

文章编号: 1003-4692(2009)03-0246-03

【论著】

# 长春龙嘉国际机场口岸汉坦病毒基因型研究

贺晨<sup>1</sup>, 邵丽筠<sup>2</sup>, 黄新功<sup>2</sup>, 于雅琴<sup>1</sup>, 刘娅<sup>1</sup>

**【摘要】** 目的 研究长春龙嘉国际机场口岸地区鼠间汉坦病毒(HV)基因型差异。方法 2006年4月至2007年3月, 采用夹日法捕捉啮齿类动物, 用免疫荧光法检测阳性标本, 应用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)扩增技术对特异性核苷酸序列进行扩增并进行测序分析。结果 共捕获鼠类195只, 10只携带HV。其中4只为汉滩型病毒(HTNV), 6只为汉城型病毒(SEOV)。基因测序分析发现, 此次研究中的HV发生了一定变异, 但并未发现新的亚型。结论 长春龙嘉国际机场口岸宿主动物所携带的HV基因型包括HTN型和SEOV型, 对该地区肾综合征出血热的防控有重要指导意义。

**【关键词】** 口岸; 汉坦病毒; 基因

中图分类号: R373.3<sup>+</sup>2

文献标识码: A

**Study on genotype of Hantavirus at Changchun Longjia international airport** HE Chen\*, SHAO Li-jun, HUANG Xin-gong, YU Ya-qin, LIU Ya. \*Jilin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Changchun, Jilin 130021, China

**【Abstract】 Objective** To study the difference of Hantavirus genotype among rats at Changchun Longjia international airport. **Methods** From Apr. 2006 to Mar. 2007, rodents were captured by snap trap (mouse clamp). Samples were detected by direct immunofluorescence technique. The partial M fragments were amplified with nested reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using Hantavirus genotype-specific primers, and its sequence was analyzed. **Results** There were 195 mice captured, and about 10 mice took the Hantavirus. There were 4 Hantaan viruses and 6 Seoul viruses. Nucleotide sequence homology analysis showed that there was some mutation in the Hantavirus and no found new sub-genotype. **Conclusion** There are Hantaan viruses and Seoul viruses at Changchun Longjia international airport, which is valuable for the prevention and control of hemorrhagic fever with renal syndrome.

**【Key words】** Port; Hantavirus; Gene

肾综合征出血热(HFRS)是由汉坦病毒(HV)引起, 以鼠类为主要传染源, 可通过多种途径传播的自然疫源性疾病<sup>[1]</sup>。目前我国的32个省(直辖市、自治区)中, 有29个已发现HV或HFRS病例。吉林省是HFRS老疫源地, 疫情比较严重<sup>[2]</sup>。长春龙嘉国际机场为新建机场, 也是吉林省最大的空港口岸, 在口岸范围内对HV在宿主动物内的流行及基因分型进行全面研究, 从而有效地预防和控制HFRS非常必要。本研究使用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)分型检测方法及核苷酸序列测定技术, 对来源于长春龙嘉国际机场口岸内的鼠肺标本进行基因分型并对部分标本的核苷酸序列进行分析比较, 为更好地在口岸范围内防制HFRS提供科学依据。

## 1 材料与方法

**1.1 标本采集** 2006年4月至2007年3月, 于每月的10—12日, 在长春龙嘉国际机场选取停机坪东侧、停机坪北侧、南方航空公司货运仓库、机场集团货运仓库

进行鼠类监测。按照常规夹日法捕鼠, 晚放晨收, 每次布放鼠夹300夹。每次调查原则: 所用鼠夹型号一致(采用2号标准鼠夹, 特殊情况采用1号或3号鼠夹), 布放时间一致(晚放晨收), 布放生境一致(室内或室外), 所用诱饵一致(本次调查采用南瓜籽)。

对捕获鼠样本, 无菌剖取鼠肺, 保存至液氮中, 送实验室待检, 所有标本放-70℃冰冻保存。

**1.2 组织切片** 用冷冻切片机将鼠肺标本切成约0.5 μm的薄片, 同一标本切2份, 分别粘于抗原片的上下两孔, 紫外线照射15 min 杀灭病毒, 然后将玻片放于染色缸内, 倒入预冷的丙酮, 在4℃冰箱中固定10 min, 用吹风机将玻片吹干备用。

**1.3 直接免疫荧光法(DFA)检测抗原** 滴加0.01 mol/L, pH值7.4的PBS于待检标本片上, 10 min后弃去, 使标本保持一定湿度; 滴加适当稀释的荧光标记的抗体溶液, 使其完全覆盖标本, 置于有盖搪瓷盒内, 37℃30~45 min; 取出玻片置玻片架上, 先用0.01 mol/L, pH值7.4的PBS冲洗后, 再按顺序过0.01 mol/L, pH值7.4的PBS三缸浸泡, 每缸3~5 min, 不时振荡; 取出玻片, 用滤纸吸去多余水分, 但不使标本干燥, 加1滴缓冲甘油, 以盖玻片覆盖; 立即用荧光显微镜观察。

