

浙江省部分地区2009—2010年蚊媒中乙型脑炎病毒分子流行病学特征研究

严菊英 唐学雯 范飞能 张意坚 罗央努 应永平 沈静 张严峻

【摘要】 目的 了解浙江省部分地区蚊媒携带流行性乙型脑炎(乙脑)病毒(JEV)情况及其分子流行病学特征。方法 2009—2010年7—8月从浙江省慈溪市和仙居县乙脑监测点采集蚊13 620只,利用荧光定量PCR方法检测蚊中JEV核酸,用BHK-21细胞分离病毒,扩增JEV分离株E基因,然后选择6株进行测序并进行同源性分析。结果 慈溪和仙居监测点蚊中JEV带病毒率分别为17.0%(27/159)和3.4%(1/29);从2010年143批蚊中分离到22株JEV,分离率为15.4%。6株测序株E基因全长均为1500个核苷酸(nt),推导编码500个氨基酸(aa),未发现nt插入和丢失,nt和aa同源性分别为99.2%~99.8%和100.0%,与浙江省2007—2008年JEV分离株的nt和aa同源性分别为99.1%~99.3%和99.2%~99.8%,与乙脑疫苗株SA14-14-2同源性分别为87.6%~88.0%和97.8%。E基因进化树显示,6株测序株位于基因I型分支上。结论 浙江省慈溪市和仙居县监测点蚊媒携带JEV,其中慈溪监测点蚊媒中乙脑带病毒率明显高于仙居监测点,JEV分离株均为基因I型。

【关键词】 乙型脑炎病毒; 基因分型

Study on the molecular characteristics of Japanese encephalitis virus living in vector mosquitoes, in Zhejiang province, 2009–2010 YAN Ju-ying¹, TANG Xue-wen¹, FAN Fei-neng², ZHANG Yi-jian³, LUO Yang-nu², YING Yong-ping³, SHEN Jing¹, ZHANG Yan-jun¹. 1 Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310051, China; 2 Cixi City Center for Disease Control and Prevention; 3 Xianju County Center for Disease Control and Prevention
Corresponding author: YAN Ju-ying. Email: jyyan1960@hotmail.com
This work was supported by a grant from the National Science and Technology Major Project of China (No. 2009ZX10004-210).

【Abstract】 Objective To investigate the molecular characteristics of Japanese encephalitis virus (JEV) living in vector mosquitoes, from Zhejiang province. **Methods** A total of 13 620 mosquitoes were collected from the monitoring stations located in Cixi city and Xianju county in Zhejiang province, in July and August, 2009–2010. Nucleic acid of JEV from the mosquitoes was monitored by using real-time RT-PCR. The virus strains were isolated with BHK-21 cell line, with E genes of the isolated viruses amplified, sequenced and their phylogeny and homology analyzed. **Results** The positive rates of JEV for those mosquitoes collected in the stations of Cixi and Xianju were 17.0% (27/159) and 3.4% (1/29), respectively. Twenty-two JEV strains were isolated, accounted for 15.4% among the 143 batches of mosquitoes collected in 2010. All E genes in the 6 sequenced virus isolates contained 1500 nucleotides encoding 500 amino acids, in which no inserts and deletions were identified. The identity rates of nucleotide and amino acid in E gene were 99.2%–99.8% and 100.0% among the 6 JEV strains isolated from Zhejiang, 99.1%–99.3% and 99.2%–99.8% between the Zhejiang strains in 2009–2010 and the Zhejiang strains in 2007–2008, respectively, 87.6%–88.0% and 97.8% between the 6 Zhejiang strains and the vaccine strain SA14-14-2 of JEV, respectively. The phylogeny tree of E gene indicated that the JEV isolates in Zhejiang during 2009–2010 was located in the branch of the genotype I. **Conclusion** Mosquitoes collected from Cixi and Xianju areas carried JEV, with the rate of JEV in Cixi higher than in Xianju. All the Zhejiang isolates in 2009–2010 were proven to be the genotype I of JEV.

