

安徽省山林地区肾综合征出血热微小疫源地及汉坦病毒新亚型的发现

罗兆庄 柳燕 刘红 王以银 赵月萍

【摘要】 目的 了解安徽省山林地区是否存在肾综合征出血热(HFRS)微小疫源地,同时对所获毒株进行型别鉴定。方法 于 20 世纪 90 年代中期对海拔 1 400 m 的大别山区和 1 600 m 的皖南山区采用流行病学、地理流行病学、血清学、病原学及分子流行病学方法进行了调查。结果 从社鼠肺标本中分离出 2 株 HFRS 病毒,经鉴定均为 A 型。核酸序列分析显示 2 株病毒均与标准 HTN 76-118 株差异较大。结论 证实山林区存在 HFRS 微小疫源地,2 株病毒为 HTNV 新亚型。

【关键词】 汉坦病毒;肾综合征出血热;疫源地;亚型

Discovery of two sub-types of Hantavirus in Anhui mountain areas LUO Zhaozhuang, LIU Yan, LIU Hong, WANG Yiyin, ZHAO Yueping. Anhui Anti-Epidemic Station, Hefei 230061, China

【Abstract】 Objective To investigate the existence of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) foci in high mountains and forest areas. **Methods** A survey was conducted in the areas of 1 400 meter altitude in Dabie mountain and of 1 600 meter altitude in Wannan mountain in the mid 1990 's using methods related to epidemiology, geographic-epidemiology, serum epidemiology, pathogenic and molecular epidemiology. **Results** Two strains of HFRS viruses were isolated from pulmonary tissues of *Rattus niviventer* and both of them were identified as A types. The analysis of the nuclei sequence showed that there were significant differences between both sub types and HTN 76-118. **Conclusion** It was confirmed that there were HFRS foci in the areas with 2 strains possible new sub-types of HFRS.

【Key words】 Hantavirus; Hemorrhagic fever with renal syndrome; Foci; Sub-type

肾综合征出血热(HFRS)主要流行于欧亚大陆的 37 个国家和地区^[1]。已成为世界主要公共卫生问题之一。我国自 1980 年首次分离出 HFRS 病毒以来,至今证实存在 HTN 和 SEO 二型。但汉坦病毒(HV)存在多种血清型,我国是否还存在其他血清型目前尚不清楚。我们选择大别山区、皖南山区进行 HFRS 微小疫源地调查,同时对所获毒株进行分型鉴定。

材料与方 法

1. 现场调查时间及地点:1992~1993 年分别在大别山区的妙道山和皖南山区不同海拔高度的山林地带进行 HFRS 宿主动物调查。

2. 小型兽类调查:用夹夜法捕鼠,分种统计,计算密度和鼠种构成。

3. 标本收集与检测:捕获鼠鉴定鼠种后,取其肺组织,置液氮中保存待检。检测时经冷冻切成 4 μ m

的薄片,用 IFAT 检测 HV 相关抗原。同时用滤纸沾取心脏、胸腔血液检测 HV 抗体。

4. 病毒分离:部分 HV 抗原阳性肺标本,研磨接种于 Vero-E6 细胞传代,分离 HV 病毒。

5. RT-PCR 及核苷酸序列检测:鼠肺病毒分离阳性标本,提取病毒 RNA 后,进行 RT-PCR^[2]和核酸序列检测^[3,4]。

结 果

1. 标本检测:本次调查于大别山区海拔 1 400 m 的山林地区布放 718 夹次,捕鼠 15 只,密度为 2.09%。本点共捕鼠型动物 67 只,其中社鼠 38 只(56.72%),小林姬鼠 11 只(16.42%),大足鼠 7 只(10.45%),黑线姬鼠 4 只(5.97%),尚有少数苛岚绒鼠和 等。38 份社鼠标本用 IFAT 检测 HV 抗原或抗体,阳性 4 份,其中抗原阳性 2 份。取其中 1 份抗原阳性较强的 167 号标本进行病毒分离获可疑毒株 1 株。在皖南山区海拔 1 600 m 点,布夹 694 夹次,捕鼠型动物 75 只,密度为 10.81%。其中社鼠 9

只(12%),小林姬鼠 18 只(24%),针毛鼠 6 只(8%),褐家鼠 12 只(16%),大足鼠 17 只(22.67%),苛岚绒鼠 2 只(2.67%),白腹巨鼠 3 只(4%),猪尾鼠 1 只(1.33%), 3 只(4%)。9 份社鼠标本中, IFAT 检测仅发现 09 号标本 HFRS 病毒抗原阳性,进一步的病毒分离获 1 株可疑病毒。

2. 病毒鉴定:

(1)用 IFA 法对 167 及 09 号肺、血标本进行抗原和抗体检测,结果 167 号肺标本 HV 抗原阳性(卅),血标本 HV 抗体 1:20(+),09 号肺标本 HV 抗原阳性(+),血标本 HV 抗体 1:40(+)

