

湖北省武汉地区啮齿动物汉坦病毒S基因的特征分析

刘东瀛 刘婧 李金林 陈文 罗凡 李晴 杨占秋

【摘要】 目的 了解湖北省武汉地区啮齿动物自然感染汉坦病毒(HV)情况以及流行的基因型和亚型。方法 2000—2003年、2009—2011年秋冬季在武汉地区新洲、江夏区野外及居民区采用夹夜法捕鼠。对捕获的动物进行分类鉴定并取肺脏用间接免疫荧光法检测病毒抗原。抗原阳性的样本,采用RT-PCR方法扩增部分S片段核苷酸序列,构建系统发生树并进行基因分型。结果 2000—2003年捕获啮齿类动物437只, HV抗原阳性鼠肺标本24份,病毒携带率为5.49%。2009—2011年捕获啮齿类动物173只, HV抗原阳性鼠肺标本7份,病毒携带率为4.05%。褐家鼠为当地的优势鼠种。22份标本成功地用汉滩病毒(HTNV)、汉城病毒(SEOV)特异引物扩增部分S基因片段并测序。17只(13只褐家鼠,4只黑线姬鼠)鼠肺标本中扩增出SEOV部分S基因片段(nt 588~1147),分别属于第3亚型和2个新的基因亚型。5只黑线姬鼠的鼠肺标本中扩增出HTNV部分S基因片段(nt 615~1141),分别属于第7亚型和1个新的亚型。结论 武汉地区流行的HV为SEOV和HTNV,并发现新的基因亚型,SEOV可能“溢出”感染黑线姬鼠。

【关键词】 汉坦病毒; 啮齿动物; 基因; 系统发生分析

Genetic analysis on S segment of hantaviruses in rodent hosts from Wuhan area, Hubei province LIU Dong-ying^{1, 2}, LIU Jing^{1, 3}, LI Jin-lin¹, CHEN Wen¹, LUO Fan¹, LI Qing⁴, YANG Zhan-qiu¹. 1 State Key Laboratory of Virology, Institute of Medical Virology, 2 Department of Microbiology, School of Medicine, Wuhan University, Wuhan 430071, China; 3 Medical College of Nantong University; 4 Department of Basic Medicine, Medical College of Xiamen University
Corresponding author: YANG Zhan-qiu, Email: yangzhanqiu@163.com

This work was supported by grants from the National High Technology Research and Development 863 Program of China (No. 2007AA02Z465) and National Natural Science Foundation of China (No. 30770096).

【Abstract】 **Objective** To investigate the infection and genotype of hantaviruses in rodents from Wuhan area, Hubei province. **Methods** Rodents were trapped in fields and residential areas of Xinzhou and Jiangxia districts of Wuhan in autumn and winter seasons, from 2000 to 2003 and from 2009 to 2011. Trapped rodents were identified, and hantavirus antigens were detected in the lung tissues with indirect immunofluorescence assay (IFA). Partial S segment sequences were amplified with RT-PCR in hantavirus antigen positive samples and then sequenced. Phylogenetic tree was constructed to analyze the genetic characteristics of hantaviruses. **Results** From 2000 to 2003, 437 rodents were trapped, with 24 (5.49%) lung tissues showed hantavirus antigen positive. From 2009 to 2011, 173 rodents were trapped and 7 (4.05%) were hantavirus antigen positive. *Rattus norvegicus* were the dominant species of rodents. Partial S segment sequences were amplified from 22 samples with Hantaan and Seoul viruses specific primers and sequenced. Partial S segments of Seoul viruses (nucleotide 588–1147) were amplified from 17 rodents (13 *R. norvegicus* and 4 *Apodemus agrarius*). Seven of these sequences belonged to 3 genetic lineage, while two novel genetic lineages were formed by 9 and 1 sequences, respectively. Partial S segments of Hantaan viruses (nucleotide 615–1141) were amplified from 5 *A. agrarius*. One of these sequences belonged to 7 genetic lineages, and 4 sequences formed one novel genetic subtype. **Conclusion** Hantaan and Seoul viruses co-circulated in Wuhan area, Hubei province. Novel genetic lineages were identified in this study and Seoul virus might have caused spillover infection in *A. agrarius*.

