

深圳市 2005 年鼠间汉坦病毒感染的鼠情监测及病毒株 SZ2083 的分离鉴定

阳帆 古丽巴哈尔 刘建军 杨洪 张小岚 何建凡 梁焯南 张顺祥
姚芊芊 翁景清 何雅青

【摘要】 目的 了解深圳市啮齿动物自然感染汉坦病毒(HV)状况和病毒型别,为制订防控措施提供科学依据。方法 收集宿主动物资料,采用酶联免疫吸附试验和间接免疫荧光试验分别检测鼠血清特异性总抗体和 IgG 抗体,直接免疫荧光检测鼠肺汉坦病毒抗原。将阳性鼠肺标本接种长爪沙鼠分离 HV,阳性鼠肺标本提取病毒 RNA,应用型特异性引物进行逆转录-巢式 PCR 扩增及核苷酸序列测定从而进行分型鉴定。结果 共捕获鼠形动物 472 只,其中以褐家鼠为优势鼠种,带病毒率为 9.96%。鼠血标本总抗体阳性 76 例,IgG 阳性 56 例。成功分离到 1 株 HV,命名为 SZ2083。经逆转录-巢式 PCR 扩增并进行序列测定显示为汉城(SEO)型。序列比较分析发现 SZ2083 核苷酸序列与 L99 同源性为 97%,而与 HTN 76-118 株的同源性仅为 76%。结论 深圳市存在着以家鼠型为主的肾综合征出血热自然疫源地。

【关键词】 汉坦病毒;肾综合征出血热;监测

Surveillance on natural infection of rodents with Hantavirus in Shenzhen city and identification of a Hantavirus strain SZ2083 YANG Fan*, GULI Bahaer, LIU Jian-jun, YANG Hong, ZHANG Xiao-lan, HE Jian-fan, LIANG Zhuo-nan, ZHANG Shun-xiang, YAO Ping-ping, WENG Jing-qing, HE Ya-qing. *Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518020, China
Corresponding author: LIU Jian-jun, Email: junii8@126.com

【Abstract】 Objective For clarifying the situation of the natural infection of rodents having hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) virus and to type Hantavirus (HV) using molecular technique in Shenzhen city in 2005, and offering guidance for prevention and control of HFRS. **Methods** Data on the host animals was collected from the city of Shenzhen. ELISA and indirect immunofluorescent antibody (IFA) test were applied to the specific antibodies against HV in the sera of captured rats. Direct immunofluorescence assay was adopted to determine HFRS antigens and the lung tissues of the HV infected rats were inoculated into *Meriones unguiculata* to isolate HV. The whole viral RNA was extracted from the lung tissues of the HV infected rats and amplified the partial M fragments with RT-nested-PCR, using the HV genotype specific primers. The amplified genes were then sequenced, and subjected to genotyping and homology analysis. **Results** 472 rodents were captured from Shenzhen in 2005. Surveillance on rats demonstrated 9.96% rats carrying HV (with a density of 8.25%) and the main host was *Rattus norvegicus*. In the blood samples of rats, anti-HV IgG antibodies were detectable in 56 cases by IFA, and proved to be positive in 76 cases by ELISA. We successfully isolated a HV strain designated as SZ2083 from *Rattus norvegicus* for the first time in Shenzhen and was identified to SEO type by RT-nested-PCR. Compared with the coding region of the M gene of HV L99 virus strain, the homologies of nucleotide among them were 97%, but the homology was 76% of the SZ2083 with HTN 76-118 virus strain. **Conclusion** Results showed the existence of natural epidemic areas of HFRS in Shenzhen city. Based on the results of sequencing, it is possible that the Seoul strain of HV might be the predominant serotype of virus harbored.

【Key words】 Hantavirus; Hemorrhagic fever with renal syndrome; Surveillance

作者单位:518020 深圳市疾病预防控制中心(阳帆、刘建军、杨洪、张小岚、何建凡、梁焯南、张顺祥、何雅青);新疆哈密地区疾病预防控制中心(古丽巴哈尔);浙江省疾病预防控制中心(姚芊芊、翁景清)