(2)病毒血清学、单克隆抗体及 RT-PCR 分型结果:167 和 09 号标本接种于 Vero E6 细胞盲传,每代均取部分细胞进行 IFA 检测,结果 2 份均阳性。待抗原达到一定强度时,收集制备抗原片或冻存以备血清学检测、McAb 或 PCR 分型。排除呼肠孤病毒后 2 株均为 HFRS 病毒,经单克隆分型和 RT-PCR 分型后 2 株均为 A 型。

3. 核酸序列分析:

(1)09 株应用 RT-PCR 扩增的 M 和 S 全基因片段,并将其克隆于 T 载体,纯化后测定序列。结果 M 片段全基因序列共 3 652 个核苷酸,编码 1 135 个氨基酸, S 片段的全基因序列共 1 724 个核苷酸,编码 429 个氨基酸(表 1)。其 M 和 S 片段全基因核苷酸和推导的氨基酸序列与汉坦病毒各型毒株的代表株和 HTN 型毒株同源性比较,结果表明 09 株分枝与 HTN 型接近,而与其他各型病毒则相差较远,确定为 HTN 型毒株。但 09 株与 HTN 型毒株 M 和 S 全基因序列差异分别高达 23.6% 和 20.4%。结合系统发生树分析(图 1, 2),结果证明 09 株是迄今为止所发现的 HTN 型中差异最大的新基因亚型病毒株。

(2)167 株结合 McAb 技术、RT-PCR 技术,主要使用病毒基因组核苷酸序列测定技术进行分型研究,单克隆抗体技术与 RT-PCR 分型结果均属于 HTN 型,经部分 M 基因组片段核苷酸序列分析,提示我国存在高山社鼠毒株 167,其可能成为一个新的血清型。S 片段全基因序列共 1 721 个核苷酸,编码 429 个氨基酸。167 株与其他不同亚型 HTN 型病毒间 S 基因核苷酸序列同源性均在 70% 左右,明显低于 HTN 型病毒不同亚型之间的同源性(82.3% ~ 88.7%)。

(3)167、09 株与 76-118 株片段的全基因组序列同源性:167、09 株与 76-118 株病毒间的 S 基因核苷

酸序列同源性分别为 71.1% 和 79.6%,差异为 28.9% 和 22.4%,氨基酸的同源性为 91.7% 和 93.2%,而且 167 株与 09 株间的核苷酸序列同源性为 98.6%,氨基酸的同源性为 98.4%。

表 1 76-118、167 和 09 株病毒 S 片段基因组的结构和编码特征

病毒株	S 片段长度	编码长度	编码区间	非编码区长度	编码氨基酸数
76-118	1 696	1 290	37 ~ 1 326	370	429
167	1 721	1 290	37 ~ 1 326	395	429
09	1 724	1 290	37 ~ 1 326	398	429

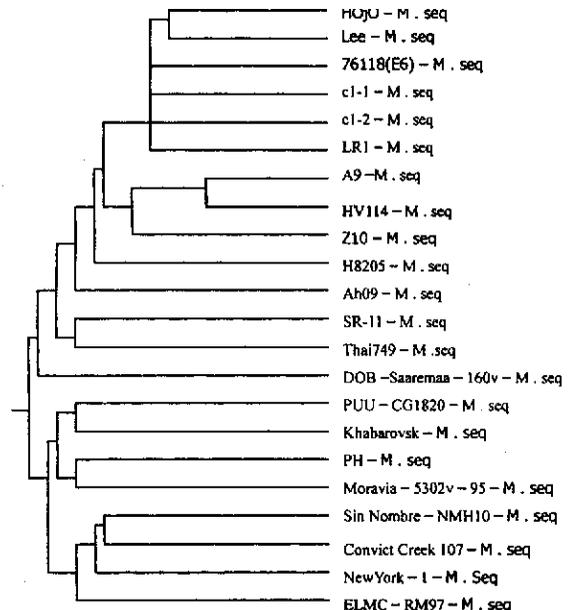


图 1 09 株病毒 M 片段全基因的系统发生树

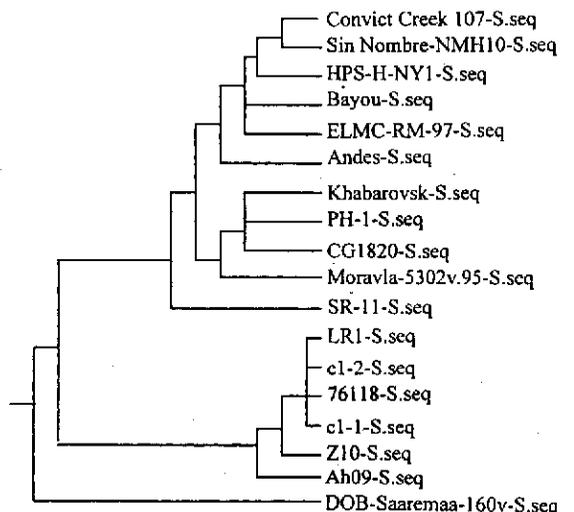


图 2 09 株病毒 S 片段全基因的系统发生树

讨 论

本次根据地理、地貌和海拔高度选择调查点开展 HFRS 疫源地调查,在海拔 1 400 m 以上的 2 个调

查点捕获了带有 HFRS 病毒抗原的鼠型动物,并从 2 份社鼠肺标本中分离到 2 株病毒,经鉴定均为 A 型。证实安徽省山林地区存在 HFRS 疫源地,并且首次证实社鼠是 HFRS 宿主动物,从而丰富了安徽省宿主动物的种类。

