

· 实验室研究 ·

浙江省慈溪市啮齿动物中汉坦病毒
分子流行病学研究

范飞能 杨鹏飞 施南峰 高娜 陈国华 李明慧 邹洋 邓小昭 张永振

【摘要】 目的 研究浙江省慈溪市啮齿动物中汉坦病毒(HV)流行情况及病毒型别。方法 采用间接免疫荧光法(IFA)检测鼠肺中 HV 抗原;用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)法扩增阳性样品中 HV 的部分 S 片段;构建系统发生树进行系统发生分析及分型。结果 在慈溪市肾综合征出血热(HFRS)疫点共捕获啮齿动物 243 只,在 7 份鼠肺样品中检测到 HV 抗原,其中 4 只为褐家鼠,3 只为黄胸鼠,病毒携带率为 2.88%。用汉城型病毒(SEOV)特异性引物从 6 份 HV 抗原阳性样品中扩增出部分 S 片段(620~999 nt)并测定了序列。对扩增出的部分 S 片段核苷酸序列分析表明,6 株病毒与现有的 SEOV 有最高的同源性,均为 SEOV。用部分 S 片段核苷酸序列所构建的系统进化树显示,6 株病毒构成两个单元支,其中由褐家鼠携带的 3 株病毒与 B₁HD01 株病毒的亲缘关系最近,分在同一分支,由黄胸鼠携带的 3 株病毒构成另一分支,与 L99、R22 及 Hb8610 株的亲缘关系较近。结论 慈溪市的褐家鼠与黄胸鼠分别携带一种不同亚型的 SEOV,表现出 SEOV 在同一地区的遗传多样性,并支持宿主与汉坦病毒共进化的理论。

【关键词】 汉坦病毒;汉城型病毒;系统发生分析;基因分型

Study on the molecular epidemiology of Hantavirus carried by rodent hosts in Cixi, Zhejiang province
FAN Fei-neng*, YANG Peng-fei, SHI Nan-feng, GAO Na, CHEN Guo-hua, LI Ming-hui, ZOU Yang, DENG Xiao-zhao, ZHANG Yong-zhen. *Cixi Center for Disease Control and Prevention, Cixi 315300, China

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

【Abstract】 Objective To collect more data on the epidemiology of hantavirus in rodents in Cixi, Zhejiang province. **Methods** Rodents were captured in Cixi, where hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) appeared endemic. Hantavirus antigens in the rat lungs were detected by immunofluorescence assay. Partial S segment sequences were amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and then sequenced. The phylogenetic trees were constructed by maximum likelihood method to detect the genetic characteristics of hantavirus. **Results** A total of 243 rodents were trapped in the epidemic areas, and hantavirus antigens were identified in 7 out of these lung samples (2.88%). Partial S segment sequences (620-999 nt) were recovered from 6 samples and sequenced. Data from phylogenetic analysis of these S segment sequences indicated that all viruses belonged to Seoul virus (SEOV), despite the origins of sources were either from *Rattus norvegicus* or from *R. flabipectus*. These viruses could further be divided into two distinct lineages but the viruses carried by *R. norvegicus* were different from those carried by *R. flabipectus*. **Conclusion** Two distinct lineages of SEOV had been cocirculating in rodents in Cixi.

【Key words】 Hantavirus; Seoul virus; Phylogenetic analysis; Genotype

汉坦病毒(HV)属于布尼亚病毒科的汉坦病毒属,主要由啮齿类动物携带并传播给人类,引起肾综

合征出血热(HFRS)及汉坦病毒肺综合征(HPS)^[1]。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^[2],而且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性无症状感染,与其宿主共进化^[2,3]。我国至今已发现汉滩型(HTNV)、汉城型(SEOV)、大别山型及北海道型病毒^[4,5]。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流行强度。慈溪市是浙江省

基金项目:科技部“十五”科技攻关课题资助项目(2003BA712A08-02);国家自然科学基金资助项目(30771861)

