

山东省烟台市人与动物新型布尼亚病毒感染调查及同源性分析

宫连凤 姜梅 刘娟 韩文清 刘靖宇 孙振璐 王志昱 高巧
邢玉芳 丁淑军 王显军

【摘要】 目的 了解山东省烟台市人和动物发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒(SFTSV)感染及流行情况。**方法** 2011年4—11月分别在烟台市的蓬莱和莱州2个SFTSV病例高发地区连续采集与人密切接触的5种家养动物(羊、牛、猪、犬、鸡)血清标本3 576份,应用双抗原夹心ELISA方法和Real time RT-PCR方法检测血清中SFTSV总抗体和病毒核酸;观察不同月份感染情况;采集两地人群血清2 590份,应用间接ELISA方法检测SFTSV IgG抗体;用Vero细胞从核酸阳性的人和动物血清中分离病毒,通过RT-PCR方法对SFTSV S片段进行序列扩增、同源性分析。**结果** 3 576份动物血清标本中SFTSV血清总抗体阳性1 439份,阳性率为40.24%,病毒核酸阳性163份,阳性率为4.56%。其中羊、牛、鸡、犬、猪抗体阳性率分别为62.78%、52.97%、45.56%、28.73%和1.45%,核酸阳性率分别为5.72%、4.63%、3.02%、5.25%和3.73%。动物体内的抗原抗体随季节消长而变化。2 590份人群血清SFTSV IgG抗体阳性率为5.41%。对10株来自人的毒株和3株来自动物的毒株进行S片段基因序列扩增分析,显示其同源性在95.23%~100.00%,与国内其他省市分离毒株比较,其同源性在94.72%~99.13%,高度同源。**结论** 烟台地区存在SFTSV流行,人与家养动物普遍易感,其基因序列高度同源,提示家养动物可能作为SFTSV的增殖宿主和扩散宿主,应引起高度重视。

【关键词】 发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒; 动物; 人群; 感染; 同源性

Prevalence and homology analysis on human and animals severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infection in Yantai of Shandong province Gong Lianfeng¹, Jiang Mei¹, Liu Juan¹, Han Wenqing¹, Liu Jingyu¹, Sun Zhenlu¹, Wang Zhiyu¹, Gao Qiao¹, Xing Yufang¹, Ding Shujun², Wang Xianjun². 1 Yantai Center for Disease Control and Prevention, Yantai 264003, China; 2 Institute for Viral Infectious Disease Control and Prevention, Shandong Center for Disease Control and Prevention
Corresponding authors: Jiang Mei, Email: ytjiangmei@163.com; Han Wenqing, Email: ythwq405@aliyun.com

【Abstract】 Objective To learn the prevalence of infection of human and animals severe fever with thrombocytopenia syndrome bunyavirus (SFTSV) in Yantai, Shandong province, and to analyze the pathogenic features of SFTSV as well as its relationship between human and animal hosts. **Methods** From April to November in 2011, 3 576 serum samples were collected from domesticated animals, including sheep, cattle, pigs, dogs, chickens, in Laizhou and Penglai areas where fever with thrombocytopenia syndrome frequently occurred among local residents. Total SFTSV antibodies and virus-specific nucleic acids of the serum were tested by ELISA and Real time RT-PCR, respectively. SFTSV infection on each animal was observed in different months. 2 590 human serum samples were also collected in Laizhou and Penglai areas, with IgG antibodies tested by ELISA. Virus was isolated with Vero cells from the serum which SFTSV viral nucleic acids were positive. S fragments were amplified by RT-PCR and sequenced, with homology analysis conducted on these sequences. **Results** The overall positive rate of serum samples from animals on the total SFTSV antibodies was 40.24% (1 439/3 576) while the positive rate for specific nucleic acids was 4.56% (163/3 576). The positive rates for SFTSV antibodies were 62.78%, 52.97%, 45.56%, 28.73%, 1.45% and the positive rates for specific nucleic acids were 5.72%, 4.63%, 3.02%, 5.25% and 3.73%, in sheep, cattle, chickens, dogs, pigs, respectively. The antigens/antibodies for SFTSV in animals changed seasonally. The overall

