

浙江省龙泉市汉坦病毒宿主动物自然感染状况研究

王森若 王文 林献丹 梅盛华 郭文平 张永振

【摘要】 目的 调查浙江省龙泉市肾综合征出血热(HFRS)疫源地小动物中汉坦病毒(HV)的自然感染情况及其流行的基因型。**方法** 用鼠笼在龙泉市查田镇、小梅镇、小梅镇黄南村捕鼠。捕获的小动物进行分类鉴定并解剖取肺脏,用间接免疫荧光法(IFA)检测肺组织中HV抗原,用RT-PCR对HV抗原阳性的样本扩增部分S片段核苷酸序列并测序,构建系统发生树进行基因分型。**结果** 共捕获小动物319只,其中野外312只,室内7只。黑线姬鼠和东方田鼠为野外优势鼠种。肺组织标本中共检测到9份抗原阳性,带病毒率为4.97%,用部分S片段(620~999 nt)的核苷酸序列构建系统发生树,结果表明均为汉滩病毒(HTNV),并与Z251分离株的亲缘关系最近。**结论** 龙泉市野外主要存在以黑线姬鼠为宿主的HTNV感染,且携带率较高。

【关键词】 肾综合征出血热; 汉坦病毒; 系统发生分析

Investigation on the natural infectious status of hantaviruses among small mammals in Longquan city, Zhejiang province WANG Miao-ruo¹, WANG Wen², LIN Xian-dan³, MEI Sheng-hua¹, GUO Wen-ping², ZHANG Yong-zhen². 1 Zhejiang Provincial of Longquan Center for Disease Control and Prevention, Longquan 323700, China; 2 National Institute of Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention; 3 Zhejiang Provincial of Wenzhou Center for Disease Control and Prevention

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

This work was supported by grants from the National Science and Technology Support Projects for the "Tenth Five-Year Plan" of China (No. 2003BA712A08-02) and from Longquan Bureau of Science and Technology (No. 2010-017).

【Abstract】 Objective To investigate the situation of the natural infection of hantaviruses (HV) in small mammals and to provide evidence for the control and prevention of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) in Longquan area, Zhejiang province. **Methods** Small mammals were captured by night trap, and lung tissue samples were collected and stored in liquid nitrogen. HV antigens were detected by indirect immuno-fluorescence assay (IFA). The partial S genome segment sequences were amplified by RT-PCR. DNASTar program was used for editing and comparing the sequences. Phylogeny was analyzed through PAUP*4.0 software. **Results** 319 small animals were collected in Longquan, and 9 hantavirus antigen-positive samples were identified. The positive rate of hantavirus in *Apodemus agrarius* was 4.97%. Phylogenetic tree constructed by partial S segment (620-999 nt) showed that the 9 strains carried by *A. agrarius* from Longquan all belonged to HTNV, and had a closer evolutionary relationship with isolate Z251 from Zhejiang province. **Conclusion** Our results indicated that the main host was *A. agrarius* and the infection rate of HTNV was high in Longquan area.

【Key words】 Hemorrhagic fever with renal syndrome; Hantaviruses; Phylogenetic analysis

肾综合征出血热(HFRS)是由布尼亚病毒科的

汉坦病毒(HV)引起的自然疫源性传染病,主要由啮齿动物传播给人类。由于长期在宿主中的适应与协同进化,不同型别的HV由不同宿主携带,并因不同地理环境而异,特定地区宿主动物与当地流行的病毒株类型关系密切。在全世界范围内已发现HV至少存在23个血清型或基因型。目前我国已证实存在大别山病毒(DBSV)^[1]、北海道病毒(HOKV)^[2]、哈巴罗夫斯克病毒(KHAV)^[3]、符拉迪沃斯托克病毒

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.06.015

基金项目:“十五”国家科技支撑计划(2003BA712A08-02);浙江省龙泉市科技局科技项目(2010-017)

作者单位:323700 浙江省龙泉市疾病预防控制中心(王森若、梅盛华);中国疾病预防控制中心传染病预防控制所 传染病预防控制国家重点实验室(王文、郭文平、张永振);浙江省温州市疾病预防控制中心免疫预防科(林献丹)

