

文章编号:1002-2694(2012)03-0237-04

# 辽宁省首次发现的新布尼亚病毒 其培养特性的研究\*

刘芸<sup>1</sup>, 姚文清<sup>1</sup>, 耿英芝<sup>1</sup>, 孙英伟<sup>1</sup>, 陈静乙<sup>2</sup>, 王博<sup>1</sup>,  
韩仰欢<sup>1</sup>, 孙海波<sup>1</sup>, 雷露<sup>1</sup>, 李建东<sup>3</sup>, 于丹梅<sup>4</sup>, 宫润妍<sup>4</sup>

**摘要:**目的 探讨发热伴粒细胞血小板减少综合征布尼亚病毒(Severe fever with thrombocytopenia syndrome bunyavirus, SFTSV)在细胞分离培养时表现的特异性。**方法** 收集发病一周以内发热伴粒细胞血小板减少综合征患者的血液,首先做血清学检测排除汉坦病毒(Hantavirus, HV),然后将样本采用多种细胞培养的方法进行病毒分离。最后采用逆转录(RT-PCR)方法对病毒进行鉴定。**结果** 从我省发热伴出血征候群血液样本分离出病毒 12 株,经鉴定均为新布尼亚病毒。**结论** 我省东部山区及丘陵地带有新布尼亚病毒流行,其临床症状及体征与肾综合征出血热极为相似。但体外细胞培养及核苷酸序列却存在着明显的差别。

**关键词:**新布尼亚病毒; RT-PCR; 细胞培养

中图分类号:R373 文献标识码:A

## Cultivating characteristics and biological characteristics of the new virus of Bunyaviridae isolated from the patient serum in Liaoning province

LIU Yun<sup>1</sup>, YAO Wen-qing<sup>1</sup>, GENG Ying-zhi<sup>1</sup>, SUN Ying-wei<sup>1</sup>, CHEN Jing-yi<sup>2</sup>, WANG Bo<sup>1</sup>, HAN Yang-huan<sup>1</sup>, SUN Hai-bo<sup>1</sup>, LEI Lu<sup>1</sup>, LI Jian-dong<sup>3</sup>, YU Dan-mei<sup>4</sup>, GONG Run-Yan<sup>4</sup>

(1. Liaoning Center for Disease Control and Prevention, Shenyang 110005;

2. China Medical University, Shenyang 110005;

3. China Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052;

4. Dandong Center for Disease Control and Prevention, Dandong 118000, China)

**ABSTRACT:** To explore the specificity of Severe fever with granulocyte thrombocytopenia syndrome virus in many cells. Blood samples of patients with fever and leukothrombopenia for no more than one week was collected and had a serologic test for Hantavirus, then isolated the virus by using different kinds of cells. RT-PCR was adopted to identify virus in our research. Twelve virus strains were separated from samples of fever and bleeding blood symptoms in Liaoning province. The virus was identified SFTSV. It has had an epidemic of bunyaviridae virus in mountain district and hills in east of Liaoning Province. It is similar with hemorrhagic fever with renal syndrome at clinical symptoms and signs, but there is obvious distinction between them when culturing in cells.

**KEY WORDS:** Bunyaviridae; RT-PCR; cell culturing

自 2003 年 SARS 疫情后, 我国对突发新发传染病

\* 艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治项目辽宁及周边省(市)传染病病原谱流行规律研究(2009ZX10004-209)和辽宁省科技厅卫生安全重点实验室项目(2007403016)联合资助

通讯作者:姚文清, Email: yaowenqing@lncdc.com

作者单位:1. 辽宁省疾病预防控制中心, 沈阳 110005;

2. 中国医科大学, 沈阳 110005;

3. 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, 北京 100052;

4. 丹东市疾病预防控制中心, 丹东 118000;

