

文章编号: 1000-5471(2008)03-0109-04

巴彦淖尔地区汉坦病毒的分子流行病学调查^①

杨鹏飞^{1,2}, 马超^{1,2}, 高娜^{1,2}, 张永振², 祝建波¹

1. 新疆石河子大学 生命科学学院, 新疆 石河子 832003; 2. 中国疾病预防控制中心 传染病预防控制所, 北京 102206

摘要: 目的: 对巴彦淖尔地区进行汉坦病毒的分子流行病学调查. 方法: 采用间接免疫荧光法 (IFA) 对在野外捕获的鼠肺样品进行初筛, 用逆转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 扩增 IFA 阳性标本中汉坦病毒的 S 基因片段, 以 S 基因片段 (620-999 nt) 的核苷酸序列构建系统发生树并进行分子进化分析. 结果: 捕获的 200 只中有褐家鼠 141 只 (70.5%), 黑线仓鼠 40 只 (20.0%), 小家鼠 19 只 (9.5%); IFA 检出 6 份阳性标本, 均来自褐家鼠, 其 S 基因均为 S1 亚型. 结论: 巴彦淖尔地区褐家鼠携带 S1 亚型汉坦病毒.

关键词: 汉坦病毒; RT-PCR; 系统发生分析; 基因分型

中图分类号: Q939.4

文献标识码: A

汉坦病毒 (Hantavirus, HV) 属布尼亚病毒科 (Bunyaviridae) 汉坦病毒属, 目前有 20 多个基因型, 我国存在汉滩型、汉城型、大别山型以及普马拉型 4 个型. 啮齿目及食虫目动物是汉坦病毒的天然宿主, 人感染后发生肾综合症出血热 (HFRS)^[1,2]. 一个基因型的汉坦病毒仅存在于一种或少数几种密切相关的自然宿主体内, 比如黑线姬鼠携带汉滩型, 褐家鼠携带汉城型, 病毒与自然宿主形成共进化模式^[3]. 由于汉坦病毒与自然宿主间的这种对应关系, 自然宿主的种群类型、种群密度及其感染情况决定了疫区的性质和流行强度. 巴彦淖尔地区是我国 HFRS 的疫区之一^[4], 近年来疫情呈上升趋势, 为了解该地区中汉坦病毒的分子流行特征及其进化关系, 笔者进行了分子流行病学调查, 现将结果报告如下:

1 材料与方法

1.1 标本采集

2005 年在内蒙古自治区巴彦淖尔地区用鼠夹进行野外捕鼠, 对捕获的鼠类标本经分类鉴定后, 无菌解剖取其肺脏, 放置于液氮中保存待检.

1.2 病毒抗原检测

将鼠肺样品冰冻后切成 3 μm 厚薄片, 贴附在 10 孔载玻片上, 紫外照射 15 min, 冷丙酮固定 25 min, 室温自然干燥. 在抗原片的每孔中加入 15 μL 兔抗汉坦病毒抗体 (由本实验室制备, 工作效价为 1:50), 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min 后用 PBS 洗 3 次, 蒸馏水洗 3 次, 迅速吹干, 逐孔加入羊抗兔免疫荧光抗体 (购自 Sigma 公司, 工作效价为 1:1000), 置 37 $^{\circ}\text{C}$, 30 min 后, 按上述方法洗涤, 干燥后用荧光显微镜镜检.

1.3 RT-PCR

经免疫荧光检测汉坦病毒抗原阳性的标本用于扩增 S 基因. 参照 Invitrogen 公司的 Trizol RNA 试剂使用说明书提取总 RNA.

P14 引物用于反转录汉坦病毒基因的 cDNA. S 基因片段的扩增采用套式-PCR 方法, HS-Pr2 为外引物, 内引物 SEO-SN1 和 SEO-SN2, 引物序列见表 1, 由北京奥科生物技术有限公司合成.