通讯作者:刘建军,Email:junii8@126.com

深圳市自从出现肾综合征出血热(HFRS)病例以来疫情范围不断扩大,且一直呈上升趋势,成为深圳市的主要传染病之一。由于不同血清型的汉坦病毒(HV)有着不同的原始宿主动物,分布于世界不同的地区,其防控措施及对人类的致病性也各有不同。因此,搞清当地流行汉坦病毒的血清型别是采取有效防制策略的先决和必要条件。为控制疫情,预测今后其流行趋势,制订有效的防制措施提供科学依据,据此对 2005 年深圳市 HFRS 鼠情监测结果进行分析,明确了深圳市存在着以家鼠型为主的 HFRS 自然疫源地。并首次在长爪沙鼠体内成功分离到 1 株 SEO 型 HV 株,为进一步研究深圳市 HFRS 的分子流行病学情况奠定了坚实的基础。

材料与方 法

1. 鼠类来源:在深圳市 4 个行政区设 25 个调查点,分布在罗湖、福田、南山和宝安区。采用笼日法布点,由深圳市疾病预防控制中心及其下属单位组织布笼捕鼠。

2. 标本采集:将捕获的鼠类经分类鉴定和登记后,以无菌操作解剖取鼠肺,置 -80°C 超低温冰箱保存待检。活鼠股动脉放血,分离血清,样本置 -20°C 保存备用。

3. 血清学检测:ELISA 双抗原夹心法检测 HV 总抗体^[1]。重组 HV 核蛋白抗原由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所提供。间接免疫荧光(IFA)检测 HV IgG 抗体^[1]。HFRS 病毒 Vero E6 细胞抗原片和兔抗鼠荧光抗体血清均购自浙江省疾病预防控制中心。

4. 鼠肺组织抗原检测:采用直接免疫荧光法。将采集的鼠肺标本在无菌条件下分切,制成 $4\sim 10\ \mu\text{m}$ 厚的冷冻切片,丙酮固定 10 min 后吹干。玻片上滴加用伊文思兰-PBS 稀释的 HV 直接荧光血清(购自浙江省疾病预防控制中心) $15\ \mu\text{l}$ /孔,置湿盒内 37°C 水浴 50 min。反应后的玻片用 pH 7.2, $0.01\ \text{mol/L}$ PBS 震荡轻洗 3 次,每次 $3\sim 5\ \text{min}$,吹干,封片,荧光显微镜观察结果。

5. HV 分离鉴定:HV 抗原阳性的鼠肺标本进行分离。4 周龄左右的长爪沙鼠购自浙江省实验动物中心,分离方法采用长爪沙鼠腹腔接种^[2],实验于浙江省疾病预防控制中心出血热重点实验室完成。先用生理盐水冲洗两次后,每份加 $4\sim 5\ \text{ml}$ PBS,用组织研磨器研磨, $2000\ \text{r/min}$ 离心 15 min,取上清腹腔

接种长爪沙鼠, $0.5\ \text{ml}$ /只,每个样品接种 4 只,置隔离动物室内饲养。12 d 后放血处死沙鼠,无菌取肺,冷冻切片做直接免疫荧光检查特异性病毒抗原鉴定阳性与否。阴性鼠肺需再传两代,确定为阴性后弃之。

6. HV 分型:

(1) 病毒 RNA 的提取:用浙江天元生物药业股份有限公司生产的双价 HFRS 灭活疫苗作为阳性对照,产品批号为 200412053。阳性鼠肺病毒 RNA 及疫苗 RNA 的提取按照德国 QIAGEN 公司试剂盒说明书操作,于 -80°C 保存待用。

(2) 引物:根据 GenBank 中 HV 标准株 76-118 (M14627) 和 80-39 (S47716) 序列,并参照其他毒株的序列设计逆转录-巢式 PCR 所用引物。① 汉滩型病毒 (HTN) 与汉城型病毒 (SEO) 通用引物:MF: $5'\text{-GGA CCT GGT GCC AGT TGT GAA GC-3}'$, 1190~1212 +; MR: $5'\text{-ACC TCA CAA AC CAT TGA ACC-3}'$, 1661~1680 -; ② 结合设计的型特异性引物分型:HTN 型 (I 型) 特异性引物:HTN GIF: $5'\text{-TGC AAC GGG CAG AGG AAA GT-3}'$, 1343~1362 +; HTN GIR: $5'\text{-GTA CTG ATT TTA GCC TAT CTC-3}'$, 1604~1625 -; SEO 型 (II 型) 特异性引物:SEO GIF: $5'\text{-TGT AAT GGT CAG AAA AAG AC-3}'$, 1343~1362 +; SEO GIR: $5'\text{-CGT AGA ATG GCT TTG AAT CGG TT-3}'$, 1607~1629 -; 以上引物均由上海生工生物工程公司合成。

