

· 实验研究 ·

湖南省啮齿动物携带汉坦病毒的分子流行病学研究

张永振 肖奇友 李明慧 邹洋 吕炜 戴德芳 陈化新

【摘要】 目的 研究湖南省啮齿动物中汉坦病毒(HV)流行情况及病毒型别。方法 采用 IFA 法检测鼠肺中 HV 抗原;用 RT-PCR 法扩增阳性标本中 HV 的部分 S 和 M 片段;构建系统发生树进行系统发生分析及分型。结果 在湖南省 HV 流行的地区共捕获啮齿动物 344 只,其中 6 份标本 HV 抗原阳性,病毒携带率为 1.74%。对扩增出的部分 S 与 M 片段的核苷酸序列分析表明,5 份标本中的病毒为汉城型 HV(SEOV),1 份为汉滩型 HV(HTNV)。用 S(620~990 nt)与 M 片段 G2 区(2001~2301 nt)核苷酸序列所构建的系统进化树显示,湘乡褐家鼠、黄胸鼠及黄毛鼠携带的病毒均为 SEOV 的 S4 亚型;宁远褐家鼠携带的病毒为 SEOV 的一个新亚型;石门小家鼠携带的病毒为 HTNV 的 H4 亚型。结论 湖南省为混合型 HV 疫区,以汉城病毒为主,并具有宿主多样性。

【关键词】 汉坦病毒;基因型;系统发生分析

An epidemiologic investigation of hantaviruses carried by rodent hosts in Hunan province ZHANG Yong-zhen*, XIAO Qi-you, LI Ming-hui, ZOU Yang, LV Wei, DAI De-fang, CHEN Hua-xin. *National Institute of Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Diseases Control and Prevention, Beijing 102206, China

Corresponding author: ZHANG Yong-zhen, Email: yongzhenzhang@sohu.com

【Abstract】 **Objective** To explore the hantavirus infection and their genotype in rodents in Hunan. **Methods** Hantavirus antigens in the rat lungs from Hunan province were detected by immunofluorescence assay. Partial S and M segment in antigen-positive samples were amplified by RT-PCR, and then sequenced. The phylogenetic trees were constructed for the analysis of genetic characters of hantavirus. **Results** A total of 344 rats were trapped in the main epidemic area of Hunan province, and hantavirus antigens were found in 6 of the 344 rats (1.74%). The phylogenetic trees constructed by partial S segment (nt 620-990) or partial G2 segment (nt 2001-2301) showed that the hantaviruses carried by *Rattus norvegicus*, *R. flabipectus* and *R. rattoides* from Xiangxiang district were genetic subtype SEOV4. The virus carried by *R. norvegicus* in Ningyuan district was phylogenetically different from the known SEOV. The hantavirus carried by *Mus musculus* from Shimen district was genetic subtype HTNV4. **Conclusion** The hantaviruses in the main epidemic areas in Hunan province mainly belonged to SEOV, and *R. flabipectus* and *R. rattoides* carried the same genotype of SEOV as *R. norvegicus*.

【Key words】 Hantavirus; Genotype; Phylogenetic analysis

汉坦病毒属于布尼亚病毒科的汉坦病毒属(hantavirus, HV),主要由啮齿类动物携带并传播给人类。在全世界范围内已发现 HV 至少存在有 20 个以上的血清型/基因型^[1]。每一型均来自一种或少数几种密切相关的啮齿动物,并在宿主动物中产

生持续无症状感染,与自然宿主共进化^[2]。由于 HV 与宿主动物间的这种对应关系,宿主动物的种群类型及其感染情况决定了疫区的性质和人间的流行强度。湖南省于 1963 年报告肾综合征出血热(HFRS)疫情^[3],以后报告发病数不断增加,疫区范围不断扩大,是我国 HFRS 的主要疫区之一^[3,4]。为进一步了解湖南省宿主动物中 HV 的流行特征,我们在湖南省进行宿主动物 HV 的流行病学调查,并从 HV 抗原阳性鼠肺中扩增部分 S 与 M 基因片段,进行病毒基因分型及相关序列分析,现将结果报告如下。

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, 2002DIB40095)

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心传染病预防控制所(张永振、李明慧、邹洋、陈化新);湖南省疾病预防控制中心(肖奇友、吕炜、戴德芳)

