

北京市朝阳区首次从蚊虫标本中 检出辽宁病毒

唐承军¹, 葛军旗¹, 张洪江¹, 付士红², 李元元², 徐潮³, 王会平¹, 张政¹

1 北京市朝阳区疾病预防控制中心消毒科, 北京 100021; 2 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, 北京 102206; 3 兰州大学, 兰州 730000

摘要: **目的** 了解北京市朝阳区蚊虫携带辽宁病毒(LNV)情况。**方法** 按照《病媒生物密度监测方法—蚊虫》(GB/T 23797—2009)中的方法,于2014—2015年采用CO₂诱蚊灯采集蚊虫,利用反转录聚合酶链式反应检测LNV核酸,采用Mega 6.0软件进行进化分析。**结果** 2014—2015年共采集蚊虫9 811只,其中淡色库蚊为优势种,占捕获总数的91.41%(8 968/9 811)。标本编号BJCY14007的淡色库蚊核酸经检测为LNV阳性。基于LNV第10节段的分子特征显示,LNV分支为两个进化群血清I型和血清II型,BJCY14007与NE97-12较为接近,属血清I型。**结论** 北京市首次报道从蚊虫中检出LNV。因LNV有潜在的致病性,应注意其分布及变化情况,且有必要在人群及宿主动物中开展血清学调查。

关键词: 虫媒病毒; 辽宁病毒; 分子特征; 北京市

中图分类号: R373.3; R384.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-8280(2017)02-0113-04

DOI: 10.11853/j.issn.1003.8280.2017.02.004

First report of Liaoning virus from mosquitoes in Chaoyang district, Beijing

TANG Cheng-jun¹, GE Jun-qi¹, ZHANG Hong-jiang¹, FU Shi-hong², LI Yuan-yuan², XU Chao³,
WANG Hui-ping¹, ZHANG Zheng¹

1 Chaoyang District Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100021, China; 2 Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention; 3 Lanzhou University

Corresponding author: ZHANG Zheng, Email: zhangzheng@cycdpc.org

Supported by the Beijing Outstanding Young Talent Training Project (No. 2014000052580G290) and the Research Foundation of Chaoyang District Center for Disease Control and Prevention (No. Cycdc-2015-271103)

Abstract: **Objective** To investigate Liaoning virus (LNV) in mosquitoes in Chaoyang district, Beijing. **Methods** According to the Surveillance for Vector Density-Mosquito (GB/T 23797-2009), mosquitoes were collected by CO₂ traps in 2014 and 2015. Reverse transcription-polymerase chain reaction was used to detect LNV. Molecular characteristics were carried out by Mega 6.0. **Results** A total of 9 811 mosquitoes were collected and *Culex pipiens pallens* (8 968/9 811, 91.41%) was the main species. The sample BJCY14007 was positive for LNV. LNV has two branches (serotype I and serotype II) based on the molecular characteristics of the segment 10. BJCY14007 was more related to NE97-12 (representative strain, serotype I). **Conclusion** The LNV was firstly detected in Beijing. It deserves further investigation LNV prevalence in mosquito, human population and other hosts for risk assessment.

Key words: Arbovirus; Liaoning virus; Molecular characteristics; Beijing

虫媒病毒是指可在吸血节肢动物体内繁殖并能通过叮咬而引起人畜共患病的病毒,其主要传播媒介为蚊和蜱,我国已检测到多种虫媒病毒及虫媒病毒病^[1]。辽宁病毒(Liaoning virus, LNV)属于呼肠病毒科 Seadornavirus 属,为12节段双链RNA无包膜

病毒。LNV的致病性研究表明,小鼠在接种2次LNV后出现鼻腔出血、皮下出血并死亡^[2-4];另在发热病例体内也检测到LNV抗体^[5],表明其有潜在的致病性。目前,北京市周边省份如山西、辽宁省等地已分离到LNV。

基金项目:北京市优秀人才培养资助项目(2014000052580G290);北京市朝阳区疾病预防控制中心自选项目(Cycdc-2015-271103)

作者简介:唐承军,男,硕士,微生物检验师,从事消毒和病媒生物防制工作,Email: happyamyjack@163.com

通信作者:张政,Email: zhangzheng@cycdpc.org

网络出版时间:2017-01-06 16:44 **网络出版地址:**http://epub.cnki.net/kns/oldnavi/n_CNKIPub.aspx?naviid=59&BaseID=ZMSK&NaviLink=

