

DOI:10.13350/j.cjpb.221002

• 论著 •

广西中越边境口岸地区 1 株 Nam Dinh 病毒的分离及鉴定*

梁亮¹, 陈世毅¹, 李又云², 韦一知¹, 邓秋云¹, 邓丽丽¹, 韦敬航¹, 马宇燕¹, 秦月¹, 刘巍^{1**}

(1. 广西壮族自治区疾病预防控制中心, 广西南宁 530028; 2. 宁明县疾病预防控制中心)

【摘要】 目的 分离鉴定广西中越边境口岸地区来源的 1 株 NDiV, 并对其进行同源性比较和进化分析。方法 将蚊虫标本研磨液接种 C6/36 和 BHK21 细胞, 提取阳性分离物的病毒 RNA, 合成 cDNA 后进行二代测序, 获得毒株的全基因组序列, 利用 Editseq 软件识别该序列的 ORF 和非编码区, 采用 Bioedit 7.0 软件进行同源性比较, 采用 Mega X 软件分别构建全基因组、RDRP 和 S 基因的系统进化树。结果 接种 1 批次三带喙库蚊标本的 C6/36 细胞出现明显的病变, 病毒命名为 Ad2019035sd, 二代测序显示该毒株的 NDiV 覆盖率为 99.80%; 比较 Ad2019035sd 与 Mesoniviridae 科参考株全基因组核苷酸同源性在 57.9%~98.9% 之间, 主要蛋白的编码基因核苷酸和氨基酸同源性分别在 56.7%~100% 和 40.0%~99.5% 之间, 其中与深圳毒株 SZ11706Z 的同源性最高。全基因组、RDRP 和 S 基因系统进化树均显示毒株 Ad2019035sd 与两株 NDiV 毒株在同一进化分支。结论 毒株 Ad2019035sd 为 NDiV, 与深圳毒株 SZ11706Z 高度同源, 为广西地区 NDiV 感染情况调查及相关研究提供了基础资料。

【关键词】 Nam Dinh 病毒; 中越边境口岸; 全基因组; 系统进化树

【中图分类号】 R373

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2022)10-1121-04

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Oct.; 17(10): 1121-1124.]

First isolation and identification of Nam dinh virus at the area of China-Vietnamese border port in Guangxi

LIANG Liang¹, CHEN Shi-yi¹, LI You-yun², WEI Yi-zhi¹, DENG Qiu-yun¹, DENG Li-li¹, WEI Jing-hang¹, MA Yu-yan¹, QIN Yue¹, LIU Wei¹ (1. Guangxi Center for Disease Control and Prevention, Nanning, Guangxi; 2. Ningming Center for Disease Control and Prevention)

【Abstract】 **Objective** To identify one strain of NDiV isolated from the area of China-Vietnamese border port in Guangxi, and perform homology comparison and evolutionary analysis with other strains. **Methods** The mosquito grinding supernatant was used to infect C6/36 and BHK-21 cells respectively, the viral RNA of positive isolate was extracted, and its cDNA was synthesized for next-generation sequencing to obtain the whole genome sequence of the strain. The ORFs and the non-coding regions of the sequence were identified using Editseq, nucleotide and amino acid sequences of the strain were compared to those of other strains using Bioedit 7.0, and phylogenetic trees for complete genome, RDRP and S gene were constructed using Mega X. **Results** Obvious cytopathic effect was observed in C6/36 cell inoculated with one batch of *Culex tritaeniorhynchus*, and this strain was named Ad2019035sd. The result of next-generation sequencing showed that NDiV coverage of this strain was 99.80%, in comparison of the nucleotide and amino acid homology with other reference strains of Mesoniviridae, the genomic nucleotide similarity ranged from 57.9% to 98.9%, and the nucleotide and amino acid similarities of important NDiV proteins ranged from 56.7% to 100% and 40.0% to 99.5%, respectively, and the Ad2019035sd strain had the highest similarity with the Shenzhen strain (SZ11706Z); furthermore, phylogenetic trees based on complete genome, RDRP and S gene also indicated that the Ad2019035sd strain and two NDiV strains were on the same evolutionary branch. **Conclusion** The Ad2019035sd strain belongs to NDiV and has high homology with the Shenzhen strain (SZ11706Z), which could serve as an experimental material for further research on NDiV infection in Guangxi.