(3) 反转录与第一轮 PCR AMV 逆转录酶、Taq DNA 聚合酶、Rnase Inhibitor 酶等均购自 TaKaRa 公司。UNG 酶 ($1\ \text{U}/\mu\text{l}$) 购自晶美公司。先逆转录合成 cDNA, 然后进行巢式 PCR。将上述提取的 RNA 取 $10\ \mu\text{l}$ 于 EP 管中,加入 $1\ \text{mmol/L}$ dNTP Mixture, AMV 酶 $5\ \text{U}$, Rnase Inhibitor $20\ \text{U}$, 反转录引物 MF 和 MR 各 $250\ \text{nmol/L}$, $5\times\ \text{buffer}$ $4\ \mu\text{l}$, 补加 DEPC 水至总体积为 $20\ \mu\text{l}$ 。 42°C 反应 1 h, 95°C 3 min 灭活逆转录酶。 -20°C 保存备用。巢式 PCR 第一轮反应。取反转录产物 $5\ \mu\text{l}$ 作为第一次 PCR 扩增的模板,再加入 $10\times\ \text{PCR buffer}$ $5\ \mu\text{l}$, $2.5\ \text{mmol/L}$ dNTP Mixture $4\ \mu\text{l}$, Taq 酶 $0.5\ \text{U}$, 引物 MF 和 MR 各 $200\ \text{nmol/L}$, 补加去离子水至总体积 $50\ \mu\text{l}$ 。其参数为 95°C 变性 4 min, 94°C 30 s, 52°C 30 s, 72°C 30 s, 共循环 35 次后 72°C 再延伸 10 min。

(4) 巢式 PCR:取第一轮 PCR 产物 $5\ \mu\text{l}$, 加入 $10\times\ \text{PCR buffer}$ $5\ \mu\text{l}$, $2.5\ \text{mmol/L}$ dAUGTP $4\ \mu\text{l}$,

UNG 酶(1 U/ μ l) 1 μ l, Taq 酶 0.5 U, 分型引物 GIF 和 GIR 各 200 nmol/L, 补加去离子水至总体积 50 μ l。其参数为 37 $^{\circ}$ C 15 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 4 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 52 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共循环 35 次后 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。

(5) PCR 产物的鉴定及测序分析: 用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。PCR 产物由 Invitrogen 公司纯化后测序。测序结果应用 DNAMAN 和 DNASTar 软件进行排序、比较分析建立系统进化树, 其他已知参考序列片段来源于 NCBI 的 GenBank。

结 果

1. 鼠种构成: 本次调查共布放鼠笼 5813 个, 有效笼 5720 个, 共捕获 4 个鼠种: 褐家鼠、黄胸鼠、臭鼯鼠、板齿鼠, 鼠密度为 8.25% (472/5720), 其中以褐家鼠为优势鼠种, 捕获 412 只, 占 87.29%; 其次为黄胸鼠, 占 8.05%; 臭鼯鼠和板齿鼠分别占 4.45%、0.21%。

2. HFRS 抗体检测结果: 用 ELISA 法检测 HFRS 总抗体总阳性率为 16.78% (76/453), 褐家鼠为最高 18.20% (73/401)。HFRS IgG 抗体总阳性率为 12.36% (56/453), 以褐家鼠为最高 13.72% (55/401), 见表 1。且用 ELISA 和 IFA 方法均表明臭鼯鼠中存在着 HV 感染, 这是在深圳市首次得到证实。

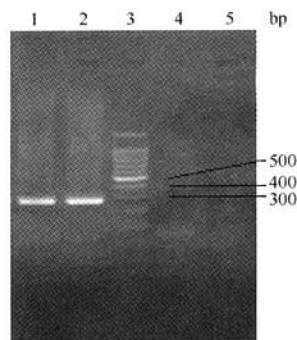
表 1 2005 年深圳市 HFRS 监测鼠血抗体检测结果

鼠种类	鼠血清 HV 总抗体(ELISA)			鼠血清 HV IgG 抗体(IFA)		
	检查数 (份)	阳性数 (份)	感染率 (%)	检查数 (份)	阳性数 (份)	感染率 (%)
褐家鼠	401	73	18.20	401	55	13.72
黄胸鼠	34	1	2.94	34	0	0.00
臭鼯鼠	17	2	11.76	17	1	5.88
板齿鼠	1	0	0.00	1	0	0.00
合计	453	76	16.78	453	56	12.36

