

地方土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^{1,2}, 贺秀媛¹, 赵军¹, 陈陆¹, 王新卫¹, 杨霞¹, 姚惠霞¹, 王川庆^{1*}

(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)

摘要:脑心肌炎病毒(Encephalomyocarditis virus, EMCV)是一种自然疫源性人兽共患病病原,但有关地方土猪 EMCV 的分离、鉴定及全基因组研究等尚未见报道。本研究应用“细胞接种与 RT-PCR 方法相结合”技术,成功分离到国内首株淮南猪源 EMCV,命名为 HNXX13 株,并对其进行了系统鉴定和全基因组序列测定分析。结果显示,该病毒粒子大小约为 24~30nm,呈圆形,不耐酸和热,对胰蛋白酶敏感,对氯仿不敏感,二价阳离子没有保护作用,所感染 BHK-21 细胞的细胞浆内可见到特异的绿色荧光;基因组全长为 7 725bp(GenBank 登录号:KF771002),与不同动物源参考毒株的核苷酸同源性为 81.0%~99.9%,与国内猪源参考毒株同源性为 99.5%以上;基于全基因组序列和 ORF 的系统发育进化树显示,EMCV 可分为 G1、G2 和 G3 3 个群,HNXX13 株与国内其他参考毒株同属于 G1 群。研究结果表明,地方土猪可感染 EMCV 并引起发病,丰富了我国 EMCV 分子流行病学资料,并提醒在进行地方品种养殖中要充分考虑到人兽共患疫病传播的生态学;EMCV 存在较大的地域差异,其传播具有一定的区域限制性;EMCV 在地方土猪和鼠之间可能存在着交叉感染与传播;EMCV 在感染地方土猪时可能会发生个别氨基酸的突变,以适应不同的猪种。

关键词:脑心肌炎病毒;地方土猪;RT-PCR;全基因组;分子特征分析

中图分类号:S852.65 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-8721(2014)04-0375-07

DOI:10.13242/j.cnki.bingduxuebao.002518

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],人感染发病也时有发生^[3-4]。自然条件下,鼠类是 EMCV 的自然贮存宿主和传播者^[5-6],但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心肌炎、脑炎和急性死亡等^[7-8]。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该病的存在和流行。中国于 2005 年从疑似病死猪体内成功分离到首株 EMCV^[9],2007 年即已证实国内猪群中感染已较为普遍,血清抗体平均阳性率高达 72%^[10-11],并分离到多株良种猪源 EMCV^[8,12]。EMCV 粒子直径约 27 nm,基因组为单股正链 RNA,全长约 7.8 kb,其衣壳蛋白由 VP1、VP2、VP3 和 VP4 等 4 种结构蛋白组成,其中以 VP1 的抗原性最强,可刺激机体产生中和抗体^[13-14],且与致病性有关^[15]。本研究对淮南猪源 EMCV 河南株进行分离、鉴定和全基因组测序解析,以期了解不同的猪种对该

病毒的感染情况,丰富 EMCV 基因序列数据库,为研究其遗传演化和分子生态学提供参考依据。

材料与方法

1 病毒分离鉴定 2013 年 6 月采集河南省信阳市某养猪场送检的疑似发病淮南猪的心脏、淋巴结和脾脏等病料,-20℃冻存待用。病毒的分离、电镜观察、间接荧光抗体法和 TCID₅₀测定、氯仿敏感试验、胰蛋白酶敏感试验、耐酸性试验、耐热性试验及二价阳离子保护试验等理化特性鉴定均按参考文献^[9]的方法进行。将 10 只 BALB/c 小鼠分为 2 组,其中攻毒组 5 只,腹腔注射分离毒培养物 0.1ml/只,对照组 5 只,腹腔注射 2% DMEM 0.1ml,仔细观察试验鼠临床表现,处死后采集心脏组织,进行组织病理切片制作。

2 细胞与主要试剂 BHK-21 传代细胞系由本实验室保存,RPMI-1640、新生牛血清等购自美国 Hyclone 公司, RNA 提取用 TRIZOL LS Reagent 购自 Invitrogen 公司, M-MLV 反转录酶、TaqDNA 聚合酶、5'-Full RACE Kit、3'-Full RACE Core Set Vet 2.0 Kit、pMD18-T 载体和胶回收试剂盒等均购自宝生物工程(大连)有限公司。

