

## 肾综合征出血热传播途径的研究

项目名称 :肾综合征出血热传播途径的研究 ;

革螨、恙螨体内汉坦病毒的检测、定位和增殖的分子生物学研究

项目来源 :国家自然科学基金( 39970653 ,39420631 );

全军“七五”、“八五”、“九五”指令性课题

项目负责人 张云、吴光华( 210002 南京军区军事医学研究所 )

起止时间 :1980~2000 年

获奖项目 :国家科技进步三等奖一项 ,军队科技进步二等奖一项

肾综合征出血热( hemorrhagic fever with renal syndrome , HFRS )在我国分布于 29 个省( 区、市 ) ,近年每年发病约 5 万人 ,平均病死率约在 2% ,严重危害人民健康。长时期内 ,由于病原体未定 ,对传播途径的认识 ,主要来自人体实验和流行病学分析结果。自 1978 年韩国李锦汪报告建立了特异性的检测方法并分离到汉坦病毒( Hantavirus ,HV )后 ,有了判断结果的科学指标 ,寻找出一些敏感动物 ,为传播途径的研究提供了有效手段。目前认为可能的传播途径有 3 类 5 种 ,即 动物源性传播( 包括通过伤口、呼吸道和消化道三种途径传播 )、螨媒传播和垂直传播。国内外有关单位多就个别途径进行一些研究 ,因缺少对多途径的综合研究 ,难以对各种途径的传播作用作出评价。我们自 1980 年以来 ,对 5 种途径紧密结合实际 ,以 HV 为指标 ,对感染和传播的全过程所需明确的实际问题 ,如 :HV 在动物体内的定位、排出途径、在外环境中存活的条件和时间 ,通过不同途径实现感染的难易、方式和剂量 ,人群发生流行时可能的感染途径等 ,进行了较系统的实验研究和一些现场流行病学调查 ,以期探明各种途径的传播作用 ,为预防工作提供依据。

### 一、伤口传播

#### 1. 实验研究 :

( 1 )实验证明 HV 抗原可通过伤口传播。1980 年用 HV 抗原阳性鼠的血、尿分别感染非疫区黑线姬鼠各 10 只的皮肤伤口 ,结果血感染组阳性 9 只 ,尿感染组阳性 6 只<sup>[1]</sup>。

( 2 )实验证明黑线姬鼠感染 HV 后 ,抗原在鼠的血、尿、粪和唾液中有一定的消长规律。1988 年以 HV 感染非疫区黑线姬鼠 ,感染后 7 天从鼠血中检测到 HV 抗原 ,检出阳性率和滴度高峰均在 15~21 天 ,第 28 天后逐渐下降 ;感染后 10 天分别从唾液、尿和粪便中检测到 HV 抗原 ,检出阳性率高峰在 15~21 天 ,第 28 天后逐渐下降 ,第 35 天消失。

( 3 )实验证明 HV 排出后在外环境中一定时间内仍有传染性。1986 年将 HV 抗原阳性黑线姬鼠的血、尿、粪涂于布、纸、草片上 ,在 pH 6.5~7.5、4~15℃ 条件下 ,48 h 仍有传染性<sup>[2]</sup>。

( 4 )实验证明微量带病毒血即可通过不显性表皮破伤使

实验鼠受染。1986 年用 HV 抗原阳性黑线姬鼠的血 ,对非疫区黑线姬鼠按皮肤不同破伤程度用不同剂量进行实验感染 ,证明 1  $\mu$ l 血即可通过不显性表皮破伤使实验鼠受染。1989 年实验证明 100  $\mu$ l 5 TCID<sub>50</sub>/ml HV 悬液可通过不显性表皮破伤使非疫区黑线姬鼠感染 ,并证明感染率与感染剂量和浓度呈高度正相关<sup>[3]</sup>。

2. 现场研究 :1987 年在野鼠型疫区、1989 年在家鼠型疫区调查 ,均证明皮肤破伤为鼠间主要传播因素<sup>[4]</sup>。1987~1989 年在野鼠型疫区对 100 例 HFRS 患者进行病例对照调查 ,经配对分析、分层分析和 logistic 回归分析的结果 ,证明皮肤破伤也是鼠人间传播的主要危险因素<sup>[5]</sup>。