【Key words】 Hantavirus; Rodent; Gene; Phylogenetic analysis

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2012.08.016

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)(2007AA02Z465); 国家自然科学基金(30770096)

作者单位: 430071 武汉大学医学病毒学研究所/病毒学国家重点实验室(刘东瀛、刘婧、李金林、陈文、罗凡、杨占秋), 医学微生物学教研室(刘东瀛); 南通大学医学院(刘婧); 厦门大学医学院基础医学部(李晴)

通信作者: 杨占秋, Email: yangzhanqiu@163.com

汉坦病毒(HV)主要由啮齿类动物和食虫动物携带,感染人类后能引起肾综合征出血热(HFRS)和汉坦病毒肺综合征(HPS)。在世界范围内已发现HV至少存在有20个以上的血清型/基因型,每型病毒均与一种或少数几种相近的啮齿或食虫动物密切相关,并在宿主动物中产生持续性无症状感染^[1]。HV及其宿主动物的种系发生树结构具有相似性,提示病毒与宿主共进化或者共分化^[2]。我国目前发现的HV有汉滩型(HTNV)、汉城型(SEOV)、大别山型(DBSV)、北海道型(HOKV)、符拉迪沃斯托克型(VLAV)、哈巴罗夫斯克型(KHAV)及沅江型(YUVJ)^[3]等。由于HV与宿主动物间的对应关系,宿主动物的类型及其感染情况决定了疫区流行病毒的型别和流行强度。武汉地区是湖北省HFRS的主要疫区之一,但是HV的基因型尚不明,为此本研究在2000—2003年及2009—2011年对该地区宿主动物携带HV的流行特征及基因序列进行了分析。

材料与方 法

1. 标本采集:2000—2003年、2009—2011年秋冬季节在武汉地区新洲区、江夏区HFRS流行疫点周围的野外及居民区采用夹夜法,晚放晨取捕鼠。将捕获的鼠类经分类鉴定和登记后,无菌解剖采集鼠肺标本,放置于液氮中保存待检。

2. 病毒抗原检测:将鼠肺标本冰冻切片后,用间接免疫荧光法(IFA)检测^[4]。兔抗HV抗体为本实验室制备。羊抗兔免疫荧光抗体购自美国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. 引物的设计及合成:根据GenBank中HV基因序列,设计3对HTNV、SEOV特异性S片段引物。HTNV引物:HTN-S558F/HTN-S830R, HTN-S774F/S1007R和S927F/S1168R。SEOV引物:SEO-S567F/SEO-S870R, SEO-S802F/S1007R和S927F/S1168R(表1)。

4. 病毒RNA提取及反转录聚合酶链反应(RT-PCR):用RNAprep Tissue Kit(Qiagen)提取RNA。用随机引物和MMLV反转录酶(Promega)合成cDNA。用上述引物扩增部分S片段(SEOV: nt 588~1147,产物长度560 bp, HTNV: nt 615~1141,产物长度527 bp)。具体扩增条件为:94℃预变性5 min, 94℃45 s, 55℃45 s, 72℃45 s,共30个循环,最后于72℃延伸5 min。PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳后,用凝胶回收试剂盒(Qiagen)进行

表1 用于RT-PCR的HTNV和SEOV S片段特异性引物

引物	序列(5'~3')
HTN-S558F	AAGCATGAAGGCAGAAGAGAT
HTN-S830R	TAGTCCCTGTTTGTGTCAGG
HTN-S774F	ACTCCCAGATACAGCAGCAGT
SEO-S567F	ACATCTGTATGTGTCAATGCC
SEO-S870R	CATTCCTGCAAGTGCACCTTG
SEO-S802F	GGGAGTTTATCTGGGAATCC
S1007R	ACAAACAAGCATGTTGGTGG
S927F	GATTGAAGATATTGAGTCACC
S1168R	GTTGTATCCCCATTGATTGTG

纯化。用ABI 3730自动测序仪测序。

5. 系统发生分析:用BioEdit软件进行基因序列排序及同源性分析,用PAUP* 4.0软件进行系统发生分析,以最大似然法(ML)构建系统发生树,分支支持率用1000次重复bootstrap分析。用于比较分析的HV序列来自于GenBank(表2)。

结 果

1. HV抗原检测:2000—2003年在武汉地区新洲、江夏疫点居民区及野外共捕获啮齿类动物437只,其中褐家鼠282只(64.53%),黄胸鼠31只(7.09%),黑线姬鼠104只(23.80%),小家鼠20只(4.58%)。采用IFA法检测437份鼠肺标本,共检出24份鼠肺标本HV抗原阳性,其中15份为褐家鼠,9份为黑线姬鼠,病毒携带率为5.49%。其他鼠种的鼠肺标本中没有检测到HV抗原。2009—2011年在江夏疫点居民区及野外捕获啮齿动物173只,其中褐家鼠125只(72.25%),黑线姬鼠48只(27.74%)。IFA法检测鼠肺标本,7份为HV抗原阳性,其中4份为褐家鼠,3份为黑线姬鼠,病毒携带率为4.05%(表3)。

