

鄢梓晴, 粟硕. 福建省赤腹松鼠源盖塔病毒的分子鉴定及其遗传进化分析 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (1): 105-110.

YAN Z Q, SU S. Molecular identification and genetic evolution of Getah virus from red belly squirrels in Fujian Province [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (1): 105-110.

福建省赤腹松鼠源盖塔病毒的分子鉴定及其遗传进化分析

鄢梓晴, 粟硕*

(南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 盖塔病毒 (Getah virus, GETV) 是一种人畜共患的虫媒传播病毒, 主要感染养殖动物, 遗传多样性高, 具有流行风险。本研究基于高通量测序技术, 在来自福建省的死亡野生赤腹松鼠中首次发现了 GETV, 结合一代测序技术进一步鉴定到赤腹松鼠肺组织感染 GETV, 并成功获得该病毒的全基因组序列, 命名为 GETV/RS/China/2022 毒株。基于 GETV 全基因组的系统发育分析结果表明, 源自野生啮齿目动物的 GETV/RS/China/2022 毒株属于罕见 GETV 谱系 II 型衍生株, 这提示了 GETV 宿主谱的扩展以及野生动物对甲病毒进化和传播的重要性。

关键词: 啮齿目动物; 盖塔病毒; 甲病毒; 系统发育分析; 野生动物

中图分类号: S852.65 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2025)01-0105-06

Molecular identification and genetic evolution of Getah virus from red belly squirrels in Fujian Province

YAN Ziqing, SU Shuo*

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Getah virus (GETV) is a zoonotic, insect-borne virus that mainly infects farmed animals and is of high genetic diversity and epidemic risk. In this study, GETV was first detected in dead wild red-bellies squirrels from Fujian Province. based on the high-throughput sequencing technology. Combined with the next-generation sequencing technology, GETV infection in lung tissues of red-bellies squirrels was further identified, and the whole genome sequence of the virus was successfully obtained, named the GETV/RS/China/2022 strain. Phylogenetic analysis based on the whole genome of GETV showed that the GETV/RS/China/2022 strain belonged to the rare GETV lineage type II derivatives, which suggested the expansion of the GETV host spectrum and the importance of wild animals to the evolution and transmission of alphavirus.

Keywords: rodent; Getah virus; alphavirus; phylogenetic analysis; wildlife

甲病毒是引起人畜共患疾病的重要病原体, 绝大多数甲病毒通过吸血节肢动物进行传播, 其中一些已经在人类中引发了重要的流行病, 比如基孔肯雅病毒 (Chikungunya virus, CHIKV) 和委内瑞拉马脑炎病毒 (Venezuelan equine encephalitis virus, VEEV)^[1-2]。盖塔病毒 (Getah virus, GETV) 是披膜病毒科甲病毒属的成员之一, 是一种单股正链 RNA 病毒, 全基因组长度约 12 kb, 于 1955 年第一次在马来西亚库蚊样本中获得 (毒株: MM2021), 而后相继在中国、日本、泰国和澳大利亚等多个国家和地区被发现^[3-4]。

GETV 可引起多种动物的疾病和死亡, 马感染 GETV 可引起发热体疹和下肢水肿, GETV 在猪群中可引起致死性疾病和生殖障碍等^[5-6]。值得关注的是, 虽然在澳大利亚、马来西亚和中国的一些人群的血清中检测到了 GETV 的中和抗体, 但是并未发现 GETV 感染人类导致疾病的报道^[7]。到目前为止, GETV 表现出较高的遗传多样性, 随着 GETV 暴发感染的报告逐渐增加, 其感染人类的潜力已经引起了持续的 GETV 监测, 以评估其流行特征和公共卫生风险。

本研究对来自福建省的野生死亡赤腹松鼠 (*Callosciurus erythraeus* Pallas) 组织样品进行高通量测序, 经过序列拼接注释, 发现 1 条与 GETV 基因组高度匹配的序列, 结合 Sanger 测序技术, 成功获得了 1 条完整的罕见 GETV 谱系 II 型衍生株基因组序列。

收稿时间: 2024-03-02; 修回日期: 2024-10-31

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFC2604203)

第一作者: 鄢梓晴, 女, 硕士研究生

* 通信作者: 粟硕, 教授, 研究方向为动物病毒学, E-mail:

shuosu@njau.edu.cn.

