

浙江省啮齿动物中温州病毒的基因组学分析

李鲲 林献丹 李明慧 王森若 孙肖瑜 张永振

102206 北京, 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所人兽共患病室(李鲲、李明慧、张永振); 325000 浙江省温州市疾病预防控制中心消毒和病媒生物防制所(林献丹、孙肖瑜); 323700 龙泉市疾病预防控制中心业务管理科(王森若)

通信作者: 张永振, Email: zhangyongzhen@icdc.cn

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2017.03.022

【摘要】 目的 为了解国内发现的新型沙粒病毒(温州病毒)在温州地区啮齿类动物中的流行情况。**方法** 采用巢式 RT-PCR 方法分别对采集自温州(48 份)及龙泉(156 份)的啮齿动物样本筛查沙粒病毒。**结果** 在温州地区采集的 5 份啮齿动物样本中再次检测到温州病毒, 阳性率为 10.41%; 但在龙泉地区采集的 156 份样本中均未发现温州病毒。分析病毒的全基因组序列发现其中 4 株病毒与已知的温州病毒有很高的同源性; 而编号为 Wencheng-Rn-288 病毒株的 S 和 L 片段与已知病毒同源性分别为 87.5% 和 91.6%, 在进化树上为一独立分支, 为温州病毒的新亚型。**结论** 温州病毒在温州地区啮齿动物中有较高的流行率, 且呈多样性。鉴于在柬埔寨已发现温州病毒能引起人呼吸道疾病, 因此我国应加强温州病毒的监测。

【关键词】 温州病毒; 啮齿动物; 新亚型; 呼吸道疾病

基金项目: 国家自然科学基金(81290343, 81273014)

Genomic analysis of Wenzhou virus in rodents from Zhejiang province Li Kun, Lin Xiandan, Li Minghui, Wang Miaoruo, Sun Xiaoyu, Zhang Yongzhen

Department of Zoonoses, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China (Li K, Li MH, Zhang YZ); Institute of Disinfection and Vector Control, Wenzhou Prefecture Center for Disease Control and Prevention, Wenzhou 325000, China (Lin XD, Sun XY); Department of Business Management, Longquan County Center for Disease Control and Prevention, Longquan 323700, China (Wang MR)

Corresponding author: Zhang Yongzhen, Email: zhangyongzhen@icdc.cn

【Abstract】 Objective Arenavirus is a negative single-stranded RNA virus and an important human pathogen, mainly harbored and transmitted by rodents, causing severe diseases, including hemorrhagic fever and encephalitis. Following the discovery of a novel pathogenic arenavirus (Wenzhou virus, WENV), the prevalence of WENV in local small rodents was investigated. **Methods** By using RT-PCR, WENV was screened in 48 and 156 rodents sampled from Wenzhou and Longquan, respectively. **Results** Consequently, WENV was detected in 5 (10.41%) rodents sampled from Wenzhou. However, no WENV was identified in all the rodents sampled from Longquan. Genetic analysis of complete genome sequences indicated that 4 of 5 virus strains were closely related to the known Wenzhou viruses with high homology. Especially, the L and S segments of Wencheng-Rn-288 strain shared homology of 87.5% and 91.6% with other viruses, respectively. They formed a distinct lineage, suggesting that this strain might be a novel variant of WENV. **Conclusions** Our results indicate that WENV has a high prevalence and high genetic diversity among rodents in Wenzhou. As the respiratory disease caused by WENV has been detected in Cambodia, it is necessary to strengthen the surveillance for WENV in China.