**1.4 组织总RNA提取** 用天平称取鼠肺标本50~

作者单位: 1 吉林大学公共卫生学院(长春 130021); 2 吉林出入境检验检疫局

作者简介: 贺晨(1981-), 男, 甘肃临洮人, 博士研究生, 从事卫生检疫工作。E-mail: gshechen@yahoo.com.cn

100 mg, 放入灭菌研磨器中, 加入 Trizol 试剂 (GibcoBrl, 加拿大), 充分研磨后移入 Eppendorf 管中; 冰上 5 min; 每 1 ml 体系中加入氯仿 200  $\mu$ l, 振荡器上剧烈振荡; 冰上 3 min, 期间, 液体开始分为上下两层, 不要随意搅动液体; 12 000 r/min, 离心 10 min (离心半径 6 cm); 将上层清澈透明的水相移入另一新的 Eppendorf 管中, 加入相同体积的异丙醇, 上下颠倒充分混匀; 冰上放置 10 min; 12 000 r/min, 离心 10 min, 弃上清; 100% 乙醇洗涤; 12 000 r/min, 离心 10 min, 弃上清; 室温干燥晾干。

**1.5 RT-PCR 扩增 HV 基因 M 片段**

**1.5.1 引物设计** 采用卫生部制定的《全国肾综合征出血热监测方案》中推荐的引物。序列见表 1。

表 1 RT-PCR 中使用的引物

引物	序列(5'~3')	位置	片段
反转录引物	Oligodt Primers		LMS
通用外侧引物	AAAGTAGGTGITAYATCYTIACA	1910~1939	M(+)
	ATGTGG		
	GTACAICCTGTRCCCIACCCC	2373~2354	M(-)
型特异性引物			
HTN 型内侧引物	GAATCGATACTGTGGGCTGC	1958~1984	M(+)
	AAGTGC		
	GGATTAGAACCCCGAGCTCGTCTC	2318~2340	M(-)
SEO 型内侧引物	GTGGACTCTTCTTCATTATT	1936~1957	M(+)
	TGGGCAATCTGGGGGGTTGCATG	2331~2353	M(-)

注: 引物来源: 反转录引物由大连宝生物有限公司合成; 其余引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

**1.5.2 cDNA 第一链的合成** 反转录合成 cDNA: 采用 M-MLV (Promega, 美国) 反转录酶, 按说明书进行。反转录反应条件: 退火 25  $^{\circ}$ C 5 min; cDNA 链合成 42  $^{\circ}$ C 1 h; 反转录酶灭活 70  $^{\circ}$ C 15 min。

**1.5.3 目的片段 nPCR 方法扩增** 使用通用外侧引物进行第 1 轮 PCR, PCR 反应循环条件: 94  $^{\circ}$ C 5 min; (95  $^{\circ}$ C 35 s, 62  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 1 min)  $\times$  5; (94  $^{\circ}$ C 40 s, 61  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 1 min)  $\times$  5; (94  $^{\circ}$ C 40 s, 60  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 1 min)  $\times$  30, 72  $^{\circ}$ C 10 min。使用不同型别的内侧引物进行第 2 轮 PCR, 反应条件同第 1 轮。

**1.5.4 电泳** 取 PCR 扩增产物 4  $\mu$ l, 以 DNA Marker DL2000 为分子质量标准品, 用 1.5% 琼脂糖凝胶 (EB 染色) 电泳。电压 100 V, 电泳时间 15 min, 然后用 Jel Doc 2001 型凝胶成像系统观察 PCR 扩增目的片段的的结果。

**1.5.5 核苷酸序列测定** 对获得的基因产物进行纯化回收, 由上海生工生物工程技术有限公司进行核苷酸序列测定。利用互联网 BLAST 工具及 DNASTar 软件对获得的 HV 核苷酸序列进行同源性分析。

**2 结果**

**2.1 基因分型** 此次研究共捕获鼠类 195 只, 经免疫

荧光法检测出阳性标本 10 份。提取 10 份阳性鼠肺标本的组织总 RNA, 用特异性引物进行反转录和 nPCR 扩增。用汉滩 (HTN) 型特异性引物和汉城 (SEO) 型特异性引物同时扩增 10 份标本, 结果显示, 有 4 份标本被 HTN 型特异性引物扩增出长度为 383 bp 的片段, 标本编号分别是 2、48、80、92 号; 有 6 份标本被 SEO 型特异性引物扩增出长度为 418 bp 的片段, 标本编号分别是 11、18、30、64、106、139 (图 1)。