3 引物设计 利用 Primer Premier 5.0 软件,参考已发表的猪 EMCV BJC3 株基因序列(GenBank 登录号:DQ464062),设计并合成可覆盖其完整 ORF 的特异性引物(表 1),进行分段扩增、克隆。

收稿日期:2013-11-26;修回日期:2014-05-13

常洪涛和刘慧敏同为第一作者

作者简介:常洪涛(1978-),男,商丘人,博士研究生,讲师,主要从事动物传染病免疫防治研究, Tel:13140081018, E-mail:ndcht@163.com;刘慧敏(1984-),女,博士研究生,主要从事野生动物疫病研究, Tel:15911180140, E-mail:lhmin01@126.com

*通讯作者:王川庆(1954-),博士,教授, Tel:13653710063, E-mail:wchuanq@163.com

表 1 用于 EMCV 全基因组 RT-PCR 扩增的引物参数

Table 1 Oligonucleotide primer parameters of EMCV for RT-PCR amplification

Primer	Primer sequence	Position for amplified fragments	Length
ER-1F;	ATTGTATGGGATCTGATCTGGGG	603-625	1 513bp
ER-1R;	GTGTTGGATGCCTCAATGTAGGG	2 093-2 115	
ER-2F;	GTATTCTACTCTGCCAGACAGCAC	1 948-1 971	1 575bp
ER-2R;	CTAAACAATCTAACCTCCAAACCTC	3 498-3 522	
ER-3F;	CTGATTTTCGGCACTCTGTTCTTT	3 258-3 280	2 097bp
ER-3R;	CATCTGTCTGCTTCTGTCTTGTT	5 332-5 354	
ER-4F;	TGGCTAGGATTGAAAGGAAGAAG	5 226-5 248	1 050bp
ER-4R;	TTTTACGTGGTACGTGAATACGG	6 253-6 275	
ER-5F;	GTAGTGAATGCCTTTGAGCCACA	6 200-6 222	1 314bp
ER-5R;	TTCCTGCTTACCAGAATGAACGG	7 491-7 513	
5'-GSP1	GAGGAGGAGTTATTCTGTCTGAGG	942-966	5'-UTR
5'-GSP2	GGGGCCTAGACGTTTTTTAAACCTC	659-682	
5'-RACE outer primer	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA		
5'-RACE inner primer	CGCGGATCCACAGCCTACTGATCAGTCCGATG		
3'-GSP1	ATGTTGTCATACTATCGTCCAGG	7 430-7 452	3'-UTR
3'-RACE outer primer	TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT		

UTR, Untranslated region.

Based on the sequence of EMCV strain BJC3 (GenBank accession number DQ464062).

4 病毒总 RNA 提取 取分离毒的细胞培养液,按照 TRIZOL 使用说明书,提取总 RNA。

5 RT-PCR 及测序 应用各片段特异性引物,以提取的总 RNA 为模板反转录成相应片段的 cDNA,并以各 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,同时优化最佳反应条件。最终 PCR 反应条件设定为:95 °C 4min;95 °C 45 s,57~60 °C 60 s,72 °C 1 min,35 个循环;72 °C 延伸 10min。基因组 5'端和 3'端扩增方法按 5'-Full RACE 和 3'-Full RACE Core Set Vet. 2.0 试剂盒说明书操作进行。各扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定、胶回收纯化后与 pMD18-T 载体连接,转化 DH5a,筛选阳性克隆经 PCR 鉴定后送至上海生工生物工程公司测序。并应用 DNASTar 软件和测序峰图软件 Chromas2.33 对各