Email: LY\_169@163.com

的研究取得重大进展, 虫媒病毒性疾病新的布尼亞病毒不断被发现。目前布尼亞病毒科被分为 5 个属, 包括约 350 种病毒, 其中至少有 60 种病毒可引起人类或动物的疾病<sup>[1]</sup>。其中发热伴血小板减少综合征布尼亞病毒(SFTSV)简称“新布尼亞病毒”<sup>[2]</sup>就是“蜱咬病”元凶。我省在 2009—2010 年在国家科技重大专项“传染病检测技术平台—发热伴出血征候群”项目病例监测中采集了发热伴血小板减少综合征患者急性期血液做病原培养及核酸检测。本文共选择了我省 5 个监测点的 120 份样本, 经检测

阳性病毒 12 株。病例主要分布在我省东北部的山区及丘陵地带。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 收集我省发热伴出血监测哨点急性期患者血,采用间接免疫荧光、IgM 抗体、荧光定量 PCR、细胞培养等方法进行测定。其中间接免疫荧光血清抗体由北京索莱宝科技有限公司提供;细胞培养所用试剂为 GIBCO 产品;VERO-E6、VERO、BHK、C6/36、HEP<sub>2</sub> 等细胞均由中山大学达安基因公司提供;用于汉坦病毒检测的试剂盒来源于 Promega 公司,新型病毒检测的试剂盒来源于中山大学达安基因公司;用于新型病毒和汉坦病毒检测的引物和序列及两种病毒患者血清 IgM 检测试剂盒均由病毒所提供。

**1.2 方法** 取血清或全血上清液各 200 μL,一份用于提取病毒核酸,另一份用于感染已长成单层 VERO 或 VERO-E6 细胞。用于细胞培养的样本,无论是否有细胞病变(CPE)均盲传 3 代,每个代次都刮取少量的细胞液滴在凹孔玻片上,吹干后冷丙酮固定制成抗原片备用。然后将核酸检测阳性的患者恢复期血清混合后取适量用 pH7.2 PBS 做 1:20 倍稀释,做间接免疫荧光(IFAT)检测<sup>[3]</sup>。同时将每一代收获的细胞病毒液冻融后取 200 μL 提取病毒核酸,采用 Real-Time 荧光定量 PCR 或 RT-PCR 凝胶成像的方法<sup>[4]</sup> 观察病毒对细胞的感染情况。

## 2 结果

自 2009—2010 年起共选择血液样本 120 人份,分离出病毒株 13 株,其中汉坦病毒 1 株,新型病毒 12 株。按样本采集的地区-采样年代-收样编号,将每一个细胞分离株进行编号。

**2.1 选择** 2009 年全部的病毒株、2010 年的部分病毒株与汉坦病毒的毒株做比较观察其血清学和生物学变化。选择 LFC-09-16, LFC-09-18, LFS-09-23 3 株传代超过 7 代细胞病变明显而且稳定的病毒株分别感染几种不同的细胞,37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养观察其生长变化,全部试验见表 1、2。

**2.2 新病毒感染 VERO-E6 第 12 d 时细胞出现的病变** 见图 1、2。

**2.3 新病毒感染 VERO-E6 第 15 d 后刮取细胞制成混悬液滴在凹孔玻片上做免疫荧光染色** 见图片 3。

表 1 新病毒与汉坦病毒血清学及生物学检测结果比较

Tab. 1 The comparison of serologic test results about SFTSV and Hantaan virus

编号	ELISH 法	ELISH	RT-PCR	RT-PCR
	HV-IgM	法新病毒-IgM	HV(血清)	V(血清)
09-16	+	+	+	+
09-18	-	+	-	+
09-23	-	+	-	+
10-1	-	+	-	+
10-15	-	+	-	+
10-17	-	+	-	+
10-5	+	-	+	-
07-6	+	-	+	-

注:表 1 中除 10-5、07-6 为汉坦病毒株对照外,其余均为新病毒毒株

表 2 新病毒株培养第 12 d 时在各种细胞上的生长变化

Tab. 2 SFTSV cultures changes of cell growth on twelve days

细胞	细胞荧光染色	Real-Time-PCR	细胞 CPE 改变
VERO	+	+	±
VERO-E6	+	+	+
BHK	+	+	+
C6/36	+	+	±
HEP <sub>2</sub>	-	-	-

