

新疆南部地区 2012 年西尼罗病毒感染的检测与监测

付士红 曹蕾 吕志 何英 雷雯雯 李樊 王环宇 梁国栋

中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所 传染病预防控制国家重点实验室, 北京 100026

付士红和曹蕾对本文同等贡献

通信作者: 梁国栋, Email: gdliang@hotmail.com, 电话: 010-63510124

【摘要】 目的 了解在新疆南部地区西尼罗病毒(west nile virus, WNV)感染的情况。**方法** 于 2012 年在新疆南部地区采集发热患者和鸡血清标本, 通过酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)及中和试验检测标本中西尼罗病毒特异性抗体。**结果** 在新疆南部地区 8 个县共采集到门诊和住院患者 1 712 份血清标本, 其中 WNV IgM 抗体阳性和 WNV 中和抗体阳性标本分别为 22 份和 48 份, 这其中迦师县标本中 WNV IgM 抗体和中和抗体阳性标本分别为 21 份和 42 份; 在新疆南部 4 个县采集的 383 份鸡血清标本中仅在迦师县采集的鸡血清标本中检测到 28 份标本为 WNV 中和抗体阳性, 其余县采集的鸡血清均为阴性。**结论** 新疆南部地区 2012 年存在人群和家养鸡的 WNV 感染, 迦师县是该病毒感染的主要地区。

【关键词】 西尼罗病毒; 感染; 检测

基金项目: “传染病防治”科技重大专项(2018ZX10711001)

DOI: 10. 3760/cma.j. issn. 1003-9279. 2019. 03. 010

Detection and surveillance of west nile virus infection in southern Xinjiang, China, 2012

Fu Shihong, Cao Lei, Lyu Zhi, He Ying, Lei Wenwen, Li Fan, Wang Huanyu, Liang Guodong

National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Fu Shihong and Cao Lei are contributed equally to the article

Corresponding author: Liang Guodong, Email: gdliang@hotmail.com, Tel: 010-63510124

【Abstract】 Objective To investigate the west nile virus (WNV) infection in Xinjiang, China. **Methods** Serum samples were collected from patients with fever and chicken in southern Xinjiang, 2012. The presence of WNV-specific immunoglobulin M (IgM) antibodies and neutralizing antibodies was examined through enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and plaque reduction neutralization test (PRNT₉₀). **Results** A total of 1 712 serum samples of outpatients and inpatients were collected in 8 counties in southern Xinjiang. As a result, 22 samples were positive for WNV IgM antibody and 48 samples were positive for WNV neutralization antibody, among which 21 WNV IgM antibody positive samples and 42 WNV neutralization antibody positive samples were from Jiashi county. Of 383 chicken serum samples collected in 4 counties in southern Xinjiang, only 28 samples were positive for WNV neutralizing antibody, interestingly, all positive chicken serum samples were collected from Jiashi county. **Conclusions** This study revealed that WNV infection occurred in human and poultry in southern Xinjiang, 2012, mainly in Jiashi county.

【Key words】 West Nile virus; Infection; Detection

Fund program: National Science and Technology Major Project of China (2018ZX10711001)

DOI: 10. 3760/cma.j. issn. 1003-9279. 2019. 03. 010

西尼罗病毒(west nile virus, WNV)为黄病毒科(Flaviviridae)黄病毒属(Flavivirus)成员。西尼罗

病毒首次分离自非洲, 随后该病毒播撒到非洲、欧洲、澳洲、亚洲、北美等地区, 其流行呈扩大趋势^[1]。

WNV 已经成为在世界分布最广的蚊传黄病毒^[2]。WNV 感染可以出现发热(也称作西尼罗热)、脑膜炎、脑炎和脑膜脑炎等症状,统称为 WNV 病(west Nile virus disease)。自 1999 年美国东部的纽约地区首次出现 WNV 感染病例后,在美国已经出现数万例 WNV 感染病例,数千人死亡,估计感染人数已经达到 700 万^[3]。WNV 感染造成极大的公共卫生健康威胁和经济损失已经引起了全世界各国的高度关注^[4-5]。

