

对一起汉滩病毒感染案例 44 年后长时效体液免疫应答的回顾性分析

张宇丝, 马 樱, 刘 蓓, 张 贲, 张春梅, 唐 康, 庄 然, 金伯泉

[摘要] **目的** 探讨汉滩病毒(hantaan virus, HTNV)感染者长时效体液免疫应答情况, 为研究长时效体液免疫应答规律提供参考依据。**方法** 采集 4 名 HTNV 感染者感染 44 年后的血清, 通过酶联免疫吸附试验和 HTNV 中和抗体检测技术检测分析患者血清中 HTNV 特异性抗体 IgM、IgG 及中和活性抗体滴度。**结果** 4 名 HTNV 感染者血清中均检测到不同滴度的 HTNV 特异性 IgG 抗体, 其滴度最高可达 1:800, HTNV 特异性 IgM 抗体均未检测到。此外, 在血清中也检测到不同滴度的中和活性抗体, 其滴度最高可达 1:10。**结论** HTNV 感染 44 年后体内仍存在长时效体液免疫应答, 其可以为感染者提供终身免疫保护。

[关键词] 汉滩病毒; 实验室感染; 免疫保护; 中和抗体

[中国图书资料分类号] R392

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-8134(2020)04-0324-03

DOI: 10.3969/j.issn.1007-8134.2020.04.008

Retrospective analysis of long-term immunity protection in a case of hantaan virus infection after 44 years

ZHANG Yu-si, MA Ying, LIU Bei, ZHANG Yun, ZHANG Chun-mei, TANG Kang, ZHUANG Ran, JIN Bo-quan*

Department of Immunology, College of Basic Medicine, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China

*Corresponding author, E-mail: immu_jin@fmmu.edu.cn

[Abstract] **Objective** To investigate the long-term humoral immune response in patients infected with hantaan virus (HTNV) and provide references for the study of long-term humoral immune response. **Methods** The sera from 4 patients infected with HTNV were collected after 44 years. The titers of HTNV-specific antibodies IgM and IgG as well as the neutralization antibody in their sera were analyzed by using enzyme linked immunosorbent assay and neutralization antibody test. **Results** Among the 4 HTNV-infected patients, the presence of different titers of HTNV-specific IgG antibodies were detected in the sera, and the titer was up to 1:800. But the HTNV-specific IgM antibodies were not detected. In addition, different titers of neutralization antibodies were also detected in their sera, the titer was up to 1:10. **Conclusions** There is a long-lasting humoral immune response in the body after 44 years of HTNV infection, and it provides a lifelong immune protection for the infected patients.

[Key words] HTNV; laboratory infection; immune protection; neutralization antibody

汉滩病毒(hantaan virus, HTNV)属于布尼亚病毒科汉坦病毒属,是肾综合征出血热(hemorrhagic fever with renal syndrome, HFRS)的主要病原体,主要在亚洲流行,病死率高达 12%^[1-3]。其暴发快、流行范围广、危害程度高,被归为乙类传染病。由于 HTNV 核衣壳蛋白(HTNV-nucleocapsid protein, HTNV-NP)在 HTNV 感染后数天内即可诱导机体产生特异性的 IgM 和 IgG 抗体,因此,临床上常通过检测患者血清中是否含有特异性抗体作为其血清学诊断金标准。目前,普遍认为 HFRS 是一种可终身免疫的传染病,但 HTNV 保护性抗体在体内存留时间及滴度情况尚不清楚。鉴于此,本研究采集感染 HTNV 44 年后的 4 名患者血清,通过对其体内的 HTNV 特异性抗体进行检测分析,研究其血清中特异性抗体及中和活性抗体的水平,为体液

免疫应答规律研究提供参考。

1 对象与方法

1.1 对象 在 2012 年选取 1968 年在原中国人民解放军第四军医大学基础医学院免疫学教研室工作的 4 名 HTNV 感染者作为研究对象,选取 1968 年同一实验室其他 2 名未感染 HTNV 的工作人员作为来自同一时期、同一实验室的阴性对照,选取本实验室从未接触过 HTNV 气溶胶的健康工作人员作为正常对照,选取 2012 年在原中国人民解放军第四军医大学唐都医院确诊为 HFRS 的 2 名男性患者作为阳性对照。所有 HFRS 患者诊断均符合原中华人民共和国卫生部颁布的《流行性出血热诊断标准》(WS 278-2008)^[4],并经血清学检测确认抗 HTNV 特异性抗体 IgM 或 IgG 阳性。本研究所有患者均知情同意,且研究获得医院伦理委员会批准。