王森若、王文、林献丹同为第一作者

通信作者:张永振, Email: yongzhenzhang@sohu.com

(VLAV)^[3]、沅江病毒(YUVJ)^[4]、汉城病毒(SEOV)和汉滩病毒(HTNV)。龙泉市位于浙江省西南部,东临温州经济开发区,西接福建省武夷山风景旅游区,山是其地貌。自 1974 年发现首例 HFRS 病例以来,疫区范围不断扩大,流行强度逐年增高,已成为该市危害最为严重的传染病之一^[5]。为了解龙泉市宿主动物中 HV 的感染情况,为 HFRS 的防治提供科学依据,本研究开展了宿主动物流行病学调查,检测宿主动物所携带 HV 的型别,现将结果报告如下。

材料与方 法

1. 标本采集:2010 年 4—5 月在龙泉市西南部的查田镇、小梅镇、小梅镇黄南村 3 个监测点的居民区及野外采集小动物。采用鼠笼捕捉,晚放晨收。捕获的宿主动物经分类鉴定后,无菌解剖取其肺脏组织,放入冻存管内液氮冻存待检^[6]。

2. HV 抗原检测:将小动物肺标本冷冻切片后采用间接免疫荧光法(IFA)检测 HV 抗原^[6]。将鼠肺在-25℃条件下冷冻切片,紫外照射 10 min 灭活病毒,冷丙酮固定 5~10 min,于-20℃保存。每孔加 20 μl 的兔抗-HV 血清,37℃恒温水浴箱中温浴 30 min,用 PBS 冲洗 3 次,蒸馏水冲洗 3 次,每次振荡 1 min,吹干;每孔加 20 μl FITC 标记的羊抗兔 IgG 抗体,37℃恒温水浴箱中温浴 30 min,用 PBS 冲洗 3 次,蒸馏水冲洗 3 次,每次振荡 1 min,吹干;滴缓冲甘油,盖玻片封片,荧光显微镜下观察。兔抗-HV 抗体由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所人兽共患病室制备,羊抗兔免疫荧光抗体购自美国 Sigma 公司。

3. PCR 检测及基因分型:参照美国 Invitrogen 公司的 TRIzol RNA 试剂使用说明书提取阳性鼠肺组织的病毒 RNA。用 50 μl 无 RNA 酶的去离子水溶解,于-70℃保存备用。用 Promega 公司的 AMV 反转录酶反转录得到 cDNA。用 Nested-PCR 法扩增 HV 部分 S 基因片段(620~999 nt),1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,DNA Marker 标准为 DL2000(宝生物工程大连有限公司),加样量为每孔 5 μl。用凝胶成像仪观察电泳结果并保存图片结果。用 P14 引物反转录 S 基因片段^[7],用于扩增 S 片段的 HTNV 与 SEOV 特异引物见参考文献^[8]。引物由上海生物工程技术有限公司合成。

4. 系统发生分析:用 DNASTar 软件进行基因序列排序编辑及同源性分析,利用 ClustalX 软件排序,排序结果输入 PAUP*4.0 软件进行系统发生分析,以

邻位相连法(neighbor-joining method)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 用于系统发生分析的病毒株及来源

型别	病毒株	宿主	来源	地区	S 基因片段
HTNV	76-118	黑线姬鼠	韩国	-	M14626
	CJAP93	大林姬鼠	中国	吉林	EF208929
	Z5	-	中国	浙江	EF103195
	Z10	人	中国	浙江	AF184987
	A9	黑线姬鼠	中国	江苏	AF329390
	Q32	黑线姬鼠	中国	贵州	AB027097
SEOV	CGAa2	黑线姬鼠	中国	贵州	EU092219
	L99	罗赛鼠	中国	江西	AF288299
	Z37	褐家鼠	中国	浙江	AF187082
	80-39	褐家鼠	韩国	-	AY273791
DBSV	Gou3	黑家鼠	中国	浙江	AF184988
	Nc167	社鼠	中国	安徽	AB027523
SNV	NM.H10	鹿鼠	北美	-	L25784

