

两种基因型流行性乙型脑炎病毒 在上海市共同流行

王环宇¹, 付士红¹, 何英¹, 闵继光², 潘晓玲¹, 梁国栋¹

¹ 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, 北京 102206; ² 上海中医药大学分部

摘要: **目的** 掌握上海市流行性乙型脑炎(乙脑)病毒基因型别特征。**方法** 2002—2005年在上海市奉贤县养猪场采集蚊虫标本, 研磨处理后分离病毒, 完成病毒细胞学、动物学、血清学及分子生物学鉴定。测定病毒全基因组序列, 应用ATGC、Clustal X(1.83)、MegAlign、GeneDoc 3.2和Mega 5.0等生物学软件完成序列拼接、比对、核苷酸与氨基酸同源性分析、系统进化分析。**结果** 共采集38 347只蚊虫标本, 主要是三带喙库蚊。分离到13株乙脑病毒。测定13株乙脑病毒全基因组序列, 结合上海市其他年份分离的乙脑病毒及涵盖5个基因型别的其他乙脑病毒全基因组序列, 通过系统进化分析发现, 上海市2001、2003、2005和2007年分离的乙脑病毒属于基因I型, 2004年和2006年分离的乙脑病毒属于基因III型。**结论** 2种基因型别乙脑病毒(I、III型)在上海市共同流行。

关键词: 流行性乙型脑炎病毒; 基因型; 系统进化分析

中图分类号: R512.32 文献标志码: A 文章编号: 1003-4692(2012)05-0398-04

Co-prevalence of two genotypes of Japanese encephalitis virus in Shanghai, China

WANG Huan-yu¹, FU Shi-hong¹, HE Ying¹, MIN Ji-guang², PAN Xiao-ling¹, LIANG Guo-dong¹

¹ Department of Viral Encephalitis, Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China; ² Shanghai University of T. C. M

Corresponding author: LIANG Guo-dong, Email: gdliang@hotmail.com

Supported by the Ministry of Science and Technology of China (No. 2003BA712A08-01) and National Natural Science Foundation of China (No. 31070145)

Abstract: Objective To grasp the genotypic characteristics of Japanese encephalitis virus (JEV) in Shanghai, China. **Methods** Mosquito samples were collected from two pig farms in Fengxian county in Shanghai from 2002 to 2005. Viruses were isolated from ground samples and then identified by cytological, zoological, serological, and molecular biological methods. The whole genomes of viruses were sequenced. Sequence splicing, sequence alignment, nucleotide and amino acid homology analysis, and phylogenetic analysis were performed with biological softwares, such as ATGC, Clustal X (1.83), MegAlign, GeneDoc 3.2, and Mega 5.0. **Results** A total of 38 347 mosquitoes were collected and the main species was *Culex tritaeniorhynchus*. Thirteen JEV strains were isolated and identified. The whole genomes of the 13 strains were sequenced. Phylogenetic analysis based on the whole genome sequences of other 5 genotypes of JEV and those JEV strains found in other years revealed that the JEV strains isolated in 2001, 2003, 2005, and 2007 belonged to genotype I and those isolated in 2004 and 2006 belonged to genotype III.

Conclusion Two genotypes of JEV (I and III) were co-prevalent in Shanghai, China.

Key words: Japanese encephalitis virus; Genotype; Phylogenetic analysis

流行性乙型脑炎(乙脑)病毒(Japanese encephalitis virus, JEV), 属于黄病毒科(Flaviviridae)黄病毒属(Flavivirus)的单股正链RNA病毒。基因组约

由11 000个核苷酸组成, 包括5'非编码区、1个开放读码框(open reading frame, ORF), 编码3个结构蛋白、7个非结构蛋白和3'非编码区, 基因组顺序依次为5'-C-M-E-NS1-nS2a-nS2b-NS3-nS4a-nS4b-NS5-3'^[1]。全世界分离的JEV共分为5个基因型, 目前我国已经分离到3个基因型(基因I、III和V型)的JEV^[2-3]。该病毒全基因组进化分析显示, 目前亚洲地区主要以基因I型JEV流行为主^[4]。

基金项目: 国家科技部重大传染病专项(2003BA712A08-01); 国家自然科学基金(31070145)