【Key words】 Wenzhou virus; Rodent; Novel variant; Respiratory disease

Fund programs: National Natural Science Foundation of China (81290343, 81273014)

沙粒病毒(Lassa virus)是一类以啮齿动物为主要宿主的单股负链 RNA 病毒, 其基因组由 2 个片段

(S 和 L) 组成。目前已确定的沙粒病毒有 30 种, 根据地理分布、抗原性和序列差异, 分为新世界和旧世

界两大群^[1]。沙粒病毒可导致以出血热和脑炎症状为主的多种严重人类疾病。如拉沙病毒每年在非洲地区可导致30万至50万人感染,5 000人死亡^[2]。在南美洲,胡宁病毒(Junin virus)、马秋波病毒(Machupo virus)、萨比亚病毒(Sabia virus)、Chapare病毒分别引起阿根廷出血热、玻利维亚出血热、委内瑞拉出血热和巴西出血热^[3-5]。在亚洲,目前已知的沙粒病毒仅有淋巴脉络丛脑膜炎病毒(Lymphocytic choriomeningitis virus, LCMV)和2015年本研究组在温州地区发现的温州病毒(Wenzhou virus, WENV)^[6-7]。后者系一种新型沙粒病毒,也是自20世纪30年代以来在欧亚大陆上发现的第二种沙粒病毒。最新研究发现WENV能引起人呼吸道疾病^[8]。为进一步研究WENV的遗传特征及其流行,对温州和龙泉地区啮齿动物中WENV的流行情况开展调查,并对其全基因组序列进行遗传进化分析。

材料与方法

1. 样本来源: 2013年在温州市文成地区和龙泉市采用笼捕法捕鼠,经形态学和分子生物学鉴定后,采集其粪便样本,置冻存管-80℃保存。
2. RNA提取: 使用德国Qiagen公司的总RNA提取试剂盒提取动物粪便总RNA,置于-80℃备用。
3. RT-PCR检测及序列扩增: 参照以往的检测方法,使用已有的引物序列^[7],采用巢式RT-PCR方法检测鼠粪便中病毒RNA。选取阳性样品,根据GenBank中沙粒病毒末端保守序列扩增阳性样品病毒全基因组(S和L节段)。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。序列测定由北京擎科新业生物技术有限公司完成。
4. 核苷酸、蛋白序列和系统进化树分析: 使用DNASar软件对获得的序列进行编辑及同源性分析,用Clustal X软件转换序列格式。用PhyML 3.1软件构建系统进化树(用于分析的其他毒株序列来自GenBank)。

结 果

1. 病毒检测: 2013年在温州地区采集的48份啮齿动物样本,有5份检测到病毒RNA阳性,其中4份源自褐家鼠,1份来自黄胸鼠,病毒携带率为10.41%。分别用S和L节段末端及中间区域保守序列设计引物,获得5份样品(Wencheng-Rn-232、Wencheng-Rn-288、Wencheng-Rn-337、Wencheng-Rn-343及Wencheng-Rf-250)病毒基因组的全长或接近全长序列。但在龙泉地区采集的156份啮齿动物样本中未检测到相同病毒。

2. S与L节段分析:

(1)同源性和进化分析: 5株病毒的S节段全长在3 210~3 241核苷酸之间,L节段全长在6 764~6 880核苷酸之间,与典型沙粒病毒基因组序列长度一致。与已知的沙粒病毒序列比对发现,与已知WENV同源性最高,S节段同源性为88.0%~99.0%,L节段为94.0%~99.0%。选取国内先前报道的Wencheng-Rf-366毒株(WENV)和Armstrong 53b毒株(LCMV)序列作为参照,计算不同毒株序列的遗传距离。结果显示,Wencheng-Rn-232、Wencheng-Rn-337、Wencheng-Rn-343、Wencheng-Rf-250毒株间同源性>99%,与已知的Wencheng-Rf-366株核苷酸序列同源性也在97%~99%之间(表1)。而Wencheng-Rn-288毒株与其他已知WENV的序列差异较大,S和L节段与已知WENV的同源性分别为87.5%和91.6%,与国内已有的LCMV同源性分别为56.3%和50.1%,与拉沙病毒同源性分别为62.0%和53.9%。表明Wencheng-Rn-288毒株可能为WENV一个新亚型。选择旧世界群沙粒病毒代表株及新世界群的Whitewater Arroyo virus(WWAV)作为外群,分别构建S和L节段进化树。如图1所示,此次发现的病毒(Wencheng-Rn-232、Wencheng-Rn-337、Wencheng-Rn-343、Wencheng-Rf-250)均与之前报道的WENV聚集在一起,有很高的亲缘关系。而病毒株Wencheng-Rn-288在进化