1.2 标本采集 晨起空腹采集患者外周血 5 ml,置于真空采血管静置 2 h 后离心,3000 r/min,离心 15 min,分装后冻存于 -20℃ 冰箱,保存备用。

1.3 试剂和仪器 小鼠抗人 IgM (HB57) 与小鼠

[基金项目] 陕西省自然科学基金研究计划(2018JQ8060); 国家自然科学基金(81701555)

[作者单位] 710032 西安,空军军医大学基础医学院免疫学教研室(张宇丝、马樱、刘蓓、张贲、张春梅、唐康、庄然、金伯泉); 710021,西安医学院医学技术系(刘蓓)

[通信作者] 金伯泉, E-mail: immu_jin@fmmu.edu.cn

抗人 IgG (HB43) 单克隆抗体杂交瘤细胞株均购自 ATCC 公司, 单克隆抗体为本实验室自行纯化并标记辣根过氧化物酶。抗 GST 标签单克隆抗体与 GST-HTNV-NP 融合蛋白为本实验室自行制备。Vero E6 细胞株、HTNV 76-118 病毒株、HTNV 中和抗体 3D8 mAb 和 HTNV 检测抗体 1A8 mAb 由本校病原微生物教研室提供。包被缓冲液 (0.1 M NaHCO₃, pH 9.5)、抗体稀释液 (含 3% 胎牛血清的 PBST)、洗涤缓冲液 (0.1% PBS-Tween 20)、底物缓冲液、终止液等均为本实验室自行配置。

1.4 抗体检测 采用本实验室早期建立的 GST 捕获酶联免疫吸附试验检测血清中 HTNV-NP 特异性 IgM 和 IgG 抗体^[5]。采用本校病原微生物教研室建立的 HTNV 中和抗体检测方法, 对感染 HTNV 76-118 病毒株的 Vero E6 细胞实施细胞微量培养中和实验, 分析血清中抗 HTNV 中和抗体滴度^[6], 中和抗体滴度为可抑制 50% Vero E6 细胞被 HTNV 感染的最大血清稀释度。

2 结 果

2.1 一般资料 4 名 HTNV 感染者均为男性, 年龄均 > 80 岁。其中 2 名发病时出现少尿及急性肾功能衰竭症状, 临床诊断为重型, 其余 2 名临床诊断为轻型。详见表 1。

Table 1 Information of subjects											
项目	编号										
	IS1	IS2	IS3	IS4	P1	P2	US1	US2	C1	C2	
性别	男	男	男	男	男	男	男	女	女	女	
发病时年龄 (岁)	46	38	40	36	/	/	25	37	/	/	
采样时年龄 (岁)	90	82	84	80	69	24	69	81	24	27	
疾病状态	重型	重型	轻型	轻型	重型	轻型	健康	健康	健康	健康	

注: IS, 1968 年与 Wistar 大鼠接触并感染的工作人员; US, 1968 年与 Wistar 大鼠接触但未感染的工作人员; P, 2012 年在原中国人民解放军第四军医大学唐都医院确诊的 HFRS 患者; C, 在本实验室工作的健康人 (正常对照)

2.2 特异性抗体检测结果 4 名 HTNV 感染者血清标本中均检出 NP 特异性 IgG 抗体, 其滴度最低为 1:100, 最高为 1:800; HTNV-NP 特异性 IgM 抗体检测均为阴性。阳性对照中, 2 名新近感染者的抗体滴度均 > 1:6400; 阴性对照中, 同一时期在同一实验室工作的 2 名未感染人员及其余 2 名健康人正常对照血清中均未检测出 HTNV-NP 特异性抗体。详见表 2。

2.3 中和抗体检测结果 4 名 HTNV 感染者血清中均可检测出中和活性抗体, 其滴度最高可达 1:10。其余阴性对照及正常对照样本中均未检测出具有中和活性的抗体。详见表 2。