2. RT-PCR:2000—2003年和2009—2011年31份HV抗原阳性的标本中,22份标本用HTNV、SEOV型特异引物成功扩增部分S基因片段,并进行序列测定。其中17只(13只褐家鼠,4只黑线姬鼠)鼠肺标本扩增出SEOV部分S基因片段(nt 588~1147),5只黑线姬鼠的鼠肺标本扩增出HTNV部分S基因片段(nt 615~1141)。

3. 系统发生分析和同源性分析:用SEOV和HTNV部分S片段核苷酸序列构建的系统发生树(图1、2)。图1显示,17株SEOV形成3个分支:①7株病毒(来源于2000—2003年江夏7只褐家鼠)与Z37、ZT10、BjHD01和JUN5-14等病毒分在同一分支,这7株病毒之间的同源性为99.2%以上,与疫苗株Z37的同源性97.1%~97.4%。②9株病毒

表2 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	
SEOV	JUN5-14	褐家鼠	中国山东	DQ217791	
	BjHD01	褐家鼠	中国北京	AY627049	
	ZT10	东方田鼠	中国浙江	AY766368	
	Z37	褐家鼠	中国浙江	AF187082	
	IR461	实验室大鼠	英国	AF329388	
	SR-11	褐家鼠	日本	M34881	
	Tchoupitoulas	褐家鼠	美国	AF329389	
	80-39	褐家鼠	韩国	NC_005236	
	Hb8610	褐家鼠	中国山西	AF288643	
	K24-v2	褐家鼠	中国浙江	AF288655	
	R22	褐家鼠	中国河南	AF488707	
	L99	罗塞鼠	中国江西	AF288299	
	ZJ5	褐家鼠	中国浙江	FJ753400	
	Gou3	黑家鼠	中国浙江	AF184988	
	HTNV	A16	黑线姬鼠	中国陕西	AF288646
		CGRni1	大足鼠	中国贵州	EU363812
		TJJ16	社鼠	中国天津	AY839871
		Q32	黑线姬鼠	中国贵州	AB027097
		SN7	社鼠	中国四川	AF288657
		84FLi	人	中国陕西	AY017064
KY		实验室大鼠	中国云南	GU140098	
Z10		人	中国浙江	AF184987	
Z5		-	中国浙江	EF103195	
Hu		人	中国湖北	AB027111	
A9		黑线姬鼠	中国江西	AF329390	
CGRn53		褐家鼠	中国贵州	EF990907	
CGAa4MP9		黑线姬鼠	中国贵州	EF990915	
CGAa4P15		黑线姬鼠	中国贵州	EF990914	
CGAa1011		黑线姬鼠	中国贵州	EF990913	
Bao14		黑线姬鼠	中国黑龙江	AB127998	
CJAp93		大林姬鼠	中国吉林	EF208929	
Maaji-2		-	韩国	AF321095	
S85-46		中麝鼯	中国四川	AF288659	
76-118		黑线姬鼠	韩国	M14626	
LR1	黑线姬鼠	中国陕西	AF288294		
SC-3	大林姬鼠	韩国	AY675351		
SC-1	大林姬鼠	韩国	AY675349		
H5	人	中国黑龙江	AB127996		
JilinAP06	大林姬鼠	中国吉林	EF121324		
AH09	社鼠	中国安徽	AF285264		
NC167	社鼠	中国安徽	AB027523		
SNV	NM-H10	鹿鼠	美国	NC_005216	

表3 武汉地区不同调查时间捕获啮齿类动物种类和HV 阳性只数

鼠种	2000—2003年			2009—2011年		
	捕获只数	抗原阳性 (%)	PCR 阳性	捕获只数	抗原阳性 (%)	PCR 阳性
褐家鼠	282	15(5.32)	11	125	4(3.20)	2
黄胸鼠	31	0	0	0	0	0
黑线姬鼠	104	9(8.65)	8	48	3(6.25)	1
小家鼠	20	0	0	0	0	0
合计	437	24(5.49)	19	173	7(4.05)	3