我国于 2011 年在新疆南部迦师县采集的尖音库蚊标本中分离到 WNV^[6],并在当地发现 WNV 感染所引起的西尼罗热和 WNV 性脑炎的流行^[6-8],这提示新疆南部地区自然界存在 WNV 在蚊虫中的循环,同时也存在人类感染 WNV 的临床病例。这不仅是在新疆南部地区发现 WNV 和相关感染病例,在我国也是首次分离到 WNV 和发现由该病毒感染引起的发热和病毒性脑炎的患者,具有重要的流行病学意义。但是以上研究结果仅提示迦师县 2011 年存在 WNV 的循环和人群间感染状况,而 2011 年以后包括迦师县及其临近的地区是否存在 WNV 感染?当地动物宿主中是否存在 WNV 感染?这些问题不仅是科学家的研究课题同时也是在当地实施 WNV 感染预防控制的首先要解决的科学问题。为此,本研究在迦师县及其临近的地区医院采集发热和住院患者血清标本,并在采集当地饲养的鸡血清标本检测 WNV 的抗体以了解 WNV 在当地的感染状况,为当地 WNV 感染的预防控制提供基础数据。结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 病毒 WNV XJ11 129 株为 2011 年在新疆蚊虫标本分离的 WNV(GenBank 序列号 JX442279)乙脑病毒(Japanese encephalitis virus, JEV) P3 株(GenBank 序列号 JEU47032)为本实验室保存^[6,9]。

1.2 标本采集 发热患者标本采集:在医院门诊部或者病房采集患者血液标本,采集患者全血 4 ml,实验室分离血清 626×g, 15 min),血清标本分装于-80℃保存备检。鸡血清标本采集:在当地农户饲养的鸡,静脉取血 2 ml,实验室分离血清 626×g, 15 min),血清标本分装-80℃保存备检。

1.3 WNV IgM 抗体检测 使用捕获 IgM-ELISA 法检测 WNV(WNV IgM Capture DxSelect; Focus Diagnostics Inc., Cypress, CA, USA),按照试剂盒说

明书进行操作^[6-8]。

1.4 WNV 和 JEV 中和抗体检测 使用 90% 蚀斑减少中和试验(plaque reduction neutralization test, PRNT₉₀)检测患者标本中 WNV 和 JEV 中和抗体滴度^[6-8],血清稀释度≥1:10 判定为 PRNT₉₀ 中和抗体阳性标本。

2 结果

2.1 标本采集 2012 年 9 月 1~11 d 之间在新疆南部两个地区(喀什和和田)的 8 个县的县医院和镇医院采集到门诊和住院患者标本 1 712 份血清标本;在 4 个县采集到 383 份鸡血清标本(表 1)。

2.2 WNV 感染的实验室检测

2.2.1 人血清标本的检测:本研究对采集到的所有人血清标本平行检测 WNV 的 IgM 抗体和 PRNT₉₀ 中和抗体。检测结果显示,1 712 份人血清标本中有 21 份 WNV IgM 抗体阳性和 48 份 WNV PRNT₉₀ 抗体阳性(表 1)。WNV IgM 和 PRNT₉₀ 抗体同时阳性的血清标本有 11 份(表 2)。

检测结果还显示,以上阳性标本均集中在喀什地区的迦师县、英吉沙县和麦盖提县。其余 5 个县的标本中均未检测到抗体阳性标本。为了排除 WNV 和 JEV 抗体间的交叉反应,本研究对所有 WNV PRNT₉₀ 中和抗体阳性的血清标本平行检测了该标本中 JEV PRNT₉₀ 中和抗体滴度,如果以血清稀释度≥1:10 判定为 JEV 中和抗体阳性,这 48 份 JEV 中和抗体阳性标本中仅存在 2 份标本为 JEV 中和抗体阳性(表 2)。

