

· 论 著 ·

# 舟山海岛地区 2011—2012 年新型布尼亚病毒感染监测分析

叶凌<sup>1</sup>, 任宜<sup>1</sup>, 王忠发<sup>2</sup>, 王承维<sup>1</sup>, 李世波<sup>3</sup>

1 岱山县疾病预防控制中心, 浙江 舟山 316200; 2 舟山市疾病预防控制中心; 3 温州医科大学附属舟山医院

**摘要:** **目的** 分析舟山海岛地区新型布尼亚病毒感染特征和宿主、媒介的感染情况, 为其预防控制提供科学依据。**方法** 按照卫生部防治指南开展病例监测, 在有病例的地区用布旗法和啮齿动物体表检蜱法相结合的方法捕蜱, 每季度采用鼠笼法捕捉鼠形动物, 鉴定种类后无菌解剖取肝、脾、肺和血清, 提取 RNA 后, 用荧光定量 PCR 方法进行检测, 用 EpiData 3.1 软件建立数据库, Excel 2003 软件进行统计学分析。**结果** 岱山县 2011—2012 年共确诊新型布尼亚病毒感染患者 24 例, 死亡 2 例; 其中男性 11 例, 女性 13 例; 年龄最小 47 岁, 最大 85 岁, 60 岁以上发病数占病例总数的 70.83%。4 例患者有被蜱叮咬史。病例呈散发, 有一起家庭聚集性感染病例, 一起外地人口进入本地感染病例。采集牛、羊等动物血清 25 份, 野外捕获鼠类 111 只, 布旗法和动物体表捕获法共捕蜱 251 只, 在蜱中检出新型布尼亚病毒核酸阳性。在 2 例患者血液分离到 2 株新布尼亚病毒株, 病毒株 S 基因具有高度同源性, 与来源于国内 6 省新布尼亚病毒的 S 基因相比具有一定的差异性。**结论** 岱山县已发现多例发热伴血小板减少综合征病例, 而且从蜱中检测到新型布尼亚病毒, 迫切需要加强对该疾病研究和监测。

**关键词:** 发热伴血小板减少综合征; 监测; 新型布尼亚病毒

中图分类号: R373 文献标志码: A 文章编号: 1003-4692(2013)05-0429-03

DOI: 10.11853/j.issn.1003.4692.2013.05.014

## Surveillance and analysis of new Bunya virus infections in Zhoushan Island area during 2011–2012

YE Ling<sup>1</sup>, REN Yi<sup>1</sup>, WANG Zhong-fa<sup>2</sup>, WANG Cheng-wei<sup>1</sup>, LI Shi-bo<sup>3</sup>

1 Daishan Center for Disease Control and Prevention, Daishan 316200, Zhejiang Province, China;

2 Zhoushan Center for Disease Control and Prevention; 3 Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhoushan

Supported by the Key Funding Scheme of Medicine and Health Platform in Zhejiang Province (No. 2012ZDA044), the Key Project of Medical Science and Technology Plan in Zhoushan (No. 2013G01) and the General of Medical Science and Technology Plan in Zhoushan (No. 2013A05)

