

云南省楚雄州汉坦病毒宿主动物 及分子流行病学研究

周济华 张海林 王静林 杨卫红 米竹青 张云智 章域震 宋先毅
胡秋凌 董应宽 普文华 胡海梅 高丽芬 袁庆虹 亚红祥 冯云

【摘要】 目的 掌握汉坦病毒(HV)在云南省啮齿动物中的流行情况及其遗传特征。方法 采用笼夜法捕鼠,鼠肺标本用直接免疫荧光法检测HV抗原,用RT-PCR法检测HV核酸及分型,对产物进行序列测定,用PHYLIP软件包进行系统发生分析。结果 2005—2006年在云南省楚雄州10个县(市)居民区共捕获鼠类4属8种1421只,其中褐家鼠1056只,构成比高达74.31%,其次为黄胸鼠(19.70%)。检测鼠肺组织1029份,HV抗原阳性53份,总带病毒率为5.15%,带病毒鼠种为褐家鼠(5.08%,38/748)、黄胸鼠(5.97%,12/201)、大足鼠(7.69%,2/26)和斯氏家鼠(6.25%,1/16)。HV汉城型(SEO)核酸检测阳性21份(褐家鼠15份,黄胸鼠4份,大足鼠2份)。获得的12个病毒S片段核苷酸序列与GenBank中国SEO型病毒R22、L99和HLD65株同源性较高,为87.1%~99.7%;与汉滩型(HTN)76-118株同源性仅为64.4%~69.1%。系统进化分析显示,楚雄州12个病毒S片段核苷酸序列与SEO型亲缘关系较近,与HTN型及其他型HV相距较远,证实这12份病毒标本均为SEO型病毒,并可分S1和S3两个亚型。结论 首次证实楚雄州10个县(市)广泛存在以褐家鼠为主要传染源的HFRS家鼠型疫源地及SEO型病毒的流行。分析发现SEO型不同亚型病毒的分布有其地域特点和独立性。

【关键词】 汉坦病毒;汉城型;宿主动物;分子流行病学

Survey on host animal and molecular epidemiology of hantavirus in Chuxiong prefecture, Yunnan province ZHOU Ji-hua*, ZHANG Hai-lin, WANG Jing-lin, YANG Wei-hong, MI Zhu-qing, ZHANG Yun-zhi, ZHANG Yu-zhen, SONG Xian-yi, HU Qiu-ling, DONG Ying-kuan, PU Wen-hua, HU Hai-mei, GAO Li-fen, YUAN Qing-hong, YA Hong-xiang, FENG Yun. Yunnan Institute of Endemic Disease Control and Prevention, Dali 671000, China

Corresponding author: ZHANG Hai-lin, Email: zhangHL715@163.com

【Abstract】 **Objective** To determine the hosts of hantavirus (HV) and its molecular epidemiological characteristics, to provide evidence for prevention and control on hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS). **Methods** Rodents were captured by a special trap within the residential area. The antigens of HV in lung tissues were detected by direct immuno-fluorescence assay (DFA). Nucleotide sequences of HV were amplified by RT-PCR with HV genotype-specific primer. The amplified genes were then sequenced. Phylogenetic tree were built on nucleotide sequence with ClustalX 1.83 software. **Results** 1421 rodents were captured and classified into 8 species of 4 Genera in the epidemic area within 10 counties of Chuxiong prefecture, Yunnan province, between 2005 and 2006. Out of the 1421 rodents, 1056 (74.31%) of them were *Rattus norvegicus* and 280 (19.70%) belonged to *Rattus flavipectus*. The antigens of HV were detected by DFA in lung tissues and the total positive rate of HV was 5.15% (53/1029). After applying the sequencing nucleotide method to the 53 positive specimens, data showed that 21 specimens were positive and all of them belonged to Seoul type (15 samples were from *Rattus norvegicus*, 4 samples *Rattus flavipectus*, 2 samples *Rattus nitidus*). The partial S segments from 12 specimens were sequenced which appeared homologous with R22, L99 and HLD65 from GenBank in relatively high level (87.1%~99.7%). When compared to 76-118 strain of Hantaan type, their homologous degree was only 64.4%~69.1%. Results from Phylogenetic analysis showed that 12 specimens belonged to Seoul type. As for their homology, they were significantly similar to Seoul type and could be tentatively divided into two subtypes S1 and S3. **Conclusion** It was confirmed that the Seoul type virus, as HFRS's pathogenic agent mainly carried by rats, prevailed widely in Chuxiong prefecture. Owing to the local ecological environment, we also noticed the characteristics of different HV subtypes among Seoul type.

