

· 论 著 ·

天台县汉坦病毒宿主动物调查及病毒分离结果

姚苹苹¹, 徐芳¹, 朱函坪¹, 杨章女¹, 孙一晟¹, 卢杭景¹, 陈晨¹, 庞卫龙², 张云³, 项海青⁴

1.浙江省疾病预防控制中心, 浙江省传染病疫苗与预防控制研究重点实验室, 浙江 杭州 310051;

2.天台县疾病预防控制中心; 3.南京军区军事医学研究所; 4.杭州市卫生事业发展中心

摘要: **目的** 了解 2011—2018 年浙江省天台县汉坦病毒 (HV) 宿主动物的种群分布、带毒情况和病毒型别, 为防治肾综合征出血热 (HFRS) 提供依据。**方法** 在天台县 HFRS 监测点采用夹夜法捕获鼠形动物, 对鼠种和鼠龄进行鉴定, 分析当地鼠种构成和鼠密度。取鼠肺和鼠血, 采用免疫荧光法检测 HV 抗原和抗体, HV 抗原阳性鼠肺用 HV S 片段特异性引物进行 RT-PCR 核酸检测, 并进行分离病毒和鉴定型别。**结果** 2011—2018 年天台县平均鼠密度为 4.44%, 野外鼠密度为 4.94%, 居民区鼠密度为 2.23%。捕获鼠形动物 10 种, 野鼠优势鼠种为黑线姬鼠, 家鼠优势鼠种为褐家鼠。鼠肺 HV 抗原阳性 67 份, 阳性率为 4.13%, 其中 1 份来自褐家鼠, 其他 66 份均来自黑线姬鼠; 鼠血抗体阳性 79 份, 阳性率为 4.86%, 均来自黑线姬鼠。67 份 HV 抗原阳性鼠肺标本经 RT-PCR 扩增后, 阳性 34 份, 阳性率为 50.75%。分离到 22 株 HV, 其中汉滩型 (HTN) 21 株, 汉城型 (SEO) 1 株, 均分离自黑线姬鼠。**结论** 天台县存在以黑线姬鼠为主要传染源的 HFRS 疫源地, 主要流行型别为 HTN 型, 同时首次在天台县发现黑线姬鼠携带 SEO 型病毒。

关键词: 汉坦病毒; 肾综合征出血热; 汉城型; 鼠密度**中图分类号:** R512.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-5087 (2019) 05-0433-05

The host investigation and virus isolation of hantavirus in Tiantai County

YAO Ping-ping*, XU Fang*, ZHU Han-Ping, YANG Zhang-nyu, SUN Yi-sheng, LU Hang-jing, CHEN Chen,

PANG Wei-long, ZHANG Yun, XIANG Hai-qing

*Key Lab. of Vaccine, Prevention and Control of Infectious Disease of Zhejiang Province, Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou, Zhejiang 310051, China

Abstract: **Objective** To learn the population, virus status and viral types of hantavirus (HV) hosts in Tiantai County of Zhejiang Province from 2011 to 2018, and to provide evidence for hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) control. **Methods** Rodents in Tiantai County were captured by night trapping method. After the species and age of rodents were identified, the composition of rodent species, dominant species and density of rodents were analyzed. The lungs and blood of rodents were sampled to detect the antigen and antibody of HV by immunofluorescence method. The HV antigen-positive lung samples were detected by RT-PCR with specific primers of HV S fragment, then HV was isolated and identified by inoculating Vero-E6 cells. **Results** The average rodent density in Tiantai County from 2011 to 2018 was 4.44%. The rodent density in the field and residential areas were 4.94% and 2.23%, respectively. Ten species of rodents were identified, with *Apodemus agrarius* dominant in the field and *Rattus norvegicus* in the residential areas. Sixty-seven lung samples were HV antigen positive (4.13%), one from *Rattus norvegicus* and the other sixty-six from *Apodemus agrarius*. Seventy-nine blood samples were HV antibody positive (4.86%), all from *Apodemus agrarius*. Thirty-four HV antigen-positive lung samples were positive (50.75%) after RT-PCR amplification. Twenty-two strains of virus were isolated and all of them were from *Apodemus agrarius*, including twenty-one strains of Hantaan type (HTN) and one strain of Seoul type (SEO). **Conclusion** In Tiantai County, *Apodemus agrarius* is the main source of HFRS infection; the main epidemic type of HV is HTN and SEO is first found in *Apodemus agrarius*.

