

褐家鼠种群特征与汉坦病毒感染的关联分析

江佳富 吴晓明 左曙青 王日明 陈立泉 王炳才 敦哲 张洋河 郭天宇 曹务春

【摘要】 目的 了解汉坦病毒(HV)优势宿主褐家鼠感染 HV 的相关危险因素。方法 采集北京不同地区、生境捕获的褐家鼠,用统一的调查表记录宿主动物及环境特征,采用针对 HV M 基因片段的巢式 RT-PCR 法检测其带病毒情况,运用 SPSS 软件多因素非条件 logistic 回归分析。结果 在所调查的 10 种相关因素中,6 种与褐家鼠 HV 感染相关。多因素非条件 logistic 回归分析结果显示:成年鼠、处于繁殖期、体表皮肤有伤痕是褐家鼠 HV 感染的危险因素。雄性睾丸位于阴囊内与雄性 HV 感染有非常高的危险度(OR = 30.92)。发情期雄性个体的体表疤痕率高于非发情期个体(P = 0.049),两者的交互作用与 HV 感染相关有统计学意义(P < 0.001)。结论 从现场多途径观察研究证实:HV 在褐家鼠中存在平行传播,雄性的侵犯行为促进 HV 的传播。

【关键词】 汉坦病毒;褐家鼠;危险因素

Study on the association between hantavirus infection and *Rattus norvegicus* JIANG Jia-fu*, WU Xiaoming, ZUO Shu-qing, WANG Ri-ming, CHEN Li-quan, WANG Bing-cai, DUN Zhe, ZHANG Pan-he, GUO Tian-yu, CAO Wu-chun. *State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China
Corresponding author: CAO Wu-chun, Email: caowc@nic.bmi.ac.cn

【Abstract】 Objective To further understand the association of hantavirus (HV) harbored and transmitted in wild brown rats. **Methods** *Rattus norvegicus* (n = 570) were trapped in 10 sites in Beijing. RT-PCR was used to test rodent lung samples for hantavirus infection. Unconditional multivariate logistic regression analysis was performed, with PCR positive as the dependent variable and the characteristics of *Rattus norvegicus* population as independent variables. **Results** The overall HV prevalence in *Rattus norvegicus* was 9.1% (52/570). Significant association between HV infection in *Rattus norvegicus* and some biological characteristics of host population was observed. Adult *Rattus norvegicus* had a higher HV prevalence than juveniles. Males in the reproduction periods and rats with wounds were more likely to be infected with HV than others. **Conclusion** It was further confirmed that there existed parallel transmission of HV in *Rattus norvegicus* hosts. Aggression might be the primary mode of HV transmission among male *Rattus norvegicus*.

【Key words】 Hantavirus; *Rattus norvegicus*; Risk factors

汉坦病毒(HV)主要是由鼠类等啮齿动物传播的一类病原体,在我国主要引起肾综合征出血热(HFRS)。目前每年报告病例数仍居高不下,近些年来,以褐家鼠为主要传染源的家鼠型 HFRS 疫情发展尤为迅猛,并正向大中城市蔓延。北京地区 1984 年出现首例 HFRS 患者,其后 HFRS 疫情一直

处于间断偶发状态^[1]。1996 年后疫情急剧上升,2002 年报告病例达 200 余例,加之周边河北省、山东省是 HFRS 高发区,北京地区 HV 流行形势十分严峻。作为一种自然疫源性疾,特定地区宿主动物、流行毒株类型、宿主行为活动特征与 HV 流行关系密切,有效控制和预防 HV 感染也依赖于对这些宿主生态学的深入了解。近几年有关北京地区 HV 及其宿主动物生态学特征的一些调查已经明确:褐家鼠对于 HV 传播与流行起着重要的优势作用^[1-5]。因此,本研究在横断面调查北京地区不同生境内以鼠类为主的小型啮齿动物宿主生物群落及其 HV 感染特点的基础上,以野外现场观察结合先进试验检测技术,继续深入对北京地区 HV 重要优势宿

基金项目:国家自然科学基金资助重大项目(30590374);北京市自然科学基金重点资助项目(7021004,06G0668)

作者单位:100071 北京,军事医学科学院微生物流行病研究所病原微生物与生物安全国家重点实验室(江佳富、吴晓明、左曙青、张洋河、郭天宇、曹务春);北京市东城区疾病预防控制中心(王日明、陈立泉);北京市海淀区疾病预防控制中心(王炳才、敦哲)