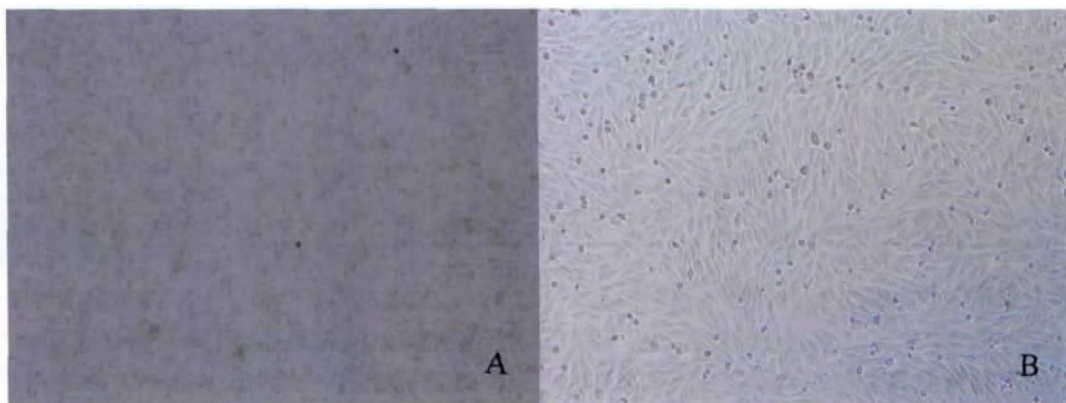
片段测序结果进行拼接,获得全基因组序列。

6 同源性比较与系统进化分析 运用 DNA Star 软件包中的 MegAlign 程序,将分离毒与 17 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,并应用 MEGA 5.05 软件构建系统进化树。

结 果

1 病毒分离

从疑似病料组织中成功分离到 1 株淮南猪源 EMCV,命名为 HNXX13 株,初代培养 48 h 时出现细胞病变(CPE),连传 3 代后,接种 24 h 即出现典型 CPE(图 1)。



A. CPE of EMCV isolate; B. Normal BHK-21 cells

图 1 EMCV 在 BHK-21 细胞上产生的细胞病变(×20)

Figure 1 CPE of EMCV in BHK-21 cells(×20)

2 病毒形态、理化特性和致病性鉴定 在透射电镜下可以清晰观察到数个直径约为 24~30nm, 形状规则的圆形病毒粒子(图 2)。分离毒所感染 BHK-21 细胞的细胞浆内可见到特异的绿色荧光(图 3)。1~4代分离毒细胞培养物的 TCID₅₀ 经测定, 分别为 $10^{-6.21} \cdot 0.1\text{ml}^{-1}$ 、 $10^{-5.86} \cdot 0.1\text{ml}^{-1}$ 、 $10^{-7.39} \cdot 0.1\text{ml}^{-1}$ 和 $10^{-7.6} \cdot 0.1\text{ml}^{-1}$; 分离毒经终浓度为 4.8% 分析纯氯仿处理后, TCID₅₀ 为 $10^{-5.96} \cdot 0.1\text{ml}^{-1}$, 略低于对照组的 $10^{-6.48} \cdot 0.1\text{ml}^{-1}$, 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, TCID₅₀ 由 $10^{-6.68} \cdot 0.1\text{ml}^{-1}$ 降低到 $10^{-3.75} \cdot 0.1\text{ml}^{-1}$, 说明对胰蛋白酶敏感; 病毒液在 pH3.0 的酸性环境中作用 1 h 后, TCID₅₀ 由 $10^{-7.18} \cdot 0.1\text{ml}^{-1}$ 降低到 $10^{-3.46} \cdot 0.1\text{ml}^{-1}$, 表明不耐酸; 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 TCID₅₀ 由 $10^{-7.18} \cdot 0.1\text{ml}^{-1}$ 降低至 $10^{-4.25} \cdot 0.1\text{ml}^{-1}$, 60 °C 时已完全失活, 失去感染力, 表明对热敏感; 将分离株置于 $1.1\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ MgCl₂ 溶液中 50 °C 水浴 1 h, TCID₅₀ 为 $10^{-4.25} \cdot 0.1\text{ml}^{-1}$, 与对照组

分离毒并未有保护作用。试验组小鼠在攻毒 2~3d 后表现出精神沉郁、食欲减退、蜷缩、反应迟钝、呼吸加快、震颤、后肢麻痹、转圈等临床症状, 很快死亡, 组织病理学观察发现心肌纤维坏死, 并有局灶性和弥散性单核细胞、红细胞的聚集(图 4), 对照组小鼠无任何不良临床反应。



图 2 BHK-21 中的 HNXX13 株 EMCV 粒子
($\times 50\,000$)