此项研究结果证明鼠感染 HV 后 ,其病毒随血、尿、粪排出体外在外环境中仍有传染作用 ,微量血可通过不显性皮肤破伤使实验鼠受染 ,表明通过伤口传播较易实现。

### 二、呼吸道传播

1984 年 2 月 ,南京某校一动物饲养员发生 HFRS ,我们追踪调查表明该患者病前与实验大白鼠有密切接触 ,该校大白鼠经用间接免疫荧光法( IFAT )检测 HV 抗原和抗体 ,总阳性率为 49.11%。据分析认为该病例可能是吸入带 HV 排泄物形成的气溶胶而感染<sup>[6]</sup>。

1989 年实验证明 HV 气溶胶在( 230 ± 5 )TCID<sub>50</sub>/m<sup>3</sup> 时 ,鼠吸入 20 min 即可感染<sup>[7]</sup>。

1990 年实验证明大白鼠吸入荧光标记的 HV 气溶胶 5 min 后即可在气管和左、右肺中检测到荧光标记的 HV 抗原 ,在呼吸系统的沉积分布占 95% ;大白鼠吸入 5 天左右即可在肺巨噬细胞和外周血白细胞内检测到 HV 抗原 ;10 天左右在吸入感染大白鼠的心、肺、肾、肝和脾脏用 RT-PCR 扩增技术亦检测到 HV-RNA ,吸收进入血液的 HV 气溶胶颗粒可随血行分布于各个脏器 ,继而随尿排出体外 ,整个清除、转运过程约 10 天左右<sup>[8]</sup>。

1992 年模拟现场研究将攻毒组和对照组实验动物饲养在同一室内 ,在攻毒组动物体内检出 HV 抗原后 15 天 ,对照组动物体内即可检出 HV 抗原 ,两者有一定的伴随关系 ;在攻毒组动物检出 HV 抗原阳性率高峰期间 ,从饲养室内气溶

胶中分离到 2 株 HV<sup>[9]</sup>。

此项研究结果证明 HV 通过呼吸道感染需要一定的剂量和时间,一般情况下不易实现。但室内在带病毒鼠密集并大量排毒的情况下,所形成的气溶胶可经吸入感染,甚至引起流行。

### 三、消化道传播

1980 年用 HV 抗原阳性鼠的血、尿各 0.1 ml 给实验鼠灌胃未能感染<sup>[1]</sup>。

1988 年将含有 100 TCID<sub>50</sub>/ml HV 黑线姬鼠的血、尿、粪悬液对非疫区黑线姬鼠灌胃,结果实验鼠未能通过完整的消化道黏膜感染,但可通过损伤的消化道黏膜感染<sup>[10]</sup>。而国内有些单位有通过消化道感染成功的报告。

此项研究结果表明 HV 较难通过消化道感染,可能需要较大的剂量。

### 四、螨媒传播

20 世纪 40 年代,日本北野政次、前苏联 Chumakov 将 HFRS 疫区革螨制成悬液注入人体引起发病。1954 年美国 Traub 等根据流行病学资料提出恙螨是朝鲜出血热的可疑媒介,但缺乏病原学证据。近半个世纪以来,革螨、恙螨能否作为 HFRS 的传播媒介一直是国际上悬而未决的问题。

我们对革螨、恙螨的传播作用分别进行了以下研究。

1. 革螨:1970~1984 年,对革螨与 HFRS 的关系进行了研究,结果证明格氏血厉螨 (*Haemolaelaps glasgwi*) 和厩真厉螨 (*Eulaelaps stabularis*) 是 HFRS 疫区鼠体的优势螨种,季节消长与居民发病一致,能自然感染、叮刺传播和经卵传递 HV,可作为 HFRS 的传播媒介。1989~1990 年研究证明:①在 HFRS 疫区从黑线姬鼠同窝鼠和革螨分离的 HV,经单克隆抗体检测,两者的抗原性一致,表明在鼠螨之间已构成相互传播的关系;②用从鼠肺 HV 抗原阳性鼠巢采集的格氏血厉螨和厩真厉螨,经饥饿后叮刺实验鼠,结果证明 10 只甚至 1 只组该两种螨叮刺实验鼠各 10 只后,可从个别鼠肺检出 HV 抗原,血清检出 HV 抗体,并分离到 HV,进一步表明该两种螨可通过叮刺在鼠间传播 HV<sup>[11]</sup>。