1 材料与方法

1.1 标本采集 按照《病媒生物密度监测方法 蚊虫》(GB/T 23797—2009)的方法,于 2014—2015 年 6—9 月,采用 CO₂ 诱蚊灯在公园、居民区等地采集蚊虫。采集时间在 18:00—20:00,部分在 18:00 至次日 06:00 完成。标本采集后,迅速带回北京市朝阳区疾病预防控制中心(CDC)进行处理。将蚊虫标本采集网兜置于-20℃冰箱冰冻约 30 min 后,在铺有冰排的 A4 纸上进行分类,同类雌蚊按蚊种类分装于带螺口的冻存管,每管 50~100 只;在冻存管上做好蚊虫信息标记,并记录蚊虫标本采集信息。全过程应低温操作,将蚊虫标本装入布袋后迅速置于-80℃冰箱或液氮罐中保存。

1.2 标本检测 使用组织研磨机(QIAGEN)研磨标本。按照核酸提取试剂盒(QIAamp Viral RNA Mini Kit, Qiagen 公司)方法提取 RNA,用反转录试剂盒(Ready-to-Go You-Prime First-Strand Beads, GE Healthcare 公司)合成 cDNA。利用 LNV 第 10 基因片段的特异性引物^[6]进行 PCR 扩增,采用 GoTaq® Green Master Mix 试剂盒(Promega 公司),扩增产物采用 1% 琼脂糖凝胶电泳,根据凝胶成像仪结果,将阳性标本送北京擎科新业生物技术有限公司进行测序,并在 NCBI 网站上进行 Blast 分析。

1.3 进化分析 使用 DNASTar 和 Sequencing Analysis v5.2 软件进行序列拼接和质量分析。在 GenBank 上选取 NE97-12 (LNV-NE97-12) 及 NE97-31 (LNSV-NE97-31) 为代表毒株,分别代表 LNV 血清 I 型 (serotype I) 和 II 型 (serotype II);选取往年部分 LNV、版纳病毒 (Banna virus, BAV) 及 Kadipiro virus (KDV) 序列为参考;部分参考序列为中国 CDC 病毒病预防控制所病毒性脑炎室提供。采用 Mega 5.1 软件的 Neighbor-Joining (NJ) 法进行进化树分析。

2 结果

2.1 蚊虫标本 共采集蚊虫 9 811 只,其中淡色库蚊 (*Culex pipiens pallens*) 占捕获总数的 91.41%,为优势种;三带喙库蚊 (*Cx. tritaeniorhynchus*)、白纹伊蚊 (*Aedes albopictus*) 和中华按蚊 (*Anopheles sinensis*) 分别占 2.73%、5.62% 和 0.24%;2014 和 2015 年采集蚊虫分别为 6 336 和 3 475 只。8—9 月采集的蚊虫标本数量最多,共占捕获总数的 80.60%;淡色库蚊在 6—9 月均有采集,而三带喙库蚊仅在 8、9 月采集到,见表 1。

2.2 LNV 检测 共 132 只蚊虫标本经核酸提取后反转录为 cDNA,用 LNV 第 10 节段的特异引物进行

表 1 2014—2015 年北京市朝阳区采集蚊虫标本情况

Table 1 Information of mosquitoes samples collected in Chaoyang district of Beijing, 2014–2015

采集时间 (年-月)	淡色库蚊	三带喙库蚊	白纹伊蚊	中华按蚊
2014-06	100	0	0	0
2014-07	900	0	0	0
2014-08	2 840	13	0	0
2014-09	2 250	233	0	0
小计	6 090	246	0	0
2015-06	360	0	0	0
2015-07	480	0	63	0
2015-08	317	0	30	0
2015-09	1 721	305	175	24
小计	2 878	305	268	24
合计	8 968	551	268	24
构成比 (%)	91.41	2.73	5.62	0.24

PCR 扩增。结果显示,编号为 BJCY14007 的标本与目标片段大小相符,测序后经 Blast 比对分析,显示 BJCY14007 与 LNV 血清 I 型代表毒株 NE97-12 的同源性达到 93%,同时与新疆等地分离株同源性达 99%,表明该阳性产物为 LNV。

