

河南省 II 型汉坦病毒基因亚型及其分布的研究

孙黎 张永振 李林红 张彦平 张爱梅 郝宗宇 孙建伟 陈化新

【摘要】 目的 查明河南省 II 型汉坦病毒基因亚型的分布情况。方法 在河南省汉坦病毒流行严重的地区,捕捉啮齿类动物,以免疫荧光法检测阳性标本,应用汉坦病毒型特异性引物以逆转录-聚合酶链反应方法对抗原检测阳性的鼠肺标本扩增 M 和 S 基因片段上的特异核苷酸序列并测序,将扩增片段的核苷酸序列与已知病毒序列进行比较,以明确基因亚型及其地理分布情况。结果 褐家鼠、黄胸鼠以及小家鼠携带的病毒均为 II 型汉坦病毒。序列分析发现河南省主要疫区宿主动物间流行的 II 型汉坦病毒至少存在 S1、S2 和 S3 三个亚型,其中 S1 和 S3 为河南省汉坦病毒的优势流行基因亚型。结论 河南省汉坦病毒的亚型较为复杂,地理分布较广。

【关键词】 汉坦病毒;亚型;分布

Genetic subtypes and distribution of Seoul virus in Henan SUN Li, ZHANG Yong-zhen, LI Lin-hong, ZHANG Yan-ping, ZHANG Ai-mei, HAO Zong-yu, SUN Jian-wei, CHEN Hua-xin. *College of Life Science, Xinjiang Shihezi University, Shihezi 832003, China
Corresponding author: ZHANG Yong-zhen, Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

【Abstract】 Objective To investigate the sub-genotypes and distribution of Seoul virus in Henan. **Methods** Rodents were collected in the major epidemic areas and rats lungs were studied by indirect immunofluorescence assay. Partial M and S segments were amplified with nested reverse transcription-polymerase chain reaction using Hantavirus genotype-specific primers, sequenced, analyzed and compared with other known sequences. **Results** The Hantavirus carried by *Rattus norvegicus*, *Rattus flavipectus* and *Mus musculus* were all belonged to Seoul virus in the main epidemic areas of Henan. We constructed two phylogenetic tree based on the partial M and S segment sequences while phylogenetic analysis distinguished three genetic subtypes (S1, S2 and S3). S1 and S3 were found main subtypes in Henan. **Conclusion** The results indicated that the genetic subtypes of Hantavirus were complicated and widely distributed in Henan.

【Key words】 Hantavirus; Genetic subtype; Distribution

汉坦病毒(HV)属于布尼亚病毒科汉坦病毒属(Hantavirus),为分节段的单股负链 RNA 病毒,病毒基因组有大(L)、中(M)、小(S)3 个片段组成,分别编码病毒 RNA 依赖的 RNA 多聚酶、病毒糖蛋白 G1 和 G2 以及病毒的核衣壳蛋白(NP)^[1]。人类感染 HV 主要导致两种严重的疾病:肾综合征出血热(HFRS)和汉坦病毒肺综合征(HPS)。我国是受 HV 危害最严重的国家,发病人数占世界报道病例

的 90% 以上。国外研究表明, HV 至少存在近 20 个血清型/基因型^[2,3],我国流行的 HV 主要是 HTN 型和 SEO 型,分子流行病学研究表明,我国流行的 HTNV 可分为 9 个亚型,SEOV 可分为 4~6 个亚型^[4]。河南省是我国最早发现 SEOV 的地区,也是我国 HFRS 的重发病省份之一,但目前对河南省 HV 基因型和基因亚型的分布研究尚未见报道。本研究对来源于河南省的阳性鼠肺等标本,以逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)扩增特异核苷酸片段及序列测定对其进行了分析,现报告如下。

材料与方 法

1. 标本的采集:于 2002 年春季和秋季,在河南省 HFRS 高发地区汤阴县、杞县、滑县、新野县、确

基金项目:科技部科研院所社会公益研究专项资金重点项目(2001DIA40037,2002DIR40095);国家“十五”科技攻关课题资助项目(2003BA712A08-02)