3. 鼠肺 HV 抗原检测结果: 鼠血清 HV 抗体是感染的一个重要指标, 所以我们先用血清学方法检测 HFRS 抗体进行初筛。选择鼠血清总抗体阳性的鼠肺共 76 份, 冷冻切片做直接免疫荧光检测。镜检发现黄绿色特异性荧光颗粒呈蚁状散在分布。抗原阳性标本共 47 份, 带病毒率为 9.96% (47/472)。以褐家鼠阳性率最高, 阳性标本 44 份, 阳性率为 10.68% (44/412)。黄胸鼠阳性鼠肺标本 1 份, 臭鼯鼠阳性鼠肺标本 2 份, 阳性率分别为 2.63% (1/38)、

9.52% (2/21)。表明当地鼠类中存在有 HFRS 病毒的自然感染。

4. 病毒分离及分型: 取 HV 抗原阳性的鼠肺标本研磨后接种沙鼠, 12 d 后取鼠肺做直接免疫荧光检测。结果编号为 2083 的 4 只长爪沙鼠肺均检测到荧光, 证明 HV 抗原阳性, 成功分离到 1 株 HV。这是深圳市首次从长爪沙鼠中成功分离到 HV 株。提取鼠肺 HV RNA 后进行 RT-nested-PCR 扩增分型, 产物经琼脂糖凝胶电泳后可见用 SEO GIF/SEO GIR 作为内套式引物得到一条约 287 bp 的片段(图 1), 与目的基因大小一致。而用 HTN GIF/HTN GIR 为内套式引物未得到目的带。表明该病毒株为 SEO 型 HV, 命名为 SZ2083 株。其余 HV 抗原阳性的鼠肺标本均未见 HTN 型阳性标本。



1. SEO 型分型引物扩增疫苗阳性对照; 2. SEO 型分型引物扩增 2083; 3. Marker 100 bp DNA ladder; 4. HTN 型分型引物扩增 2083; 5. 阴性对照

图 1 型特异性逆转录-巢式 PCR 对鼠肺标本扩增结果

5. SZ2083 株 PCR 产物的测序结果: 对 SZ2083 株 PCR M 片段部分核苷酸产物进行了序列测定, 测序结果去掉引物和附近序列信息, 实际比较的核苷酸序列为 240 bp。选取国际标准株 76-118、80-39 和国内外分离到的代表株 Z10、A9、Z37、ZT10、IR461、L99、R22、HB55、Gou3-e5、Gou3、Seoul 为比较毒株进行比较。从序列测定结果分析, SZ2083 与 SEO 型国际标准株 80-39 的同源性较近为 96%, 与国内应用疫苗株 L99 最高为 97%, 而与 HTN 型国际标准株 76-118 同源性较低为 76%, 表明为 SEO 型 HV。

6. 系统发生树分析: 进化树分析结果可见 SZ2083 与中国代表株 Z37、ZT10、R22、HB55 和 L99 处于同一分支(图 2)。这进一步证明了我们从深圳褐家鼠鼠肺中分离到的病毒株为 SEO 型 HV 株。