Figure 2 Virions of EMCV strain HNXX13-in BHK-21 cells($\times 50\,000$)

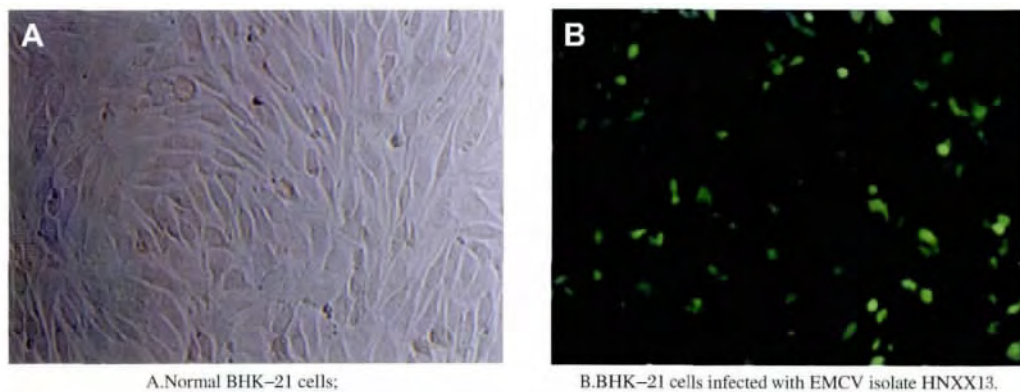


图 3 BHK-12 中 HNXX13 株的免疫荧光鉴定 ($\times 200$)

Figure 3 Identification of the EMCV isolate HNXX13 in BHK-21 cells by IFA($\times 200$)

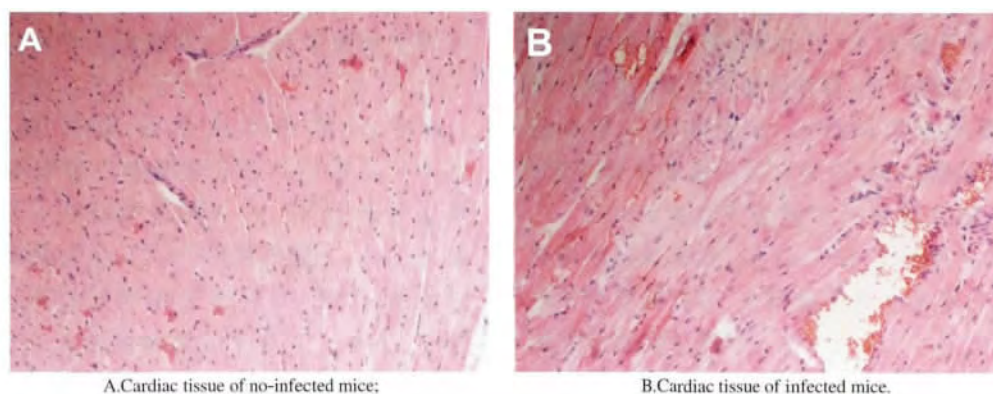


图 4 感染小鼠心脏组织(H, E $\times 400$)

Figure 4 Cardiac tissue of mice infected with EMCV isolate HNXX13(H, E $\times 400$)

3 病毒基因组序列及结构分析 对阳性重组质粒中插入的各目的片段进行双向测序,利用 DNASTar 软件和 Chromas2.33 软件对测序结果进行拼接,获得 HNXX13 株的全基因组序列(GenBank 登录号:KF771002),全长为 7 725bp,其中 5'-UTR 包含

708bp,3'-UTR 包含 138bp,中间为一个大的 ORF (6 879bp)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 5)。

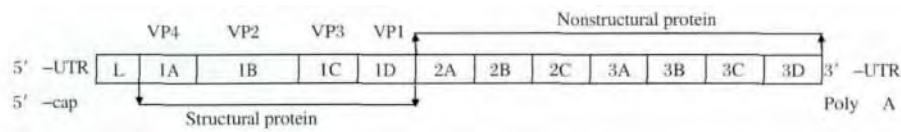


图 5 HNXX13 株的全基因组结构图

Figure 5 Full-length genome features of the EMCV isolate HNXX13

4 同源性比较分析 全基因组核苷酸序列分析结果表明(表 2),HNXX13 株与国内外不同动物源参考毒株的同源性为 81.0%~99.9%,其中与国内猪源分离毒的同源性高达 99.5%以上,与韩国、欧美分离毒的同源性分别为 99.5%~99.7%和 83.5%~99.2%,与国、内外鼠源毒株的同源性分别为 99.6%和 81.1%~99.5%。进而与参考毒株 ORF 及各基因片段的核苷酸、氨基酸序列比对分析,发现 HNXX13 株的结构蛋白中,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对于结构蛋白编

