

DOI: 10.3969/cjz.j.issn.1002-2694.2014.08.004

家养野猪脑心肌炎病毒的分离、 鉴定及全基因组序列分析

常洪涛¹, 刘慧敏², 赵军¹, 陈陆¹, 杨霞¹, 王新卫¹, 姚惠霞¹, 王川庆¹

摘要:目的 分离家养野猪脑心肌炎病毒(Encephalomyocarditis virus, EMCV), 作全基因组序列测定及与相关物种同源性比较。方法 用改进的“细胞接种与 RT-PCR 方法相结合”技术, 成功分离到国内首株家养野猪 EMCV JZ1202 株, 并对其全基因组序列进行测定和分子特征分析。结果 分离毒的基因组全长为 7 735 bp, 与国内外不同动物源 EMCV 参考毒株的核苷酸同源性为 81.2%~99.9%, 与国内猪源 EMCV 分离毒的同源性高达 99.4% 以上。基于 EMCV 全基因组、ORF 和 VP1 基因序列绘制的系统发育进化树显示, EMCV 可分为 G1、G2 和 G3 3 个群, JZ1202 株与其他国内参考毒株同属于 G1 群。结论 结果证实, 家养野猪可感染 EMCV 并引起发病, 提醒作野生动物养殖要考虑 EMCV 的传播; EMCV 存在较大的地域差异, 在家养野猪和鼠之间可能存在着交叉感染; EMCV 在感染家养野猪时可能发生个别氨基酸突变, 以适应不同的猪种。

关键词: 脑心肌炎病毒; 家养野猪; RT-PCR; 全基因组; 分子特征分析

中图分类号: R373

文献标识码: A

文章编号: 1002-2694(2014)08-0793-04

Isolation, identification and full-length genome sequence of EMCV from domesticated boar

CHANG Hong-tao¹, LIU Hui-min², ZHAO Jun¹, CHEN Lu¹, YANG Xia¹,
WANG Xin-wei¹, YAO Hui-xia¹, WANG Chuan-qing¹

(1. College of Animal Husbandry and Veterinary, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

ABSTRACT: Encephalomyocarditis virus (EMCV), named JZ1202, was isolated from domesticated boar in Henan, China. We performed the full-length genome sequencing and molecular characteristic analysis of the isolated strain. Results showed that the full-genome sequence of EMCV JZ1202 generated a sequence of 7 735 bp in length, and had 81.2%-99.9% nucleotide identity with other reference strains from different animals, but 99.4% with Chinese reference from pig. The phylogenetic tree was constructed based on the full-length genome; ORF and VP1 gene sequences identified EMCV was divided into G1, G2 and G3 groups; the strain JZ1202 belongs to G1 with other Chinese reference strains. Results identified that the EMCV infection could cause severe clinical symptoms in domesticated boar. Big regional differences exist in EMCV and the transmission is limited in a range of area. However, cross infection and prevalence of EMCV disease between domesticated boar and mice might exist. Mutation of some amino acid may occurred in EMCV infected domesticated boar.

KEY WORDS: encephalomyocarditis virus; domesticated boar; RT-PCR; full-length genome; molecular analysis

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31272567)

Corresponding author: Wang Chuan-qing, Email: wchuanq@163.com

脑心肌炎病毒(Encephalomyocarditis virus, EMCV)是一种重要的人畜共患疫病病原^[1], 属小 RNA 病毒科、心病毒属, 可以感染猪、野生动物、啮

齿动物和灵长类动物等^[2-3], 近年来人感染发病也时有发生^[4-5]。自然条件下, 鼠类是 EMCV 的自然贮存宿主和传播者^[6-7], 但其感染最广泛和最严重的动物是猪, 临床上主要引起母猪繁殖障碍及断奶仔猪的脑炎、心肌炎和急性死亡等^[8-9]。自 1958 年巴拿马猪群中首次发生疫情以来, 许多国家相继报道了