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.05.012

作者单位: 264003 烟台市疾病预防控制中心(宫连凤、姜梅、刘娟、韩文清、刘靖宇、孙振璐、王志昱、高巧、邢玉芳); 山东省疾病预防控制中心病毒性传染病防制所(丁淑军、王显军)

通信作者: 姜梅, Email: ytjiangmei@163.com; 韩文清, Email: ythwq405@aliyun.com

positive rate for SFTSV IgG antibody from 2 590 human samples was 5.41%. Thirteen virus strains were isolated from these serum samples (10 strains from human and 3 strains from animals). The nucleotide homology of 13S fragments' sequences ranged from 95.23% to 100.00% and the nucleotide homology with the isolates from other provinces were between 94.72% and 99.13%. The homology was considered to be high. **Conclusion** High prevalence of SFTSV infections occurred both in human and domestic animals in Yantai city. The nucleotide sequences of SFTSV were highly homologous among human and domestic animals. The findings suggested that domesticated animals might serve as SFTSV proliferation and the hosts for transmission thus should be attached great importance.

【Key words】 Severe fever with thrombocytopenia syndrome bunyavirus; Animal; Human; Infection; Homology

为了解山东省烟台地区人与动物发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒(SFTSV)的感染及流行情况,本研究采集正常人与动物血清标本,应用血清学、分子生物学方法进行的研究。

材料与方法

1. 标本采集:选择山东省烟台市 SFTSV 感染病例高发的蓬莱和莱州 2 个县级市,并各选 2 个乡镇作为调查点,于 2011 年 4—11 月选择有病例发生的村庄或邻村,连续采集与人群密切接触的家养动物羊、牛、犬、猪、鸡 5 种动物血清标本,每月每种动物采集标本 50 份左右。其中羊、牛、犬、鸡全部为散养,猪标本在当地屠宰点进行采集。共采集标本 3 576 份。每种动物采集血标本 5 ml,及时分离血清,置 -70 °C 冻存备检。同时在 2 个市共 30 个村庄,以年龄组 (0~、10~、20~、30~、40~、50~、60~、70~) 为基础,采集 2 590 人份血清,每人采集非抗凝血 5 ml,及时分离血清,置 -70 °C 冻存,由烟台市疾病预防控制中心(CDC)统一送中国 CDC 病毒病预防控制所(病毒病所)检测。并采集烟台市各医院上报的 SFTS 疑似病例血清, -70 °C 冻存。

2. 研究方法:

(1) 血清抗体检测:采用双抗原夹心 ELISA 方法检测 5 种动物血清中 SFTSV 血清总抗体,临界值 = 0.1 + 阴性对照平均 A 值。采用间接 ELISA 方法检测人血清中新型布尼亚病毒 IgG 抗体,临界值 = 2.1 × 阴性对照平均 A 值。试剂由病毒病所提供。

(2) 病毒核酸检测:采用双重探针引物实时荧光定量 RT-PCR 检测 5 种动物和急性期患者血清中 SFTSV 核酸,方法和引物、探针由病毒病所提供,具体方法参照文献[1]。使用德国 Qiagen 公司 RNeasy Mini Rit (Cat 74104) 提取核酸;应用美国 ABI 公司的 Ambio AgPath-IDTM One-step RT-PCR Kit (Cat: AM1005) 进行实时荧光定量 PCR,均按试剂盒说明书进行操作。结果判定 Ct 值 > 35.0 判为阴性。