作者单位:315300 浙江省慈溪市疾病预防控制中心(范飞能、施南峰、陈国华);新疆石河子生命科学学院(杨鹏飞、高娜);中国疾病预防控制中心传染病预防控制所(李明慧、邹洋、张永振);南京军区军事医学研究所(邓小昭)

范飞能与杨鹏飞同为第一作者

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

HFRS 的主要疫区之一。为进一步了解慈溪市宿主动物中 HV 的流行特征,在慈溪市进行了宿主动物 HV 的流行病学调查。

材料与方法

1. 标本采集:2006 年的春季与秋季在慈溪市疫点周围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:将鼠肺样品冰冻切片后,用间接免疫荧光法进行检测。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扩增部分 S 基因片段。

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 μl 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 引物反转录 S 基因片段^[6],用于扩增 S 片段(600~999 nt)的引物见参考文献[7]。引物由北京奥科生物技术有限公司合成。

5. 反转录聚合酶链反应(RT-PCR):以 P14 引物使用 AMV 反转录酶(Promega)于 42℃ 反应 60 min 合成 S 基因的 cDNA。采用巢式 PCR 方法,以 HV-SFO 和 HV-SRO 及 SEO-SF 和 SEO-SR 为内外套引物扩增 S 片段(620~999 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:用 DNASTar 软件进行基因序列排序及同源性分析,用 PHYLIP 软件进行系统发生分析,以最大似然法(ML)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:2006 年在慈溪市 4 个疫点周围共捕获啮齿类动物 243 只,其中褐家鼠 167 只,黄胸鼠 31 只,黑线姬鼠 10 只,小家鼠 20 只,鼯鼠

15 只。褐家鼠占总数的 68.7%,为当地的优势鼠种。采用 IFA 法检测 243 份鼠肺样品,共检出 7 份鼠肺样品 HV 抗原阳性,病毒携带率为 2.88%。查出 HV 抗原阳性的鼠中,褐家鼠 4 只,编号分别为 CXRn20、CXRn30、CXRn56、CXRn76;黄胸鼠 3 只,编号分别为 CXRf23、CXRf92、CXRf135。在其他鼠种的鼠肺样品中没有检测到 HV 抗原。

表 1 用于系统发生分析的毒株及来源

病毒型	毒株	宿主	来源	S 基因片段 (620~999 nt)
SEOV	L99	罗赛鼠	中国江西	AF488708
	R22	褐家鼠	中国河南	AF488707
	Z37	褐家鼠	中国浙江	AF187082
	ZT10	东方田鼠	中国浙江	AY766368
	80-39	褐家鼠	韩国	AY273791
	K24-v2	褐家鼠	中国浙江	AF288655
	Hb8610	-	中国山西	AF288643
	BjHD01	-	中国北京	AY627049
	zy27	-	中国黑龙江	AF406965
	pf26	-	中国黑龙江	AY006465
	IR461	实验大白鼠	英国	AF324902
	QH367	-	中国浙江	DQ081717
	NYA039	褐家鼠	中国湖南	EF210131
	Tchoupitoulas	褐家鼠	美国	AF329389
HTNV	SR11	褐家鼠	日本	M34881
	Gou3	黑家鼠	中国浙江	AF288651
	76-118	黑线姬鼠	韩国	M14626
	DOB	黄喉姬鼠	斯洛文尼亚	L41916