国家自然科学基金(No. 31272567)资助

通讯作者: 王川庆, Email: wchuanq@163.com

作者单位: 1. 河南农业大学牧医工程学院, 郑州 450002;

2. 中国科学院动物研究所, 北京 100101

该病的存在和发生。中国自 2005 年从疑似病死猪体内成功分离到首株 EMCV 并作较多研究^[10-17]。特对家养野猪 EMCV 河南株进行分离、鉴定和全基因组测序解析,以期了解不同猪种对 EMCV 的易感情况。

1 材料与方法

1.1 病料采集和病毒的分离鉴定 2012 年 5 月收集河南省焦作市某养猪场送检的疑似发病家养野猪的心脏、淋巴结和脾脏等标本, -20 °C 冻存待用。病毒分离、电镜观察和初步鉴定等工作均参考盖新娜等^[10]的方法进行。

1.2 RT-PCR 及测序 取分离毒的细胞培养液,使用 TRIZOL 提取总 RNA。参考文献^[18]中的各片段特异性引物和反应条件,分别进行 RT-PCR 扩增、基因克隆和序列测定。并应用 Chromas2.33 软件进行拼接,获得全基因组序列。

1.3 同源性比较与系统进化分析 运用 MegAlign 程序,将分离毒全基因组序列与 19 株从 NCBI GenBank 搜集下载的 EMCV 参考毒株的基因序列及其推导的氨基酸序列进行同源性分析,并构建系统进化树。

2 结果

2.1 病毒分离及鉴定 从疑似病料组织中成功分离到 1 株家养野猪 EMCV,命名为 JZ1202 株。在透射电镜下可以清晰观察到数个形状规则,直径大小约为 25~29 nm 的圆形病毒粒子(图 1)。1~4 代分离毒细胞培养物的 TCID₅₀ 经测定,分别为 10^{-6.32}/0.1 mL、10^{-5.9}/0.1 mL、10^{-7.42}/0.1 mL 和 10^{-7.63}/0.1 mL;分离毒经终浓度为 4.8% 分析纯氯仿处理后,其 TCID₅₀ 为 10^{-5.78}/0.1 mL,略低于对照组的 10^{-7.63}/0.1 mL,但仍可判定为不敏感;分离毒经 1% 胰蛋白酶溶液 37 °C 消化 1 h 后,其 TCID₅₀ 由 10^{-7.63}/0.1 mL 降低到 10^{-3.94}/0.1 mL,说明对胰蛋白酶较为敏感;病毒液在 pH3.0 的酸性环境中

作用 1 h 后,其 TCID₅₀ 由 10^{-7.63}/0.1 mL 降低到 10^{-3.53}/0.1 mL,表明该分离毒不耐酸;将分离毒分别置于 37 °C、50 °C、60 °C 和 70 °C 时处理 1 h,发现 37 °C 时病毒滴度并无明显变化,50 °C 时其 TCID₅₀ 由 10^{-7.18}/0.1 mL 降低至 10^{-4.25}/0.1 mL,60 °C 时已完全失活,失去感染力,从而表明该分离株对热敏感;将分离株置于 1.1 mol/L MgCl₂ 溶液中 50 °C 水浴 1 h,测定 TCID₅₀ 为 10^{-4.32}/0.1 mL,与对照组的 10^{-3.99}/0.1 mL 差异不明显,说明二价阳离子对分离毒并未有保护作用。

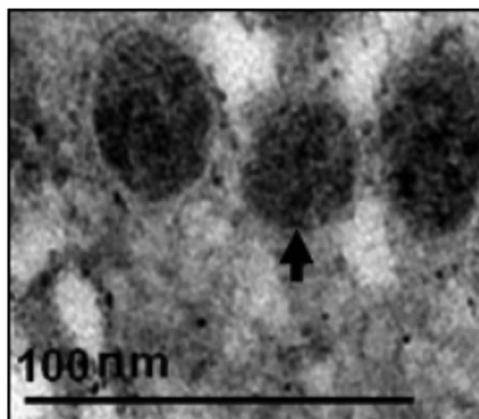


图 1 JZ1202 株感染 BHK-21 超微形态电镜图

Fig. 1 Ultrastructural morphologic features of JZ1202 strain-infected BHK-21 cells collections of picornavirus particles

