

浙江省仙居县 2012—2013 年流行性乙型脑炎病毒基因特征和人群血清学研究

严菊英 潘金仁 张意坚 周佳悦 倪红年 张严峻

【摘要】 目的 分析浙江省仙居县媒介蚊虫中流行性乙型脑炎(乙脑)病毒(JEV)基因型别和健康人群乙脑抗体水平。**方法** 2012—2013 年在浙江省仙居乙脑监测点采集蚊虫,分离 JEV,测定其 E 基因核苷酸序列,并进行同源性与进化分析;对监测点的 642 名健康人群,在乙脑流行季节前后,分别采集双份血清,共计样本 1 263 份,检测 JEV 中和抗体。**结果** 采集 11 650 只蚊虫标本,分离 25 株 JEV,同源性分析显示,2012—2013 年分离到的 JEV 与浙江省 1982—2010 年 JEV 之间 E 基因核苷酸同源性为 87.8%~99.7%,与乙脑疫苗株 SA14-14-2 之间核苷酸同源性为 87.7%~88.0%。E 基因进化分析显示,2012—2013 年 JEV 属于基因 I 型,E 基因编码病毒毒力和抗原表位的位点未发生改变。健康人群 JEV 中和抗体阳性率为 31.5%~42.0%,抗体几何平均滴度(GMT)为 1:2.56~1:3.53,流行前后人群抗体阳性率($\chi^2 \leq 1.76, P > 0.05$)和 GMT($u \leq 0.64, P > 0.5$)差异均无统计学意义。**结论** 2012—2013 年浙江省仙居县蚊媒中携带基因 I 型 JEV,健康人群 JEV 中和抗体阳性率 $\leq 42.0\%$,流行前后抗体阳性率和中和 GMT 均无明显变化。

【关键词】 流行性乙型脑炎病毒;基因型;中和抗体;健康人群

Study on the genotypic characteristics of Japanese encephalitis virus and serology in the healthy population of Zhejiang province, 2012–2013 Yan Juying¹, Pan Jinren¹, Zhang Yijian², Zhou Jiayue¹, Ni Hongnian², Zhang Yanjun¹. 1 Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310051, China; 2 Xianju County Center for Disease Control and Prevention

Corresponding author: Yan Juying, Email: jyayan@cdc.zj.cn

This work was supported by a grant from the National Science and Technology Support Projects for the "Twelfth Five-Year Plan" of China (No. 2012ZX10004-210-002).

【Abstract】 Objective To understand the genotypic characteristics and the neutralizing antibody levels of Japanese encephalitis virus (JEV) and Japanese encephalitis (JE) in both vector mosquitoes and in healthy people of Zhejiang province. **Methods** Virus was isolated from mosquitos sampled from the Monitoring Stations located in Xianju county during 2012 to 2013. Phylogenetic and homological studies were carried out on the E gene. A total of 1 263 blood specimens from 642 healthy people were collected before and after the seasons of JE epidemics. JEV neutralizing antibody was detected by the micro-neutralization test. **Results** Twenty-five JEV strains were isolated from a total of 11 650 mosquitoes. The identity of nucleotide appeared as 87.8%–99.7% both from 2012 to 2013 and from 1982 to 2010 while as 87.7%–88.0% with vaccine strain SA14-14-2, in Zhejiang. The phylogeny tree of E gene indicated that the newly isolated virus belonged to genotype I but no mutation of amino acid sequence coding conformational epitope was identified in the envelop protein. Both positive rates and the geometric mean titer (GMT) of neutralizing antibody in healthy people were 31.5%–42.0% and 1:2.56–1:3.53 in Xianju county, during 2012 and 2013, respectively. Both of the two positive rates ($\chi^2 \leq 1.76, P > 0.05$) and the two GMTs ($u \leq 0.64, P > 0.5$) for antibodies pre or post the epidemic season did not show significant differences. **Conclusion** JEV isolated in Xianju during 2012 and 2013 belonged to genotype I. The positive rates of JEV neutralizing antibody from healthy people in Xianju were less than 42.0%, which showed no significant differendes pre or post JE epidemic season.