社鼠为山林地区的主要宿主动物。该 2 株病毒均分离自海拔 1 400 m 以上地区的社鼠,尤其是 167 株分离自海拔 1 400 m 山林地区,该地为森林地区,当地无常住居民,仅有少数林业工人,生态基本维持原始状态,在该地曾短期进入的林业工人中隐性感染率为 0.002 9%,尚无 HFRS 病例报告。09 株分离自海拔 1 600 m 地区,当地森林保持原始状态,人为破坏很少,但流动人口活动较为频繁,该地健康人群隐性感染率为 0.47%。上述两点地理、地貌提示可能为出血热的原始疫源地。两株 HV 增殖所能达到的滴度、毒株的抗原谱及毒株诱导的中和抗体活性的高低都值得进一步研究。

本次研究发现 167 和 09 两株病毒为 HTN 病毒的新亚型或新的血清型。根据近年来国际病毒命名委员会按分子结构对汉坦病毒分类的建议,在一个片段中至少应有 25% 的核苷酸序列与其他所有已知的汉坦病毒不同可确定为一个新型,5% ~ 25% 差异可确定为一个亚型^[5]。本次分离的 2 个毒株 167 和 09 的核苷酸序列分别与标准 HTN 株 76-118 相差

28.9% 和 22.4%。据此标准,可以认为 167 株和 09 株是目前所发现的 HTN 病毒差异最大的新基因亚型病毒株或已接近突变为新的血清型边缘。

167 和 09 株病毒虽都分离自山区社鼠,但生境不同、地理位置相距较远,又有长江相隔,但两株 HV 的 S 片段全基因序列及由此推导的氨基酸序列的同源性高达 98.5% 及 98.4%。提示我们考虑 HV 的遗传性变异或与不同鼠种、特殊地理景观有关,尚需进一步研究。

参 考 文 献

- 1 罗兆庄.我国流行性出血热地理流行病学分析研究.中华流行病学杂志,1989,10:6-10.
- 2 王华,余陶,李小青,等.应用 PCR 技术对现场捕获的携带 HFRS 病毒的动物肺组织进行血清分型的初步研究.中国媒介生物学及控制杂志,1995,6:89-92.
- 3 Wang H, Kumiko Yoshimatsu, Hideki Ebihara. Genetic Diversity of Hantaviruses Isolated in China and Characterization of Novel Hantaviruses Isolated from *Niviventer confucianus* and *Rattus rattus*. Virology, 2000, 278:332-345.
- 4 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.
- 5 宋干,陈化新,俞永新,等.流行性出血热防治手册.第 2 版.北京:人民卫生出版社,1998.12.

(收稿日期 2001-11-25)

(本文编辑:尹廉)

· 短篇报道 ·

晋城煤业集团总医院抗感染药物用药及宏观管理分析

贾晋生 陈爱群 李莉

对晋城煤业集团总医院近 5 年抗感染药物购入作一分析,为合理使用和宏观管理提供科学、可靠的理论依据。

1. 评价方法:采用目前流行的用药频度分析方法确定 DDD 值(defined daily dose):依据《新编药理学》(第 14 版)和《临床合理用药手册》(第 1 版),结合临床常用的剂量确定 DDD 值。

2. 5 年的抗感染药物 DDDs 分析结果:按 2000 年 DDDs 排序的最常用的抗感染药物(前 10 位)依次为头孢氨苄胶囊、吗啉呱片、甲硝唑片、青霉素针、阿莫西林胶囊、利福定胶囊、增效联磺片、利菌沙片、环丙沙星片和异烟肼片;常用的抗感染药物(第 11 ~ 20 位)有氟哌酸胶囊、吡嗪酰胺片、甲硝唑针、头孢唑啉针、头孢哌酮针、乙胺丁醇片、氨苄青霉素针、

庆大霉素针、利福平胶囊和严迪片;其次常用的抗感染药物(21 位以后)有丁胺卡那霉素针、氧氟沙星针、链霉素针、环丙沙星针、抗菌优片、头孢三嗪针、咪喹妥因片、林可霉素片、痢特灵片、氧氟沙星片、头孢拉定片、哌拉西林针、氟康唑针、头孢他啶针、泰能针等。

3. 提示的问题及宏观管理应采取的相应措施(1)药事管理委员会应对抗感染药物的使用管理制度进一步完善。(2)感染管理委员会应加大按《抗菌药物使用规定》进行临床考核的力度。(3)检验科应定期公布细菌学检出情况和药敏试验结果。(4)药剂科应加大临床药学工作的力度,进一步协助临床合理使用好抗感染药物和搞好抗感染药物合理使用的宣传。

(收稿日期 2002-01-20)

(本文编辑:尹廉)