码区较为保守。将 HNXX13 株的 VP1 蛋白与国内猪源参考毒株进行比较,发现氨基酸变异多集中于 3~63 位,3 位与 GXLC 株、GX0601 株、BJC3 株和 HB1 株均为谷氨酸(E),不同于 NJ08 株的天冬氨酸(D);7 位除 GXLC 株为精氨酸(R)外,其余为赖氨酸(K);13 位与 GXLC 株均由丙氨酸(A)→苏氨酸(T);63 位与 GX0601 株、GCLX 株均为谷氨酰胺(Q),不同于 BJC3 株、HB1 株和 NJ08 株的甘氨酸(G);与国内鼠源参考毒 GX0602 株进行比较,VP1 蛋白仅有 2 个位置发生氨基酸变异,分别为 13 位由 A→T,212 位由 E→G。

表 2 HNXX13 株与 EMCV 参考毒株核苷酸及推导的氨基酸序列比较

Table 2 Comparison of nucleotide and deduced amino acid sequences between the HNXX13 strain and other EMCV isolates

Strains (Accession)	Nucleotide and amino acid sequence identity with HNXX13 (%)													
	Genome	ORF	L	VP4	VP2	VP3	VP1	2A	2B	2C	3A	3B	3C	3D
GXLC (FJ897755)	99.9	99.9	99.5	100	99.9	100	99.9	99.8	99.8	100	100	100	100	99.9
GX0601 (FJ604852)	99.7	99.8	99.5	99.9	99.9	99.9	99.8	99.8	100	99.8	100	100	100	99.4
BJC3 (DQ464062)	99.7	99.8	100	100	99.9	100	99.3	100	100	99.8	100	100	99.8	99.6
HB1 (DQ464063)	99.5	99.6	100	99.9	99.7	99.9	99.3	99.6	100	99.7	100	100	99.7	99.5
NJ08 (HM641897)	99.6	99.7	100	99.9	99.9	99.9	99.4	99.6	100	99.8	100	100	99.7	99.6
CBNU (DQ517424)	99.7	99.8	100	100	99.9	100	99.5	100	100	99.6	100	100	99.8	99.6
K3 (EU780148)	99.5	99.6	100	99.9	99.6	99.9	98.8	100	100	99.5	100	100	99.8	99.3
K11 (EU780149)	99.5	99.6	100	99.9	99.6	99.9	99.4	99.6	100	99.5	100	100	99.5	99.4
PV21 (X74312)	99.2	99.5	99.5	99.5	99.7	99.5	99.4	99.6	99.5	99.5	99.2	98.5	99.7	99.9
EMC-D (M22458)	83.5	82.3	80.5	80.6	81.5	80.6	81.9	77.9	92.2	81.9	79.8	74.2	80	84.8
D variant (M37588)	83.6	82.4	80.5	80.5	81.5	80.5	81.9	78.3	92.2	82.1	80.6	74.2	80.7	85

