

5 株新疆出血热病毒分子流行病学研究

唐青 高佃平 赵秀芹 韩磊 杭长寿

【摘要】 目的 从分子水平揭示中国新疆出血热(XHF)病毒基因结构与功能的关系,寻找传播途径及流行原因。方法 对分离自新疆的5株XHF病毒进行S基因片段的克隆和测序,与其他克里米亚-刚果出血热(CCHF)的S基因序列进行比较和分析。结果 5株病毒S基因全长均为1 672个核苷酸,开放阅读框均为1 449个核苷酸,编码一个含482个氨基酸的蛋白。新疆分离毒株的S基因核苷酸序列同源性(93.0%~99.5%)明显高于其他国家分离毒株的S基因核苷酸序列。系统发生树状图显示新疆毒株在一个分支之下形成独立的群体,明显区别于来自其他地区的CCHF病毒并且又进一步分为三组。结论 不同毒株的S基因序列差异不完全取决于病毒分离的宿主、地域和时间。

【关键词】 新疆出血热;S基因;同源性;流行病学;分子

Study on the molecular biology of hemorrhagic fever virus in Xinjiang TANG Qing*, GAO Dianping, ZHAO Xiuqin, HAN Lei, HANG Changshou. *Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

【Abstract】 Objective To explore the relationship between the structure and function at molecular level and the routes of transmission of Xinjiang hemorrhagic fever(XHF) virus. **Methods** S genes of five XHF virus strains were cloned, sequenced and compared with that of other Crimean-Congo hemorrhagic fever virus strains. **Results** It was found that S genes of the five viruses had 1 672 nucleotides, while ORF of them including 1 449 nucleotides and coded with a protein of 482 amino acid. The nucleotides homology of Chinese isolates(93.0%-99.5%) was obviously higher than that of any other S genes strains identified in other countries'. Phylogenetic tree showed that all Chinese isolates clustered into one branch and could be further divided into another three groups. **Conclusion** The sequential difference of S genes was not totally related to the host, areas and time of the viruses isolated.

【Key words】 Xinjiang hemorrhagic fever; S gene; Homology; Epidemiology; molecular

新疆出血热(Xinjiang hemorrhagic fever, XHF)即克里米亚-刚果出血热(Crimean-Congo hemorrhagic fever, CCHF)病毒,属于布尼亚病毒科内罗毕病毒属,可以引起人严重的出血热疾病和高病死率。本病于1964年在我国新疆巴楚县首次发现并一直在该地区流行。2001年春季XHF在巴楚再次严重流行,并且这次流行是自1964年该病在我国首次发现至今发病最严重、病例数最多的一次。截止到2001年6月共出现51例病人,其中3例死亡。51例病人中,有45例发生在XHF一直连续流行的红海乡。红海乡总人口只有1 000多人,仅以红

海乡人口来计算,发病率大约为5%,病死率为5.88%。CCHF病毒的主要宿主是蜱。家畜是蜱的主要血源动物,人可以通过被带毒蜱叮咬或接触感染的家畜而感染此病。因此,巴楚地区无论是自然环境,还是当地生活习惯都为CCHF病毒的存在和传播提供了很好的条件。CCHF病毒基因组为单链,由L(large)、M(middle)、S(small)三个节段组成,分别编码转录酶蛋白(L)插在病毒膜内的两个外部糖蛋白(G1和G2)和核蛋白(N)。因为S基因更为保守并常常作为基因分类的基础,因此我们选择N基因进行XHF病毒的遗传变异性研究。

材料与amp;方法

一、材料

1. 病毒株:所有病毒株均来自我国新疆地区并根据其分离时间命名。88166 M₁:1988年分离自新疆生产建设兵团50团因剪羊毛剪破蜱而感染的病

基金项目 国家自然科学基金资助项目(39870680)

作者单位:102206北京,中国疾病预防控制中心传染病预防控制所出血热研究室(唐青、赵秀芹、韩磊);中国农业大学生物学院分子病毒室(高佃平);中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所出血热虫媒病毒室(杭长寿)