【Key words】 Japanese encephalitis virus; Genotype

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2012.01.018

基金项目: 国家科技重大专项(2009ZX10004-210)

作者单位: 310051 杭州, 浙江省疾病预防控制中心(严菊英、唐学雯、沈静、张严峻); 慈溪市疾病预防控制中心(范飞能、罗央努); 仙居县疾病预防控制中心(张意坚、应永平)

通信作者: 严菊英, Email: jyyan1960@hotmail.com

流行性乙型脑炎(乙脑)主要在中国、日本和越南等亚洲国家流行^[1]。浙江省属于乙脑中等流行区,近几年乙脑发病率维持在0.5/10万以下,年发病数在100例左右。为了进一步降低乙脑发病率,掌握浙江省蚊媒中乙脑病毒(JEV)带病毒情况和JEV分子流行病学特征,2009—2010年对浙江省乙脑监测点蚊虫开展乙脑病原学研究。

材料与方 法

1. 标本来源及处理:浙江省慈溪市和仙居县乙脑监测点,蚊虫采集地点为慈溪市的观海卫镇、周巷镇和横河镇,仙居县福应乡三亩田村。2009年和2010年7月下旬至8月上旬采用诱蚊灯和电动吸蚊器采集猪圈和牛圈中的蚊虫。标本放置-20℃冰箱10 min,剔除雄蚊对雌蚊进行分类,分装至冻存管,每管40~50只,标本号登记后保存于低温冰箱,用干冰运输至省级乙脑实验室,-80℃低温冰箱保存。2009年和2010年分别采集蚊6470只和7150只,其中三带喙库蚊分别为5250只(81.1%)和5345只(74.8%)。-80℃低温冰箱中取出蚊虫冻存管,将标本迅速倒入研磨器中,加入Hanks液1.5 ml清洗,然后加入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核酸提取或病毒分离。

2. JEV分离、鉴定:采用细胞分离法,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。取已处理的蚊标本上清液接种于BHK-21细胞,每份样本接种2管,每管接种200 μl,置于37℃5%CO₂培养箱,吸附1 h后弃去接种液体,用Hanks液洗2次,然后加入1.5 ml细胞维持液,细胞置于37℃5%CO₂培养箱中培养。逐日观察细胞病变,无病变者在细胞中连续盲传3代,仍无病变者舍弃,病变者连续传代直到规律病变,收获置-80℃保存备检。阳性分离株鉴定参照文献[2]。核酸提取采用德国Qiagen公司的Rneasy mini试剂盒,按说明书进行操作。取蚊标本上清液200 μl或细胞分离物100 μl提取RNA。核酸检测采用荧光定量PCR方法,引物参照文献[2],由上海生工生物工程有限公司合成,试剂采用大连宝生物工程有限公司一步法荧光定量PCR试剂盒(DRR064A),按说明书进行操作。采用一步法RT-PCR方法扩增E基因,引物参照文献[3]。试剂采用大连宝生物工程有限公司一步法RT-PCR试剂盒(DRR024A),按试剂说明书操作。反

应条件为:50℃30 min,94℃2 min;94℃30 s,52℃30 s,72℃2 min,40个循环;72℃延伸8 min。取扩增产物5 μl,用1.5%琼脂糖凝胶电泳。PCR扩增产物纯化后直接测序,测序由上海英骏生物科技有限公司完成。数据处理和序列比对采用DNAMAN、Clustal X和BioEdit软件,进化树的构建采用Mega软件,建树方法采用邻位连接法(NJ),可信度评估采用1000 bootstrap值。将6株分离株E基因测序数据递交GenBank。

结 果

1. JEV核酸检测:慈溪监测点蚊样本6375只,分成159批,JEV核酸阳性27批(17.0%);仙居监测点蚊样本2150只,分成29批,JEV核酸阳性1批(3.4%);按年份进行分类,则2009年和2010年蚊样本分别为144批和44批,JEV核酸阳性分别为8批和20批,阳性率分别为5.6%和45.5%;所有核酸阳性样本均来源于三带喙库蚊。慈溪监测点蚊中带病毒率明显高于仙居监测点,2010年蚊中JEV检出率明显高于2009年(表1)。

表1 2009—2010年浙江省蚊样本中JEV核酸检测结果

监测点	年份	蚊只数	蚊批数	蚊种批数				核酸阳性批数	阳性率(%)
				三带喙库蚊	淡色库蚊	中华按蚊	其他		
慈溪	2009	5070	130	127	1	1	1	7	5.4
	2010	1305	29	29	0	0	0	20	69.0
仙居	2009	1400	14	3	6	4	1	1	7.1
	2010	750	15	15	0	0	0	0	0.0
合计		8525	188	174	7	5	2	28	14.9

