

中国淮阳山地区由新蜱传布尼亚病毒引起的出血热

张永振 周敦金 熊衍文 陈小萍 贺永文 孙强正 余滨 李娟 代永安
田俊华 覃新程 金东 崔志刚 罗雪莲 李伟 卢珊 王文 彭劲松 郭文平
李明慧 李振军 张少敏 陈晨 王艳 Menno D. de Jong 徐建国

【关键词】 布尼亚病毒；蜱传疾病

Hemorrhagic fever caused by a novel tick-borne *Bunyavirus* in Huaiyangshan, China ZHANG Yong-zhen¹, ZHOU Dun-jin², XIONG Yan-wen¹, CHEN Xiao-ping¹, HE Yong-wen³, SUN Qiang-zheng¹, YU Bin², LI Juan¹, DAI Yong-an⁴, TIAN Jun-hua², QIN Xin-cheng¹, JIN Dong¹, CUI Zhi-gang¹, LUO Xue-lian¹, LI Wei³, LU Shan¹, WANG Wen¹, PENG Jin-song², GUO Wen-ping¹, LI Ming-hui¹, LI Zhen-jun¹, ZHANG Shao-min¹, CHEN Chen¹, WANG Yan¹, Menno D. de Jong⁵, XU Jian-guo¹. 1 State Key Laboratory for Infectious Diseases Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China; 2 Wuhan Center for Disease Control and Prevention; 3 Affiliated Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology; 4 Zhongnan Hospital, Wuhan University; 5 Academic Medical Center, University of Amsterdam, Netherlands

Corresponding authors: XU Jian-guo, Email: xujianguo@icdc.cn; ZHANG Yong-zhen, Email: yongzhenzhang@sohu.com; ZHOU Dun-jin, Email: zdj@whcdc.org

This work was supported by grants from the This study was supported by grant (No. 2008ZX10004-001) from Major Project for Infectious Diseases from State Council of China, by grant from State Key Laboratory for Infectious Diseases Prevention and Control, and by the Grant from National Institute of Communicable Diseases Control and Prevention.

【Key words】 Bunyavirus; Tick-borne

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.08.024

基金项目: 国家科技重大专项(2008ZX10004-001); 国家传染病预防控制重点实验室与传染病预防控制所资助课题

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、熊衍文、陈小萍、孙强正、李娟、覃新程、金东、崔志刚、罗雪莲、卢珊、王文、郭文平、李明慧、李振军、张少敏、陈晨、王艳、徐建国); 湖北省武汉市疾病预防控制中心(周敦金、余滨、田俊华、彭劲松); 华中科技大学同济医学院附属协和医院(贺永文、李伟); 武汉大学附属中南医院(代永安); 荷兰阿姆斯特丹大学医学中心(Menno D. de Jong)

张永振、周敦金、熊衍文、陈小萍、贺永文、孙强正、余滨、李娟、代永安、田俊华、覃新程同为第一作者

通信作者: 徐建国, Email: xujianguo@icdc.cn; 张永振, Email: yongzhenzhang@sohu.com; 周敦金, Email: zdj@whcdc.org

病毒性出血热是一种临床症状表现为急性发热和出血的疾病。病原体为人兽共患及节肢动物携带传播的 RNA 病毒, 包括丝状病毒科(如埃博拉出血热、马尔堡出血热)、沙粒病毒科(拉沙热)、黄病毒科(如登革出血热、黄热病)和布尼亚病毒科(如克里米亚-刚果出血热、肾综合征出血热)。目前, 在我国流行的有肾综合征出血热、克里米亚-刚果出血热、登革出血热和基孔肯雅出血热^[1,2]。在人、哺乳动物, 以及节肢动物媒介密切接触的地区, 可能存在一些新的或之前尚未认识的能引起出血热症状的相关病毒。2009 年 4—7 月和 2010 年有多名淮阳山地区(桐柏山、大别山和张八岭的总称, 位于河南、湖北和安徽省交界处)的农民出现不明原因出血热样症状, 本研究从其中 2 例患者血样和该地区犬体表采集到的长角血蜱中分离到一种新病毒, 全基因组测序分析发现该病毒是布尼亚病毒科家族的新成员。

1. 材料与方法:

(1) 临床和实验室资料及病例定义: 患者就诊于武汉市协和医院和中南医院, 临床表现为急性发热($>37.5\text{ }^{\circ}\text{C}$), 血液中白细胞计数减少($<4.0\times 10^9/\text{L}$)和血小板计数减少($<100\times 10^9/\text{L}$)。住院期间采集患者血样, 如有可能还采集粪便、尿液, 以及咽拭子样本, 保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。经常规检测未发现其他病原(包括汉坦病毒和嗜吞噬细胞无形体)的感染者为疑似病例, 采用 RT-PCR 方法从患者血液中检测到新型病毒者为确诊病例。临床和实验室资料来源于确诊患者病历记录。本研究对 2009 年的病例进行回顾性调查, 患者的主动发现工作始于 2010 年 4 月。本研究经中国疾病预防控制中心传染病预防控制所伦理委员会批准。

