

# 新型虫媒病毒—南定病毒的研究进展

王德全<sup>1</sup>, 刘渠<sup>2</sup>, 梁克峰<sup>1</sup>, 周健明<sup>2</sup>

1. 广东药学院, 广东 广州 510310; 2. 深圳市龙岗区疾病预防控制中心

**摘要:** 近年来新发传染病不断出现和流行, 其中虫媒病毒性疾病对人类健康的威胁正逐步增加。全球首株南定病毒是从越南一名脑炎患者脑脊液中分离得到的新型病毒, 并在致倦库蚊等多种库蚊中也发现了该病毒, 因分离该病毒的地点位于越南的南定(Nam Dinh)省, 2011 年日本科学家 Nga 将其命名为南定病毒。作者于 2013 年在国内首次从致倦库蚊中发现和分离了南定病毒。本文就新型虫媒病毒—南定病毒的特征和研究概况进行综述。

**关键词:** 虫媒病毒; 南定病毒; 特征

中图分类号: R383.35 文献标识码: A 文章编号: 1006-3110(2017)05-0638-04 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2017.05.037

## Research progress of new arbovirus virus – Nam Dinh virus

WANG De-quan\*, LIU Qu, LIANG Ke-feng, ZHOU Jian-ming

\* Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong 510310, China

**Abstract:** New infectious diseases are constantly emerging and prevailing in recent years, and arbovirus diseases threatened to human health are gradually increased. The first strain of Nam Dinh virus in the world is a new type of virus isolated in cerebrospinal fluid of a patient with encephalitis in Vietnam; moreover, it is also found in *Culex pipiens quinquefasciatus* and other *Culex* mosquitoes. A Japanese scientist, Nga names it Nam Dinh virus in 2012 because the location of separation of the virus is in Nam Dinh Province, Vietnam. The author discovers and isolates Nam Dinh virus in *Culex pipiens quinquefasciatus* for the first time in China in 2013. This paper reviews the characteristics of Nam Dinh virus and its research situation.

**Key words:** arbovirus; Nam Dinh virus; characteristic

目前, 感染性疾病仍是导致人们住院和死亡的重要原因。传统的传染病如结核、流感等没有被完全控制或又重新肆虐, 新的传染病正在不断出现和流行, 世界各国都面临着新老传染病的双重威胁。

2012 年英国由吸血昆虫(锥蝥)引发的致命疾病—恰加斯病(美洲锥虫病)呈现全球逐渐蔓延态势, 因感染者在患病初期与艾滋病患者症状类似, 有专家称该病为“新型艾滋病”; 同年, 美国遭遇史上同期最严重的西尼罗河病毒疫情。据美国疾病预防控制中心统计, 自 2012 年年初美国出现西尼罗河病毒疫情以来, 美国已有 48 个州报告病例; 2013 年国内部分地区流行了 H7N9 禽流感, 对人们生活和农业生产造成了巨大的影响; 2014 年埃博拉病毒感染疫情更引起人们的恐慌, WHO 公布的统计数字显示, 自 2014 年 2 月开始暴发于西非的大规模埃博拉疫情, 截至 2014 年 12 月 2 日几内亚、利比里亚、尼日利亚和塞拉利昂等西

非国家报告了疑似和可能感染病例 17 290 例, 其中 6 128 人死亡。

### 1 新发传染病及虫媒病毒

新发传染病(emerging infectious diseases, EIDs)一词最早于上世纪 90 年代初由美国国家科学院医学研究所提出, 该类疾病包括原已获得控制又“死灰复燃”的传染病、已知病原出现新的变异导致的新传染病和原本认为不传染的疾病。自上世纪 70 年代以来, 已经认定的 EIDs 已有 40 余种新发传染病, 而狭义的新发传染病一般仅指新发现的病原导致的传染病。据统计, 自 1940 年以来新发传染病发生率一直持续上升, 并在 20 世纪 80 年代达到了高峰。1940-2004 年全球共发现 335 种新发传染病, 其中 60.3% 由人畜共患病原体造成(71.8% 来自野生动物)。1990-2000 年发生的新发传染病病例数占过去 60 年总病例数的 52%。新发传染病中 3/4 以上为人兽共患病, 2/3 为动物源性疾病(zoonosis)。