(3) 病毒分离与鉴定:取 SFTSV 核酸阳性血

清标本 100 μl,用 1 ml 含 2% PS 的 DMEM 液稀释 10 倍,接种到 Vero 细胞上,36 °C 吸附 2 h,加维持液 7 ml,置 36 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 2 周,逐日观察细胞病变情况。连续传代 2~3 代,用实时荧光定量 PCR 方法对分离的病毒株进行鉴定。动物病毒株由病毒病所分离;人的病毒株由烟台市 CDC 分离。

(4) 序列扩增及系统进化树分析:选取 SFTSV S 片段的高度保守区设计引物(病毒病所),通过巢式 PCR 方法对人和动物分离毒株进行扩增。PCR 阳性产物测序后利用 DNASTar 软件将各片段的序列进行拼接;使用 Mega 4.0 软件进行比对,并构建系统进化树。

3. 统计学分析:采用 Excel 软件进行数据录入、整理,采用 SPSS 18.0 软件对数据进行统计分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 家养动物 SFTSV 血清总抗体及病毒核酸检测:5 种家养动物血清中均检出 SFTSV 血清总抗体,其中羊的抗体阳性率最高,其次为牛,猪的最低。经统计学检验,5 种动物之间抗体阳性率差异有统计学意义 ($\chi^2 = 816.44, P = 0.000$)。两两比较显示,牛、鸡之间的抗体阳性率差异无统计学意义 ($\chi^2 = 7.14, P > 0.005$),其余动物之间抗体阳性率差异有统计学意义 (均 $P < 0.000 1$),见表 1。5 种家养动物中均检出 SFTSV 核酸,其中羊核酸阳性率最高为 5.72%,鸡阳性率最低为 3.02%。5 种动物之间病毒核酸阳性率差异无统计学意义 ($\chi^2 = 7.73, P > 0.05$)。两两比较显示,核酸阳性率差异无统计学意义 (均 $P > 0.005$)。

表 1 2011 年烟台地区 5 种动物血清中 SFTSV 抗体和核酸检测

动物种类	检测数量	抗体		核酸	
		阳性数	阳性率(%)	阳性数	阳性率(%)
羊	1 013	636	62.78	58	5.72
牛	842	446	52.97	39	4.63
鸡	529	241	45.56	16	3.02
犬	362	104	28.73	19	5.25
猪	830	12	1.45	31	3.73
合计	3 576	1 439	40.24	163	4.56

不同月份中动物抗体检出率、核酸检出率差异有统计学意义($\chi^2=73.17, P<0.01; \chi^2=152.31, P<0.01$), 见表2。抗体高峰出现在11月, 其中羊、牛的抗体阳性率在11月最高, 分别为86.44%(204/236)和72.96%(116/159), 鸡的抗体阳性率在9月最高, 为64.71%(55/85), 犬在受检的几个月中阳性检出率变化较小, 猪的阳性检出率仅在7月出现1个低的峰值, 为7.22%(7/97), 8—11月未检出。5种动物核酸检出高峰在8月。羊的检出率相对较高, 为5.72%, 犬次之, 为5.25%。

表2 2011年4—11月烟台地区5种动物SFTSV抗体和核酸检测

月份	检测数量	抗体		核酸	
		阳性数	阳性率(%)	阳性数	阳性率(%)
4	394	151	38.32	9	2.28
5	368	123	33.42	32	8.70
6	345	133	38.55	13	3.77
7	488	120	24.59	9	1.84
8	379	116	30.60	39	10.29
9	484	231	47.72	33	6.82
10	403	168	41.69	9	2.23
11	715	396	55.38	19	2.66
合计	3 576	1 439	40.24	163	4.56