2. 恙螨:20 世纪 70 年代,陕西省卫生防疫站根据小盾纤恙螨 (*Leptotrombidium scutellare*) 为 HFRS 疫区黑线姬鼠体外的优势螨种,季节消长与发病曲线一致等流行病学证据,提出该种螨为 HFRS 可疑的传播媒介。

确定一种恙螨为 HFRS 的传播媒介,须具有以下基本条件:①流行病学证据;②有 HV 的自然感染;③能经叮刺传播 HV;④能经卵传递 HV。由于恙螨一生仅幼虫叮刺而且只饱食一次,饲养成长率低,难以获得子代幼虫供实验用。因而,多年来还未见有达到上述 4 项基本条件的完整报告。

为进一步查明小盾纤恙螨传播 HFRS 的媒介意义,1988~1990 年我们先后设计了 4 种方法进行研究,结果如下<sup>[12,13]</sup>。

(1) 恙螨分离法(I法):在陕西 HFRS 疫区捕鼠取肺用 IFAT 检测 HV 抗原,阳性率为 5.7%(26/459)。以 50~100

只螨为 1 份,从 14 份标本中分离到 HV 6 株。但 I 法尚不能排除螨所带 HV 是由于吸食鼠的体液带来的可能性。

(2) 自然界游离恙螨叮刺黑线姬鼠法(II法):将捕自非疫区的黑线姬鼠(经 IFAT 检测 HV 抗原、抗体均为阴性)28 只置放于疫区草地上连续 3 天,所有的鼠均诱集到游离的小盾纤恙螨幼虫,螨数 23~92 只。从螨叮刺的鼠分离到 HV 3 株。但 II 法尚不能完全排除实验鼠所感染的 HV 是由于螨二次叮刺带来的可能性。

(3) 小黑板采集的游离恙螨分离和叮刺乳鼠法(III法):将小黑板(15 cm×15 cm×0.5 cm)置放于疫区草地上,10 min 后取起检查。共置放小黑板 177 块次,采集到小盾纤恙螨幼虫 1326 只,平均每块板 7.5 只(0~43 只)。将此幼虫以 100 只为 1 份,先作成悬液再作成滤液,接种 Vero E6 细胞,共接种 4 份,分离到 HV 2 株。以 10~30 只幼虫为 1 批叮刺 1 只小白鼠乳鼠,共试乳鼠 24 只,分离到 HV 5 株。

(4) 疫区土中成虫所产卵孵出的子代幼虫分离和叮刺乳鼠法(IV法):在上述小黑板采集小盾纤恙螨幼虫多的点,取土表面下 6~10 cm 的土块,加水于土中,将漂浮于水面的成虫带回实验室任其产卵。从孵出的幼虫直接分离到 HV 1 株,从孵出的子代幼虫叮刺的乳鼠分离到 HV 3 株。

III 法和 IV 法,由于所用螨为未曾叮刺过的幼虫,特别是 IV 法为土中成虫所产卵孵出的子代幼虫,完全排除了由鼠带来 HV 的可能性。

根据恙螨一生仅幼虫叮刺而且只饱食一次,螨带有的病原体只能经卵传递由后代传播的特点,以上 III 法和 IV 法所用幼虫未曾叮刺过,但从这些幼虫能直接分离到 HV,用这些幼虫叮刺小白鼠能使鼠感染 HV,表明这些幼虫有 HV 的自然感染,并能经叮刺传播,而幼虫自然感染的 HV 又只能是经卵传递而来。

此项研究结果证明小盾纤恙螨是 HFRS 疫区鼠体的优势螨种,季节消长与居民发病一致,能自然感染、叮刺传播和经卵传递 HV,可作为 HV 的传播媒介。在陕西疫区,小盾纤恙螨对传播 HFRS 和保持疫源地起重要作用(根据是:该种螨有 HV 的自然感染,可通过叮刺在鼠间传播;草地中游离螨多,能叮人,该种螨的生活史长,一年仅一代,且能经卵传递 HV,故带毒时间长)。这对 HFRS 的流行病学和预防有理论意义和实用价值。