(2) 样本的采集: 部分患者具有蜱叮咬史, 有患者入院时在其体表发现蜱。2010 年 4—5 月采集确诊患者所在 4 个村庄的牛、犬、羊体表蜱, 并放入不同瓶中标记, 进行形态学鉴定分类, 再通过线粒体 12S rDNA 的序列分析进行分类确认^[3]。将蜱研磨后分离病毒及通过 RT-PCR 检测病毒 RNA。同时在该地区的牛棚和猪舍捕蚊进行形态学分类。

(3) 病毒分离和血清学分析: 将患者全血和蜱研磨悬液上清接种到 Vero E6 单层细胞进行病毒分离^[4]。2 周后用胰酶消化细胞, 消化后的细胞固定在玻片上, 并用间接免疫荧光法 (IFA) 检测病毒抗原。用透射电镜观察生长在 Vero E6 细胞中或超速离心富集的病毒超微结构特征。未感染病毒的 Vero E6 细胞为阴性对照, 用感染病毒的细胞为抗原, 以 IFA 方法检测患者血清中的特异性抗体。同时检测患者血清

中是否存在抗汉坦病毒(76-118和L99株)以及嗜吞噬细胞无形体的抗体^[5,6]。

(4)全基因组测序及RT-PCR方法的建立:采用非序列依赖的单引物扩增技术检测未知病毒的核苷酸序列,采用引物步移法的策略扩增病毒的全基因组序列^[7]。根据全基因组序列,设计了两套巢式PCR的引物,一套位于L片段,扩增大小为914 bp(2208~3121 nt),另一套位于S片段,扩增大小为601 bp(63~663 nt)。PCR产物经纯化后克隆到pMD18-T载体,然后使用ABI 373自动测序仪进行序列测定。每个样品至少挑取2个克隆以确保测序的准确性。

(5)系统发生分析:使用ClustalW2软件比对病毒和蜱的mtDNA序列。用DNASTar软件计算核苷酸以及氨基酸的同源性。采用PAUP*(Version 4b10)软件进行系统发生分析,以Neighbor-Joining(NJ)法构建系统发生树。本研究使用的转换/颠换比例为2:1,采用进化树对分重接(tree bisection reconnection, TBR)进行启发式搜索树。分析采用1000个多序列组。用于比较分析的病毒和蜱的mtDNA参考序列来自GenBank。

2. 结果:

(1)病毒分离与遗传特征:将2010年发病的2例患者(编号2010-2和2010-13)血样接种到Vero E6细胞,感染14 d后,使用PCR、IFA和电子显微镜均检测到病毒感染的阳性细胞。该2株分离病毒分别被命名为Huaiyangshan-Human-1和Huaiyangshan-Human-2。本研究对分离株扩增全基因组序列,为负义RNA病毒,包含11 492个核苷酸,具有布尼亚病毒科的基因结构特点,由3个独立的基因片段组成,分别为S片段(1746 nt)、M片段(3378 nt)和L片段(6368 nt)。系统发生分析表明,病毒全L片段间有很高的同源性(核苷酸的同源性为95.95%,氨基酸的同源性为99.14%),但均不同于已知的其他布尼亚病毒。其中与乌库涅米病毒(D10759)有最高的同源性(核苷酸同源性为38.83%,氨基酸同源性为28.57%),与白蛉属其他病毒的核苷酸同源性高达32.47%,氨基酸同源性高达39.57%,用部分S和L片段核苷酸序列构建的系统发生树表明,本研究发现该病毒形成一个独立的分支[为布尼亚病毒科的一个新成员,将其命名为淮阳山病毒(Huaiyangshan virus)]。用全S和M片段核苷酸序列构建的系统发生树与用全L片段核苷酸序列构建的发生树有相似的拓扑结构。

(2)病例的回顾性和前瞻性研究:2009年发病的37份疑似病例血样送至中国疾病预防控制中心传染病预防控制所。采用RT-PCR方法从发病时间为2~22 d的血液标本中检出23份(62.2%)淮阳山病毒RNA阳性,其中9份经IFA检测病毒特异性IgG抗体均为阳性,但未能在3份RT-PCR阴性样本中检测到病毒特异IgG抗体。2010年4月15日至7月20日间对21例疑似病例进行前瞻性研究,结果从20例(95.2%)发病1~40 d患者血样中扩增到L和S片段,20例PCR确诊患者的血样中均检出病毒特异性IgG抗体,而PCR检测阴性血样中未检测到特异抗体。其中12例患者的双份血

