

北京市北郊地区宿主动物感染汉坦病毒分子流行病学研究

左曙青 吴晓明 孙培源 张泮河 王炳才 汤芳 敦哲 蔡伟 刘启
曾凡新 江佳富 刘玮 曹务春

【摘要】 目的 了解北京市北郊地区宿主动物携带肾综合征出血热病毒状况和病毒型别。方法 夹夜法捕鼠, 计算鼠密度, 确定鼠种构成。应用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)扩增 M 片段部分序列并测序, 并用 Clustal X(5.0) 和 DNAClub 软件对序列进行分析。检测结果应用 SPSS 软件进行统计学分析。结果 共捕获宿主动物 414 只, 褐家鼠为优势鼠种, 占 74.32%。其次为小家鼠, 占 22.72%。RT-PCR 检测宿主带病毒率, 海淀区褐家鼠为 13.14%, 小家鼠为 0, 昌平区褐家鼠为 17.46%, 小家鼠为 3.57%。对 6 份扩增阳性标本进行序列测定并对其核苷酸序列进行分析显示, 它们均为汉城型(SEO)汉坦病毒。毒株基于 M 片段部分序列所构建的系统进化树显示, 它们可分为两个小进化分支。所测序列在此片段推导出的氨基酸序列多数与标准株完全相同, 少数有 1.40%~2.16% 的差异。结论 北京市北郊地区汉坦病毒的主要宿主动物是褐家鼠, 不同宿主动物携带的汉坦病毒之间的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列同源性较高, 但也存在一定的差异。这种差异形成的原因有待进一步研究。

【关键词】 汉坦病毒; 序列分析; 流行病学; 分子

Study on the molecular epidemiology of hantaviruse carried by hosts in northern suburb of Beijing ZUO Shu-qing*, WU Xiao-ming, SUN Pei-yuan, ZHANG Pan-he, WANG Bing-cai, TANG Fang, DUN Zhe, CAI Wei, LIU Qi, ZENG Fan-xin, JIANG Jia-fu, LIU Wei, CAO Wu-chun. *Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China

Corresponding author: CAO Wu-chun. Email: caowc@nic.bmi.ac.cn

【Abstract】 Objective To investigate hantavirus infection of captured rodents in Haidian district and Changping district of Beijing and to type hantavirus using molecular technique. **Methods** The captured mice were classified and the density of distribution was calculated. Reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) technique was used to amplify the partial M fragments of hantaviruse. Several representative positive samples were sequenced and analysed by ClustalX(5.0) and DNAClub software. **Results** A total of 414 animals were captured, among which *Battus norvegicus* was the dominant group. In Haidian district, the median infection rates with hantavirus were 13.14% in *Battus norvegicus* and 0 in *Mus musculus Linnaeus*. In Changping district, the average infection rates were 17.46% in *Battus norvegicus* and 3.57% in *Mus musculus Linnaeus*. Nucleotide sequences analysis showed that the virus detected all belonged to SEO-type. They clustered with Z37 viruse and could be branched into 2 different subclades. **Conclusion** The major hosts of hantaviruse in Haidian and Changping district were *Battus norvegicus* and the epidemic strains in the two districts of Beijing were genotyped as SEO-type. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence from different rodents were highly homologous, while nucleotide mutation had also been observed. Further studies are required to explore the possible viruse sequence mutation.

【Key words】 Hantavirus; Sequence analysis; Epidemiology, melocular

肾综合征出血热(HFRS)为布尼亚病毒科汉坦

病毒属(hantavirus, HV)病毒引起的主要由鼠类传播的自然疫源性疾病, 其发病和流行取决于人类的行为、宿主动物的行为以及流行毒株的特点。HFRS 为世界性分布, 我国发病占世界发病的 90% 以上^[1]。不同型别的汉坦病毒有不同的宿主动物, 其进化、传播、变异以及致病性和疾病谱均不相同。

基金项目 北京市自然科学基金重点资助项目(7021004)