【Key words】 Nam Dinh virus; China-Vietnamese border port; complete genome; phylogenetic tree

*** Nam dinh 病毒(Nam dinh virus, NDiV)属于成套病毒(Nidovirus)目 Mesoniviridae 科 Alphamesonivirus 属^[1], 2002 年由 Phan Thi Nga 等首次分离自越南急性脑炎病人的脑脊液标本, 随后又从当地的库蚊标本中分离到该病毒, 并以分离地越南的南定省(Nam dinh)命名^[2-3]。NDiV 为不分节段的单股正链 RNA 病毒, 病毒颗粒呈球形, 直径为 60~80 nm, 该病

* **【基金项目】** 广西壮族自治区卫生和计划生育委员会自筹经费课题(No. Z20180986)。

** **【通讯作者】** 刘巍, E-mail: gxlw@163.com

【作者简介】 梁亮(1982-), 男, 湖南涟源人, 硕士, 副主任技师。主要研究方向: JEV 等相关蚊媒病毒检测。
E-mail: Lianglde@163.com

毒基因组全长约 20.2 kb, 包含至少 6 个开放读码框 (Open Reading Frame, ORF)、5' 和 3' 端非编码区, 其中 5' 端含帽子结构, 3' 端含 Poly(A) 尾。目前我国的深圳、云南等地分离到该病毒^[4-6]。为了解广西中越边境口岸地区蚊虫分布及其携带病原的情况, 本研究于 2019 年 4 月至 2020 年 3 月在宁明、靖西等 8 个中越边境口岸地区设置蚊媒监测点^[7], 开展蚊媒监测及病毒感染检测, 从采自宁明县爱店口岸附近的蚊虫标本中分离到 1 株 NDiV, 关于该病毒的分离鉴定和全基因组特征报告如下。

材料与方 法

1 标本采集

于 2019 年 4 月至 2020 年 3 月在距爱店口岸约 600 m 的爱店村开展蚊媒监测, 监测生境为市场、人房、猪舍和稻田, 上述 4 种生境各放置 1 盏“功夫小帅”诱蚊灯 (武汉吉星科技有限公司生产), 捕获时间从当日的 19:30 开始, 到次日 7:30 结束, 共计 12 h, 每月开展 2 次, 共 24 次。监测时间选择在气候为“晴”或“阴”天, 且两次监测间隔不少于 15 d。

2 标本处理

采集的蚊虫置于 -20 °C 冰箱冷冻处死, 在冰排上剔除雄蚊, 再对雌蚊进行蚊种鉴别, 并按每管 50~80 只分装入冻存管中, 编号后保存在 -80 °C 冰箱, 待监测项目结束, 再通过液氮冷冻运输到本实验室开展病毒分离。

3 病毒分离

上述蚊虫标本采用组织研磨仪 (天根公司生产) 进行研磨, 获得的研磨液使用高速冷冻离心机 (Sigma 公司生产) 以 20 000 g 离心 30 min, 取上清, 再用 0.22 μm 无菌针头过滤器 (Jet Biofil 公司生产) 过滤, 取 100 μL 接种于生长至 70%~80% 单层细胞的 C6/36 和 BHK21 进行病毒分离, 按文献^[8]的方法操作。上述两种细胞系均由中国疾病预防控制中心病毒所虫媒室提供。

4 cDNA 合成

采用 QIAamp Viral Mini Kit (Qiagen 公司生产) 提取阳性分离物的病毒 RNA, 按照试剂说明书操作, 获得的病毒 RNA 提取物保存于 -80 °C 冰箱。采用 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Takara 公司生产) 合成 cDNA, 按照试剂说明书操作。

5 基因组测序和序列分析

获得的 cDNA 产物委托广州微远基因科技有限公司采用二代测序技术进行基因组测序。获得的核苷酸序列利用 DNASTAR 软件包中的 Editseq 软件识别全基因组的开放读码框 (ORF) 和非编码区, 利用

Bioedit 7.0 软件进行核苷酸序列编辑和多序列同源性比对。利用 Mega X 软件按照邻接法 (Neighbor-joining) 构建系统进化树, Bootstrap Test 重复 1000 次。

结 果

1 病毒分离

将蚊虫标本研磨液接种 C6/36 和 BHK21 细胞进行病毒分离, 经传代观察, 仅 1 批次研磨液在接种 C6/36 细胞后出现了明显的病变, 该批次蚊虫标本为三带喙库蚊, 于 2019 年 6 月采集自爱店村的猪圈, 但其接种的 BHK21 细胞并未出现明显病变。收集上述 C6/36 细胞阳性分离物, 并将该毒株命名为 Ad2019035sd。