1 材料与方法

1.1 病料采集

2022年6月,收集来自中国福建省野生的死亡赤腹松鼠的组织样本,−80℃冻存。

1.2 样本处理和核酸提取

无菌采取0.5~1g组织样本,加入2颗无菌钢珠和1mL高压灭菌的磷酸盐缓冲溶液进行低温研磨,4℃12000 r/min离心10 min,取上清液,根据试剂盒RNA Clean & Concentrator kit (Zymokit, Zymo Research, USA)说明书提取病毒RNA。

1.3 RT-PCR 鉴定

使用HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)的说明书进行反转录获得样本的cDNA模板。使用由生工生物工程(上海)股份有限公司合成的GETV E2检测引物进行PCR检测。实验室设计的上下游引物序列分别为F: 5'-ACTCAYCSGAYTTCGRCGGGRT-3', R: 5'-SCTGYACCCATGTCATTGCCRT-3'。PCR反应体系为: 2×Taq Plus Master Mix (Dye Plus) (南京诺唯赞生物科技股份有限公司) 10 μL, 上下游引物各1 μL, cDNA模板1 μL, 加无菌超纯水7~20 μL。PCR检测程序为: 95℃预变性5 min; 95℃变性30 s, 56℃退火30 s, 72℃延伸30 s, 共35个循环; 72℃总延伸10 min。目的片段大小为312 bp。反应结束后,取5 μL PCR产物用琼脂糖凝胶电泳进行

检测。

1.4 高通量测序与病毒注释

根据试剂盒RNA Clean & Concentrator kit说明书提取死亡松鼠组织的病毒RNA。将上述提取的RNA液氮速冻,并低温运输到诺禾致源生物(北京)股份有限公司进行高通量测序,对获得的原始数据进行质控、组装拼接和注释。使用Trimmomatic软件的默认参数程序去除文库的接头序列并对读长(reads)进行质量修剪,文库reads采用从头组装的拼接方法,用Megahit软件进行拼接,最小拼接长度设置为500 bp。将拼接成功的病毒基因组序列与盖塔病毒参考基因组序列进行比对,进一步获得病毒株的全部完整基因组序列。

1.5 系统发育分析

从NCBI GenBank数据库下载74条GETV全基因组序列,参考毒株信息见表1。结合本研究中鉴定的源自野生赤腹松鼠的GETV全基因组序列,使用Mafft软件进行全局比对,利用MEGA软件进行手动调整序列和纠错。采用RAxML软件中的最大似然(maximum likelihood, ML)方法对校对校正好的GETV完整基因组序列进行了系统发育分析,重构无根ML树,使用具有离散伽马分布的一般时间可逆核苷酸替代模型来模拟位点(GTR + Gamma)之间的速率异质性,并使用1000次bootstrap重复来评估分支支持。

表1 GETV 参考毒株信息

毒株	登录号	宿主	地点	年份
MM2021	MW404214	蚊子	马来西亚	1955
MM2021	MN849355	白雪库蚊	马来西亚	1955
MM2021	LR990839	白雪库蚊	马来西亚	1955
AMM2021	MT121984	白雪库蚊	马来西亚	1955
unknown	AB032553	蚊子	日本	1956
M/6-Mag/132	MW410934	蚊子	日本	1956
LEIV/16275/Mag	EF631998	伊蚊	俄罗斯	2000
B254	LR990838	棕头库蚊	马来西亚	2012
YN12031	KY434327	白腹丛蚊	中国	2012
GETV/SW/Thailand/2017	LC534253	猪	泰国	2017
M1	EU015061	库蚊	中国	1964
MI-110-C2	LC079087	马	日本	1978
MI-110-C1	LC079086	马	日本	1978
LEIV/17741/MPR	EF631999	库蚊	蒙古	2000
Kochi/01/2005	AB859822	猪	日本	2005
JL1808	MH722256	牛	中国	2018