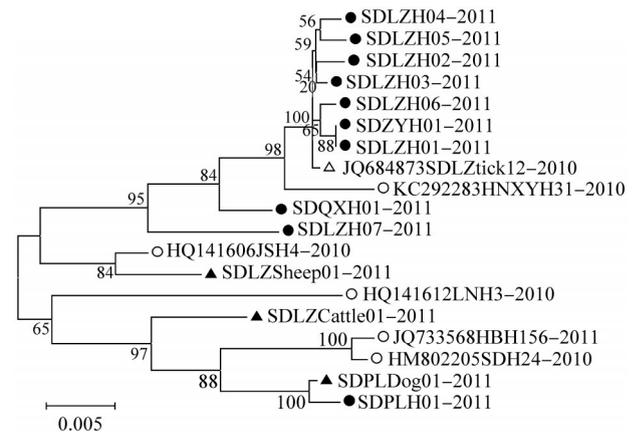
2. 人群SFTSV抗体检测: 共收集蓬莱和莱州两地正常人群血清2 590份, 140份血清IgG抗体阳性, 阳性率为5.41%, 其中男性为5.07%, 女性为5.67%, 性别间差异有统计学意义($\chi^2=4.38, P<0.05$); 各年龄组均可感染SFTSV, 经统计学检验, 组间差异无统计学意义($\chi^2=12.94, P>0.05$), 见表3。学生与农民抗体阳性率分别为3.15%(18/571)和6.04%(122/2 019), 差异有统计学意义($\chi^2=7.27, P<0.01$)。

表3 烟台市正常人群SFTSV IgG抗体检测

年龄组(岁)	男性			女性			合计		
	调查人数	阳性人数	阳性率(%)	调查人数	阳性人数	阳性率(%)	调查人数	阳性人数	阳性率(%)
0~	159	1	0.63	123	6	4.88	282	7	2.48
10~	160	6	3.75	142	5	3.52	302	11	3.64
20~	97	11	11.34	132	4	3.03	229	15	6.55
30~	120	4	3.33	146	13	8.90	266	17	6.39
40~	168	12	7.14	280	14	5.00	448	26	5.80
50~	171	7	4.09	262	13	4.96	433	20	4.62
60~	140	11	7.86	225	18	8.00	365	29	7.95
70~	130	6	4.62	135	9	6.67	265	15	5.66
合计	1 145	58	5.07	1 445	82	5.67	2 590	140	5.41

3. 病毒分离及同源性分析: 用Vero细胞对24份SFTSV核酸阳性患者血清标本进行病毒分离, 共分离SFTSV阳性毒株16株, 分别是莱州11株, 蓬莱3株, 招远和栖霞各1株。从动物核酸阳性标本中分离毒株3株, 分别为羊、牛、犬各1株。

对本研究分离的3株动物分离株(SDPLDog01-2011、SDPLSheep01-2011、SDLZCattle-2011)和10株人分离株(SDLZH01-2011、SDLZH02-2011、SDLZH03-2011、SDLZH04-2011、SDLZH05-2011、SDLZH06-2011、SDLZH07-2011、SDPLH01-2011、SDZYH01-2011、SDQXH01-2011)S片段进行扩增, 拼接后得到全系列。从GenBank中检索到国内其他省份毒株的S片段序列, 构建系统进化树。结果显示, 人和动物13株毒株与山东、河南等省份的毒株同源性为94.72%~99.13%, 与SDLZtick12-2010同源性为95.35%~99.83%; 分离自人的10株毒株和分离自羊、牛、犬的3株毒株同源性为95.23%~99.71%, 分离自人的10株毒株同源性为95.35%~100.00%之间, 3株动物之间同源性在97.12%~98.02%, 显示人与动物之间、人与人之间、动物之间高度同源, 见图1。



注: ●为本研究患者分离株; ○为其他省市患者分离株; ▲为本研究动物分离株; △为tick毒株

图1 人源和动物源SFTSV S片段基因序列系统进化树

讨论

本研究对烟台发病地区的人和动物血清SFTSV抗体进行检测, 结果显示人和动物血清中均检测出抗体阳性; 对SFTS患者血清和核酸阳性动物血清分离病毒做S片段基因序列分析, 其基因同源性>95%, 与山东、河南等省从人和蝇中分离毒株同源性在94.72%以上, 为高度同源。提示SFTSV不仅可感染羊、牛、犬等脊椎动物, 还可经“蜚”传播, 引起人类严重疾病^[2-4]。也表明该病毒在家养动物中可广泛流行, 提示家养动物具有作为SFTSV增殖宿主和扩散宿主的可能, 人类可通过接触动物的血液和体液或通过蜚等媒介引起感染。本研究共调查5种家养动物血清标本3 576份, 结果显示, 5种家养动物血清中均检出SFTSV抗体阳性和核酸阳性, 其抗