作者简介: 王环宇(1972-), 男, 博士, 副研究员, 主要从事病毒性脑炎的预防控制工作。Email: rainoffall@yahoo.com

通讯作者: 梁国栋, Email: gdliang@hotmail.com

我国于2001年首先在上海市采集的三带喙库蚊(*Culex tritaeniorhynchus*)标本中分离到基因I型JEV^[5],其后于2007年再次分离到该型病毒^[6]。本研究于2002—2005年于上海市奉贤县的养猪场中采集蚊虫标本,进行病毒分离,并通过病毒全基因序列分析了解上海市JEV的分子特征。

1 材料与方法

1.1 蚊虫标本采集 2002—2005年的6—7月,在上海市奉贤县城郊的陈河浜私人养猪厂和新寺现代化养猪厂采集蚊虫标本。于22:00在猪厂悬挂紫外蚊虫收集灯,次日04:00将蚊虫收集灯取回,在实验室内于室温饲养适当时间待蚊血消化后,用电动吸蚊器收集蚊虫。蚊虫标本于-20℃冰箱放置20 min。取出后首先剔除雄蚊,然后对雌蚊进行分类,分别装入冻存管,每管50或150只,编号登记后冻存于液氮罐中。

1.2 病毒分离与鉴定 BHK-21、C6/36细胞由本实验室保存。2~3日龄乳小白鼠购自中国药品生物制品检定所啮齿类动物繁殖中心。从液氮罐中取出冻存管,将蚊虫标本研磨、滤过。取0.4 ml滤过液接种于BHK-21和C6/36细胞,逐日观察细胞病变。在两种细胞中连续盲传3代,无病变者丢弃,病变者出现规律病变后冻存。

用病毒感染的细胞上清液制备病毒全抗原;甲病毒、布尼亚病毒、JEV多克隆抗体由本实验室制备。羊抗鼠二抗购自北方同正生物制品有限公司。

使用Trizol LS Reagent(Invitrogen公司)从细胞培养阳性分离物中提取总RNA;使用随机引物和Ready-to-Go™ You-Prime First-Strand Beads Kit试剂盒(GE Healthcare,UK公司)按照操作说明制备cDNA文库;使用本实验室设计的JEV PrM区段特异性引物^[2]进行核酸鉴定,在利嘉泰成科技有限公司完成序列测定。

1.3 病毒全基因组序列扩增与测定 采用本实验室设计的JEV全基因组序列引物^[7]扩增,在利嘉泰成科技有限公司完成序列测定;使用ATGC软件对序列片段进行拼接、剪辑、校正。

1.4 全基因组序列分析 使用Clustal X 1.83软件进行碱基配对及核苷酸序列同源性分析,使用DNASar软件包中的MegAlign软件进行核苷酸及氨基酸差异度分析,使用GeneDoc 3.2软件进行氨基酸位点差异分析。从GenBank中选择基因I~V型的17株JEV全基因组核苷酸序列,与上海市2002—2005年分离的JEV一起,使用Mega 4.0软件中的Neighbor-Joining法(Bootstrap值为1000)进行系统进化分析。所有PCR产物测序由利嘉泰成科技有限公司完成。

2 结果

2.1 病毒分离及生物学性状观察 4年中共采集38 347只蚊虫标本,其中三带喙库蚊37 874只,常型曼蚊(*Mansonia uniformis*)372只,中华按蚊(*Anopheles sinensis*)51只,二带喙库蚊(*Cx. bitaeniorhynchus*)2只,迷走库蚊(*Cx. vagans*)1只,其它蚊虫47只。所有蚊虫标本分为326批编号保存。

蚊虫按照常规方法进行研磨处理,研磨滤过上清液接种BHK-21和C6/36细胞36 h后,每隔8 h观察一次细胞病变情况。经过连续3次传代,各毒株病变情况逐渐规律,病变时间趋于稳定。大多数毒株在72 h左右,BHK-21细胞出现圆缩,96 h后出现明显细胞病变,细胞开始脱落。毒株在C6/36细胞中出现融合,96 h后细胞融合,连接成片,形成较大的空泡,部分细胞脱落。从326批蚊虫标本中共分离到13株阳性分离物。

将收获病毒悬液的BHK-21细胞上清液颅内接种1~3日龄乳鼠,经乳鼠脑内3次传代,各毒株病变情况逐渐规律,病变时间趋于稳定。乳鼠从6 h起就陆续出现拒乳、蜷屈、震颤、抽搐等中枢神经系统症状。随着时间的推移症状逐渐加剧,多数乳鼠在72 h左右死亡(表1)。