结 果

1. 宿主动物调查:本次调查捕获的小动物经鉴定有小家鼠(*Mus musculus*)、黑线姬鼠(*Apodemus agrarius*)、东方田鼠(*Microtus fortis*)、褐家鼠(*Rattus norvegicus*)、黄毛鼠(*Rattus losea*)、黄胸鼠(*Rattus flavipectus*)、巢鼠(*Micromys minutus*)、社鼠(*Niviventer confucianus*)和水鼯鼠(*Neomys fodiens*)。其中黑线姬鼠为优势鼠种,占捕获总数的 56.74%,其次为东方田鼠和黄毛鼠,分别占 17.24%和 17.55%(表 2)。

表 2 龙泉市小动物的种群构成情况

鼠种	查田镇		小梅镇		黄南村		合计
	野外	室内	野外	室内	野外	室内	
小家鼠	2/0/0	2/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	4/0/0
黑线姬鼠	129/7/7	0/0/0	20/1/1	0/0/0	32/1/1	0/0/0	181/9/9
东方田鼠	41/0/0	0/0/0	5/0/0	0/0/0	9/0/0	0/0/0	55/0/0
褐家鼠	5/0/0	4/0/0	0/0/0	1/0/0	0/0/0	0/0/0	10/0/0
黄毛鼠	47/0/0	0/0/0	9/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	56/0/0
黄胸鼠	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	7/0/0	0/0/0	7/0/0
巢鼠	1/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	1/0/0
社鼠	4/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	4/0/0
水鼯鼠	1/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	1/0/0
合计	230/7/7	6/0/0	34/1/1	1/0/0	48/1/1	0/0/0	319/9/9

注:表内数据分别为捕获/抗原阳性/PCR 阳性只数

2. 宿主动物中 HV 的自然感染情况:本次共采集动物肺标本 319 份,阳性 9 份,总感染率为 2.82%;9 份 HV 抗原阳性标本均为野外捕获的黑线姬鼠,带病毒率为 4.97%。其中查田镇 7 份、小梅镇 1 份、黄南村 1 份,带病毒率分别为 5.43%、5.00%和 3.12%。

3. 病原学分型:从HV抗原阳性的鼠肺标本中提取病毒RNA,9份样品均能用HTNV型特异性引物扩增出目的片段。而用SEOV型特异性引物未能扩增出基因片段。表明9只黑线姬鼠携带的均为HTNV。

4. HV部分S基因片段同源性分析:9株病毒的部分S片段核苷酸序列的同源性为99.4%~99.9%,进一步分析发现,这9株病毒与浙江省黑线姬鼠携带的病毒Z251有最大的同源性(99.5%~99.9%),与疫苗株Z10的同源性为91.7%~91.8%,与浙江分离株Z5的同源性为91.6~91.9%。但与SEOV的同源性均小于75%。

5. 系统发生分析:用部分S片段核苷酸序列构建的系统发生树见图1。可见黑线姬鼠携带的9株病毒(LQ46、LQ58、LQ68、LQ74、LQ98、LQ101、LQ116、LQ157、LQ210)全部位于HTNV单元群中。与浙江Z251株分在一起,与Z10和Z5进化关系最近。

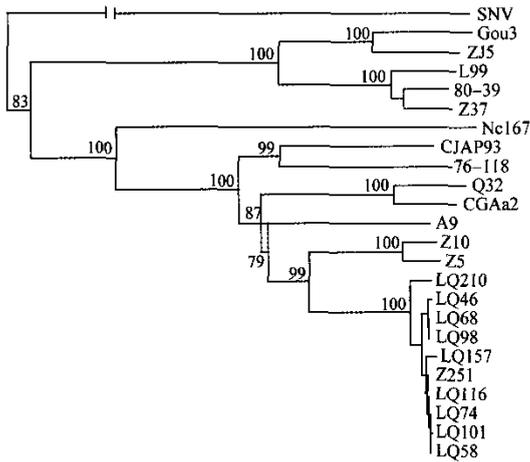


图1 HV S片段系统发生树分析

讨论

龙泉市属浙江省的偏远山林地区,是该省HFRS的重要疫区,自1974年报告首例HFRS以来,历年来HFRS一直是重点防控的传染病之一。至2008年,龙泉市共报告1742例HFRS,占同期报告传染病的3.10%,位居(并列)第7位,其中20例死亡。