表1 WENV毒株与其他沙粒病毒的S/L节段核苷酸序列分析

病毒株	Wencheng-Rn-232	Wencheng-Rf-250	Wencheng-Rn-288	Wencheng-Rn-337	Wencheng-Rn-343	Lassa virus	LCMV
Wencheng-Rn-232		97.1/94.9	87.5/90.5	98.4/98.6	98.4/98.0	62.6/53.6	56.1/49.8
Wencheng-Rf-250	2.7/4.4		87.5/89.9	97.3/95.5	97.2/95.8	62.6/54.3	55.9/50.3
Wencheng-Rn-288	14.7/9.4	14.5/11.6		87.5/91.2	87.1/91.6	62.0/53.9	56.3/50.1
Wencheng-Rn-337	0.8/0.6	2.2/4.7	14.5/9.3		99.0/99.1	62.6/54.2	56.1/50.3
Wencheng-Rn-343	0.9/0.7	2.4/4.6	14.7/9.4	0.4/0.3		62.9/54.4	56.3/50.6
Lassa virus	46.0/63.3	45.9/63.2	46.7/63.8	45.8/62.8	46.0/63.1		59.0/50.5
LCMV	59.0/72.3	59.3/72.7	57.8/72.7	58.8/72.1	59.0/72.1	54.1/74.3	