Key words: Hantavirus; Hemorrhagic fever with renal syndrome; Seoul type; Rat density

DOI: 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2019.05.001

基金项目: 国家自然科学基金 (81473036, 81171609)

作者简介: 姚苹苹, 本科, 主任技师, 主要从事病原微生物检测和研究
工作; 共同第一作者徐芳, 本科, 副主任技师, 主要从事病原微生物检测和研究工作

通信作者: 项海青, E-mail: xhq87065651@163.com

人类感染汉坦病毒 (hantavirus, HV) 主要导致肾综合征出血热 (hemorrhagic fever with renal syndrome, HFRS) 和汉坦病毒肺综合征 (Hantavirus pulmonary syndrome, HPS)。我国是 HFRS 流行的主要地区, 发病数占全世界的 90% 以上^[1]。近年来, HFRS 疫情总体呈下降趋势, 但部分地区疫情仍居高不下或有所上升, 形势不容乐观^[1-4]。鼠类是 HV 的自然宿主和主要传染源, 包括姬鼠属、大鼠属、鼯鼠属、田鼠属、仓鼠属和小鼠属的一些种类。我国以汉滩型 (Hantaan, HTN) 病毒和汉城型 (Seoul, SEO) 病毒为主要流行株^[5-6], 黑线姬鼠是汉滩型 HFRS 的传染源, 褐家鼠是汉城型 HFRS 的传染源。

浙江省天台县位于浙中丘陵山区, 属亚热带季风气候, 适宜鼠类生存和活动。天台县自 1965 年发现首例 HFRS 以来, 疫情逐渐上升, 20 世纪 80 年代达高峰, 1986 年发病率为 206.08/10 万^[7], 居浙江省第一位, 全国第六位。采取针对性防控措施后, 天台县 HFRS 发病率逐年下降, 但仍是全国疫情较重的县之一^[8-9]。1984 年以来, 天台县开展了鼠间和人间 HFRS 疫情监测, 为国家监测点。本文对天台县 2011—2018 年监测的鼠密度, 鼠种, 以及鼠 HV 的抗原检测、抗体检测、核酸检测、病毒分离和型别鉴定结果进行分析, 为制定 HFRS 防控对策提供依据, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 HV 抗原片和直接免疫荧光血清 (浙江省疾病预防控制中心 HFRS 实验室); 兔抗鼠荧光血清 (美国 Sigma 公司); Vero-E6 细胞 (中国食品药品检定研究院); MEM 细胞培养基、L-谷氨酰胺、0.25% 胰酶消化液 (美国 Gibco 公司); 胎牛血清 (杭州四季青公司); HV 单克隆荧光血清抗体 (第四军医大学); RNA 抽提试剂盒 RNA Isolation Kit (上海之江生物科技股份有限公司); M-MLV 反转录酶、DNA Taq 酶和聚合酶链反应 (PCR) 相关试剂 (日本 TAKARA 中国分公司); 冷冻切片机 KD2258 (浙江金华科迪仪器设备有限公司); 荧光显微镜 DMI4000B (德国, Leica); 核酸自动提取仪 EX2400 (上海之江生物科技股份有限公司); PCR 仪 analytikjena (德国, Biometra)。

1.2 方法

1.2.1 鼠密度和鼠种监测 根据全国肾综合征出血热监测方案^[10] 要求, 于每年 3—4 月和 9—10 月开展野外和居民区的鼠密度、鼠种监测。采用 5 m 夹夜

法, 连续布放 3 天, 3—4 月和 9—10 月各捕获 100 只左右的鼠形动物, 对鼠种、性别和鼠龄进行鉴定。

1.2.2 HV 抗原和抗体检测 无菌采集鼠肺和鼠血, 置于 -40 ℃ 冰箱保存。鼠肺冷冻切片后丙酮固定 10 min, 吹干, 采用直接免疫荧光法检测 HV 抗原^[11]。鼠血采用间接免疫荧光法检测 IgG 抗体^[11]。采用荧光显微镜观察特异性荧光颗粒来判断 HV 抗原和抗体检测结果, 细胞内病毒特异性荧光为黄绿色颗粒, 分布在感染细胞的胞质内, 根据荧光强度、阳性细胞在细胞总数中所占的比例, 可将免疫荧光反应大致区分为 1~4 个 “+”, 无特异性荧光者为 “-”。抗原阳性的鼠肺标本及时冻存于 -80 ℃ 冰箱以备核酸检测和病毒分离。