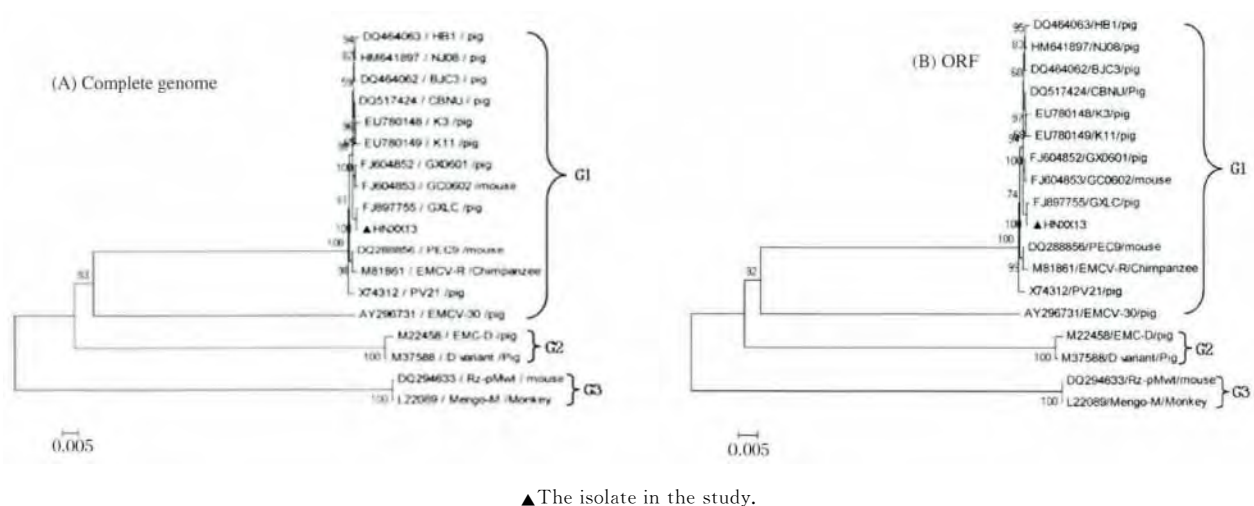
续表 2

Strains (Accession)	Nucleotide and amino acid sequence identity with HNXX13 (%)													
	Genome	ORF	L	VP4	VP2	VP3	VP1	2A	2B	2C	3A	3B	3C	3D
EMCV-30 (AY296731)	85.2	84.2	80.5	82.3	83.7	82.3	85	77.9	94.4	83.5	81.4	81.8	82.6	86.8
GX0602 (FJ604853)	99.6	99.7	100	99.9	99.7	99.9	99.6	99.6	100	99.8	100	100	100	99.3
PEC9 (DQ288856)	99.5	99.6	100	99.6	99.7	99.6	99.6	99.4	99.5	99.6	99.6	100	99.7	99.6
Rz-pMwt (DQ294633)	81.1	79.9	77.1	78.8	79.5	78.8	80.5	70.9	90	80.8	72.5	66.7	75.6	83.6
EMCV-R (M81861)	99.2	99.4	99.5	99.3	99.9	99.3	99.2	99.2	99.8	99.5	98.8	100	99.7	99.6
Mengo-M (L22089)	81	79.9	77.1	78.8	79.5	78.8	80.5	70.9	90	80.8	72.5	66.7	75.6	83.7
		93.5	97.1	97.7	97.4	97.7	97.1	75.2	97.1	95.7	90.7	86.4	88.8	92.3

• The percentages of amino acid sequences shared with HNXX13 are illustrated in bold.

5 系统进化分析 基于 HNXX13 株全基因组和 ORF 序列,应用 MEGA 5.05 软件绘制系统发育进化树(图 6),结果大致相同,均可见 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。HNXX13 株与 GXLC 株亲缘关系最近,并与其他国内参考毒株同属于 G1 群。而猪源 EMCV-30 株尽管属于 G1 群,但却位于一个独立分支,明显不同于其他 EMCV 分离株。



▲ The isolate in the study.

图 6 基于 HNXX13 株全基因组(A)、ORF(B)核苷酸序列的系统进化树

Figure 6 Phylogenetic trees based on the complete genome of the HNXX13 strain (A) and ORF (B) nucleotide sequences

讨 论

近年来,地方土猪及相关产品作为无公害优质食品的重要来源之一,因其独特风味和营养价值日益备受青睐,国内各地都在进行土猪相关资源的开发利用,如土猪集中放牧或规模化饲养以满足人们的消费需求。但随之而来的问题是,由于传统散养生态环境的改变,接触良种猪机会频繁以及屠宰、加工、消费环节中存在的风险因素,都使得地方土猪感染多种人兽共患病原体并危害人类的可能性大大增

加。国内已分离到多株良种猪源 EMCV,但有关地方土猪源 EMCV 的研究尚未见报道,因此开展其分离、鉴定和全基因组解析等相关工作,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。