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

材料与方法

1. 标本采集:2004-2005 年的春季与秋季在湖南省宁远、石门、湘乡、洞口、望城、岳阳、沅江等地区的野外及居民区用鼠笼和鼠夹捕鼠,对捕获的鼠类标本经分类鉴定后,无菌解剖取其肺脏,放置于液氮中保存待检。

2. 病毒抗原检测:将鼠肺冰冻切片后,用间接免疫荧光法(IFA)进行检测。检测中所用的兔抗 HV 抗体由本实验室制备,羊抗兔免疫荧光抗体购自 Sigma 公司。免疫荧光检测抗原呈阳性的标本用于 RT-PCR 扩增。

3. 病毒 RNA 的提取:参照 Invitrogen 公司的 Trizol RNA 提取试剂使用说明书提取病毒 RNA。用 40 μ l 无 RNA 酶的去离子水溶解,于 -70℃ 保存备用。

4. 引物的设计及合成:用 P14 引物逆转录 S 与 M 基因片段^[5],用于扩增 S 片段(620~990 nt)与 M 片段 G2 区(2001~2301 nt)的引物见参考文献[6]。扩增 M 片段 G1 区的 140~640 nt 的外引物见参考文献[7],我们设计了用于扩增 SEOV M 片段 G1 区的内引物 G1N1(5'-ATTTCCCCACTCTCATTAC-3'), G1N2 (5'-CAAAGCATTTTCTTCTGTCA-3')。扩增田鼠中携带病毒的内引物 KBR-S1(5'-TCCTTTGATGATGTGAATGG-3')与 KBR-S4(5'-GGCTGCATACTCCAGAAGTT-3')见参考文献[8]。引物由北京奥科生物技术有限公司合成。

5. RT-PCR:以 P14 引物使用 AMV 逆转录酶(Promega)于 42℃ 反应 60 min 合成 S 及 M 基因的 cDNA。采用巢式 RT-PCR 方法,以 HV-SFO 和 HV-SRO 及 SEO-SF 和 SEO-SR 为外内引物扩增 S 片段(620~990 nt),以外引物 G1W1 和 G1W2 及内引物 G1N1 和 G1N2 扩增 G1 区片段(140~640 nt),以外引物 HV-MFO 和 HV-MRO 及内引物 SEO-MF 和 SEO-M 扩增 G2 片段(2001~2301 nt)。具体扩增条件为:94℃ 预变性 5 min,94℃ 1 min、52℃ 1 min、72℃ 1 min,共 30 个循环,最后于 72℃ 延伸 10 min。

PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳后,用 TaKaRa 公司的凝胶回收试剂盒按照说明进行回收纯化。扩增的核苷酸片段由北京奥科生物技术有限公司完成序列测定。

6. 系统发生分析:使用 MEGA 3.1 和 DNASTar 软件包进行系统发生分析,以邻位相连法构建系统

发生树。分析采用 1000 个多序列组。用于比较分析的 HV 序列来自于 GenBank,见表 1。

结 果

1. HV 抗原的检测:2004-2005 年在湖南省宁远、石门、湘乡、洞口、望城、岳阳、沅江等地区共捕获啮齿类动物 344 只,啮齿类动物种类及其数量见表 2,其中褐家鼠和黑线姬鼠均占鼠类总数的 27.9%,为优势鼠种。采用 IFA 法检测 344 份鼠肺标本,共检出 HV 抗原阳性 6 份,病毒携带率为 1.74%。所发现的阳性标本中湘乡地区 4 份,占 66.7%;宁远及石门各 1 份。带病毒的鼠种为褐家鼠、黄胸鼠、黄毛鼠及小家鼠。在 96 只黑线姬鼠的鼠肺中没有检测到 HV 抗原。

2. HV 的型别鉴定:对 6 份 HV 抗原阳性的标本,采用型特异的引物,扩增其部分 G1 片段并进行序列测定,结果湘乡地区 2 只褐家鼠、1 只黄胸鼠及 1 只黄毛鼠中所携带的病毒均为 SEOV,编号分别为 XXA017、XXA039、XXA001、XXA032,这 4 株病毒间的核苷酸序列的同源性达 98.5% 以上,与 L99 及 R22 株的同源性分别为 90.2%~90.5%、90.5%~90.8%;宁远地区褐家鼠所携带的病毒也为 SEOV,编号为 NYA039,与湘乡地区 4 株病毒 HV 序列的同源性为 81.5%~83.0%,与中国 L99 及 R22 株的同源性为 80.0%~80.5%;石门地区小家鼠所携带病毒 SMA029 株为 HTNV,与 HTNV 国际标准株 76-118 株的同源性为 82.5%,与 SEOV 病毒的同源性为 70.0%~71.9%。采用 KBR 型特异性引物对所捕获的 57 份东方田鼠肺组织样品进行 S 片段序列扩增,结果全部为阴性。