续表1

毒株	登录号	宿主	地点	年份
SD17/09	MH106780	狐狸	中国	2017
GX201808	MT269657	猪	中国	2018
JX202004	This laboratory	猪	中国	2020
HuN1	MF741771	猪	中国	2017
GD201907-1	This laboratory	猪	中国	2019
GX202005	This laboratory	猪	中国	2020
unknown	NC_006558	猪	韩国	2004
YN0540	EU015063	白腹丛蚊	中国	2005
YN12042	KY450683	三带喙库蚊	中国	2012
SC1210	LC107870	白腹丛蚊	中国	2012
GETV-V1	KY399029	猪	中国	2016
AH9192	MG865965	猪	中国	2017
JS18	MT210319	猪	中国	2018
FJ202005-2	This laboratory	猪	中国	2020
GZ201808	MK487997	马	中国	2018
GX201909	This laboratory	猪	中国	2019
GD201909	This laboratory	猪	中国	2019
FJ201807-1	MZ736799	猪	中国	2018
FJ201807-1	This laboratory	猪	中国	2018
HB0234	EU015062	三带喙库蚊	中国	2002
JL1707	MH722255	蚊子	中国	2017
SC201807	MK693225	猪	中国	2018
SC266	MN478487	猪	中国	2018
SC483	MN478486	猪	中国	2018
HeB201707	This laboratory	猪	中国	2017
NMDK1813-1/China/2018	MW512827	蚊子	中国	2018
NM_JA_F2_18-8L-NH-Cxp-Y-1-1	MW246769	尖音库蚊	中国	2018
GETV/SCrph328/2018	MZ357111	尖音库蚊	中国	2018
SC202009	OK423758	猪	中国	2020
GETV/SCrph129/2020	MZ357112	小熊猫	中国	2020
HNJZ-S2	KY363863	猪	中国	2015
GETV-GDFS9-2018	MT086509	猪	中国	2018
GETV-GDFS2-2018	MT086508	猪	中国	2018
12IH26	LC152056	三带喙库蚊	日本	2012
14-I-605-C1	LC079088	马	日本	2014
14-I-605-C2	LC079089	马	日本	2014
15-I-752	LC212972	马	日本	2015
15-I-1105	LC212973	猪	日本	2015
16-I-674	LC223131	马	日本	2016
16-I-676	LC223132	马	日本	2016
16-0810-26	LC710656	伊蚊	日本	2016
16-I-599	LC223130	马	日本	2016
HNNY-2	MG865967	猪	中国	2016

续表1

毒株	登录号	宿主	地点	年份
HNJZ-S1	KY363862	猪	中国	2011
SD201910	This laboratory	猪	中国	2019
HeN201907	This laboratory	猪	中国	2019
JS201809-2	This laboratory	猪	中国	2018
GX1	MZ736796	猪	中国	2019
GX1	This laboratory	猪	中国	2019
SX201809	This laboratory	猪	中国	2018
HeN2021	This laboratory	猪	中国	2021
HeN202009-2	This laboratory	猪	中国	2020
HeN202009-2	MZ736801	猪	中国	2020
JL17/08	MG869691	蚊子	中国	2017
HuB201905	This laboratory	猪	中国	2019
HNNY-1	MG865966	猪	中国	2016
HNPDS-1	MG865968	猪	中国	2017
HNPDS-2	MG865969	猪	中国	2017

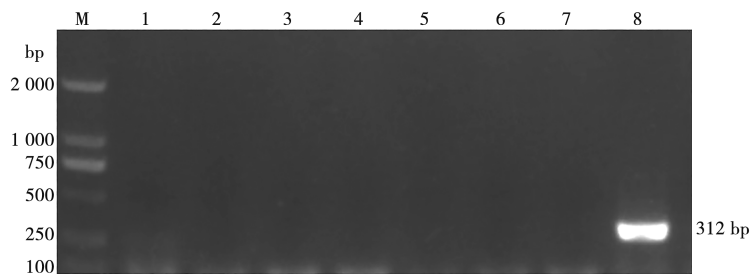
2 结果

2.1 高通量测序结果与序列比对

对死亡松鼠肺组织样本提取的 RNA 核酸进行高通量测序，二代测序结果经过质控、去宿主污染和拼接组装处理后，获得拼接序列集。然后用 diamond 软件对获得的序列集与 NR 数据库 (Non-redundant Database) 进行比对分析。将关注的病毒注释挑选出来统一整理，其中发现了之前未在松鼠中检测到的 GETV 序列。经 BLAST 比对后，发现该序列与泰国国家猪中分离的 GETV/SW/Thailand/2017 毒株序列高度相似，全基因组核苷酸同一性达到 99.9%。为了验证从赤腹松鼠中鉴定到的 GETV，对赤腹松鼠所有组织样本进行常规 RT-PCR 验证，结果显示肺组织样

