

浙江省温州市啮齿动物中汉坦病毒的分子流行病学研究

林献丹 杨鹏飞 廖晓伟 李梅福 高娜 陈祎 曾士典 温怀加
陈玲萍 李明慧 张永振

【摘要】 目的 研究浙江省温州市啮齿动物中汉坦病毒(HV)流行情况及病毒型别,为该地区肾综合征出血热(HFRS)的预防控制提供科学依据。方法 采用间接免疫荧光法(IFA)检测鼠肺中 HV 抗原;用 RT-PCR 法扩增阳性样品中 HV 的部分 S 片段及部分 M 片段;构建系统发生树进行系统发生分析及分型。结果 在温州市 HFRS 疫区共捕获啮齿动物 96 只,在 6 份鼠肺样品中检测到 HV 抗原,其中 4 只褐家鼠,1 只黄胸鼠与 1 只黄毛鼠,病毒携带率为 6.3%。用汉城病毒(SEOV)特异引物从其中 5 份 HV 抗原阳性样品中扩增出部分 S 片段(620~999nt)及部分 M 片段(2001~2301nt)并测定序列。对扩增出的部分 S 及 M 片段的核苷酸序列分析发现,5 株病毒与现有的 SEOV 有同源性,均为汉城型 HV。但在用部分 S 片段及部分 M 片段核苷酸序列所构建的系统进化树上,5 株病毒的聚集模式不同。结论 温州市的褐家鼠、黄胸鼠、黄毛鼠均携带汉城型 HV,并可能发生基因片段的重排。

【关键词】 汉坦病毒;汉城型病毒;基因分型;系统发生分析

The molecular epidemiologic investigation of hantavirus carried by rodent hosts in Wenzhou, Zhejiang province LIN Xian-dan*, YANG Peng-fei, LIAO Xiao-wei, LI Mei-fu, GAO Na, CHEN Yi, ZENG Shi-dian, WEN Huai-jia, CHEN Ling-ping, LI Ming-hui, ZHANG Yong-zhen. *Wenzhou Center for Diseases Control and Prevention, Wenzhou 325001, China
Corresponding author: ZHANG Yong-zhen. National Institute of Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Diseases Control and Prevention, Beijing 102206, China Email: yongzhenzhang@sohu.com

【Abstract】 **Objective** To study the epidemiological features of hantavirus in rodents in Wenzhou, Zhejiang province. **Methods** Rodents were captured in Wenzhou, where hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) had been endemic. Hantavirus antigens in the rat lungs were detected by immunofluorescence assay (IFA). Partial S segment (nt 620-999) and partial M segment (nt 2001-2301) sequences were amplified by RT-PCR, and then sequenced. Neighbor-joining method was used to construct for phylogenetic analysis. **Results** A total of 96 rodents were trapped in the epidemic areas, and 6 hantavirus antigens were identified from these lung samples (6.3%). Partial S and partial M segment sequences were successfully recovered from 5 samples and determined. Phylogenetic analysis of these sequences indicated that all viruses belonged to Seoul virus (SEOV), regardless of the sources (*Rattus norvegicus*, *Rattus tanezumi* and *Rattus rattoides*) that they were derived. However, the clustering pattern in the partial S-tree was different from that in the partial M-tree, suggesting that the re-assortment between SEOVs had occurred. **Conclusion** All *Rattus* rats carried SEOV in Wenzhou and the genetic re-assortment with SEOV had occurred naturally.