【Key words】 Hantavirus; Seoul type; Host animal; Molecular epidemiology

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2009.03.009

作者单位: 671000大理, 云南省地方病防治所/云南省病毒立克次体研究中心(周济华、张海林、王静林、杨卫红、米竹青、张云智、章域震、袁庆虹、亚红祥、冯云); 云南省楚雄州疾病预防控制中心(宋先毅、胡秋凌、普文华、胡海梅、高丽芬); 楚雄州卫生局(董应宽)

通信作者: 张海林, Email: zhangHL715@163.com

肾综合征出血热(HFRS)疫源地的存在很大程度上取决于携带汉坦病毒(HV)的主要(原始)贮存宿主鼠种的地理分布。由于各地自然和地理条件的不同, HV 宿主动物和分布也有差异, 因此, 掌握 HV 宿主动物分布及其遗传特征, 对防治工作具有重要意义。20 世纪 80 年代以来, 云南省楚雄州常有 HFRS 流行, 但缺乏宿主动物及 HV 的流行病学资料, 为此, 我们对该州进行了 HV 宿主动物和疫源地分布特点以及 HV 分子流行病学研究。

材料与方法

1. 标本采集: 2005 和 2006 年的 5—10 月, 在云南省楚雄州的楚雄、双柏、大姚、南华、姚安、元谋、牟定、永仁、武定和禄丰共 10 个县(市)居民区用笼夜法捕鼠, 对捕获的鼠类经分类鉴定后, 无菌解剖取其肺脏, 放置于液氮中保存待检。

2. HV 抗原检测: 鼠类肺脏组织经冰冻切片后, 用直接免疫荧光试验(DFA)检测 HV 抗原, 抗原呈阳性的标本用于核酸检测。

3. RT-PCR 法检测 HV 核酸: 参照 Invitrogen 公司的 TRIzol RNA 试剂使用说明提取阳性鼠肺组织中的病毒 RNA。用宝生物工程大连有限公司反转录酶试剂盒反转录得到 cDNA。用 RT-PCR 法扩增 HV S 基因片段, 1% 琼脂糖凝胶检测扩增产物。

4. 引物的设计与合成: 用 P14 引物反转录 cDNA, 用于扩增 S 片段(620 ~ 999 nt)的引物见参考文献[1]。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

5. 反转录聚合酶链反应(RT-PCR): 以 P14 引物反转录 S 基因的 cDNA, HV-SFO 和 HV-SRO 为 SEO 病毒通用 S 片段的外引物, SEO-SF 和 SEO-SR 为扩增 SEO 病毒 S 片段的内引物。具体扩增条件为: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 10 min, 共 35 个循环, 最后一个循环于 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 用 TaKaRa 产物回收试剂盒(宝生物工程大连有限公司)纯化与回收, 参照说明书操作。扩增的核苷酸片段由北京三博远志生物技术有限责任公司完成序列测定。

6. 序列分析: 序列分析采用 ClustalX 1.83 进行核苷酸序列配对, 应用 Phylip 3.68 软件包进行系统发生分析, 以最大相邻法(neighbor-joining method, NJ)构建系统发生树, Bootstrap 值设定为 100。用 Treeview 软件打开 phb 文件后, 获得 HV 的 S 段基因

序列进化树。核苷酸序列同源性采用 DNASTAR 中的 MegAlign 软件进行分析。用于本研究的 HV 名称、分离地点、标本来源及 S 片段核苷酸序列基因库编号见表 1。