表1 新分离毒株接种BHK-21、C6/36细胞及乳鼠病变观察
Table 1 Pathological observation of BHK-21 and C6/36 cells and suckling mice inoculated with newly isolated virus strains

序号	病毒名称	BHK-21细胞 病变(h)			C6/36细胞 病变(h)			乳鼠致死性 观察(h)		
		1代	2代	3代	1代	2代	3代	1代	2代	3代
1	SH03-103	96	84	60	-	-	96	48	72	72
2	SH03-105	96	84	60	120	72	72	144	72	72
3	SH03-109	72	72	60	120	72	72	120	72	72
4	SH03-115	-	72	60	-	-	72	144	72	72
5	SH03-124	120	96	60	-	-	72	96	72	72
6	SH03-127	-	120	96	-	120	72	168	72	72
7	SH03-128	-	72	60	-	-	120	144	72	72
8	SH03-129	72	72	60	-	96	72	144	72	72
9	SH03-130	96	96	96	-	-	6	96	72	72
10	SH04-3	96	96	72	120	96	72	144	72	60
11	SH04-5	96	96	72	96	96	72	96	72	72
12	SH04-10	96	96	72	120	96	72	144	96	72
13	SH05-24	96	72	72	96	96	72	72	72	72

注:“-”表示未出现细胞病变。

2.2 新分离病毒的鉴定 新分离的13株病毒分别与甲病毒属、布尼亚病毒属和JEV(高顺生株)特异性免疫腹水反应。结果显示,13株病毒与JEV高顺生株的免疫腹水发生阳性反应,而与甲病毒属、布尼亚病毒属特异性免疫腹水不反应。通过JEV PrM区段序列分析

证实,13 株病毒为 JEV。

经血清学和分子生物学鉴定证实,上海市 2002—2005 年共分离到 13 株 JEV,均分离自三带喙库蚊标本,其中 2003 年 9 株,2004 年 3 株,2005 年 1 株。

2.3 JEV 基因型特征 将上海市 2003—2005 年分离的 JEV 及我国其他地区分离的 JEV 一起与来源于 GenBank 中不同基因型的 JEV 全基因组进行系统进化

分析。结果显示,13 株 JEV 分布在基因 I、III 两个型别中,其中 2003 年分离的 9 株、2005 年分离的 1 株,共 10 株属于基因 I 型,上海市 2004 年分离的 3 株 JEV 属于基因 III 型。上海市分离的基因 I 型 JEV 之间全基因序列核苷酸同源性在 98.3%~99.7% 之间,基因 III 型 JEV 之间全基因序列核苷酸同源性在 97.8%~99.9% 之间(图 1)。