作者单位:832003 新疆石河子大学生物工程学院(孙黎);中国疾病预防控制中心传染病预防控制所(张永振、陈化新);河南省疾病预防控制中心(李林红、张彦平、张爱梅、郝宗宇、孙建伟)

通讯作者:张永振,Email: yongzhenzhang@sohu.com

山县、原阳县和灵宝县捕捉啮齿类宿主动物,取鼠肺组织,冰冻切片后用间接免疫荧光法检测,免疫荧光检测抗原呈“+”阳性或以上的标本用于RT-PCR扩增及病毒分离。河南及其周边省份的HV毒株来源于实验室分离保存的毒株。

2. 病毒 RNA 的提取:参照 GIBCO/BRL 公司的 TRIzol RNA 提取试剂使用说明书进行。取 0.1 g 阳性鼠肺组织,加入 1000 μl TRIzol 试剂,充分研磨后 -70℃ 过夜。取出后加氯仿 200 μl,混匀静置 5 min,4℃ 15 000 r/min 离心 5 min。取上清,加等体积的异丙醇,于 -20℃ 放置 10 min,4℃ 15 000 r/min 离心 10 min,弃上清,加 80% 乙醇 1000 μl,4℃ 15 000 r/min 离心 10 min,弃上清,用 20 μl 无 RNA 酶的去离子水溶解, -70℃ 保存备用。

3. 引物的设计及合成:参考文献[5,6],用 P14 引物反转录 cDNA, HV-MFO 和 HV-MRO 为 HTNV、SEOV 通用 M 片段外引物, HMF 和 HMR 为 HTNV M 片段分型内引物, SEO-MF 和 SEO-MR 为 SEOV M 片段分型内引物, HV-SFO 和 HV-SRO 为 HTNV、SEOV 通用 S 片段外引物,我们自行设计了用于扩增 HTNV S 片段的内引物 HSF 和 HSR 及扩增 SEOV S 片段的内引物 SEO-SF 和 SEO-SR。其序列见表 1。

表1 用于 RT-PCR 扩增的引物

引物	序列(5'-3')	位置(bp)	片段(意义)
P14	TAGTAGTAGACTCC	1~14	L, M, S
HV-MFO	AAAAGTAGGTGITAYATC YTIACAATGTGG	1910~1939	M(+)
HV-MRO	GTACAICCTGTRCCIACC CC	2373~2354	M(-)
HMF	GAATCGATACTGTGGGCT GCAAGTGC	1958~1984	M(+)
HMR	GGATTAGAACCCAGCTC GTCTC	2318~2340	M(-)
SEO-MF	GTGGACTCTTCTTCTCAT TAIT	1936~1957	M(+)
SEO-MR	TGGGCAATCTGGGGGGTT GCAAG	2336~2358	M(-)
HV-SFO	GGCCAGACAGCAGAATTGG	-	S(+)
HV-SRO	AGTCCAGGATCCATGTCA TC	-	S(-)
HSF	AACAAGAGGAAGGCAAAC AAC	63~83	S(+)
HSR	GCCCAAGCTCAGCAAT ACC	607~626	S(-)
SEO-SF	TGCCAAACGCCCAATCCA	584~601	S(+)
SEO-SR	GCCATCCCTCCGACAAAC AA	1000~1019	S(-)

4. RT-PCR 及其产物的纯化和回收:使用 AMV 逆转录酶合成 cDNA, 42℃ 反应 1 h。PCR 扩增条件

为 94℃ 预变性 5 min, 进行如下循环: 94℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 3 min, 共 35 个循环, 最后一个循环于 72℃ 延伸 10 min。取 2 μl RT-PCR 产物为模板, 用相应的内引物进行巢式 RT-PCR 扩增, 1% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯观察结果。切下特异分子量条带, 用回收试剂盒纯化回收, 收集的 DNA 溶于 20 μl 去离子水中, -20℃ 保存备用。