表 1 本研究使用 GenBank 中 HV 序列的病毒株

型	病毒株	宿主	来源	GenBank No. S(620 ~ 990 nt)
SEOV	L99	罗寨鼠	中国江西	AF488708
	R22	褐家鼠	中国河南	AF488707
	Gou3	黑家鼠	中国浙江	AF288651
	C-10	-	中国浙江	DQ081718
	QH367	-	中国浙江	DQ081717
	K24	-	中国浙江	AF288653
	Hb8610	-	中国山西	AF288643
	141	褐家鼠	柬埔寨	AJ427499
	144	褐家鼠	柬埔寨	AJ427498
	8039	褐家鼠	韩国	AY273791
	SR11	褐家鼠	日本	M34881
	ZT71	-	中国浙江	AY750171
	ZT10	-	中国	AY766368
	BjHD01	-	中国北京	AY627049
HTNV	Wan	人	中国江苏	AB027113
	HLD65	褐家鼠	中国辽宁	EF205371
	Hebei4	黑线仓鼠	中国河北	AB027114
	pI26	褐家鼠	中国黑龙江	AY006465
	zy27	-	中国黑龙江	AF406965
	Z37	-	中国浙江	AF187082
	Ir461	-	-	AF329388
	JUN5-14	褐家鼠	中国山东	DQ217791
	Tchoupitoulas	褐家鼠	美国	AF329389
	76-118	黑线姬鼠	韩国	M14626
Z10	人	中国浙江	AF184987	
PUU	Cg-13891	人	法国	U22423
DOB	Dobrava	黄喉姬鼠	斯洛文尼亚	L41916
SNV	NM H10	人	美国	L25784

结 果

1. 宿主动物调查: 2005 和 2006 年的 5—10 月, 在楚雄州 10 个县(市)共捕获鼠类 5 属 8 种 1421 只, 其中褐家鼠 1056 只, 构成比高达 74.31%, 黄胸鼠、小家鼠、大足鼠、斯氏家鼠、高山姬鼠、臭鼩鼯和卡氏小鼠构成比依次为 19.70%、2.25%、1.83%、1.27%、0.28%、0.21% 和 0.14%。结果表明, 褐家鼠和黄胸鼠是楚雄州居民区优势鼠种。

2. HV 抗原检测: 检测楚雄州 10 县(市)居民区鼠类肺组织标本 1029 份, 阳性 53 份, 总带病毒率为 5.15%, 阳性鼠种为褐家鼠(5.08%, 38/748)、黄胸鼠(5.97%, 12/201)、大足鼠(7.69%, 2/26)和斯氏家鼠(6.25%, 1/16)。各县(市)鼠类 HV 带病毒率: 永仁县为 5.77% (3/52), 阳性鼠种为褐家鼠; 禄丰县为 3.98% (8/201), 阳性鼠种为褐家鼠、黄胸鼠、大足鼠和斯氏小鼠; 牟定县为 3.77% (2/53), 阳性鼠种为褐

家鼠、黄胸鼠；大姚县为 4.85% (5/103)，阳性鼠种为褐家鼠、黄胸鼠；南华县为 10.00% (11/110)，阳性鼠种为褐家鼠和黄胸鼠；楚雄市为 6.37% (13/204)，阳性鼠种为褐家鼠；双柏县为 2.00% (1/50)，阳性鼠种为褐家鼠；元谋县为 3.00% (3/100)，阳性鼠种为褐家鼠和黄胸鼠；武定县为 5.66% (3/53)，阳性鼠种为褐家鼠；姚安县为 3.88% (4/103)，阳性鼠种为褐家鼠和黄胸鼠。

3. HV 核酸检测和分型：首先用 HV 属特异性引物对 HV 抗原检测阳性的 53 份鼠肺标本进行第一轮 RT-PCR 检测，然后用汉滩型 (HTN) 和汉城型 (SEO) 引物进行扩增，结果 SEO 型阳性 21 份，分布于南华县 (黄胸鼠 1 份，褐家鼠 3 份)、楚雄市 (褐家鼠 4 份)、元谋县 (褐家鼠 1 份，黄胸鼠 1 份)、禄丰县 (大足鼠 2 份，黄胸鼠 2 份)、永仁县 (褐家鼠 1 份)、姚安县 (褐家鼠 2 份)、双柏县 (褐家鼠 1 份)、大姚县 (褐家鼠 1 份)、牟定县 (褐家鼠 1 份)，而 HTN 型扩增均为阴性。结果表明大多数县、市均分布有 SEO 型 HV。