2.2.2 鸡血清标本的检测:使用 WNV PRNT₉₀ 蚀斑中和试验对所有采集到的 383 份鸡血清标本进行 WNV 中和抗体检测,结果显示在迦师县采集的 94 份鸡血清标本有 28 份标本为 WNV 中和抗体阳性,阳性率为 30%(28/94)。其余各县采集的鸡血清标本中均未检测到 WNV 中和抗体阳性。鸡血清中和抗体阳性见表 1。

3 讨论

我国于 2011 年夏季在新疆喀什地区迦师县采集的蚊虫标本中分离并鉴定出 5 株 WNV,其中 XJ11129-3 株全基因组序列分析发现该病毒全基因组 11 029 bp,与俄罗斯 1999—2003 年分离株同源率为 99%。病毒全基因组分子遗传进化分析提示我国分离的 WNV 与俄罗斯、匈牙利、纽约等 WNV

表 1 2012 年新疆南部地区 WNV 感染检测与监测

Tab.1 Detection of west Nile Virus infection in southern Xinjiang, 2012

区县	份数	患者标本	采集时间 (d)	WNV-IgM(阳性)	PRNT ₉₀ ≥ 1:10	
					WNV	JEV
患者血						
伽师县	113		5~11	21	42	1
英吉沙	289		6~9	0	6	0
麦盖提	165		3~6	1	0	0
库班 1	55		4~5	0	0	0
库班 2	66		4~5	0	0	0
拜城	335	90 例标本来自门诊	7~9	0	0	0
博湖	149	内科、外科、儿科	5~10	0	0	0
喀什	469		1~11	0	0	0
克孜勒苏柯尔克孜自治州	81		10~11	0	0	0
患者血小计	1 712			22	48	1
鸡血						
			9 月 1~8			
墨玉县	67	居民庭院中的鸡圈	1	未做	0	未做
伽师县	94	居民庭院中的鸡圈	4~8	未做	28	未做
英吉沙	81	居民庭院中的鸡圈	7	未做	0	未做
麦盖提	83	居民庭院中的鸡圈	8	未做	0	未做
鸡血小计	383				28	

表 2 伽师县 2012 年 WNV IgM 抗体和 PRNT₉₀ 中和抗体同时阳性标本信息

Tab.2 Both WNV IgM and PRNT₉₀ antibody positive in Jiashi county, 2012

编号	年龄(岁)	性别	WNV-IgM	PRNT ₉₀	
				WNV	JEV
1	66	男	+	1:10	-
2	80	男	+	1:10	-
3	77	男	+	1:10	-
4	5	男	+	1:20	-
5	54	女	+	1:10	1:10
6	60	男	+	1:40	-
7	59	男	+	1:10	-
8	59	女	+	1:10	-
9	44	男	+	1:10	-
10	77	男	+	1:10	-
11	42	女	+	1:320	1:160

注:1. 所有病例职业都是农民;2. “+”表示阳性,“-”表示阴性

Notes:1. The occupation of all the cases was farmers; 2. “+” denotes positive, “-” denotes negative

均处于同一进化分支。这是我国首次分离到 WNV, 同时也是在东亚地区首次分离到 WNV^[6]。

2004 年 8 月 5 ~9 月 3 日喀什市伽师县发生不明原因的病毒性脑膜脑炎的大流行, 首例患者发生于 8 月 3 日, 8 月中旬病例达到高峰, 8 月下旬开始下降, 至 9 月 3 日报告最后 1 例患者。全县共报告 80 例病例, 死亡 10 例(病死率 12.5%)。伽师县共有 12 乡镇, 300 行政村, 314 251 人。病例高度散发, 80 病例分布于 10 乡镇, 其中以 7 乡(21 例)和 8