2. 病毒分离:2010年慈溪和仙居监测点共143批蚊,分离到JEV 22株,病毒分离率为15.4%(表2),其中慈溪监测点JEV核酸阳性的20批蚊样本中分离到病毒14株。所有阳性分离物经荧光定量PCR法检测均为阳性,部分毒株扩增病毒E基因并测序,测序数据经GenBank BLAST程序比对,结果显示与其同源性最高的50个核酸序列均来自JEV,因此从分子水平确定病毒型别为JEV。所有阳性株均分离于慈溪监测点三带喙库蚊。2009年核酸阳性的8批蚊样本病毒分离均阴性。

3. E基因同源性分析:从2009年核酸阳性的慈溪分离株中选取2株(ZJ09-52、ZJ09-108)、2010年22株分离株中选取4株(ZJ10-7、ZJ10-10、ZJ10-23、ZJ10-45)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1500个nt,推导编码500个氨基酸(aa),未发现nt插入和缺失。6株测序

株之间E基因nt和aa同源性分别为99.2%~99.8%和100.0%，与浙江省2007—2008年分离株之间nt和aa同源性分别为99.1%~99.3%和99.2%~99.8%；与疫苗株SA14-14-2 nt和aa同源性分别为87.6%~88.0%和97.8%。与浙江省历年分离株同源性最高的2003年上海乙脑分离株SH03-124, nt和aa同源性分别为98.9%~99.3%和100.0%，2008年台湾株TPC0806c, nt和aa同源性分别为99.2%~99.8%和99.8%。

表2 2010年浙江省蚊媒中JEV分离结果

监测点	蚊只数	蚊批数	蚊种批量					JEV阳性率(%) ^a
			三带喙库蚊	淡色库蚊	致倦库蚊	中华按蚊	其他	
慈溪	4410	90	82	3	2	1	2	22(24.4)
仙居	2740	53	18	7	0	10	18	0(0.0)
合计	7150	143	100	10	2	11	20	22(15.4)

注：^a均分离于三带喙库蚊

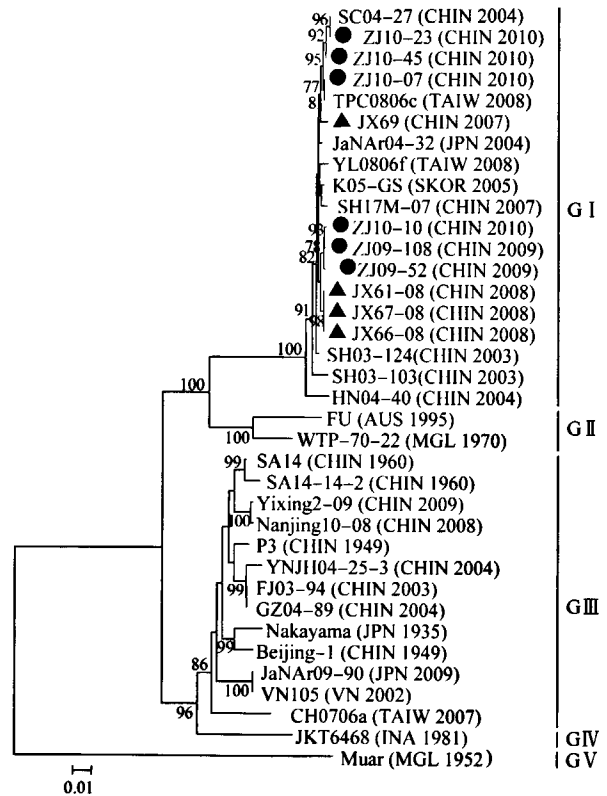
4. JEV E基因aa序列差异分析：E基因编码500个aa。6株测序株E基因aa序列完全一致，与浙江省2007—2008年分离株相比，分别存在2~4个和1个aa位点不同，这些位点不位于重要aa位点(E-107、E-138、E-176、E-177、E-264、E-279、E-315)或结构域区；与疫苗株SA14-14-2比较，6株测序株在E蛋白500个aa序列中存在14个共同位点差异。在E基因的重要aa位点，浙江省各年份分离株与SA14株、P3株完全一致，与疫苗株SA14-14-2均不同(表3)，在E蛋白结构域I、II和III区aa变异数分别为3、6和3个。

5. 基因分型：将分离株与GenBank下载的不同国家、不同年份的JEV株进行比对，采用NJ法构建进化树，全球不同地域来源的JEV可分为I~V5个基因亚型^[4]，2009—2010年浙江省分离株位于基因亚型I(GI)分支上，2007—2008年浙江省分离株(XJ69、JX61-08、JX66-08、JX67-08)与2009—2010年分离株紧密地排列在一起，与浙江省各年份分离株亲缘关系最近的毒株分别是SH03-124株和TPC0806c株，均在同一GI进化分支上(图1)。6株测序株提交至GenBank，登录号为JN216865~JN216870。