通讯作者:唐青 E-mail: tangqing@263.net

人 7803 M₉ :1978 年分离自巴楚病人 ;75024 :1975 年分离自阿克苏病人 ;7001 M₅ :1970 年分离自巴楚病人 ;79121 M₉ :1979 年分离自巴楚长耳跳鼠。

2. 引物 :用于逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 的寡核苷酸引物通过比较已发表的分离自中国羊的 C68031 毒株的 S 基因片段序列设计合成。正向和反向引物分别在其 5' 末端带有 Bam HI 和 PsT I 酶切位点 ,以便用于基因扩增后的基因克隆。引物序列为 :5' -CAT GGA TCC TCT CAA AGA AAC ACG TGCC-3' ;5' -CTAA CTG CAG T CTC AAA GAT ATC GTT-3' 。

3. 克隆载体为 pGEM-T ,购自 Promega 公司。

二、方法

1. RT-PCR :

(1) RNA 提取 :病毒接种感染的鼠脑用细胞总 RNA 分离试剂 TRIzol 研磨 ,氯仿抽提 ,异丙醇沉淀 ,75% 乙醇漂洗后得到 RNA。

(2) 逆转录合成 cDNA :正向引物 (100 ng) 1 μl 和 RNA 5 μl 混匀后离心数秒 ,70℃ 变性 5 min ,冰浴 2 min。按 25 μl 总反应体系依次加入如下成分 :焦碳酸二乙酯 (DEPC) 处理的水 9.5 μl ,5 × M-MLV Buffer 5 μl ,2.5 mmol/L 4 dNTP 1 μl ,Rnasin 2.5 μl (25 U/μl) ,M-MLV 1 μl (200 U) ,混匀后 ,离心数秒 ,42℃ 水浴 60 min。

(3) PCR 扩增 cDNA :50 μl 总反应体系依次加入水 38 μl ,10 × PCR Buffer 5 μl ,2.5 mmol/L MgCl₂ 5 μl ,4 dNTP (10 mmol/L) 5 μl ,cDNA 2 μl ,正向和反向引物 (20 pmol/L) 各 1.5 μl ,Taq Plus 1 μl (2.5 ~ 5 U/ml) 。PCR 反应条件 :94℃ 预变性 5 min ,94℃ 50 s → 50℃ 60 s → 72℃ 90 s × 30 ,72℃ 延伸 10 min ,回收 PCR 产物。

2. S 基因克隆 :连接 PCR 产物和 pGEM-T 载体 :2 × Buffer 5 μl ,pGEM-T vector 1 μl ,PCR 回收产物 3 μl ,T4 DNA 连接酶 1 μl ,4℃ 过夜。

(1) 转化 :解冻 JM109 感受态细菌 ,加入连接产物 5 μl ,冰浴 30 min ,42℃ 热击 60 s ,冰浴 10 min ,加入无任何抗生素的 LB 500 μl ,37℃ 温浴 1 h → 涂氨苄青霉素平板并加 X-gel 40 μl 和 IPTG 20 μl ,37℃ 温浴过夜。

(2) 筛选重组质粒 :挑白斑 摇菌 ,小提质粒。用 BamHI 和 HindIII 双酶切鉴定重组质粒 :水 11 μl ,1% BSA 2 μl ,Buffer E 2 μl ,Plasmid 5 μl ,BamHI 0.5 μl ,HindIII 0.5 μl ,37℃ 2 ~ 3 h 后电泳。阳性重组质

粒直接测序。

3. 计算机分析和比较测序结果。

结 果

1. S 基因测序结果 :5 株病毒 S 基因核苷酸序列测定结果 ,其基因序列均已被 GeneBank 收录。5 株病毒 S 基因全长均为 1 672 个核苷酸 ,都同样含一个完整开放阅读框 (ORF) ,ORF 都是从 56 位核苷酸开始到 1 504 位核苷酸终止 ,全长 1 449 个核苷酸 ,编码一个含 482 个氨基酸的蛋白质。S 基因 5' 端 55 个核苷酸和 3' 端 168 个核苷酸为非编码区 ,5 株病毒 S 基因的起始密码和终止密码均相同 ,起始密码为 ATG ,终止密码为 TGA ,而且核酸之间的差异性多发生在末端非编码区。