5. 核苷酸序列测定和分析: 测序由上海 BioAsia 公司和大连 TaKaRa 公司完成, 使用 ABI PRISM TM 377XL DNA 自动测序仪, DNASTar 软件分析比较核苷酸序列。HV 参比序列来自 GenBank(表 2)。

表2 研究中相关病毒株及来源

病毒	来源	型	GenBank	
			M	S
HB55	河南	SEO	AF035832	-
R22	河南	SEO	AF035834	AF288295
Henan94	河南	SEO	AB027083	-
L99	江西	SEO	AF035833	AF288299
10a	河北	SEO	AB027090	-
Hubei-1	湖北	SEO	S72343	-
SD10	山东	SEO	AB027092	-
Shanxi	山西	SEO	AB027084	-
C3	河北	SEO	AB027088	-
Gou3	浙江	SEO	AB027521	AB027522

结 果

1. 基因亚型及其分布: 本研究共扩增、测序及其系统发生分析河南省的 17 个病毒与鼠肺样品, 与河南省毗邻的湖北、山西、山东、安徽、江苏省 7 个病毒株。研究发现, 1 株从河南省患者与 2 株从褐家鼠分离到的病毒为 II 型 HV(SEOV), 10 只褐家鼠、3 只黄胸鼠及 1 只小家鼠携带的病毒也均为 II 型 HV。另外, 我们在新野县和原阳县也进行了调查, 由于收集的标本较少, 未检测出阳性。采用 HTNV 型引物进行序列扩增, 均为阴性。对河南省 17 个样品, 采用 SEOV 型引物共扩增出 17 个 M 与 14 个 S 基因节段上核苷酸序列片段。分析这些核苷酸序列, 结果发现 17 个样品共出现 3 个基因亚型。采用 M 基因节段与 S 基因节段分型, 结果一致(表 3)。

河南省主要疫区 II 型 HV 的基因亚型分布见表 3。杞县、灵宝县主要为 S1 亚型; 确山、滑县和汤阴县主要为 S3 亚型; 滑县存在 S2 亚型。S1 和 S3 亚型为河南省的优势流行亚型。河南省不同地区的基因亚型分布表现出明显的地理聚集性。同一地区有特定的亚型存在, 来自同一鼠种, 地理位置相近的地区病毒基因组核苷酸序列同源性较高。与河南省周