讨论

慈溪市和仙居县是浙江省乙脑监测点。2009—2010年对监测点蚊

样本进行JEV核酸检测，结果显示慈溪监测点蚊中JEV带病毒率(17.0%)明显高于仙居监测点(3.4%)；2010年蚊媒中JEV检出率明显高于2009年。2010年从慈溪监测点蚊中分离到22株JEV，病毒分离率达15.4%，所有核酸和病毒分离阳性样本均来源于三带喙库蚊，说明三带喙库蚊是浙江省部分地区乙脑的主要蚊种。



注：●：2009—2010年浙江省分离株；▲：2007—2008年浙江省分离株；毒株命名(毒株来源，分离年份)：CHIN：中国，TAIW：中国台湾，JPN：日本，SKOR：韩国，AUS：澳大利亚，MGL：马来西亚，VN：越南，INA：印度尼西亚

图1 浙江省乙脑分离株与其他JEV株在E基因区进化分析

表3 2007—2010年浙江省JEV株和疫苗株在E蛋白结构域与主要位点aa序列比较

毒株 ^a	分离年份	结构域											
		I			II					III			
		138	176	177	107	129	222	244	264	279	315	327	366
SA14-14-2	1960	K	V	A	F	T	A	G	H	M	V	S	A
P3	1949	E	I	T	L	-	-	E	Q	K	A	-	-
ZJ10-07	2010	E	I	T	L	M	S	E	Q	K	A	T	S
ZJ10-10	2010	E	I	T	L	M	S	E	Q	K	A	T	S
ZJ10-23	2010	E	I	T	L	M	S	E	Q	K	A	T	S
ZJ10-45	2010	E	I	T	L	M	S	E	Q	K	A	T	S
ZJ09-52	2009	E	I	T	L	M	S	E	Q	K	A	T	S
ZJ09-108	2009	E	I	T	L	M	S	E	Q	K	A	T	S
JX61	2008	E	I	T	L	M	S	E	Q	K	A	T	S
JX67	2008	E	I	T	L	M	S	E	Q	K	A	T	S
XJ69	2007	E	I	T	L	M	S	E	Q	K	A	T	S
XJP613	2007	E	I	T	L	M	S	E	Q	K	A	T	S

注：^a除SA14-14-2和P3外，其余均为浙江省分离株

2009—2010年浙江省6株测序株之间E基因nt的差异率分别为0.2%~0.8%,差异很小,nt序列差异均为碱基的替换,大多数nt变异在aa编码的第三位,属于沉默突变,不引起aa变化,因此,6株测序株E基因aa序列完全一致。2009—2010年浙江省6株JEV与2007—2008年相比,在E基因的nt和aa的差异率分别为0.7%~0.9%和0.2%~0.8%,差异较小,提示近几年在浙江省外界循环的JEV变异较小。浙江省分离株与疫苗株SA14-14-2相比在E基因区nt和aa差异率分别为12.0%~12.4%和2.2%,与王环宇等^[5]报道的2001年我国首次分离的JEV基因I型株与疫苗株SA14-14-2的nt和aa差异率分别为12.2%和2.8%~3.2%相接近。

JEV E基因区某些位点的aa与病毒毒力有关^[6]。浙江省2009—2010年分离株与2007、2008年JEV株相比,分别存在2~4个和1个aa位点差异,但均不在E基因的重要aa位点和结构域区;与疫苗株SA14-14-2比较,在E蛋白500个aa序列中存在14个共同位点差异,在E基因的重要aa位点浙江省JEV与P3株完全相同。已有研究显示E基因138位谷氨酸替换成赖氨酸后病毒的毒力会显著下降^[6,7],本研究分离株在此位点为谷氨酸(E),与P3株和SA14株相同。提示浙江省蚊媒中分离的JEV具有野毒株特征。在E蛋白的3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^[8],在这一区域发生的变异会导致抗原性的改变,甚至影响抗原与中和抗体的结合反应,而中和抗体在预防乙脑中起主导作用^[9]。本研究分离株在该区域与疫苗株SA14-14-2完全一致。通过对浙江省JEV的E区段aa序列分析,认为现在使用的乙脑疫苗株在理论上可以覆盖浙江省乙脑流行株。