HNXX13 株分离自淮南猪,该猪种为河南省地方优良品种,主要产区集中在信阳市及周边地区,是在艰苦条件下长期驯化、培育而成,通常情况下抗病力极强。该毒株的成功分离证实 EMCV 可感染地方土猪并导致发病,在一定程度上改变了“地方猪种抗病性强”的传统认识。EMCV 多表现为亚临床感

染,在疑似病料组织中的含量很低,另外,猪在感染后的病毒血症持续时间较短,一般为 2~4 天,在感染早期体内即出现较低滴度的中和抗体,一旦中和抗体出现就会降低病毒的分离成功率^[16],因此病毒的直接分离、鉴定等工作难以开展。笔者曾尝试应用多种常规方法从病料中直接检测,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(PRRSV)等多种猪重要病毒性病原均无法在 BHK-21 细胞上增殖,而 EMCV 接种后可迅速出现明显 CPE^[9]。因此,作者按参考文献^[9]的方法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淮南猪源 EMCV,并明显提高了病料组织中 EMCV 的检出率和分离率。

对不同猪种 EMCV 地方流行株的全基因组序列进行测定与分析,对于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。本研究应用 5-RACE、3-RACE 和 RT-PCR 技术获得 HNXX13 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地方品种养殖活动中要充分考虑人兽共患疫病传播的生态学。另外,HNXX13 株与韩国分离毒的亲缘关系较近,与多数欧美毒株的亲缘关系较远,与德国分离毒 PV21 株的亲缘关系却高达 99.2%,说明 EMCV 存在较大的地域差异,其传播应有一定范围内的区域限制性,但也不能排除日益发达的国际交通和贸易可加速 EMCV 的扩散。

EMCV 只有一个血清型,但在不同动物甚至同种动物中可引起差异较大的临床症状,且病毒的致病性具有毒株依赖性^[17]。而本研究中,HNXX13 株分离于自然发病死亡的猪只,对小鼠攻毒后可引起典型的临床症状和严重的心肌组织病理损伤,说明该毒株对猪、鼠都具有很强的致病性,这与 Yuan (2014 年)^[12]的研究结论基本一致。VP1 是 EMCV 基因组中最重要的中性抗原表位所在区域,受选择性压力的影响,需要不断发生变异以维持 EMCV 的存活,并与病毒粒子表面的拓扑结构、抗原性、受体吸附及脱壳有关^[18]。VP1 第 100 位氨基酸 T 的突变可明显导致 EMCV 对小鼠致病性的改变,若突变为异亮氨酸(I)和脯氨酸(P),可对小鼠的致死率降低,脑中病毒载量减少且脑组织损伤轻微,突变为丝氨酸(S)和 A 则表现了与野生型亲本病毒相似的高致病性^[19]。HNXX13 株的第 100 位氨基酸并

未发生突变,与国内其他猪源分离毒均为 T,再次验证了该分离毒对鼠的高致病性。由于 EMCV 在猪只之间传播能力有限,而鼠在猪群 EMCV 的传播过程中具有重要作用。HNXX13 株与国内鼠源毒株的核苷酸同源性高达 99.6%,亲缘关系极近,氨基酸也仅有 2 个位置发生变异,证实 EMCV 在地方土猪和鼠类之间存在着交叉感染与传播的可能性,因此做好猪场内、外的鼠类控制工作,无疑是有效防控猪 EMCV 感染的重要环节。但是,VP1 蛋白中细微变异的出现,提示 EMCV 在感染地方土猪时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 J, Allaire S D, Taylor D J. Disease of swine, 9th Edition [M]. Blackwell Publishing Professional, 2006, 331-336.
- [2] Liu H M, Yan Q, Zhao B, et al. Isolation, molecular characterization, and phylogenetic analysis of encephalomyocarditis virus from South China tigers in China [J]. Infection Genet Evol, 2013, 19: 240-243.
- [3] 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.
- [4] Bberste M S, Gotuzzo E, Blair P, et al. Human febrile illness caused by encephalomyocarditis virus infection, Peru [J]. Emerg Infect Dis, 2009, 15: 640-646.
- [5] Seaman J T, Boulton J G, Carrigan M J. Encephalomyocarditis virus disease of pigs associated with a plague of rodents [J]. Aust Vet J, 1986, 63: 292-294.
- [6] Billinis C. Encephalomyocarditis virus infection in wildlife species in Greece [J]. J Wild Dis, 2009, 45(2): 522-526.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] Zhang G Q, Ge X N, Guo X, et al. Genomic analysis of two porcine encephalomyocarditis virus strains isolated in China [J]. Arch Virol, 2007, 152: 1209-1213.
- [11] 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.
- [12] Yuan W Z, Song Q Y, Zhang X Y, et al. Isolation and molecular analysis of porcine encephalomyocarditis virus strain BD2 from northern China [J]. Infection Genet

