基础研究 文章编号:0253-3626(2008)s1-0010-04

新疆伊犁地区马的西尼罗病毒感染情况调查

翟 红[1,2],谢 鹏[1,2,3],曾志磊[1,2],刘妍汐[1,2],徐鸣明[1,2],余建萍[1,2],张英英[1,2]
陈 晓[1,2],展群岭[1,2],朱 丹[1,2],彭 丹[1,2]

(1.重庆医科大学附属第一医院神经内科,重庆 400016;2.重庆医科大学基础研究所 重庆 400016;
3.重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨西尼罗病毒(West Nile virus,WNV)在新疆伊犁地区马群中的流行状况。方法:采用一步法实时定量逆转录聚合酶链反应(Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction,Real-time RT-PCR)检测120份伊犁地区马的外周血液单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cells,PBMCs)中WNV包膜蛋白(E)基因片段,并对可能的阳性产物进行基因序列测定、同源性和氨基酸顺序分析。结果:所检测的120份血液标本中未发现WNV E 基因阳性片断。结论:目前没有证据表明我国新疆伊犁地区的马群中存在西尼罗病毒感染。

【关键词】西尼罗病毒;Real-time RT-PCR;一步法;Taqman探针
【中国图书分类法分类号】R51 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-08-29

Investigation on west Nile virus infection in equine of Yili, Xinjiang uygur autonomous region

ZHAI Hong, et al

(*Department of Neurology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the epidemic of west Nile virus(WNV) infection in Yili, Xinjiang uygur autonomous region. *Methods*: One step real-time RT-PCR was performed to detect the west nile virus envelope (WNV E) in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of 120 equines. Gene sequence and amino acid sequence were analyzed for positive products. *Results*: No positive product was found in all the samples. *Conclusion*: No evidence was found to support WNV infection in Yili, Xinjiang uygur autonomous region.

【Key words】 West Nile virus; Real-time RT-PCR; One step; Taqman probe

WNV是不分节段的单股正链RNA病毒,属黄病毒科(Family flaviviridae)黄病毒属(Genus flavivirus),是可引起人兽共患病的虫媒病毒[1]。WNV的传染源主要是带毒的鸟类,传播媒介主要是亲鸟类蚊子,也可通过输血、器官移植、哺乳、宫内感染和经破损的皮肤粘膜接触感染等方式传播[2-6],已经证实该病毒可感染鸟(其中乌鸦和兰松鸡最易感)、蚊、鹅、鸡、鸭、人、马、猴、狗、猫、鸽子、蜱、蝙蝠、山羊、绵羊和家兔等家养和野生动物。我国地域广阔,具有WNV传播流行的条件,虽然目前我国尚未发现WNV引起的疾病,但是否存在WNV 的隐性感染呢?为此,我们课题组采用一步法Real-time RT-PCR检测了新疆伊犁地区马的外周血液中WNV E基因片段,现将前期结果报道如下。

作者介绍:翟 红(1981-),男,硕士,
研究方向:中枢神经系统感染性疾病。
通讯作者:谢 鹏,男,教授,E-mail:pengxie58@gmail.com。

基金项目:国家高技术研究发展计划(863 计划)(No. 2006AA02Z196)。

1 材料与方法

1.1 研究对象

全部120份马外周血液标本均于2007年初秋采自新疆伊犁地区天然牧场上放养的马匹。

1.2 主要试剂及仪器

(1)引物:P1:5'-CAA CGG CTG CGG ACT ATT T-3'(19 bp),P2:5'- CTT TCA AGA TGG TTC TTC CT-3'(20 bp),荧光探针的序列:5'-FAM- CAA AGG AAG CAT TGA CAC ATG CGC C -DABCYL-3',均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。(2)Rotor-GeneTM6000型