注: Lassa virus为拉沙病毒; LCMV为淋巴脉络丛脑膜炎病毒; 其他为温州病毒株

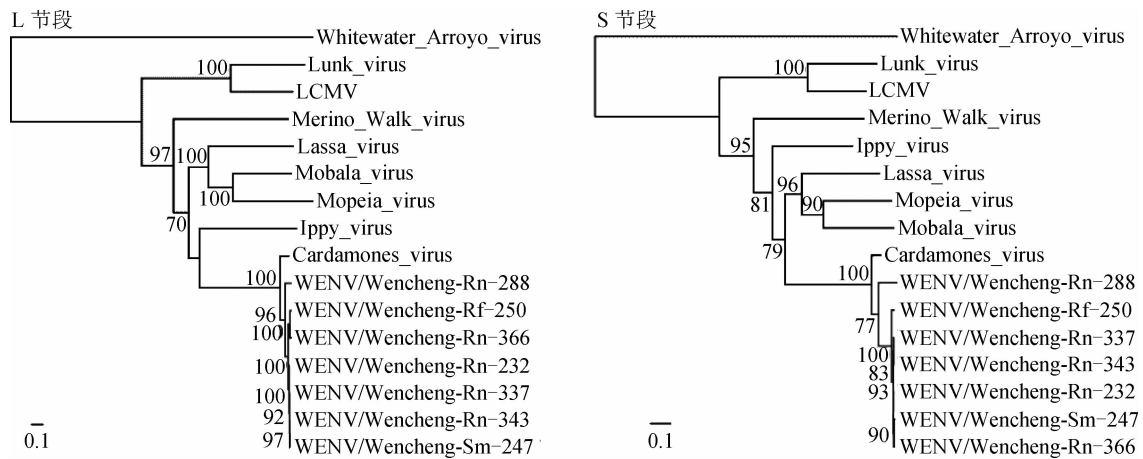


图 1 WENV 的 L、S 基因节段系统进化树

树上构成独立的分支,为在柬埔寨发现的 WENV 另一分支。

(2)遗传特征分析:对所获得 5 株病毒分析其 S 和 L 节段遗传特征,结果显示 S 和 L 节段末端均有典型的沙粒病毒末端保守序列(表 2),L 节段 5' 端为: 5-CGC ACC GGG GAT CCT AGG CAA AGT GGT TAT CT-3, 3' 端为: 5-CCT CTA CAC TGA GAG ATT CAG AGT TG-3; S 节段 5' 端为: 5-AGG GGA TCC TAG GCC TTT TTG GTT GCG CAT ATA AA-3, 3' 端为: 5-CAA TTC GCC ATG AAA ATG CCT AGG ATC CCC-3。蛋白序列分析表明,5 株病毒的核蛋白均有典型的核酸外切酶区域,而糖蛋白也具有典型的细胞质区(cytoplasmic region),均与以往发现的 WENV 及其他沙粒病毒一致。分析基因间非编码区域(intergenic region),显示 Wencheng-Rn-232、Wencheng-Rn-337、Wencheng-Rn-343、Wencheng-Rf-250 的 S 和 L 节段基因间区域长度也均与已报道的 WENV 完全一致,分别为 61 bp 和

120 bp。而 Wencheng-Rn-288 毒株则与其他毒株存在较大差异,长度分别为 39 bp 和 124 bp。为了解其对人的可能致病性,选取与对人致病的拉沙病毒、LCMV 和柬埔寨的 WENV 毒株进行对比。结果表明,WENV 各毒株的糖蛋白序列与 LCMV 糖蛋白同源性为 52.0%~53.0%,与拉沙病毒糖蛋白同源性约为 73.0%,而与柬埔寨检测到的 WENV 亚型 C617、C621 和 C649 毒株糖蛋白同源性则高达 91.2%~95.2%。表明我国的 WENV 毒株有可能发生跨物种传播造成人类感染。

讨 论

目前已知的致病性沙粒病毒多分布在非洲和南美洲,如拉沙病毒、Lujó 病毒、胡宁病毒、马秋波病毒、萨比亚病毒、Chapare 病毒等^[2-5,9],多以出血热为主要症状。2015 年以前在欧亚大陆唯一发现的沙粒病毒为 LCMV,可致人脑炎^[6]。2015 年我们在温州地区啮齿动物和食虫类动物中首次发现一种新的沙粒病毒,命名为 WENV^[7],并得到世界病毒分类委员会(ICTV)认可^[10]。Blasdell 等^[8]2016 年报道了流行在东南亚地区的 WENV 变种,并在柬埔寨发现可感染人,引起发热、头痛、流涕、咳嗽、胃部不适等症状。分析发现,柬埔寨流行 WENV 毒株的 L 与 S 节段与我国报道的 WENV 同源性分别高达 87.5%~88.6%和 87.5%~89.8%^[10]。本研究再次在温州市文成地区啮齿类动物中发现了 5 株 WENV 及其新亚型,证明沙粒病毒在温州地区啮齿类动物中的流行。

龙泉地区虽与温州同属浙江省南部,但在该地区的鼠类样本中未检测到沙粒病毒,而温州地区则有较高的检出率(10.41%),可能与两地独特的地理地貌有关。多山地区易形成物理障碍限制了宿主动

表 2 WENV 的 S、L 基因节段遗传特征

节段	病毒株	末端保守序列	基因间序列长度	NP 核酸外切酶区域	GP 蛋白细胞质区
S	Wencheng-Rn-232	+	61	+	+
	Wencheng-Rn-288	+	39	+	+
	Wencheng-Rn-337	+	61	+	+
	Wencheng-Rn-343	+	61	+	+
	Wencheng-Rf-250	+	61	+	+
L	Lassa virus	+	61	+	+
	Wencheng-Rn-232	+	120	+	+
	Wencheng-Rn-288	+	124	+	+
	Wencheng-Rn-337	+	120	+	+
	Wencheng-Rn-343	+	120	+	+
Wencheng-Rf-250	+	120	+	+	
Lassa virus	+	100	+	+	

注:Lassa virus 为拉沙病毒;其他为温州病毒株

物的迁移,从而造成 WENV 的地理聚集现象。此外,不同宿主动物中(褐家鼠、黄胸鼠、鼯鼠等)均检出 WENV,也说明病毒宿主动物的多样性。

对5株病毒的全基因组序列分析发现,其中4株与已报道的 WENV 在系统发生树上处于同一进化分支,具有相同或相似的遗传特征。而 Wencheng-Rn-288 株则与其他毒株存在一定差异,在进化树上位于另一个分支,L 和 S 节段与其他 WENV 毒株核苷酸同源性分别为 89.9%~91.6% 和 87.1%~87.5%。表明该病毒株系 WENV 一个新亚型,提示在该地区动物中 WENV 具有很长的进化历史。