3 讨 论

HFRS 以发热、出血、急性肾功能损害为主要临床症状。据报道, 全世界每年约 100 000 例 HFRS 新发病例, 其中 90% 发生在我国, 陕西西安地区是我国 HFRS 的主要流行区^[7]。由于该病情危急、病死率高, 被列为国家重点防治传染病之一。HTNV 是引起 HFRS 的主要病原体, 属于布尼亚病毒科汉坦病毒属的单股负链 RNA 病毒, 其基因组由 S (小)、M (中) 和 L (大) 3 个区段分别编码 NP、包膜糖蛋白 (glycoprotein, GP) 和病毒 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp), 其中 NP 和 GP 是引起机体体液免疫应答、诱导中和抗体产生的主要免疫原^[8]。一直以来, HFRS 被认为是一种可终身免疫的传染病, 但目前尚无研究报道 HTNV 的保护性抗体在体内存留时间及滴度情况。因此, 进一步探讨 HTNV 感染者保护性抗体情况, 对于研究其长时效体液免疫应答规律具有重要意义。

以往研究报道, 疫情暴发后如果诊断与采样及时, 可在感染者体内同时检测到 HTNV 特异性的 IgG 和 IgM 抗体^[8-12]。本研究中, 4 名曾经感染过 HTNV 的患者体内均未检测到 IgM 抗体, 只有正在 HFRS 病程中的 2 名患者可检测到。上述结果表明, 病原特异性的 IgM 抗体可能通常出现在许多感染性疾病的早期阶段, 一般恢复期患者体内常无法检测到 IgM 抗体。此外, 本研究患者血清中都检测到了滴度从 1:5 ~ 1:10 不等的中和抗体, 在血清稀释 5 倍或 10 倍后仍具有中和 HTNV 感染的能力, 提示如果当他们遇到 HTNV 二次感染时, 具有中和活性的抗体可迅速中和病毒, 同时记忆 B 细胞可直接增殖分化成浆细胞并产生更多的抗体, 避免病毒的二次侵入, 这为 HFRS 作为终身免疫性疾病提供了更多的实验室检测证据。据了解, 之前实验室感染研究并未进行患者体内中和抗体水平的检测, 本研究则弥补了这一方面的空白。

HTNV 从啮齿类动物向人类的传播一般是通过吸入含有致病病毒的气溶胶发生的, 黑线姬鼠是公认的 HTNV 最常见的自然宿主^[3, 13]。此外, 在疫区与感染啮齿类动物排泄物密切接触的农民等人群同样易发生 HTNV 感染^[13-15]。除了自然途径感染外, 也存在实验室感染可能, 如动物房管理不善, 冬季野鼠入室偷食, 实验室饲养的小鼠和大鼠也可能会传播 HTNV, 引起实验室相关的 HFRS 暴发流行^[9-11, 16-17]。自 1978 年韩国学者 Lee 等^[18]第一次从黑线姬鼠身上分离出 HTNV 以来, 《柳叶刀》等杂志多次报道实验室获得性 HTNV 感

表 2 HTNV-NP 特异性抗体滴度
Table 2 Titers of HTNV-NP specific antibody

项目	编号										
	IS1	IS2	IS3	IS4	P1	P2	3D8 mAb	US1	US2	C1	C2
NP 特异性 IgG 抗体滴度	1 : 800	1 : 200	1 : 100	1 : 800	1 : 12 800	1 : 6400	ND	UD	UD	UD	UD
NP 特异性 IgM 抗体滴度	UD	UD	UD	UD	1 : 25 600	1 : 12 800	ND	UD	UD	UD	UD
中和抗体滴度	1 : 10	1 : 10	1 : 5	1 : 10	ND	ND	> 1 : 1000	UD	UD	UD	UD

注：IS. 1968 年与 Wistar 大鼠接触并感染的工作人员；US. 1968 年与 Wistar 大鼠接触但未感染的工作人员；P. 2012 年在原中国人民解放军第四军医大学唐都医院确诊的 HFRS 患者；C. 在本实验室工作的健康人（正常对照）；UD. 未检测出；ND. 未检测；3D8 mAb. 中和抗体（阳性对照）

染。其中，病毒来源可追溯至动物饲养员^[10-11, 16]、野生啮齿类动物^[9, 19]或实验用的啮齿类动物。关于 HFRS 实验室疫情的最早病例报道，有文献显示，1975 年在日本暴发的 HFRS 疫情可能是公开发表的首例实验室 HTNV 感染事件^[19]，但本研究中 1968 年发生在本校实验室 HFRS 疫情应该早于日本。从另一方面来看，实验室工作人员需要强化监测措施和培训，以提高对传染病的敏感性和警惕性，降低实验室感染风险。

综上所述，本研究发现了 HTNV 感染 44 年后患者体内仍能检测到针对 HTNV-NP 的 IgG 抗体及具有中和活性的抗体，对于理解 HTNV 感染后的记忆性体液免疫应答规律，明确其他新发传染病是否为终身免疫性疾病提供了判断依据。不足的是，由于本研究中当事人年事已高，采集到的样本有限，关于同种属病毒交叉检测及其他反映细胞或体液免疫应答程度指标的检测还需后续更深入的研究。

【参考文献】

[1] Zhang YZ, Dong X, Li X, *et al.* Seoul virus and hantavirus disease, Shenyang, People's Republic of China [J]. *Emerg Infect Dis*, 2009, 15(2):200-206.

