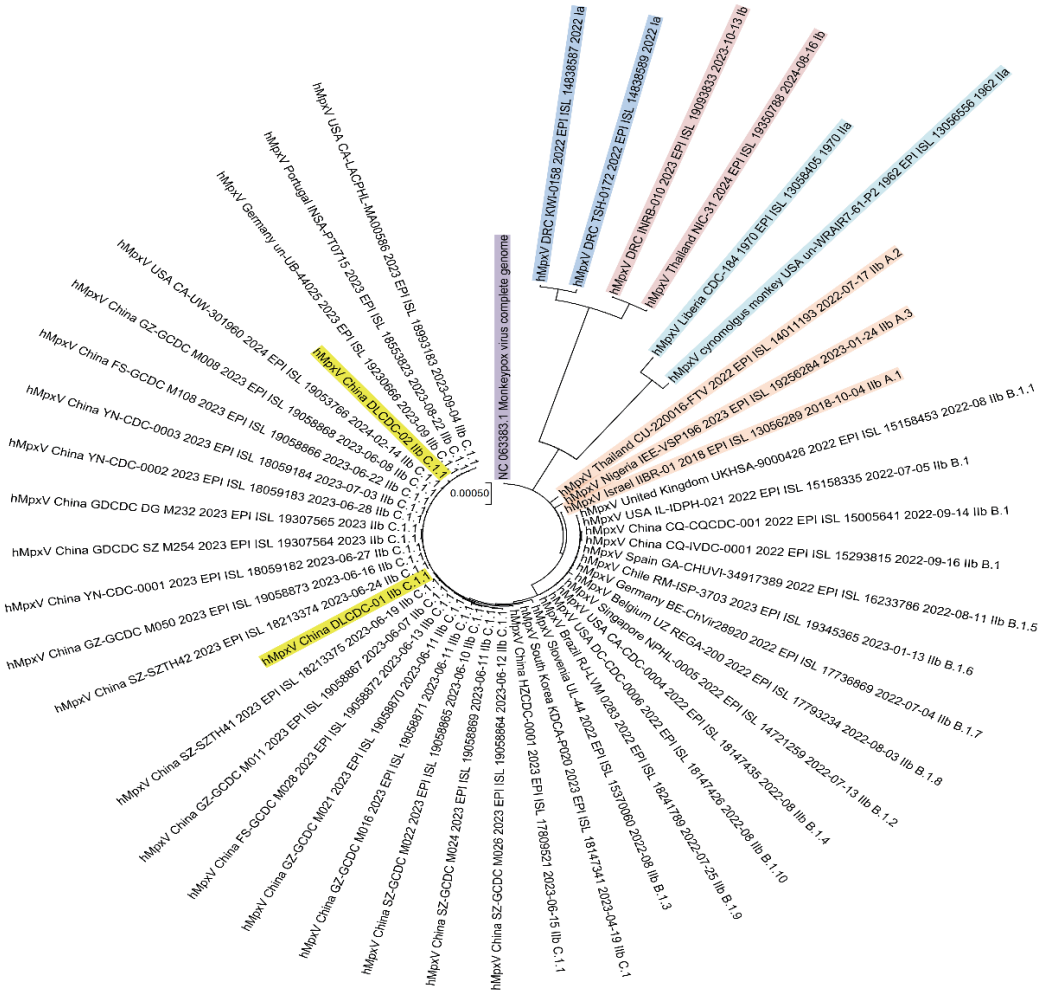


图 2　基于全基因组的猴痘病毒进化关系

Fig. 2　Phylogenetic relationship of monkeypox virus based on whole-genome sequencing

3 讨　论

本研究通过对大连市痘疱液样本提取的 MpxV 总核酸进行扩增子测序、构建文库、制备模板、上机测序、数据质控、数据优化及组装拼接，成功建立了 MpxV 全基因组测序流程和生物信息分析流程，获得了 2 条 MpxV 全基因组有效序列，通过分析比较病毒的核苷酸变异位点、全基因组分型及遗传进化分析，对 2 例 MpxV 病例进行了分子流行病学溯源，为大连市 MpxV 疫情防控提供了科学依据。

MpxV 基因组较大且具有末端串联重复等复杂特征，临床样本类型多样且病毒载量一般较低，因此，样本的采集部位和基因组测序方式的选择，对分子溯源和病毒变异监测预警至关重要。有研究证实，MpxV 核酸检测中痘疱液的病毒载量高于咽拭子，故而建议尽量采集病变部位的痘疱液[5–7]。有研究评估了 mNGS、扩增子测序技术及 3 种测序平台在猴痘病毒基因组测序方面的综合表现[8–9]，表明 MpxV 扩增子测序技术可高效地应用于临床样本测序且成本较低，利于获得高质量的猴痘基因组[10]。通过分子遗传进化分析，国际上普遍将 MpxV 分为 2 个进化分支[11]：分支Ⅰ和Ⅱ，分支Ⅰ曾称为中非分支或刚果盆地分支，分支Ⅱ曾称为西非分支，进一步分为Ⅱa 和Ⅱb。其中，引发 2022 年全球非地方性流行区猴痘暴发疫情的毒株为新分类的谱系Ⅱb 分支 B.1 谱系[12–15]，MpxV-2022 毒株与 2018 年分离的 MpxV 毒株属于同一谱系，其流行病学特征发生了重大转变。与 2018 年的 MpxV 毒株相比，在 MpxV-2022 毒株中共观察到 46 个新的一致突变，包括 24 个非同义突变[12]。MpxV-2022B.1 谱系，包括 13 个衍生谱系，在与免疫逃逸、毒力因子和宿主识别相关的几个基因中存在 10 种独特的非同义突变[16]。截止 2024 年 9 月 1 日，通过 GISAID 查询，Ⅱb 分支目前分为 33 个谱系，包括Ⅱb A 分支 8 个谱系（A、A.1、A.1.1、A.2、A.2.1、A.2.2、A.2.3、A.3），Ⅱb B.1 分支 23 个谱系（B.1、B.1.1、B.1.10-B.1.19、B.1.2、B.1.20-B.1.22、B.1.3-B.1.9），Ⅱb C.1 分支 2 个谱系（C.1 和 C.1.1）。