表5 SEOV 部分 S 片段核苷酸(620~999nt)序列同源性比较

	Ts246	Ts214	TS354	II151	Qs23	H202	H223	Qs50	Qs56	Qs84	Hubei	HB86	HR54	Q12	HF1	L99	R22	Gou3
Ts246		100.0	99.7	99.7	99.7	99.5	98.2	98.2	98.2	97.9	95.5	95.0	95.0	95.3	95.0	95.0	95.0	85.3
Ts214	0.0		99.7	99.7	99.7	99.5	98.2	98.2	98.2	97.9	95.5	95.0	95.0	95.3	95.0	95.0	95.0	85.3
TS354	0.3	0.3		99.5	99.5	99.2	97.9	97.9	97.9	97.6	95.3	95.3	95.3	95.5	95.3	95.3	95.3	85.0
II151	0.3	0.3	0.5		100.0	99.2	97.9	97.9	97.9	97.6	95.8	95.3	95.3	95.5	95.3	95.3	95.3	85.0
Qs23	0.3	0.3	0.5	0.0		99.2	97.9	97.9	97.9	97.6	95.8	95.3	95.3	95.5	95.3	95.3	95.3	85.0
H202	0.5	0.5	0.8	0.8	0.8		98.7	98.7	98.7	98.4	96.1	95.5	95.5	95.8	95.5	95.5	95.5	85.8
II223	1.6	1.6	1.9	1.9	1.9	1.1		97.4	97.4	97.1	94.7	94.5	94.5	94.7	94.5	94.5	94.5	84.7
Qs50	1.9	1.9	2.1	2.1	2.1	1.3	2.4		100.0	99.2	95.8	94.7	94.7	95.0	94.7	94.7	94.7	85.5
Qs56	1.9	1.9	2.1	2.1	2.1	1.3	2.4	0.0		99.2	95.8	94.7	94.7	95.0	94.7	94.7	94.7	85.5
Qs84	2.1	2.1	2.4	2.4	2.4	1.6	2.7	0.8	0.8		95.0	94.5	94.5	94.7	94.5	95.0	95.0	85.5
Hubei	4.6	4.6	4.9	4.3	4.3	4.1	5.2	4.4	4.4	5.2		95.0	95.0	95.3	95.5	95.0	95.0	86.1
HB86	5.2	5.2	4.9	4.9	4.9	4.7	5.5	5.5	5.5	5.8	5.2		100.0	99.7	99.5	99.5	99.5	86.3
HR54	5.2	5.2	4.9	4.9	4.9	4.7	5.5	5.5	5.5	5.8	5.2	0.0		99.7	99.5	99.5	99.5	86.3
Q12	4.9	4.9	4.6	4.6	4.6	4.4	5.2	5.2	5.2	5.5	4.9	0.3	0.3		99.7	99.7	99.7	86.6
HF1	5.2	5.2	4.9	4.9	4.9	4.7	5.5	5.5	5.5	5.8	4.6	0.5	0.5	0.3		99.5	99.5	86.8
L99	5.2	5.2	4.9	4.9	4.9	4.7	5.5	5.5	5.5	5.2	5.2	0.5	0.5	0.3	0.5		100.0	86.8
R22	5.2	5.2	4.9	4.9	4.9	4.7	5.5	5.5	5.5	5.2	5.2	0.5	0.5	0.3	0.5	0.0		86.8
Gou3	16.7	16.7	17.0	17.0	17.0	16.1	17.1	16.4	16.4	16.4	15.8	15.4	15.4	15.0	14.7	14.7	14.7	

片段比 M 片段更加保守。

讨 论

早期的 HV 分型工作主要以空斑减少中和实验 (PRNT) 进行, 但 PRNT 技术的试验周期长, 条件要求严格, 不适用于对大量毒株的分型和大规模流行病学调查的需要, 并且有些病毒不易形成空斑或很难分离成功, 限制了该方法的应用。而使用 PCR 技术, 结合序列分析的方法, 对 HV 进行分型, 不但操作简便、迅速, 且能确定 HV 的亚型, 因此, 越来越得到广泛的应用^[7,9]。本研究采用间接免疫荧光法检测鼠肺阳性标本, 以 RT-PCR 分型技术和核苷酸序列测定技术, 对来源于河南省主要 HFRS 疫区的 HV 毒株、宿主动物阳性标本进行了基因型及其亚型分布研究, 研究发现在河南省主要疫区采集的褐家鼠、黄胸鼠以及小家鼠均携带 II 型 HV, 存在 3 个基因亚型。

国际病毒分类与命名委员会于 1994 年提出根据病毒基因组序列分型的标准: ①新汉坦病毒, 至少有一个基因片段的核苷酸序列和其他已知的 HV 序列有 25% 以上的差异; ②HV 亚型, 至少有一个基因片段的核苷酸序列和该型的其他病毒序列有 5%~24% 的差异; ③同一亚型, 所有基因片段的核苷酸序列差异在 5% 以下。Xiao 等^[10] 依据 M 基因片段上部分核苷酸序列构建系统发生树, 分型结果与血清学分型结果一致, 而位于 G2 区 2003~2302nt 的核苷酸片段是常用来进行构建系统发生树及其分型的片段^[5,11,12]。我们根据 M 和 S 片段核苷酸序列的