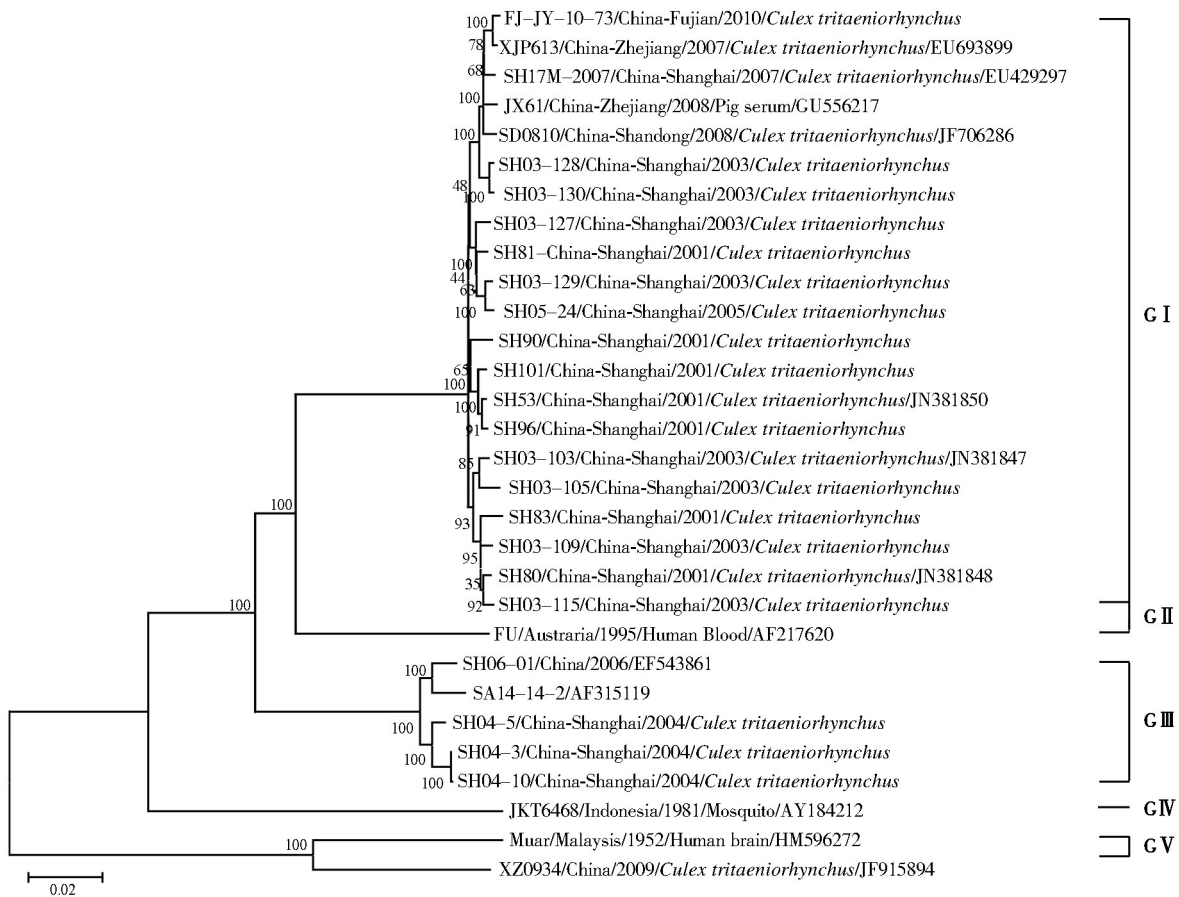


图 1 5 个基因型别的 JEV 30 株系统进化
Fig. 1 Phylogenetic analysis of 30 JEV strains of five genotypes

3 讨论

2002—2005 年在上海市采集的 3 万余只蚊虫标本中共分离到 13 株 JEV,其中 2002 年未分离到该病毒。结合 2006—2007 年上海市分离的 JEV 全基因组系统进化分析显示,上海市分离和鉴定的 JEV 分别属于基因 I 型和 III 型,其中 2001、2003、2005、2007 年均为基因 I 型,2004 和 2006 年均为基因 III 型。所有分离的同一型别 JEV 全基因组之间同源性非常高,在 97% 以上。

我国于 2001 年从上海市采集的三带喙库蚊标本中首次报道分离到基因 I 型 JEV^[5],之后在我国大部分地区均从蚊虫标本中分离到该型别病毒^[2,8],并且,

在贵州^[9]、山西和云南省^[10]的脑炎患者标本中分离到该型别病毒,在 2006 年山西省运城城市成年人乙脑暴发流行中同时检测基因 I、III 两个型别的 JEV^[11]。在亚洲的其他国家也从蚊虫中分离到基因 I 型 JEV,例如:日本和韩国以往均为基因 III 型 JEV,在 20 世纪 90 年代后从蚊虫标本和/或猪血清标本中分离到基因 I 型 JEV^[12-13];泰国^[14]、越南^[13]也相继在 2000 年之后分离到该型别 JEV;我国台湾省以往分离的均为基因 III 型 JEV,但在 2008 年后从采集的三带喙库蚊标本中分离到基因 I 型 JEV^[15-16],但尚未发现基因 I 型 JEV 感染的脑炎患者。另有一些国家目前已经从患者标本中分离到基因 I 型 JEV 或检测到该型别病毒的核酸序列,例如:在日本,因为乙脑疫苗的广泛使用,脑炎患者非常

少,每年<10例,尚未在患者标本中分离到基因 I 型 JEV,但是日本从脑炎患者的脑脊液标本中检测到基因 I 型 JEV 的核酸序列^[17],可以认为该型别的 JEV 已经在当地流行;印度次大陆在 2005 年之前从蚊虫及患者标本中分离的均为基因 III 型 JEV,但在 2007 年从脑炎患者的脑脊液标本中分离到基因 I 型 JEV^[18],说明该型别的 JEV 已经在当地流行。通过基因 I ~IV 型 JEV 全基因序列进化分析显示,该病毒的整体进化与地理环境、生物种系等关系不显著;同时发现,基因 I 型 JEV 是最年轻的型别,目前已经取代基因 III 型 JEV 成为亚洲地区的最主要基因型别^[4]。

