



华北地区埃博拉病毒莱斯顿亚型的流行病学调查

谷松至, 许黎黎, 鲍琳琳, 姚艳丰, 秦川

(中国医学科学院, 北京协和医学院, 医学实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室,
国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室, 北京 100021)

【摘要】 **目的** 了解华北地区埃博拉病毒莱斯顿亚型的分布和流行情况, 为埃博拉病毒病的防控提供理论依据。**方法** 采集华北地区动物园及养殖场的多种哺乳动物血清, 对其进行埃博拉病毒莱斯顿亚型的检测。**结果** 采集各种哺乳动物血清共 109 份, 经 Real-time PCR 方法检测未检出阳性样品。**结论** 埃博拉病毒尚未在华北地区流行, 应加强对埃博拉病毒病的知识宣传, 并做好安全防护工作。

【关键词】 埃博拉; 埃博拉病毒; 莱斯顿亚型; 流行病学

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 05-0071-03

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2015. 005. 017

Epidemiology investigation for reston subtype of ebola virus in north China area

GU Song-zhi, XU Li-li, BAO Lin-lin, YAO Yan-feng, QIN Chuan

(Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicine, Ministry of Health; Institute of Medical Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences; Key Laboratory of Human Diseases Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine; Peking Union Medicine College, Beijing 100021, China)

【Abstract】 **Objective** To provide a theoretical basis for the prevention of Ebola virus disease, this survey aims to understand the distribution and prevalence status of Reston subtype of Ebola virus in north china area. **Methods** Collecting a variety of mammalian serums from zoos and farms in north china area, and detecting Ebola virus of Reston subtype. **Results** 109 kinds of collected mammalian serums, there were no positive samples detected by the Real-time PCR method. **Conclusion** Ebola virus has not been found in north china area, we should strengthen the publicity of Ebola virus disease, and do well security work.

【Key words】 Ebola; Ebola virus; Reston subtype; Epidemiology

埃博拉病毒病 (ebola virus disease) 又称埃博拉出血热 (ebola hemorrhagic fever), 是由埃博拉病毒 (ebola virus) 引起的一种急性的、高致死率的烈性传染病, 病死率可高达 90%^[1]。埃博拉病毒属丝状病

毒科, 为不分节段的单股负链 RNA 病毒^[2], 被 WHO 列为“生物危害四级”病原。2013 年 3 月, 几内亚首次爆发了有记录以来最严重的一次埃博拉疫情, 并迅速蔓延至利比里亚、塞拉利昂等西非国家^[3]。截

【基金项目】 [基金项目] 国家自然科学基金(31370203); 科技重大专项—艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治(2012ZX10004501-004); 北京市自然科学基金(7142106)。

【作者简介】 谷松至(1988-), 女, 技师, E-mail: gusongzhi123@126.com。

【通讯作者】 秦川, 教授, 博士生导师。E-mail: qinchuan@cnilas.org。

至 2015 年 1 月 4 日,世界卫生组织(WHO)发表数据显示埃博拉出血热疫情肆虐的利比里亚、塞拉利昂和几内亚等西非国家的感染病例(包括疑似病例)已达 20747 人,其中死亡人数达到 8235 人^[4]。

根据埃博拉病毒基因的位置、顺序和数量的不同,可将埃博拉病毒分为 5 个基因型,即扎伊尔型(EBOV)、苏丹型(SUDV)、本迪布焦型(BDBV)、塔伊森林型(TAFV)和莱斯顿型(RESTV)^[5]。埃博拉病毒莱斯顿型虽不对人致病,但可对非人灵长类有致死性,在美国和菲律宾有过猴子感染的报道^[6]。而我国在 2011 年首次报道了从猪体内也检测到埃博拉病毒莱斯顿型^[7]。目前我国虽尚未发现有感染埃博拉病毒病的患者,但不排除有埃博拉病毒随着病毒携带者或引进动物(如猴子、黑猩猩等)而进入我国的风险。为监测华北地区埃博拉病毒莱斯顿型的分布和流行情况,进一步确定是否有存在埃博拉病毒的风险。本研究通过采集华北地区动物园及养殖场的哺乳动物血清,对埃博拉病毒莱斯顿型进行核酸检测,以期对埃博拉病毒的防控提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集

