

湖北地区 HFRS 患者血清与欧洲汉坦病毒重组核抗原的反应性研究

李晴 陈文 杨占秋

【摘要】 目的 用欧洲汉坦病毒流行株制备重组核抗原,检测湖北地区 HFRS 患者血清中汉坦病毒特异性抗体,观察流行于不同地区汉坦病毒的相关性。方法 收集湖北地区 34 例 HFRS 患者急性/恢复期血清,以 ELISA 法检测血清标本对欧洲汉坦病毒重组核抗原(rNP)的反应性。结果 多不拉伐病毒(DOBV)-rNP 对 IgA 抗体检出率最高,汉滩病毒(HTNV)-rNP 对 IgG 抗体检出率最高,两者对 IgM 抗体检出率的差异无统计学意义;普马拉病毒(PUUV)-rNP 对各种抗体检出率均低,但有 3 例患者急性期和恢复期标本对 3 种 PUUV-rNP 均有很强反应性。定量分析结果发现,IgM 抗体水平急性期较高,IgA 抗体水平急性期、恢复期均较高;IgA、IgG 抗体水平恢复期均显著升高。结论 DOBV-rNP 对湖北地区 HFRS 患者血清检出率高,IgA 抗体水平在急性期和恢复期均较高,对疾病的监测具有重要意义;湖北地区可能存在 PUU 型和 DOB 型汉坦病毒流行。

【关键词】 肾综合征出血热;汉坦病毒;抗体水平

The reactivity of sera from hemorrhagic fever in patients with renal syndromes to the recombination nucleotide proteins from European hantaviruses in Hubei province LI Qing*, CHEN Wen, YANG Zhan-qiu. *Medical College of Xiamen University, Xiamen 361005, China

Corresponding author: YANG Zhan-qiu. State Key Laboratory of Virology, Institute of Medical Virology, School of Medicine Wuhan University, Wuhan 430071, China. Email: zqyang@whu.edu.cn

【Abstract】 Objective Five yeast-expressed recombination nucleotide proteins of European hantaviruses were prepared as coated antigens to detect hantavirus-specific antibodies in sera from hemorrhagic fever with renal syndromes (HFRS) in Hubei province, through ELISA assay. The reactivity among hantaviruses prevailing in different areas was investigated. **Methods** 34 pairs of acute/convalescent serum samples were collected from HFRS patients in Hubei during 1985 - 1989 and 1996 - 2000. ELISA assay was performed to detect the reactivity of these sera to different hantavirus-recombinant nucleocapsid proteins(HV-rNP) which were derived from puumala virus (PUUV), dobrava virus (DOBV) while using hantaan virus (HTNV) to serve as control. Qualitative results were used to analyze the detection rate and the quantitative results of optical density values were used to investigate the antibodies' level and the changes. **Results** The detective efficiency of rNP against IgG antibody in samples was as follows: HTNV-rNP > DOBV-rNP > PUUV-rNP. As to the detection of IgA, it was: DOBV-rNP > HTNV-rNP > PUUV-rNP. However, there was no difference between DOBV-rNP and HTNV-rNP when the hantavirus-specific IgM was detected. PUUV-rNP showed a very weak reactivity to all the antibodies in samples, but 3-pair samples reacted strongly to all the three subtype-rNP of PUUV. Results from quantitative analysis revealed that there was a relative higher level of IgM and IgA in acute phase sera. No significant difference between IgM and IgA levels was found and the level of IgG was low. A high level of IgA was detected in convalescent sera. Moreover, the level of IgA and IgG significantly increased with the progress of the disease. **Conclusion** DOBV-rNP had a high detective efficiency to serum samples from HFRS patients in Hubei. HV-specific IgA was kept on a high level in acute and convalescent phases and had important implications for the surveillance of HFRS. Also, it is assumed that PUUV and DOBV might have existed in Hubei province.