逆转录反应条件为 42 $^{\circ}\text{C}$ 90 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min. 套式-PCR 的两轮反应条件相同: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 52 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 共 30 个循环, 最后于 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 取 5 μL 第一轮反应产物为模板进行第二轮反应, 反应总体积均为 50 μL .

① 收稿日期: 2008-01-26

作者简介: 杨鹏飞 (1983-), 男, 山西阳泉人, 硕士, 主要从事分子病毒学研究.

表 1 RT-PCR 研究中所用引物

引物名	序列(5'-3')	位 置	文 献 ^[5]
P ₁₄	TAGTAGTAGAC	1-11	5
HS-Pr ₂	TTCTGCAGTAGTAGTAKRCTCCCTAAARAG	1-22, 1696-1675	本实验
SEO-SN ₁	TGCCAAACGCCCAATCCA	584-601	5
SEO-SN ₂	GCCATCCCTCCGACAAACAA	1000-1019	5

1.4 序列测定

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后用 DV805A (TaKaRa 公司) 回收纯化, 纯化后 PCR 产物由北京奥科生物技术有限公司测序, 测序引物为 SEO-SN₁。

1.5 系统发生分析

用 DNASTA 软件包及 Clustal X(1.8) 进行基因序列排序及同源性分析, 用 PHYLIP 软件包进行系统发生分析, 以最大似然法(maximum likelihood method, ML) 构建系统发生树, 分析采用 1 000 个多序列组。用于比较分析的汉坦病毒序列来自于 GenBank(表 2)。

表 2 毒株来源及 S 基因登录号

毒 株	基因型	宿 主	来 源	登录号
L99	SEOV	罗赛鼠	中国江西	AF488708
R22	SEOV	褐家鼠	中国河南	AF488707
Z37	SEOV	褐家鼠	中国浙江	AF187082
ZT10	SEOV	褐家鼠	中国浙江	AY766368
80-39	SEOV	褐家鼠	韩国	AY273791
K24-v2	SEOV	褐家鼠	中国浙江	AF288655
Hb8610	SEOV	—	中国山西	AF288643
BjHD01	SEOV	—	中国北京	AY627049
zy27	SEOV	—	中国黑龙江	AF406965
pf26	SEOV	—	中国黑龙江	AY006465
IR461	SEOV	实验室	英国	AF324902
QH367	SEOV	—	中国浙江	DQ081717
NYA039	SEOV	褐家鼠	中国湖南	EF210131
Tchoupitoulas	SEOV	褐家鼠	美国	AF329389
SR11	SEOV	褐家鼠	日本	M34881
Gou3	SEOV	黑家鼠	中国浙江	AF288651
76-118	HTNV	黑线姬鼠	韩国	M14626
Dobrava	DOBV	黄喉姬鼠	斯洛文尼亚	L41916

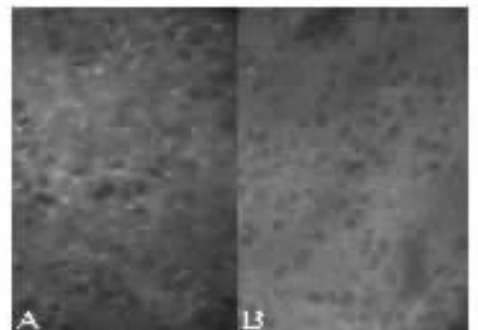
2 结 果

2.1 IFA 检测汉坦病毒抗原

2005 年在内蒙古巴彦淖尔地区共捕获啮齿类动物 200 只, 其中褐家鼠 141 只(70.5%), 黑线仓鼠 40 只(20.0%), 小家鼠 19 只(9.5%)。对 200 份肺组织标本用 IFA 法检测汉坦病毒抗原, 结果显示仅 6 份样品为阳性, 阳性样品均来自褐家鼠, 其它鼠样品检测为阴性。IFA 检测结果见图 1。