【Key words】 Japanese encephalitis virus; Genotype; Neutralizing antibody; Healthy people

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.10.016

基金项目:国家“十二五”科技重大专项(2012ZX10004-210-002)

作者单位:310051 杭州,浙江省疾病预防控制中心(严菊英、潘金仁、周佳悦、张严峻);仙居县疾病预防控制中心(张意坚、倪红年)

通信作者:严菊英, Email: jyayan@cdc.zj.cn

流行性乙型脑炎(乙脑)病毒(JEV)可引起人类急性中枢神经系统疾病。为掌握浙江省媒介蚊虫中 JEV 的基因型别和人群 JEV 抗体水平,于 2012—2013 年对仙居县乙脑监测点的蚊虫样本和健康人群血清开展病原学和血清学研究。

材料与方法

1. 标本来源:2012—2013 年 6—8 月在浙江省仙居县乙脑监测点(官路镇北岙村和白塔镇东安村)采集猪、牛圈和人房中蚊虫,于 20:00 悬挂紫外诱蚊灯,次日 04:00—05:00 将诱蚊灯取回,在实验室内室温饲养,待蚊血消化后,用电动吸蚊器收集蚊虫。标本采集后于-20℃冰箱放置 10 min,剔除雄蚊,对雌蚊进行分类,分别装入冻存管,每管 40~50 只为 1 批,标本用干冰运输到省级乙脑实验室,-80℃低温冰箱保存。2012 年和 2013 年分别采集蚊虫 6 110 只和 5 540 只,其中三带喙库蚊分别为 4 290 只(70.2%)和 2 289 只(41.3%)。采用随机抽样方法在监测点选择 5 个不同年龄组健康人群,分别于 2012—2013 年乙脑流行前的 5 月和流行后的 11 月采集同一人血液标本,同时现场进行一般资料、免疫接种史、牲畜饲养等流行病学调查,共调查 642 人,采集血液标本 1 263 份,其中 2012 年 279 人,采集样本 555 份,2013 年 363 人,采集样本 708 份。样本分离血清后,送省级乙脑实验室。

2. 病毒分离及鉴定:从-80℃冰箱中取出蚊虫冻存管,将蚊虫标本迅速倒入研磨器中,加入 Hanks 液 1.5 ml 清洗,吸出液体后加入 1.5 ml 研磨液(不含牛血清的维持液)反复研磨至组织碎片基本消失为止。将研磨液吸入离心管,4℃12 000 r/min,离心 30 min。吸取上清液用于病毒分离。参见文献[1]采用 C6/36 和 BHK-21 细胞(来源于中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所脑炎室)进行病毒分离,阳性分离物采用 JEV 荧光 RT-PCR 方法进行验证^[2]。

3. 病毒 E 基因序列分析:采用德国 Qiagen 公司 Rneasy mini 试剂盒提取核酸。E 基因扩增采用 RT-PCR 法,引物及方法参见文献[3]。PCR 产物纯化后由生工生物工程(上海)有限公司进行测序。数

据处理和序列比对采用 DNAMAN 和 ClustalX 软件,进化树构建采用 Mega 软件,建树方法采用邻接法,可信度评估采用 1 000 bootstrap 值。

4. 中和抗体测定:采用微量细胞中和试验法。将待检血清 56℃灭活 30 min,从 1:10 开始稀释,2 倍系列稀释至 1:320,加等量病毒悬液(100 TCID₅₀),置 37℃5%CO₂培养箱中和 1.5 h,将血清和病毒混合液加入到已长成单层的 BHK-21 细胞上,置 37℃、5%CO₂培养箱中培养,7 d 判断结果。抗体几何平均滴度(GMT)≥1:10 判定为阳性。JEV 株为本实验室从 2012 年仙居乙脑监测点蚊虫样本中分离获得(ZJ12-3 株),病毒滴度为 10^{5.8}TCID₅₀/ml。