3. 系统发生分析:6 份阳性鼠肺标本中,用属特异性引物共扩增出 6 个 S 基因 620~990 nt 片段,采用常用于进化分析的 M 基因 G2 片段特异性引物仅扩增出 5 个 G2 片段,从 NYA039 标本中没有扩增出相应的 G2 片段。

比较 5 株 SEOV 部分 S 片段核苷酸序列发现,5 株病毒间的同源性为 89.7%~99.7%。其中湘乡地区 4 株病毒间的同源性最高,为 97.3%~99.7%,但与宁远 NYA039 株的同源性相对较远,同源性为 89.2%~89.7%。与表 1 中所列出其他 SEOV 同源性比较发现,湘乡地区 4 株病毒与 SR11、80-39、Tchoupitoulas 株等 S4 亚型病毒的同源性较高^[9],为 96.1%~97.9%,与 HLD12、HLD65、HLD78 等 S3

亚型病毒的同源性为 90.3% ~ 91.7%^[10], 与 L99、R22、K24 株等 S1 亚型病毒的同源性为 89.4% ~ 90.2%^[9], 与 Gou3 株的同源性为 86.0% ~ 86.3%^[9]。NYA039 与 Gou3 株的同源性 90.2%, 与 S1 与 S4 等其他亚型病毒株的同源性为 82.8% ~ 83.1%。石门小家鼠携带的病毒 SMA029 株的 S 片段的核苷酸序列与包括 76-118 株在内的 HTNV 的差异型在 25% 以内。

用部分 S 片段核苷酸序列构建的进化树见图 1。在 SEOV 中, 湘乡 XXA001、XXA017 及 XXA039 分在一个亚支, XXA032 与 80-39、BjHD01、Tchoupitoulas 分在同一亚支, 但这 4 株病毒均分在 S4 亚型分支内。而 NYA039 虽与 Gou3 株的进化关系较近, 但独自构成一进化支。石门小家鼠携带的病毒株 SMA029 为 HTNV, 分在 HTNV 发生群。

用 M 片段 G2 (2001 ~ 2301 nt) 区核苷酸序列所构建的系统进化树显示, 湘乡地区 4 株病毒均为 SEO 型 HV, 4 株病毒间的同源性为 98.5% 以上, 与 Hubei-1、SR11、Girard Point 病毒株的同源性最高, 为 95.5% ~ 96.3%, 在系统发生树上亲缘关系最近, 同在第 4 亚型分支^[7] (图 2)。