注:DOB 为多布拉伐型病毒

2. RT-PCR 结果及基因片段的同源性分析:对 7 份 HV 抗原阳性的样品,用 SEOV 型特异引物分别扩增其部分 S 基因片段,并进行序列测定。除鼠肺样品 CXRn20 外,其他 3 只褐家鼠及 3 只黄胸鼠的鼠肺样品中均扩增出部分 S 基因片段(620~999 nt)。6 株病毒间的部分 S 片段核苷酸序列的同源性为 94.6%~99.2%(表 2)。值得注意的是褐家鼠携带的 3 株病毒间(CXRn30、CXRn56、CXRn76)的同源性最高,为 98.5%~99.2%;黄胸鼠携带的 3 株病毒间的同源性最高,为 98.9%~99.2%。两种鼠携带的病毒间的差异为 5%。进一步分析发现,褐家鼠携带的 3 株病毒(CXRf23、CXRf92、CXRf135)与北京发现的褐家鼠携带的 BjHD01、zy27、Z37、ZT10 株的同源性 >96%,而黄胸鼠携带的 3 株病毒与 Hb8610、K24-v2、L99 以及 R22 株病毒的同源性较高,>98%。另外,这 6 株病毒与 HTNV 及 DOBV 的同源性均 <70%。

表2 慈溪市啮齿动物中 SEOV 与其他已知 SEOV 的部分 S 基因片段(620~999 nt)核苷酸和氨基酸同源性(%)

毒株	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1 CXRf23		99.2	98.9	94.9	94.6	94.4	95.4	95.7	99.2	98.9	94.6	93.8	86.0	68.4	69.1
2 CXRf92	99.2		99.2	95.4	95.2	94.9	95.7	96.0	99.7	99.2	94.9	94.4	86.3	68.6	69.9
3 CXRf135	99.2	99.9		95.7	95.4	95.2	96.0	95.7	99.5	98.9	94.6	94.1	86.0	68.4	69.9
4 CXRn30	99.2	99.9	99.9		99.2	98.5	98.7	97.8	95.7	95.2	94.9	95.7	86.0	68.9	69.4
5 CXRn56	98.4	99.2	99.2	99.7		99.2	97.6	97.6	95.4	94.9	94.6	95.4	85.8	68.9	69.1
6 CXRn76	97.6	98.4	98.4	99.5	99.7		96.8	96.8	95.2	94.6	94.4	94.6	85.5	68.6	68.8
7 BjHD01	99.2	99.9	99.9	98.9	98.7	98.4		97.8	96.0	95.4	95.2	94.4	86.6	68.8	68.8
8 ZT10	99.2	99.9	99.9	98.4	97.6	97.3	99.9		96.2	95.7	94.9	94.4	85.8	68.8	68.8
9 Hb8610	99.5	99.9	99.9	98.4	97.6	96.8	99.9	99.9		99.5	95.2	94.6	86.6	68.6	68.8
10 L99	99.2	99.9	99.9	98.4	97.6	96.8	99.9	99.9	99.9		94.6	94.1	86.0	68.6	68.7
11 SR11	97.6	98.4	98.4	98.5	97.7	96.9	96.8	96.8	96.8	96.8		94.4	86.8	68.4	69.4
12 IR461	95.1	95.9	95.9	96.2	95.4	95.2	96.0	95.2	95.0	94.4	96.2		85.8	68.8	69.4
13 Gou3	97.6	98.4	98.4	96.8	96.0	95.2	98.4	98.4	98.4	98.4	96.8	94.4		67.0	67.2
14 HTNV	69.1	69.9	69.9	70.4	69.6	68.8	69.2	69.2	68.8	68.8	69.6	68.9	68.0		68.1
15 DOBV	70.2	70.2	69.9	70.6	69.8	69.0	69.9	69.4	70.4	71.0	69.8	69.8	68.3	70.4	

3. 系统发生分析:用部分基因 S 片段(620~999 nt)核苷酸序列构建的系统发生树见图 1。由图可见,无论是由褐家鼠携带的 3 株病毒还是由黄胸鼠携带的 3 株病毒全部位于 SEOV 单元群中。然而,6 株病毒被分在两个不同的单元支中。由褐家鼠携带的 3 株病毒聚集在一起,构成一个单元支,与 BjHD01 株病毒的进化关系最近。而由黄胸鼠携带的 3 株病毒聚集在一起,构成一个独立的单元支,与 Hb8610、K24-v2、R22、L99 等病毒的亲缘关系最近,但与褐家鼠携带的 3 株病毒的亲缘关系较远。另外,所有的 SEOV 病毒构成 6 个单元支,表明 SEOV 与其他 HTNV 等一样具有遗传多样性。