注:Real-Time-PCR(+)表示 ct 值 <35

CPE(+)表示细胞感染病毒后有形态改变,(±)表示细胞仅有肿胀改变,(-)表示细胞无 CPE 改变。

**2.4 新布尼亚病毒抗原性检测** 选择三株病毒传代超过 5 代的病毒株用 Hank's 液从 10<sup>-1</sup> 起做系列稀释并接种 VERO-E6 细胞,每天刮取细胞做 IFAT 染色并与汉坦病毒作比较。汉坦病毒感染细胞 24 h 后就有微弱的荧光颗粒可见,最高稀释度可达 10<sup>-6</sup><sup>[5]</sup>,而新布尼亚病毒最早出现荧光颗粒是第 9 天,最高滴度 10<sup>-3</sup>。

**2.5 将 6 株新病毒株提取的 RNA 采用新型病毒 M 片段通用外套引物逆转录扩增后的产物用 1.5% 琼脂糖凝胶检测**,使用凝胶成像仪观察条带,结果显示:6 株病毒株条带位置均在 700 bp 左右,无阳性对照,仅做阴性对照,见图 4。

**2.6 根据不同年代、不同地域选择 2009 年细胞分离株 2 株,2010 年细胞分离株 3 株** 采用 23 对引物对该病毒 L、M、S 全部核苷酸序列进行检测,结果证明辽宁分离株确为新布尼亚病毒。与汉坦病毒不同的是新布尼亚病毒没有明显的地域聚集性<sup>[6]</sup>。不同地区核苷酸排列差别不大即同源性强,此项试验均由病毒所出血热实验室老师指导下完成,后续工作仍在进行中。

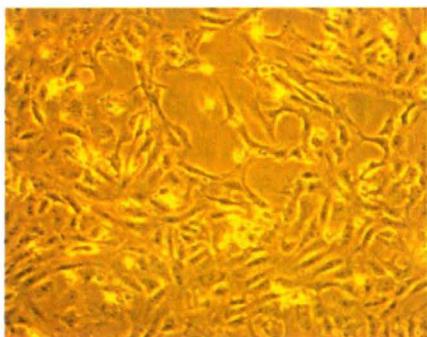


图 1 病变细胞

Fig. 1 The lesions cells

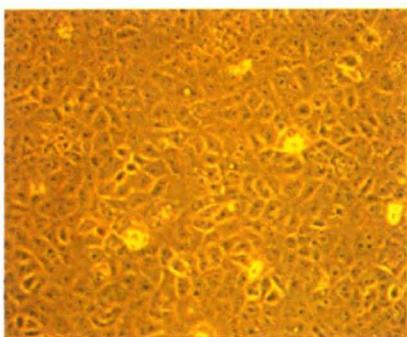


图 2 正常对照细胞

Fig. 2 The normal controls cells

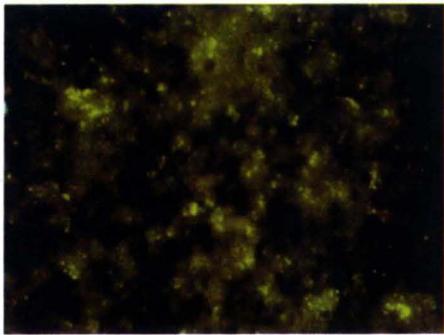


图 3 新病毒感染 VERO-E6 细胞的免疫荧光染色

Fig. 3 The immunofluorescence stain of SFTSV in VERO-E6 cells

### 3 讨 论

3.1 鉴于新布尼亚病毒有很多的血清学、生物学及流行病学特点目前尚未完全清楚,有些研究工作仍在继续。所以在实际工作中有些试验结论是参照HTN病毒的特征比对而得出的。新布尼亚病毒与汉坦病毒体外培养相比较:培养时间短,一般初代培养需要13~15 d,大多数病毒在初代培养时就有明显的CPE改变,不同的细胞有不同的表现形式;而HTN病毒初代培养需20~30 d,视细胞状态而定。无论使用哪种细胞,病毒培养多少代,全过程均无CPE改变。