2.2 病毒基因组序列及结构分析 通过序列拼接, JZ1202 株的基因组全长为 7 735 bp (GenBank: KF836387),其中 5'-UTR 包含 724 bp,3'-UTR 包含 132 bp,中间为一个大的 ORF(6 879 bp)编码的由 2 292 个氨基酸组成的多聚蛋白,该多聚蛋白可切割成 1 个病毒自身编码的前导蛋白(L)和 11 个蛋白终产物(1A~1D、2A~2C 和 3A~3D)(图 2)。

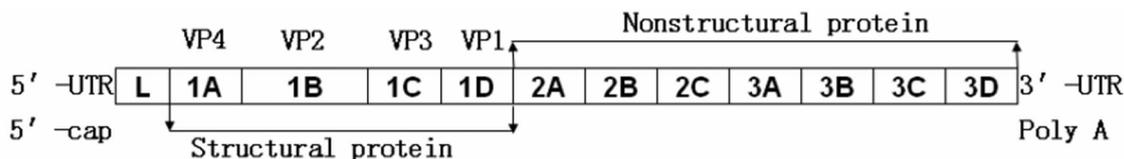


图 2 JZ1202 株的全基因组结构图

Fig. 2 Full-length genome feature of JZ1202 strain

2.3 病毒全基因组及各基因片段的同源性比较 全基因组序列分析结果表明, JZ1202 株与国内外不同动物源 EMCV 参考毒株的核苷酸同源性为 81.2%~99.9%,其中与国内猪源分离毒(GXLC、GX0601、BJC3、HB1、NJ08 和 BD2)的同源性高达 99.4% 以上,与韩国猪源分离毒(CBNU、K3 和

K11)和欧美猪源分离毒(PV21、EMC-D、D variant 和 EMCV-30)的同源性分别为 99.4%~99.6% 和 83.6%~99.3%,与国内(GX0602)、外(PEC9 和 Rz-pMwt)鼠源毒株的同源性分别为 99.4% 和 81.3%~99.5%。进而与参考毒株 ORF 和各基因片段的核苷酸、氨基酸序列比对分析,发现 JZ1202

株结构蛋白中,VP1 变异幅度最大,VP2 最为保守;非结构蛋白中,2A 变异幅度最大,3D 最为保守;非结构蛋白编码区相比结构蛋白编码区较为保守。将 VP1 蛋白与国内猪源 EMCV 比较后发现,氨基酸变异多发生在 7~63 位,7 位由 K→R,13 位与 GX-LC 均由 A→T,63 位与 BD2、BJC3、HB1 均为 Q,不同于 GX0601 和 GCLX 的 G。

2.4 病毒系统进化分析 基于 JZ1202 株全基因组、ORF 和 VP1 基因序列绘制的系统发育进化树显示(图 3),可见 EMCV 分为 G1、G2 和 G3 3 个群。猪源 EMCV 主要分布在 G1 群和 G2 群,鼠源 EMCV 在 G1 群和 G3 群中均有分布。JZ1202 株与 HB1 亲缘关系最近,并与国内的良好猪源、鼠源和华南虎源 EMCV 同属于 G1 群。