通讯作者:曹务春,Email:caowc@nic.bmi.ac.cn

主——褐家鼠 HV 感染的相关危险因素做进一步分析,以了解优势宿主 HV 感染及传播与宿主种群特征之间的关联,探究 HV 在褐家鼠间传播的规律,提高预测 HV 传播至人群的危险性的能力。

材料与方 法

1. 标本来源:褐家鼠标本采集于北京地区 7 个区县[昌平区(南口)、海淀区(苏家坨、温泉、黑山扈和西山南)、东城区、丰台区(花乡、南苑)、门头沟区(东灵山)、延庆县(康庄)、房山区(陀里)]12 类不同的生境。每个调查点包括 2~4 种生境,生境类型包括养殖场(养牛场、养猪场、养狗场和家禽养殖场)、垃圾场(站)、单位食堂、餐饮行业、蔬菜基地、工地、工棚、城区农贸市场、人群(机场和火车站)及农副产品集散地。采集时详细记录生境和褐家鼠生物学等特征。无菌解剖获取鼠肺组织等内脏,置于液氮中冻存输送备检。

2. 宿主动物测度指标、亚种群划分:测度记录外部形态特征(皮毛、体重、体长、尾长、后足长、耳高)等生物学指标。体重、体长按参考文献[6]进行分级。根据雄性睾丸在腹腔中或在阴囊中的位置判定生殖状态,依据雌性阴道、乳头外观状态及怀孕和哺乳状况判定繁殖情况。详细调查记录体表损伤情况。综合性成熟状态、体长和体重将褐家鼠分为 3 个亚群体:幼鼠、亚成鼠和成鼠。

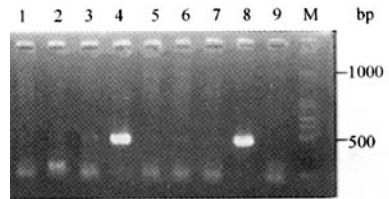
3. 褐家鼠携带 HV 状况检测:采用 Trizol 一步法提取标本肺组织总 RNA。Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司,遵循说明书操作,获得总 RNA 室温干燥后加入 10 μl 0.2% DEPC 水溶解待逆转录。采用 HV 属特异 P14 引物逆转录,AMV 逆转录酶和 RNA 酶抑制剂均购自美国 Promega 公司。采用巢式 PCR 对逆转录产物进行扩增。引物和扩增条件按参考文献[7],引物序列与位置见表 1,PCR 反应体系为:10 × PCR 缓冲液 3.0 μl, Taq 酶 1 U, dNTPs(均购自北京天为时代公司)各 1 mmol/L, MgCl₂ 1.5 mmol/L,模板 3 μl,第二轮扩增模板为第

一轮扩增产物 10 倍稀释液,补双蒸水至总体积 30 μl。两轮扩增条件均为:94℃ 预变性 4 min,94℃ 15 s,54℃ 20 s,72℃ 20 s,38 个热循环,后 72℃ 7 min,在 PE2700PCR 仪上进行,产物检测应用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,电泳后在凝胶成像系统(法国 SIM 公司)观察、照相。

4. 统计学分析:运用 SPSS 11.5 软件建立数据表,对各项危险因素分别予以分级,对各项因素进行 χ² 检验或单因素非条件 logistic 回归分析,各研究因素的分析均假定以第一水平为参照(OR = 1),其他水平与之进行比较并计算 OR 值。筛选出有统计学意义的因素(以 P < 0.05 为有统计学意义水平),再以 HV 感染状况为因变量,对单因素分析中有统计学意义的因素进行多因素非条件 logistic 分析。

结 果

1. 单因素分析:对 570 只褐家鼠进行了 HV 检测,结果共获得 52 份阳性标本,扩增阳性 M 片段 443 bp(图 1),对 570 只鼠个体的生物学特征、采集时间和生境与 HV 感染状况首先进行了单因素分析,结果显示:在所测的 10 个调查因素中,除雌雄性别、采集季节、雌性生殖状况 3 个因素外,其他 7 个因素与 HV 感染的关联有统计学意义,其中采集生境、雌雄综合繁殖状态、鼠龄因素与 HV 感染具有统计学意义,体重、体长、雄性睾丸位置(生殖状况)和体表受伤情况 4 个因素与 HV 感染关联具有统计学意义(P < 0.001)(表 2)。