2014 年 9 月,从华北地区的动物园或养殖场采集猴、猪、雪貂、狗、猫等哺乳动物的血清。置于 -20℃ 冻存备用。

1.1.2 引物合成

埃博拉病毒莱斯顿亚型的引物序列为本实验室设计,引物序列已申请专利保护(专利号:201510014997.0)。

1.1.3 主要试剂和仪器

RNeasy Mini Kit 提取试剂盒购自 QIAGEN 公司,Superscript III First Strand Synthesis Kit 试剂盒购自 Invitrogen 公司,Taq DNA 聚合酶,10 × buffer、dNTP、Mg²⁺ 均购自 TaKaRa 公司,荧光染料 Power SYBR Green PCR Master Mix,96 孔 0.2 mL PCR 反应管 Fast Optical 96 - well RXN Plate,光学反应盖膜 96 - Well Optical Adhesive Film 25PK 均购自 ABI 公司,实时荧光定量 PCR 仪为 ABI 公司 StepOne 系列产品。

1.2 方法

1.2.1 病毒 RNA 提取及反转录

采用 RNeasy Mini Kit 提取试剂盒提取采集到的哺乳动物血清的 RNA,采用 Superscript III First Strand Synthesis Kit 试剂盒对病毒 RNA 进行反转录成 cDNA,具体实验操作步骤参见说明书。合成的 cDNA 置于 -20℃ 冻存备用。

1.2.2 埃博拉病毒莱斯顿亚型的 Real-time PCR 检测

反应体系为:模板 2 μL, dNTP 0.5 μL,上、下游引物各 1 μL (10 pmol/μL), 10 × buffer 1 μL, Mg²⁺ 1 μL, Ex Taq 酶 0.1 μL, DEPC 水 8.4 μL, Power SYBR Green 荧光染料 5 μL。反应条件:94℃ 3 min, 94℃ 30 s, 64℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 35 个循环,每个循环结束后读取荧光值。

将连有埃博拉病毒莱斯顿亚型的 NP gene 的全长质粒作为阳性对照。

2 结果

2.1 采样情况

2014 年 9 月,我们从华北地区的动物园或养殖场共采集 109 份血清样品。其中恒河猴 51 份,猪 40 份,食蟹猴 4 份,雪貂 4 份,狗 3 份,猫 2 份,金丝猴 2 份,大熊猫 1 份,黑猩猩 1 份,环尾狐猴 1 份。

2.2 检测情况

对采集到的 109 份哺乳动物血清样品,进行埃博拉病毒莱斯顿亚型的 Real-time PCR 检测,结果显示,109 份血清样本全部呈阴性。

3 讨论

埃博拉病毒病一直被认为是动物源性传染病,而埃博拉病毒的自然宿主及其在自然界的循环和传播方式尚不明确。有研究显示,果蝠可能是埃博拉病毒的自然宿主之一。但从自然宿主直接到人类的感染很罕见,目前认为是果蝠将埃博拉病毒直接传染给非人类灵长类动物或人,感染病毒的非人类灵长类动物再直接传染给人^[8]。感染者可通过多种途径传播埃博拉病毒,而接触传播是最主要的传播途径。通过接触患者和被感染动物的各种体液、分泌物、排泄物及其污染物感染即可感染埃博拉病毒^[9]。在埃博拉疫情中,都有患者曾密切接触过非人类灵长类(大猩猩、黑猩猩等)和其他哺乳动物(小羚羊、猪等)的尸体而被感染^[10-14]。埃博拉病毒莱斯顿型不使人致病,但对非人类灵长类有致死性,且使人隐性感染^[15]。在美国和菲律宾就曾在

接触过猕猴和猪的人血清中检测出莱斯顿型埃博拉病毒抗体,并且中国和菲律宾都有猪感染莱斯顿型的报道^[5,16-18]。是否存在莱斯顿型在猪体内变异,其使人感染的潜在危险值得关注。

目前中国尚未发现感染埃博拉病毒的病例,但随着我国与世界各国之间的贸易、经济、旅游和人员往来的日益频繁,埃博拉病毒通过各种途径侵入我国不无可能。尤其是外来动物(黑猩猩、猴子等)的引进,更是提高了埃博拉病毒进入我国的风险。并且我国的人群无免疫力,对埃博拉病毒普遍易感。而当前尚无有效预防和治疗埃博拉病毒病的疫苗和药物^[19]。因此,在加速研发疫苗和药物的同时,密切的对埃博拉病毒的监测及流行病学调查显得尤为重要。确诊埃博拉病毒病的最主要方式是病原学检测,而传统的 RT-PCR 检测方法灵敏度不高、容易出现假阳性且不适用于大批量样本的筛查。Real-time PCR 检测方法敏感性高、特异性强、重复性好,在疾病暴发时可快速诊断,现已成为病原体检测的重要方法。本调查对华北地区动物园及养殖场的各种哺乳动物进行采样,并对埃博拉病毒莱斯顿型进行检测。集中采集易感染埃博拉病毒的哺乳动物血清样本 109 份,利用本实验室针对埃博拉病毒莱斯顿型建立的 Real-time PCR 检测方法对埃博拉病毒莱斯顿型进行核酸检测。结果显示,所采集的血清样本全部检测呈阴性,表明该地尚无埃博拉病毒莱斯顿型的流行。为埃博拉病毒莱斯顿型的防控提供理论依据。虽然并未在采集到的各类哺乳动物中检测到埃博拉病毒莱斯顿型,但考虑到采样量和采样次数的局限,尚需进一步研究。