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

汉坦病毒(hantavirus, HV)属于布尼亚病毒科的 HV 属,主要由啮齿类动物携带并传播给人类。虽然人感染后能引起肾综合征出血热(HFRS)和汉

坦病毒肺综合征(HPS),但宿主动物感染后其生长繁殖不受影响,且产生持续无症状感染^[1]。在全世界范围内已发现 HV 至少存在有 22 个以上的血清型或基因型^[2],每一型 HV 由一种或少数几种密切相关的啮齿动物携带并传播,与自然宿主共进^[3]。由于 HV 与宿主动物间的这种共进关系,一个地区宿主动物的种群构成及其感染情况也就决定了当地 HFRS 疫区的类型及其流行强度。温州市地处

基金项目:科技部国家“十五”攻关资助项目(2003BA712A08-02)

作者单位:325001 浙江省温州市疾病预防控制中心(林献丹、李梅福、陈祎、曾士典、陈玲萍);新疆石河子大学生命科学学院(杨鹏飞、高娜);浙江省瑞安市疾病预防控制中心(廖晓伟、温怀加);中国疾病预防控制中心传染病预防控制所(李明慧、张永振)

林献丹、杨鹏飞同为第一作者

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

东南沿海,地理地貌以山区为主,与福建省 HFRS 的主要疫区相邻,1981 年报告首例 HFRS 病例,随后 HFRS 疫情不断。为进一步了解温州市宿主动物中的 HV 型别、流行强度,我们在温州市进行宿主动物 HV 的流行病学调查,并从 HV 抗原阳性的鼠肺样品中扩增出部分 S、M 基因片段,做病毒的基因分型及分子流行病学分析。

材料与方 法

1. 标本采集:2007 年冬季在温州市 HFRS 流行最严重的瑞安市疫点周围的野外及居民区用鼠笼捕鼠,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(IFA)检测。兔抗-HV 抗体由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所出血热室制备,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 与 M 基因片段^[4],用于扩增 S 片段(620~999nt)与 M 片段 Gc 区(2001~2301nt)的引物见参考文献[5]。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 反转录酶(Promega)于 42℃ 反应 60 min 合成 S 及 M 基因的 cDNA。采用巢式 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(620~999nt),以外引物 HV-MFO 和 HV-MRO 及内引物 SEO-MF 和 SEO-M 扩增 Gc 片段(2003~2302nt)。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 软件包进行基因序列排序及同源性分析,用 PHYLIP 软件包进行系统发生分析,以邻位相连法(Neighbor-joining method, NJ)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(表 1)。

表 1 研究中用于系统发生分析的毒株及来源

型及毒株	宿主	来源	S(620~999nt)	M(2003~2302nt)
SEOV				
L99	罗赛鼠	中国江西	AF488708	AF035833
R22	褐家鼠	中国河南	AF488707	AF035834
Z37	褐家鼠	中国浙江	AF187082	AF190119
ZT10	东方田鼠	中国浙江	AY766368	DQ159911
80-39	褐家鼠	韩国	AY273791	S47716
K24-v2	褐家鼠	中国浙江	AF288655	AF288654
Hb8610	-	中国山西	AF288643	-
BjFT01	褐家鼠	中国北京	-	AY645717
BjHD01	-	中国北京	AY627049	DQ133505
Zy27	-	中国黑龙江	AF406965	-
Pf26	-	中国黑龙江	AY006465	-
HLD65	褐家鼠	中国葫芦岛	-	EF205377
c3	人	中国河北	-	AB027088
SD10	褐家鼠	中国山东	-	AB027092
IR461	大白鼠	英国	AF324902	AF458104
Girard Point	褐家鼠	美国	-	X53861
Tchoupitoulas	褐家鼠	美国	AF329389	S47716
SR11	褐家鼠	日本	M34881	M34882
CGRn9415	褐家鼠	中国榕江	-	EF990916
NYA039	褐家鼠	中国浙江	EF210131	-
QH367	-	中国浙江	DQ081717	-
Gou3	黑家鼠	中国浙江	AF288651	A027521
Baltimore	褐家鼠	美国	-	U00151
HTNV				
76-118	黑线姬鼠	南朝鲜	M14626	M14627
DOBV				
Dobrava	黄喉姬鼠	斯洛文尼亚	L41916	NC005234