1: NC; 4 和 8 阳性标本扩增,其他示阴性样品; M: 100 bp Marker

图1 褐家鼠 HV 检测 RT-PCR 扩增产物 1.2% 琼脂糖电泳结果

表1 研究中所用引物一览表

引物类型	名称	序 列	位置*	扩增片段
逆转录引物	P14	TAGTAGTAGACTCC	1~14	L M S(+)
M 片段外引物	HTV-MFO	AAAAGTAGGTGITAYATCYTIACAATGTGG	1910~1939	M(+)
	HTV-MRO	GTACAICCTGTRCCIAACCC	2373~2354	M(-)
SEO 型引物	SEO-MF	GTGGACTCTTCTTCTCATTATT	1936~1957	M(+)
	SEO-MR	TGGGCAATCTGGGGGGTTGCATG	2331~2353	M(-)

* 为汉滩型 76-118 株 M 片段对应位置

表2 北京地区褐家鼠 HV 自然感染单一危险因素分析

变量 分级	检测 只数	阴性 只数	阳性 只数(%)	P 值	OR 值(95% CI)
采集生境				0.036	
食堂饭店	186	179	7(3.8)		1.00
工地工棚	59	53	6(10.2)	0.039	3.31(1.07~10.34)
养殖场	144	125	19(13.2)	0.003	3.95(1.61~9.68)
垃圾场	72	62	10(13.9)	0.005	4.19(1.53~11.49)
蔬菜基地	72	63	9(12.5)	0.012	3.71(1.33~10.39)
农贸市场	20	20	0(0.0)	0.998	
口岸枢纽	17	16	1(5.9)	0.659	1.63(0.19~14.04)
采集季节				0.386	
夏冬	184	170	14(7.6)		1.00
春秋	386	348	38(9.8)	0.386	1.326(0.69~2.51)
性别				0.706	
雌	184	166	18(9.8)		1.00
雄	386	352	34(8.8)	0.706	0.89(0.49~1.62)
体重(g)				<0.001	
<60	146	143	3(2.1)		1.00
60~	371	335	36(9.7)	0.007	5.12(1.55~16.90)
>180	53	40	13(24.5)	<0.001	15.49(4.21~57.04)
鼠龄				0.012	
幼鼠	141	138	3(2.1)		1.00
成鼠	288	254	34(11.8)	0.018	5.47(1.55~19.36)
老年鼠	141	126	15(10.6)	0.003	6.15(1.85~20.41)
体长(cm)				<0.001	
<12	156	152	4(2.6)		1.00
12~	171	164	7(4.1)	0.448	1.62(0.47~5.66)
15~	195	165	30(15.4)	<0.001	6.74(2.32~19.58)
>18	44	33	11(25.0)	<0.001	12.66(3.79~42.25)
雌生殖状况				0.111	
间情期	160	146	16(10.0)		1.00
发情期	5	4	1(20.0)	0.016	20.85(1.77~244.68)
怀孕期	15	14	1(6.7)	0.784	0.75(0.09~6.09)
哺乳期	4	4	0(0.0)	0.999	0.00
睾丸位置				0.001	
腹腔内	287	268	19(6.6)		1.00
阴囊内	99	84	15(15.2)	0.001	3.36(1.64~6.88)
综合生殖				0.020	
间情期	448	417	31(6.9)		1.00
繁殖期	122	101	21(17.2)	0.002	2.79(1.54~5.07)
体表伤痕				<0.001	
无	526	489	37(7.0)		1.00
有	44	29	15(34.1)	<0.001	6.84(3.37~13.86)

2. 多因素非条件 logistic 回归分析:为明确在以上单因素分析中有统计学意义的危险因素对构成 HV 感染的影响,将与感染相关有统计学意义的 7 个因素(除雄性睾丸位置因素外)引入多因素非条件 logistic 回归分析,结果显示:采集生境未能进入方程,体长因素与 HV 感染 OR 值较低,由于体长与体重同时受营养状况的影响具有同步、交互作用,在体重先进入方程的前提下,后者对方程的贡献率较低,通过逐步回归法,体长因素没有统计学意义。但考虑不同生境的营养状况,相比之下,综合评价鼠个体的指标——鼠龄因素更符合生物学意义,鼠龄与 HV 感染的 OR 值也较高。另外,综合繁殖状态以