2.2 RT-PCR 及序列比对

对 6 份汉坦病毒抗原阳性的标本采用 SEOV 型特异性引物 SEO-SN₁ 和 SEO-SN₂ 扩增 S 基因片段, 结果 6 份样品的 RT-PCR 扩增产物经电泳检测显示分子量约 400 bp, 与设计产物分子量大小相符。将测定的核苷酸序列编号为 NeiMongRn45、NeiMongRn86、NeiMongRn56、NeiMongRn55、NeiMongRn116 和 NeiMongRn987。经 DNASTA 软件包分析, 这 6 条序列的同源性为 98.9%~99%。它们与 R22 株、L99、K24-v2 的同源性为 98.9%~99.2%, 而与 ZT10、Z37、SR11 和 IR461 的同源性为 94.9%~96.2%, 与浙江分离 Gou3 株、湖南分离株 NYA039 的同源性最低, 分别为 85.7% 和 88.9%。



A: 阳性鼠肺; B: 阴性对照

图 1 IFA 法检测褐

家鼠鼠肺中汉坦病毒抗原

2.3 系统进化分析

用 S 基因片段(620 - 999 nt)核苷酸序列构建的系统发生树(图 2). 可见从巴彦淖尔褐家鼠样品中扩增的 S 基因片段核苷酸序列与 R22 株、L99 株及 K24-v2 株处于同一分支, 属于 SEOV S1 亚型, 与从浙江褐家鼠中分离的 ZT10 及 Z37 株、美国褐家鼠中分离的 Tchoupitoulas 株、日本褐家鼠中分离的 SR11 株 和英国 IR461 亲缘关系较远, 与从浙江黑家鼠中分离的 Gou3 株、湖南褐家鼠中分离的 NYA039 株最远.

6 株病毒间的部分 S 片段与标准株各亚型的基因距离及标准误差表 3. 其中 6 株病毒间基因距离为 0.001~0.021, 与标准株中 S1 的基因距离最近为 0.013~0.023, 与 S2、S3、S4 和 S6 的平均基因距离较远为 0.010~0.337, 与 S5 的平均基因距离为 0.329.

3 讨 论

内蒙古自治区是我国最早报告 HFRS 的地区之一^[6]. 1955 年在呼伦贝尔盟(现改为呼伦贝尔市)牙克石市发生肾综合症出血热(HFRS)流行^[7]. 50 多年来内蒙古 HFRS 流行强度呈东高西低趋势, 近年来疫区范围不断扩大, 已从东部扩展到西部的巴彦淖尔市. 巴彦淖尔市于 1999 年报告第一例 HFRS 病人; 1999-2004 年报告 32 例 HFRS 病人; 2005 年全年报告 95 例病人, 年发病率为 0.546/万^[8]. 尽管期间该区采取了包括灭鼠、接种疫苗、治理环境等防控措施, 但至今疫情仍很严重.