作者单位: 100071 北京 军事医学科学院微生物流行病学研究所(左曙青、吴晓明、张泮河、汤芳、江佳富、刘玮、曹务春); 北京市海淀区疾病预防控制中心(孙培源、王炳才、敦哲、蔡伟); 解放军第 61975 部队(刘启、曾凡新)

通讯作者: 曹务春 Email: caowc@nic.bmi.ac.cn

现已证实我国存在汉坦型(HTN)和汉城型(SEO)汉坦病毒。北京地区为发病较多的河北地区所包围,1996年首次发现该地区鼠类携带SEO型汉坦病毒^[2]。近年来北京地区HFRS的发生明显加快,病例迅速增加,形成散发而又相对集中的特点^[3]。为了解北京市HFRS自然疫源地的性质和状况,我们在海淀区和昌平区进行了宿主动物感染汉坦病毒分子流行病学研究。

材料与方法

1. 现场调查及标本采集:2002年8月至2003年3月每月调查一次,选择发病较多的城乡结合部的平原地区作为采样点。海淀区侧重从不同地点采样,两地之间至少相距5 km以上,鼠类标本主要采自菜地、垃圾场(站)、建筑工地周围、外地来京人员聚居区室内外、猪圈、苗圃等地;而昌平区则在同一地点采样,侧重观察其在不同时间的变化,鼠类标本采自某营院养牛场及其周围果园、居民区室内外。采用夹夜法捕鼠,分类统计,计算鼠密度和鼠种构成^[4]。所获鼠类标本现场无菌解剖,取心、肝、肺、脾组织,置液氮罐中冻存备用。

2. 病毒RNA提取:使用Trizol(Gibco公司)试剂提取RNA:在实验室以无菌操作剪取约3 mm³大小的肺组织,放入灭菌研磨器中,加入Trizol,充分研磨后移入Eppendorf管中,加入氯仿,涡式振荡器上剧烈振荡4℃,12 000 r/min离心15 min,将上清液移入新管中,加入异丙醇4℃,12 000 r/min离心10 min,吸弃上清,加入75%酒精,12 000 r/min离心5 min,吸弃上清,室温干燥RNA后加入0.2% DEPC处理水,-20℃冻存备用。

3. 引物:本研究逆转录使用特异性逆转录引物P14,扩增使用分型引物(表1)。所用引物由上海博亚生物工程有限公司合成。

4. 逆转录:使用AMV逆转录酶(Promega公司产品)。直接在上述RNA中加入P14,70℃孵育5 min后冰上冷却5 min,再加入5×buffer,10 mmol/L dNTP,RNA酶抑制剂,AMV逆转录酶,纯水42℃逆转录1 h;99℃,10 min灭活逆转录酶。

5. 巢式聚合酶链反应(nPCR):第一轮扩增引物为HTV-MFO,HTV-MRO。条件:94℃ 3 min→94℃ 20 s,54℃ 30 s,72℃ 30 s→72℃ 5 min,扩增40个循环。第二轮扩增分别使用分型引物。使用

引物HMF、HMR时扩增条件:94℃ 3 min后,94℃ 15 s,56℃ 25 s,72℃ 25 s,35个循环后72℃延伸5 min。使用引物SEO-MF、SEO-MR时扩增条件:94℃ 3 min后,94℃ 15 s,53℃ 25 s,70℃ 25 s,38个循环后70℃延伸5 min。PCR扩增在2400PCR仪上进行。

表1 研究中所用引物

引物类型	名称	序列	位置	扩增片段
逆转录	P14	TAGTAGTAGACTCC	1~14	LMS(+)
通用外引物	HTV-MFO	AAAAGTAGGTGTTAYA TCYTIACAATGTGG	1910~1939	M(+)
	HTV-MRO	GTACAICCTGTRCC IACCC	2373~2354	M(-)
HTN型内引物	HMF	GAATCGAATCTGTG GGCTGCAAGTGC	1958~1984	M(+)
	HMR	GGATTAGAACCCCA GCTCGTCTC	2318~2340	M(-)
SEO型内引物	SEO-MF	GTTGACTCTCTTTC TCATTAIT	1936~1957	M(+)
	SEO-MR	TGGGCAATCTGGGG GGTTGCAITG	2331~2353	M(-)