注:括号外数据为阳性只数,括号内数据为阳性率

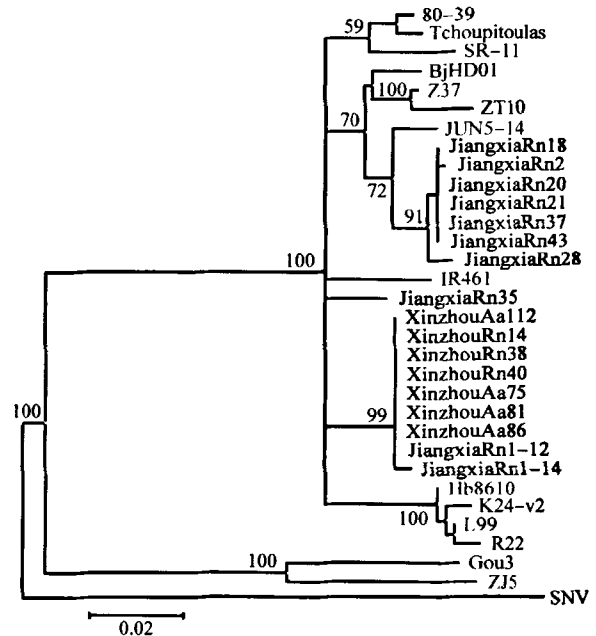


图1 SEOV 部分S 片段序列(nt 588 ~ 1147) 构建系统发生树

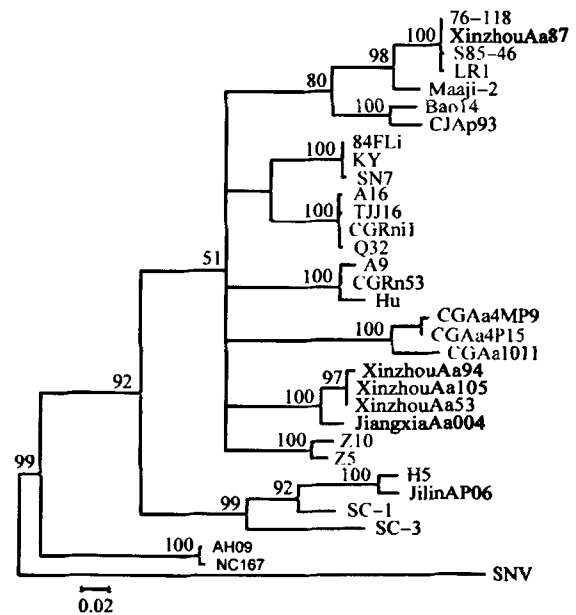


图2 HTNV 部分S 片段序列(nt 615 ~ 1141) 构建系统发生树

(2000—2003年新洲3只褐家鼠和4只黑线姬鼠; 2009—2011年江夏2只褐家鼠)形成一新的分支,与Z37的同源性为96.9%。③1株病毒 JiangxiaRn35 (2000—2003年江夏褐家鼠)形成一个单独的分支,与Z37的同源性为97.3%。

图2显示,由黑线姬鼠携带的5株HTNV形成2个分支:①1株病毒 XinzhouAa87(2000—2003年新洲黑线姬鼠)与代表株76-118聚在一个分支中,两病毒部分S 片段序列相似度达100%。②另外4株病

毒(2000—2003年新洲3只黑线姬鼠,2009—2011年江夏1只黑线姬鼠)形成一个新的分支,与湖北分离株Hu的同源性为84.9%~87.2%,与贵州分离株Q32的同源性最高(87.4%~88.5%),与代表株76-118的同源性为84.2%~86.2%。

讨 论

本研究通过对武汉地区HFRS发病数相对较高的江夏区、新洲区调查发现,当地优势鼠种是褐家鼠, HV宿主为褐家鼠和黑线姬鼠。2000—2003年啮齿动物HV携带率为5.49%,2009—2011年携带率降为4.05%。对该地区啮齿动物HV进行基因分型及系统发生分析,发现22份RT-PCR阳性的标本中,17份为SEOV,5份为HTNV。当地流行的HV以SEOV为主。SEOV主要由褐家鼠携带,能引起轻型HFRS,导致人群隐性感染的概率高于HTNV。近几年HV流行病学研究表明,我国其他某些地区也是以SEOV为主^[5-7]。这提示随着我国城镇化进程的加快,由褐家鼠携带的SEOV的流行有逐渐扩大趋势。本研究在黑线姬鼠的鼠肺标本中检测到SEOV的部分S片段基因,提示SEOV“溢出”感染黑线姬鼠。HV有相对严格的宿主动物特异性,每一型病毒主要由一种啮齿动物或食虫动物携带。黑线姬鼠主要生存于野外,而褐家鼠既生存于居民区也生存于野外。当两种鼠密切接触时,可能造成它们携带的病毒“溢出”感染。

系统发生分析结果表明,武汉地区的SEOV属于3个基因亚型,包括以Z37株为代表的第3亚型和2个新亚型^[8]。根据已发表文献,SEOV第3亚型广泛分布于我国的东北、内蒙古、河北、北京、山东、河南、浙江等地^[9-13]。本研究显示,中南地区也存在第3亚型的分布;SEOV 2个新基因亚型的发现提示SEOV在武汉地区具有较强的遗传多样性。