【Key words】 Hemorrhagic fever with renal syndromes; Hantavirus; Antibodies' level

基金项目:国家“863”高技术研究发展计划资助项目(2007AA02Z465);国家自然科学基金资助项目(30770096);立陶宛 EU Project BIOCEL 基金资助项目;厦门大学引进人才科研启动基金资助项目(Z03111)

作者单位:361005 厦门大学医学院基础医学部(李晴);武汉大学医学病毒学研究所 病毒学国家重点实验室(陈文、杨占秋)

通讯作者:杨占秋, Email: zqyang@whu.edu.cn

肾综合征出血热(HFRS)是我国重点防治的传染病之一^[1]。目前我国流行的 HFRS 病原主要有汉滩病毒(HTNV)和汉城病毒(SEOV)。近年来,有研究证明我国东北地区已有普马拉病毒(PUUV)的流行,亦有学者推测我国可能有多不拉伐病毒(DOBV)的存在^[2,3]。这表明我国汉坦病毒(HV)的血清型日趋复杂,新的血清型的不断出现可能是我国 HFRS 流行特征改变的原因之一。湖北地区是 HFRS 重疫区,过去的流行病学研究表明该地区是以 HTNV 流行为主的 HFRS 混合疫区。为了解湖北地区 HFRS 病原与欧洲地区流行株之间的血清学关系,我们拟研究 DOBV-重组核抗原(rNP)、PUUV-rNP 抗原对湖北地区患者血清中特异性抗体的检出率及疾病早晚期各种抗体水平变化,探讨疾病监测中新病毒出现的可能性。

材料与方 法

1. 血清标本:34 对急性/恢复期血清收集自 1985-1989 年和 1996-2000 年间原湖北医科大学附属教学医院(现武汉大学中南医院、人民医院等)和原同济医科大学附属教学医院(现华中科技大学附属协和医院)部分收治住院的 HFRS 患者。所有患者均知情同意并按以下标准筛选:①年龄 ≥ 14 岁;②发热时间 ≤ 4 d;③临床确诊为 HFRS,包括发热、蛋白尿等症状;④有病原暴露史或与感染者接触史;⑤所有急性期血清经 ELISA 抗体捕捉法检测抗-HV混合抗原(HTNV 76-118、HV 114 和 A9)特异性 IgM 抗体阳性,且滴度在 1:200 以上。

2. ELISA 包被抗原制备及对照设立:表达欧洲地区流行株 PUUV Kazan 株、PUUV Vranica 株、PUUV Sotkamo 株、DOBV Slovakia 株、DOBV Slovenia 株及对照 HTNV Fojnica 株核衣壳蛋白的酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*)由立陶宛维尔纽斯生物技术研究所 Sasnauskas 提供。其结构及分子质量大小见文献[4]。按文献[5]操作提取并纯化酵母菌中表达的重组核蛋白,用 0.05 mol/L 碳酸钠包被液(pH 值 9.6)将其配制成浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的包被抗原;同时设立不含任何抗原的包被缓冲液为空白对照。ELISA 中所用阴性对照,阳性 PUUV 对照和 DOBV/HTNV 对照均由德国 Friedrich-Loeffler 研究所 Ulrich 提供。

3. ELISA 法检测血清中特异性 IgG、IgA、IgM 抗体:ELISA 法常规操作。待测血清 1:100 稀释加

入包被孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h,同时设立 PUUV 阳性对照、DOBV-HTNV 阳性对照和阴性对照;HRP 标记小鼠抗人 IgG 抗体 1:8000 稀释、小鼠抗人 IgA 抗体 1:10 000 稀释,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h;TMB 底物显色液室温孵育 10 min,最后 10% H_2SO_4 终止,酶标仪 450 nm 测 A 值。IgM 抗体仅用经预试检出率较高的 DOBV-Slo 和 HTNV-Foj 两种抗原检测,且需先用 ABS 试剂(Absorb IgG Reagent)预处理去除血清中的 IgG 抗体。处理步骤:将血清标本与 ABS 试剂以 1:5 体积比混匀,室温放置 15 min;9000 $\times g$ 离心 10 min,沉淀 IgG 抗体,取出上清稀释待用。由于缺少 HRP 标记抗人 IgM 抗体,所以一抗用生物素抗人 IgM 抗体(1:7000 稀释)、二抗用 HRP 标记抗生物素蛋白抗体(1:1000 稀释),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育各 1 h。HRP 标记小鼠抗人 IgG 抗体、小鼠抗人 IgA 抗体、生物素抗人 IgM 抗体、HRP 标记抗生物素蛋白抗体均购自 BD 公司。ABS 试剂购自 PROGEN 公司。

4. 统计学分析:同时符合以下标准判定为阳性结果:

样品的绝对 A 值 ≥ 0.2 ;

$$\frac{\text{样品 A 值} - \text{空白对照 A 值}}{\text{阴性对照 A 值} - \text{空白对照 A 值}} \geq 2.1;$$

样品相对 A 值 = 样品 A 值 - 空白对照 A 值,所有 ELISA 结果定量分析均取相对 A 值。所有数据输入计算机,用 SPSS 11.0 软件对相对 A 值进行均数比较分析(独立样本 t 检验、配对 t 检验或 LSD 法)。

结 果

1. 6 种 HV-rNP 抗原对血清中特异性 IgG、IgA、IgM 抗体定性分析:以 HTNV-rNP 对患者血清中各种抗体检出率为参照,分析 DOBV 及 PUUV 的检出率。

(1)血清标本中 IgG 抗体检测:68 份血清标本中,用 HTNV-rNP 检测到 61 份为阳性结果,总阳性率为 89.7%,其中急性期血清检出率 79.4% (27/34),恢复期血清检出率 100%;PUUV-rNP 检测 33 份标本阳性,阳性率为 48.5%,急性期血清检出率 32.4% (11/34),恢复期血清检出率 64.7% (22/34);DOBV-rNP 检测 57 份标本阳性,阳性率 83.3%,急性期血清检出率 73.5% (25/34),恢复期血清检出率 94.1% (32/34)。各种 HV-rNP 对血清中特异性 IgG 检出率由高至低依次为 HTNV-Foj、DOBV-Slo、

DOBV-Slk、PUUV-Sot、PUUV-Kaz、PUUV-Vra, 但 DOBV-Slk 株对恢复期血清的反应率高于 DOBV-Slo 株(图 1)。

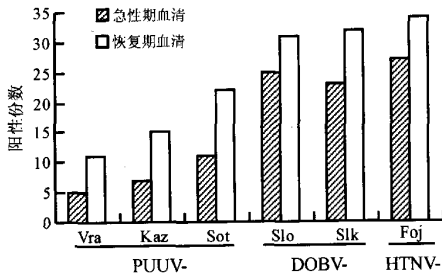


图1 HFRS 患者血清标本中特异性 IgG 抗体检测

(2) 血清标本中 IgA 抗体检测: 68 份标本中, HTNV-rNP 检测到 31 例双份血清为阳性结果, 阳性率 91.2%; PUUV-rNP 检测 59 份标本阳性, 阳性率 86.8%, 其中急性期血清检出率 88.2% (30/34), 恢复期血清检出率 85.3% (29/34); 所有双份血清用 DOBV-Slk 重组抗原检测均为阳性; 而 DOBV-Slo 检测到 65 份标本阳性, 阳性率为 95.6%, 急性期血清检出率 97.1% (33/34), 恢复期血清检出率 94.1% (32/34)。各种 rNP 对 IgA 抗体检出率由高至低依次为 DOBV-Slk、DOBVSlo、HTNV-Foj、PUUV-Kaz、PUUV-Sot、PUUV-Vra(图 2)。

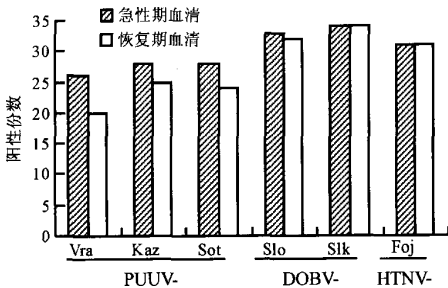


图2 HFRS 患者血清标本中特异性 IgA 抗体检测

(3) 血清标本中特异性 IgM 抗体检测: 选取对血清标本 IgG 与 IgA 抗体检出率均较高的 DOBV-Slo 和 HTNV-Foj 重组核蛋白对 34 份急性期标本中 IgM 抗体进行检测, 结果发现两者检出结果完全一致, 共检出 28 份标本阳性, 阳性率均为 82.4%。

经检测, PUUV-rNP 对湖北地区 HFRS 患者血清检出率均较低, 但发现 3 对急性期/恢复期标本对 3 种 PUUV-rNP 均有很强反应性。

2. 血清中特异性 IgG、IgA、IgM 抗体水平及变

化分析: 鉴于湖北地区是以 HTNV 流行为主的 HFRS 混合疫区, 且血清标本均收集自有明显症状的患者, 因此定量分析 HTNV-rNP 对血清中特异性 IgG、IgA、IgM 检测结果, 以了解各种抗体水平及变化。