4. 同源性分析：经序列测定，楚雄州鼠肺标本中共获得 12 株 HV S 片段核苷酸序列，其中来自褐家鼠 10 株，黄胸鼠和大足鼠各 1 株。这 12 个病毒序列与来自河南省褐家鼠的 R22、江西省罗赛鼠的 L99 和辽宁省褐家鼠的 HLD65 SEO 型病毒株的同源性在 87.1% ~ 99.7% 之间，与 HTN 型 76-118 株同源性仅为 64.4% ~ 69.1% (表 2)。表明楚雄州 12 个病毒序列与 SEO 型同源性较高，而与 HTN 型同源性较低，均为 SEO 型病毒。

5. 系统发生树分析：用本次测序获得的 12 株 HV 序列与 GenBank 中收集到的 28 株不同型 HV (表

1) 的部分 S 基因片段核苷酸序列 (620 ~ 999 nt) 构建系统发生树 (图 1)。楚雄州 HV 与 SEO 型病毒亲缘关系较近，同在一个分支上；与 HTN 型和分布于欧洲的多不拉伐-贝尔格莱德 (Dobrova-Belgrade)、普马拉 (Puumala) 和美洲引起汉坦病毒肺综合征的辛诺柏 (Sin Nombre) 病毒相距甚远，表明来自楚雄州家鼠的 12 份病毒标本均为 SEO 型 HV。其中 SB036 (双柏县) 和 RA084、RA242 (姚安县) 的病毒标本与北京市褐家鼠中的病毒株 (BjHD01)、辽宁省褐家鼠的病毒株 (HLD65) 亲缘关系最近，在同一分支上，同属于 SEO 型 S3 亚型；而 LF029、LF064 (禄丰县)、YM050 (元谋县)、MD047 (牟定县)、DR082 (大姚县) 与分离自山西省病毒株 (HB8610) 和河南省褐家鼠的病毒株 (R22) 亲缘关系最近，在同一分支上，均属 SEO 型 S1 亚型；来自楚雄市的 4 份病毒标本 (CX10、CX16、CX35、CX127) 均与江西省罗赛鼠分离病毒株 L99 同在一小分支上，同属 SEO 型 S1 亚型。

讨 论

楚雄州属高原地区，本次捕鼠地区覆盖该州所有县 (市)，均为海拔在 1600 ~ 2000 m 的山间盆地，在云南省具有代表性。由于国内 HFRS 疫源地主要分布在低海拔 (<500 m) 地区，故楚雄州 HFRS 疫源地在国内也具有特殊性。调查表明，褐家鼠和黄胸鼠是该州居民区优势鼠种，且带病毒率也较为相似，由于这两种家鼠种群数量多，分布广泛，属当地居民区主要带病毒鼠种，符合 HFRS 家鼠型疫源地宿主动物分布特点。楚雄州 10 县 (市) 居民区鼠类带病毒率最高为南华县 (10.00%)，最低为双柏县