6. 产物检测及回收纯化:1.2%琼脂糖凝胶电泳。产物回收使用博大泰克公司的DNA片段玻璃奶回收试剂盒。按说明书操作。

7. 核苷酸序列测定及分析:回收片段送上海博亚或上海申友生物工程有限公司测序,测序结果应用Clustal X(5.0)及DNAClub进行分析和比较,其他已知片段序列来源于NCBI的GenBank(网址:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

8. 统计学分析:应用 χ^2 检验比较不同宿主动物、不同地区、不同时间感染率的差异,应用相关分析比较不同鼠密度与宿主动物感染阳性率的关系。统计处理应用SPSS 9.0软件。

结 果

1. 宿主动物调查及病原检测结果:研究中捕获各种小动物共计414只,其中各种鼠类405只,其他小兽9只,平均鼠密度为7.11%。褐家鼠为优势鼠种,占74.32%,其次为小家鼠,占22.72%。海淀区和昌平区宿主动物肺标本RT-PCR检测扩增分型均为SEO型,未见HTN型阳性标本。除昌平区1只小家鼠外所有扩增阳性鼠均为褐家鼠。不同宿主动物携带汉坦病毒阳性率不同,且差异有显著性($\chi^2=16.456, P<0.01$)。海淀区和昌平区宿主动物检测

阳性率虽有差异但无统计学意义($\chi^2 = 1.074, P = 0.300$) (表 2)。昌平区不同时间点捕获动物扩增阳性率虽有差异但无统计学意义($\chi^2 = 3.889, P = 0.792$) (表 3)。鼠密度与宿主动物扩增阳性率呈正相关关系($r = 0.501, P < 0.001$)。

表 2 北京市不同地区、不同宿主动物扩增结果

鼠种	海 淀 区				昌 平 区			
	捕获只数	阳性只数	构成比 (%)	阳性率 (%)	捕获只数	阳性只数	构成比 (%)	阳性率 (%)
褐家鼠	175	23	70.28	13.14	126	22	76.37	17.46
小家鼠	64	0	25.70	0.00	28	1	16.97	3.57
其它	10	0	4.02	0.00	11	0	6.66	0.00
合计	249	23	100.00	9.24	165	23	100.00	13.94

表 3 海淀区和昌平区不同时间(地点)捕获鼠类

RT-PCR 扩增阳性率

捕获时间(年.月)	海 淀 区				昌 平 区			
	捕获只数	阳性只数	阳性率 (%)	鼠密度 (%)	捕获只数	阳性只数	阳性率 (%)	鼠密度 (%)
2002.08	54*	2	3.57	4.67	6	0	0.00	2.00
2002.09	30	1	3.33	10.00	27	5	18.52	9.00
2002.10	31	5	16.13	10.33	29	4	13.79	9.67
2002.11	37	5	13.51	12.33	21	2	10.00	6.67
2002.12	34	4	11.76	11.76	13	1	7.69	4.33
2003.01	17	2	11.76	5.67	12	1	8.33	4.00
2003.02	23	2	8.70	7.67	23	5	21.74	7.67
2003.03	20	2	10.00	6.67	28	5	17.86	9.33
合计	246	23	9.35	7.45	159	23	14.47	6.63

* 海淀区于 8 月前已开始捕鼠,统计结果与 8 月结果合并计算,共计 1200 夹次

2. 序列测定结果及分析:从逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)扩增阳性标本中选出海淀区来自不同采样点的 4 份鼠类标本(HD208、HD209、HD210、HD301 均来自褐家鼠),另选来自昌平区 2 份(1 份来自褐家鼠 CHP211,1 份来自小家鼠 CHP302)标本经纯化后测序(部分标本经正反两个反应测序,相互验证补充),应用 Clustal X(5.0)和 DNAClub 对它们的核苷酸序列进行分析,显示它们与 HTN 型汉坦病毒的同源性较低。而与浙江地区分离到的 SEO 型汉坦病毒 Z37 株的同源性最高,为 96%~98%。来自褐家鼠和小家鼠的核苷酸序列差异很小(1%)。测序的这 6 株毒株与 1999 年王华等测定的褐家鼠分离株(Beijing-Rn,序列号 AB027087)相比,其同源性 94%~95%。绘制他们的系统进化树(图 1)显示,这 6 株均属 SEO 型汉坦病毒,可以分为两个较小的进化分支,4 份标本与浙江地区分离株 Z37 关系较近,同属一个小分支,另有 2 份标本则属