1.2.3 HV 核酸检测 采用反转录 PCR 法 (RT-PCR) 对 HV 抗原阳性的鼠肺标本进行核酸检测。标本经超声粉碎后, 按照 RNA 抽提试剂盒说明书和核酸自动提取仪的操作规程提取 RNA, 用 40 μL 无 RNA 酶的去离子水溶解。使用 M-MLV 反转录酶和反转录引物 (5'-TAGTAGTAGACTCC-3') 合成 cDNA; 应用 HV S 基因片段的引物 (上游引物: 5'-ATGTTGC-CTGGGGIAAAGAGG-3', 下游引物: 5'-GCGCAC-TAGTAGTAGTAGACTCCCTAAAGA-3'); 扩增片段长度为 518 bp, 扩增的反应条件为 95 ℃ 10 min; 94 ℃ 60 s, 55 ℃ 60 s, 72 ℃ 45 s, 30 个循环, 72 ℃ 延伸 12 min。扩增产物用 1%~2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.4 HV 分离和型别鉴定 HV 抗原阳性的鼠肺标本用生理盐水冲洗 2 次后, 每份加 4~5 mL PBS, 用组织研磨器研磨, 2 000 r/min 离心 15 min, 取上清液过滤除菌, 接种长成单层的 Vero-E6 细胞, 接种量是细胞培养液量的 3%, 3 天后换液, 8~10 天后刮取少量细胞, 用直接免疫荧光法检查细胞感染 HV 情况, 阴性的盲传 3 代。刮取少量 HV 感染的 Vero-E6 细胞, 滴加到 12 孔的载玻片上, 风干后丙酮固定 10 min, 吹干, 分别滴加 HTN 型、SEO 型 HV 单克隆荧光血清抗体, 37 ℃ 水浴 50 min, 经荧光显微镜检查确定型别。

2 结果

2.1 2011—2018 年天台县鼠密度和鼠种分布 2011—2018 年共布放有效鼠夹 36 585 夹次, 其中野外布放 29 802 夹次, 居民区布放 6 783 夹次。捕获鼠 1 624 只, 鼠密度为 4.44%; 其中野外捕获 1 473 只, 野外鼠密度为 4.94%; 居民区捕获 151 只, 居民区鼠密度为 2.23%。鉴定出黑线姬鼠、褐家鼠、黄毛

鼠、黑腹绒鼠、臭鼯鼠、社鼠、黑仓鼠、小家鼠、黑家鼠和鼯鼠等 10 种；数量居前三位为黑线姬鼠，1 276 只占 78.57%；褐家鼠，141 只占 8.68%；黄毛

鼠，86 只占 5.30%。野鼠优势鼠种为黑线姬鼠，家鼠优势鼠种为褐家鼠。见表 1。

表 1 2011—2018 年天台县鼠密度和鼠种分布

年份	有效夹次	捕鼠数（只）									鼠密度（%）	
		黑线姬鼠	褐家鼠	黄毛鼠	黑腹绒鼠	臭鼯鼯	社鼠	黑仓鼠	灰仓鼠	其他		小计
2011	4 903	179	11	22	10	2	0	0	0	3	227	4.63
2012	4 335	189	6	2	1	10	0	0	0	0	208	4.80
2013	4 620	176	9	4	0	4	4	4	0	1	202	4.37
2014	4 330	132	46	14	0	1	0	4	3	0	200	4.62
2015	4 225	132	11	9	12	2	11	0	0	0	177	4.19
2016	4 950	136	28	21	10	10	3	0	0	0	208	4.20
2017	4 350	153	25	10	8	5	0	0	0	0	201	4.62
2018	4 872	179	5	4	4	3	6	0	0	0	201	4.13
合计	36 585	1 276	141	86	45	37	24	8	3	4	1 624	4.44

注：其他指小家鼠、黑家鼠和鼯鼠。

2.2 鼠 HV 抗原和抗体检测结果 共检测鼠肺和鼠血标本各 1 624 份，鼠肺抗原阳性 67 份，阳性率为 4.13%，其中 1 份抗原弱阳性来自褐家鼠，其他 66