5. 统计学分析:采用 Excel 2003 软件进行统计学分析。

结 果

1. 一般情况:采集三带喙库蚊(*Culex tritaeniorhynchus*)、淡色库蚊(*Cx. pipiens pallens*)、中华按蚊(*Anopheles sinensis*)和骚扰阿蚊(*Armigeres subalbatus*)3 属 4 种共 11 650 只蚊虫标本,其中以三带喙库蚊最多,占采集蚊虫总数的 56.5%(表 1)。

2. 病毒分离:将蚊虫标本分为 152 批进行研磨处理,所有上清液在 BHK-21 和 C6/36 细胞上连续盲传 3 代,共获得 25 株病毒分离物(21 株分离于三带喙库蚊、2 株分离于淡色库蚊、2 株分离于中华按蚊),在连续传代过程中,均能够引起 C6/36 和 BHK-21 细胞产生稳定的细胞病变。25 株病毒经 JEV 荧光 RT-PCR 法检测,病毒核酸均为阳性(表 1)。

3. E 基因同源性分析:从 25 株 JEV 中选取 13 株扩增病毒 E 基因,并进行核苷酸(nt)序列测定,所有测序毒株 E 基因全长 1 500 个 nt,推导编码 500 个氨基酸(aa)。浙江省新分离 JEV 与浙江省 2007—2010 年 JEV 之间 nt 和 aa 同源性分别为 98.6%~99.3%和 99.2%~99.8%,与浙江省 1982—1983 年 JEV 之间 nt 和 aa 同源性分别为 87.8%~88.3%和 98.4%~99.0%,与疫苗株 SA14-14-2 之间 nt 和 aa 同源性分别为 87.7%~88.0%和 96.4%~97.2%。