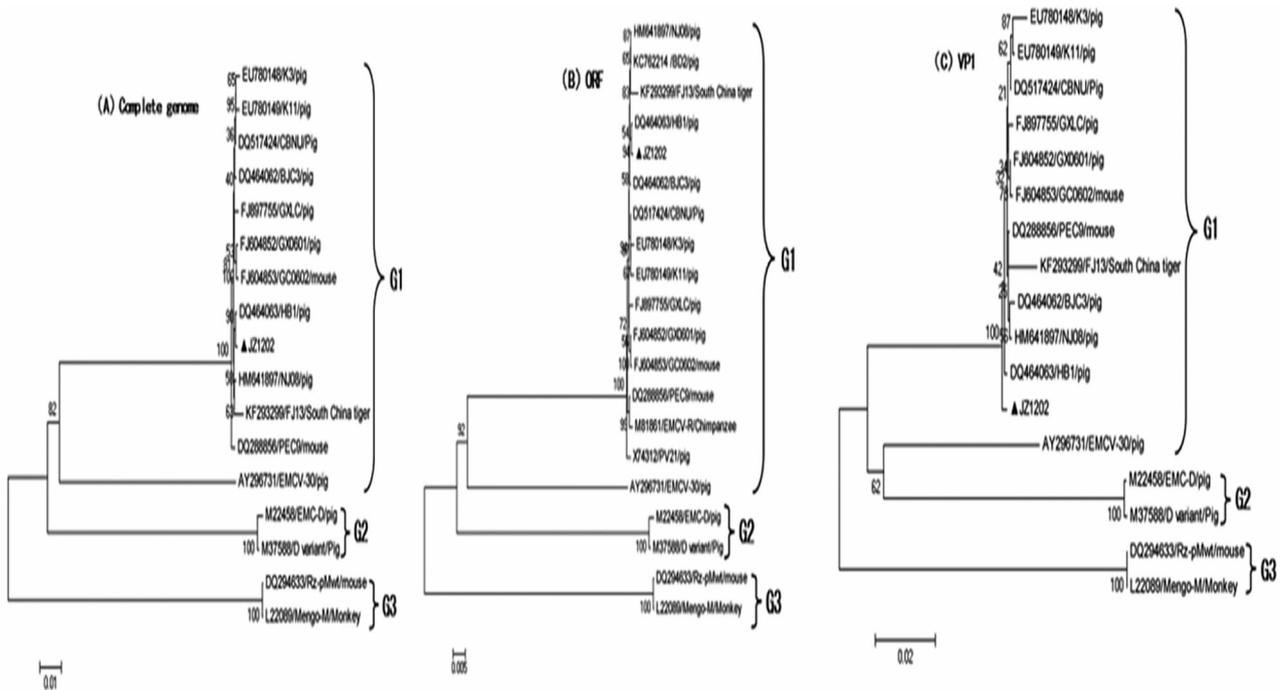


图 3 基于 JZ1202 株全基因组(A)、ORF(B)和 VP1 基因(C)核苷酸序列的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic trees based on JZ1202 strain complete genome (A), ORF (B) and VP1 gene (C) nucleotide sequences

3 讨论

据统计,目前感染人的病原体中 60% 属于人兽共患病,而这些病原体 71% 以上源于野生动物。近年来,野猪及相关产品作为绿色食品的重要来源之一,因其独特的营养价值和风味而日益备受青睐,国内各地都在进行野猪资源的开发利用,如野猪家养或作为父本经济杂交以满足人们的消费需求。但随之而来的问题是,由于野生生态环境改变,接触家猪机会频繁以及屠宰、加工、消费环节中存在的风险因素,都使得野猪携带多种病原体并感染家畜和人类变成可能。国内已分离到多株良种猪源 EMCV,但有关家养野猪源 EMCV 的研究尚未见报道,因此开展其分离、鉴定和遗传演化工作,可为研究 EMCV 的分子流行病学特征、分子生态学、疫苗毒株筛选和制定综合防控措施提供科学依据。