荧光定量PCR仪(Corbett Research,Sydney,Australia)。

1.3 方法

1.3.1 提取细胞总RNA 每例采集外周EDTA-Na_2抗凝血10ml,用马淋巴细胞分离液(天津灏洋生物制品科技有限公司)按使用说明分离PBMCs,采用组织/细胞RNA(小量)抽提试剂盒(上海华舜生物工程有限公司)提取细胞总RNA,随机取5份RNA样本进行纯度检测、浓度计算及完整性检。标本置于-80℃保存。

1.3.2 标准曲线制作 用WNV Real-time一步法双色荧光定量RT-PCR检测试剂盒(上海吉玛制药技术有限公司,GenePharma)中的RNA标准品连续10倍稀释得到10^6、10^5、10^4、10^3、10^2、10^1copies/μl的浓度梯度,将不同稀释度的RNA标准品加入反应体系中,按操作说明进行一步法Real time RT-PCR反应。反应结束后由PCR仪附带软件Rotor-Gene 6000 series Software 1.7(Corbett Research,Sydney,Australia)进行分析,自动生成标准曲线。

1.3.3 一步法Real-time RT-PCR 使用GenePharma 公司的WNV一步法双色荧光定量RT-PCR检测试剂盒按操作说明进行。20μl体系含RNA 2μl,上下游引物的终浓度为0.5μmol/L,探针终浓度为0.2μmol/L。反应条件为:42℃,30 min;95℃,15min;95℃,12s;55℃,20 s;72℃,20s,共40个循环,55℃时收集FAM荧光。每次实验设阴性对照,用水代替RNA标准品。

1.3.4 PCR产物纯化、测序及氨基酸序列分析 对可能的阳性PCR产物进行纯化并测序和进行氨基酸序列分析。

2 结 果

2.1 RNA完整性

随机抽取的 5 份 RNA 样本用核酸蛋白分析仪测得 OD_{260}/OD_{280} 值分别为:1.962、1.946、2.009、2.06、2.061,RNA 浓度分别为 0.261、0.325、0.235、0.622、0.552μg/L。1%琼脂糖凝胶电泳显示较明显的 28S、18S、5S 3 条带(见图 1),说明 RNA 样品纯度高、完整性较好,无明显降解。

2.2 标准曲线

将RNA标准品连续10倍稀释获得的一系列浓度的RNA作为模板,进行一步法Real-time RT-PCR反应,荧光扩增曲线见图2。根据不同浓度的RNA标准品进行一步法Real-time RT-PCR反应时的荧光扩增信号,由Rotor-Gene 6000 series Software 1.7软件自动生成WNV荧光定量标准曲线:CT=-3.494×log(conc)+47.885,斜率为3.493 9,R^2=0.998 5,见图3。

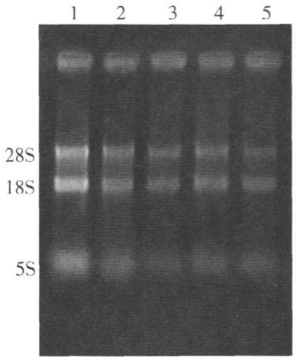


图1 RNA电泳图(1、2、3、4、5为随机抽取的马PBMCs RNA样本)