4. E 蛋白毒力位点分析:浙江省 2012—2013 年

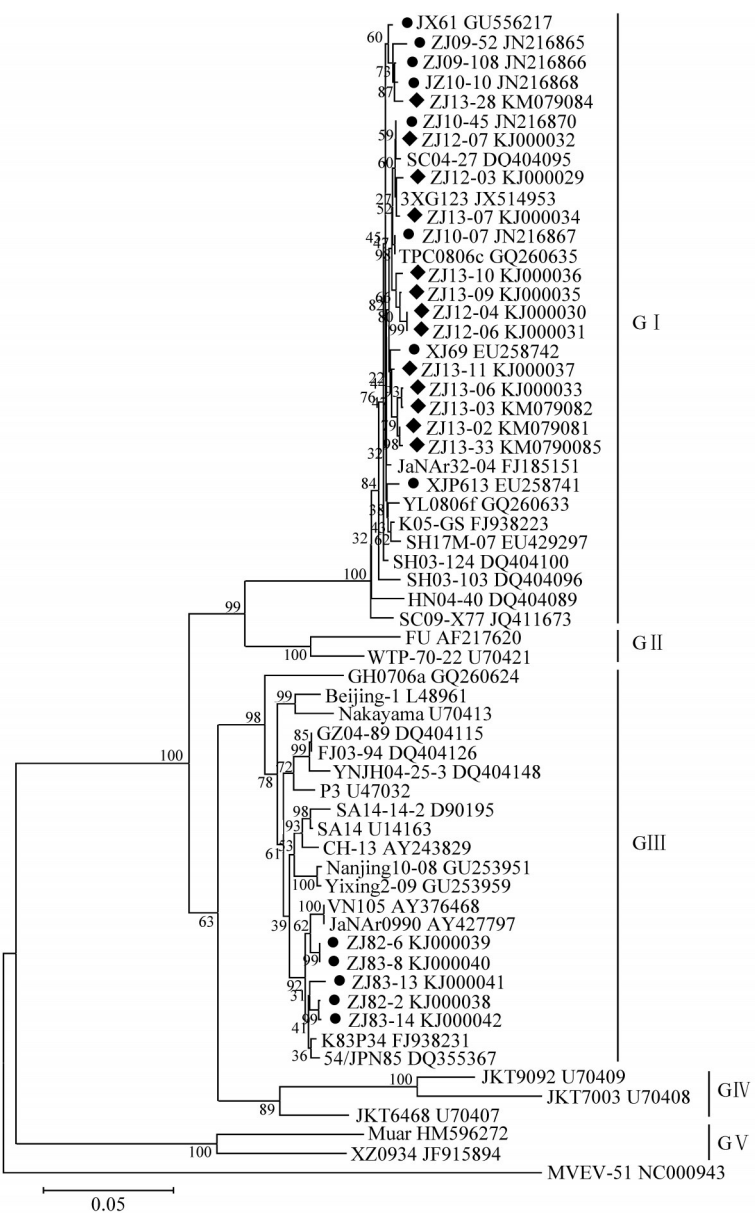
表 1 2012—2013 年仙居县监测点蚊虫采集数量及病毒分离

年份	蚊虫数量 (只)	蚊虫种类				蚊虫数量 (批)	蚊虫 批数	病毒阳性		
		三带喙 库蚊	淡色 库蚊	中华 按蚊	骚扰 阿蚊			蚊虫种类		
								三带喙库蚊	淡色库蚊	中华按蚊
2012	6 110	4 290	131	1 224	465	92	4	3	1	0
2013	5 540	2 289	247	2 786	218	60	21	18	1	2
合计	11 650	6 579	378	4 010	683	152	25	21	2	2

JEV 与强毒株(P3、Beijing-1)相比,8 个 E 蛋白相关毒力决定关键位点(E107、E138、E176、E177、E264、E279、E315、E439)均未发生改变(表 2),浙江省 2012—2013 年 JEV 与浙江省 2007—2010 年 JEV 在 E 蛋白区 14 个主要 aa 位点均相同,与浙江省 1982—1983 年 JEV 比较存在 4 个共同位点差异(E129、E222、E327、E366),与疫苗株 SA14-14-2 比较存在 14 个共同位点差异。

5. 系统进化分析:选择不同分离年代、分离国家、宿主来源、基因型别的 60 株 JEV E 基因进行系统进化分析(图 1),结果显示,全球 JEV 分为 5 个基因型,2012—2013 年浙江省 JEV 均属于基因 I 型(G I),与浙江省 2007—2010 年 JEV、SH03-124 株和 TPC0806c 株位于同一个进化分支上,亲缘关系很近,浙江省 1982—1983 年 JEV 则位于基因 III 型(G III)进化分支上。

6. 人群 JEV 中和抗体水平:2012 年共调查 5 个年龄组 279 人,采集乙脑流行前后标本分别为 279 份和 276 份,JEV 中和抗体阳性分别为 93 份和 87 份,阳性率分别为 33.3% 和 31.5% ($\chi^2=0.68, P>0.05$),GMT 分别为 1:2.56 和 1:2.68 ($u=0.64, P>0.5$);2013 年共调查 363 人,采集流行前后标本分别为 363 份和 345 份,抗体阳性分别为 152 份和 145 份,阳性率分别为 41.9% 和 42.0% ($\chi^2=1.76, P>0.05$),GMT 分别为 1:3.74 和 1:3.53 ($u=0.49, P>0.5$),2012 年和 2013 年流行前后乙脑抗体阳性率和



注: MVEV-51 作为外群对照;●和◆分别为浙江省 1982—2010 年和 2012—2013 年 JEV, 毒株命名: 省份(ZJ)分离年份/毒株编号/accession number; 下载序列为: 毒株名称/accession number

图 1 浙江省 JEV 在 E 基因区进化分析

表 2 浙江省 JEV E 蛋白主要位点 aa 差异比较

毒株	aa 位点													
	107	129	138	176	177	222	244	264	279	315	327	366	439	447
SA14-14-2	F	T	K	V	A	A	G	H	M	V	S	A	R	D
ZJ13-11	L	M	E	I	T	S	E	Q	K	A	T	S	K	G
ZJ12-07	L	M	E	I	T	S	E	Q	K	A	T	S	K	G
ZJ10-07	L	M	E	I	T	S	E	Q	K	A	T	S	K	G
ZJ82-2	L	T	E	I	T	A	E	Q	K	A	S	A	K	G
Beijing-1	L	T	E	I	T	A	E	Q	K	A	S	A	K	G
P3	L	T	E	I	T	A	E	Q	K	A	S	A	K	G