乡(28 例)报告病例最多, 占全部病例 61% (49/80)。其余乡镇病例在 1~4 例不等。各病例之间没有任何流行病学关联。病例的时间分布, 8 月 5 日 1 例, 6~10 日 13 例, 11~15 日 20 例, 16~20 日 27 例, 21~25 日 10 例, 26~31 日 4 例, 9 月 1~3 日 5 例。病例中最小 2 岁, 最大 83 岁, 50 岁以上年龄患者占 62.5% (50/80), 患者男女性别比为 58:22。职业以农民为主 90% (72/90)。48 例住院病例临床症状观察发现, 所有病例均急起发热, 并伴有头痛, 全身酸痛, 颈项强直症状; 90% 病例有烦躁不安, 意识障碍, 抽搐, 嗜睡, 谵妄, 昏迷等中枢神经系统症状, 50% 病例出现恶心和呕吐症状, 提示这些病例具有中枢系统感染。实验室的检测结果表明患者急性期血清中 WNV IgM 抗体阳性, 提示为 WNV 急性感染, 此外患者双份(急性期和恢复期)血清标本存在 WNV 中和抗体 4 倍差异。以上结果提示 2004 年新疆喀什地区发生的群体性, 以成年人为主的神经系统感染为 WNV 感染。这是首次证实我国存在由 WNV 感染引起的病毒性脑炎在我国的流行, 具有重要公共卫生意义^[8,10]。

鉴于在伽师县曾经发生过 WNV 脑炎的流行, 并且在当地蚊虫中分离到 WNV, 此外, 伽师县周围地区的地理环境具有相似性, 为了了解新疆南部地区 WNV 的流行状况, 本研究在新疆南部地区 8 个县开展 WNV 感染状况调查。本次检测与监测结果显示, 在 8 个县采集的 1 712 份患者标本中仅仅检

测到 WNV IgM 抗体阳性 22 份,其中 21 份来自迦师县(麦盖提 1 份),西尼罗中和抗体阳性为 48 份,其中 42 份来自于迦师县(6 份来自于英吉沙县)。可见 2012 年新疆南部地区 8 个县中,迦师县仍然存在 WNV 在人间的感染(表 1,表 2)。

本研究在新疆南部地区 4 县采集的 383 份鸡血清标本中 WNV 中和抗体阳性样本为 28 份,而且所有 28 份 WNV 中和抗体阳性的鸡血清标本均来自于迦师县,其余 3 个县的 289 份鸡血清标本未检测到阳性。因此迦师县鸡血清 WNV 中和抗体阳性率为 30%(28/94),见表 1。众所周知,WNV 为蚊虫传播的病毒,鸡可以作为 WNV 感染的哨点动物^[1-2]。迦师县鸡血清标本中 WNV 中和抗体阳性提示在迦师县自然环境中存在携带 WNV 的蚊虫,蚊虫叮咬家庭饲养的鸡,而使后者感染 WNV。鸡可以作为 WNV 的扩增宿主。由此,WNV 维持了在当地的种群循环,同时由于携带病毒的蚊虫叮咬当地居民而造成 WNV 在人间的感染。

我国自 1980 年代即开始使用血凝抑制法在云南省采集的鸟血清标本检测到 WNV 血凝抗体^[12]。近年来在我国上海市采集 95 只鸟(含 14 种)和 341 匹马血清标本开展 WNV 感染状况调查,检测发现 9 只鸟 WNV IgG 抗体阳性,进一步使用中和试验方法确认其中 5 只鸟血清标本存在 WNV 中和抗体。341 匹马血清标本中未检测到 WNV IgM 抗体和中和抗体阳性^[13]。此外在我国上海市采集 367 只家养犬和 309 只家养猫血清标本中检测到 5%(17/367)家养犬和 15%(46/309)宠物猫标本中存在 WNV 中和抗体阳性^[14]。本研究首次在新疆南部地区开展家养鸡对 WNV 感染状况研究,结果提示新疆南部地区的迦师县鸡感染率高于南疆其他地区(表 1)。

本研究结果的局限性仅仅采集到患者的一份血清标本,未采集到患者恢复期血清,因此仅仅以标本中是否存在 WNV IgM 抗体和中和抗体作为判定其是否存在 WNV 感染的指标。作为 WNV 感染的血清学检测需要同一患者双份(急性期和恢复期)血清中中和抗体的 4 倍增高。此外,鉴于 WNV 与 JEV 之间具有血清学交叉反应,因此需要监测同一份血清中 WNV 与 JEV 中和抗体滴度差异,以便排除抗原交叉所致的假阳性等。