我国 39 种法定传染病中, 属于新发传染病范畴的疾病共有 10 种, 如非典和高致病性禽流感等。近年流

**基金项目:** 广东省自然科学基金(2014A030313583)

**作者简介:** 王德全(1962-), 男, 黑龙江佳木斯人, 硕士, 教授, 研究方向: 病媒生物性疾病预防, E-mail: yxywdq@163.com。

行的新发传染病一般具有以下特点:1. 病原体以病毒为主,特别是动物源性病毒为主,中东呼吸综合征(Middle East respiratory syndrome, MERS)、埃博拉病毒病(Ebola virus disease, EVD)、登革热等均为病毒性疾病,同时也是虫媒性疾病和人兽共患性疾病,如埃博拉病毒的传播与当地居民食用猴、羚羊等野生动物有关<sup>[1-3]</sup>。MERS 是由 MERS 冠状病毒(MERS coronavirus, MERS-CoV)从动物宿主蝙蝠 MERS-CoV 传播而来,并有研究提示单峰骆驼可能参与 MERS-CoV 的跨种传播;2. 新发传染病在全球传播迅速,流行范围广。全球一体化进程加速使得国家间交往日益频繁,交通的便利也促进病原、媒介生物和感染者在不同国家和地区之间的流动,加速了疫情传播。

虫媒病毒(arbovirus)是指由吸血昆虫传播的病毒,其特点是病毒可在昆虫体内繁殖,但昆虫本身不发病,昆虫通过叮咬将病毒传播给人而引起人兽共患传染病。虫媒病毒分类众多,归属于 14 个病毒科,在国际虫媒病毒中心记载的已达 534 种,其中有 128 种为人兽共患病(viral zoonoses)病原体<sup>[4]</sup>。虫媒病毒性疾病分布主要集中于热带、亚热带和温带,大多具有地理分布特征。病毒的传播媒介主要以蚊和蜱,而约有 300 个蚊种能传播虫媒病毒,其中又以伊蚊(*Aedes mosquito*)和库蚊(*Culex mosquito*)为主<sup>[5]</sup>。病毒在自然界的循环主要通过昆虫媒介来实现,所以虫媒病毒病多为自然疫原性疾病(disease of natural focus)。

## 2 新型虫媒病毒—南定病毒

2.1 南定病毒的发现和命名 2011 年,日本科学家 Nga 等报告了全球首株新型虫媒病毒<sup>[7]</sup>,病毒是 2002 年从越南一名脑炎患者脑脊液中分离得到的新型病毒,因其分离地点位于越南的南定(Nam Dinh)省,故 2011 年将其命名为南定病毒(Nam Dinh virus, NDiV)。Zirkel 等<sup>[6]</sup>2011 年报告,在西非的科特迪瓦原始森林、种植农场、居民区等多个地点采集成蚊标本,从致倦库蚊等多种库蚊中发现新型病毒,并将其命名为 Cavally virus(CAVV),这是首篇新型昆虫病毒的研究报告。南定病毒分类上属于套式病毒目中冠状病毒科,其结构和套式病毒中其它病毒有很多相同之处,由于目前发现的套式病毒均为哺乳类和无脊椎动物病毒,而 NDiV 和 CAVV 属于一类病毒<sup>[8]</sup>。

NDiV 和 CAVV 均分离自昆虫节肢类动物,故 Nga 等将 NDiV 和 CAVV 归类为套式病毒目下的新家族,将该病毒科命名为 Mesoniviridae<sup>[10]</sup>,并已经向国际病毒命名委员会(International Committee for Nomenclature

of Viruses, ICNV)递交申请。

传统意义的套式病毒目(Nidovirales)包括冠状病毒科(Coronaviridae)、动脉炎病毒科(Arteriviridae)及罗尼病毒科(Roniviridae)。这些病毒基因结构与复制方式有共同之处,即这些病毒均采用套式系列的转录方式,通过 3' 端相同的亚基因组 mRNA 完成基因的表。该类病毒被认为是最复杂的单股正链 RNA 病毒<sup>[9]</sup>。在科特迪瓦与越南发现的套式病毒填补了套式病毒存在于节肢动物的空白。

已经有九种 Mesoniviruses 分离成功,包括在科特迪瓦分离到的 Cavally (CavV)、Hana (HanaV)、Meno (MenoV)、Nse(NseV) 和 Moumo(MoumoV),分别在越南、美国、印度尼西亚分离到的南定病毒,在越南分离到的 NDiV,在印度尼西亚分离到的 Bontag Baru virus (BBaV)和 Karang Sari virus (KSaV),在泰国分离到的 Kamphaeng Phet virus (KPhV)。Mesoniviruses 广泛分布在不同地理区域,并拥有较大的蚊种宿主范围,有观点认为南定病毒可能常见于世界各地的蚊群之中,提示在更多地方的蚊虫中存在发现南定病毒的可能。