2 全基因组测序分析

毒株 Ad2019035sd 的 cDNA 产物送广州微远基因技术有限公司进行基因组测序, 结果显示该毒株基因组总长为 20 078 个核苷酸 (Nucleotide, Nt), 且 NDiV 覆盖率为 99.80%, 表明该毒株应为 Nam Dinh 病毒。采用 Editseq 软件识别序列的 ORF 和非编码区, 该毒株基因组序列包括 5' 非编码区、至少 6 个 ORF 区以及 3' 非编码区。其核苷酸位置如下: 5' 非编码区 1-319Nt, ORF1a 320-7828Nt, ORF1b 7789-15594Nt, ORF2a 15619-18315Nt, ORF2b 15633-16268Nt, ORF3 18363-18836Nt, ORF4 18715-19062Nt, 3' 非编码区 19063-20078 Nt。其中 3' 非编码区不含 Poly(A) 尾。

3 核苷酸和氨基酸同源性比较

从 GenBank 上下载 Mesoniviridae 病毒科参考毒株的全基因组序列, 比对显示毒株 Ad2019035sd 与参考毒株的全基因组核苷酸同源性在 57.9%~98.9% 之间, 其中与 NDiV 的深圳毒株 SZ11706Z 同源性为 98.9%, 与越南毒株 02VN178 的同源性为 98.7%, 与 Ofaie 病毒的同源性为 57.9%。比较毒株 Ad2019035sd 与参考毒株的重要蛋白 (包括与病毒复制相关的蛋白 3CL^{pro}、RdRp、HEL1、ExoN、NMT、OMT 及结构蛋白 S 和 N) 的编码基因核苷酸及其氨基酸的同源性, 在 3CL^{pro} 分别为 66.4%~98.8% 和 68.2%~99.2%, 在 RdRp 分别为 68.0%~99.1% 和 69.7%~99.1%, 在 HEL 分别为 70.3%~98.9% 和 73.7%~99.5%, 在 ExoN 分别为 62.5%~98.9% 和 58.4%~98.8%, 在 NMT 分别为 67.6%~99.5% 和 60.9%~100.0%, 在 OMT 分别为 66.7%~99.5% 和 47.0%~99.1%, 在 S 蛋白分别为 56.7%~99.0% 和 40.0%~99.1%, 在 N 蛋白分别为 60.7%~99.5% 和 54.4%~99.5%。毒株 Ad2019035sd 与参

考毒株的重要蛋白的编码基因核苷酸及其氨基酸同源 性最高均为 NDiv,最低均为 Ofaie 病毒(表 1)。

表 1 Ad2019035sd 毒株与 Mesoniviridae 科其他参考毒株全基因组和主要蛋白的同源性比较
Table 1 Comparison of complete genome and main proteins between the strain Ad2019035sd and other reference strains of Mesoniviruses