经统计学分析, 34 份 HTN 型急性期血清中, 特异性 IgM 与 IgA 抗体水平较高且差异无统计学意义 ($F = 6.548, P = 0.742$), IgG 抗体水平较低 ($F = 6.548, P = 0.001$); 恢复期血清中 IgA 抗体水平显著高于 IgG 抗体水平 ($t = 4.165, P = 0.000$); 进一步分析急性期和恢复期各种抗体水平的变化, 发现恢复期血清中 IgA、IgG 抗体水平均高于急性期 ($t = 2.452, P = 0.020; t = 4.660, P = 0.000$), 见图 3、4。

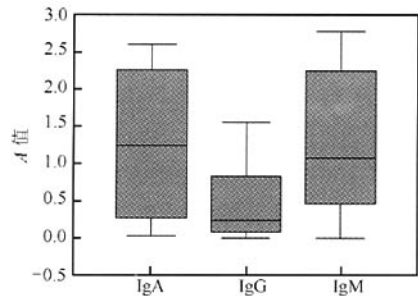


图3 湖北地区 HFRS 患者急性期血清中 IgA、IgG 和 IgM 抗体水平比较

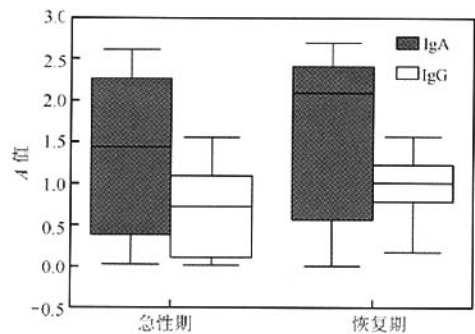


图4 湖北地区 HTN 型急性期患者血清中 IgA 和 IgG 抗体水平的动态变化

讨 论

为了解湖北地区 HFRS 患者血清与欧洲地区汉坦病毒流行株之间的血清学关系, 并减少 ELISA 反应非特异性, 本研究选用 5 种欧洲地区流行株制备重组核抗原, 同时对血清标本中各种特异性抗体进行平行检测。结果发现, DOBV-rNP 对各种抗体

的检出率均较高。DOBV 是东欧和南欧地区流行并导致严重症状 HFRS 的 HV 血清型。该研究选用的 DOBV-Slo 株和 DOBV-Slk 株在核蛋白上的抗原表位仅比 HTNV-Foj 株少一个位于 1~45 位氨基酸的 B5D9 表位,从理论上分析 DOBV 对 HTNV 的交叉反应性可达到 100%,甚至比 HTN 型抗原更为敏感。湖北地区是以 HTNV 流行为主的 HFRS 混合疫区,因此 DOBV-rNP 对湖北地区 HFRS 患者血清存在高反应性是可以理解的。鉴于我国存在 DOBV 已有推测,提示在对 HTNV 流行区域进行 HFRS 检测时,应考虑用 DOBV 抗原代替传统使用的 HTNV 抗原以防止漏检;另一方面,也不能排除湖北地区已有 DOBV 流行的可能性。虽然本研究中没有发现仅与 PUUV 抗原反应阳性的标本,但有 3 对急性期/恢复期标本对 3 种 PUUV-rNP 均有很强的反应性,这与以前报道相矛盾。以往研究证明,PUUV 感染患者血清与辛诺柏病毒(Sin Nombre virus, SNV)有很强交叉性,但对 HTNV、SEOV 抗原仅有很弱交叉性^[6]。因此应该从两个方面来分析,一是湖北地区可能已有 PUUV 的存在,另一方面,也有可能是本地原有株型发生了抗原性变异。笔者在 1985-2000 年间收集湖北地区 229 份 HFRS 患者血清,通过 RT-PCR/RFLP 法分析发现该地区 HV 存在一定的基因变异性,但这种基因变异能否导致抗原性变异还有待进一步证实^[7]。HV 与宿主动物之间的共进化关系是其进化的基础,一种病毒是否在某一地区存在主要由宿主动物的种类决定,要证明一种新病毒的出现必须在流行区域内检测到相应的动物宿主。因此,要证明湖北地区是否已出现 PUUV 或 DOBV 的流行还需进一步深入研究。