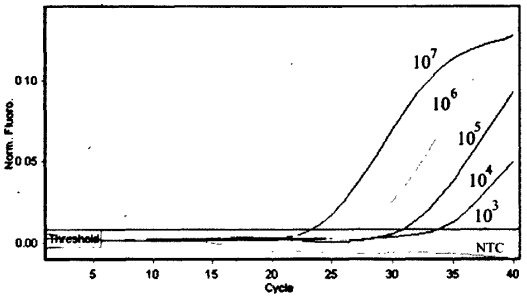


图2 RNA标准品不同稀释度的荧光扩增曲线

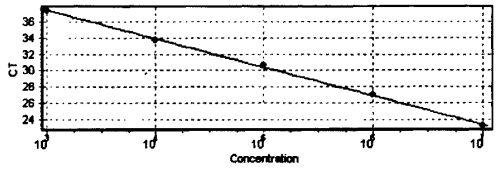


图3 WNV定量标准曲线

2.3 样本检测

所检测的120份马外周血单个核细胞提取的RNA样本中,未发现阳性样本,荧光扩增曲线见图4。

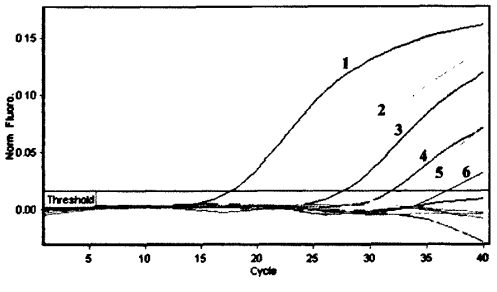


图4 马PBMCs荧光扩增曲线(1、2、3、4、5、6为RNA标准品)

3 讨 论

近年来,WNV、尼帕病毒(Nipah virus)引起严重急性呼吸器官综合征(Severe acute respiratory syndrome,SARS)的冠状病毒、禽流感病毒等所引起的病毒感染性疾病在许多国家的暴发流行,引起了人类的恐慌,造成巨大的经济损失,使得研究者对新发病毒感染性疾病高度重视。

WNV最早于1937年从非洲乌干达北部西尼罗河地区一名发热妇女的血液中分离得到,1999年WNV首次登陆西半球,引起了美国和加拿大历史上虫媒病毒感染的最大流行。目前WNV广泛分布于非洲、欧洲、澳洲、亚洲、美国、加拿大、墨西哥、加勒比海和中美洲及南美洲的部分地区。WNV感染潜伏期通常为2~14d。大多数呈隐性感染,约有20%~40%的感染者出现症状,主要表现为西尼罗热;约1/150的感染者出现中枢神经系统症状,主要为婴幼儿、老年人和免疫缺陷患者,50岁以上的人群属于高危人群。1999~2006年间,美国共报道约19 525例西尼罗病患者,其中8 606(44%)例患者出现神经系统症状,771例死于神经系统感染[8],可见近年来,WNV感染引起的症状越来越重,出现了西尼罗病毒性脑炎、脑膜炎和脊髓灰质炎等致命的中枢神经系统感染,发病率和死亡率都很高。虽然目前我国尚无WNV感染的报道,但WNV感染大多呈隐性感染,且大量库蚊和乌鸦等鸟类在我国的存在,为WNV在我国的传播流行提供了条件。此外,WNV对我国而言是一种全新的致病病毒,人群普遍缺乏免疫力,一旦出现WNV感染的爆发流行,后果不堪设想,所以在我国进行西尼罗病毒相关研究刻不容缓。国内已有张久松、姜焱、罗招凡等人[9-12]进行了一些WNV的相关基础性研究,但尚无WNV在我国感染情况的调查研究报道。我们课题组的调查研究为我国的WNV感染情况积累了原始数据,并为我国WNV的预防和控制提供资料。

WNV的传播媒介主要是亲鸟类蚊子,以尖音库蚊为主,所以WNV疾病主要是在蚊虫活跃的夏末或秋初发生,但在美国南部等地区也可全年发病。雨水多、气温高、洪水泛滥等使蚊虫密度增加的因素可引起WNV感染的多发和爆发流行。我国有多种库蚊属的蚊子,WNV的主要媒介尖音库蚊又主要分布在新疆[13]。因此我们选择新疆伊犁地区的天然牧场作为标本的采集地,将采样时间集中在蚊虫活跃的秋初,以符合WNV的流行病学特点。