结 果

1. HV 抗原检测:2007 年在温州市主要 HFRS 疫区瑞安市的居民区及野外共捕获啮齿类动物 96 只,其中褐家鼠(*Rattus norvegicus*)64 只(野外 8 只、居民区 56 只),黄胸鼠(*Rattus tanezumii*)15 只(居民区),黄毛鼠(*Rattus rattoides*)16 只(野外 14 只、居民区 2 只),黑线姬鼠 1 只(野外)。褐家鼠占总数的 66.7%,为当地居民区的优势鼠种(占居民区鼠总数的 76.7%)。

采用 IFA 法检测 96 份鼠肺标本,共检出 6 份鼠肺样品 HV 抗原阳性,病毒携带率为 6.3%,其中褐家鼠 4 只,编号分别为 WenzhouRn23、WenzhouRn33、WenzhouRn45、WenzhouRn76,黄胸鼠 1 只,编号为 WenzhouRf74,黄毛鼠 1 只,编号为 WenzhouRr57。

2. HV 部分 S 基因片段核苷酸序列的扩增、测序及其同源性分析:以 RT-PCR 法采用 SEOV 型特异引物从 6 份 HV 抗原阳性的标本扩增部分 S 与 M 基因片段,并进行序列测定。除 WenzhouRn45 鼠肺样品外,从其他 5 份鼠肺样品中均扩增出部分 S 基因片段(620~999nt)及 M 基因片段 Gc 区

(2001~2301nt)的核苷酸序列。5 株病毒间的部分 S 片段核苷酸序列的同源性为 96.2%~98.0%，部分 M 基因片段核苷酸序列间的同源性为 96.9%~99.7%。进一步分析发现，这 5 株病毒与浙江省慈溪地区褐家鼠携带的病毒 (CixiRn30、CixiRn56、CixiRn76) 及北京褐家鼠携带得到 BjHD01 株病毒的核苷酸序列的同源性大于 95%。

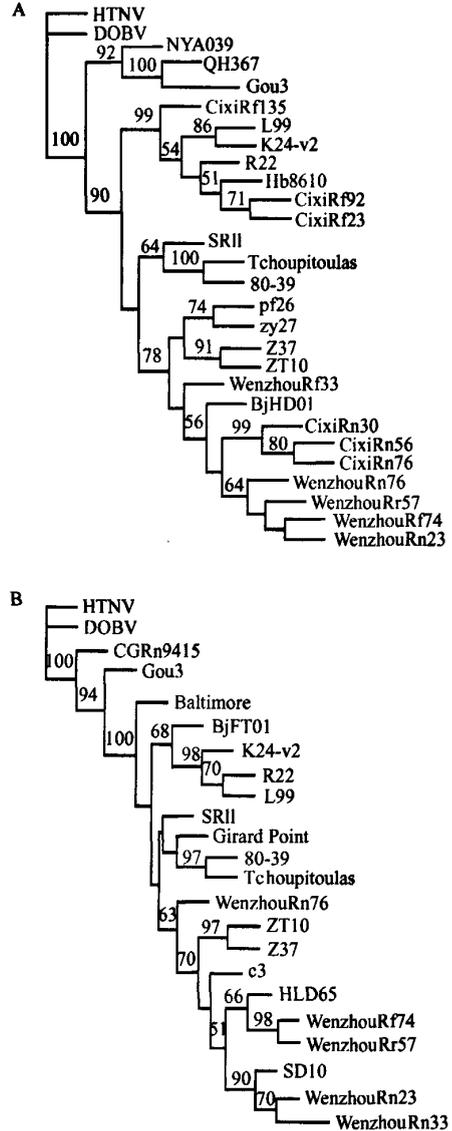
另外，这 5 株病毒的部分 S 与 M 基因片段 Gc 区的核苷酸序列与汉滩型病毒 (HTNV) 及多布拉伐型病毒 (DOBV) 的同源性分别小于 70% 和 75%。