**Abstract: Objective** To analyze the epidemiological characteristics of new Bunya virus infections among hosts and vectors in Zhoushan Island area and to provide scientific evidence for their prevention and control. **Methods** Case surveillance was performed in accordance with the Ministry of Health Prevention Guide. In places with positive cases, ticks were collected using cloth flag method or from the body of rodents. Murine-like animals were captured every 3-months, using rodent cages; they were identified, and then their liver, spleen, blood, and lung were collected under aseptic conditions; RNA was extracted and subjected to fluorescence quantitative PCR. Twenty-five serum samples of cattle, sheep, and other animals were collected. A database was created using EpiData 3.1, and statistical analysis was performed using Excel 2003. **Results** In Daishan county, Zhejiang province, China, from 2011 to 2012, 24 human cases of new Bunya virus infection (in 11 males and 13 females) were confirmed, including 2 deaths; the minimum age was 47 years, and the maximum age was 85 years; 70.83% of all cases were aged over 60 years. Four cases had a history of tick bite. These cases were sporadic, with one case of familial clustering of infection and one case of imported infection. A total of 111 rodents were captured in the field, and 251 ticks were collected by either cloth flag method or from the body of animals. New Bunya virus nucleic acid was detected in ticks. Two new Bunya virus strains were isolated from the blood of two human cases; the S genes of virus strains had a high degree of homology, but with some difference from those of new Bunya viruses from six other provinces in China. **Conclusion** In recent years, there have been many cases of severe fever with thrombocytopenia syndrome in Daishan county, and new Bunya virus was detected in ticks. Thus, measures should be taken to enhance the study and surveillance of this disease.

**Key words:** Severe fever with thrombocytopenia syndrome; Surveillance; New Bunya virus

2009—2010 年, 河南、湖北等地相继发现一些以

发热伴血小板减少为主的病例, 2011 年 3 月, 中国疾病预防控制中心 (CDC) 将该病命名为发热伴血小板减少综合征 (severe fever with thrombocytopenia syndrome, SFTS)<sup>[1]</sup>。浙江省于 2011 年首次报道病例发生<sup>[2]</sup>, 岱山县作为浙江省新型布尼亚病毒感染病例的高发县, 近 2 年报告的病例数一直位居全省之首, 2011—2012 年共报告确诊病例 24 例, 年发病率分别为 2.97/10 万和 8.91/10 万, 其中死亡 2 例, 累计病死率 8.33% (2/24)。

**基金项目:** 2012 年浙江省医药卫生平台重点资助计划 (2012ZDA044); 舟山市医药卫生科技计划攻关项目 (2013G01); 舟山市医药卫生科技计划一般项目 (2013A05)

**作者简介:** 叶凌 (1969—), 男, 主管医师, 主要从事传染病防控与公共卫生应急工作。Email: zdsdcdp@126.com; 任宜 (1977—), 女, 主管技师, 主要从事微生物检验工作。Email: renyi1977@126.com

叶凌、任宜同为第一作者。

2011 年开始,岱山县启动新型布尼亚病毒监测,在各级医疗单位开展发热伴血小板或白细胞减少的症状监测,同时采集宿主动物和媒介标本,检测其携带情况。

## 1 材料与方法

### 1.1 监测对象

1.1.1 监测病例定义 ①急性起病,主要临床表现为发热,伴乏力、明显纳差、恶心、呕吐等,部分患者有头痛、肌肉酸痛、腹泻等。查体常有颈部及腹股沟等浅表淋巴结肿大伴压痛、上腹部压痛及相对缓脉。②外周血白细胞计数减少,多为  $1.0 \times 10^9/L \sim 3.0 \times 10^9/L$ ; 血小板降低,多为  $30 \times 10^9/L \sim 60 \times 10^9/L$ 。③流行季节在丘陵、林区、山地等地工作、生活、旅游等或发病前 2 周内内有被蜱叮咬史。

1.1.2 宿主和媒介监测 监测对象为牛、猪、羊、犬、鼠形动物、蜱及其他动物体表的寄生虫。

### 1.2 监测方法和内容

1.2.1 监测病例调查 医疗单位在诊疗过程中发现疑似病例,及时报告县 CDC,同时采集患者急性期(发病 1 周内)血液标本:①抗凝血:用乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管或枸橼酸盐抗凝管采集 5 ml,充分混匀。②血清:用无菌真空管采集患者急性期血液标本 5 ml,分离血清,冰排冷藏运送县 CDC  $-70^\circ\text{C}$  保存。县 CDC 专业人员对每例患者均开展流行病学调查,填写个案调查表。1 个月后采集患者恢复期血清。