份阳性均来自黑线姬鼠；鼠血抗体 IgG 阳性 79 份，阳性率为 4.86%，均来自黑线姬鼠。见表 2。

表 2 2011—2018 年天台县鼠 HV 实验室检测结果

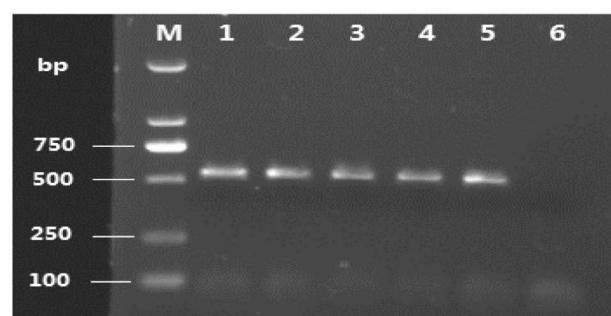
年份	抗原检测			抗体检测			核酸检测		
	检测数	阳性数	阳性率 (%)	检测数	阳性数	阳性率 (%)	检测数	阳性数	阳性率 (%)
2011	227	7	3.08	227	11	4.85	7	1	14.29
2012	208	15	7.21	208	20	9.62	15	4	26.67
2013	202	14	6.93	202	15	7.43	14	9	64.29
2014	200	6	3.00	200	8	4.00	6	0	0
2015	177	4	2.26	177	4	2.26	4	2	50.00
2016	208	3	1.44	208	5	2.40	3	1	33.33
2017	201	6	2.99	201	0	0.00	6	5	83.33
2018	201	12	5.97	201	16	7.96	12	12	100.00
合计	1 624	67	4.13	1 624	79	4.86	67	34	50.75

2.3 鼠 HV 核酸检测结果 对 67 份 HV 抗原阳性的鼠肺标本进行 RT-PCR 扩增检测，34 份鼠肺标本扩增出汉坦病毒 S 基因特异性条带（约 500 bp），阳性率为 50.75%，见表 2。抗原阳性鼠肺标本 S 基因引物 RT-PCR 扩增条带见图 1。

2.4 病毒分离和型别鉴定 67 份 HV 抗原阳性鼠肺标本，成功分离到 22 株 HV，均来自野外捕获的黑线姬鼠，其中 HTN 型 21 株，SEO 型 1 株。

3 讨论

天台县是浙江省唯一的 HFRS 国家级监测点，开



注：M 表示 Mark；1~4 表示 4 个抗原阳性鼠肺标本的 PCR 产物阳性条带；5 表示 Z10 毒株阳性对照；6 表示阴性对照。

图 1 抗原阳性鼠肺标本 S 基因引物 RT-PCR 扩增条带

展 HFRS 监测工作已有 30 多年, 监测数据对当地和浙江省, 乃至全国的 HFRS 防控工作均有一定指导意义。2011—2018 年天台县平均鼠密度为 4.44%, 略高于浙江省的平均鼠密度 4.21%^[9]; 野外鼠密度为 4.94%, 高于居民区的鼠密度 2.23%; 鼠类 HV 带毒率为 4.13%, 略高于浙江省平均带毒率 3.90%^[9]。鼠密度和鼠带毒率的高低与人群 HFRS 的发病率呈正相关^[12-13]。据文献报道, 只有鼠密度长年控制在 2% 以下, 才能减少 HFRS 发病率^[12]。因此天台县存在 HV 流行风险, 应大力开展灭鼠运动, 降低鼠密度, 控制 HFRS 的流行。

天台县野外优势鼠种是黑线姬鼠, 居民区优势鼠种是褐家鼠, 当地鼠种 78% 为黑线姬鼠, 优势鼠种与浙江省其他地区^[9] 类似。2011—2018 年检出 67 份 HV 抗原阳性鼠肺标本, 其中 1 份来自褐家鼠, 66 份均来自黑线姬鼠, 提示黑线姬鼠为天台县流行 HFRS 的主要宿主动物, 也说明 HFRS 具有明显的地理聚集现象及对宿主的相对选择性^[14-16]。

不同型别的 HV 对宿主具有相对选择性, HTN 型以黑线姬鼠为主要宿主动物, SEO 型以褐家鼠为主要宿主动物^[17], 因此, 天台县是以 HTN 型为主, SEO 型为辅的混合型流行疫区。浙江省疾病预防控制中心 HFRS 实验室曾在 2004 年从天台县的东方田鼠中分离到 SEO 型病毒^[18], 本次调查也发现 2016 年 HV 阳性的 1 份黑线姬鼠标本携带 SEO 型病毒, 表明天台县 HV 在不断进化, 突破了宿主间隔, 发生了宿主转换现象。HTN 型和 SEO 型病毒同为 HV 病毒属, 具有亲缘关系, 此次监测发现它们均可感染黑线姬鼠。由于不同型别的 HV 可在同一宿主动物体内交换遗传物质, 发生基因重排^[19], 形成突变株, 导致新抗原出现, 而人群缺乏对新抗原的免疫力, 可能会引发新的或大的疾病流行。国内近年研究也证实了不同型 HV 基因重排现象的存在: LIU 等^[20] 在 2012 年研究发现湖北省出现 SEO 型病毒溢出感染 HV 的自然宿主黑线姬鼠以及不同进化分枝间基因片段的重排现象; 范胜涛等^[21] 在 2014 年也报道了吉林省的黑线姬鼠和小家鼠中检测到 SEO 型病毒的存在。因此, 有必要继续开展天台县 HV 的基因型别和基因进化变异研究, 进一步了解当地 HV 的生物学特征和流行状况, 为制定 HFRS 防治对策提供依据。