毒株 Strain	全基因组 Complete Genome	主要蛋白 Main Protein							
		3CL ^{pro} (4508-5311) ^a	RdRp (9337-11007) ^a	HEL1 (12136-13347) ^a	ExoN (13372-14169) ^a	NMT (14170-14871) ^a	OMT (14872-15594) ^a	S (15619-18315) ^a	N (15633-16268) ^a
Ad2019035sd	20078 ^d	804(268) ^b	1671(557) ^b	1212(404) ^b	807(269) ^b	699(233) ^b	723(241) ^b	2700(899) ^b	639(212) ^b
NiDV(SZ11706Z)	98.9 ^e	98.7(99.2) ^c	98.9(99.1) ^c	98.9(99.5) ^c	98.9(98.8) ^c	99.5(100.0) ^c	99.3(99.1) ^c	99.0(99.1) ^c	99.5(99.5) ^c
NiDV(02VN178)	98.7 ^e	98.8(98.8) ^c	99.1(99.1) ^c	98.8(99.5) ^c	98.8(98.4) ^c	98.7(99.1) ^c	99.1(98.7) ^c	98.7(98.1) ^c	98.7(98.5) ^c
Houston virus/KC807176.1	97.4 ^e	98.0(98.8) ^c	98.1(98.9) ^c	98.6(99.5) ^c	98.8(98.8) ^c	98.1(98.7) ^c	97.3(98.7) ^c	96.7(97.1) ^c	96.8(95.3) ^c
Cavally virus/NC_015668.1	90.6 ^e	90.7(95.8) ^c	92.3(97.4) ^c	92.0(98.0) ^c	92.6(94.7) ^c	92.5(94.0) ^c	92.1(95.4) ^c	90.8(87.9) ^c	89.2(91.1) ^c
Dianke virus/NC_036586.1	89.7 ^e	90.2(90.6) ^c	89.4(94.2) ^c	91.9(95.2) ^c	93.9(94.7) ^c	91.0(94.4) ^c	92.5(96.6) ^c	91.7(90.7) ^c	91.1(91.5) ^c
Dak Nong virus/NC_038297.1	81.8 ^e	83.0(89.5) ^c	87.2(92.1) ^c	85.0(93.3) ^c	83.3(83.4) ^c	82.3(83.3) ^c	85.7(87.1) ^c	86.9(85.9) ^c	78.1(76.6) ^c
Karang Sari virus/NC_038296.1	78.6 ^e	83.4(89.5) ^c	86.5(91.2) ^c	87.4(95.2) ^c	86.0(86.0) ^c	82.6(81.1) ^c	84.7(85.8) ^c	79.2(73.6) ^c	71.0(65.0) ^c
Bontang virus/KC807167.1	78.5 ^e	82.2(84.7) ^c	87.1(91.0) ^c	85.5(93.3) ^c	83.5(83.8) ^c	83.1(81.1) ^c	83.8(83.4) ^c	79.2(72.1) ^c	72.0(64.6) ^c
Hana virus/NC_020899.1	82.5 ^e	82.8(89.5) ^c	83.7(86.5) ^c	85.5(88.3) ^c	85.8(87.5) ^c	86.3(89.7) ^c	80.3(76.4) ^c	85.3(81.9) ^c	79.4(78.7) ^c
Casuarina virus/NC_023986.1	76.7 ^e	79.7(84.7) ^c	85.6(83.2) ^c	81.1(89.6) ^c	81.9(83.8) ^c	76.4(79.0) ^c	77.4(76.7) ^c	75.8(70.5) ^c	73.1(69.3) ^c
Nse virus/NC_020901.1	69.1 ^e	73.0(79.1) ^c	76.1(80.1) ^c	72.1(78.7) ^c	75.2(68.9) ^c	70.2(68.3) ^c	75.7(71.0) ^c	70.2(62.5) ^c	67.0(59.2) ^c
Kadiweu virus/NC_043488.1	60.9 ^e	67.1(70.5) ^c	72.2(74.3) ^c	73.8(77.2) ^c	68.9(63.9) ^c	67.3(60.4) ^c	68.3(64.0) ^c	60.1(49.8) ^c	61.5(54.5) ^c
Ofaie virus/NC_043489.1	57.9 ^e	66.4(68.2) ^c	68.0(69.7) ^c	70.3(73.7) ^c	62.5(58.4) ^c	67.6(60.9) ^c	66.7(47.0) ^c	56.7(40.0) ^c	60.7(54.4) ^c

注:a 核苷酸起止位置;b 核苷酸数(氨基酸数);c 核苷酸同源性百分比(氨基酸同源性百分比);d 全基因组核苷酸总数;e 全基因组核苷酸同源性百分比。

Notes:a-(start position and end position of Nucleotide);b-Nucleotide number (amino acid number);c-percent of nucleotide sequence homology (percent of amino acid sequence homology).

4 进化分析

4.1 基于全基因组的进化分析 以 Mesoniviridae 病毒科的代表株为参考,构建基于全基因组的系统进化树(图 1),结果显示毒株 Ad2019035sd 与 NDiv、Houston 病毒、cavally 病毒和 Dianke 病毒在同一分支上,与深圳毒株 SZ11706Z 和越南毒株 02VN178 处于同一个小分支,表明该病毒与 NDiv 之间的亲缘性更近。

