

新疆夏尔希里自然保护区蜱传脑炎疫源地调查

张桂林 刘然 孙响 郑晔 刘晓明 赵焱 党荣理 刘栓奎
夏晶 郑重 杨银辉

【摘要】 目的 调查新疆北部夏尔希里地区蜱传脑炎(TBE)疫源地特征,分离鉴定蜱传脑炎病毒(TBEV)。**方法** 利用间接免疫荧光法对2011年春季出现的2例疑似病毒性脑炎患者及当地健康人群检测TBEV特异性IgG抗体。调查当地蜱种群特征;通过蜱研磨液接种实验小鼠与细胞分离培养TBEV;利用RT-PCR扩增检测病毒NS1基因片段,通过序列分析明确新分离毒株的系统进化特征。**结果** 在夏尔希里自然保护区TBE疫源地采集全沟硬蜱和森林革蜱共1760只,全沟硬蜱为优势蜱种(87.5%)。2例疑似病毒性脑炎患者确诊为TBEV感染。当地健康人群中病毒IgG血清阳性率为35.4%(23/65)。BALB/c小鼠接种蜱研磨液后,发病与死亡发生率分别为72.9%(70/96)和55.7%(44/79)。从病死小鼠脑组织中扩增获得TBEV特异性条带。基于病毒NS1基因序列的系统进化分析表明,TBEV新分离株属于远东亚型,与中国东北地区分离株、俄罗斯分离株的同源性分别为99%和98%。**结论** 首次发现新疆夏尔希里自然保护区存在TBE疫源地,病毒流行株属于远东亚型,全沟硬蜱和森林革蜱是病毒传播的重要媒介。

【关键词】 蜱传脑炎; 蜱传脑炎病毒; 疫源地

Investigation on the endemic foci of new emerged tick-borne encephalitis in Charles Hilary, Xinjiang ZHANG Gui-lin¹, LIU Ran^{1,2}, SUN Xiang¹, ZHENG Yang², LIU Xiao-ming¹, ZHAO Yan¹, DANG Rong-li¹, LIU Shuan-kui¹, XIA Jing³, ZHENG Zhong¹, YANG Yin-hui². 1 Center for Disease Control and Prevention of Xinjiang Military Command Region, Urumuqi 830011, China; 2 National Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medicine Science; 3 Clinical Department, 23rd Hospital of PLA

Corresponding authors: ZHANG Gui-lin, Email: xjglzhang@126.com; YANG Yin-hui, Email: yyh428@sina.com

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 31270466 and No. 81171633).

【Abstract】 Objective To investigate the recent emerged endemic region of tick-borne encephalitis (TBE) regarding its natural reserves, in Charles Hilary, northern Xinjiang and to isolate and characterize the viral geographic strain. **Methods** Using indirect fluorescent assay to detect tick-borne encephalitis virus (TBEV) specific IgG antibodies from serum of local residents including 2 unconfirmed viral encephalitis patients in 2011 spring-summer. Viruses were isolated from tick samples by inoculating BALB/c mice and BHK-21 cells. For phylogenetic analysis, TBEV NS1 gene fragments were detected by RT-PCR and then subjected to sequence alignment. **Results** 1760 ticks were captured from the fields to have found that *Ixodes persuleatus* were dominated among the tick population. Two viral encephalitis patients were diagnosed as TBEV infection. In addition, 35.4% (23/65) local residents were detected positive for presence of TBEV specific-IgG antibodies in serum. After inoculation, morbidity and mortality of BALB/c mice were 72.9% (70/96) and 55.7% (44/79), respectively. TBEV specific-fragments were amplified from brain tissue of dead mice and cells culture supernatant. NS1 sequence alignment showed that the viral isolates were clustered into TBEV far-eastern sub-type, phylo-genetically, and were mostly close to the isolates from northeastern China (99%) and Russian strain (98%). **Conclusion** In this study, a new endemic loci of TBE was firstly

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.05.006

基金项目: 国家自然科学基金(31270466, 81171633)

作者单位: 830011 乌鲁木齐, 新疆军区疾病预防控制中心(张桂林、刘然、孙响、刘晓明、赵焱、党荣理、刘栓奎、郑重); 军事医学科学院微生物流行病研究所一室(刘然、郑晔、杨银辉); 解放军第23医院临床部(夏晶)

通信作者: 张桂林, Email: xjglzhang@126.com; 杨银辉, Email: yyh428@sina.com

described in Charles Hilary natural reserve, northern Xinjiang. TBEV geographic isolates belonged to TBEV far-eastern subtype while *Ixodes persuleatus* and *Dermacentor silvarum* played crucial roles for disease transmission.