3.2 新布尼亚病毒同 HTN 病毒一样能感染 VERO、

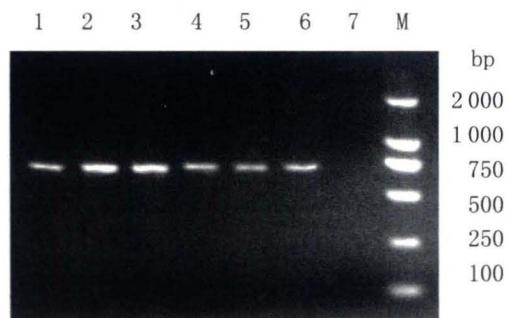


图 4 为 6 株细胞分离株 M 片段扩增产物图

注:使用的 DNA Marker 为 DL2000;1-6:为 DNA 条带为特异性目的片段(分子量为 700 bp);7:为阴性对照

PCR 扩增反应条件为:95 °C 3 min, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s, 扩增 40 个循环;延伸 72 °C 10 min。

Fig. 4 The M segment amplification product of six cell separation plants

VERO-E6、BHK、C6/36 等细胞而不感染 HEP<sub>2</sub>,具有相似的虫媒病毒培养特性,但用 VERO、C6/36 细胞培养时无明显的 CPE 改变,只是细胞比正常对照细胞略显肿胀而已;BHK 细胞易衰老脱落形态学上不易区分 CPE 变化;VERO 细胞敏感性好,病毒易感染,因细胞无病变产生不直观,建议做疫苗株筛选时使用该细胞。做常规监测工作时最好采用 VERO-E6 细胞做病毒分离,对于病毒含量高的样本在初代培养时就能观察到明显的细胞病变,采用 Real-Time 荧光定量 PCR 检测细胞培养液可见阳性曲线。对于初代培养阴性的样本至少需要盲传 3 代取上清液做荧光定量 PCR 检测阴性后方可弃之。

3.3 将感染新布尼亚病毒的细胞刮取少量制成悬液滴在凹孔玻片上,吹干后冷丙酮固定并用 20 倍稀释的患者恢复期血清做 IFAT 检测。第一、二代时荧光清晰可见,随着病毒传代次数的增高,细胞 CPE 出现的时间越早,一般由最初的 12~15 d 缩短至 6~10 d,而此时将细胞悬液滴片做免疫荧光染色时荧光颗粒消失,继续传代时有可能再次出现,经常出现时隐时现的现象,这可能是因为病毒在细胞内增殖时间短或病毒传代次数少还不够稳定所致。

3.4 除 LFC-09-16 株在做汉坦病毒项目检测时出现阳性,其它株均为阴性。可能是该患者同时感染两种病毒,我们只分离出其中一种,或者使用的检测试剂还缺乏唯一性。

3.5 新布尼亚病毒致 VERO-E6 等细胞病变特点是:(1)细胞形态发生改变,能使 VERO-E6 由原来的多边形变成柳叶形;(2)细胞病变变化较缓慢且本底细胞逐渐脱落减少,从细胞出现肿胀变形开始

达到 90% CPE 时全程需要 2 w 左右。

**3.6 新布尼亚病毒抗原性检测结果证明:**新布尼亚病毒感染细胞后病毒颗粒复制出现时间比 HTNV 长且毒力也较弱。这可能与我们所选择的病毒株传代还不够稳定,或者选择的检测方法不适合新型病毒有关,有待于今后工作中进一步证实。

**3.7 鉴于新布尼亚病毒对于 IFAT 检测法有“时隐时现”即不稳定的特点,样本在做抗原检测时最好不要采用该方法。试验证明采用 Real-time 荧光定量 PCR 的方法检测待测样本中是否含有新病毒是一种既快速方便又直观的好方法。**

#### 4 结语

血清学可将白蛉病毒属分为两组,白蛉热病毒组(Sandfly fever)和乌库尼米病毒组(Uukuniemi)。其中白蛉热病毒组已发现 55 个不同血清型,而乌库尼米病毒组已包含 13 个血清型。白蛉热组病毒通常由感染节肢动物(白蛉、蚊、蠓等)叮咬传播人类。乌库尼米病毒经由蜱传播。蜱是媒介生物,常通过叮咬传播病原体(病毒、细菌、寄生虫)使人患病。蜱可传播多种疾病。已知蜱可携带 83 种病毒、31 种细菌、32 种原虫,其中大多数是重要的自然疫源性疾病和人兽共患病,如森林脑炎、蜱传出血热、Q 热、蜱传斑疹伤寒、野兔热、莱姆病、人粒细胞无形体病、巴尔通体感染等,给人类健康及畜牧业带来很大危害。