2.3 进化分析 基于第 10 节段核苷酸序列的系统发育树(第 51~753 位核苷酸)显示,进化树分为 3 个大支,LNV、BNV 及 KDV 分属不同类群,显示出该 3 种病毒存在种属差异。LNV 分支群明显分为 2 个进化群,即血清 I 型和 II 型。新疆、山西、青海等省(自治区)毒株与代表株 NE97-12 均属血清 I 型,2012 年分离自辽宁省的毒株 LN12002-1 和 LN12018-1 与代表株 NE97-31 同属血清 II 型。北京市 LNV 基因 BJCY14007 与代表毒株 NE97-12 在进化关系上更为接近,为血清 I 型,且与分离自新疆地区的毒株最为接近,但也存在差异,见图 1。

3 讨论

北京市曾报道多种虫媒病毒及虫媒病毒病,如流行性乙型脑炎(乙脑)病毒、BAV,输入性登革热,媒介蚊虫主要有淡色库蚊、白纹伊蚊、三带喙库蚊和中华按蚊等^[7]。本次系北京地区首次报道 LNV。LNV 最早于 1997 年分离自辽宁省,近些年在我国新疆、青海、辽宁、山西和甘肃等省(自治区)多种蚊虫中分离到^[8-12]。以往动物实验及血清学结果表明,LNV 有其潜在的致病性;同属的 BAV 和 KDV 也为该病毒属,其中 BAV 被认为能引起脑炎等疾病。此外,LNV 有较快的进化速率且媒介分布较为广泛,目前已在背点伊蚊 (*Ae. dorsalis*)、中华按蚊、淡色库蚊、里海伊蚊 (*Ae. caspius*)、尖音库蚊 (*Cx. pipiens*)、黄背伊蚊 (*Ae. flavidorsalis*) 和凶小库蚊 (*Cx. modestus*) 等多种蚊虫媒介中检测到。北京地区优势蚊种为淡色