【Key words】 Tick-borne encephalitis; Tick-borne encephalitis virus; Endemic foci

蜱传脑炎(tick-borne encephalitis, TBE)或称森林脑炎,是蜱传脑炎病毒(tick-borne encephalitis virus, TBEV)经蜱叮咬人、畜传播的急性传染病。TBEV 在分类学上属于黄病毒科黄病毒属(Flaviviridae, *Flavivirus*)成员,根据血清学交叉反应特性进一步归入蜱传黄病毒血清复合群,而与登革 1~4 型病毒、日本脑炎病毒等蚊媒黄病毒相区别。TBEV 分布横贯亚欧大陆,根据地理分离株的基因组序列变异性可分 3 个亚型,包括欧洲型、西伯利亚型和远东型。不同亚型的病毒毒力差异大,欧洲亚型和西伯利亚型的致死率分别为 0.5%~2%和 6%~8%,而远东型致死率最高,为 5%~20%^[1,2]。目前对病毒毒力的差异还不十分清楚。

TBE 疫源地在我国主要分布于东北和西北森林地区^[3,4],近年还发现云南、西藏地区也有 TBE 流行^[5]。我国新疆北部山区森林覆盖率高,蜱种群丰富。在 20 世纪 90 年代初期北天山与阿尔泰山一带已确认为 TBE 疫源地,但流行病学和病原学等本底信息并不十分完整。夏尔希里自然保护区(东经 81°43'~82°18',北纬 45°07'~45°23')位于新疆博尔塔拉蒙古自治州境内,地处阿拉套山南坡,与哈萨克斯坦共和国交界。保护区生态地理景观主要为海拔 1300 m 以下处为荒漠、半荒漠化草原,海拔 1300~1600 m 为山地干旱草原,1600~2700 m 为山地森林,2700~3300 m 为高山草甸^[6]。保护区内人类活动较少,以当地牧民与边防驻军为主。2011 年春夏季,保护区内曾出现 2 例高度疑似 TBE 患者,为进一步明确 TBE 疫源特征,本研究通过病史调查, TBEV 特异性 IgG 抗体的血清学检测,媒介蜱种类密度调查及病毒分离培养等,研究保护区内 TBE 的流行情况。

对象与方法

1. 研究对象、主要试剂及实验动物:蜱采自新疆夏尔希里林地生态环境。人血清样本采自 2 例患者及当地健康人群。TBEV 抗原片、黄病毒属特异单克隆抗体与 TBEV 单克隆抗体由军事医学科学院微生物流行病学研究所五所一室提供,异硫氰酸荧光素(FITC)标记的兔抗人 IgG 抗体与山羊抗小鼠 IgG 抗体均购于北京中杉金桥生物技术有限公司, RNeasy

试剂盒为德国 QIAGEN 公司产品,一步法 RT-PCR RNA PCR 试剂盒为宝生物(大连)工程有限公司产品。0.22 μm 滤器为美国 Pall 公司产品,DMEM 培养基购自北京清大天一科技有限公司,胎牛血清购自杭州四季青生物科技有限公司。BALB/c 小鼠由新疆医科大学实验动物中心提供。

2. 间接免疫荧光法(IFA)TBEV 抗体检测:利用 TBEV 细胞培养抗原片进行 IFA 检测。待检血清按 1:10、1:20、1:40 倍稀释,滴于抗原片孔中,37℃ 孵育 30 min,磷酸盐缓冲液漂洗 3 次,干燥后加入 1:200 倍稀释的 FITC 标记兔抗人 IgG 抗体,37℃ 孵育 30 min,磷酸盐缓冲液漂洗 3 次。荧光信号通过荧光显微镜(Nikon ECLIPSE 80i)观察。待检血清稀释度≥1:20 时观察到特异性荧光颗粒判定为 TBEV 抗体阳性。