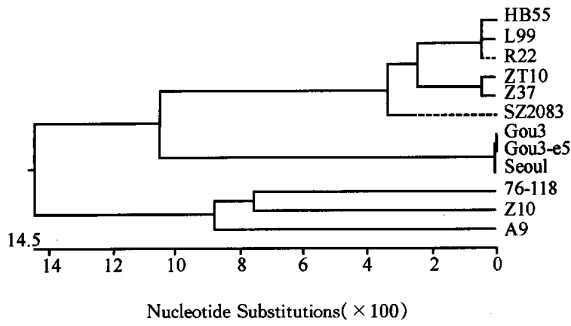


图2 SZ2083 与其他 HV 株的系统发生树

讨 论

HFRS 是由 HV 引起的以鼠类为主要传染源的自然疫源性疾病,是以发热、出血、肾脏损害为主要临床特征的急性病毒性传染病。近年来,深圳市的 HFRS 病例呈上升趋势。由于呈散发状态,对于其媒介生物种类、感染率以及病原情况的了解尚处在空白。鉴于此,2005 年 6 月我们开展了深圳市 HFRS 疫源地调查,并在此基础上开展了病原分离及鉴定工作。从 2005 年鼠种密度及感染率监测结果表明,褐家鼠为优势鼠种,带病毒率为 9.96%,从而证实了该地为自然疫源地。而黄胸鼠、臭鼯鼯阳性率分别为 2.63%、9.52%。说明深圳市的 HFRS 是以褐家鼠为主要传染源的家鼠型出血热的可能性较大。根据鼠类的生活习性表明,褐家鼠是宅区的优势鼠种,且鼠密度和鼠带病毒率的高低与人群发病率基本处于稳定水平且呈正相关关系^[1]。这就提示我们要控制和减少 HFRS 的发生,就必须大力开展灭鼠运动,迅速降低鼠密度,只有使鼠密度长年控制在 2% 以下,才能有效控制 HFRS 的流行^[3]。

病毒分离作为病原学的研究手段,是实验室中最常用也是最重要的技术。HV 分离技术早在 20 世纪 80 年代已经建立,到现在已相对成熟,虽然如此,但分离率并不高,特别对于低病毒含量的标本,或者毒株毒力较弱的标本。本次在长爪沙鼠中分离毒株对于深圳地区在 HV 动物分离方面积累了经验。HV 不同型别具有宿主选择性,深圳市鼠中分布以褐家鼠为优势种,且为主要带病毒鼠种。因此,在该地区 HV 研究中,褐家鼠体内所携带的毒株具有一定代表性。

对 HV 的分型早期多用空斑减少中和试验 (PRNT),由于有的病毒空斑产生不明显或病毒难

以分离,且该实验存在操作繁琐、费时等因素,致使 PRNT 分型技术难以得到广泛的应用。病毒基因组核苷酸序列的测定已广泛应用于 HV 的分子进化研究和病毒分型的研究^[4]。并且用病毒基因组核苷酸序列分析法对病毒进行分型与血清学分型结果基本一致^[5],近年来用该法进行 HV 的基因分型研究,已报道发现了许多新的病毒株、病毒型及病毒亚型^[6-8]。本研究经序列测定及比较分析,明确深圳市病毒株 SZ2083 为 SEO 型 HV,与 L99 的同源性最高达到 97%,核苷酸差异 < 5%。这些结果为本市 HFRS 疫源地性质的确定提供了可靠的科学依据。

本次监测所获得的 HV 抗原阳性鼠肺标本将继续用分子生物学方法确定其基因型别,该工作目前尚在进行中。建立病毒分离技术,通过对不同来源宿主携带毒株的分析,可了解病毒在不同宿主中的发展动态及变异特性,同时也可为该病的防制、疫苗的研究提供科学依据。

(致谢:浙江省疾病预防控制中心出血热重点实验室的所有工作人员)

参 考 文 献

- 1 宋干,主编.卫生部疾病预防控制司.流行性出血热防治手册.第 2 版.北京:人民卫生出版社,1998.
- 2 朱智勇,姚顺勇,傅桂明,等.长爪沙鼠是流行性出血热病毒敏感的实验动物.微生物学报,1984,24:92-95.
- 3 邓昭明.控制鼠密度对预防流行性出血热发病的研究.中国公共卫生,1992,5:227.
- 4 Monroe MC, Morzunov SP, Johnson AM, et al. Genetic diversity and distribution of Peromyscus-borne Hantaviruses in North America. Emerging Infectious Disease, 1999, 5: 75-86.
- 5 Puthavathana P, Dobbs M, Baek LJ, et al. Comparison of nucleotide sequence among hantaviruses belonging to the same serotype: an analysis of amplified DNA by thermal cycle sequencing. Virus Res, 1993, 30:161-169.
- 6 Hua W, Kumiko Y, Hideki E, et al. Genetic diversity of hantaviruses isolated in China and characterization of novel hantaviruses isolated from *Niviventer confucianus* and *Rattus rattus*. Virology, 2000, 278: 332-345.
- 7 姚智慧,罗兆庄,俞永新,等.汉坦病毒汉滩型特殊新亚型的发现.病毒学报,2001,17:215-220.
- 8 姚智慧,俞永新,董关木,等.肾综合征出血热山东分离株鲁宁-84 刘株的分子特征分析.中华实验和临床病毒学杂志,2003,17: 112-115.

(收稿日期: 2006-04-27)

(本文编辑:王多春)