本研究通过对该市HFRS发病数相对较高的查田镇、小梅镇、黄南村的调查发现,龙泉地区HV的主要宿主动物是黑线姬鼠。尽管东方田鼠和黄毛鼠也有较大的捕获率,但未检测到HV。HV有相对严格的宿主动物特异性,每一型的HV主要由一种啮

齿动物宿主携带和传播,并与宿主动物共进化,宿主动物的种群构成决定了疫源地的类型^[9]。本次检测到9株HV均来自黑线姬鼠,且核苷酸序列高度同源,显示同一地区相同鼠种携带同一亚型的HV。这表明黑线姬鼠是引起龙泉市HFRS流行的主要传染源,HTNV是主要致病因子。

Horling等^[10]报道在俄罗斯远东地区有东方田鼠携带KHAV,我国也在吉林省抚松地区和沈阳地区的东方田鼠中发现VLAV,在湖南省沅江地区东方田鼠中发现YUJV^[3,4]。应用KHAV特异性引物对所捕获的55份东方田鼠肺组织进行S片段序列扩增,结果全部为阴性。因此,龙泉地区的东方田鼠是否携带特殊型别的HV还需进一步研究证实。

SEOV主要由鼠属的褐家鼠携带,能引起轻型HFRS。流行病学研究发现SEOV分布广泛^[11],主要分布在中国,以及日本和韩国等国家^[12]。除褐家鼠和黑家鼠是SEOV的主要宿主外,黄胸鼠、黄毛鼠、小家鼠等也能携带SEOV。我们在浙江省温州和慈溪市的监测结果也表明黄胸鼠和黄毛鼠携带SEOV^[13,14]。龙泉市捕获的褐家鼠、黄胸鼠和黄毛鼠未检测到SEOV,提示SEOV可能在该地区的流行强度较低。

对龙泉市阳性标本中的病毒进行基因分型,发现野外黑线姬鼠携带的病毒均为HTNV,表明在该市的野外主要流行HTNV,且病毒携带率较高。一般认为,HV在宿主动物中的自然感染率高低与当地HFRS的发病率呈正相关。龙泉市野外黑线姬鼠带毒率高,传染源广泛存在,人群普遍易感,应对当地从事野外生产活动的农民、种植人员等高危人群提前接种出血热疫苗,对阳性标本的分型表明携带的HTNV与疫苗株Z10有较高的同源性,提示目前使用的双价HFRS纯化疫苗能有效预防出血热的暴发。因此,监测疫区宿主动物密度和带病毒状况,对预测HFRS的流行及制定有效防治策略十分必要。

参考文献

[1] Wang H, Yoshimatsu K, Ebihara H, 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.

[2] Kariwa H, Yoshizumi S, Arikawa J, et al. Evidence for the existence of puumula-related virus among *Clethrionomys rufocanus* in Hokkaido, Japan. *Am J Trop Med Hyg*, 1995, 53: 222-227.

[3] Zou Y, Xiao QY, Dong X, et al. Genetic analysis of hantaviruses carried by reed voles *Microtus fortis* in China. *Virus Res*, 2008,

137:122-128.

[4] Zou Y, Wang JB, Gaowa HS, et al. Isolation and genetic characterization of hantaviruses carried by *Microtus voles* in China. *J Med Virol*, 2008, 80(4):680-688.

[5] Wang MR, Zhong XJ, Hu J, et al. Epidemic analysis of hemorrhagic fever with renal syndrome in Longquan, Zhejiang. *Dis Surveil*, 2009, 24(10):750-752. (in Chinese)
王森若, 钟秀娟, 胡健, 等. 浙江省龙泉市肾综合征出血热疫情分析. *疾病监测*, 2009, 24(10):750-752.

[6] Zhang YZ, Dong X, Li X, et al. Seoul virus and hantavirus disease, Shenyang, People's Republic China. *Emerg Infect Dis*, 2009, 15(2):200-206.

[7] Schmaljohn CS, Jennings GB, Hay J, et al. Coding strategy of the S genome segment of Hantaan virus. *Virology*, 1986, 155(2):633-643.