3. 动物接种:①蜱样本处理:采用布旗法捕获活蜱。蜱分类鉴定后按 50~100 只分组。每组蜱置于 75%乙醇中浸泡 30 min,灭菌生理盐水漂洗 3 次,加入 1 ml 磷酸盐缓冲液研磨破碎,3000 r/min 离心收集上清液,经 0.22 μm 滤器过滤除菌,按 0.5 ml 分装,-70℃ 冷藏。②动物接种:按每只 0.5 ml 剂量腹腔接种 5~8 周龄的 BALB/c 小鼠,每组接种 3 只。接种后每日观察小鼠发病情况,连续观察 15 d。第一代小鼠处死后,取脑组织研磨液上清液继续接种小鼠传代。

4. 病毒细胞分离培养与 IFA 鉴定:①病毒细胞分离培养:BHK-21 细胞(Baby hamster kidney-21)经含 10%(v/v)胎牛血清的 DMEM 培养基传代分种于 48 孔细胞培养板 37℃ 培养至长为单层细胞。每孔 BHK-21 细胞接种 0.5 ml 蜱组织研磨液,37℃ 培养 7~10 d。细胞反复冻融 3 次,按 3000 r/min 离心收集细胞培养上清,按上述方法再次接种细胞,盲传三代后观察细胞病变现象。②IFA 鉴定:将 20 μl 病毒感染细胞培养基悬液接种于抗原玻片孔中,37℃ 过夜培养,冰冻丙酮固定过夜,按同样步骤进行 IFA 鉴定。一抗使用 1:1000 倍稀释的鼠源黄病毒属特异 mAb 与 TBEV mAb,二抗使用 1:200 倍稀释的 FITC 标记的羊抗小鼠 IgG 抗体。

5. 病毒 RNA 的反转录 PCR 检测:TBEV NS1 基因扩增引物设计参照文献[4]。上下游引物:

NS1-F: GAG GTT TCC GAG TGG TAT GAC, NS1-R: CGA GCA ATG CAA GGA CGA CAA T(扩增区域病毒基因组 2529~3654 nt; 预期长度约为 1100 bp), 引物由上海生工生物工程公司合成。按 RNeasy 试剂盒说明书方法对 400 μ l 细胞培养上清液进行 RNA 提取, 提取物溶于 40 μ l 无核酸酶去离子水, 置于 -70 $^{\circ}$ C 冷藏备用。按照一步法 RT-PCR 试剂盒说明书操作, 扩增体系为 25 μ l, 其中包括 5 μ l 上清 RNA 提取物, TBEV NS1 特异正、反向引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ l。扩增条件: 42 $^{\circ}$ C 反转录 30 min; 94 $^{\circ}$ C 热变性 4 min; 35 轮热循环中, 每轮循环 94 $^{\circ}$ C 热变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 扩增 1 min, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 5 μ l 扩增产物进行 1% (m/v) 琼脂糖凝胶电泳鉴定。阳性扩增产物交上海生工生物工程公司测序, 利用 DNASTAR 7.0 SeqMan 程序进行序列比对。最后利用 Mega 5.0 程序聚类分析, 以 Clustal-W 算法构建 TBEV 系统发生树 (Bootstrap=1000)。

6. 统计学分析: 利用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 结果通过 χ^2 检验确定组间发病率及死亡率差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 病例报告:

[病例 1] 男性 25 岁, 汉族, 林区工作人员。2011 年 5 月 14 日起无诱因突然发热 (39.3 $^{\circ}$ C), 并间断性发热 12 d, 伴全身不适, 头痛头晕, 恶心, 颈项强直, 活动受限, 脑膜刺激征阳性, 手足抽搐。头颅 MRI 检查提示左侧侧脑室扩大; 脑脊液压力 200 mm H₂O, 白细胞 300×10^6 /L, 蛋白 66.1 mg/L; 血常规检查白细胞 12.7×10^9 /L, 中性粒细胞 79.8%。患者回忆发病前有蜱叮咬史与野生动物腐败尸体接触史。IFA 诊断结果表明, TBEV 特异 IgG $\geq 1:800$ 。根据我国职业性森林脑炎诊断标准 (GB Z88-2002) 诊断为中度 TBE。