迦师县是我国首次分离到 WNV 和发现 WNV 感染引起的群体性病毒性脑炎的流行地区,此外,迦

师县夏季还流行有伤寒和 Tahyna 病毒感染引起的发热等的流行^[7,11]。本次调查结果提示 2012 年迦师县依然存在 WNV 的感染。因此,继续加强新疆南部地区,特别是加强迦师县 WNV 及其感染检测和监测具有重要流行病学意义,以便应对和防止再次出现 WNV 感染,特别是 WNV 感染所引起的群体性病毒性脑炎的暴发流行。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 付士红、曹蕾:论文撰写;付士红、曹蕾、吕志:实验操作;何英、雷雯雯、李樊、王环宇、梁国栋:研究审计、指导、论文修改、经费支持

参考文献

- [1] Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses[J]. *Nat Med*, 2004, 10(Suppl 12): S98-109. DOI:10.1038/nm1144.
- [2] Weaver SC, Reisen WK. Present and future arboviral threats[J]. *Antiviral Res*, 2010, 85(2): 328-345. DOI: 10.1016/j.antiviral.2009.10.008.
- [3] Ronca SE, Murray KO, Nolan MS. Cumulative Incidence of West Nile Virus Infection, Continental United States, 1999-2016[J]. *Emerg Infect Dis*, 2019, 25(2): 325-327. DOI: 10.3201/eid2502.180765.
- [4] Kramer LD, Styer LM, Ebel GD. A global perspective on the epidemiology of West Nile virus[J]. *Annu Rev Entomol*, 2008, 53(1):61-81. DOI:10.1146/annurev.ento.53.103106.093258.
- [5] Kilpatrick AM. Globalization, land use, and the invasion of West Nile virus[J]. *Science*, 2011, 334(6054): 323-327. DOI: 10.1126/science.1201010.
- [6] Lu Z, Fu SH, Cao L, et al. Human infection with West Nile Virus, Xinjiang, China, 2011[J]. *Emerg Infect Dis*, 2014, 20(8): 1421-1423. DOI:10.3201/eid2008.131433.
- [7] Cao L, Fu S, Lv Z, et al. West Nile virus infection in suspected febrile typhoid cases in Xinjiang, China[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2017, 6(6): e41. DOI:10.1038/emi.2017.27.
- [8] Li XL, Fu SH, Liu WB, et al. West Nile Virus infection in Xinjiang, China[J]. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2013, 13(2): 131-133. DOI:10.1089/vbz.2012.0995.
- [9] 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. DOI:10.1128/jvi.00825-11.
- [10] 李朝霞,朱常忠,王素蕾等,急性病毒性脑膜脑炎疫情分析[J]. *中国公共卫生*, 2007, 23(增刊): 72-74;
- [11] Lu Z, Lu XJ, Fu SH, et al. Tahyna virus and human infection, China[J]. *Emerg Infect Dis*, 2009, 15(2): 306-309. DOI: 10.3201/eid1502.080722.
- [12] 杨起饶,刘行知,张嘉玉,等.云南省洱源县血清虫媒病毒抗体调查[J]. *中华流行病学杂志*, 1988, 9(3): 150-153.
- [13] Lan DL, Wang CS, Deng B, et al. Serological investigations on West Nile virus in birds and horses in Shanghai, China[J]. *Epidemiol Infect*, 2013, 141(3): 596-600. DOI:10.1017/s0950268812001094.
- [14] Lan D, Ji W, Yu D, et al. Serological evidence of West Nile virus in dogs and cats in China[J]. *Arch Virol*, 2011, 156(5): 893-895. DOI:10.1007/s00705-010-0913-8.

(收稿日期:2019-01-25)

(本文编辑:陈培莉)