WNV的检测方法主要有以下几种:病毒分离与鉴定、血清中和试验(Serum neutralization test, SNT)、酶联免疫吸附检测(Enzyme-linked immunosorbent assays,ELISA)、PCR检测等。病毒分离是最基础、最重要的诊断手段,但WNV分离需在生物安全3级(P3)条件下进行。SNT和ELISA均为免疫学检测方法,敏感性高,但特异性较差,并且WNV与日本脑炎病毒(Japanese encephalitis virus)、圣路易脑炎病毒(StLouis encephalitis virus)、墨累谷脑炎病毒(Murray Valley encephalitis virus)、昆津病毒(Kunjin virus,WNV的一个亚型)等黄病毒组成日本脑炎病毒抗原复合组,组内成员间抗原性关系密切,尤其与圣路易脑炎病毒的免疫原性相近,有可能存在一定的交叉反应。制备单克隆抗体可以增加特异性,但成本较高。PCR检测具有快速、准确的特点,也被广泛用于WNV的检测。Lanciotti等[14]建立了基于WNV NY99株基因序列的Taqman RT-PCR,发现针对E基因的引物灵敏度最高,可用于所有标本的筛查,但是检测不出谱系Ⅱ的两株病毒。我们采用的一步法实时定量RT-PCR敏感性和特异性较高,针对WNVE基因所设计的引物和探针能检测出绝大多数现有已知的WNV病毒株,不与其它病毒产生阳性结果,且不易出现污染引起的假阳性结果。但Papin等[15]研究发现,Taqman在检测引物结合区有基因突变的WNV时,假阴性率高达47%。课题组前期的实验检测中没有发现阳性样本,是否有可能存在荧光探针结合区的基因突变从而出现假阴性的结果这还需进一步的研究。

总之,我们课题组所进行的前期调查研究结果提示,尚没有证据表明在我国新疆伊犁地区的马群中存在WNV的感染。

参 考 文 献

[1] Mukhopadhyay S,Kim BS,Chipman PR,et al.Structure of West Nile virus[J]. Science,2003;302:248.

[2] Centers for Disease Control and Prevention.West Nile virus transmission through blood transfusion--South Dakota,2006[J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep,2007;56(4):76-79.

[3] Iwamoto M,Jernigan DB,Guasch A,et al.Transmission of West Nile virus from an organ donor to four transplant recipients[J]. N Engl J Med,2003;348(22):2196-2203.

[4] Centers for Disease Control and Prevention.Possible West Nile virus transmission to an infant through breast-feeding-Michigan,2002[J]. JAMA,2002;288(16):1976-1977.

[5] Centers for Disease Control and Prevention.Intrauterine West Nile virus infection—New York,2002[J]. JAMA,2003;289(3):295-296.
[6] Bowen RA,Nemeth NM. Experimental infections with West Nile virus[J]. Curr Opin Infect Dis,2007;20(3):293-297.
[7] Nash D,Mostashari F,Fine A,et al.The outbreak of West Nile virus infection in the New York city area in 1999[J]. N Engl J Med,2001;344(24):1807-1814.
[8] Hayes E,Gubler D.West Nile Virus:Epidemiology and clinical features of an emerging epidemic in the United States[J]. Annu Rev Med,2006;57:181-194.
[9] 张久松,张泮河,高玉然,等.西尼罗病毒外膜蛋白的表达及其抗原性鉴定[J].中华微生物学和免疫学杂志,2006;26(12):1102-1103.
[10] 姜 焱,张常印,王凯民,等.检测马西尼罗热病毒抗体的重组E蛋白-ELISA的建立[J]. 农业生物技术学报,2007;15(2):323-326.
[11] 姜 焱,侯玉峰,张常印,等.马西尼罗热病毒E蛋白部分基因在大肠杆菌中的表达[J]. 微生物学通报,2007;34(1):101-104.
[12] 罗招凡,丁鹤林,刘建伟.SYBR Green I 荧光定量PCR检测西尼罗病毒[J]. 中华医院感染学杂志,2007;17(8):1031-1034.
[13] 魏 荣,王志亮,李其平.在中国可以传播西尼罗河病毒的蚊虫种类[J]. 中国媒介生物学及控制杂志,2004;15(1):65-66.
[14] Lanciotti RS,Kerst AJ,Nasci RS,et al. Rapid detection of West Nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes,and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay[J]. J Clin Microbiol,2000;38(11):4066-4071.
[15] Papin JF,Vahrson W,Dittmer DP.SYBR green-based real-time quantitative PCR assay for detection of West Nile virus circumvents false-negative results due to strain variability[J]. J Clin Microbiol,2004;42(4):1511-1518.