1.2.2 主要家畜等动物血清采集 采集动物血清 5 ml,记录所采集动物的种类、性别、饲养方式、昆虫寄生情况等。及时分离血清,血清和血球分装送检。蜱类监测以布旗法和啮齿动物体表捡蜱法相结合的方式展开。鼠形动物监测为每季度在监测点安放鼠笼 100 个,用油条作诱饵,连续布放 2 d,分类鉴定后,无菌操作取鼠形动物的肝、脾、肺和血清,记录鼠形动物的种类、性别、体表寄生虫等。

1.2.3 实验室检测 ①荧光 RT-PCR 检测:病毒核酸提取试剂盒、荧光 PCR 扩增试剂盒、特异性引物和探针分别由德国 QIAGEN 公司、大连 TaKaRa 生物工程有限公司与浙江省 CDC 提供。采集荧光信号,设立阴阳性对照,通过  $C_t$  值和扩增曲线判读结果。②病毒分离培养:用患者血清接种 Vero 细胞,5%  $\text{CO}_2$  环境  $37^\circ\text{C}$  培养 2 周为 1 代,阴性样本盲传 3 代。用于患者急性期血清且荧光 RT-PCR 检测  $C_t$  值  $< 35$  的样本。③巢式 RT-PCR 的方法建立:选用国家传染病预防控制重点实验室提供的专用于临床患者诊断的外、内引物序列。用于阳性血样与病毒株鉴定及新型布尼亚病毒序列测定。④双份血清鉴定:对患者急性期血清荧光 RT-PCR 检测为弱阳性的血样做双份血清抗体检测鉴定,恢复期血清较

急性期血清抗体 4 倍以上增高者,可确认为新近感染。

## 2 结果

### 2.1 监测结果

2.1.1 病例基本情况 2011—2012 年共对 32 例 SFTS 血液标本进行荧光 RT-PCR 检测,阳性 24 例,阳性率为 75.00%。全县 7 个乡镇(镇)中除衢山镇和秀山乡无病例报告外,其余乡(镇)均有病例报告。2011 年病例报告集中在 6—7 月,其中 6 月发病 2 例,7 月发病 4 例;2012 年首例病例出现在 4 月,5—6 月为发病高峰,其中 5 月发病 8 例,6 月发病 6 例。24 例患者中男性 11 例,女性 13 例;年龄最小 47 岁,最大 85 岁,60 岁以上发病数占总病例数的 70.83%(17/24)。职业分布以农民和家务劳动者居多。临床特征都以发热伴恶心或乏力为首发症状,患者从发病到县级以上医院正规治疗时间间隔最短 2 d,最长 10 d,5 d 以上的占 66.67%(16/24)。

2.1.2 流行病学史 大多数病例居住于山区丘陵地带,每年的 5—7 月为发病高峰时段,以务农和家务劳动者居多,有野外作业史,年龄相对偏大。发病前无外出史,本地感染特征明显。24 例患者中 4 例有被蜱叮咬史,其余均否认。病例呈散发,有 1 起家庭聚集性感染病例<sup>[3]</sup>,1 起外地人口进入本地感染病例。

2.1.3 媒介监测 采集牛、羊等家畜动物血清和肝、脾等标本共 25 份。对有病例发生地的高亭镇大皎、大蒲门、石马岙、岱西镇后岸和东沙镇的江窑村等地,分别在 4、6、9 和 12 月开展野外鼠类监测,共捕获鼠形动物 111 只,有臭鼯鼠(*Suncus murinus*)、褐家鼠(*Rattus norvegicus*)、黄毛鼠(*R. losea*)和小家鼠(*Mus musculus*),采集鼠血、肝、脾和肺等标本,在其体表捕获跳蚤 34 匹。上述标本均未检测到阳性。采用布旗法和动物体表捕获法共捕蜱 251 只,优势蜱种为长角血蜱(*Haemaphysalis longicornis*),荧光定量 RT-PCR 法从长角血蜱中检测出新型布尼亚病毒核酸阳性。