JZ1202 株分离自家养野猪,通常情况下该猪种抗病力极强,而该毒株的成功分离证实 EMCV 可感染家养野猪并导致发病,但其是否来源于良种猪或

是由于传统饲养模式改变而导致的自身内源感染,则有待进一步研究。另外,EMCV 在疑似病料组织中的含量很低,生产中也多表现为亚临床感染,因此病毒的直接分离、鉴定等工作难以直接开展。笔者曾多次尝试应用常规 RT-PCR 方法从病料中直接检测 EMCV,但从未获得成功。由于猪瘟病毒(SCFV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRS)、猪圆环病毒(PCV)、猪伪狂犬病毒(PRV)和猪细小病毒(PPV)等多种猪重要病毒性病原均无法在 BHK-21 细胞上增殖,而 EMCV 接种后则很快能出现明显细胞病变(CPE)。因此,作者先将疑似病料处理后接种 BHK-21 细胞,一旦出现 CPE 后再用 RT-PCR 方法进行检测,最终成功分离到国内首株家养野猪源 EMCV。这种改进的“细胞接种与 RT-PCR 方法相结合”技术,一方面可利用细胞接种技术进行初步鉴定,另一方面则大幅提高了病料组织中 EMCV 的检出率和分离率。

开展不同猪种 EMCV 地方分离株的基因组序

列测定与分析,对丰富病毒流行病学资料和研究病毒结构与功能的关系至关重要。本研究成功获得 JZ1202 株全基因组序列,分析结果表明,该病毒与国内猪源 EMCV 分离毒株高度同源,说明可能彼此间交叉感染或具有共同感染来源,从而提醒我们在进行野生动物养殖活动中要充分考虑到人兽共患疫病传播的生态学。另外,该毒株与韩国分离株的亲缘关系较近,与绝大多数欧美分离株的亲缘关系较远,但与德国分离株 X74312 的同源性高达 99.3%,从而提示 EMCV 存在较大的地域差异,但传播应有一定范围内的区域限制性,日益发达的国际交通和贸易可能会加速 EMCV 的扩散。

现有研究表明,EMCV 在猪只之间传播能力有限,而鼠类等啮齿目动物在猪群 EMCV 的传播过程中具有重要作用。在本研究中,JZ1202 株与国内鼠源毒株的同源性高达 99.6%,亲缘关系极近,从而提示 EMCV 在家养野猪和鼠之间可能存在着交叉感染与传播,但要鼠在 EMCV 传播中的精确定位仍需做进一步研究,而做好猪场内及周边的灭鼠工作,却无疑会对有效防控猪 EMCV 感染至关重要。

VP1 基因是 EMCV 基因组中最重要的中和性抗原表位所在区域,变异幅度最大,其氨基酸序列与致病性密切相关,因此对其开展相关研究最具价值。本研究通过对 JZ1202 株与国内猪源参考毒株的全基因组、ORF 和各基因片段进行比较,发现彼此间尽管同源性很高,但 VP1 蛋白已出现细微变异,提示 EMCV 在感染家养野猪时可能会发生个别氨基酸的突变,以适应新的猪种。

参考文献:

[1] Zimmerman J, Allaire SD, Taylor DJ. Disease of swine[M]. 9th ed. Oxford: Blackwell Publishing Professional, 2006: 331-336.

[2] Liu HM, Yan Q, Zhao B, et al. Isolation, molecular characterization, and phylogenetic analysis of *encephalomyocarditis* virus from South China tigers in China[J]. *Infect Genet Evol*, 2013, 19: 240-243. DOI: 10.1016/j.meegid.2013.07.023

[3] Yuan WZ, Song QY, Zhang XY, et al. Isolation and molecular analysis of porcine *encephalomyocarditis* virus strain BD2 from northern China[J]. *Infect Genet Evol*, 2014, 21: 303-307. DOI: 10.1016/j.meegid.2013.11.014

[4] Deutz A, Fuchs K, Nowotny N, et al. Sero-epidemiological studies of zoonotic infections in hunters-comparative analysis with veterinarians, farmers, and abattoir workers [J]. *Wien Klin Wochenschr*, 2003, 115(3): 61-67.

[5] Oberste MS, Gotuzzo E, Blair P, et al. Human febrile illness caused by *encephalomyocarditis* virus infection. Peru[J]. *Emerg Infect Dis*, 2009, 15: 640-646. DOI: 10.3201/eid1504.081428

[6] Seaman JT, Boulton JG, Carrigan MJ. *Encephalomyocarditis* virus disease of pigs associated with a plague of rodents[J]. *Aust Vet J*, 1986, 63: 292-294. DOI: 10.1111/j.1751-0813.1986.

tb08069. x

[7] Billinis C. *Encephalomyocarditis* virus infection in wildlife species in Greece[J]. *J Wild Dis*, 2009, 45(2): 522-526.