石门地区小家鼠所携带病毒 SMA029 其 M 片段 G2 区核苷酸序列与中国的 HTN 型毒株 A16、Q32 株的同源性最近为 87.0% ~

表1 研究中用于系统发生分析的毒株及来源

型	毒株	宿主	来源	地区	GenBank	
					M(2001~2301 nt)	S(620~990 nt)
SEOV	NM39	褐家鼠	中国	内蒙古	AB027080	-
	L99	罗赛鼠	中国	江西	AF035833	AF488708
	R22	褐家鼠	中国	河南	AF035834	AF488707
	Guang199	褐家鼠	中国	广东	AB027086	-
	Beijing-Rn	褐家鼠	中国	北京	AB027087	-
	c3	人	中国	河北	AB027088	-
	Hebei4	黑线仓鼠	中国	河北	AB027089	-
	SD227	褐家鼠	中国	山东	AB027091	-
	Hubei-1	人	中国	湖北	S72343	-
	Tchoupitoulas	褐家鼠	美国	-	U00473	AF329389
	SR11	褐家鼠	日本	-	M34882	M34881
	Girard Point	褐家鼠	美国	-	X53861	-
	Gou3	黑家鼠	中国	浙江	A027521	AF288651
	C-10	-	中国	浙江	-	DQ081718
	QH367	-	中国	浙江	-	DQ081717
	80-39	褐家鼠	韩国	-	S47716	AY273791
	BjHD01	-	中国	北京	-	AY627049
	Hb8610	-	中国	山西	-	AF288643
	K24	-	中国	浙江	AF288652	AF288653
	HTNV	B-1	褐家鼠	日本	-	X53861
76-118		黑线姬鼠	韩国	-	M14627	M14626
NC167		社鼠	中国	安徽	AB027115	AB027523
Q36		黑线姬鼠	中国	贵州	AB027057	-
Q7		黑线姬鼠	中国	贵州	AB027058	-
H5		人	中国	黑龙江	AB127993	AB127996
B78		人	中国	山东	AB027056	AB127997
A16		黑线姬鼠	中国	陕西	AB027063	AF288646
Q10		黑线姬鼠	中国	贵州	AB027062	-
Q32		黑线姬鼠	中国	贵州	AB027061	AB027097
84Fli		人	中国	陕西	AF366569	AY017064
Bao10		黑线姬鼠	中国	黑龙江	AB027069	-
Bao14		黑线姬鼠	中国	黑龙江	-	AB127998
HTN261		黑线姬鼠	中国	黑龙江	-	AF252259
Chen4		人	中国	安徽	-	AB027101
Lee		人	韩国	-	D00377	-
B256		-	中国	-	AB027079	-
Q83		-	中国	贵州	AB027078	-
A9		黑线姬鼠	中国	江苏	-	AF329390
Hu		人	中国	湖北	AB027077	AB027111
HN26-L	黑线姬鼠	中国	海南	AB027074	-	
Z10	人	中国	浙江	AB027076	AF184987	
SN7	社鼠	中国	四川	AF288656	AF288657	
DOBV	Dobrava	黄喉姬鼠	斯洛文尼亚	-	NC005234	L41916
PUVV	P360	棕背鼯	俄国	-	L08755	L11347
SNV	NMR-11	鹿鼠	美国	-	L37903	L37904
TULV	Moravia/5302v/95	普通田鼠	捷克	-	NC005228	NC005227
KBRV	MF-43	东方田鼠	俄国	-	AJ011648	U35255
ANDV	AH1	长尾小嘴鼠	阿根廷	-	AF324901	AF324902

表2 捕获啮齿类动物种类及数量

地区	种类(阳性数/检测数)									
	褐家鼠	黑线姬鼠	小家鼠	黄胸鼠	黄毛鼠	社鼠	大足鼠	银星竹鼠	田鼠	合计
宁远	1/40						1	17		1/58
石门	16	16	1/16	3		5				1/56
湘乡	2/35		14	1/6	1/8	3			1	4/67
洞口	2	69	6							77
望城	1		14							15
岳阳		10								10
沅江	2	1	1	1					56	61
合计	3/96	96	1/51	1/10	1/8	8	1	17	57	6/344

88.7%,与 HTN 型国际标准株 76-118 株的同源性为 86%,与 HTN 型毒株 84Fli 同源性为 85.4%;与 SEO 型的病毒株的同源性差异较大,为 69.1%~71.8%。SMA029 处在 HTNV 第 4 亚型分支^[9]。