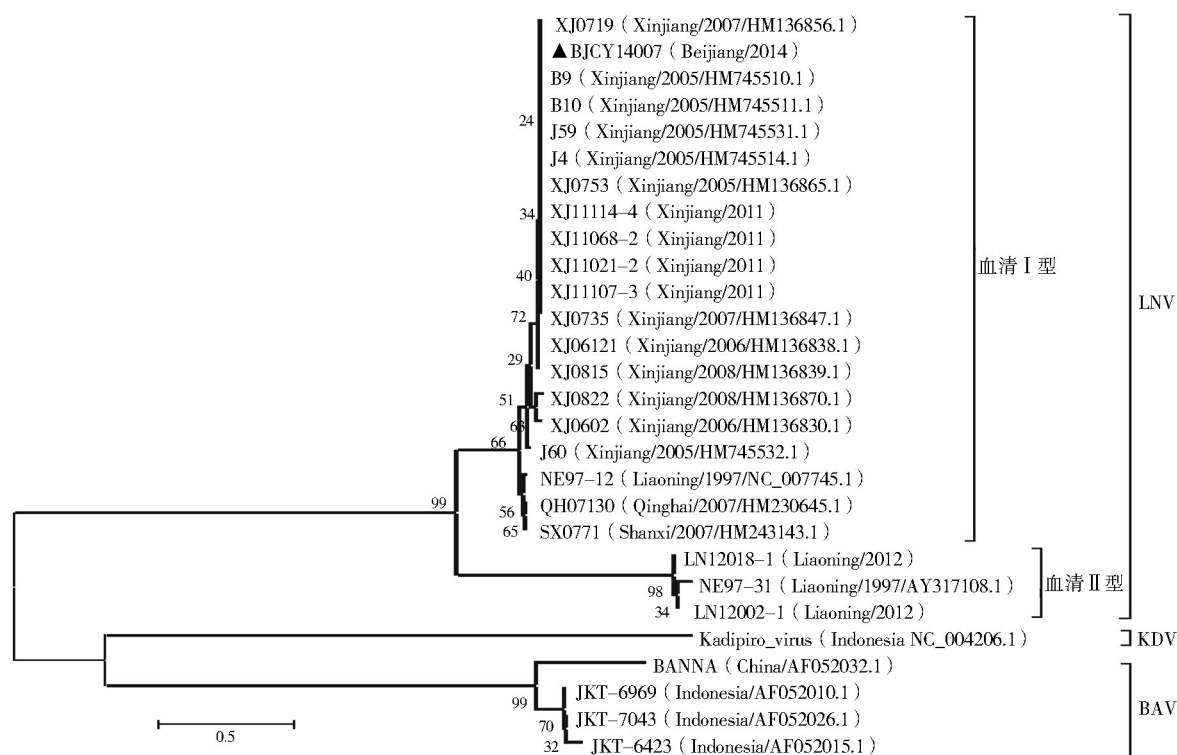


图 1 辽宁病毒第 10 节段进化树

Figure 1 Phylogenetic tree based on the 10th segments of LNV

库蚊,也有一定比例的中华按蚊,本次 LNV 的检出表明该病毒已存在于当地野外环境中。

LNV 阳性标本 BJCY14007 采集自奥林匹克森林公园,媒介蚊种为淡色库蚊。各蚊种所占比例与历年监测数据相吻合,淡色库蚊仍为优势蚊种,三带喙库蚊也占有一定比例,其在北京城区的分布出现新的变化且在城区广泛分布,需注意乙脑等虫媒传染病的传播风险^[13]。根据中和试验结果,LNV 可分为血清 I 型和 II 型,代表株分别为 NE97-12 和 NE97-31。LNV 第 10 节段编码外衣壳蛋白(VP10),在附着及侵入细胞方面有重要功能^[4]。基于 LNV 第 10 节段系统进化分析结果,BJCY14007 与新疆、山西、青海省(自治区)的分离株较为接近,与代表株 NE97-12 归为同一分支群,同属血清 I 型。目前 NE97-31 分支群(血清 II 型)仍仅在辽宁省检测到,说明该型 LNV 目前仍局限在辽宁地区,显示出 LNV 的分布存在地区差异性,且血清 I 型比 II 型分布更为广泛。已有研究结果显示,LNV 分布于我国北方地区的辽宁、新疆、山西、甘肃、青海、北京等省(直辖市、自治区),呈现地域分布规律^[14],该病毒的分布可能受气温、湿度等气候因素限制。

北京市朝阳区坐拥首都国际机场、奥林匹克森林公园等湿地公园,流动人口多,有大量城郊区,区域环境卫生质量较差,易孳生蚊虫等虫媒病毒的传播媒介。近年来,北京市较流行马术运动,城郊区存

在一定数量的牛、羊养殖户,朝阳区已有马术俱乐部近 20 家。且全球气候变暖、城市化、湿地建设及贸易全球化等因素影响蚊类的分布变化,病毒、蚊虫媒介与宿主三者间原有的平衡也发生改变。北京市 2008 年研究表明,蚊虫密度变化与气温密切相关^[15]。因此,应加强包括 LNV 在内的虫媒病毒研究,尤其是人群和动物宿主携带相关病毒抗体的情况,在不明原因发热及出血患者中开展抗体检测。此外,还应考虑蚊类分布及其季节消长规律,并继续监测蚊类携带病原体情况。目前,LNV 在自然界的循环情况仍不清楚,LNV 的时空分布规律及分子流行病学有待进一步研究。

参考文献

- [1] 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,2012,23(5):377-380.
- [2] Attoui H, Mertens PPC, Becnel J, et al. The double-stranded RNA viruses [M]// King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, et al. Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London: Academic Press, 2010:497-637.
- [3] Attoui H, Mohd Jaafar F, de Lamballerie X, et al. Seadornavirus, Reoviridae [M]//Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, et al. Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London: Elsevier/Academic Press, 2005: 504-510.
- [4] Attoui H, Mohd Jaafar F, Belhouchet M, et al. Liaoning virus, a new Chinese seadornavirus that replicates in transformed and