表 2 云南省楚雄州 12 株 HV S 基因片段部分核苷酸和氨基酸序列同源性比较

毒株	MD047	76-118	HLD65	R22	L99	YM050	CX10	LF064	CX35	LF029	CX127	SB036	CX16	DR082	RA242	RA084
MD047		65.7	87.6	96.3	99.1	95.0	97.9	94.7	98.4	95.3	98.4	86.5	98.4	95.8	86.8	87.3
76-118	43.1		69.1	66.8	65.2	66.2	64.6	66.2	65.4	66.8	64.4	68.1	64.4	66.5	69.1	69.1
HLD65	4.6	42.0		94.2	88.3	93.2	87.1	92.6	87.6	93.2	87.6	99.0	87.6	93.7	99.2	99.7
R22	1.1	42.1	3.6		97.1	98.7	95.8	98.4	96.3	98.9	96.3	93.2	96.3	99.5	93.4	93.9
L99	0.9	43.1	3.7	0.3		95.8	98.9	95.5	99.3	96.1	99.3	87.3	99.3	96.6	87.6	88.1
YM050	2.5	43.1	4.8	1.3	1.6		94.5	97.1	95.0	97.6	95.0	92.1	95.0	98.2	92.4	92.9
CX10	2.1	44.2	5.2	1.6	1.2	3.0		94.7	98.2	94.7	98.2	86.0	98.2	95.3	86.3	86.8
LF064	2.8	43.1	5.3	1.6	1.9	3.0	2.8		94.7	97.4	94.7	91.6	94.7	98.2	91.8	92.4
CX35	1.6	43.6	4.6	1.1	0.7	2.5	1.8	2.8		95.3	98.9	86.5	98.6	95.8	86.8	87.3
LF029	2.2	42.1	4.8	1.1	1.4	2.4	2.8	2.7	2.2		95.3	92.1	95.3	98.4	92.4	92.9
CX127	1.6	44.6	4.6	1.1	0.7	2.5	1.8	2.8	1.2	2.2		86.5	98.6	95.8	86.8	87.3
SB036	5.8	43.4	1.0	4.8	4.9	5.9	6.4	6.5	5.8	5.9	5.8		86.5	92.6	98.2	98.7
CX16	1.6	44.6	4.6	1.1	0.7	2.5	1.9	2.8	1.4	2.2	1.4	5.8		95.8	86.8	87.3
DR082	1.6	42.6	4.2	0.5	0.8	1.9	2.2	1.9	1.6	1.6	1.6	5.3	1.6		92.9	93.4
RA242	5.5	41.5	0.8	4.5	4.6	5.6	6.1	6.2	5.5	5.6	5.5	1.8	5.5	5.0		99.5
RA084	4.9	41.5	0.3	3.9	4.0	5.0	5.5	5.6	4.9	5.0	4.9	1.3	4.9	4.5	0.5	

注：黑体字部分为核苷酸序列同源性，白体字为核苷酸序列差异度

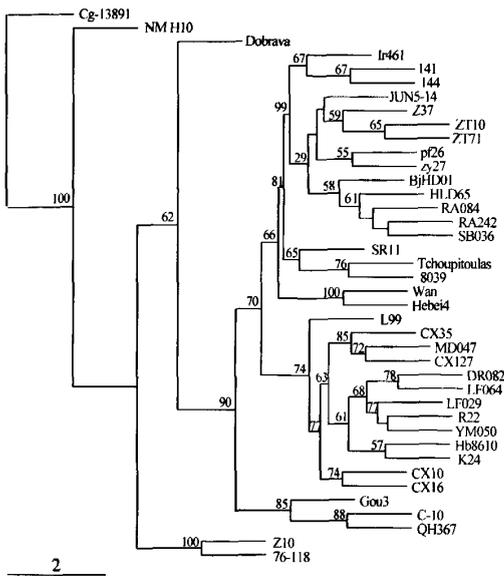


图1 SEO型病毒部分S片段核苷酸(620~999 nt)种系发生树

(2.00%, 1/50)。各县(市)居民区无论褐家鼠($\chi^2=46.83, P=0.00$)或黄胸鼠($\chi^2=196.62, P=0.00$)HV带病毒率虽有差异,但总的来看,这两种家鼠的传染源意义是一样的,而从种群数量看,褐家鼠的传染源作用更大。

已知引起人类 HFRS 的 HV 基因型主要为 HTN、SEO、普马拉型和多不拉伐-贝尔格莱德型病毒。HTN 型主要分布在亚洲和欧洲;SEO 型分布最广,包括亚洲^[2,3]、欧洲^[4]、非洲^[5]、美洲^[6]等呈全球性分布;普马拉型分布在西欧、北欧及中欧,多不拉伐-贝尔格莱德型和近年发现的 SAA 型主要分布在欧洲^[7]。我国主要流行 HTN 和 SEO 型病毒。本研究对采自楚雄州的 10 县(市)经 DFA 检查阳性的 53 份鼠肺标本进行 HV 核酸检测和分型,结果核酸阳性 21 份均为 SEO 型病毒,表明调查地区广泛分布有 SEO 型病毒。