2013 年,作者从广东省某医院监测点捕获的致倦库蚊成蚊标本中分离了南定病毒(NDiV),应用 C6/36 细胞成功地分离到病毒,通过基因测序分析,发现该南定病毒与 Phan Thi Nga 在越南分离的 NDiV 同源性达 99%以上,为我国首次对该病毒研究的期刊文献报告<sup>[11]</sup>。

2.2 南定病毒的结构和形态 南定病毒是目前最长的单股正链 ssRNA+节肢动物病毒,NDiV 与 CAVV 核酸序列长度约为 20.2 kb,这提示它们可能是套式病毒中猪生殖与呼吸综合征病毒的短基因病毒(small genomes)与 SARS 冠状病毒的长基因病毒(large genomes)之间的进化连接。

国际上仅在美国国家生物技术信息基因库 Genbank 中收录有南定病毒的全序列结果。南定病毒为不分节段、正极性、单链 RNA(+ssRNA)病毒,外形近似球形,直径为 60~80 nm,由核衣壳和包膜组成,病毒 RNA 全长为 20 192 nt,具有典型帽子 5' 结构和 3' poly (A)尾,电子显微镜下可见病毒外膜有突起。病毒编码至少 6 个相互重叠的开放阅读框(open reading frame, ORF),包括两个最长的 ORF1a 和 ORF1b(361~15 635 nt)翻译一个长蛋白质,其经病毒本身编码的蛋白酶切割成数个非结构蛋白,其中包括 RNA 依赖的 RNA 聚合酶基因(RdRp)等,其后跟随数个 3 的 ORFs, ORF1b 下游是结构蛋白的基因编码区,分别编码类似于冠状病毒结构蛋白的 S(spike glycoprotein)蛋白, M

(membrane glycoprotein) 蛋白, N (nucleocapsid phosphoprotein) 蛋白, E (small envelope glycoprotein) 蛋白。由于南定病毒的分子结构与传统的套式病毒相似, 其基因编码的蛋白符合套式病毒转录的功能需要, 病毒进入宿主细胞后首先合成 RNA 依赖的 RNA 聚合 (RdRp) 等相关蛋白酶, 在其引导下病毒以正链 RNA 为模板合成负链 RNA, 继续在相关聚合酶作用下, 以负链 RNA 为模板合成无数条子代正链和一系列亚基因 mRNA (subgenomic mRNA, sgmRNA), sgmRNA 合成一整套病毒的非结构蛋白和结果蛋白以供病毒复制增殖<sup>[12]</sup>。

科特迪瓦与越南发现的 CAVV 和 NDiV 核酸基因组长分别为 20 108 nt 和 20 192 nt, 被认为是最长的正单链 RNA 节肢类动物病毒<sup>[10]</sup>。由于已发现的套式病毒中只有以猪生殖与呼吸综合征病毒为代表的短基因病毒 (small genomes) 与 SARS 冠状病毒为代表的长基因病毒 (large genomes), 而基因长在 20 kb 间的套式病毒一直没被发现, 直至 NDiV 和 CAVV 的出现, 才填补了套式病毒由短基因组向长基因组的进化连接<sup>[10]</sup>。

中国 4 株南定病毒株 RdRp 基因 RT-PCR 扩增后进行测序, PCR 产物长度分别为 2 286、2 301、2 298、2 302 bp, 编码全长 766 个氨基酸残基组成的多肽。4 株病毒的 RdRp 基因已经提交至美国国家生物技术信息中心的 DNA 序列数据库 (GenBank)。经 BLAST 与 DNASTAR 比对分析, 4 株中国病毒株核苷酸序列间差异为 (0.11±0.06)%, 推测的氨基酸序列差异为 (0.20±0.08)%; 与越南的 NDiV 的 RdRp 基因核苷酸与氨基酸同源性为 99.0%~99.1% 和 99.3%~99.6%, 与科特迪瓦的 CAAV 比较为 93.3%~93.4% 和 97.4%~97.6%。

2.3 于 RdRp 基因构建的系统进化树分析<sup>[13]</sup> 不同套式病毒的复制酶基因核心区 (RdRp 区) 在遗传系统发生树上是同属一个分支, 从 GenBank 中获取相关的国际代表株: 冠状病毒科的 3 个亚群代表株 (I. HCoV, II. MHV/SARS-CoV, III. IBV 等), 动脉炎病毒科中的 EAV/PRRSV 等, 罗尼病毒科中的 YHV/GAV, 套式虫媒病毒中的 NDiV 和 CAVV。参照代表株 RdRp 基因氨基酸序列与 4 株中国南定病毒株构建系统进化树。结果显示, 4 株中国南定病毒株、NDiV 和 CAVV 属于同一进化分支, 南定病毒毒株与越南 NDiV 的亲缘性最近。Mesoniviridae (NDiV/CAVV) 分支群与冠状病毒分支群归于同一进化分支之下<sup>[14-16]</sup>。