JEV 只有一个血清型,因此认为由基因 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,只是保护的效果会有一定差异。通过病毒基因组序列分析^[19]以及使用活病毒进行生物学实验^[20]也初步验证了该观点。但是仍需进一步深入开展乙脑疫苗对不同类型 JEV 保护率的研究。

由于基因 I、III 两种基因型别的 JEV 在上海市同时存在,因此,建议进一步加强脑炎患者中 JEV 分离及核酸检测,密切关注患者中 JEV 基因型别是否发生变化,从而为上海市乙脑预防控制工作提供病原学的理论依据。

参考文献

- [1] Zheng Y, Li M, Wang H, et al. Japanese encephalitis and Japanese encephalitis virus in mainland China[J]. Rev Med Virol, 2012. DOI:10.1002/rmv.1710.
- [2] Wang HY, Takasaki T, Fu SH, et al. Molecular epidemiological analysis of Japanese encephalitis virus in China[J]. J Gen Virol, 2007, 88(Pt 3):885-894.
- [3] Li MH, Fu SH, Chen WX, et al. Genotype V Japanese encephalitis virus is emerging[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2011, 5(7):e1231.
- [4] 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.
- [5] 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[J].中华微生物学和免疫学杂志,2004,24(11):5-11.
- [6] Zhang JS, Zhao QM, Zhang PH, et al. Genomic sequence of a

- Japanese encephalitis virus isolate from southern China[J]. Arch Virol, 2009, 154(7):1177-1180.
- [7] 潘晓玲,梁国栋.乙脑病毒基因 I、III 型特异性全基因组引物[J].中华实验和临床病毒学杂志,2009,23(4):254-256.
- [8] 王海岩,高晓艳,宋立志,等.山东省首次分离出基因 I 型流行性乙型脑炎病毒[J].中国疫苗和免疫,2009,15(4):337-340.
- [9] Wang L, Fu S, Zhang H, et al. Identification and isolation of Genotype- I Japanese encephalitis virus from encephalitis patients [J/OL]. Virol J, 2010, 7:345.
- [10] Zhang JS, Zhao QM, Guo XF, et al. Isolation and genetic characteristics of human genotype I Japanese encephalitis virus, China, 2009[J]. PLoS One, 2011, 6(1):e16418.
- [11] Wang LH, Fu SH, Wang HY, et al. Japanese encephalitis outbreak, Yuncheng, China, 2006 [J]. Emerg Infect Dis, 2007, 13 (7) : 1123-1125.
- [12] Yun SM, Cho JE, Ju YR, et al. Molecular epidemiology of Japanese encephalitis virus circulating in South Korea, 1983-2005 [J/OL]. Virol J, 2010, 7:127.
- [13] 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.
- [14] Nitatpattana N, Dubot-Peres A, Gouilh MA, et al. Change in Japanese encephalitis virus distribution, Thailand[J]. Emerg Infect Dis, 2008, 14(11):1762-1765.
- [15] Huang JH, Lin TH, Teng HJ, et al. Molecular epidemiology of Japanese encephalitis virus, Taiwan[J]. Emerg Infect Dis, 2010, 16 (5):876-878.
- [16] Chen YY, Fan YC, Tu WC, et al. Japanese encephalitis virus genotype replacement, Taiwan, 2009-2010 [J]. Emerg Infect Dis, 2011, 17(12):2354-2356.
- [17] Kuwayama M, Ito M, Takao S, et al. Japanese encephalitis virus in meningitis patients, Japan[J]. Emerg Infect Dis, 2005, 11(3):471-473.
- [18] Fulmali PV, Sapkal GN, Athawale S, et al. Introduction of Japanese encephalitis virus genotype I, India[J]. Emerg Infect Dis, 2011, 17 (2):319-321.
- [19] 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.
- [20] 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.

收稿日期:2012-07-02

·读者·作者·编者·

欢迎订阅《中国媒介生物学及控制杂志》合订本

《中国媒介生物学及控制杂志》2004、2006—2010 年还有少量合订本,每本定价 60.00 元;2011 年定价 70.00 元(均含挂号邮费)。热诚欢迎订阅。欲订者请与本刊编辑部联系。

地址:北京市昌平区昌百路 155 号(传染病所) 邮政编码:102206 电话/传真:010-58900731 Email:bingmei@icdc.cn