为进一步掌握楚雄州家鼠中 SEO 型病毒的分子遗传特征,对经核酸检测阳性的病毒标本进行部分 S 片段核苷酸序列测定、同源性分析并构建系统发生树,同样证明楚雄州 12 个病毒序列与 SEO 型同源性较高,而与 HTN 型同源性较低,均为 SEO 型病毒。进化树分析还发现它们之间仍存在着一定差异,可分为两个亚型,其中 S1 亚型 3 株, S3 亚型 9 株,以 S1 亚型为主。有意义的是,亚型分布也存在明显的地域特点,如该州西南部的双柏和姚安县仅分布有 S3 亚型,而中部和东北部的楚雄市及禄丰、元谋、

牟定和大姚县均为 S1 亚型,尤其是楚雄市 4 份病毒序列均为 S1 亚型,表明在相似生态环境的疫源地内, HV 具有共同的分子特征。也可以认为,当地宿主动物和生态环境未发生改变, HV 的变异是非常有限的。另外本研究首次经核酸和序列分析证实大足鼠可作为 SEO 型病毒的传染源,大足鼠在云南省广泛分布,对其流行病学意义应引起重视。

由于 HV 与宿主共进化,随着生态环境的变化,宿主动物改变和新发宿主的迁移,可能会引起 HV 变异或称基因重排,导致病毒致病力更强^[8]。我国学者研究发现,自然界 HV 存在着基因重排现象^[9,10],本研究楚雄州 SEO 型病毒间虽存在一定程度的差异,但是否为基因重排有待进一步研究证实。

本研究首次通过病原学和分子生物学研究证实楚雄州的 10 县(市)广泛存在着以褐家鼠为主要传染源的 HFRS 家鼠型疫源地及 SEO 型病毒的流行,黄胸鼠和大足鼠在该疫源地中也发挥重要的传染源作用。当地是否存在 HFRS 野鼠型疫源地尚需进一步调查。

[本研究中的捕鼠工作由楚雄、双柏、大姚、南华、姚安、元谋、牟定、永仁、武定和禄丰县(市)疾病预防控制中心给予大力支持,特此志谢]

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] Plyusnina A, Ibrahim IN, Winoto I, et al. Identification of Seoul hantavirus in *Rattus norvegicus* in Indonesia. Scand J Infect Dis, 2004, 36(5):356-359.
- [3] Kariwa H, Yoshimatsu K, Arikawa J. Hantavirus infection in East Asia. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2007, 30(5-6): 341-356.
- [4] Olsson GE, White N, Hjältén J, et al. Habitat factors associated with bank voles (*Clethrionomys glareolus*) and concomitant hantavirus in northern Sweden, 2005, 5(4):315-323.
- [5] Klempa B, Frchet-Calvet E, Lecompte E, et al. Hantavirus in African wood mouse, Guinea. Emerg Infect Dis, 2006, 12(5): 838-840.
- [6] Clement J, Neild GH, Maes P, et al. Symptomatic human hantavirus in the Americas. Emerg Infect Dis, 2007, 13(2): 345-346.
- [7] 周济华,张海林.汉坦病毒分型及致病性的研究进展.国际病毒学杂志,2008,15(2):37-42.
- [8] Zeier M, Handermann M, Bahr U, et al. New ecological aspects of hantavirus infection: a change of a paradigm and a challenge of prevention-a review. Virus Genes, 2005, 30(2):157-180.
- [9] 林献丹,杨鹏飞,廖晓伟,等.浙江省温州市啮齿动物中汉坦病毒的分子流行病学研究.中华流行病学杂志,2008,29(9):891-894.
- [10] 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.

(收稿日期:2008-10-26)

(本文编辑:张林东)