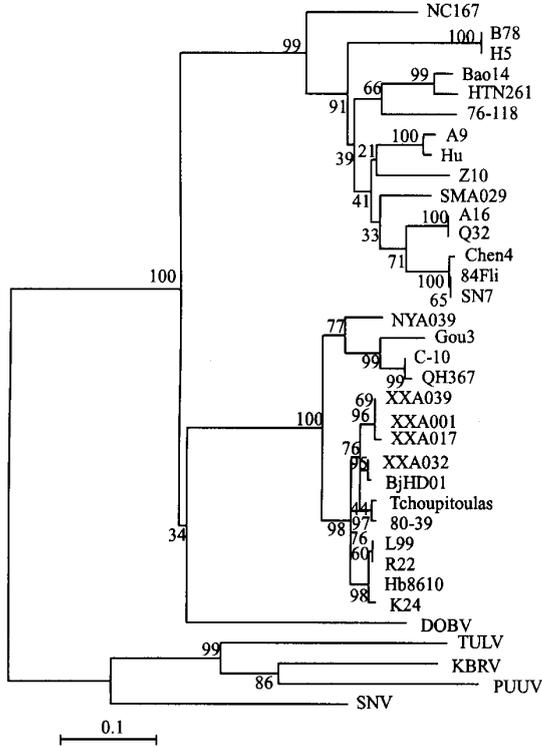


图1 用 S 片段核苷酸(620~990 nt)序列构建的系统发生树

讨 论

湖南省是我国 HFRS 的主要疫区之一,自 1990-2005 年的 16 年间,湖南省共报告 52 539 例 HFRS,死亡 501 人。全省 123 个县(市、区)有 107 个县(市、区)报告了疫情。1990-2002 年全省年报告发病数在 1000 例以上,2003 年后 HFRS 疫情下降趋势明显,2005 年全省共报告 563 例 HFRS。本次在望城、洞口、沅江、岳阳、宁远、湘乡、石门等地共采集啮齿类宿主动物 344 只,检出 HV 抗原阳性样品 6 份,病毒携带率为 1.74%。啮齿类宿主动物中较低的 HV 携带率可能是近 3 年来全省人间 HFRS 疫情显著下降的主要原因。

为了更好地了解湖南省啮齿类宿主动物中 HV 流行的类型,我们对湖南地区啮齿动物中的 HV 进行了基因分型及系统发生分析。结果发现:6 份阳性标本中有 5 份为 SEOV,1 份为 HTNV。其中湘

乡地区褐家鼠、黄胸鼠及黄毛鼠所携带的病毒均为 SEOV,而且在用 S 与 M 基因部分片段核苷酸序列构建的进化树上,与 Hubei-1、SR11、Girard Point 株病毒的亲缘关系最近,位于 S4 亚型分支。这与我们在河南省得到的结果一致,即同一地区相近鼠种携带同一亚型的 HV,显示了明显的地理聚集现象^[2,6],也表明 SEOV 与其他型的病毒相比,可能更为保守。

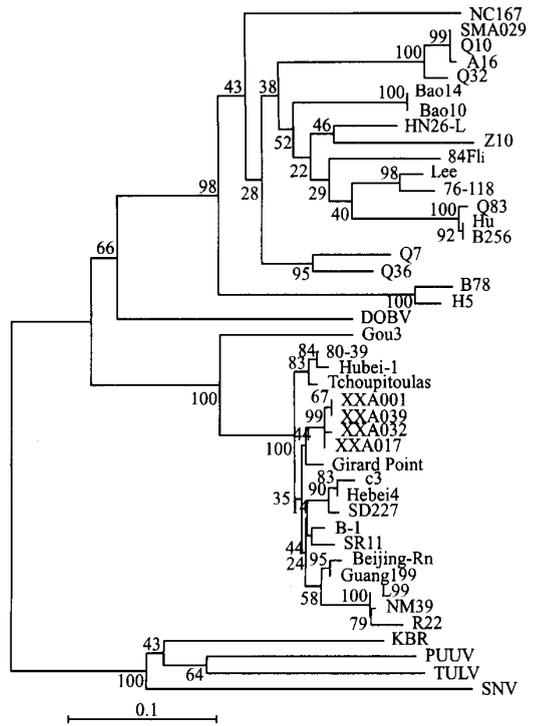


图2 用 M 片段核苷酸序列(2001~2301 nt)构建的系统发生树

湘乡地区褐家鼠、黄胸鼠及黄毛鼠所携带的病毒 XXA017、XXA039、XXA001 和 XXA032 与 BjHD01、Tchoupitoulas 等 S4 亚型病毒株的核苷酸序列的差异为 2.1%~3.9%,与 L99 及 R22 等 S1 亚型病毒株的核苷酸序列的差异为 9.8%~10.6%,与 Gou3、C-10、QH367 株 S5 亚型病毒的差异为 13.7%~14.0%。以前的研究表明在 SEOV 的系统发生树上,S1、S2、S3、S4 亚型病毒株进化关系较近,分在同一发生群,而 Gou3 株为代表的 S5 亚型为另一发生群^[9]。宁远地区褐家鼠中所携带的病毒 NYA039 在部分 S 片段构建的系统发生树上的位置与 Gou3 株处在同一发生群内。根据 1999 年国际病毒分类委员会对 HV 型的界定标准,NYA039 病