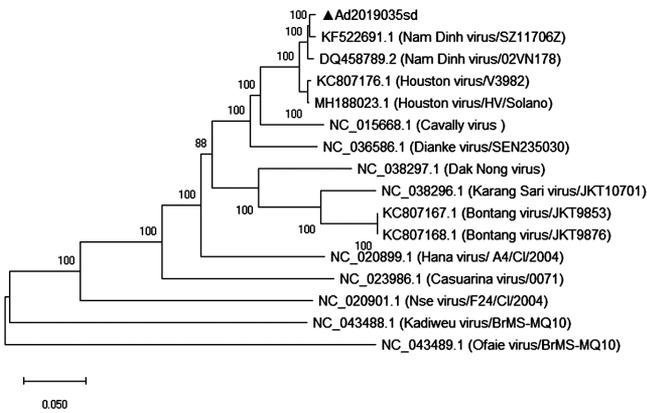


图 1 基于全基因组的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on the complete genome of Mesoniviridae

4.2 基于 RDRP 和 S 基因的进化分析 RDRP 蛋白在病毒的复制与生存起着关键作用^[9],而 S 蛋白又是套式病毒目中相对保守的区域^[3,6]。以该病毒目的冠状病毒科(Coronaviridae)、杆状套病毒科(Roniviridae)、动脉炎病毒科(Arteriviridae)以及 Mesoniviridae 病毒科成员的代表株为参考(序列均来自于 Gen-

Bank)构建基于 RDRP 和 S 基因的系统进化树,结果见图 2 和图 3。RDRP 系统进化树显示毒株 Ad2019035sd 与 NDiv、Houston 病毒、Cavally 病毒和 Dianke 病毒在同一进化分支上,S 基因系统进化树显示该毒株与 NDiv、Houston 病毒、Cavally 病毒、Dianke 病毒、Dak Nong 病毒以及 Hana 病毒在同一进化分支上,且两系统进化树均显示毒株 Ad2019035sd 与 NDiv 的深圳毒株 SZ11706Z 和越南毒株 02VN178 处于同一个小分支上,进一步表明 Ad2019035sd 与 NDiv 具有更近的亲缘性。

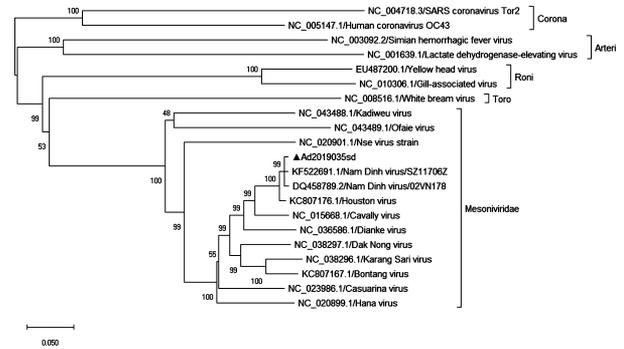


图 2 基于 RDRP 的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on RDRP and S gene of Nidovirus

讨论

本研究采用 C6/36 和 BHK21 细胞系进行蚊媒病毒分离,分离的毒株 Ad2019035sd 仅对 C6/36 细胞系敏感,对 BHK21 细胞系不敏感。将该毒株的 cDNA 产物进行二代测序,结果显示该毒株的 NDiv 覆盖率为 99.80%。通过软件拼接获得全基因组序列,再与

Mesoniviridae 科代表株进行核苷酸和氨基酸同源性比较,结果显示均为与 NDiV 深圳毒株 SZ11706Z 的同源性最高,其次是 NDiV 越南毒株 02VN178,最低是 Ofaie 病毒。全基因组、RDRP 和 S 基因系统进化树均显示毒株 Ad2019035sd 与两株 NDiV 毒株的亲缘性更近,这也进一步证实毒株 Ad2019035sd 应为 NDiV。