电镜观察显示南定病毒在细胞内形成一系列壳样颗粒和小泡释放至细胞外, 成熟的病毒颗粒呈现有包

膜、椭圆、装配较短的刺突<sup>[17]</sup>。病毒全基因组测序结果显示, 中国分离的南定病毒与越南 NDiV 核苷酸序列和氨基酸序列同源性高, 分别达 94% 和 89% 以上, 以替代为主, 未发现插入和缺失; 系统进化树结果显示病毒归于 Mesoniviridae 科 Alphamesonivirus 属, 形态学和分子生物学特征相似, 提示南定病毒的分子遗传性质保守, 地域差异造成的影响较低<sup>[18-20]</sup>。研究表明, 南定病毒是一种新发现的昆虫套式病毒, 同时也是目前唯一在昆虫节肢类动物体内发现的套式病毒。由于过去套式病毒仅包括猪生殖与呼吸综合征病毒为代表的短基因病毒与 SARS 冠状病毒为代表的长基因病毒, 基因组大小在 20 K nt 的套式病毒一直没被发现。

2.4 南定病毒与虫媒疾病 套式病毒目病毒主要感染哺乳动物 (包括人类)、脊椎及无脊椎动物。有证据表明南定病毒可以引起白纹伊蚊卵细胞 (C6/36) 发生病变<sup>[11]</sup>, 但尚无南定病毒导致人群感染的直接证据。

日本科学家 Nga 等从越南急性病毒性脑炎综合症病人的脑脊液中分离出 NDiV, 这引起人们对南定病毒致病性的关注。每年在越南约有 30%~50% 的急性病毒性脑炎综合症病例是由于有肠道病毒、单纯疱疹病毒、粘液病毒和乙脑病毒引起, 而其他众多病例的病原体尚未确定<sup>[22-25]</sup>。

Mesoniviridae 病毒科已有的病毒中, 在越南发现的 DKNV (Dak Nong virus) 只在蚊虫细胞系 (如 C6/36、NIAS-AeAI-2、NIID-CTR) 增殖复制, 并不能在脊椎动物细胞系 (如 Vero、BHK-21、HmLu-1、CCL-141) 中复制; 在科特迪瓦发现的 CAVV、HanaV、MenoV 和 NseV 也只能在被感染的 C6/36 细胞系中检测到病毒核酸的复制, 在其他脊椎动物细胞中未发现病毒的复制。与其他 Mesoniviridae 的病毒分离情况相似, 越南 NDiV 只能在 C6/36 细胞增殖, 中国南定病毒也只引起 C6/36 细胞产生细胞病变, BHK 细胞不产生细胞病变, 提示相对脊椎类动物, 蚊虫类动物可能更容易被南定病毒所感染。由于最开始 Nga 等是在非乙脑病毒引起的重症脑膜炎病人的脑脊液中成功分离到南定病毒, 提示南定病毒存在感染脊椎或哺乳类动物的可能性。因此, 有必要在我国不明原因的脑膜炎病人中进一步开展针对南定病毒的分子流行病学调查。

目前, 除我国和越南在成蚊中成功分离南定病毒, 其它地区未有分离该病毒的报道, 国内外有关南定病毒相关研究资料不多。虽然该病毒曾在越南急性脑炎病人的脑脊液中分离得到, 免疫电镜技术也表明该病毒可能是急性脑炎综合症发生的原因, 但尚未有具体的动物实验与病理因果证据证明该病毒的致病性。国



内外关于南定病毒的研究内容仅为病毒的分子生物学研究和形态学分析,而对其致病性研究资料极少,有关该病毒的毒力并没有详细的病理学证据和流行病学材料证明该病毒对人有致病性。我国每年有大量的急性脑炎患者不能确定其病原体,是否有可能是南定病毒的感染尚待证实。

### 3 南定病毒研究工作中尚待解决的问题

目前,国内外对南定病毒的研究工作还没有涉及到血清学、致病性与毒力试验,今后需要在如下方面开展南定病毒的研究工作:1)有关南定病毒动物致病性情况,如对培养细胞、动物和鸡胚接种,观察南定病毒细胞毒性和对乳鼠及鸡胚的致病性。2)南定病毒在人群中感染状况和免疫力:对社区人群和不明原因发热人群南定病毒感染状况进行流行病学调查分析。3)根据已公布的中国株核酸序列设计特异性引物,建立 PCR 检测方法,实施分子生物学检测工作。4)建立 ELISA 检测方法,对相关动物及人群进行病原学和流行病学研究。