文献报道湖北省HFRS患者中曾检测到HTNV第7和第9亚型^[8,14]。本研究在啮齿动物中除检测到以76-118株为代表的HTNV第7亚型外,还检测到一个新的基因亚型。此新亚型与分离自贵州的Q32病毒株同源性最高(87.4%~88.5%)。目前在HFRS患者中尚未检测到此新亚型HTNV,其致病性尚待进一步研究。2009—2011年的调查结果与2000—2003年相比,并未发现新的基因亚型。

近年来我国HFRS新疫区不断出现,老疫区的类型也有所变化,SEOV疫区不断扩大。本研究应用RT-PCR、基因测序和系统发生分析的方法,从分

子生物学的角度证实了武汉地区啮齿动物携带的HV以SEOV为主,并且存在新的SEOV和HTNV基因亚型。

参 考 文 献

- [1] Jonsson CB, Figueiredo LT, Vapalahti O. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clin Microbiol Rev*, 2010, 23(2):412-441.
- [2] Plyusnin A, Morzunov SP. Virus evolution and genetic diversity of hantaviruses and their rodent hosts. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2001, 256:47-75.
- [3] Zhang YZ, Zou Y, Fu ZF, et al. Hantavirus infections in humans and animals, China. *Emerg Infect Dis*, 2010, 16(8):1195-1203.
- [4] Zhang YZ, Dong X, Li X, et al. Seoul virus and hantavirus disease, Shenyang, People's Republic of China. *Emerg Infect Dis*, 2009, 15(2):200-206.
- [5] Dai DF, Zhang H, Liu YZ, et al. Virological surveillance on hemorrhagic fever with renal syndrome in Hunan province in 2006. *Chin J Epidemiol*, 2007, 28(12):1194-1197. (in Chinese) 戴德芳, 张红, 刘运芝, 等. 湖南省2006年肾综合征出血热病原学监测研究. *中华流行病学杂志*, 2007, 28(12):1194-1197.
- [6] Zhang YZ, Lin XD, Shi NF, et al. Hantaviruses in small mammals and humans in the coastal region of Zhejiang province, China. *J Med Virol*, 2010, 82(6):987-995.
- [7] Zhou JH, Zhang HL, Wang JL, et al. Survey on host animal and molecular epidemiology of hantavirus in Chuxiong prefecture, Yunnan province. *Chin J Epidemiol*, 2009, 30(3):239-242. (in Chinese) 周济华, 张海林, 王静林, 等. 云南省楚雄州汉坦病毒宿主动物及分子流行病学研究. *中华流行病学杂志*, 2009, 30(3):239-242.
- [8] 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.
- [9] Qu YG, Yang GQ, Zou Y, et al. Isolation and characterization of hantavirus carried by rodents in Huludao, Liaoning province. *Chin J Epidemiol*, 2006, 27(6):513-517. (in Chinese) 屈勇刚, 杨国庆, 邹洋, 等. 辽宁省葫芦岛地区鼠类汉坦病毒的分离与鉴定. *中华流行病学杂志*, 2006, 27(6):513-517.
- [10] Zhang YZ, Zhang FX, Wang JB, et al. Hantaviruses in rodents and humans, Inner Mongolia Autonomous Region, China. *Emerg Infect Dis*, 2009, 15(6):885-891.
- [11] Jiang JF, Zuo SQ, Zhang WY, et al. Prevalence and genetic diversities of hantaviruses in rodents in Beijing, China. *Am J Trop Med Hyg*, 2008, 78(1):98-105.
- [12] Zuo SQ, Zhang PH, Jiang JF, et al. Seoul virus in patients and rodents from Beijing, China. *Am J Trop Med Hyg*, 2008, 78(5):833-837.
- [13] Li J, Zhao ZT, Wang ZQ, et al. Nucleotide sequence characterization and phylogenetic analysis of hantaviruses isolated in Shandong province, China. *Chin Med J (Engl.)*, 2007, 120(9):825-830.
- [14] Ding XH, Yang ZQ, Xiao H, et al. Genetic diversity of partial M segment of Hantaan virus Hubei strain and analysis of phylogenetic tree. *Chin J Virol*, 2003, 19(2):169-172. (in Chinese) 丁晓华, 杨占秋, 肖红, 等. 汉滩病毒M片段的核苷酸序列变异和系统发生树分析. *病毒学报*, 2003, 19(2):169-172.

(收稿日期:2012-02-16)

(本文编辑:卢亮平)