体阳性率为 40.24%，核酸阳性率为 4.56%，表明动物中存在 SFTSV 的感染流行。其中羊、牛的抗体阳性率高达 62.78%、52.97%，鸡、犬分别为 45.56% 和 28.73%，猪最低为 1.45%，这与江苏等地的调查存在一定差异^[4]，可能与样本选择和当地流行强度有关。5 种动物核酸阳性率在 3.02%~5.72% 之间，说明动物中存在潜在的病毒血症。经统计学检验，不同动物核酸阳性率差异无统计学意义，可能是因为病毒感染动物体内，引起的病毒血症持续时间较短。不同动物抗体阳性率差异有统计学意义，可能与饲养方式有关。羊、牛多为野外放养，调查发现身上严重感染了蜱，鸡、犬为村内放养，接触蜱等媒介机会少一些，猪为圈养且时间短，感染机会较少。不同的饲养方式，使动物暴露于该病毒的概率不同。此外，抗体高低还可能与动物种群及其抗体在每种动物体内持续时间有关。

通过每月对动物血清的检测，发现 5 种动物体内的抗原抗体随季节消长有一定变化，这与蜱春秋活动高峰基本一致，与 SFTS 人群发病的季节分布特点也相吻合。蓬莱和莱州两地普遍存在 SFTSV 稳定流行，常年生活在该地区的动物有可能反复或持续感染 SFTSV，持续产生抗体，到 9—11 月逐渐累积使抗体达到高峰。但每种动物感染的病毒血症持续时间、抗体持续时间、持续感染的可能性仍需要做进一步研究。

目前 SFTS 的流行情况主要来源于临床报告，为了解发病地区 SFTSV 在人群中的流行情况，本研究在烟台市蓬莱、莱州两地有病例的地区开展 SFTSV 的自然感染情况调查。结果显示，正常人群中 SFTSV 抗体阳性率为 5.41%，远大于山东省沂源 0.8%^[5]和江苏省的 0.94%^[4]，高于湖北省的 3.80%^[6]，这可能与 SFTSV 在当地的流行强度和研究方法不同有关。本地区人群中 SFTSV 存在隐性感染，且感染率远高于发病率，提示大多数 SFTSV 感染以亚临床感染和隐性感染形式存在。调查显示，不同性别间抗体阳性率有差异，女性高于男性，这与当地男女性同样外出劳动不相符，与当地男性发病高于女性也不一致^[7]，原因有待进一步研究；农民与学生抗体阳性率差异有统计学意义，可能与农民比学生更多暴露于蜱叮咬的概率有关；各年龄组均存在 SFTSV 隐性感染，抗体阳性率之间没有差异，与其他虫媒病毒的流行病学特点一致^[8]。

序列分析显示，本地区分离自人和动物的 13 株毒株与前期山东、河南等省分离的人源毒株和蜱源

毒株同源性很高，本研究分离自人的 10 个毒株来自 4 个县(市)，分离自动物的 3 个毒株来自 2 个县(市)3 种动物，同源性均>95%，高度同源。说明人和动物之间、人与人之间、动物之间，感染的 SFTSV 没有地域和种类差异。这与 Yu 等^[2]、李德新^[3]的报道基本一致。目前认为 SFTS 是“蜱传”动物源性疾病，蜱为该病的传播媒介^[1-10]，在家养动物中已检出 SFTSV 抗原和抗体，可确定为宿主动物^[2,4,7]。但目前由于缺乏动物直接感染人的证据，还不能确定人接触家畜(禽)是否可直接传染，但其在疾病传播中的作用不可忽视。今后应该加强疫区动物的疫情监测，扩大动物种类特别是野生动物的流行情况监测，采取有力措施控制该病的流行。