[2] Vaheri A, Strandin T, Hepojoki J, *et al.* Uncovering the mysteries of hantavirus infections [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2013, 11(8):539-550.

[3] Jonsson CB, Figueiredo LT, Vapalahti O. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2010, 23(2):412-441.

[4] 中华人民共和国卫生部. WS 278-2008 流行性出血热诊断标准 [S]. 北京: 人民卫生出版社, 2008.

[5] Li PY, Yu L, Wu XA, *et al.* Modification of the adenoviral transfer vector enhances expression of the hantavirus fusion protein GnS0.7 and induces a strong immune response in C57BL/6 mice [J]. *J Virol Methods*, 2012, 179(1):90-96.

[6] Yan G, Zhang Y, Ma Y, *et al.* Identification of a novel B-cell epitope of hantaan virus glycoprotein recognized by neutralizing 3D8 monoclonal antibody [J]. *J Gen Virol*, 2012, 93(Pt

12):2595-2600.

[7] Jiang H, Du H, Wang L, *et al.* Hemorrhagic fever with renal syndrome: pathogenesis and clinical picture [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2016. DOI: 10.3389/fcimb.2016.00001.

[8] Yi J, Xu Z, Zhuang R, *et al.* Hantaan virus RNA load in patients having hemorrhagic fever with renal syndrome: correlation with disease severity [J]. *J Infect Dis*, 2013, 207(9):1457-1461.

[9] Lee HW, Johnson KM. Laboratory-acquired infections with hantaan virus, the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever [J]. *J Infect Dis*, 1982, 146(5):645-651.

[10] Desmyter J, LeDuc JW, Johnson KM, *et al.* Laboratory rat associated outbreak of haemorrhagic fever with renal syndrome due to hantaan-like virus in Belgium [J]. *Lancet*, 1983. DOI: 10.1016/s0140-6736(83)90797-3.

[11] Lloyd G, Bowen ET, Jones N, *et al.* HFRS outbreak associated with laboratory rats in UK [J]. *Lancet*, 1984. DOI: 10.1016/s0140-6736(84)91413-2.

[12] Brummer-Korvenkontio M, Vaheri A, Hovi T, *et al.* Nephropathia epidemica: detection of antigen in bank voles and serologic diagnosis of human infection [J]. *J Infect Dis*, 1980, 141(2):131-134.

[13] Schmaljohn C, Hjelle B. Hantaviruses: a global disease problem [J]. *Emerg Infect Dis*, 1997, 3(2):95-104.

[14] Chen HX, Qiu FX. Epidemiologic surveillance on the hemorrhagic fever with renal syndrome in China [J]. *Chin Med J (Engl)*, 1993, 106(11):857-863.

[15] Vapalahti K, Paunio M, Brummer-Korvenkontio M, *et al.* Puumala virus infections in Finland: increased occupational risk for farmers [J]. *Am J Epidemiol*, 1999, 149(12):1142-1151.

[16] Douron E, Moriniere B, Matheron S, *et al.* HFRS after a wild rodent bite in the Haute-Savoie--and risk of exposure to hantaan-like virus in a Paris laboratory [J]. *Lancet*, 1984. DOI: 10.1016/s0140-6736(84)92187-1.

[17] Wong TW, Chan YC, Yap EH, *et al.* Serological evidence of hantavirus infection in laboratory rats and personnel [J]. *Int J Epidemiol*, 1988, 17(4):887-890.

[18] Lee HW, Lee PW, Johnson KM. Isolation of the etiologic agent of Korean Hemorrhagic fever [J]. *J Infect Dis*, 1978, 137(3):298-308.

[19] Umenai T, Lee HW, Lee PW, *et al.* Korean haemorrhagic fever in staff in an animal laboratory [J]. *Lancet*, 1979. DOI: 10.1016/s0140-6736(79)91948-2.

(2020-02-27 收稿 2020-07-24 修回)
(本文编辑 揣征然)