[病例 2] 男性 23 岁, 汉族, 与病例 1 为同事。2011 年 6 月 9 日出现头痛头晕, 并持续发热 10 d, 体温 38~40 $^{\circ}$ C, 伴晕厥。患者回忆发病前有蜱叮咬史与野生动物腐败尸体接触史。IFA 法诊断结果表明, TBEV 特异 IgG $\geq 1:500$ 。根据职业性森林脑炎诊断标准 (GB Z88-2002) 诊断为轻度 TBE。

2. TBEV IgG 抗体诊断: 为明确 TBEV 感染在当地人群中的流行情况, 采用 IFA 检测当地健康人群血清 TBEV 特异 IgG 抗体, 结果 65 人份血清中 23 人

阳性, 阳性率为 35.4%, 其中男性 22 人 (95.7%), 女性 1 人 (4.4%), 年龄 20~34 岁。上述人群职业为保护区工作人员或牧民, 均有蜱叮咬史。检测结果表明当地人群普遍存在 TBEV IgG 抗体, 提示存在既往感染。

3. 媒介蜱调查: 2012 年 4—5 月选择保护区海拔 1200~3000 m 荒漠草原、山地草原、针阔叶混交林及中山森林草甸不同生境样地进行调查。采集获得游离蜱 2 种共 1760 只, 其中全沟硬蜱 (*Ixodes persuleatus*) 1540 只, 占组成的 87.5%; 森林革蜱 (*Dermacentor silvarum*) 220 只, 占组成的 12.5%。媒介蜱种群密度分别为 37.6 只/小时与 5.4 只/小时。全沟硬蜱主要分布在海拔 1400~1800 m 针阔混交林带, 栖息生境为混交林间灌丛, 特别是林间灌丛的兽道上分布较多。森林革蜱主要分布在海拔 1400~1800 m 处森林草甸, 栖息生境为山地阳坡草丛。也有两种蜱共栖一处现象。

4. 实验小鼠接种: 为初步对蜱传病原进行分离培养, 分别将 15 组 ($n=100$) 全沟硬蜱、2 组 ($n=60$) 森林革蜱研磨后接种 BALB/c 小鼠, 观察并描述发病情况。共有 13 组小鼠发病。全沟硬蜱接种后, 小鼠发病率为 72.6% (61/84), 其中雌性全沟硬蜱发病率为 76.6% (36/47), 雄性全沟硬蜱发病率为 67.6% (25/37), 经检验雌雄两组发病率差异无统计学意义 ($\chi^2=0.319, P=0.572$); 森林革蜱接种后, 小鼠发病率为 75.0% (9/12), 病原分离结果见表 1。小鼠发病平均潜伏期为 8 d, 发病主要表现包括倦怠、毛耸、蜷缩、体重减轻以及身体平衡失调、侧卧、后肢麻痹瘫痪等神经症状 (表 2)。13 组发病小鼠第一代死亡率为 66.7% (28/42), 第二代死亡率为 43.2% (16/37), 经检验两代小鼠死亡率的差异有统计学意义 ($\chi^2=4.374, P=0.036$)。生存率曲线见图 1。

5. 病毒细胞分离与 IFA 鉴定: 蜱研磨液接种 BHK-21 细胞, 盲传三代后, 细胞出现圆缩、脱落等病变现象 (图 2)。IFA 结果表明 (图 3), 接种细胞分别与黄病毒属特异性单克隆抗体 (1:2000)、TBEV 特异性单克隆抗体 (1:2000) 呈阳性反应, 提示从蜱研磨液中分离获得黄病毒属 TBEV。蜱研磨液接种细胞与脑炎患者恢复期血清 (1:500) 呈阳性反应, 表明脑炎患者系 TBEV 感染。上述结果表明, 本研究从夏尔希里地区蜱中分离培养获得黄病毒属 TBEV。