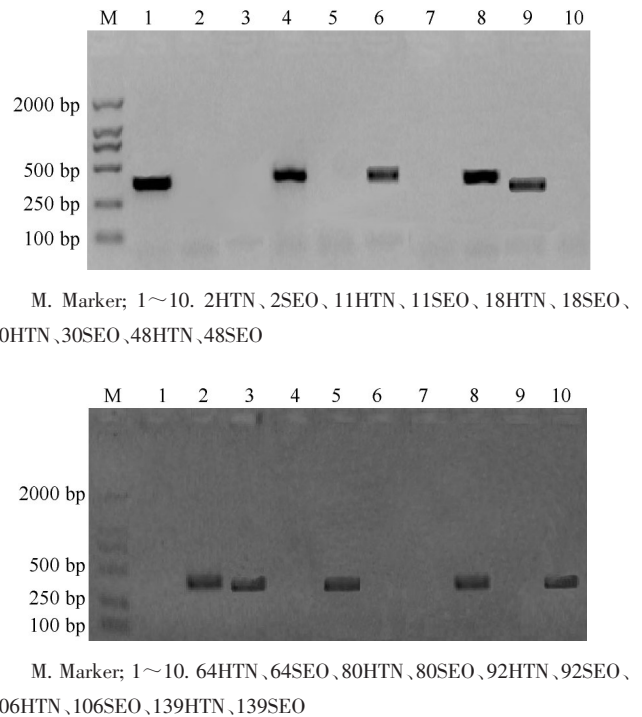


图 1 汉坦病毒 RT-nPCR 分型结果

**2.2 HV 序列分析及同源性比较** 选取 HTN 型和 SEO 型的基因扩增产物各 1 个, 经纯化回收后进行序列测定, 并通过互联网 BLAST 工具与已经发表的 HV 序列进行同源性比较, 对所测得序列进行核苷酸序列比较和系统发生树分析 (表 2、3, 图 2、3)。48 号 HTN 型经过比较后, 同源性达到 80%~96%, 系统发生树可见其与 JilinAP06、Liu、H5、B78、A3 亲缘关系较近。18 号 SEO 型经过比较后, 同源性达到 93%~99%, 系统发生树可见其与 dc501、YS32 亲缘关系较近。48 号 HTNV 与部分已知的 HTNV 毒株同源性比较见表 2。18 号 SEOV 与部分已知的 SEOV 毒株同源性比较见表 3。

**3 讨论**

在国境口岸开展媒介生物监测及相关病原体检测, 对于保护国民健康和维持国家经济正常运行具有重要的作用和深远的影响。在我国各口岸, 负责口岸卫生安全的出入境检验检疫部门多次截获境外媒介生物, 其中沈阳机场口岸、北京机场口岸、太原机场口岸

表2 48号 HTNV 与部分已知的 HTNV 毒株同源性比较

病毒株	同源性(%)	病毒株	同源性(%)
JilinAP06	96	AP111	93
Liu	95	CJAp595	83
H5	95	CRF110	92
B78	96	AP1371	93
A3	96	CJAa142	83

注:JilinAP06、Liu、H5、B78、A3、AP111、CJAp595、CRF110、AP1371、CJAa142 分别是已知的 HTNV 毒株。

表3 18号 SEOV 与部分已知的 SEOV 毒株同源性比较

病毒株	同源性(%)	病毒株	同源性(%)
BjHD01	99	HLD78	98
HLD65	99	KI-83-262	98
ZT10	97	ZT71	97
B-1	97	dc501	99
YS32	98	cp211	99