本为 GETV 检测阳性 (如图 1)。

将从野生赤腹松鼠肺组织中鉴定到的 GETV 命名为 GETV/RS/China/2022 毒株，并成功获取了病毒的完整基因组序列，全长为 11 689 bp，基因组由非结构蛋白开放阅读框 (non-structural protein open reading frame, NS-ORF) 和结构蛋白开放阅读框 (structural protein ORF, S-ORF) 组成，分别编码非结构蛋白 NSP1~NSP4 和结构蛋白 Cap、E3、E2、6K 和 E1 (如图 2)。第一个 ORF 位于病毒基因组的前 2/3 处，编码 4 个病毒非结构蛋白，负责病毒 RNA 转录和复制，有助于病毒的宿主免疫逃逸和蛋白质修饰。第二个 ORF 在基因组的最后 1/3 处，编码多个病毒结构蛋白，它们充当病毒粒子的骨架分子，并参与整个病毒生命周期的各种过程。



M. Marker; 1~7. 分别表示心、肝、脾、肾、肌肉、皮肤、肠组织样本; 8. 肺组织样本。

图 1 赤腹松鼠 GETV 鉴定结果

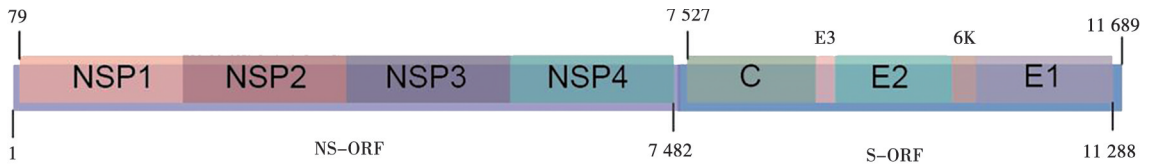


图2 GETV/RS/China/2022 毒株基因组结构

2.2 赤腹松鼠 GETV 遗传谱系鉴定

本研究检索了所有可用的 GETV 完整基因组，将新测序的松鼠 GETV 毒株序列和从公共数据库下载的 74 条序列放入 1 个数据集中。通过使用这些完整的基因组序列，对 GETV 的基因型进行了分析，从构建的 ML 进化树结果中识别了 3 个主要谱系，即：谱系

I、谱系 II 和谱系 III。谱系 I 包括最早的 GETV 序列，而谱系 III 则是 GETV 毒株最流行的谱系类型，涵盖了多数已报道的 GETV 毒株以及当前的流行毒株。值得注意的是，来自野生啮齿目赤腹松鼠的 GETV/RS/China/2022 毒株被归类为罕见的谱系 II（如图 3）。