及褐家鼠体表皮皮肤受损情况与 HV 感染相关性显著,相对危险度也较高,是褐家鼠之间 HV 感染与传播的重要危险因素(表 3)。

表3 多因素非条件 logistic 分析褐家鼠 HV 感染的
相关的危险因素

调查因素	P 值	OR 值(95% CI)
鼠龄(成/幼)	0.025	6.53(2.01~21.19)
体重(>60 g)	0.016	5.01(1.49~16.81)
繁殖状态(繁殖期)	0.001	9.63(3.11~29.84)
体表伤痕(有)	<0.001	5.69(2.64~12.26)

在调整性别因素后,对雄性 HV 感染与上述有意义的 6 个因素(除综合繁殖状况因素外)以及睾丸位置进行多因素非条件 logistic 回归分析,同样发现:除采集生境未能进入方程外,其他因素均有统计学意义,不同水平体重个体的 HV 感染的危险度差异也有统计学意义,体重 60~180 g 的群体感染率低于体重 >180 g 的群体,雄性老年鼠 HV 感染的相对危险度值更高;睾丸位于阴囊中对于 HV 感染有高相对危险度 (OR = 30.92, 95% CI: 7.59~125.83) (表 4)。

表4 雄性褐家鼠 HV 感染的相关危险因素

调查因素	P 值	OR 值(95% CI)
体重(60~180 g)	0.034	15.11(1.10~425.14)
体重(>180 g)	0.018	23.93(1.93~331.48)
鼠龄(成/幼)	0.027	5.32(1.21~23.37)
体表伤痕(有)	0.016	4.22(1.31~13.55)
睾丸位置(阴囊)	<0.001	30.92(7.59~125.83)

3. 雄性褐家鼠繁殖期与疤痕及其 HV 感染的关联分析:进一步对雄性褐家鼠繁殖期与疤痕及其 HV 感染的关联进行了分析,结果发现发情期雌性个体的体表疤痕率高于非发情期个体,两者差异有统计学意义 ($\chi^2 = 3.579, P = 0.049$) (表 5),说明由于发情期个体行为趋于活跃和侵犯,更易受伤。另外两者对 HV 感染有交互作用,经分析,两者的交互作用与 HV 感染相关有统计学意义 ($P < 0.001, OR = 15.043, 95\% CI: 3.829 \sim 19.097$)。

表5 雄性褐家鼠不同发育期体表损伤率的比较

睾丸的位置	体表疤痕只数		合计	疤痕率(%)
	无	有		
阴囊内	87	11	98	11.2
腹腔内	271	16	287	5.5
合计	358	27	385	7.0

注: $\chi^2 = 3.579, P = 0.049$

讨 论

宿主动物感染携带 HV 的特点,国内外诸多学者也作了一定的研究^[7-10],发现鼠个体生物学特性、体表损伤等与 HV 感染存在关联,但这些结果因 HV 型别以及宿主种类而有所不同,并且主要集中在美洲汉坦病毒肺呼吸综合征相关病毒的宿主(如鹿鼠)和欧洲的欧鼯。我国的不少野外 HV 相关危险因素的分析多是对所有宿主,把所有宿主混杂在一起进行分析,没有考虑不同宿主的习性以及 HV 感染差异,少数单一宿主分析只是针对黑线姬鼠,且样本量一般较小,褐家鼠 HV 感染的相关报道较少。

一般认为雄性鼠个体之间为了争夺食物、配偶、活动领域等相互撕咬、抓斗而更容易造成 HV 的传播,同时雄鼠活动量大、范围广,所以 HV 感染分布表现在性别差异上^[8,11]。但有研究报道:野栖鼠 HV 感染雌雄差异与季节有关,如比利时欧鼯雄性带病毒率在秋季高于雌性,但在冬春季差异无统计学意义,其原因认为是冬季共巢时间长,从而趋向雌雄同样的传播率^[12]。本研究发现,不同雌雄性别间 HV 带病毒率没有差异。本研究数据经不同季节分层分析,发现不同性别的 HV 感染率差异均无统计学意义,这可能与家栖、野栖宿主的生态习性有关。

本研究从体重、体长、年龄三个因素反映的褐家鼠个体差异与 HV 传播均具相关,其中体重大于 60 g 的成年褐家鼠和大于 180 g 的老年鼠带病毒率高。Abbott 等^[13]研究也发现标记重捕的雄性鹿鼠有 60% 血清学阳性是成年鼠。进一步说明宿主动物带病毒率与鼠龄大小有着一定的相关性。本研究的结果基本与此一致。体长大于 15 cm 的褐家鼠 HV 带病毒率也显著高于其他大小的个体。对体重、体长和鼠龄因素交互作用进行分析,也发现雄性体长大于 18 cm 且体重大于 60 g 的个体感染 HV 的危险度更高。