由于全球气候的变化,人类的活动及世界动物经贸的流动,一些布尼亚病毒在本地区扩大流行,甚至跨地区、跨洲流行越来越受到人们的重视<sup>[7-8]</sup>。新发现的病毒同其它布尼亚科病毒一样具有其相似的生物学特性:如病毒颗粒呈球形,直径 80~100 nm,包膜,表面有棘突。基因组包含 3 个单股负链 RNA 片段(L、M 和 S),L 片段全长为 6 368 个核苷酸,包含单一读码框架编码 RNA 依赖的 RNA 聚合酶;M 片段全长为 3 378 个核苷酸,含有单一的读码框架,编码 1 073 个氨基酸的糖蛋白前体;S 片段是一个双义 RNA,基因组以双向的方式编码病毒核蛋白和非结构蛋白。病毒基因组末端序列高度保守,与白蛉病毒属其他病毒成员相同,可形成锅柄状结构<sup>[9]</sup>。

目前我省所分离的新布尼亚病毒经鉴定已具备了布尼亚科病毒的特征,其地理流行病学特点主要在我省的丹东、抚顺、铁岭地区的山地、丘陵地带,沈阳市内五区及新民市区患者血液样本并未分离到新布尼亚病毒。因本病多发于夏秋季山区农村且人群普遍易感等特点,下一步我们将侧重于蜱、蚊等传播媒介的研究。鉴于新布尼亚病毒入侵人体后血液中含量高不排除有人传人的可能性,很可能造成局部地区人间流行,这一点区别与汉坦病毒。另外,应当做好个人防护,尽量避免在蜱类主要栖息地如草地、树林等长时间坐卧,穿紧袖长衣裤,裸露的皮肤涂驱避剂。尽快将该病毒对人类可能造成的危害纳入常规监测中。新布尼亚病毒成功的分离不仅对我省今后疫源地的确定、划分、演变等流行病学研究起到积极地作用同时对临床的诊治也提供了有力的帮助。

(承蒙中国疾病预防控制中心病毒预防控制所出血热室李建东老师在核酸鉴定及病毒序列分析方面给予的帮助,张全福老师在病毒分离方面给予大力支持,特此一并致谢!)

#### 参考文献:

- [1] 章域震,张海林,梁国栋.与人类疾病相关的布尼安病毒研究进展[J].中国人兽共患病学报,2009,25(6):589-593.
- [2] 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.
- [3] 黄祯祥,洪涛.医学病毒学基础及实验技术[M].1990:197-198.
- [4] 刘东瀛,肖红,郭广松,等. RT-PCR 方法扩增白蛉热病毒 M 片段的研究[J].中国病毒学,2003,18(5):437-440.
- [5] 刘芸,秦彩明,姚文清,等.辽宁省啮齿类动物肾综合征出血热病毒株的分离及鉴定[J].中国卫生检验,2009,19(7):1625-1627.
- [6] 王世文,杭长寿,王华,等.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.
- [7] Buchen-Osmond C. ICTVdB-The Universal Virus Database, Version 4 [M/OI]. Columbia University, New York, USA. <http://www.ncbi.nlm.gov/Ictv/fs/index.htm>.
- [8] The American Committee on Arthropod-Borne Viruses. 2000 annual report on the catalogue of arthropod-Borne and selected vertebrate viruses of the world[C]. 2002, January 31.
- [9] Karabatsos N. International catalogue of arboviruses including certain other of vertebrates [M]. 3rd ed, American Society of Tropical Medicine and Hygiene, San Antonio, Texas, 1985:71.

收稿日期:2011-04-21;修回日期:2012-01-17