2. 与其他 CCHF 病毒 S 基因序列比较 :将 5 株病毒 S 基因核苷酸序列与从 GeneBank 上查到的其他 CCHF 病毒 S 基因核苷酸序列进行比较 ,结果见表 1。88166、7803 和 75024 三株之间有较高的同源性 (99.2% ~ 99.5%) ;7001 和 79121 株之间也表现出较高的同源性 (99.0%) ;但将这两组进行比较 ,同源性相对低一些 ,为 93.0% ~ 94.0%。核苷酸序列推导的氨基酸序列同源性均高于相应的核苷酸序列同源性 (93.0% ~ 99.5%) 。与其他 CCHF 病毒 S 基因核苷酸序列进行比较 (表 1) ,明显可以看到的一点是所有中国分离毒株之间的同源性 (93.0% ~ 99.5%) 远远高于与其他国家分离毒株的同源性 (77.2% ~ 85.9%) 。

3. 聚类分析结果 :将我国和其他国家分离的 CCHF 毒株以及 Hazara 和 Dugbe 病毒的 S 基因序列通过 Dnastar 软件分析 ,绘出的系统发生树状图可以看出 ,分离自中国的毒株的 S 基因在一个分支之下形成一个独立的群体 ,明显区别于来自其他地区的 CCHF 病毒 (图 1) 。

讨 论

1. CCHF 病毒 S 基因序列比较和分析 :所测的 5 株病毒 S 基因之间核苷酸序列同源性不同 ,可以明显看出的是 88166、7803、75024 三株之间的同源性和 79121、7001 株之间的同源性高于这两组之间的同源性。79121 株分离自鼠 ,病毒来源的宿主明显与其他毒株不同 ,7001 株分离年代较早 ,并且分离自阿克苏 ,而其他所有中国分离株均来自巴楚地区。

表1 CCHF 病毒 S 基因核苷酸、氨基酸序列同源性比较

毒株	88166	7803	75024	7001	79121	8402	66019	68031	HY13	1bAr	Uganda	Dak8194	AP92	Hazara	Dugbe
88166		99.2	99.4	93.8	93.0	99.4	96.8	99.3	98.1	85.1	84.6	80.2	77.5	49.6	48.6
7803	99.0		99.5	93.8	93.0	99.0	96.8	99.3	98.2	85.2	84.6	79.8	77.2	49.8	48.5
75024	99.4	98.6		94.0	93.2	99.2	97.0	99.5	98.4	85.3	84.6	80.2	77.5	49.6	48.3
7001	97.9	97.1	97.5		99.0	93.5	92.8	94.0	93.4	84.8	83.7	79.3	76.9	50.7	48.2
79121	97.9	97.1	97.5	99.4		92.7	92.1	93.2	93.5	85.2	83.8	77.6	76.9	49.3	48.8
8402	99.2	98.3	98.8	97.3	97.3		96.7	99.0	97.9	84.7	84.3	80.0	77.5	49.3	48.1
66019	98.8	97.9	98.3	97.5	97.5	98.1		96.9	97.1	85.3	84.8	78.8	77.5	49.9	47.7
68031	99.4	98.6	99.0	97.5	97.5	98.3	98.3		98.5	85.1	84.5	80.3	77.4	49.7	48.2
HY13	99.6	98.8	99.2	97.7	97.7	99.0	98.6	99.6		85.9	84.5	78.9	77.6	49.8	48.8
1bAr	97.1	96.3	97.1	96.3	96.3	96.5	97.1	96.7	96.9		82.0	76.6	76.7	49.1	48.9
Uganda	96.3	95.4	95.9	95.0	95.0	95.9	96.3	95.9	96.1	95.2		77.7	78.3	51.6	49.0
Dak8194	94.4	93.6	94.0	93.8	93.8	93.8	94.4	94.0	94.2	94.0	93.4		77.6	50.4	48.0
AP92	91.9	91.1	91.7	91.1	91.1	91.3	91.9	91.5	91.7	91.3	91.1	92.3		51.4	48.5
Hazara	58.8	58.4	58.6	59.2	59.2	58.4	59.0	58.6	58.8	58.2	58.2	57.1	58.0		45.6
Dugbe	54.2	53.9	53.9	53.9	53.9	53.7	54.4	54.2	54.2	53.4	54.2	52.7	54.4	51.6	