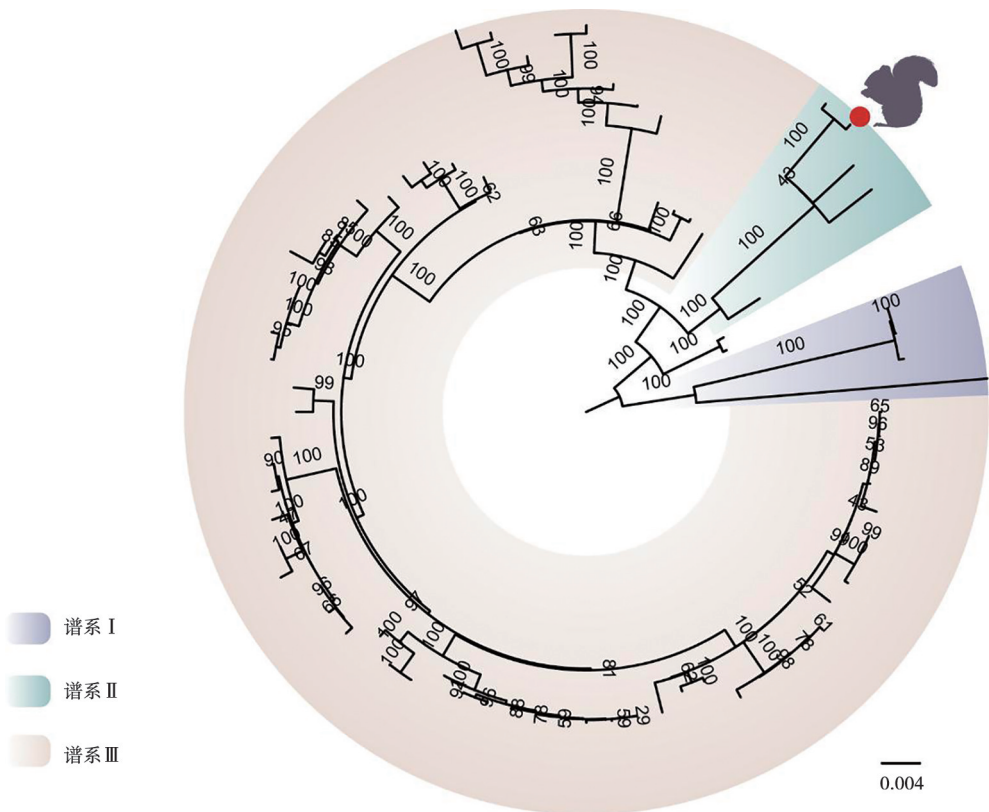


图3 基于 GETV 全基因组序列的遗传进化分析

3 讨论

课题组前期研究调查了猪群中的 GETV 流行情况，发现 GETV 具有很高的遗传多样性，且近年来在家养动物中的流行程度逐渐增加^[8]。本研究在 2022 年 6 月收集的野生赤腹松鼠中，通过高通量测序技术发现了 GETV，并利用 RT-PCR 进一步验证了赤腹松鼠肺组织 GETV 的阳性检测结果。赤腹松鼠在被发现时已经死亡，没有观察到任何临床症状。对于来自死亡野生啮齿目动物的 GETV 阳性样品，结合二代测序

和一代测序技术进行了全基因组扩增获得了完整的 GETV/RS/China/2022 毒株基因组序列，并将毒株完整基因组序列上传至 NCBI GenBank 数据库（序列登录号：OP593308）。赤腹松鼠中发现 GETV 的情况以前未见报道，提示 GETV 的宿主范围在不断扩展并在野外循环，这为 GETV 生态学、传播模式及其宿主适应性提供了新的见解。

节肢动物传播的病毒具有更高的宿主可塑性，并经常在多个哺乳动物甚至人类之间进行宿主转换，有时会导致严重的公共卫生风险。例如，VEEV 和日本

脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV) 利用家畜作为增殖宿主, 然后溢出到人类中引发流行病^[9-10]。因此, 探索诸如 GETV 之类的甲病毒在更广泛的宿主范围内的传播, 将有助于揭示该类病毒适应性进化的动态和人畜共患流行病的潜力。本文首次发现了 1 株源自野生啮齿目动物的 GETV 毒株, 属于罕见的谱系 II, 与泰国猪中的毒株序列几乎相同, 表明 GETV 在猪和野生动物之间的传播经历了一个远距离和宿主之间转换的复杂过程。由于 GETV 除猪和蚊子之外的宿主样本量不足, 从而导致了研究野生动物中 GETV 演化和传播方面的困难。未来需要在更广泛的动物群体内监测 GETV 的流行情况, 并且需要更广泛、灵敏的 GETV 检测引物, 从而覆盖所有的毒株谱系。

参考文献:

- [1] BRAULT A C, POWERS A M, MEDINA G, et al. Potential sources of the 1995 Venezuelan equine encephalitis subtype IC epidemic [J]. *Journal of Virology*, 2001, 75 (13): 5823-5832.
- [2] FRITSCH H, GIOVANETTI M, XAVIER J, et al. Retrospective genomic surveillance of Chikungunya transmission in Minas Gerais State, Southeast Brazil [J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10 (5): e0128522.
- [3] SIMPSON D I, WAY H J, PLATT G S, et al. Arbovirus infections in Sarawak, October 1968-February 1970: GETAH virus isolations from mosquitoes [J]. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1975, 69 (1): 35-38.
- [4] 李彬, 付士红, 查冰, 等. 两株盖塔病毒全基因组序列测定与分子遗传进化 [J]. *中国热带医学*, 2022, 22 (10): 916-922.
- [5] YANG T, LI R, HU Y, et al. An outbreak of Getah virus infection among pigs in China, 2017 [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2018, 65 (3): 632-637.
- [6] BROWN C M, TIMONEY P J. Getah virus infection of Indian horses [J]. *Tropical Animal Health and Production*, 1998, 30 (4): 241-252.
- [7] 张海林, 胡挺松, 张富强. 我国盖塔病毒研究进展及公共卫生意义 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2020, 36 (3): 229-233.
- [8] ZHAO J, DELLICOUR S, YAN Z, et al. Early genomic surveillance and phylogeographic analysis of Getah virus, a reemerging arbovirus, in livestock in China [J]. *Journal of Virology*, 2023, 97 (1): e0109122.
- [9] WEAVER S C, BARRETT A D. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2004, 2 (10): 789-801.
- [10] PANDIT P S, DOYLE M M, SMART K M, et al. Predicting wildlife reservoirs and global vulnerability to zoonotic *Flaviviruses* [J]. *Nature communications*, 2018, 9 (1): 5425.