- embryonic mammalian cells [J]. J Gen Virol, 2006, 87 (1): 199–208.
- [5] 蔡增林, 陶三菊, 范永星, 等. 东北地区人、鼠 Colti 病毒感染调查[J]. 沈阳部队医药, 2000, 13(3): 231–232.
- [6] Attoui H, Mohd Jaafar F, de Micco P, et al. Coltiviruses and seadornaviruses in North America, Europe, and Asia[J]. Emerg Infect Dis, 2005, 11(11): 1673–1679.
- [7] 魏绪强, 刘婷, 周小洁, 等. 北京市城区蚊密度调查及西尼罗病毒携带情况研究[J]. 中华卫生杀虫药械, 2015, 21(6): 582–586.
- [8] Lv XJ, Mohd Jaafar F, Sun XH, et al. Isolates of Liaoning virus from wild-caught mosquitoes in the Xinjiang province of China in 2005[J]. PLoS One, 2012, 7(5): e37732.
- [9] 唐承军, 吕志, 付士红, 等. 2011 年新疆维吾尔自治区辽宁病毒分离鉴定[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2012, 23(5): 381–383, 387.
- [10] 李文娟, 李铭华, 王静林, 等. 青海省凶小库蚊辽宁病毒的分离鉴定[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2014, 25(1): 12–14.
- [11] Li WJ, Wang JL, Li MH, et al. Mosquitoes and mosquito-borne arboviruses in the Qinghai-Tibet Plateau-focused on the Qinghai area, China[J]. Am J Trop Med Hyg, 2010, 82(4): 705–711.
- [12] 曹玉玺, 付士红, 张稷博, 等. 辽宁省部分地区 2008 年虫媒病毒分离鉴定[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2012, 23(2): 93–97.
- [13] 张洪江, 葛军旗, 唐承军, 等. 北京市朝阳区三带喙库蚊分布和季节消长研究[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2016, 27(2): 148–150.
- [14] Lu Z, Liu H, Fu SH, et al. Liaoning virus in China[J]. Virol J, 2011, 8: 282.
- [15] 赵瑶, 刘泽军, 曾晓芃, 等. 北京市蚊虫密度与气象因素关系的研究[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2009, 20(1): 11–14.

收稿日期: 2016–10–24

(上接第 107 页)

各方法可能得不到统一结果等。故应将形态学、分子生物学、行为生态、染色体组型分析等信息结合进行物种鉴定, 从而得到较为可靠的结果。

参考文献

- [1] 马英, 李海龙, 鲁亮, 等. DNA 条形码技术在青海海东地区小型兽类鉴定中的应用[J]. 生物多样性, 2012, 20(2): 193–198.
- [2] 常子丽, 刘芳, 王建军, 等. DNA 条形码鉴别内蒙古地区啮齿动物[J]. 生物技术通报, 2013(8): 94–98.
- [3] 刘润吉, 张荣波, 郭天宇, 等. DNA 条形码技术在贵州茂兰鼠类鉴定中的应用[J]. 中华卫生杀虫药械, 2014, 20(1): 59–62.
- [4] 胡群, 马思杰, 裴炯良. 4 种 DNA 条形码在黄毛鼠种类鉴定中的比较[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2015, 26(3): 286–289.
- [5] 庞博, 侯志军, 柴洪亮, 等. 基于传统形态分类学和 DNA 条形码技术确定东方田鼠在贺兰山的新分布[J]. 经济动物学报, 2015, 19(4): 195–201.
- [6] 骆星丹, 王董, 胡燕, 等. 三峡库区沿江口岸鼠类及其分子鉴定特征研究[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2015, 38(增刊 1): 1–3.
- [7] Robins JH, Hingston M, Matisoo-Smith E, et al. Identifying *Rattus* species using mitochondrial DNA [J]. Mol Ecol Notes, 2007, 7(5): 717–729.
- [8] Palumbi SR, Martin AP, Romano SL, et al. The simple fool's guide to PCR[M]. Honolulu: University of Hawaii Press, 1991: 1–18.
- [9] Quéroutil S, Hutterer R, Barrière P, et al. Phylogeny and evolution of *African shrews* (Mammalia: Soricidae) inferred from 16S rRNA sequences [J]. Mol Phylogenet Evol, 2001, 20(2): 185–195.
- [10] 陈敏, 周健青, 颜小军. 浙江口岸 2005—2006 年鼠形动物及体表寄生虫调查[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2007, 30(3): 159–162.
- [11] 高雪萌, 陈建国, 刘峰. 2012—2013 年温州七里港口岸医学媒介生物调查及分析[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2014, 37(4): 259–263.
- [12] 高雪萌, 陈建国, 谢建雄, 等. 2014 年温州七里港口岸医学媒介生物调查[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2016, 39(1): 29–32.
- [13] Nicolas V, Schaeffer B, Missoup AD, et al. Assessment of three mitochondrial genes (16S, *Cytb*, CO I) for identifying species in the *Praomyini* tribe (Rodentia: Muridae) [J]. PLoS One, 2012, 7(5): e36586.

收稿日期: 2016–10–24