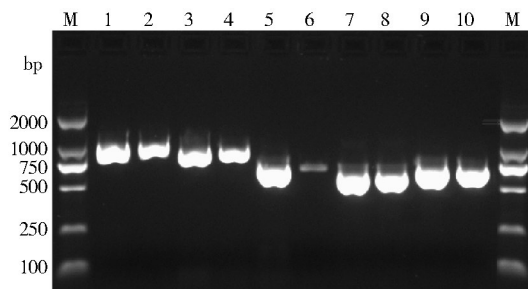
### 2.2 实验室检测

2.2.1 荧光 RT-PCR 岱山县 CDC 实验室 2012 年采用荧光 RT-PCR 法共检测可疑病例血液样本 85 份。

2.2.2 病毒分离 2012 年岱山县 CDC 在 2 例患者血液中分离到 2 株新型布尼亚病毒株,并得到浙江省 CDC 实验室确认,病毒基因序列数据通过美国国立生物技术信息中心基因库(GenBank)认证[基因登录号: ZJZS02(L: KC189855、M: KC189856、S: KC189857), ZLD(L: KC189858、M: KC189859、S: KC189860)](图 1)。

岱山县新型布尼亚病毒遗传进化特点:来自岱山县的新型布尼亚病毒 S 基因(KC189857 与 KC189860 相似度为 99.85%(1374/1376),来自其他省份的新型布

尼亚病毒 S 基因核苷酸相似度均在 93%~96%，而与来自浙江省台州市的新型布尼亚病毒 S 基因核苷酸相似度均 >99%~100%，提示来源于浙江省的新型布尼亚病毒 S 基因具有高度同源性，而与来源于国内 6 省新型布尼亚病毒的 S 基因相比具有一定差异，在基因进化树上构成一个相对独立的新分支(图 2)。



注: M. 标准分子质量; 1,2: L 外引物扩增产物; 3,4. L 内引物扩增产物; 5,6. M 外引物扩增产物; 7,8. S 外引物扩增产物; 9,10. S 内引物扩增产物; 6. 扩增循环数为 25 个,其余扩增循环数均为 30 个。

图 1 从患者血清中分离到的新型布尼亚病毒 L、M、S 3 个基因片段 RT-PCR 特异性扩增产物电泳图

Figure 1 Electrophoretograms of RT-PCR products of 3 gene segments (L, M, and S) of new Bunya viruses isolated from patient serum

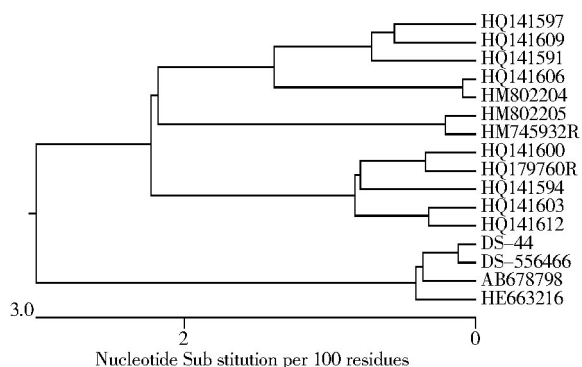


图 2 岱山县、台州市与国内 6 省新型布尼亚病毒代表株核衣壳蛋白编码基因的核苷酸序列进化树

Figure 2 A phylogenetic tree of representative new Bunya virus strains in Daishan county, Taizhou city, and six other provinces based on nucleocapsid protein coding gene sequences

2.2.3 双份血清鉴定 对 8 份患者急性期血清荧光 RT-PCR 检测为弱阳性的血样做双份血清抗体检测，恢复期血清较急性期血清的抗体 4 倍以上增高确认为新近感染(表 1)。