另外,本研究表明发情期的个体更易感染,揭示这期间的褐家鼠活动习性更易导致 HV 传播,但调整性别因素后,单因素分析中雌性生殖状况与 HV 感染没有统计学意义,一方面可能反映雌性个体在繁殖期的行为和安静期差异不明显,另一方面也可能与哺乳期和发情期等因素水平样本数少(≤ 5)有关。但是发情期雄性(睾丸位于阴囊中)HV 带病毒率(15.2%)高于安静期(睾丸位于腹腔中),其雌性

生殖状况与 HV 感染相关性仍然显著。进一步表明发情期雌雄总体 HV 容易传播,但其主导作用的应该是雄性的活跃性和一些侵犯行为促进 HV 传播。

针对有皮肤损伤的宿主感染 HV 的研究表明:体表有疤痕的褐家鼠个体 HV 带病毒率为 34.1%,远远高于没有疤痕的其他个体(7%)。Hinson 等^[11]最近的研究也表明:野外雌性、有疤痕、睾丸激素浓度高的褐家鼠个体具有较高的带病毒率,并且指出攻击侵犯行为是雌性之间 HV 传播的主要方式。另外,从病毒感染反过来对行为的影响来看, Klein 等^[14]实验观察到:感染 HV 的雄性大白鼠在急性感染期侵犯行为的频率和强度增加。所以总体说明, HV 感染与性成熟期的出现、攻击行为高度关联,并且两者互为加强,从而也更加支持了 HV 在褐家鼠之间平行传播的证据。

参 考 文 献

- 1 张秀春,胡经畲,周绍莲,等. 北京地区 1996 至 2000 年肾综合征出血热流行状况研究. 中国媒介生物学及控制杂志, 2001, 12: 218-221.
- 2 江佳富,吴晓明,曹务春,等. 北京不同生境鼠类及其感染汉坦病毒的调查. 中国媒介生物学及控制杂志, 2004, 15: 430-434.
- 3 江佳富,汤芳,曹务春,等. 北京昌平鼠间汉坦病毒感染时间动态变化的调查. 中国人兽共患病杂志, 2005, 21: 693-698.
- 4 左曙青,张洋河,吴晓明,等. 北京市褐家鼠中汉坦病毒的分离和初步鉴定. 中华微生物学和免疫学杂志, 2005, 25: 367-368.
- 5 江佳富,吴晓明,左曙青,等. 北京褐家鼠种群遗传多态性及其与汉坦病毒分布关系的研究. 中国媒介生物学及控制杂志, 2005, 16: 358-363.
- 6 张知彬,王祖望. 农业重要害鼠的生态学及控制对策. 北京:海洋出版社, 1998.
- 7 王世文,杭长寿,王华,等. 我国汉坦病毒基因型和基因型的分布研究. 病毒学报, 2002, 18: 211-216.
- 8 Childs JE, Korch GW. Epizootiology of hantavirus infection in Baltimore: isolation of a virus from Norway rat and characteristics of infected rat population. Am J Epidemiol, 1987, 126: 55.
- 9 Glass GE, Childs JE, Korch GW, et al. Association of intraspecific wounding with hantaviral infection in wild rats (*R. norvegicus*). Epidemiol Infect, 1988, 101: 459-472.
- 10 王克霞. 流行性出血热鼠间相互传播研究. 中国人兽共患病杂志, 2002, 18: 102.
- 11 Hinson ER, Shone SM, Zink MC, et al. Wounding: the primary mode of Seoul virus transmission among male Norway rats. Am J Trop Med Hyg, 2004, 70: 310-317.
- 12 Escutenaire S, Chalou P, Verhagen R, et al. Spatial and temporal dynamics of Puumala hantavirus infection in red bank vole (*Clethrionomys glareolus*) Populations in Belgium. Virus Res, 2000, 67: 91-107.
- 13 Abbott KD, Ksiazek TG, Mills JN, et al. Long-term hantavirus persistence in rodent populations in central Arizona. Emerg Infect Dis, 1996, 5: 113-117.
- 14 Klein SL, Zink MC, Glass GW. Seoul virus infection increase aggressive behaviour in male Norway rats. Anim Behav, 2004, 67: 421-429.

(收稿日期: 2005-07-28)

(本文编辑: 张林东)