JEV的基因分型,早期采用Chen等^[10,11]建立的方法,因为JEV基因组中第456~695位属于PrM区段的240个nt所受的进化压力较小,可以反映JEV的自然进化状况,用该方法将JEV分为基因I~IV 4个型别。此后为了避免用较短的nt序列进行生物进化分析可能导致的结果不准确,印度学者提出用JEV E基因作为基因分型的基础,这种方法分型的结果使得乙脑毒株的分布更具有地域特征,因此得到广泛利用^[4,12],用该方法可将JEV分为基因I~V 5个型。本研究采用E基因全长1500 nt进行基因分型,2009—2010年浙江省6株JEV株均属于G I型,亲缘关系最近的毒株分别是上海SH03-124株和台

湾TPC0806c株。在我国流行的毒株分属G I型和G III型,二者之间的nt改变超过10%。其中,一些地区只分离到G I型毒株,一些地区只分离到G III型毒株,有的地区同时存在G I型和G III型病毒共同流行^[13],浙江省2007—2010年分离的乙脑毒株均为G I型。

参 考 文 献

- [1] Li XY, Song H, Fu SH, et al. The molecular biology of Japanese encephalitis viruses isolated in China. *Chin J Virol*, 2004, 20(3): 200-208. (in Chinese)
李晓宇, 宋宏, 付士红, 等. 中国流行性乙型脑炎病毒分子生物学特性研究. *病毒学报*, 2004, 20(3): 200-208.
- [2] Xie RH, Xu F, Zhu HP, et al. Development and evaluation of TaqMan-based one-step reverse transcription polymerase chain reaction assay for the detection of Japanese encephalitis virus. *Chin J Epidemiol*, 2009, 30(3): 277-280. (in Chinese)
谢荣辉, 徐芳, 朱雨坪, 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. *中华流行病学杂志*, 2009, 30(3): 277-280.
- [3] Pan XL, Liang GD. The genotype-special primers for amplifying and sequencing the genotype I & III Japanese encephalitis virus. *Chin J Exp Clin Virol*, 2009, 23(4): 254-256. (in Chinese)
潘晓玲, 梁国栋. 乙脑病毒基因I、III型特异性全基因组引物. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2009, 23(4): 254-256.
- [4] Uchil PD, Satchidanandam V. Phylogenetic analysis of Japanese encephalitis virus; envelope gene based analysis reveals a fifth genotype, geographic clustering, and multiple introductions of the virus into the Indian subcontinent. *Am J Trop Med Hyg*, 2001, 65(3): 242-251.
- [5] Wang HY, Fu SH, Li XY, et al. Isolation and identification of genotype I Japanese virus in China. *Chin J Microbiol Immunol*, 2004, 24(11): 843-849. (in Chinese)
王环宇, 付士红, 李晓宇, 等. 我国首次分离到基因I型乙型脑炎病毒. *中华微生物和免疫学杂志*, 2004, 24(11): 843-849.
- [6] Fan XL, Yu YX, Li DF, et al. The stability of E protein gene of the Japanese encephalitis live attenuated vaccine virus SA14-14-2. *Chin J Virol*, 2002, 18(1): 39-46. (in Chinese)
范行良, 俞永新, 李德富, 等. 流行性乙型脑炎减毒活疫苗SA14-14-2 E基因的稳定性的研究. *病毒学报*, 2002, 18(1): 39-46.
- [7] Ni H, Chang GJ, Xie H, et al. Molecular basis of attenuation of neuron-virulence of wild-type Japanese encephalitis virus strain SA14. *J Gen Virol*, 1995, 76: 409-413.
- [8] Takada K, Masaki H, Konishi E, et al. Definition of an epitope on Japanese encephalitis virus (JEV) envelope protein recognized by JEV-specific murine CD8 cytotoxic lymphocytes. *Arch Virol*, 2000, 145: 523-534.
- [9] 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. *Virus Res*, 2001, 76: 59-69.
- [10] Chen WR, Tesh RB, Rico-Hesse R. Genetic variation of Japanese encephalitis virus in nature. *J Gen Virol*, 1990, 71: 2915-2922.
- [11] Chen WR, Rico-Hesse R, Tesh RB. A new genotype of Japanese encephalitis virus from Indonesia. *Am J Trop Med Hyg*, 1992, 47(1): 61-69.
- [12] Nga PT, Parquet MDC, 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 Gen Virol*, 2004, 85: 1625-1631.
- [13] Wang HY, Takasaki T, Fu SH, et al. Molecular epidemiological analysis of Japanese encephalitis virus in China. *J Gen Virol*, 2007, 88: 885-894.

(收稿日期: 2011-07-30)

(本文编辑: 万玉立)