表 1 浙江省岱山县 8 份患者急性期血清荧光 RT-PCR 检测结果  
Table 1 Serological fluorescence RT-PCR results of 8 patients in acute stage in Daishan county

患者编号	血清效价(1:)		增长倍数
	急性期	恢复期	
1	<20	1280	64
2	20	1280	64
3	<20	320	16
4	<20	320	16
5	<20	320	16
6	20	320	16
7	<20	80	4
8	20	80	4

### 3 讨论

岱山县位于浙江省沿海北部,属于典型的海岛县。自 2004 年开始,县人民医院每年春夏季期间均有收治发热伴血小板或白细胞减少,且无明确病因的患者。

感染病例大多依山而居,年龄相对较大,野外作业偏多,感染后特异性症状不明显,发病初期大多选择自行服药或在当地医疗点就诊,从发病到正规治疗一般在 5 d 以上。在流行病学询问中,有明确蜱叮咬史的比例并不是很多,可能与报道的蜱叮咬人特性有关<sup>[4]</sup>。一起聚集性家庭病例未见患者间明显的血液传播,考虑家庭内存在其他途径传播的可能。一般而言,临床症状未出现皮疹,且 CPK(肌酸磷酸激酶)升高,TT(凝血酶时间)延长,尿蛋白阳性,考虑新型布尼亚病毒感染的可能<sup>[5]</sup>,但在流调中也发现 1 例典型的皮疹重症患者。在 1 例死亡病例和 1 例重症病例中分离到病毒,提示重症及死亡病例的病毒载量相对较高,推断病程晚期的血液或体液有更强感染他人的风险<sup>[6]</sup>。

从确诊的感染人群分布特征来看,男女患者发病比例相当,与中国 CDC 和附近省份的研究结果有所不同,可能与岱山县老年人的暴露机会会有某种关系,需进一步流行病学资料佐证。时间分布上也与江苏省的发病高峰有差异,并未存在 2 个高峰值,该特点需进一步积累蜱密度季节消长资料和海岛气象资料分析<sup>[7]</sup>。

岱山县蜱种有长角血蜱、血红扇头蜱(*Rhipicephalus sanguineus*)和镰形扇头蜱(*Rh. haemaphysaloides*),长角血蜱为优势种。游离蜱在 3—6 月密度较高,寄生蜱 10 月后数量骤减。蜱类季节消长和发病关系还应进一步探索。

综上所述,岱山县已报告发热伴血小板减少综合征病例,并从媒介中检测到该病毒,但目前岱山县对该病毒的研究尚处在初步阶段,需要继续加强监测系统的敏感性和基层实验室检测能力,早期发现病例和开展预警预测,进一步提升疾控系统能力。

### 参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部. 发热伴血小板减少综合征防治指南(2010 版)[S]. 北京:中华人民共和国卫生部, 2010.
- [2] 张磊,张严峻,丁刚强,等. 浙江省首次发现新型布尼亚病毒感染病例及分离病毒分子鉴定[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2011, 31(12):1107-1111.
- [3] 叶凌,任宜,毛彬,等. 一起家庭聚集性新布尼亚病毒感染病例的报道[J]. 疾病监测, 2012, 27(12):987-989.
- [4] 窦相峰,吕燕宁,王全意,等. 北京市发热伴血小板减少综合征监测和病原检测分析[J]. 疾病监测, 2011, 26(12):928-930, 945.
- [5] 苏倩,李旭. 新型布尼亚病毒感染和皮疹伤寒临床特征比较[J]. 中华疾病控制杂志, 2012, 16(7):585-589.
- [6] 唐晓燕,崔宁,康镨,等. 一起聚集性新布尼亚病毒感染病例的诊断与治疗分析[J]. 中华预防医学杂志, 2012, 46(2):110-113.
- [7] 胡建利,鲍昌俊,祁贤,等. 20 例人感染新型布尼亚病毒病的临床和流行病学特征分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2012, 28(3):302-304.

收稿日期:2013-04-15