注: F 为苯丙氨酸, T 为苏氨酸, K 为赖氨酸, V 为缬氨酸, A 为丙氨酸, G 为甘氨酸, H 为组氨酸, M 为蛋氨酸, S 为丝氨酸, R 为精氨酸, D 为天冬氨酸, L 为亮氨酸, E 为谷氨酸, I 为异亮氨酸, Q 为谷氨酰胺; E107、E138、E176、E177、E264、E279、E315、E439 为与毒力有关的 8 个 aa 位点; SA14-14-2 为疫苗株; ZJ13-11、ZJ12-07 为 2012、2013 浙江分离株; ZJ10-07、ZJ82-2 为 2010 年及 1982 年分离株; Beijing-1 和 P3 为强度株

GMT 差异均无统计学意义(表 3)。

讨 论

2012—2013 年在仙居县采集的 1 万余只蚊虫标本中从三带喙库蚊、淡色库蚊和中华按蚊中共分离到 25 株 JEV, 其中三带喙库蚊中分离到 21 株, 提示三带喙库蚊是该地区传播乙脑的主要媒介蚊种。

E 基因同源性分析显示, 浙江省 2012—2013 年 JEV 与浙江省 2007—2010 年 JEV 比较, E 基因区 nt 和 aa 的差异分别为 $\leq 1.4\%$ 和 $\leq 0.8\%$, 与浙江省 1982—1983 年 JEV 比较, nt 和 aa 的差异分别为 $\leq 12.3\%$ 和 $\leq 1.6\%$, 提示浙江省 JEV 分离株虽然前后时间跨度 30 余年, 但在外环境中循环的 JEV 变异较小。

对比研究 JEV 疫苗株与野毒株的毒力显示, E 蛋白中有一些关键位点是影响 JEV 毒力的关键位点^[4], 特别是 E138, 如果由谷氨酸(Glu)变为赖氨酸(Lys), 则可能影响病毒复制周期, 进而引起病毒的毒性降低^[5]。在 E 蛋白 500 个 aa 序列中, 浙江省 2012—2013 年 JEV 与浙江省 2007—2010 年 JEV 比较在 14 个共同位点完全一致, 与疫苗株 SA-14-14-2 比较存在 14 个共同位点差异, 而与 JEV 强毒株(P3、Beijing-1)比较, 在 8 个重要 aa 位点完全相同, 尤其是 E138 位点均为 Glu, 毒力并未降低, 提示浙江省 JEV 分离株均具有野毒株的特征。在 JEV E 蛋白的三个活性结构域内, 中和位点主要集中在结构域 III 的 E337-345、E377-382、E397-403 三个区域内^[4], 其变异会导致抗原性的改变^[6], 浙江省 JEV 在该区域与疫苗株 SA14-14-2 完全一致。通过对浙江省 JEV 的 E 区段 aa 序列分析, 推测现在使用的乙脑疫苗株在理论上可以覆盖浙江乙脑流行株。

采用 E 基因全长 1 500 nt 进行基因分型, 将全球 JEV 分为 5 个基因型(I ~ V), 我国存在 I、III、V 基因型, 目前主要流行株为 I 型。浙江省 2012—

2013 年 JEV 属于 I 型, 与浙江省 2007—2010 年 JEV 基因型相同, 而浙江省 1982—1983 年 JEV 属于 III 型, 前后相差 30 年左右, 浙江省 JEV 由 III 型转变为 I 型。近年来, 中国及亚洲的其他国家如日本、越南和泰国也发生了类似 JEV 基因型别的更替^[7-10], 基因 I 型 JEV 已成为亚洲地区的最主要基因型别^[11], 浙江省的情况与国内外类似。JEV 只有 1 个血清型, 推测由基因 III 型 JEV 制备的乙脑疫苗, 无论是灭活疫苗(P3 株)还是减毒活疫苗(SA14-14-2 株), 能够保护各个型别的 JEV, 但保护效果会有一定差异。通过病毒基因组序列分析以及使用活病毒进行生物学实验也初步验证了该观点^[12, 13], 但是仍需进一步深入开展乙脑疫苗对不同型 JEV 保护率的研究。