6. 分子病毒学鉴定: 为对病毒核酸进行检测, 利用 RT-PCR 对 TBEV NS1 基因片段进行扩增。共有

表 1 蜱样本接种 BALB/c 小鼠后的发病情况
与蜱样本 TBEV PCR 检测结果

蜱组别	分组特征	小鼠发病只数 (发病数/接种数)	TBEV 特异性 扩增
01A	全沟硬蜱 ♀	3/3	+
02A	全沟硬蜱 ♀	0/4	-
03A	全沟硬蜱 ♀	0/5	-
04A	全沟硬蜱 ♀	6/6	+
05A	全沟硬蜱 ♀	6/6	+
06A	全沟硬蜱 ♀	5/6	+
07A	全沟硬蜱 ♀	6/7	+
08A	全沟硬蜱 ♀	10/10	+
09A	全沟硬蜱 ♂	5/6	+
10A	全沟硬蜱 ♂	0/5	-
11A	全沟硬蜱 ♂	7/7	+
12A	全沟硬蜱 ♂	3/3	+
13A	全沟硬蜱 ♂	5/6	+
14A	全沟硬蜱 ♂	5/7	+
15A	全沟硬蜱 ♂	0/3	-
16A	森林革蜱 ♂/♀	4/5	+
17A	森林革蜱 ♂/♀	5/7	+

表 2 TBEV 感染 BALB/c 小鼠后发病情况

项目	症状描述	发生率(%)
开始发病时间(d) 6~15		
平均潜伏期(d) 8		
体重减轻	发病后体重开始减轻	100(70/70)
临床症状	毛耸, 蜷缩, 倦怠	100(70/70)
	皮下伴睾丸出血	8.57(6/70)
神经症状	身体平衡失调, 侧卧, 后肢麻痹瘫痪	44.29(31/70)
解剖病理表现	脾脏、肝脏肿大	31.43(22/70)
	消化道或腹腔出血	15.71(11/70)
	颅内出血	4.29(3/70)

13 组接种细胞上清呈扩增阳性, 阳性率为 76.5% (表 1)。序列测定结果与 TBEV 新疆分离株完全一致。为进一步明确 TBEV 新分离株的基因亚型特征, 对全沟硬蜱分离株 01、13A、14A 及森林革蜱分离株 17A 进行基于 NS1 基因序列的比对分析(图 4), 结果表明新分离毒株与远东亚型毒株序列同源性 > 95%, 与欧洲、西伯利亚型同源性分别为 86% 和

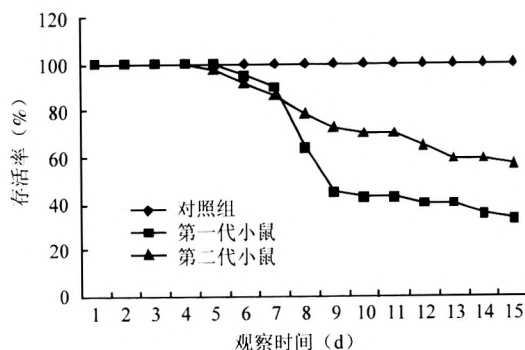


图 1 蜱研磨液接种后 BALB/c 小鼠生存曲线

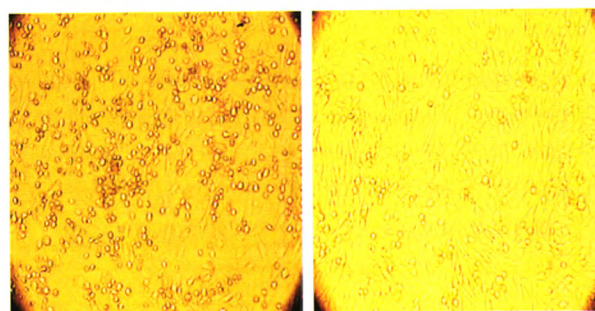


图 2 TBEV 接种 BHK-21 细胞的病变现象(×10)

85%。新分离毒株与我国东北分离毒株 MDJ-02 株、森张株序列同源性为 99%, 与俄罗斯境内 Svetlogrie 株、Karaleroovo 株序列同源性为 98%。结果表明, TBEV 新分离毒株属于 TBEV 远东亚型。