清有至少4倍的IgG抗体滴度升高。在2009和2010年所有患者标本中未检测到抗汉坦病毒和无形体的抗体。

(3)流行病学特征及其临床表现:33例确诊患者均为居住在淮阳山区的农民,从事放牧、采茶等农业活动。2009年确诊病例的发病时间为4月23日至7月6日,发病高峰在5月下旬,其他时间无患者。2010年4月监测到第1例患者,末例出现在10月25日。分析33例(2009年13例,2010年20例)确诊病例的临床资料,患者发病前均健康,年龄37~78岁(平均55岁),无性别差异。患者入院后2~15(平均7)d有发热(100%)和不同比例的其他症状,其中包括乏力(48%)、恶心(39%)、呕吐(36%)、腹泻(42%)、肌肉痛或关节痛(24%)。3例患者出现明显的出血(急性阴道出血2例和牙龈出血1例)。实验室检测血白细胞计数减少(29/32)、血小板计数减少(30/32)、凝血时间(TT)延长(19/21)、活化部分凝血酶原时间(APTT)延长(22/23)、乳酸脱氢酶(LDH)升高(27/29)、肌酸激酶(CK)升高(22/28),以及血尿素氮(BUN)升高(9/28)。大部分患者有肝转氨酶升高(天冬氨酸转氨酶和丙氨酸转氨酶升高分别为27例和28例),显著血尿7例,显著蛋白尿14例。除血液样本外,19例患者咽拭子中有12份(63%)、16例尿样中有11份(69%)、13例患者粪便中有6份病毒RNA阳性。其中有3例患者在上述三种样本中均检出病毒RNA。

5例患者(年龄50~78岁,平均62岁)在入院3 h到4 d后死亡,其中脑出血1例,另4例死于多器官衰竭。死者均可观察到肝转氨酶升高,LDH、CK、APTT及TT显著升高。存活患者住院治疗1~21(平均10.5)d后预后良好。

(4)传播媒介的调查:分别在湖北省的大悟、新洲和曾都县及河南省新县4个疫区的牛、羊和犬的体表采集成虫蜱共2个种613只(长角血蜱540只,微小牛蜱73只)。其中从大悟县2头牛的体表采集到57只长角血蜱;从新洲区采集到111只蜱[从1头牛和2只犬的体表各采集到6只和32只长角血蜱(共38只),及从1头牛和2只犬体表各采集到69只和4只微小牛蜱(共73只)];从曾都县采集到100只长角血蜱[从5头牛和7只羊体表各采集到72只和28只长角血蜱];其余采自新县3头牛体表的345只长角血蜱。采集的动物及其他疫区动物无发病症状。经RT-PCR检测,从上述4个地区采集的蜱体内均检测到淮阳山病毒的RNA核酸序列。4株病毒分别命名为Huaiyangshan-Dawu-Cattle-Tick-1, Huaiyangshan-Zengdu-Cattle-Tick-1, Huaiyangshan-Xinxian-Cattle-Tick-1和Huaiyangshan-Xinzhou-Dog-Tick-1。同时,将新洲区采集的病毒RNA检测阳性的蜱匀浆接种细胞,培养后分离到1株病毒(Huaiyangshan-Xinzhou-Dog-Tick-1)。系统分析12S rDNA核苷酸序列,病毒RNA阳性蜱均为长角血蜱,微小牛蜱中未检测到病毒RNA序列,而在同一地区采集的2000多只蚊(包括中华按蚊、白腹丛蚊和三节吻库蚊)中也未检测到该病毒。

(5)新病毒的遗传多样性:从33例患者样本中扩增到32条部分S片段核苷酸序列,以及从33例患者样本和4份蜱的

样本中共扩增到 26 条部分 L 片段核苷酸序列。从患者样本扩增到的部分 S 和部分 L 片段的核苷酸序列分别有较高的同源性。部分 S 片段的核苷酸序列同源性为 93.68% ~ 100.00%，氨基酸序列同源性为 97.99% ~ 100.00%。此外，从蜱和患者样本扩增到的部分 L 片段核苷酸序列之间也有很高的同源性，核苷酸序列同源性 > 95.41%，氨基酸序列同源性 > 98.47%。系统发生分析表明，所有来自患者的病毒株可聚在一起，并进一步划分为 3 个小分支。

3. 讨论：在调查淮阳山地区不明原因发热疾病的过程中，从患者血液中分离到一种未知病毒。全基因组序列分析揭示该病毒是布尼亚病毒科的一个新成员，本研究将其命名为淮阳山病毒。随后在该地区的犬体表蜱中也分离到相同病毒，提示蜱可能是该病毒的传播媒介。