于另一个小分支。它们与 Beijing-Rn 株以及与国内分离到的其他 SEO 型汉坦病毒进化关系则相对较远。由它们的核苷酸序列在此片段推导的氨基酸序列分析可见,海淀区的 3 株标本、昌平区小家鼠分离的毒株标本、SEO 型标准株 seoul、浙江分离株 Z37、Beijing-Rn 氨基酸序列完全相同,它们与另一株来自海淀区褐家鼠的毒株在此片段推导的氨基酸序列有 1.4% 的差异,与昌平区来自褐家鼠的标本则有 2.16% 的差别。

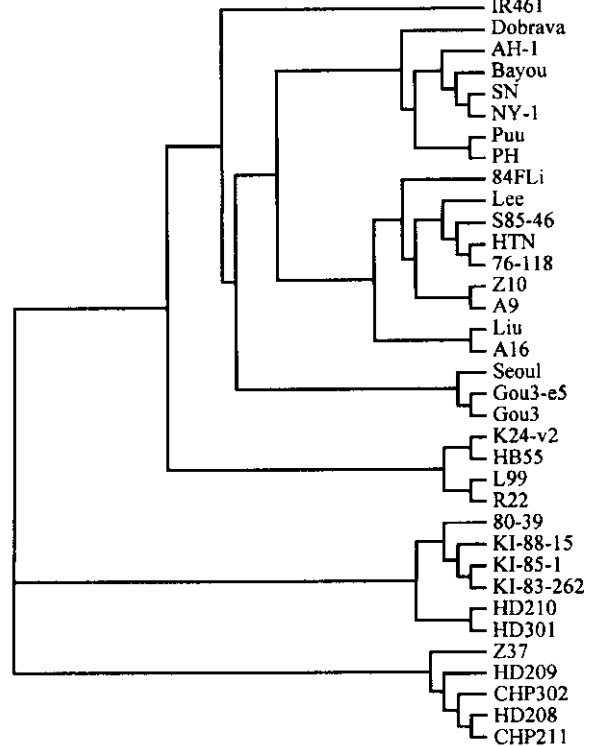


图 1 基于 M 片段部分核苷酸序列所构建的系统发生树

讨 论

本研究通过大量现场调查,结合实验室检测研究了北京市 HFPS 发病相对较高的西北郊地区不同地点、不同时间及不同鼠密度时宿主动物带毒率的状况,所获资料较为翔实,为北京地区 HFPS 的研究提供了大量可靠数据。研究所获样本采自北京市西北部地区城乡结合部的平原地带,分别来自菜地、垃圾场(站)、建筑工地周围、居民聚居区室内外、猪圈、养牛场、苗圃等地,这些地方与人类的生产生活休戚相关。除昌平区采样点常年平均气温比北京市区略低 1~2℃ 外,各采样点的地理环境和气候条件与北京市区相仿,具有广泛的代表性。随着城市改造和建设的加快,家鼠的长期栖息地被破坏,因而加剧了鼠群的迁移和流窜,使鼠间疾病传播加快,人

被感染的机会增加。因而监测这些地区宿主动物的密度和带毒状况能为研究人间的流行状况提供重要的基础资料,所以本研究有重要的理论和现实意义。研究显示,海淀区和昌平区作为 HFRS 疫区,其主要宿主动物是褐家鼠,占绝对优势,其次为小家鼠,未见其他鼠种携带汉坦病毒。宿主动物平均带病毒率为 11.33%,高于全国平均带毒率 2.75%^[5]。因此,采取以灭鼠和防鼠为主的综合措施是必要的。此研究为制定有的放矢的 HFRS 防制策略和灭鼠措施提供了一定的依据。研究结果显示,海淀区和昌平区的地区差异对宿主动物带病毒率的影响不明显。季节变化对宿主动物带病毒率的影响也不明显。但带毒率随鼠密度变化而变化,二者有正相关关系。这可能是由于鼠密度上升时,鼠类接触机会增多,鼠间因食物争夺等原因而发生撕咬、争斗等的机会也可能增加,故而感染机会增加,造成鼠间感染率上升。