毒株可能为 SEOV 的新亚型^[11]。

石门小家鼠中所发现的 SMA029 株病毒为 HTNV, 并与标准株 A16、Q32 同源性最高, 亲缘关系最近, 为 H4 亚型。早在 20 世纪 80 年代发现小家鼠携带 HV^[12], 而且分布广泛, 是优势鼠种之一^[12]。最近在河南省进行的流行病学调查发现小家鼠携带 SEOV^[6,13]。在欧洲从小家鼠中分离到 DOBV 和 PUUV^[14,15], Baek 等^[16]报道在美国从小家鼠中分离到 Leakey 病毒, 但还没有小家鼠携带 HTN 型病毒报道。上述研究表明, 小家鼠对多种 HV 易感。由于目前对小家鼠携带 HV 的病原学研究较少, 现在还不清楚小家鼠在我国主要是携带 SEOV 还是 HTNV。另外, 小家鼠是否如黑线姬鼠、褐家鼠、黄喉姬鼠等一样, 携带相对应的原始 HV 也需要进一步的研究。

我们还采用 KBR 特异的引物对所捕获的 57 份东方田鼠肺组织进行 S 片段序列扩增, 结果全部为阴性。在俄罗斯远东地区有东方田鼠携带 KBRV 的报道^[7], 但我国是否存在此型 HV 还需进一步研究证实。

我国是受 HV 危害最为严重的国家。近十年来我国年报告发病人数一直在 2 万~5 万左右, 新疫区不断出现, 老疫区的类型也有所变化, 而且 HV 宿主动物的种类繁多^[4], 以上情况提示在我国流行的 HV 可能存在新的型别或亚型。因此, 系统地开展流行性出血热的流行病学调查和病原学监测, 发现我国是否存在国外已发现的 HV 及其分布的范围, 对于 HV 预防控制具有重要的指导意义。

参 考 文 献

- [1] Khaiboullina SF, Morzunov SP, St Jeor SC. Hantaviruses: molecular biology, evolution and pathogenesis. *Curr Mol Med*, 2005, 5:773-790.
- [2] Plyusnin A, Morzunov SP. Virus evolution and genetic diversity of hantaviruses and their rodent hosts. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2001, 256:47-75.
- [3] 龙清忠, 李伟, 张志安, 等. 湖南省流行性出血热地理流行病学研究. 中国流行性出血热地理流行病学研究. 合肥: 安徽省新闻出版局, 1990:210-219.

- [4] 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.
- [5] Schmaljohn CS, Jennings GB, Hay J, et al. Coding strategy of the S genome segment of Hantaan virus. *Virology*, 1986, 155:633-643.
- [6] 孙黎, 张永振, 李林红, 等. 河南省 II 型汉坦病毒基因亚型及其分布的研究. *中华流行病学杂志*, 2005, 26:578-582.
- [7] 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.
- [8] Horling J, Chizhikov V, Lundkvist A, et al. Khabarovsk virus: a phylogenetically and serologically distinct hantavirus isolated from *Microtus fortis* trapped in far-east Russia. *J Gen Virol*, 1996, 77:687-694.
- [9] Wang H, 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.
- [10] 屈勇刚, 杨国庆, 邹洋, 等. 葫芦岛地区鼠类 HV 的检测分离与鉴定. *中华流行病学杂志*, 2006, 27:513-517.
- [11] Elliott RM, Bouloy M, Calisher CH, et al. In van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, and Wickner RB (ed.), *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses*. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, Calif, 1999:599-621.
- [12] 陈化新, 罗成旺, 主编. 肾综合征出血热监测及疫苗应用研究. 香港: 香港医药卫生出版社, 2001:78-142.
- [13] 李林红, 吴振溢, 张彦平, 等. 河南省肾综合征出血热不同类型疫区监测比较研究. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2002, 13:127-130.
- [14] Weidmann M, Schmidt P, Vackova M, et al. Identification of genetic evidence for dobrava virus spillover in rodents by nested reverse transcription (RT)-PCR and TaqMan RT-PCR. *J Clin Microbiol*, 2005, 43:808-812.
- [15] Diglisic G, Xiao SY, Gligic A, et al. Isolation of a Puumala-like virus from *Mus musculus* captured in Yugoslavia and its association with severe hemorrhagic fever with renal syndrome. *J Infect Dis*, 1994, 169:204-207.
- [16] Baek LJ, Yanagihara R, Gibbs CJ, et al. Leakey virus: a new hantavirus isolated from *Mus musculus* in the United States. *J Gen Virol*, 1988, 69:3129-3132.

(收稿日期:2006-07-07)

(本文编辑:王多春)