3. 系统发生分析: 用部分 S 片段核苷酸序列 (620~999nt) 构建的系统发生树见图 1A。由图 1A 可见, 无论是由褐家鼠携带的 3 株病毒还是由黄胸鼠及黄毛鼠携带的 2 株病毒全部位于 SEOV 单元群中。5 株病毒与慈溪褐家鼠及北京褐家鼠携带的 SEOV 病毒分在一起, 属于 SEOV 的 S3 亚型^[6]。其中由褐家鼠携带的 2 株病毒 (WenzhouRn23、WenzhouRn76) 与黄胸鼠及黄毛鼠携带的 2 株病毒 (WenzhouRf74、WenzhouRr57) 聚集在一起, 进化关系最近, 而 WenzhouRn33 株与其他 4 株的进化关系相对较远。

用 M 片段 Gc 区核苷酸序列 (2001~2301nt) 构建的系统发生树也表明温州地区 5 株病毒均为 SEOV。WenzhouRn23 与 WenzhouRn33 两株病毒与山东省褐家鼠携带病毒株 SD10 聚集在一起, WenzhouRr57 与 WenzhouRf74 两株病毒与辽宁省葫芦岛地区褐家鼠携带的病毒株 HLD65 聚集在一起。但值得注意的是 WenzhouRn76 株病毒单独构成一个分支, 与包括温州市其他 4 株病毒在内的 S3 亚型 SEOV 的进化关系较远 (图 1B)^[6]。

讨 论

温州市地处东南沿海, 是我国社会经济发展最快的地区之一, 相比 20 世纪 80 年代农村居民生活环境条件有了很大改善。温州市 1981 年报告首例 HFRS 病例, 随后 HFRS 疫情从未间断, 2006 年全市共报告 20 例。瑞安市是温州市的主要 HFRS 疫区。我们对瑞安市居民区及野外的啮齿动物中 HV 流行情况调查发现, 褐家鼠等啮齿动物中 HV 的携带率高达 6.3%。这说明虽然农村居民生活环境条件有了很大的改善, 但由于 HV 在褐家鼠等啮齿动物中的严重流行, 从而导致了该地区人间 HFRS 仍然有较强的流行。



注: A 部分 S 基因片段 (620~999nt); B 部分 M 基因片段 Gc 区核苷酸序列用 HTNV 作外群; 标出大于 50% 自展值

图1 用 NJ 法构建的系统发生树

本次在瑞安市捕捉的 96 只啮齿动物中黑线姬鼠仅 1 只, 不同于以前的调查结果^[7]。这表明该地区啮齿动物的种群结构可能发生改变, 鼠属鼠类已成为该地区居民区及野外的优势鼠种。从 96 份样品中检测出的 6 份 HV 抗原阳性的 4 份来源于褐家鼠, 另 2 份分别来源于黄胸鼠与黄毛鼠。从其中的 5 份样品中扩增出部分 S 与 M 基因片段, 系统发生分析发现 5 株病毒全为 SEOV 的 S3 亚型^[6]。上述研究结果表明该地区现阶段的人间 HFRS 可能主要由 SEOV 引起。同时也提示我们控制鼠属鼠类

的数量及在人群中加强针对 SEOV 为主的疫苗接种将能有效预防 HFRS 在该地区的流行。

基因重排(reassortment)在分节段病毒的进化、致病性以及流行病学上具有重要的意义^[8,9]。布尼亚病毒科的虫媒病毒间在试验或自然条件下可以发生基因重排^[10,11]。SNV 病毒不同亚型间也能发生基因重排^[8,12]。用不同型 HV 同时感染细胞,不同型 HV 间也能发生基因重排^[9,13,14]。然而由于 HV 与其宿主动物间的长期共进化关系,不同型 HV 间在自然条件下很少发生基因重排。最近我们在贵州省发现自然条件下 HTNV 与 SEOV 能发生基因重排^[15]。在本研究中用部分 S 基因片段和部分 M 基因片段的 Gc 区核苷酸序列分别构建系统发生树(图 1),温州鼠属啮齿动物中流行的 5 株 SEOV 的相互进化关系不同,这表明该地区流行的 SEOV 不同病毒间可能发生了基因重排。这一结果也支持 HV 进化过程中基因重排发生率可能比原来认为的要多^[15]。