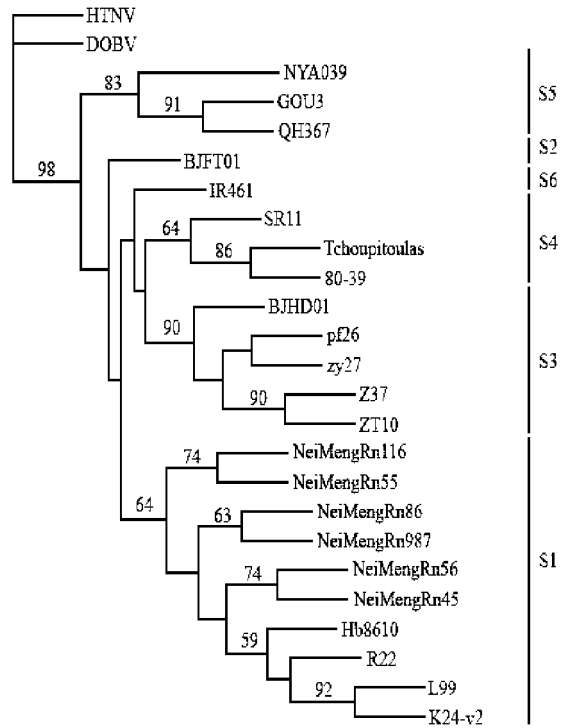


图 2 鼠肺标本部分 S 片段核苷酸序列构建的系统进化树

表 3 鼠肺标本组内毒株与标准株组内基因平均距离及标准误差分析

组 型	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 NeiMengRn86	*	0.010	0.011	0.011	0.001	0.010	0.008	0.046	0.033	0.036	0.080	0.040
2 NeiMengRn56	0.010	*	0.015	0.015	0.010	0.001	0.012	0.047	0.035	0.038	0.083	0.043
3 NeiMengRn116	0.010	0.021	*	0.001	0.011	0.015	0.014	0.049	0.037	0.035	0.082	0.043
4 NeiMengRn55	0.010	0.021	0.001	*	0.011	0.015	0.014	0.049	0.037	0.035	0.082	0.043
5 NeiMengRn987	0.001	0.010	0.010	0.010	*	0.010	0.008	0.046	0.033	0.036	0.080	0.040
6 NeiMengRn45	0.010	0.001	0.021	0.021	0.010	*	0.012	0.047	0.035	0.038	0.083	0.043
7 S1	0.013	0.023	0.023	0.023	0.013	0.023	*	0.046	0.035	0.037	0.080	0.041
8 S2	0.109	0.120	0.123	0.123	0.109	0.120	0.117	*	0.034	0.041	0.072	0.037
9 S3	0.010	0.098	0.104	0.104	0.091	0.098	0.106	0.079	*	0.026	0.076	0.020
10 S4	0.112	0.125	0.108	0.108	0.112	0.125	0.128	0.129	0.086	*	0.074	0.029
11 S5	0.375	0.388	0.384	0.384	0.375	0.388	0.374	0.317	0.346	0.340	*	0.077
12 S6	0.109	0.122	0.122	0.122	0.109	0.122	0.125	0.083	0.047	0.087	0.337	*

为了更好地了解该区汉坦病毒流行的类型, 笔者应用 RT-PCR 和序列分析等方法对 HV 进行了基因分析, 并分别将核苷酸序列和基因组数据库中已知的核苷酸序列进行比较及系统发生树分析. 结果发现: 巴彦淖尔地区褐家鼠所携带的病毒均为汉城型病毒, 而且在用 S 基因部分片段核苷酸序列构建的进化树上, 与 R22、L99 株病毒的亲缘关系最近, 位于 S1 亚型分支内.

同时, NeiMongRn45、NeiMongRn86、NeiMongRn56、NeiMongRn55、NeiMongRn116 和 NeiMongRn987 与 L99 及 R22 等 S1 亚型病毒株核苷酸序列的差异为 0.8%~1.1%, 与 BjFT01 等 S2 亚型病毒株核苷酸序列的差异为 4.1%~4.4%, 与 BjHD01 等 S3 亚型病毒株核苷酸序列的差异为 4.2%~5.0%, 与 80-39 等 S4 亚型病毒株核苷酸序列的差异为 4.8%~5.3%, 与 Gou3、QH367 等 S5 亚型病毒株核苷酸序

列的差异为 12.5%~16.2%, 与 IR461 等 S6 亚型病毒株核苷酸序列的差异为 5.9%~6.2%。研究表明在 SEOV 的系统发生树上, 褐家鼠所携带的病毒与 S1、S2、S3、S4 及 S6 亚型病毒株核苷酸序列的差异性, 较褐家鼠所携带的病毒与 Gou3 株为代表的 S5 亚型的小, 与病毒组间基因距离分析结果一致, 提示 NeiMongRn45、NeiMongRn86、NeiMongRn56、NeiMongRn55、NeiMongRn116 和 NeiMongRn987 与 S1、S2、S3、S4 及 S6 应该归为一个系统发生群, 而以 Gou3 株为代表的 S5 亚型应单独分为一个系统发生群^[8]。