注:BjHD01、HLD65、ZT10、B-1、YS32、HLD78、KI-83-262、ZT71、dc501、cp211 分别是已知的 SEOV 毒株。

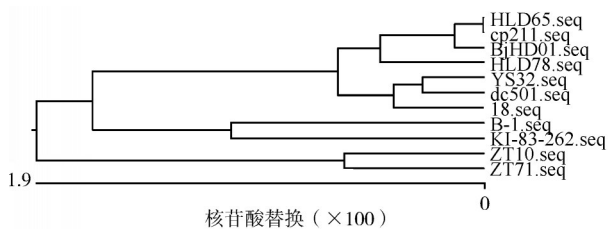


图2 部分 SEOV M 片段核苷酸序列所构建的系统发生树

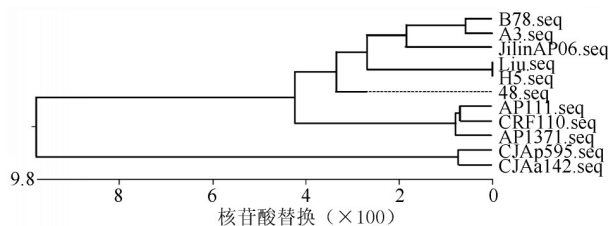


图3 部分 HTNV M 片段核苷酸序列所构建的系统发生树

等曾截获外来鼠种<sup>[3]</sup>。一旦这些外来媒介生物携带的疾病传入我国,不仅对人民身体健康和生命安全造成危害,而且对社会经济发展造成严重影响。掌握长春龙嘉国际机场口岸 HV 的基因型构成,根据检测所得数据,对该机场口岸传播媒介生物性疾病的风险进行评估,并对其传播传染病的风险程度作出科学分析和预测,将有效防止医学媒介生物及其传播的传染病传入及流行,为更好地履行《国际卫生条例》,保护人民身体健康发挥极为重要的作用。这是有效控制外来媒介生物性传染病传入最基础的工作,也是实施国际航行风险管理和技术性贸易措施最基本的工作。

近年来在世界范围内已分离到众多的 HV 毒株,这些不同地区与不同宿主来源的病毒株虽然在理化性质和形态大小上基本一致<sup>[4]</sup>,但在各地所引起的临床症状却轻重不一,流行病学特点也不尽相同<sup>[5]</sup>。根据我国 HFRS 的主要传染源种类不同,该病可分为 HTN

型和 SEO 型两种。通过多年研究,已经基本明确我国存在 HTN 型、SEO 型和混合型 3 种疫区<sup>[6]</sup>。为了能够明确 HV 基因型和基因亚型在我国的分布状况,王世文<sup>[7]</sup>广泛收集来源于我国不同疫区的毒株、患者血清和鼠肺等阳性标本,并对其进行分析。HV 各基因型和基因亚型在我国的分布情况,其中 HTN 型疫区分别为黑龙江、浙江、安徽、四川、贵州、陕西、甘肃、宁夏等省(自治区),SEO 型疫区为吉林、内蒙古、河北、河南、山西、广东、海南、江西、云南省(自治区),混合型疫区为北京、山东、上海、江苏、福建、湖北省(直辖市),但其亚型分布不甚相同。由于有的疫区标本较少对于其亚型分布研究受到限制,故尚有待于进一步研究。此次研究在长春龙嘉国际机场口岸既发现 HTNV,也发现 SEOV。

近年来 RT-PCR 检测 HV 的感染及进行基因分型得到普遍应用<sup>[8-10]</sup>。从本次实验获得的序列资料看,48 号 HTN 型经过与其他已知 HTNV 毒株比较,同源性达到了 80%~96%;18 号 SEO 型经过与其他已知 SEOV 毒株比较,同源性达到了 93%~99%。根据国际病毒分类与命名委员会提出病毒基因组序列进行分型的标准来看,同源性低于 95%,即可认为是新的亚型,低于 75%即可认为是新型。本次同源性分析发现,在已知的毒株序列中已经存在和本次研究获得的序列同源性达到 95%以上的毒株,这说明本次研究中虽然 HV 基因发生了一定程度的变异,但 18 号和 48 号并非新的亚型。由于影响 HV 变异进化的因素比较多,包括地理位置、环境气候、宿主动物等因素,所以,在长春龙嘉国际机场口岸地区 HV 的变异进化规律还有待于进一步的研究。

参考文献

- [1] 李立明. 流行病学[M]. 5版. 北京: 人民卫生出版社, 2004:504-505.
- [2] 吴燕萍, 黄飏. 吉林省肾综合征出血热流行趋势分析[J]. 中国地方病防治杂志, 2004, 19(3):164-165.
- [3] 王德强. 飞机传播媒介生物的危害与控制措施[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2001, 24(2):92-93.
- [4] Hong T, Xia SM, Liao HX, et al. Viruses of classical and mild forms of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) isolated in China have similar bunyavirus-like morphology[J]. Lancet, 1983, 1:589-591.
- [5] Schmaljohm CS, Brian Hjelle. Hantavirus: a global disease problem [J]. Emerg Infect Dis, 1997, 3 (2) :95.
- [6] 陈化新. 中国肾综合征出血热监测[J]. 中华流行病学杂志, 2002, 23(1):63-66.
- [7] 王世文. 我国汉坦病毒基因型和基因亚型的分布研究[J]. 病毒学报, 2002, 18(3):211-216.
- [8] Papa A, Johnson AM, Stockton PC, et al. Retrospective serological and genetic study of the distribution of hantaviruses in Greece[J]. J Med Virol, 1998, 55(4):321-327.
- [9] Plyusnin A, Mustonen J, Asikainen K, et al. Analysis of Puumala hantavirus genome in patients with nephropathia epidemical and rodent carriers from the sites of infection[J]. J Med Virol, 1999, 59 (3):397-405.
- [10] Chin C, Chiueh TS, Yang WC, et al. Hantavirus infection in Taiwan: the experience of a geographically unique area [J]. J Med Virol, 2000, 60(2):237-247.

[收稿日期:2009-02-02]