[8] Sun L, Zhang YZ, Li LH, et al. Genetic subtypes and distribution of Seoul virus in Henan, Chin *J Epidemiol*, 2005, 26(8):578-582. (in Chinese)
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(6):578-582.

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

[10] Horling J, Chizhikov V, Lundkvist A. Khabarovsk virus: a phylogenetically and serologically distinct hantavirus isolated from *Microtus fortis* trapped in far-east Russia. *J Gen Virol*, 1996, 77(4):687-694.

[11] Lee HW. Epidemiology and pathogenesis of hemorrhagic fever with renal syndrome//Elliott RM, ed. *The Bunyaviridae*. New York, Plenum Press, 1996:253-267.

[12] Yan YZ, Chen HX, Yu YX, et al. Hantavirus hosts and their relationship. *Chin J Prev Med*, 2007, 41(2):134-138. (in Chinese)
鄢燕贞, 陈化新, 俞永新, 等. 汉坦病毒宿主动物及其相互关系. *中华预防医学杂志*, 2007, 41(2):134-138.

[13] Lin XD, Yang PF, Liao XW, et al. The molecular epidemiologic investigation of hantavirus carried by rodent hosts in Wenzhou, Zhejiang province. *Chin J Epidemiol*, 2008, 29(9):891-894. (in Chinese)
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.

[14] Fan FN, Yang PF, Shi NF, et al. Study on the molecular epidemiology of hantavirus carried by rodent hosts in Cixi, Zhejiang province. *Chin J Epidemiol*, 2008, 29(4):365-368. (in Chinese)
范飞能, 杨鹏飞, 施南峰, 等. 浙江省慈溪市啮齿动物中汉坦病毒分子流行病学研究. *中华流行病学杂志*, 2008, 29(4):365-368.

(收稿日期:2011-01-20)

(本文编辑:张林东)

中华流行病学杂志第六届编辑委员会通讯编委名单

- | | | |
|---------------------|-------------------|----------------------|
| 陈曦(湖南省疾病预防控制中心) | 窦丰满(成都市疾病预防控制中心) | 高婷(北京市疾病预防控制中心) |
| 姜宝法(山东大学公共卫生学院) | 李杰(北京大学医学部) | 李十月(武汉大学公共卫生学院) |
| 李秀央(浙江大学医学院公共卫生学院) | 廖苏苏(中国医学科学院基础医学院) | 林玫(广西壮族自治区疾病预防控制中心) |
| 林鹏(广东省疾病预防控制中心) | 刘爱忠(中南大学公共卫生学院) | 刘刚(四川省疾病预防控制中心) |
| 刘静(北京安贞医院) | 刘莉(四川省疾病预防控制中心) | 刘玮(军事医学科学院微生物流行病研究所) |
| 鲁凤民(北京大学医学部) | 欧剑鸣(福建省疾病预防控制中心) | 彭晓旻(北京市疾病预防控制中心) |
| 邱洪斌(佳木斯大学) | 赛晓勇(解放军总医院) | 苏虹(安徽医科大学公共卫生学院) |
| 汤哲(首都医科大学附属宣武医院) | 田庆宝(河北医科大学公共卫生学院) | 王蓓(东南大学公共卫生学院) |
| 王素萍(山西医科大学公共卫生学院) | 王志萍(山东大学公共卫生学院) | 谢娟(天津医科大学公共卫生学院) |
| 徐爱强(山东省疾病预防控制中心) | 徐慧芳(广州市疾病预防控制中心) | 严卫丽(新疆医科大学公共卫生学院) |
| 阎丽静(中国乔治中心) | 杨春霞(四川大学华西公共卫生学院) | 余运贤(浙江大学医学院公共卫生学院) |
| 曾哲淳(北京安贞医院) | 张波(宁夏回族自治区卫生厅) | 张宏伟(第二军医大学) |
| 张茂俊(中国疾病预防控制中心传染病所) | 张卫东(郑州大学公共卫生学院) | 赵亚双(哈尔滨医科大学公共卫生学院) |
| 朱谦(河南省疾病预防控制中心) | 祖荣强(江苏省疾病预防控制中心) | |