讨 论

慈溪市是浙江省 HFRS 的主要疫区之一,1968 年报告首例 HFRS,随后 HFRS 疫情从未间断。2001 年是历史上发病最多的年份,全市共报告 77 例。为更好地了解慈溪市啮齿类宿主动物中 HV 流行的类型及其强度,以及与我国其他地区 HV 的进化关系,开展了啮齿动物中 HV 分子流行病学研究。对从 7 份阳性样品中的 6 份扩增出部分 S 基因片段进行系统发生分析发现:6 株病毒全为 SEOV,但褐家鼠携带的 3 株病毒不同于黄胸鼠携带的 3 株病毒,分别为不同基因亚型的 SEOV 病毒。在同一地区,鼠属的不同鼠种携带不同基因亚型 SEOV 病毒,在该地区尚属首次发现。

SEOV 主要由鼠属的啮齿动物携带,引起 HFRS 比 HTNV 和 DOBV 轻,但比 Puumala 病毒引起的 HFRS 重。至今由 SEOV 引起的 HFRS 主要分布在中国,以及日本与韩国等国家^[8]。流行病学研究发现 SEOV 分布广泛^[9],即便无 HFRS 疫情的国家也发现有 SEOV 的存在^[10,11]。我国自 1981 年首先在河南省及山西省的黄河流域发现由 SEOV 引起的 HFRS^[12],随后由 SEOV 引起的 HFRS 疫区范围不断扩大,几乎在除西藏外的其他省区的褐家鼠及黑家鼠中发现 HV 阳性^[8]。然而,我国对 SEOV 的分子流行病学研究尚不系统深入。现有的研究发现,尽管 SEOV 呈全球性分布,但与其他型的 HV 相比,SEOV 的变异较小^[3,11]。在本研究中,慈溪地区的褐家鼠与黄胸鼠中存在两个亚型的 SEOV,显示出在局部地区 SEOV 的基因多样性。

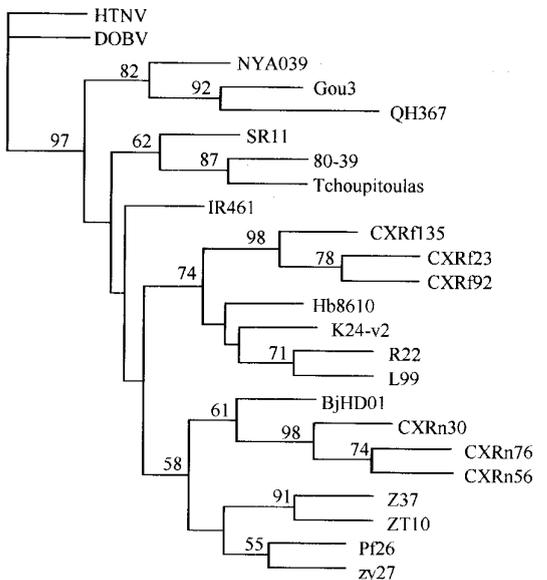


图1 用 S 基因片段核苷酸(620~999 nt)序列以 ML 法构建的系统发生树(用 HTNV 作外群)

这也表明 SEOV 可能与其他 HV 一样具有多样性。尤其是在一些偏远的山区,可能还存在着新的亚型^[13]。考虑到与大部分已知的 SEOV 差异较大的 Gou3 株病毒也分离自浙江省的褐家鼠中^[4],再加上浙江省的地形以丘陵山地为主,因此研究浙江地区鼠属啮齿动物中携带的 HV 有助于阐明我国 SEOV 的起源及其进化关系。