健康人群免疫水平是评价人群对 JEV 免疫状况的重要指标, 开展健康人群乙脑抗体水平监测, 掌握人群免疫状况, 可以了解当地人群乙脑免疫水平特征。仙居县 2012—2013 年健康人群乙脑抗体阳性率为 31.5% ~ 42.0%, 比陕西省铜川市乙脑低流行区人群抗体阳性率(24.07% ~ 27.31%)高^[14], 低于河南省洛阳市人群抗体阳性率(46.53% ~ 46.88%)^[15]。经过一个乙脑流行季节后, 流行前后人群乙脑抗体阳性率没有明显变化, GMT 无明显上升, 与陕西省安康和铜川地区监测的乙脑流行前后人群抗体阳性率无明显变化相似^[14]。抗体阳性率最高的年龄组均为 >60 岁人群, 该年龄组人群未接种过乙脑疫苗, 这可能与浙江省 20 世纪 60 年代和 70 年代初曾发生乙脑大流行(1966—1967 年乙脑发病率为 46.4/10 万 ~ 47.5/10 万), 该年龄段人群在乙脑大流行期间由于自然感染和隐性感染, 获得了比较稳固的乙脑免疫力有关, 与陕西省和云南省曲靖市调查的在 >60 岁组没有乙脑疫苗免疫史的人群中但抗体阳性率仍有 97.5% 和 90.05% 的结果相一致^[14], 提示自然感染是影响人群乙脑抗体水平的重要因素。仙居县虽然大年龄组人群(60 岁组)抗体阳性率很高(>88.6%), 但 <7 岁年龄组人群抗体阳性率比较

表 3 浙江省仙居县健康人群流行前后乙脑中和抗体水平

年龄组 (岁)	2012 年流行前			2012 年流行后			2013 年流行前			2013 年流行后		
	检测数	阳性数	阳性率 (%)	检测数	阳性数	阳性率 (%)	检测数	阳性数	阳性率 (%)	检测数	阳性数	阳性率 (%)
<7	141	19	13.5	139	24	17.3	170	33	19.4	168	32	19.0
7~	35	13	37.1	35	8	22.9	53	8	15.1	50	13	26.0
15~	36	15	41.7	35	10	28.6	38	19	50.0	38	20	52.6
20~	32	21	65.6	32	14	43.8	55	47	85.5	42	37	88.1
60~	35	25	71.4	35	31	88.6	47	45	95.7	47	43	91.5
合计	279	93	33.3	276	87	31.5	363	152	41.9	345	145	42.0

低($\leq 19.4\%$),为乙脑易感人群,因此,在乙脑传播媒介广泛存在的情况下,做好乙脑疫苗基础免疫和加强免疫工作,对提高人群乙脑免疫力降低乙脑发病率至关重要。

(仙居县疾病预防控制中心完成样本采集工作,特此志谢)