本研究应用分子生物学技术直接从标本中扩增目的基因片段,简捷快速,特别适用于宿主动物体内病毒快速分型检测。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型的建议,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% 的差异可确定为一个亚型^[4]。本研究所获得的 6 株病毒部分核苷酸序列之间的差异为 96%~99% 之间,它们与 SEO 型汉坦病毒 Z37 株之间的的同源性为 96%~98% 之间,核苷酸差异均 < 5%,系统进化树也显示它们之间的亲缘关系较近,但分属两个小进化分支,一支与 Z37 同属一个小分支,另一支则与 80-39 等毒株关系较为密切。它们与包围北京地区的河北地区分离株 HB55 进化关系则相对较远。标本所带毒株序列与来自较远地区毒株序列的相似性是否提示汉坦病毒的远距离播散还有待于进一步研

究。同时,它们与 Beijing-Rn 的同源性相对略低(94%~95%)。这提示北京地区汉坦病毒可能不止一个亚型存在。本研究未检测到 HTN 型汉坦病毒,与张秀春等^[6]的研究结果一致。

据国外文献报道^[7],另一类汉坦病毒辛诺柏病毒(SNV)在发生核苷酸变异时,其 A→G 和 U→C 的变异最多,显著高于其他种类的变异。这种变异提示细胞 RNA 编码酶、双股腺苷脱氨基酶(dsRAD)或是有类似作用的酶在产生 SNV 型汉坦病毒的基因变异中发挥重要作用。本研究所测序列共 2329 个核苷酸,与汉坦病毒标准株 seoul 比较,共发生 85 个核苷酸变异,总变异率 3.65%。其中 A→G 和 U→C 变异占 63.5% 以上,与 Z37 株比较,共发生 63 个核苷酸变异,总变异率为 2.71%。其中 A→G 和 U→C 变异占 73.0% 以上,均显著高于其他种类的变异($P < 0.05$)。这些酶在 SEO 型汉坦病毒变异中是否也扮演重要角色是一个需要进一步研究的问题。

参 考 文 献

- 1 陈化新. 中国肾综合征出血热疫情. 中国公共卫生, 1996, 12: 435.
- 2 张永华, 陈化新. 应用逆转录-聚合酶链反应和序列分析对褐家鼠肺汉坦病毒进行分型研究. 中国媒介生物学及控制杂志, 1998, 4: 240-242.
- 3 北京出血热明显增多, 专家呼吁加大灭鼠力度. 2003-2-28. <http://www.sina.com.cn>
- 4 宋干, 主编. 流行性出血热防制手册. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1998. 73-74.
- 5 陈化新, 罗成旺, 陈富, 等. 中国肾综合征出血热检测研究. 中国公共卫生, 1999, 15: 616-623.
- 6 张秀春, 周绍莲, 王华, 等. 北京地区流行性出血热 SEO 型汉坦病毒基因差异的研究. 中华流行病学杂志, 2000, 8: 349-351.
- 7 Feuer R, Boone JD, Netski D, et al. Temporal and spatial analysis of Sin nombre virus quasispecies in naturally infected rodents. J Virol, 1999, 73: 9544-9554.

(收稿日期: 2003-05-15)

(本文编辑: 尹廉)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊对来稿打印件的要求

本刊要求论著打印稿一式 2 份(包括图表), 短篇文章一式 1 份, 行距均 1.5 倍。文中特殊文种、上下角标符号、需排斜体等应予注明。同时附上通讯作者的联系电话、传真号码及 Email 地址备用。凡字迹潦草、涂改不清的稿件, 概不受理。