讨论

TBE 在新疆地区已明确分布于天山山区, 包括北天山西段的天格尔山、依连哈比尔尕山北坡和婆罗克怒山南坡, 以及中天山、南天山北坡与科古琴山南坡^[7]。夏尔希里自然保护区位于阿拉套山南坡, 属于北天山西段, 但尚未从该地区发现 TBE 流行。本研究首次证实新疆阿拉套山存在 TBE 疫源地。疫源地生境与北天山西段的天格尔山、依连哈比尔尕山北坡和婆罗克怒山南坡相同, 主要分布于海拔

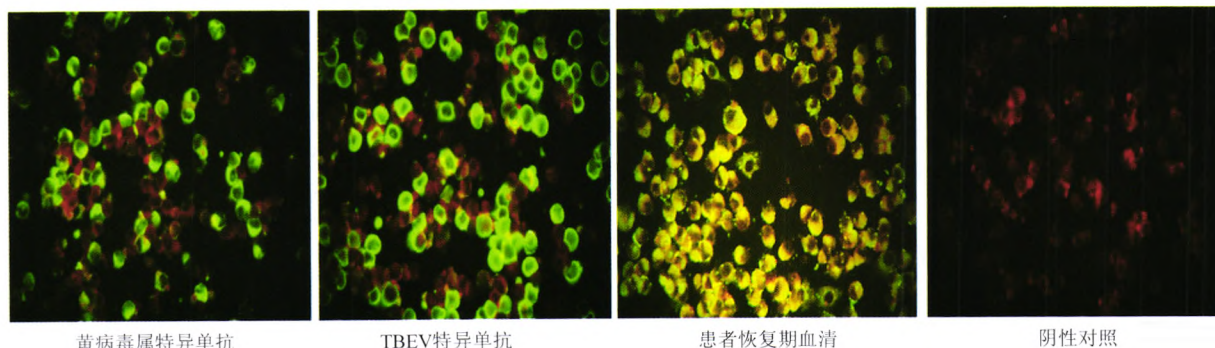
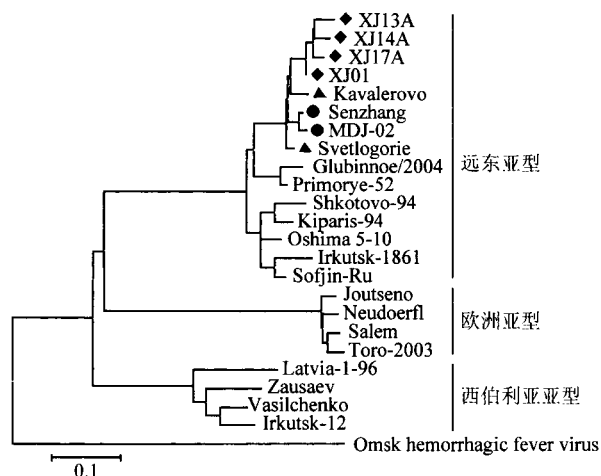


图 3 TBEV 新分离株的 IFA 检测(FITC 染色, ×40)



注：◆ 新疆夏尔西里 TBEV 分离株 (JX534167.1)；● 我国东北 TBEV 牡丹江株 MDJ-02 (JF316707.1) 与森张株 (JQ650523.1)；▲ TBEV 俄罗斯 Svetlogorie (GU121642.1) 与 Karalerovo 株 (FJ402885.1)；鄂木斯克出血热病毒 (AY438626.1) 设为组外对照

图4 基于 TBEV NS1 基因序列的新疆夏尔希里分离株同源性分析

1400 ~ 1800 m 的山地森林带, 为针阔叶混交林, 指示植物有雪岭云杉和疣枝桦以及天山桦、欧洲山杨等, 林下土壤潮湿, 灌丛茂密, 在林间空地及阳坡生长有多年生草本植物。