3. 分子生物学的证实:1995 年和 1999 年利用国家自然科学基金资助采用病毒学和分子生物学方法对革螨、恙螨体内 HV 进行检测、增殖、定位研究,并对从鼠、螨、患者中所分离的 HV 进行基因型比较分析,以期对革螨、恙螨的媒介意义进一步提供具有分子水平的直接证据<sup>[14]</sup>。

(1) 用 RT-PCR 检测螨体内 HV-RNA:鼠肺 HV 抗原阳性鼠窝革螨和未食恙螨幼虫 50 只组、30 只组、10 只组和 5 只组的螨悬液提取的 RNA 模板经 RT-PCR 扩增后取产物电泳后染色,见有 299 bp 的扩增带,最低检出为 5 只螨组。并用核酸分子杂交技术进一步证实以上结果。说明 RT-PCR 具

有特异、高敏感的特点,可用于检测螨体内微量 HV-RNA。

(2)用免疫组化法检测螨体内 HV 结构蛋白 MP 和 NP:用免疫组化法在鼠窝革螨、未食恙螨幼虫体内均可检测到 HV 结构蛋白 MP、NP,将检出阳性螨制备 RNA 模板,进一步用两套引物扩增靶序列,取产物 2  $\mu$ l 电泳 EB 染色。结果凡免疫组化阳性的组织标本均分别见有 215 bp 和 576 bp 的 M、S 片段阳性带。

(3)螨体内 HV 增殖:取饲养的革螨子 1 代至子 4 代和恙螨幼虫每 20 天为一批制成无菌滤液,用 Vero E6 细胞测定 TCID<sub>50</sub> 滴度,动态观察 HV 在螨体内的增殖情况。结果表明,除恙螨幼虫期 60 天一批未测出 HV 外,其余各批均在不同时间内测出 HV 滴度。革螨 TCID<sub>50</sub> 滴度均在 1.8~4.5 log/ml 之间,子 4 代较子 1 代增长了 2.2 log/ml,恙螨 TCID<sub>50</sub> 滴度均在 1.9~5.1 log/ml 之间,80 天和 100 天两批较 20 天和 40 天增长了 3.1~4.2 log/ml。

(4)原位 RT-PCR 分子杂交研究螨体内 HV 定位:以未食革螨、恙螨幼虫与若虫切片采用原位 RT-PCR 分子杂交技术检测螨体内 HV-RNA。结果发现,原位 RT-PCR 扩增分子杂交技术检出的阳性信号颗粒呈弥散分布,多见于螨的腹部组织细胞内,该细胞是螨的卵巢、支肠等器官,前体组织细胞内少见。若虫组织细胞内的 HV-RNA 阳性信号较幼虫密集而且量多,表明 HV 在螨体内可经卵传递并有增殖。

(5)从鼠、螨、患者中所分离的 HV 的抗原性分析:1997 年我们参照 Taag 的报道在同源性低的 G1 基因片段合成型特异引物,在 PCR 扩增基因分型的同时亦作了抗 MP 等单克隆抗体检测,结果显示从鼠源、螨源、人源中分离出 HV 具有 I 型 (HTN 型) 的反应特征和较广的血清抗原反应谱。研究结果表明,从鼠、螨 (革螨、恙螨) 患者的标本中所分离出的 HV 基因型一致,属汉滩病毒 (Hantaan virus HTNV) 型病毒,并在该疫区已构成相互传播的关系,对维持 HFRS 疫源地起了重要作用。

### 五、垂直传播

1988 年在 HFRS 疫区从 42 个黑线姬鼠鼠窝中捕获孕鼠 42 只,用 IFAT 检测, HV 抗原阳性 5 只,阳性率为 11.9%。从孕鼠中剖取胎鼠 243 只, HV 抗原阳性 25 只 (均来自 HV 抗原阳性的 5 只孕鼠),阳性率为 10.2%,表明 HV 可在黑线姬鼠中垂直传播,垂直传播对保持疫源地有一定意义。