(感谢中国 CDC 病毒病所的指导和支持以及蓬莱市和莱州市 CDC 的协助)

参 考 文 献

- [1] Gong LF, Jiang M, Han WQ, et al. The investigation about four animals infected with severe fever with thrombocytopenia syndrome in Jiaodong areas Shandong province in 2011[J]. Chin J Prev Med, 2013, 47(7):85-86. (in Chinese) 宫连凤, 姜梅, 韩文清, 等. 2011 年山东省胶东地区四种动物感染新型布尼亚病毒情况的调查[J]. 中华预防医学杂志, 2013, 47(7):85-86.
- [2] Yu XJ, Liang MF, Zhang SY, et al. Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China[J]. N Engl J Med, 2011, 364(16):1523-1532.
- [3] Li DX. The summary of severe fever with thrombocytopenia syndrome bunyavirus[J]. Chin J Exp Clin Vir, 2011, 25(2):81-84. (in Chinese) 李德新. 发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒概述[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2011, 25(2):81-84.
- [4] Zhang WS, Zeng XY, Zhou MH, et al. Seroepidemiology of severe fever with thrombocytopenia syndrome bunyavirus in Jiangsu province[J]. Dis Surveil, 2011, 26(9):676-678. (in Chinese) 张文帅, 曾晓燕, 周明浩, 等. 江苏省发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒血清流行病学调查[J]. 疾病监测, 2011, 26(9):676-678.
- [5] Zhao L, Zhai S, Wen H, et al. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus, Shandong province, China[J]. Emerg Infect Dis, 2012, 18(6):963-965.
- [6] Liu L, Guan XH, Xing XS, et al. Epidemiologic analysis on severe fever with thrombocytopenia syndrome in Hubei province, 2010[J]. Chin J Epidemiol, 2012, 33(2):168-172. (in Chinese) 刘力, 官旭华, 邢学森, 等. 2010 年湖北省发热伴血小板减少综合征的流行病学分析[J]. 中华流行病学杂志, 2012, 33(2):168-172.
- [7] Gong LF, Liu J, Han WQ, et al. Analysis on suspected cases of thrombocytopenia accompanied by fever in Yantai, Shandong[J]. Dis Surveil, 2013, 28(1):17-19. (in Chinese) 宫连凤, 刘娟, 韩文清, 等. 山东省烟台地区发热伴血小板减少综合征疑似病例检测分析[J]. 疾病监测, 2013, 28(1):17-19.
- [8] Seidahmed OM, Siam HA, Soghaier MA, et al. Dengue vector control and surveillance during a major outbreak in a coastal Red Sea area in Sudan[J]. East Mediterr Health J, 2012, 18(12):1217-1224.
- [9] Ministry of Health of People's Republic of China. National Guideline for Prevention and Control of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome[M]. Beijing: Ministry of Health of People's Republic of China, 2010. (in Chinese) 中华人民共和国卫生部. 发热伴血小板减少综合征防治指南(2010 版)[M]. 北京: 中华人民共和国卫生部, 2010.
- [10] Liu Y, Huang XY, Du YH, et al. Survey on ticks and detection of new bunyavirus in some vech in the endemic areas of fever, thrombocytopenia and leukopenia syndrome (FTLS) in Henan province[J]. Chin J Prev Med, 2012, 46(6):500-504. (in Chinese) 刘洋, 黄学勇, 杜燕华, 等. 河南发热伴血小板减少综合征流行区蜱类分布及媒介携带新布尼亚病毒状况调查[J]. 中华预防医学杂志, 2012, 46(6):500-504.

(收稿日期:2013-11-27)

(本文编辑:万玉立)