淮阳山病毒感染机体后主要引起高热、乏力、恶心、呕吐和腹泻等非特异性感染症状和体征。实验室检查结果与其他出血热病毒感染类似^[8]。虽然多数患者尿潜血阳性，但只有少数患者出现明显出血症状。所有患者均出现肝转氨酶升高，提示肝脏可能是病毒感染的首选靶器官。大部分患者出现 LDH 和 CK 升高，部分患者出现肾功能损害。这些结果提示病毒感染可累及全身多脏器，从大部分患者的咽、尿和便标本中检测到病毒 RNA 也说明了这一点。目前还不清楚全身多部位检测到病毒是由于潜在出血引起的血液污染还是病毒复制活跃所致。因此需要进一步的研究以明确该病毒的致病机制和疾病谱。本研究入院病例病死率为 15%，主要死于出血和多器官功能衰竭。另外，还应通过社区人群监测以揭示该病毒无症状或轻微感染发生概率。

尽管淮阳山病毒与白蛉病毒属亲缘关系最近，但其间的基因序列差异很大。目前白蛉病毒属包括 53 个已知血清型，分为白蛉热组和乌库涅米组 (Uukuniemi group) 两个主要的抗原组。白蛉热组包括由白蛉传播的裂谷热病毒 (Rift Valley Fever virus) 和托斯卡纳病毒 (Toscana virus)。乌库涅米组的病毒由蜱传播^[9,10]。尽管在人体内能检测到抗乌库涅米病毒抗体，但乌库涅米病毒是否能对人致病尚不清楚^[11]。系统发生分析显示此次在淮阳山地区患者和蜱分离到的病毒亲缘关系非常近，形成一个独立的分支，明显不同于白蛉热病毒和乌库涅米病毒。

本次在实验室确诊病例所在村庄的牛和犬体表采集到的长角血蜱体内检测到同样病毒。这些病例均为农民，曾饲养牛羊、采茶和从事其他农业活动，可能接触到蜱 (确诊病例自诉被蜱叮咬，且在入院就诊时发现蜱)，而 4—7 月正是淮阳山地区蜱密度最高时期^[12]。尽管从蜱和人样本中扩增到的病毒序列高度相似，提示蜱在疾病传播中起重要作用，然而节肢动物的生态学 and 该病毒是否存在其他动物宿主还需进一步研究。

(本研究英文版已在本刊 2011 年第 32 卷第 3 期第 209 ~ 220 页全文发表)

参 考 文 献

- [1] Zhang YZ, Zou Y, Fu ZF, et al. Hantavirus infection in humans and animals, China. *Emerg Infect Dis*, 2010, 16: 1195-1203.
- [2] Gao X, Nasci R, Liang G. The neglected arboviral infections in mainland China. *PLoS Negl Trop Dis*, 2010, 4: e624.
- [3] Beati L, Keirans JE. Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. *J Parasitol*, 2001, 87: 32-48.
- [4] Zhang YZ, Zou Y, Yao LS, et al. Isolation and characterization of hantavirus carried by *Apodemus peninsulae* in Jilin, China. *J Gen Virol*, 2007, 88: 1295-1301.
- [5] Zhang YZ, Dong X, Li X, et al. Seoul virus and hantavirus disease, Shenyang, People's Republic of China. *Emerg Infect Dis*, 2009, 15: 200-206.
- [6] Zhang L, Liu Y, Ni D, et al. Nosocomial transmission of human granulocytic anaplasmosis in China. *JAMA*, 2008, 300: 2263-2270.
- [7] Allander T, Tammi MT, Eriksson M, et al. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 12891-12896.
- [8] Lee JS, Lähdevirta J, Koster F, et al. Clinical manifestations and the treatment of HFRS and HPS//Lee HW, Calisher C, Schmaljohn C. *Manual of Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome and Hantavirus Pulmonary Syndrome*. WHO Collaborating Center for Virus Reference and Research (Hantaviruses). Seoul: Asan Institute for Life Sciences, 1999: 17-38.
- [9] Nichol ST, Beaty BJ, Elliot RM, et al. *Family Bunyaviridae*// Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, et al. *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Virus*. San Diego, London: Elsevier Academic Press, 2005: 695-716.
- [10] Tesh RB. The genus Phlebovirus and its vectors. *Annu Rev Entomol*, 1988, 33: 169-181.
- [11] Nichol ST. *Bunyaviridae*//Knipe DM, Howley P. *Fields Virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 1603-1633.
- [12] Liu ZY, Lu ML. *Medical entomology*. Beijing: Science Publishing House, 1990: 397-422. (in Chinese) 柳支英, 陆宝麟. *医学昆虫学*. 北京: 科学出版社, 1990: 397-422.

(收稿日期: 2011-03-14)

(本文编辑: 张林东)