对湖北地区 HFRS 患者血清中各种特异性抗体水平进行分析,发现疾病早期 IgM 抗体水平较高,IgG 抗体水平恢复期明显升高,这些与以往报道结果一致^[8-10]。与以往报道不同之处,主要表现在 IgA 抗体水平上。该研究中发现急性期血清中 IgA 抗体水平与 IgM 抗体水平差异无统计学意义,且患者血清中 IgA 抗体的水平无论在疾病早期还是晚期均明显高于 IgG 抗体水平。这提示 IgA 抗体不仅产生早,且持续时间长。HV 主要通过气溶胶传播和接触传播,而 IgA 抗体在黏膜免疫的形成中起重要作用,因此 IgA 抗体水平与疾病的发展及预后关系密切。目前 IgA 抗体在 HFRS 发病中的地位

尚未确定,但大多数研究推测可能是一种保护性抗体。患者血清中 IgA 抗体可能是在病毒经呼吸道或消化道感染时刺激呼吸道上皮细胞及肠道淋巴细胞产生,另一方面,IgA 抗体与抗原结合力较强也可能是血清中 HFRS-IgA 水平较高的原因^[11]。但为何在湖北地区 HFRS 患者血清中检测到如此高水平 IgA,其机理尚不清楚,考虑可能与地方流行株型的致病性及免疫性有关。目前,检测血清中 IgM 抗体仍然是对 HFRS 进行早期诊断的主要方法,但 IgM 的检测往往受到很多因素影响,因此如果在检测 IgM 抗体的同时检测 IgA 抗体,对于提高疾病早期检出率具有重要意义。

(感谢德国 Friedrich-Loeffler 研究所 Dr. Ulrich 及立陶宛维尔纽斯生物技术研究所 Dr. Sasnauskas 对本研究给予的支持与帮助)

参 考 文 献

- [1] Song G. Epidemiological progresses of hemorrhagic fever with renal syndrome in China. *Chin Med J*, 1999, 112: 472-477.
- [2] 刘刚,李川,扈光伟,等. 在中国发现普马拉型汉坦病毒. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2003, 17(1): 55-57.
- [3] 刘京梅,李泉根,李新军. 以汉坦病毒重组核衣壳蛋白为抗原进行 ELISA 血清分型的研究. *细胞与分子免疫学杂志*, 2001, 13(3): 269-299.
- [4] Dargeviciute A, Sjölander KB, Sasnauskas K, et al. Yeast-expressed Puumal hantavirus nucleocapsid protein induces protection in a bank vole model. *Vaccine*, 2002, 20: 3523-3531.
- [5] Razanskiene A, Schmidt J, Geldmacher A, et al. High yields of stable and highly pure nucleocapsid proteins of different hantaviruses can be generated in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotech*, 2004, 111: 319-333.
- [6] Elgh F, Lundkvist A, Alexeyev OA, et al. Serological diagnosis of hantavirus infections by an enzyme-linked immunosorbent assay based on the detection of immunoglobulin G and M responses to recombinant nucleocapsid proteins of five viral serotypes. *J Clin Microbiol*, 1996, 35: 1122-1130.
- [7] Li Q, Yang ZQ, Qu H, et al. Variability of G1 gene of hantaviruses occurring in the Hubei province, P. R. China from 1985 to 2000. *Acta Virol*, 2005, 49(1): 51-57.
- [8] Elgh F, Linderholm M, Wadell G, et al. The clinical usefulness of a Puumalavirus recombinant nucleocapsid protein based enzyme-linked immunosorbent assay in the diagnosis of nephropathia epidemica as compared with an immunofluorescence assay. *Clin Diag Virol*, 1996, 6: 17-26.
- [9] Groen J, Gerding MN, Jordans JGM, et al. Class and subclass distribution of hantavirus-specific serum antibodies at different times after onset of nephropathia epidemica. *J Med Virol*, 1994, 43: 39-43.
- [10] 孟祥芝,陈宇萍,李川,等. 用重组汉坦病毒 NP、GP 检测急性期 HFRS 患者血清中特异性 IgG、IgM、IgA 抗体. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2003, 17(3): 254-257.
- [11] 张秀华,叶力,杨储海,等. 不同病型、病期 HFRS 患者特异性抗体水平测定及其临床意义. *山东医药*, 1996, 36(8): 3-4.

(收稿日期: 2007-12-27)

(本文编辑: 张林东)