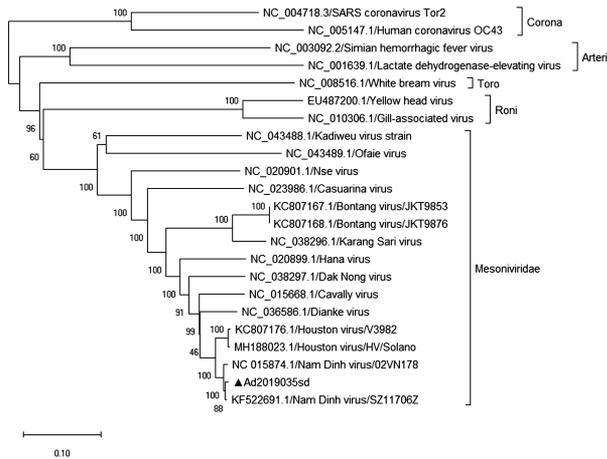


图 3 基于 S 基因的系统进化树
Fig. 3 Phylogenetic tree based on S gene of Nidovirus

2012 年深圳市龙岗区疾控中心从当地的致倦库蚊标本中分离到 4 株 NDiV^[4],此后进一步开展了全基因组和超微结构分析^[10]。赵秋敏等^[5]于 2009 年从云南省采集的三带喙库蚊中分离并鉴定了云南省首株 NDiV,雷雯雯等^[6]从云南中老缅边境的致倦库蚊、三带喙库蚊和杂蚊标本中分离到 3 株 NDiV。本研究中的毒株 Ad2019035sd 为广西地区首株 NDiV,分离自猪圈中采集的三带喙库蚊,但其分离地点在地理位置上具有一定的特殊性;位于宁明县爱店口岸附近,且两地相距仅 600 m。此前在广西的桂平、北流和靖西设置蚊媒监测点,持续进行了为期 5 年的蚊媒监测,采集了大量的蚊虫标本进行蚊媒病毒分离和检测,但均未分离到 NDiV。宁明县的爱店口岸监测点与上述 3 个监测点在气候、环境及蚊虫分布上大致相同,但地理位置稍有不同,前者位于中越边境口岸地区附近,推测边境口岸地区因两国人员、物品来往频繁,其蚊虫所携带的病原可能存在差异,因此为防范因重要媒介生物比如蚊虫、蠓、蝙蝠等携带越南特有的病原而发生输入性疾病,在边境口岸地区设置监测点,开展相关病原监测研究对广西传染性疾病的防控具有重要意义。

NDiV 最初从越南急性脑炎患者的脑脊液中分离到,但此后并无该病毒感染人或动物的报道。为明确 NDiV 是否感染人及其在广西地区内的感染情况,可采集相关急性脑炎患者的脑脊液标本,开展 NDiV 分离和核酸检测,也可以该毒株为基础,进一步研发该病毒抗体检测试剂,用来评估全人群感染情况及其抗体水平。广西地区大部分急性脑炎病例的致病病原不明,当发生不明原因急性脑炎疫情,特别是中越边境口岸地区,建议在进行疫情调查和处置时将 NDiV 作为病原之一开展相关实验室检测。

【参考文献】

[1] Lauber C, Ziebuhr J, Junglen S, et al. Mesoniviridae: a proposed new family in the order Nidovirales formed by a single species of mosquito-borne viruses [J]. Arch Virol, 2012, 157 (8): 1623-1628.
[2] Nga PT, Thuy NT, Morita K, et al. Emerging viruses associated with acute encephalitis syndrome in Vietnam [A]. Scientific Conference of the re-emerging viral infectious [C]. National Institute of Hygiene and Epidemiology Hanoi, 2006.
[3] Nga PT, Parquet Mdel C, Lauber C, et al. Discovery of the first insect nidovirus, a missing evolutionary link in the emergence of the largest RNA virus genomes [J]. PLoS Pathog, 2011 (7): e1002215.
[4] 刘渠, 林琳, 周健明, 等. 中国国内首次发现 Nam Dinh 病毒 [J]. 病毒学报, 2013, 29(1): 1-6.
[5] 赵秋敏, 郭晓芳, 曾旭灿, 等. 云南省 Nam Dinh 病毒的首次鉴定 [J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2016, 23(2): 91-97.
[6] 雷雯雯, 郭晓芳, 付士红, 等. 中老缅边境蚊虫标本中 Nam Dinh 病毒的分离和鉴定 [J]. 病毒学报, 2016, 32(6): 782-789.
[7] 梁亮, 陈世毅, 农长挥, 等. 广西中越边境口岸地区 1 株乙型脑炎病毒全基因组特征分析 [J] 中国病原生物学杂志. 2021, 16(7): 841-844.
[8] Feng Y, Fu SH, Zhang HL, et al. Distribution of mosquitoes and mosquito-borne viruses along the China-Myanmar border in Yunnan Province [J]. Jpn J Infect Dis, 2012, 65(3): 215-221.
[9] Wilson J A, Jayasena S, Khvorova A, et al. RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replicons propagated in human liver cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA. 2003, 100(5): 2783-2788.
[10] Zhou JM, Jin YJ, Chen YJ, et al. Complete genomic and ultrastructural analysis of a Nam Dinh virus isolated from *Culex pipiens quinquefasciatus* in China [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 271-277.

【收稿日期】 2022-04-14 【修回日期】 2022-07-01