2023 年 7 月 4 日大连确诊首例输入 MpxV 病例，将首例和后续发现的其他 3 例 MpxV 感染者的

样本送至中国疾病预防控制中心，反馈测序报告显示，4 条序列均属于 MpxV Ⅱb 分支（西非分支）的 C.1（全称为 B.1.3.1）亚分支。与其中 3 例 MpxV 感染者进化关系最近的为中国云南省提交序列 EPI_ISL_18059184 和中国广东省提交序列 EPI_ISL_18213374。本研究中，hMpxV/China/DLCDC-01 和 hMpxV/China/DLCDC-02 的 2 条序列均属于 MpxV Ⅱb 分支（西非分支）的 C.1.1（全称为 B.1.3.1.1）亚分支，hMpxV/China/DLCDC-01 与中国广东省提交序列EPI_ISL_18213375、EPI_ISL_19058867、EPI_ISL_18213374、EPI_ISL_19058866 和EPI_ISL_19058873，中国云南省提交序列 EPI_ISL_18059184 的进化关系较近，与中国疾病预防控制中心溯源的结果处于同一进化分支。hMpxV/China/DLCDC-02 与 hMpxV/China/DLCDC-01 及 GISAID 上传的 20 条中国有效序列进化关系较远，不同源。

随着全球一体化进程带来的人员和货物流动，也给 MpxV 快速传播创造了条件。为应对猴痘疫情的变化，海关口岸、疾病预防控制中心与医疗机构应继续加强对猴痘疫情的防控监测，推进数据的全球共享，有助于分析病原的基因组特征与遗传进化关系，为快速溯源和指导防控措施的制定提供依据。

参考文献

[1] Martín-Delgado M C, Martín Sánchez F J, Martínez-Sellés M, et al. Monkeypox in humans: a new outbreak[J]. Revista Espaň ola De Quimioterapia, 2022, 35(6): 509-518.

[2] 国家卫生健康委员会. 猴痘防控技术指南 (2022 年版)[J]. 中国病毒病杂志, 2022, 12(4): 245-254.

[3] 唐云, 文海燕, 赵华, 等. 中国大陆首例输入性猴痘病例的基因特征分析 [J]. 现代预防医学, 2024, 51(10): 1878-1883.

[4] Zhang D T, Qi X, Li F, et al. The first local case of mpox caused by an imported case in the Chinese mainland[J]. Biosafety and Health, 2023, 5(4): 187-190.

[5] 裴建新, 吴长城, 张银豪, 等. 宁夏首例猴痘病毒测序及全基因组序列特征分析 [J]. 病毒学报, 2024, 40(4): 779-786.

[6] Rani I, Satapathy P, Goyal A, et al. Viral loads in skin samples of patients with monkeypox virus infection: a systematic review and meta-analysis[J]. Viruses, 2023, 15(6): 1386.

[7] Lim C K, McKenzie C, Deerain J, et al. Correlation between monkeypox viral load and infectious virus in clinical specimens[J]. Journal of Clinical Virology, 2023, 161: 105421.

[8] Wu C C, Ruhan A, Ye S, et al. Rapid identification of full-length genome and tracing variations of monkeypox virus in clinical specimens based on mNGS and amplicon sequencing[J]. Virologica Sinica, 2024, 39(1): 134-143.

[9] Chen Y D, Wu C C, Ruhan A, et al. Perspective on the application of genome sequencing for monkeypox virus surveillance[J]. Virologica Sinica, 2023, 38(2): 327-333.

[10] 雷有菊, 赵生仓, 唐志坚, 等. 青海省 1 例外省输入性猴痘病毒基因特征分析 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2023, 37(5): 518-523.

[11] 赵红, 刘子薇, 张钦钰, 等. 2023 年济南市 7 例猴痘病毒全基因组特征分析 [J]. 中国公共卫生, 2024, 40(5): 632-634.

[12] Wang L L, Shang J Z, Weng S H, et al. Genomic annotation and molecular evolution of monkeypox virus outbreak in 2022[J]. Journal of Medical Virology, 2023, 95(1): e28036.

[13] Zhu J, Yu J, Qin H, et al. Exploring the key genomic variation in monkeypox virus during the 2022 outbreak[J]. BMC Genomic Data, 2023, 24(1): 67.

[14] Luna N, Ramírez A L, Muñoz M, et al. Phylogenomic analysis of the monkeypox virus (MPXV) 2022 outbreak: emergence of a novel viral lineage?[J]. Travel Medicine and Infectious Disease, 2022, 49: 102402.

[15] Khosravi E, Keikha M. B.1 as a new human monkeypox sublineage that linked with the monkeypox virus (MPXV) 2022 outbreak - correspondence[J]. International Journal of Surgery, 2022, 105: 106872.

[16] Luna N, Muñoz M, Bonilla-Aldana D K, et al. Monkeypox virus (MPXV) genomics: a mutational and phylogenomic analyses of B. 1 lineages[J]. Travel Medicine and Infectious Disease, 2023, 52: 102551.