- Evol, 2014, 21 :303-307.
- [13] Racaniello V R. Picornaviridae: The viruses and their replication, in KNIPE D M, HOWLEY P M, GRIFFIN D E, et al. *Fields Virology*[M], 4th Edition. Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 2001:685-715.
- [14] Suh Y S, Ha S J, Lee C H, 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.
- [15] 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.
- [16] Hill B D, Ketterer P J, Rodwell B J, et al. Encephalomyocarditis virus infection and pig disease in Queensland [J]. *Aust Vet J*, 1985, 62:433-434.
- [17] Cerutis D R, Bruner R H, Thomas D C, et al. Tropism and histopathology of the D, B, K, and MM variants of encephalomyocarditis virus. [J]. *J Med Virol*, 1989, 29:63-69.
- [18] Morishima T, McClintock P R, Aulakh G S, et al. Genomic and receptor attachment differences between Mengovirus and encephalomyocarditis virus[J]. *Virology*, 1982, 122(2):461-465.
- [19] 朱书, 盖新娜, 宫晓文, 等. 脑心肌炎病毒 VP1 蛋白 100 位氨基酸的突变导致其对小鼠致病性的改变[J]. *中国科学*, 2011, 41(06):462-471.

Isolation, Identification and Full-Length Genome Sequence Analysis of Encephalomyocarditis Virus from Local Aardvarks

CHANG Hong-tao¹, LIU Hui-min^{1,2}, HE Xiu-yuan¹, ZHAO Jun¹, CHEN Lu¹,
WANG Xin-wei¹, YANG Xia¹, YAO Hui-xia¹, WANG Chuan-Qing^{1*}

(1. College of Animal Husbandry and Veterinary Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;
2. Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: Encephalomyocarditis virus (EMCV) is a natural epidemic zoonotic pathogen. However, no reports have been published regarding the isolation, identification and full-length genome of EMCV from a local aardvark population. In present study, an EMCV isolate HNXX13 was isolated from aardvarks named Huainan-pig in Henan Province. The systematic identification, full-length genome sequencing and molecular characteristic analysis of the isolate HNXX13 were conducted. The result showed that the isolate was spherical with a diameter of 24-30 nm, neither heat-nor acid-resistant, sensitive to trypsin, insensitive to chloroform, not protected by bivalent cationic, and the specific fluorescence was observed in the cytoplasm of BHK-21 cells infected with the isolate by using indirect fluorescence assay. The full-length genome of EMCV HNXX13 generated a 7 725bp sequence (GenBank: F771002), with 81.0%-99.9% nucleotide identity to reference strains from different animals, and 99.5% with a Chinese reference strain isolated earlier from a commercial pig herd. The phylogenetic tree based on the full-length genome and ORF sequences identified that all EMCV strains were divided into three groups G1, G2 and G3, and strain HNXX13 belonging to the G1 group with other Chinese reference strains. The result also identified that this EMCV infection could cause severe clinical signs in a local aardvark population, and enriches the molecular epidemiological data of EMCV in China. Regional differences exist in EMCV genome and transmission is limited within a certain area. However, the cross-infection and transmission of EMCV between aardvark and mice appears most likely. Mutations have occurred in some amino acids of EMCV strain HNXX13 during the transmission in local aardvark herd and these mutations might make the virus easier to infect the aardvark

Key words: Encephalomyocarditis virus; Local aardvark population; RT-PCR; Full-length genome; Molecular analysis

* Corresponding author: WANG Chuan-qing, E-mail: wchuanq@163.com