HV 可采用相应的细胞进行分离, 但由于不同的 HV 病毒株在细胞中的敏感性有较大差异, 分离率并不高, 特别对于低病毒含量或毒株毒力较弱的标本分离难度更大。为提高病毒分离率, 需采集鼠双肺标

本, 保证标本量充足, 同时严格按照标本冷冻储藏的要求低温保存, 及时送检和分离。浙江省疾病预防控制中心 HFRS 实验室自 20 世纪 80 年代开始研究 HFRS 疫苗并成功产业化, 在 HV 分离上积累了大量经验, 能很好地把握病毒分离用细胞的代次、培养时间及培养液的营养成分等因素, 极大提高了病毒的分离率。本次成功分离到 22 株 HV, 为进一步研究不同年代 HV 分离株的病毒基因分子进化特征奠定了坚实的基础。

参考文献

- [1] 王芹, 李建东, 张全福, 等. 2014 年全国肾综合征出血热监测总结和疫情分析 [J]. 疾病监测, 2016, 31 (3): 192-199.
- [2] WU H C, WANG X Y, XUE M, et al. Spatial-temporal characteristics and the epidemiology of haemorrhagic fever with renal syndrome from 2007 to 2016 in Zhejiang Province, China [J]. Scientific Reports, 2018, 8 (1): 10244.
- [3] 陈立锋, 罗学辉, 陈佳. 1996—2015 年余姚市肾综合征出血热监测结果分析 [J]. 预防医学, 2016, 28 (7): 697-699.
- [4] 黄金波, 蓝玉清, 柳付明, 等. 丽水市肾综合征出血热监测结果 [J]. 浙江预防医学, 2015, 27 (2): 162-166.
- [5] 盛欣, 陈淑红, 兰英华, 等. 肾综合征出血热汉坦病毒分型及序列特征的研究 [J]. 医学研究杂志, 2014, 43 (6): 41-44.
- [6] 张俊丽, 肖寒. 肾综合征出血热病原学、实验室检测、防治措施的研究进展 [J]. 医学综述, 2017, 23 (21): 4303-4307.
- [7] 陈永法, 张东其, 许世芬, 等. 天台县肾综合征出血热流行特征与防治对策 [J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2000, 11 (4): 308-309.
- [8] 庞卫龙, 葛君华, 周雪冰. 2011—2016 年天台县肾综合征出血热监测分析 [J]. 中国农村卫生事业管理, 2018, 38 (7): 914-916.
- [9] 张蓉, 姚苹苹, 徐芳, 等. 2010—2014 年浙江省肾综合征出血热流行特征分析 [J]. 中国地方病学杂志, 2016, 35 (7): 520-524.
- [10] 中华人民共和国卫生部. 全国肾综合征出血热监测方案 (试行) [Z]. 2005.
- [11] 黄祯祥. 医学病毒学基础及实验技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1990: 190-199.
- [12] 张振, 孙英伟, 毛玲玲, 等. 2014—2016 年锦州市出血热疫区鼠密度及其感染汉坦病毒情况调查 [J]. 中华卫生杀虫药械, 2018, 24 (5): 488-490.
- [13] 郭刚, 吴熙然, 郭利萍, 等. 汉坦病毒感染生态流行病学研究现状 [J]. 口岸卫生控制, 2016, 21 (3): 58-63.
- [14] 朱妮, 刘峰, 邱琳, 等. 2011—2015 年陕西省肾综合征出血热时空聚集性分析 [J]. 现代预防医学, 2017, 44 (9): 1537-1540.
- [15] 黄鹏, 杨章女, 刘源, 等. 东南沿海地区 1980—2015 年汉坦病毒分子特征及流行病学分析河南省 II 型汉坦病毒基因亚型及其分布的研究 [J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2017, 28