HFRS 疫情在内蒙古自治区依然严重, 尤其是 2005 年 HFRS 在巴彦淖尔市流行严重, 疫区不断向西扩散。部分流行性出血热患者的临床症状已不同于 HTNV 与 SEOV 病毒感染后典型的临床症状, 以上情况提示在我国流行的汉坦病毒可能存在新的型别或亚型^[9]。因此, 有必要加大监测力度, 开展汉坦病毒的分子流行病学调查, 为控制汉坦病毒的流行提供科学依据。

参考文献:

- [1] Svetlana F, Khaiboullina S P. Hantaviruses: Molecular Biology, Evolution and Pathogenesis [J]. *Curr Mol Med*, 2005, 5: 773 - 790.
- [2] Klempa B, Fichet C E, Lecompte E, et al. Novel Hantavirus Sequences in Shrew [J]. *Guinea Emerg Infect Dis*, 2007, 13: 520 - 522.
- [3] Plyusnin A, Morzunov S P. Virus Evolution and Genetic Diversity of Hantaviruses and Their Rodent Hosts [J]. *Curr Top Microbiol*, 2001, 256: 47 - 75.
- [4] 张永振, 肖东楼, 王玉, 等. 中国肾综合征出血热流行趋势及其防制对策 [J]. *中华流行病学杂志*, 2004, 25: 466 - 499.
- [5] 姚智慧, 俞永新. 应用聚合酶链反应对我国不同来源肾综合征出血热病毒的型别分析 [J]. *病毒学报*, 1994, 10: 128 - 135.
- [6] 陈化新, 罗成旺. 肾综合征出血热监测及疫苗应用研究(第 1 版) [M]. 香港: 香港医药卫生出版社, 2001: 78 - 142.
- [7] 刘清怀, 王 铭, 巴 根. 内蒙古自治区流行性出血热地理流行病学调查 [G]. 合肥: 安徽省新闻出版局, 1990, 9: 74.
- [8] Wang H, Kumiko Y, Hideki E, et. al. Genetic Diversity of Hantaviruses Isolated in China and Characterization of Novel Hantaviruses Isolated from *Niviventer Confucianus* and *Rattus* [J]. *Virology*, 2002, 278: 332 - 345.
- [9] 邹 洋, 薛燕萍, 陈化新, 等. 汉坦病毒生物学特性研究进展 [J]. *中华流行病学杂志*, 2006, 27(9): 819 - 822.

The Molecular Epidemiological Investigation of Hantavirus in Bayannaer Region

YANG Peng-fei^{1,2}, MA Chao^{1,2}, GAO Na^{1,2},
ZHANG Yong-zhen², ZHU Jian-bo¹

1. College of Life Science, Shihezi University, Shihezi Xinjiang 832003, China;

2. Institute of Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Diseases Control and Prevention, Beijing 102206, China

Abstract: Objective: to explore the molecular epidemiology of hantavirus carried by hosts in the city of Bayannaer in Inner Mongolia Autonomous Region. Methods: collecting rodents in the Bayannaer areas, rats lungs were detected by indirect immunofluorescence assay(IFA). The hantaviral S gene of positive samples were covered by reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR), and then phylogenetic tree was constructed based on S segments(620-999 nt). Results: a total of 200 rodents were trapped, and hantavirus antigens were identified in 6 out of these lung samples. Phylogenetic analysis of these S segment sequences indicated that all viruses belonged to Seoul virus (SEOV). Conclusion: the main genotype of hantavirus carried by *Rattus norvegicus* in Bayannaer Region were S1 subtype of SEOV.

Key words: Hantavirus; RT-PCR; phylogenetic analysis; genotype

责任编辑 夏 娟