参 考 文 献

- [1] Yan JY, Tang XW, Fan FN, et al. Study on the molecular characteristics of Japanese encephalitis virus living in vector mosquitoes, in Zhejiang province in 2009–2010 [J]. Chin J Epidemiol, 2012, 33(1): 78–81. (in Chinese)
严菊英,唐学雯,范飞能,等. 浙江省部分地区 2009—2010 年蚊媒中乙脑病毒分子流行病学特征研究[J]. 中华流行病学杂志, 2012, 33(1): 78–81.
- [2] Xie RH, Xu F, Zhu HP, et al. Development and evaluation of assay for the detection of Japanese TaqMan-based one-step reverse transcription polymerase chain reaction encephalitis virus [J]. Chin J Epidemiol, 2009, 30(3): 277–280. (in Chinese)
谢荣辉,徐芳,朱函坪,等. 一步法流行性乙型脑炎病毒 TaqMan 荧光定量反转录聚合酶链反应方法的建立及应用[J]. 中华流行病学杂志, 2009, 30(3): 277–280.
- [3] Obara M, Yamauchi T, Watanabe M, et al. Continuity and change of Japanese encephalitis virus in Toyama prefecture [J]. Japan Am J Trop Med Hyg, 2011, 84(5): 695–708.
- [4] Li MH, Fu SH, Chen WX, et al. Genotype V Japanese encephalitis virus is emerging [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2011, 5(7): e1231.
- [5] Gao XY, Nasci RD, Liang GD. The neglected arboviral infections in mainland China [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2010, 4(4): e624.
- [6] Wu SC, Lin CW. Neutralizing peptide ligands selected from phage-displayed libraries mimic the conformational epitope on domain III of the Japanese encephalitis virus envelope protein [J]. Virus Res, 2001, 76: 59–69.
- [7] Sun YJ, Zhang HL. Distribution and gene typing of Japanese encephalitis virus in China [J]. Chin J Vector Biol Control, 2012, 23(5): 436–439. (in Chinese)
孙玉杰,张海林. 中国流行性乙型脑炎病毒基因型及分布[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2012, 23(5): 436–439.
- [8] Ma SP, Yoshida Y, Makino Y, et al. A major genotype of Japanese encephalitis virus currently circulating in Japan [J]. Am J Trop Med Hyg, 2003, 69(2): 151–154.
- [9] Nga PT, Del CPM, Cuong VD, et al. Shift in Japanese encephalitis virus (JEV) genotype circulating in northern Vietnam: implications for frequent introductions of JEV from Southeast Asia to East Asia [J]. J Gen Virol, 2004, 85(Pt 6): 1625–1631.
- [10] Nitatpattana N, Dubot-Pères A, Gouilh MA, et al. Change in Japanese encephalitis virus distribution, Thailand [J]. Emerg Infect Dis, 2008, 14(11): 1762–1765.
- [11] Pan XL, Liu H, Wang HY, et al. Emergence of genotype I of Japanese encephalitis virus as the dominant genotype in Asia [J]. J Virol, 2011, 85(19): 9847–9853.
- [12] Wang HY, Liang GD. Comparison of nucleotide and deduced amino acid sequences of E gene of the newly isolated Japanese encephalitis virus strains and inactivated vaccine strain P3 [J]. Chin J Exp Clin Virol, 2006, 20(1): 56–60. (in Chinese)
王环宇,梁国栋. 中国分离乙脑病毒与灭活疫苗株(P3株)E 基因差异分析[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2006, 20(1): 56–60.
- [13] Liu X, Yu Y, Li M, et al. Study on the protective efficacy of SA14–14–2 attenuated Japanese encephalitis against different JE virus isolates circulating in China [J]. Vaccine, 2011, 29(11): 2127–2130.
- [14] Zhang SB, Li P, Liu XZ, et al. Analysis on Japanese B encephalitis virus neutralization antibody titer in health people before and after epidemic season and the ratio of inapparent infection and apparent infection [J]. Chin J Dis Control Prev, 2012, 16(3): 222–225. (in Chinese)
张少白,李平,刘西珍,等. 流行季节前后流行性乙型脑炎病毒中和抗体及隐性感染和显性感染比值分析[J]. 中华疾病控制杂志, 2012, 16(3): 222–225.
- [15] Tang XY, Ma HX, Xu C, et al. Surveillance of healthy people's Japanese encephalitis neutralizing antibody in sonic areas of Henan province [J]. Chin J Exp Clin Virol, 2011, 25(6): 401–404. (in Chinese)
唐晓燕,马红霞,徐超,等. 河南省部分地区健康人群流行性乙型脑炎病毒中和抗体监测[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2011, 25(6): 401–404.

(收稿日期: 2014–05–26)

(本文编辑: 万玉立)