人类传染病多源于动物^[11],70%以上新发传染病是由野生动物携带的病毒引起^[12]。我国野生动物种类繁多,分布广泛,是多种人类病原体的储存库。随着人类活动日渐频繁,未来野生动物源病原体对人类构成重大威胁。本研究发现温州地区啮齿动物中 WENV 流行率高,其中褐家鼠为主要宿主。而后者在我国分布广泛,是居民区的优势鼠种,与人类接触密切。因此应加强对啮齿类动物 WENV 流行的监测,并研究其感染性和致病性,评估引起新发传染病的风险。

利益冲突 无

参 考 文 献

- [1] Emonet SF, de La Torre JC, Domingo E, et al. Arenavirus genetic diversity and its biological implications [J]. *Infect Genet Evol*, 2009, 9(4): 417-429. DOI: 10.1016/j.meegid.2009.03.005.
- [2] Ogbu O, Ajuluchukwu E, Uneke CJ. Lassa fever in West African sub-region: an overview [J]. *J Vector Borne Dis*, 2007, 44(1): 1-11.
- [3] Carballal G, Videla CM, Merani MS. Epidemiology of Argentine hemorrhagic fever [J]. *Eur J Epidemiol*, 1988, 4(2): 259-274.
- [4] Patterson M, Grant A, Paessler S. Epidemiology and pathogenesis of Bolivian hemorrhagic fever [J]. *Curr Opin Virol*, 2014, 5: 82-90. DOI: 10.1016/j.coviro.2014.02.007.
- [5] Koma T, Huang C, Kolokoltsova OA, et al. Innate immune response to arenaviral infection: a focus on the highly pathogenic New World hemorrhagic arenaviruses [J]. *J Mol Biol*, 2013, 425(24): 4893-4903. DOI: 10.1016/j.jmb.2013.09.028.
- [6] Morita C, Tsuchiya K, Ueno H, et al. Seroepidemiological survey of lymphocytic choriomeningitis virus in wild house mice in China with particular reference to their subspecies [J]. *Microbiol Immunol*, 1996, 40(4): 313-315. DOI: 10.1111/j.1348-0421.1996.tb03342.x.
- [7] Li K, Lin XD, Wang W, et al. Isolation and characterization of a novel arenavirus harbored by Rodents and Shrews in Zhejiang province, China [J]. *Virology*, 2015, 476: 37-42. DOI: 10.1016/j.viro.2014.11.026.
- [8] Blasdel KR, Duong V, Eloit M, et al. Evidence of human infection by a new mammarenavirus endemic to Southeastern Asia [J]. *eLife*, 2016, 5: e13135. DOI: 10.7554/eLife.13135.001.
- [9] Briese T, Paweska JT, McMullan LK, et al. Genetic detection and characterization of Lujo virus, a new hemorrhagic fever-associated arenavirus from southern Africa [J]. *PLoS Pathog*, 2009, 5(5): e1000455. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000455.
- [10] International Committee on Taxonomy of Viruses. *Virus Taxonomy: 2015 Release* [EB/OL]. [2016-08-20]. <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.
- [11] Guo WP, Lin XD, Wang W, et al. Phylogeny and origins of hantaviruses harbored by bats, insectivores, and rodents [J]. *PLoS Pathog*, 2013, 9(2): e1003159. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003159.
- [12] Paige SB, Frost SD, Gibson MA, et al. Beyond bushmeat: Animal contact, injury, and zoonotic disease risk in western Uganda [J]. *Ecohealth*, 2014, 11(4): 534-43. DOI: 10.1007/s10393-014-0942-y.

(收稿日期:2016-08-24)

(本文编辑:张林东)