同源性, 与 GenBank 中所报道的 SEOV 核苷酸序列进行比较绘制系统发生树, 研究发现河南省主要疫区的 SEOV 至少存在 3 个亚型: S1、S2、S3, 其中 S1 和 S3 为优势流行亚型。河南周边省份 SEOV 的分布情况: 湖北、安徽省为 S4 亚型; 山西、江苏省为 S1 亚型; 河北、山东省为 S3 亚型。HV 有相对严格的宿主动物特异性, 宿主动物的种群构成决定了疫源地的类型。国外的科学家对分离自各种宿主动物和患者的毒株进行分析, 发现 HV 至少存在 20 个以上的血清型/基因型, 而且每型病毒均来自不同的啮齿类动物^[2,3,13]。然而, 在河南省主要疫区采集的褐家鼠、黄胸鼠以及小家鼠中携带的 HV 均为 II 型汉城病毒, 且基因亚型的分布表现出明显的地理聚集性, 没有动物间的区别。本研究的结果与我国 HFRS 的长期监测结果相一致^[10]。

对河南省几个主要监测点的地形、地貌特征与鼠种分布情况研究发现, 汤阴县毗邻河北与山东省, 宿主动物携带的病毒与这两省的毒株同属于 S3 亚型, 可能其来源相同。灵宝县毗邻山西省, 宿主动物携带的病毒与山西 SEOV 毒株同属于 S1 亚型, 其来源可能相同。确山县虽位于河南省南部, 鼠携带的病毒为 S3 亚型, 然而与相邻的湖北省的 2 株 SEOV 不同。上述结果表明 SEOV 比较保守, 亚型分布上呈现出明显的地理聚集性, 而在不同地区间仍表现出明显的遗传多样性。但由于样品数量有限以及系统性研究不够, 本研究还不能揭示河南省完整 II 型 HV 的基因亚型及其分布, 以及与周边省份流行的 II 型 HV 的进化关系。

参 考 文 献

1 Elliott LH, Schmaljohn CS, Collet MS. Bunyaviridae genome structure and gene expression. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1991, 169:91-141.

2 Kukkonen SK, Vaheri A, Plyusnin A. Completion of the Tula hantavirus genome sequence: properties of the L segment and heterogeneity found in the 3' termini of S and L genome RNAs. *J Gen Virol*, 1998, 79:2615-2623.

3 Plyusnin A, Morzunov SP. Virus evolution and genetic diversity of hantaviruses and their rodent hosts. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2001, 256:47-75.

4 王世文, 杭长寿, 王华, 等. 我国汉坦病毒基因型和基因亚型的分布研究. *病毒学报*, 2002, 18:211-216.

5 Wang H, Yoshimatsu K, Ebihara H, et al. Genetic diversity of hantavirus isolated in China and characterization of novel hantaviruses isolated from *Niviventer confucianus* and *Rattus*. *Virology*, 2000, 278:332-345.

6 姚智慧, 俞永新. 应用聚合酶链反应对我国不同来源肾综合征出血热病毒的型别分析. *病毒学报*, 1994, 10:128-135.

7 Plyusnin A, Horling J, Kanerva M, et al. Puumala hantavirus genome in patients with nephropathia epidemica: correlation of PCR positivity with HLA haplotype and link to viral sequences in local rodents. *J Clin Microbiol*, 1997, 35:1090-1096.

8 Papa A, Johnson AM, Stockton PC, et al. Retrospective serological and genetic study of the distribution of hantaviruses in Greece. *J Med Virol*, 1998, 55:321-327.

9 Tatjana Avsic-Zupanc, Kirill N, Miro P, et al. Genetic analysis of wide-type Dobrava hantavirus in Slovenia: co-existence of two distinct genetic lineages within the same natural focus. *J General Virol*, 2000, 81:1747-1755.