全沟硬蜱是远东地区的绝对优势蜱种, 在种群构成中可占 80% ~ 97%, 也是远东型 TBE 流行的主要媒介宿主。由于孳生条件限制, 全沟硬蜱仅分布在具有特定温度 (6 ~ 25 °C)、湿度 (>85%) 的生态环境中。全沟硬蜱活动范围受生态条件所限, 仅在具有特定小气候的、相对孤立的生态环境中觅食、繁衍^[8]。全沟硬蜱在天山山脉的分布呈不连续的片状。而 TBE 在天山山脉的大范围传播很可能依赖鹿等大型野生哺乳动物与家畜的携带作用, 一方面由于野生哺乳动物的迁移将寄生蜱散播到不同的地区和生境, 另一方面由于野生动物感染病毒后仅产生亚临床状态的病毒血症, 不同地区的蜱通过吸食带毒血液获得病毒, 从而传播产生新的疫源地。由于本次调查尚未涉及夏尔希里地区野生动物, 对于上述推论还需通过血清学证据深入评估。

远东型 TBE 主要媒介为全沟硬蜱, 其次是森林革蜱、嗜群血蜱 (*H. concinna*)、日本血蜱 (*H. japonica*), 在我国除上述蜱种外, 从新疆的边缘革蜱 (*D. marginatus*) 中也分离出病毒^[8]。本次调查还从

森林革蜱中分离获得病毒, 表明这两种蜱均可作为该疫源地 TBEV 的传播媒介, 但全沟硬蜱在保护区为优势蜱种, 占种群组成的 87.5%, 因此其媒介作用更大。

此外, 本次调查发现夏尔希里地区健康人群缺少 TBE 疫苗接种防护, 较高的 IgG 阳性率表明普遍存在 TBEV 既往感染^[9], 但仅发现 2 例脑炎患者。从病原生物学角度分析可能与病毒株致病性差异、人群易感性有关, 也为相关研究提供新线索。

(本研究由军事医学科学院微生物流行病学研究所杨银辉研究员提供 TBEV 包膜蛋白单抗, 邓永强博士提供黄病毒属特异包膜蛋白单抗, 张雨博士提供 NS1 扩增引物序列; 同时感谢新疆军区博乐军分区在调查中给予的帮助)

参 考 文 献

[1] Mansfield KL, Johnson N, Phipps LP, et al. Tick-borne encephalitis virus — a review of an emerging zoonosis. *J Gen Virol*, 2009, 90:1781-1794.

[2] Suss J. Tick-borne encephalitis 2010: epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia — an overview. *Ticks Tick Borne Dis*, 2011, 2(1):2-15.

[3] Lu Z, Broker M, Liang G. Tick-borne encephalitis in mainland China. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2008, 8(5):713-720.

[4] Zhang Y, Si BY, Liu BH, et al. Complete genomic characterization of two tick-borne encephalitis viruses isolated from China. *Virus Res*, 2012, 167(2):310-313.

[5] Gao X, Nasci R, Liang G. The neglected arboviral infections in mainland China. *PLoS Negl Trop Dis*, 2010, 4(4):624.

[6] Chen SJ. Comprehensive scientific observation in Xiaerxili nature reserve, Xinjiang. Xinjiang Science Technology Press, 2006: 13-27. (in Chinese)
陈蜀江. 新疆夏尔希里自然保护区综合科学考察. 乌鲁木齐:新疆科学技术出版社, 2006: 13-27.

[7] Chen GS. Study of natural foci of tick-borne encephalitis. *Infect Dis Inf*, 2004, 17(1):7-9. (in Chinese)
陈国仕. 蜱媒脑炎自然疫源探究. *传染病信息*, 2004, 17(1):7-9.

[8] Xie XC, Yu X, Zhang TX, et al. A survey report on the natural foci of Russian spring summer encephalitis in the Mountainous Areas of Tianshan and Altay Mountain in Xinjiang. *Endemic Dis Bull*, 1991, 6(3):109-114. (in Chinese)
谢杏初, 于心, 张挺秀, 等. 新疆天山、阿尔泰山森林脑炎自然疫源地考察报告. *地方病通报*, 1991, 6(3):109-114.

[9] Baldovin T, Mel R, Bertonecello C, et al. Persistence of immunity to tick-borne encephalitis after vaccination and natural infection. *J Med Virol*, 2012, 84(8):1274-1278.

(收稿日期:2013-02-01)

(本文编辑:张林东)