通过对 5 种途径的研究,我们对其传播作用和实用价值有以下初步认识:①伤口传播:研究证明微量 HV 即可通过不显性皮肤破伤使实验鼠感染,表明通过伤口传播较易实现。其实用价值如对秋收时参加田间劳动人员 HFRS 发病率高的问题,可认识为秋收季节黑线姬鼠大量繁殖并频繁下田取食,其排泄物污染土壤和农作物的机会亦大为增加,因此,参加秋收人员发病率高与受染机会增多有关。在这一认识的指导下,便可相应地采取灭鼠和个体防护措施,如劳动时应注意保护皮肤防止破伤,若有破伤应及时消毒包扎。②

呼吸道传播:研究证明 HV 通过呼吸道感染需要一定的剂量和时间,一般情况下不易实现。因此,当室内 (实验动物饲养室) 或野外 (打谷场) 有带毒鼠密集并大量排毒使气溶胶污染的情况下,应采取消毒、戴口罩等预防呼吸道感染的措施。

③消化道传播:研究表明 HV 较难通过消化道感染,可能需要较大的剂量。因此,在做好灭鼠防鼠的前提下,还应防止食物被鼠排泄物污染,如有污染不得食用。④螨媒传播:研究证明恙螨在陕西疫区是 HFRS 的传播媒介,对传播 HV 和保持疫源地起到重要作用。因此,在疫区除灭鼠外, HFRS 流行季节野外活动接触草地人员,应做好灭螨防螨和个体防护 (如不在草地坐卧休息)。⑤垂直传播:研究证明在鼠间存在垂直传播,对保持疫源地有一定意义,故在疫区应做好灭鼠工作。

(张云 吴光华 整理)

协作单位、人员:南京军区军事医学研究所 朱进、赵学忠、鲍明荣、沈建中、张应阔、陶开华、唐家琪,陕西省疾病预防控制中心 姜克俭、甘粤怀、张家驹、钱俊英、邢爱华、王敬军、周燕萍,江苏省东海县疾病预防控制中心 王庆奎、王兰如

### 参 考 文 献

- 1 周乐明,吴光华,丁世昌,等.流行性出血热传播途径的初步实验研究.解放军医学杂志,1981,6:206-208.
- 2 张云,张炳根,赵学忠,等.流行性出血热抗原在外环境中抗原性和感染性的实验观察.解放军预防医学杂志,1990,80:21-26.
- 3 张云,史江,龚蕊,等.流行性出血热病毒经表皮感染黑线姬鼠的有效剂量的观察.江苏医药,1990,16:477-478.
- 4 张云,陶开华,史江,等.流行性出血热鼠间传播因素的调查.中国公共卫生学报,1991,10:217-219.
- 5 张云,陶开华,刘玉,等.流行性出血热传播因素的病例对照研究及 logistic 回归分析.江苏医药,1993,19:656-657.
- 6 邓小昭,张云,赵学忠,等.实验大白鼠感染流行性出血热来源的追踪调查.江苏医药,1984,10:547-549.
- 7 张云,赵学忠,龚蕊,等.流行性出血热病毒气溶胶实验感染黑线姬鼠的初步报告.中国公共卫生学报,1989,8:164-166.
- 8 张云,陶开华,赵学忠,等.肾综合征出血热病毒气溶胶传播的实验研究.中华实验和临床病毒学杂志,1995,9:122-125.
- 9 陶开华,张云,赵学忠,等.流行性出血热病毒气溶胶在实验动物中传播的研究.中国公共卫生学报,1993,9:34-36.
- 10 张云,龚蕊,赵学忠,等.流行性出血热病毒通过消化道感染黑线姬鼠的实验研究.江苏医药,1988,9:481-483.
- 11 张云,赵学忠,沈建中,等.流行性出血热病毒在疫区鼠间传播的调查.中华预防医学杂志,1987,21:325-327.
- 12 吴光华,张云,赵学忠,等.小盾纤恙螨在流行性出血热传播中的作用.中华医学杂志,1992,72:481-483.
- 13 Wu GH, Jiang KJ, Zhang Y, et al. The role of *Leptotrombidium scutellare* in the transmission of human diseases. Chin Med J, 1996, 19:670-673.
- 14 张云,朱进,陶开华,等.革螨和恙螨体内汉坦病毒增殖与定位的分子生物学研究.中华医学杂志,2002,82:1415-1419.

(收稿日期 2002-10-21)

(本文编辑:张林东)