总之,在对华北地区的哺乳动物进行埃博拉病毒病的监测过程中并未检测到埃博拉病毒莱斯顿型。但我们仍需继续开展对埃博拉病毒莱斯顿型的流行病学研究,监测埃博拉病毒莱斯顿型在人类和非人灵长类动物及其他哺乳动物中的传播流行规律,做到及时预警、及时控制、彻底杜绝埃博拉病毒病在人间的传播。

参考文献:

[1] Pourrut X, Kumulungui B, Wittmann T, *et al.* The natural history of Ebola virus in Africa[J]. *Microbes Infect*, 2005. 7(7

- 8): 1005 - 1014.
- [2] Feldmann H, Geisbert TW. Ebola haemorrhagic fever [J]. *Lancet*, 2011, 377(9768): 849 - 864.
- [3] World Health Organization. Ebola virus disease in Guinea. http://www.who.int/csr/don/2014_03_23 Ebola/en.
- [4] World Health Organization. Ebola Situation report. <http://www.who.int/csr/disease/ebola/situation-reports/en/>.
- [5] LI YH, CHEN SP. Evolutionary history of Ebola virus [J]. *Epidemiol Infect*, 2014, 142(6): 1138 - 1145.
- [6] Lefebvre A, Fiet C, Belpois-Duchamp C, *et al.* Case fatality rates of Ebola virus disease: a meta-analysis of World Health organization data [J]. *Med Mal Infect*, 2014, 44(9): 412 - 416.
- [7] Pan Y, Zhang W, Cui L, *et al.* Reston virus in domestic pigs in China [J]. *Arch Virol*, 2014, 159(5): 1129 - 1132.
- [8] Feldmann H, Geisbert TW. Ebola haemorrhagic fever [J]. *Lancet*, 2011, 377(9768): 849 - 862.
- [9] Breman JG, Johnson KM. Ebola then and now [J]. *New England Journal of Medicine*, 2014, 371(18): 1663 - 1666.
- [10] Peterson AT, Bauer JT, Mills JN. Ecologic and geographic distribution of filovirus Disease [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2004, 10(1): 40 - 47.
- [11] Vogel G. Are bats spreading Ebola across sub-Saharan Africa? [J]. *Science*, 2014, 344(6180): 140.
- [12] Mitman G. Ebola in a Stew of Fear [J]. *New England Journal of Medicine*, 2014, 371(19): 1763 - 1765.
- [13] Barrette RW, Metwally SA, Rowland JM, *et al.* Discovery of swine as a host for the Reston ebolavirus [J]. *Science*, 2009, 325(5937): 204 - 206.
- [14] Towner JS, Sealy TK, Khristova ML, *et al.* Newly discovered ebola virus associated with hemorrhagic fever outbreak in Uganda [J]. *PLoS Pathog*, 2008, 4(11): e1000212.
- [15] Bray M, Geisbert TW. Ebola virus: the role of macrophages and dendritic cells in the pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005. 37(8): 1560 - 1566.
- [16] Barrette RW, Metwally SA, Rowland JM, *et al.* Discovery of swine as a host for the Reston ebolavirus [J]. *Science*, 2009, 325(5937): 204 - 206.
- [17] Miranda ME, White ME, Dayrit MM, *et al.* Seroepidemiological study of filovirus related to Ebola in the Philippines [J]. *The Lancet*, 1991, 337(8738): 425 - 426.
- [18] Centers for Disease Control (CDC). Update: Filovirus infection in animal handlers [J]. *Morbidity Mortality Weekly Report*, 1990, 39(13): 221.
- [19] Cohen J. Infectious disease. Ebola vaccine: little and late [J]. *Science*, 2014, 345(6203): 1441 - 1442.

[修回日期] 2015 - 03 - 30