注:黑体字为核苷酸序列同源性,白体字为 S 基因编码区氨基酸序列同源性

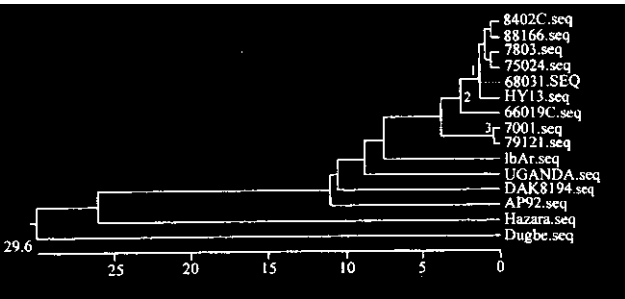


图1 不同 CCHF、Hazara 和 Dugbe 病毒 S 基因系统发生树状图

与已经发表的 1965 年我国首例病人及 1984 年蜱分离的 2 株 CCHF 病毒^[1]以及 1968 年分离自我国羊(C68031)^[2]和 1968 年分离自我国蜱(HY13)^[3]的 2 株病毒 S 基因序列相比,所有 CCHF 中国分离毒株起始密码均相同,为 ATG;终止密码除 HY13 和 66019 株为 TAA 外,其余均为 TGA;所有 CCHF 毒株的 ORF 长度均一致。可以明显看出的是我国分离毒株的 S 基因核苷酸序列同源性(93.0%~99.5%)明显高于其他国家分离毒株的 S 基因核苷酸序列同源性(77.2%~85.9%) (表 1),其中 1bAr10200 株是 1972 年非洲奈及利亚蜱分离毒株;DAK8194 株是 1969 年塞内加尔蜱分离毒株;Uganda 株是乌干达分离毒株;AP92 株是 1976 年希腊北部蜱分离毒株。

2. CCHF 的流行和遗传变异分析:比较所有已经测序的 CCHF、Hazara 和 Dugbe 病毒 S 基因序列绘出的系统发生树状图分为数个分支,其中一个分支

包括了所有中国的毒株,提示我国流行的 CCHF 病毒从遗传学上有着自己的独立性;而其他分支分别包括了分离自世界其他地区的毒株。中国毒株分支又进一步分为三组:第一组包括了 1968~1988 年分离自不同宿主的 6 株病毒(8402 和 1968 年分离自蜱的 HY13、68031 分离自羊以及分离自病人的 88166、7803、75024);第二组为 1966 年分离自病人的第 1 株病毒(66019);第三组包括 1970 年分离自巴楚病人的 7001 和 1979 年分离自巴楚长耳跳鼠的 79121 株。不同毒株的 S 基因序列与病毒分离的宿主、地域和时间的关系均可以从系统发生树状图上反映出来,但还可以看到的一点是基因序列之间的差异又不完全取决于病毒分离的宿主、地域和时间。从中国毒株 S 基因序列比较看,分离的时间似乎与病毒的变异有更大的关系,这一点无论从序列同源性比较或系统发生树状图上都可以表现出来。但又并不完全是这样,如 7001 和 79121 株分离时间相差近十年并且分离自不同的宿主,但两者之间表现出极高的同源性,而这 2 株病毒与其他所有中国分离毒株均表现出最大的差异。中国分支下的第一组包括了 6 株病毒,这些病毒同样来自不同的宿主(蜱、羊、人)和不同的时间(1968~1988 年),但却表现出高度的同源性 and 种系发生相关性。

CCHF 病人主要发生于春季,一般 4~6 月中旬,这与该地区成年蜱活动的高峰时间一致。一般来说,干旱缺雨雪的年份,蜱数量增加,容易发生 CCHF 的流行。此外,在 CCHF 的流行和病毒毒力以及病毒基因型之间是否也有一些内在联系?通过 9

株中国 CCHF 病毒 S 基因全序列分析比较初步推断,不同基因型的 CCHF 病毒可能自然存在于流行地区的宿主动物体内,一旦环境条件适宜,病毒会随着宿主动物的大量繁殖和活动而增殖和扩散。一旦其中一种基因型被大量扩增并有机会感染动物和人,该基因型的流行就有可能发生。一种基因型可以只出现在一次流行中,也可以出现在多次流行中。如果病毒来源相同,则不会出现太大的变异。由于基因型的不同,病毒的致病能力不同,产生的流行强度和病死率必然不同。