世界范围内,至今已发现啮齿类动物中存在至少 20 个血清型或基因型的 HV^[2],每一型均来自一种或少数几种密切相关的啮齿动物,与其宿主共进化^[3]。流行病学研究发现,除褐家鼠与黑家鼠是 SEOV 的主要宿主外,黄胸鼠、黄毛鼠、小家鼠、社鼠、针毛鼠等也能携带 SEOV^[8]。近年来在河南、湖南、辽宁、吉林等地区开展的分子流行病学研究,发现在同一地区甚至不同地区鼠属的不同鼠种中流行的 SEOV 均为同一亚型^[7,13-15]。然而,本研究发现在慈溪这样局部有限的地区却同时存在两种不同亚型的 SEOV,而且分别由褐家鼠与黄胸鼠携带,不同于以前的研究结果。这一结果可能意味着 SEOV 虽然相对其他 HV 较为保守,在局部地区不但显示出多样性,同时存在地理聚集现象及对宿主的相对选择性。另外,我们的这一发现支持 HV 及宿主的共进化理论^[3]。

我国是受 HV 危害最为严重的国家。近十年来我国年报告 HFRS 发病例数一直在 2 万~5 万例,新疫区不断出现,老疫区的类型也有所变化^[16],褐家鼠又是我国居民区的优势鼠种,加之 SEOV 疫区不断扩大。因此,系统地开展 SEOV 的分子流行病学研究,发现我国是否还存在新亚型的 SEOV 及其致病性,SEOV 的变化规律及其进化关系,不但对 HFRS 的预防控制具有重要的指导意义,而且有助于阐明 SEOV 的生物学特性。

参 考 文 献

[1] Schmaljohn CS, Hjelle B. Hantaviruses: a global disease problem. *Emerg Infect Dis*, 1997, 3(2): 95-104.
 [2] Nichol ST, Beaty BJ, Elliott RM, et al. *Bunyaviridae*/Fauquet

CM, Mayo MA, Maniloff J, et al. editors. *Virus Taxonomy*. VIII th report of the international committee on taxonomy of viruses. Elsevier Academic Press, Amsterdam, 2005: 695-716.
 [3] Plyusnin A, Morzunov SP. Virus evolution and genetic diversity of hantaviruses and their rodent hosts. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2001, 256(1): 47-75.
 [4] 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(2): 332-345.
 [5] Zhang YZ, Zou Y, Yan YZ, et al. Detection of phylogenetically distinct Puumala-like viruses from red-grey vole *Clethrionomys rufocanus* in China. *J Med Virol*, 2007, 79(8): 1208-1218.
 [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(2): 128-135.
 [7] 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(8): 578-582.
 [8] 鄢燕贞, 陈化新, 俞永新, 等. 汉坦病毒宿主动物生态学与进化研究进展. *中华预防医学杂志*, 2007, 41(2): 134-138.
 [9] Lee HW. *Epidemiology and pathogenesis of hemorrhagic fever with renal syndrome*/Elliott RM, editor. *The Bunyaviridae*. New York, Plenum Press, 1996: 253-267.
 [10] Childs JE, Korch GW, Glass GE, et al. Epizootiology of hantavirus infections in Baltimore: isolation of a virus from Norway rats, and characteristics of infected rat populations. *Am J Epidemiol*, 1987, 126(1): 55-68.
 [11] Shi X, McCaughey C, Elliott RM. Genetic characterisation of a hantavirus isolated from a laboratory-acquired infection. *J Med Virol*, 2003, 71(1): 105-109.
 [12] 宋干, 杭长寿, 廖化新, 等. 从轻型出血热疫区的褐家鼠分离到与流行性出血热有关的病原因子. *微生物学报*, 1982, 22(4): 373-377.
 [13] 张永振, 肖奇友, 李明慧, 等. 湖南省啮齿动物携带汉坦病毒分子流行病学研究. *中华流行病学杂志*, 2007, 28(1): 65-69.
 [14] 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(6): 513-517.
 [15] 鄢燕贞, 姚来顺, 扈光伟, 等. 吉林省汉城型汉坦病毒的基因分型与分布. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2006, 17(4): 324-326.
 [16] 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(6): 466-469.

(收稿日期: 2007-11-23)

(本文编辑: 尹廉)