(上接第 7 页)

[29] 何玉琴,吴宜富.P/Q 型钙通道 α1 亚基基因 CACNA1A 突变与偏头痛[J].国外医学脑血管疾病分册,2005;13(6):49-52.
[30] Drenth JP,te Morsche RH,Guillet G,et al.SCN9A mutations define primary erythermalgia as a neuropathic disorder of voltage gat ed sodium channels[J]. J Invest Dermatol,2005;124(6):1333-1338.
[31] Rachakonda V,Pan TH,LE WD.Biomarkers of neurodegenera tive disorders:how good are they[J]. Cell Res,2004;14(5):347-358.
[32] 乐卫东,陈 晟.阿尔茨海默病生物学标记和早期诊断研究进展[J]. 老年医学与保健,2005;11(4):202-205.
[33] Padovani A,Pastorino L,Borroni B,et al. Amyloid precursor p rotein in platelets:a peripheral marker for the diagnosis of sporadic AD[J]. Neurology,2001;57(12):2243-2248.
[34] Colciaghi F,Marcello E,Borroni B,et al.Platelet APP,ADAM 10 and BACE alterations in the early stages of Alzheimer disease [J]. Neurology,2004;62(3):498-501.
[35] 陈兴泳,唐洲平,唐荣华.早期诊断 Alzheimer 病的血液生物学标志物研究进展[J]. 临床神经病学杂志,2007;20(6):475-476.
[36] Byberg H,An J,Darko S.characterization of the CSF proteome by mass spectrometry to discover peptide biomarkers for ALS[A]. Ses sion 8C clinical genetics and biomarkers [C]. Lateral Sclerosis,2007;8:50-54.
[37] Lynch J,Blessing R,White W,et al.Novel diagnostic test for acute stroke[J]. Stroke,2004;35(1):57-63.
[38] 郭 喆,张锦明.阿尔茨海默病的放射性分子显像探针研究进展[J]. 国际放射医学核医学分册,2006;30(4):199-202.
[39] Katzenschlager R,Lees AJ.Treatment of Parkinson's disease: l evodopa as the first choice[J]. J Neurol,2002;249(s2):II19-24.
[40] Schulte-Herbrüggen O,Braun A,Rochlitzer S,et al.Neurotrop hic factors-a tool for therapeutic strategies in neurological, neuropsy chiatric and neuroimmunological diseases[J]. Curr Med Chem,2007;14(22):2318-2329.
[41] 柯荔宁,王 玮,康仲涵.几类神经营养因子在血管性痴呆治疗中的应用前景[J]. 齐齐哈尔医学院学报,2005;26(2):169-171.
[42] 李鸿钧,马雁冰.胶质细胞源性神经营养因子家族研究进展 [J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册,2002;23(2):115-117.
[43] Storkebaum E,Lambrechts D,Dewerchin M,et al.Treatment of motoneuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of ALS[J]. Nat Neurosci,2005;8(1):85-92.
[44] Sahenk Z,Nagaraja HN,McCracken BS,et al.NT-3 promotes nerve regeneration and sensory improvement in CMT1A mouse mod els and in patients[J]. Neurology,2005;65(5):681-689.
[45] 杜 丽,牛争平.靶向神经营养因子在缺血性脑血管病中的作用[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2007;5(2):149-151.
[46] Moxley RT.Potential for growth factor treatment of muscle disease[J]. Current Opinion in Neurol,1994;7(5):427-434.
[47] Xia H,Mao Q,Eliason SL,et al.RNAi suppresses polyglutamine-i nduced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia[J]. Nat Med,2004;10(8):816-820.
[48] Dodart JC,Marr RA,Koistinaho M,et al.Gene delivery of hum an apolipoprotein E alters brain Abeta burden in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2005;102(4):1211-1216.
[49] Kaplitt MG,Feigin A,Tang C,et al.Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus(AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease:an open label,phase I trial[J]. Lancet,2007;369(9579):2097-2105.