[8] Gelmetti D, Meroni A, Brocchi E, et al. Pathogenesis of *encephalomyocarditis* experimental infection in young piglets; a potential animal model to study viral myocarditis[J]. *Vet Res*, 2006, 37: 15-23. DOI: 10.1051/vetres;2005041

[9] Bai J, Jiang FK, Li YF, et al. Analysis of the complete sequence of a porcine *encephalomyocarditis* virus isolate NJ08 from China [J]. *Chin J Prev Vet Med*, 2011, 33(5): 402-404. (in Chinese) 白娟, 蒋康富, 李玉峰, 等. 猪脑心肌炎病毒 NJ08 株基因组序列测定与分析[J]. *中国预防兽医学报*, 2011, 33(5): 402-404.

[10] Ge XN, Yang HC, Guo X, et al. Isolation and characterization of porcine *encephalomyocarditis* virus [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2007, 38(1): 59-65. (in Chinese) 盖新娜, 杨汉春, 郭鑫, 等. 猪脑心肌炎病毒的分离与鉴定[J]. *畜牧兽医学报*, 2007, 38(1): 59-65.

[11] Zhang GQ, Ge XN, Guo X, et al. Genomic analysis of two porcine *encephalomyocarditis* virus strains isolated in China [J]. *Arch Virol*, 2007, 152: 1209-1213. DOI: 10.1007/s00705-006-0930-9

[12] Zhang JL, Ge XN, Ma L, et al. Serological survey of EMCV infection in pigs on large-scale pig farms in China 2005-2006 [J]. *Chin J Vet Med*, 2007, 43(1): 7-9. (in Chinese) 张家龙, 盖新娜, 马良, 等. 规模化猪场脑心肌炎病毒的血清学调查[J]. *中国兽医杂志*, 2007, 43(1): 7-9.

[13] Zhao T, Zhang JL, Ge XN, et al. Comparative analysis virus isolates of the genomes of from porcine and *encephalomyocarditis* mouse origin [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2009, 40(6): 873-878. (in Chinese) 赵婷, 张家龙, 盖新娜, 等. 猪源和鼠源脑心肌炎病毒分离株基因组的比较分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2009, 40(6): 873-878.

[14] Chen JX, Shi KC, Huang SB, et al. Isolation of porcine *encephalomyocarditis* virus GXLC strain and analysis of the molecular characteristics of its 3D gene [J]. *Chin Ani Husb Vet Med*, 2011, 38(1): 81-87. (in Chinese) 陈进喜, 施开创, 黄胜斌, 等. 猪脑心肌炎病毒 GXLC 株的分离及其 3D 基因分子特征的分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2011, 38(1): 81-87.

[15] Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, et al. *Fields virology* [M]. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2001: 685-715.

[16] Suh YS, Ha SJ, Lee CH, et al. Enhancement of VP1-specific immune response and protection against EMCV-K challenge by co-delivery of IL-12 DNA with VP1 DNA vaccine [J]. *Vaccine*, 2001, 19(15-16): 1891-1898. DOI: 10.1016/S0264-410X(00)00443-6

[17] Koenen F, Vanderhallen H, Castryck F, et al. Epidemiologic, pathogenic and molecular analysis of recent *encephalomyocarditis* outbreaks in Belgium [J]. *Zentralbl Vet Med B*, 1999, 46(4): 217-231. DOI: 10.1111/j.0931-1793.1999.0_216.x

[18] Lin WC, Liu YB, Cui SJ, et al. Isolation, molecular characterization, and phylogenetic analysis of porcine *encephalomyocarditis* virus strain HB10 in China [J]. *Infect Genet Evol*, 2012, 12: 1324-1327. DOI: 10.1016/j.meegid.2012.04.008

收稿日期: 2013-11-29; 修回日期: 2014-04-21