世界范围内,至今已发现啮齿类动物中存在至少 22 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]。SEOV 主要由鼠属的鼠类携带,能引起轻型 HFRS,呈世界性分布^[6,16,17],但由 SEOV 引起的 HFRS 主要分布在我国,以及日本与韩国等国家^[6,18]。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^[17]。近年来我们在河南、湖南、辽宁、吉林等地区开展的分子流行病学研究,在同一地区鼠属的不同鼠种中流行的 SEOV 均为同一亚型^[5,19-21]。尽管 SEOV 呈全球性分布,但与其他型的 HV 相比,SEOV 的变异较小^[3,17]。在本研究中,由于基因重排的发生,温州地区的褐家鼠、黄胸鼠、黄毛鼠中可能存在至少 2 个亚型的 SEOV,显示出在局部地区 SEOV 的基因多样性。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^[6,15,19]。

我国是受 HV 危害最为严重的国家。褐家鼠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 HV 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。对类似于温州市这样啮齿类动物密度较高,地理生态环境复杂(有平原、海岛、山区和丘

陵)的地区,深入开展 HFRS 宿主动物间和人间 HV 感染状况流行病学调查研究及分子流行病学研究具有重要的价值,更是为预测分析温州市 HFRS 流行趋势,制定疫苗免疫策略提供科学依据。

(本研究得到浙江天元生物药业股份有限公司的资助,谨志衷心感谢)

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. *Virus Taxonomy. VIIIth 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: 47-75.
- [4] 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.
- [5] 孙黎, 张水振, 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.
- [6] 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.
- [7] 林东, 易维平, 李梅福, 等. 温州市流行性出血热自然疫源地的调查. *中国鼠类防制杂志(出血热专辑)*, 1987: 137-138.
- [8] Li D, Schmaljohn AL, Anderson K, et al. Entire nucleotide sequences of the M and S segments of two hantavirus isolates from California, evidence for reassortment in nature among viruses related to hantavirus pulmonary syndrome. *Virology*, 1995, 206(2): 973-983.
- [9] Rizvanov AA, Khaiboullina SF, St Jeor S. Development of reassortant viruses between pathogenic hantavirus strains. *Virology*, 2004, 327(2): 225-232.
- [10] Beaty BJ, Sundin DR, Chandler LJ, et al. Evolution of bunyaviruses by genome reassortment in dually infected mosquitoes (*Aedes triseriatus*). *Science*, 1985, 230(4275): 548-550.
- [11] Deyde VM, Khristova ML, Rollin PE, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus genomics and global diversity. *J Virol*, 2006, 80(17): 8834-8842.
- [12] Henderson WW, Monroe MC, St Jeor S, et al. Naturally occurring Sin Nombre virus genetic reassortants. *Virology*, 1995, 214(2): 602-610.
- [13] Rodriguez LL, Owens JH, Peters CJ, et al. Genetic reassortment among viruses causing hantavirus pulmonary syndrome. *Virology*, 1998, 242(1): 99-106.
- [14] 康文臻, 黄长形, 白雪帆, 等. 汉滩型与汉城型汉坦病毒基因重排的初步研究. *中华流行病学杂志*, 2002, 23(1): 46-49.
- [15] Zou Y, Hu J, Wang ZX, et al. Genetic Characterization of hantaviruses isolated from Guizhou, China: evidence for spillover and reassortment in nature. *J Med Virol*, 2008, 80(6): 1033-1041.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 张水振, 肖奇友, 李明慧, 等. 湖南省啮齿动物汉坦病毒的流行病学研究. *中华流行病学杂志*, 2007, 28(1): 65-69.
- [20] 屈勇刚, 杨国庆, 邹洋, 等. 葫芦岛地区鼠类汉坦病毒的检测分离与鉴定. *中华流行病学杂志*, 2006, 27(6): 513-517.
- [21] 鄢燕贞, 姚来顺, 惠光伟, 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. (收稿日期: 2008-04-01)

(本文编辑: 张林东)