10 Xiao SY, Liang M, Schmaljohn CS. Molecular and antigenic characterization of HV114, a hantavirus isolated from a patient with haemorrhagic fever with renal syndrome in China. *J Gen Virol*, 1993, 74:1657-1659.

11 Padula PJ, Colavocchia SB, Martinez VP, et al. Genetic diversity, distribution, and serological features of hantavirus infection in five countries in South America. *J Clin Microbiol*, 2000, 38:3029-3035.

12 Lokugamage K, Kariwa H, Hayasaka D, et al. Genetic characterization of hantaviruses transmitted by the Korean field mouse (*Apodemus peninsulae*), Far East Russia. *Emerg Infect Dis*, 2002, 8:768-776.

13 张永振, 肖东楼, 王玉, 等. 中国肾综合征出血热流行趋势及其防治对策. *中华流行病学杂志*, 2004, 25:466-469.

(收稿日期:2004-11-11)
(本文编辑:张林东)

· 疾病控制 ·

乌鲁木齐市 230 名体检儿童中输血传播病毒感染的检测

雷新莉 马秀敏 王伊 阿曼古丽·牙生 王晓岚

为了解儿童中输血传播病毒(TTV)的感染情况,我们采用巢式 PCR 技术对新疆自治区乌鲁木齐市 230 名体检儿童进行了 TTV-DNA 检测。

1. 对象与方法:2003 年 2 月至 2004 年 6 月在乌鲁木齐市中医医院体检儿童 230 名,年龄 3~12 岁,平均年龄 7.5 岁±0.8 岁,其中 HBsAg 阴性儿童血清标本 160 份,乙肝病毒(HBV)携带者,即单纯 HBsAg 阳性儿童血清标本 70 份,两组儿童年龄无差异,无输血史、无肝炎症状。TTV PCR 扩增试剂盒购自北京肝炎试剂中心, IIBV 检测 ELISA 诊断试剂盒购自英科新创厦门科技有限公司,按说明书操作。数据统计学处理采用 χ^2 检验。

2. 结果与分析:在 230 名体检儿童中共检出 TTV-DNA 阳性者 40 例,阳性率为 17.4%。其中 HBsAg 阴性儿童 TTV-DNA 阳性率为 13.7% (22/160), HBsAg 携带儿童 TTV-DNA 阳性率为 25.7% (18/70), 两组相比差异有统计学意义 ($\chi^2 = 4.85, P < 0.05$)。我们根据 Okamoto 等^[1]报道的基因

序列设计引物,采用巢式 PCR 技术对 230 名儿童进行 TTV-DNA 检测,结果共检出 TTV-DNA 阳性血清者 40 例。说明乌鲁木齐市儿童中存在 TTV 感染,HBV 携带儿童组 TTV-DNA 感染率明显高于体检健康儿童组,初步推测儿童 TTV 的感染与肝炎病毒感染有关。TTV 主要通过输血传播,还可能通过多种途径传播,如:消化道、飞沫感染的可能性;儿童感染 TTV 的重要传播途径可能是母乳喂养及母婴间密切接触,儿童之间又通过幼儿园、学校的集体生活广泛播散。TTV 与输血后原因不明转氨酶升高有密切关系^[2];所以,应重视对儿童的定期体检。

参 考 文 献

1 Okamoto H, Nishizawa T, Kato N, et al. Molecular cloning and characterization of a novel DNA Virus (TTV) associated with post transfusion hepatitis of unknown etiology. *Hepato Res*, 1998, 10:1-16.

2 Naoumov N, Petrova E, Thomas M, et al. Presence of a newly described human DAN virus (TTV) in patients with liver disease. *Lancet*, 1998, 352:195-197.

(收稿日期:2004-08-15)
(本文编辑:尹廉)

作者单位:830000 新疆乌鲁木齐市中医医院儿科(雷新莉);新疆医科大学基础医学院(马秀敏、王伊),第一附属医院肝病专科医院(阿曼古丽·牙生、王晓岚)