### 参考文献

- [1] Stramer SL. Current perspectives in transfusion-transmitted infectious diseases: emerging and re-emerging infections[J]. ISBT Sci Ser, 2014,9(1):30-36.
- [2] Grace D, Jeffrey G, Lapar MLA, et al. Zoonotic emerging infectious disease in selected countries in Southeast Asia: insights from ecohealth[J]. Ecohealth, 2011,8(1):55-62.
- [3] Jones KE, Patel NG, Levy MA, et al. Global trends in emerging infectious diseases[J]. Nature, 2008,451(7181):990.
- [4] Wang L, Valderramos SG, Wu A, et al. From mosquitos to humans: genetic evolution of Zika virus[J]. Cell Host Microbe, 2016, 14(1): 1931-3128.
- [5] 张海林,梁国栋. 中国虫媒病毒和虫媒病毒病[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2012,28(5):377-380.
- [6] Zirkel F, Kurth A, Quan PL, et al. An insect nidovirus emerging from a primary tropical rainforest[J]. MBio, 2011,2(1):e11-e77.
- [7] Nga PT, Parquet MC, 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(9):e1002215.
- [8] Zirkel F, Kurth H, Kurth A, et al. Identification and characterization of genetically divergent members of the newly established family Mesoniviridae[J]. Virol, 2013,87(11):6346.
- [9] Gorbalenya AE, Enjuanes L, Ziebuhr J, et al. *Nidovirales*: evolving the largest RNA virus genome [J]. Virus Res, 2006,117(1):17-37.
- [10] 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
- [11] Liu Q, Lin L, Zhou JM, et al. Identification of Nam Dinh virus in China[J]. Bing Du Xue Bao, 2013, 29(1):1-6.
- [12] Gorbalenya AE, Enjuanes L, Ziebuhr J, et al. *Nidovirales*: evolving the largest RNA virus genome[J]. Virus Res, 2006,117(1):17-37.
- [13] 周健明. 深圳市龙岗区部分蚊传虫媒病毒的分子流行病学研究[D]. 广州:广东药学院,2013.
- [14] Lapid B, Pennetier C, Afaire-Marchais V, et al. Innovative applications for insect viruses: towards insecticide sensitization[J]. Trends Biotechnol, 2009, 27(4):190-198.
- [15] Vasilakis N, Tesh RB. Insect-specific viruses and their potential impact on arbovirus transmission[J]. Curr Opin Virol, 2015,15(1):69-74.
- [16] Teurlai M, Huy R, Cazelles B, et al. Can human movements explain heterogeneous propagation of dengue fever in Cambodia? [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2012, 6(12): e1957.
- [17] Thuy NT, Huy TQ, Nga PT, et al. A new nidovirus (NamDinh virus NDIV): its ultrastructural characterization in the C6/36 mosquito cell line[J]. Virology, 2013,444(1-2):337-342.
- [18] Bolling BG, Weaver SC, Tesh RB. Insect-specific virus discovery: significance for the arbovirus community[J]. Viruses, 2015, 7(9): 4911.
- [19] Becnel JJ, White SE. Mosquito pathogenic viruses-the last 20 years [J]. Am Mosq Control Assoc, 2007,23(1):36-49.
- [20] Kean J, Rainey SM, McFarlane M, et al. Fighting arbovirus transmission: natural and engineered control of vector competence in *Aedes* mosquitoes[J]. Insects, 2015,6(1):236-278.
- [21] Becnel JJ. Transmission of viruses to mosquito larvae mediated by divalent cations[J]. Invertebr Pathol, 2006,92(3):141-145.
- [22] 张荣. 基于反向遗传平台的套式病毒蛋白结构与功能研究[D]. 北京:中国农业科学院,2013.
- [23] 梁克峰. NDIV 致病性初步研究及实时荧光 PCR 检测方法的建立[D]. 广州:广东药学院,2016.
- [24] 梁克峰,刘渠,王德全,等. 实时荧光 PCR 检测 Nam Dinh 病毒方法的建立及初步应用[J]. 中国媒介生物学控制杂志, 2015, 26(5):443-450.
- [25] 王德全,刘渠,周建明,等. 南定病毒标准血清制备及间接 ELISA 检测方法的建立[J]. 实用预防医学, 2016, 23(9): 1144-1146, 封三.

收稿日期:2016-11-08