从目前有限的研究只能初步作出一些推断,清楚地解释 CCHF 流行病学中出现的一些问题还有待

于进一步的调查和研究。

参 考 文 献

- 1 唐青,Prehaud C, Bouloy M, 等. 新疆出血热病毒 S 基因片段的测序和分析. 中华微生物学和免疫学杂志, 1999, 19: 461-465.
- 2 Anthony CM, Patricia AN. Comparison of the S RNA segments and nucleoprotein sequences of Crimean-Congo hemorrhagic fever, Hazara and Dugbe viruses. Virology, 1992, 189: 795-799.
- 3 Rodriguez LL, Maupin GO, Ksiazek TG, et al. Molecular investigation of a multisource outbreak of Crimean-Congo hemorrhage fever in the United Arab Emirates. Am J Trop Med Hyg, 1997, 57: 512-518.

(收稿日期 2001-11-30)

(本文编辑:尹廉)

· 短篇报道 ·

陆海空三军新兵基础训练期间军事训练伤的发生调查

龙泳 李远贵 黄久仪 欧阳浪

陆海空三军的新兵在入伍后,都要接受为期 3 个月的新兵基础训练,期间所发生的军事训练伤(军训伤)是导致战士患病和死亡的主要原因。选自 1998 年 1 月 1 日至 3 月 31 日参加基础训练的新兵,均为男性,年龄 16~21 岁,平均年龄(18.32±2.15)岁。其中陆军 1 142 人,空军 713 人,海军 592 人,共 2 447 人。陆军与空军每 4 周以连为单位,用统一的调查表对全部参训战士逐一筛检 1 次。海军为就诊登记法,战士受伤后在营军医处就诊时,由营军医和课题组成员共同做出诊断。所有调查均由课题组成员独立或参与完成。诊断标准参照《中国人民解放军军事训练伤诊断分类标准》及有关文献制定统一诊断标准。

调查结果军训伤的发生率陆军为 32.8%,空军 21.9%,海军 27.9%。陆海空三军开始训练后第 1~13 周均有军训伤发生,陆军和空军第 7 周达到发生高峰,海军第 8 周为发生高峰。陆海空三军的军训伤大多数均发生于下肢。陆军和空军中以小腿的损伤最为多见,海军以踝关节损伤最为多见(表 1)。陆军以过劳性损伤为主,海军以急性创伤性损伤为主,空军两种损伤分布均匀。

调查结果表明,陆海空三军军训伤的时间分布、发生高

峰大致相同,发生率不同,可能由于动作的掌握程度要求不同所致。陆海空三军的军训伤大多数均发生于下肢,但损伤的类型之间有差异,可能归因于训练条件的限制。预防军训伤的发生,可从 3 个方面着手:①在保障训练质量的前提下,适当的降低训练强度;②改善训练场地,尽量避免外因所致军训伤;③对受训部位进行适当的保护,将不同受训部位的训练项目穿插进行。

表 1 陆海空三军军训伤发生的部位分布

部位	陆 军		海 军		空 军	
	人次	构成比 (%)	人次	构成比 (%)	人次	构成比 (%)
小腿	195	51.8	25	15.0	66	37.1
踝关节	59	15.7	65	38.9	23	12.9
膝关节	25	6.7	23	13.8	44	24.8
足	65	17.3	16	9.6	0	0.0
手	0	0.0	16	9.2	24	13.5
腰	10	2.7	10	6.0	10	5.6
臂	10	2.7	7	4.2	0	0.0
面部	0	0.0	1	0.6	11	6.1
大腿	9	2.4	0	0.0	0	0.0
其他	2	0.7	4	2.7	0	0.0
合计	375	100.0	167	100.0	178	100.0

作者单位:710033 西安,第四军医大学预防医学系流行病学教研室(龙泳、李远贵、黄久仪);空军 38903 部队(欧阳浪)

(收稿日期 2002-03-27)

(本文编辑:段江娟)