

云南省西双版纳地区 2011 年蚊虫 及虫媒病毒调查

唐承军¹, 付士红¹, 张海林², 范建华³, 杨卫红², 章域震², 吕志¹, 李园园³, 李鸿斌³,
朱进³, 王宇³, 陶伽伶³, 李丽华⁴, 白卫荣⁴, 查冰¹, 王丕玉⁵, 梁国栋¹

1 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 102206; 2 云南省地方病防治所;
3 西双版纳州疾病预防控制中心; 4 西双版纳州人民医院; 5 云南省寄生虫病防治所

摘要: **目的** 了解云南省西双版纳地区蚊虫媒介的分布特点及当地虫媒病毒情况, 为虫媒病毒病防治提供科学依据。**方法** 在云南省西双版纳州采集蚊虫标本, 用细胞培养法分离病毒, 并用 RT-PCR 法检测常见虫媒病毒核酸; 在西双版纳州采集发热患者血清及脑脊液标本, 并用 ELISA 法检测常见病毒性脑炎 IgM 抗体。**结果** 共采集蚊虫 5 属 29 种 13 337 只, 其中三带喙库蚊、中华按蚊、带足按蚊分别占蚊虫标本总数的 79.98% (10 667/13 337)、7.95% (1060/13 337) 和 7.38% (984/13 337), 三带喙库蚊为当地优势蚊种。采用流行性乙型脑炎(乙脑)病毒、版纳病毒、甲病毒属、环状病毒等多种虫媒病毒引物对 214 批蚊虫标本进行 PCR 检测, 结果均为阴性; 采用多种细胞对蚊虫标本进行病毒分离, 结果也为阴性。用相关脑炎病毒试剂盒对采集到的 52 份急性期血清标本及 54 份脑脊液标本进行 ELISA 检测, 发现乙脑病毒 IgM 阳性 16 例, 单纯疱疹病毒 IgM 抗体阳性 4 例, 腮腺炎病毒 IgM 抗体阳性 13 例, 埃可病毒 IgM 抗体阳性 3 例, 登革热病毒 IgM 抗体阳性 1 例。**结论** 2011 年西双版纳地区采集到的蚊虫标本中未检测到乙脑、版纳及环状病毒等虫媒病毒, 但血清学检测结果表明当地发热患者存在乙脑等多种病毒性脑炎感染。

关键词: 蚊虫; 虫媒病毒; 流行性乙型脑炎病毒

中图分类号: R384.1; R373 文献标志码: A 文章编号: 1003-4692(2012)05-0410-04

Investigation of mosquitoes and arboviruses in Xishuangbanna, Yunnan province, China in 2011

TANG Cheng-jun¹, FU Shi-hong¹, ZHANG Hai-lin², FAN Jian-hua³, YANG Wei-hong², ZHANG Yu-zhen², LV Zhi¹, LI Yuan-yuan³,
LI Hong-bin³, ZHU Jin³, WANG Yu³, TAO Jia-ling³, LI Li-hua⁴, BAI Wei-rong⁴, ZHA Bing¹, WANG Pi-yu⁵, LIANG Guo-dong¹

1 State Key Laboratory for Infectious Diseases Prevention and Control, Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China; 2 Yunnan Institute of Endemic Disease Control and Prevention; 3 Xishuangbanna Center for Disease Control and Prevention; 4 Xishuangbanna People's Hospital; 5 Yunnan Institute of Parasitic Disease Control and Prevention

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

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81171635) and Science and Technology Project of Xishuangbanna (No. 201017)

Abstract: Objective To investigate the distribution profiles of mosquitoes and arboviruses in Xishuangbanna, Yunnan province, China, and to provide evidence for prevention and control of arbovirus diseases. **Methods** Mosquito samples were collected in Xishuangbanna and then used for virus isolation by cell culture. RT-PCR was used to identify arbovirus. Serum and cerebrospinal fluid samples were collected from fever patients, and the common encephalitis virus IgM antibodies were detected by ELISA. **Results** A total of 13 337 mosquitoes, belonging to 29 species and 5 genera, were collected. The main mosquitoes were *Culex tritaeniorhynchus* (79.98%, 10 667/13 337), followed by *Anopheles sinensis* (7.95%, 1060/13 337) and *An. pedtaeniatus* (7.38%, 984/13 337). Several specific primers for Japanese encephalitis virus (JEV), Banna virus, alphavirus, and circovirus were used for PCR detection in 214 batches of mosquitoes, and no virus was isolated from the mosquitoes. Also, no virus was found in isolation using several types of cells. A total of 52 serum samples and 54 cerebrospinal fluid samples were collected from patients in acute stage by kits for encephalitis viruses and then subject to ELISA. There were 16 cases with JEV IgM, 4 cases with Herpes simplex virus IgM, 13 cases with mumps virus IgM, 3 cases with ECHO virus IgM, and 1 case with dengue virus IgM. **Conclusion** No JEV, BAV, and circovirus were detected from mosquitoes collected in Xishuangbanna, Yunnan province, China in 2011. However, serological results indicated that local fever patients were infected with several viruses such as JEV.

Key words: Mosquito; Arbovirus; Japanese encephalitis virus

基金项目: 国家自然科学基金(81171635); 西双版纳州科技项目(201017)

作者简介: 唐承军(1985-), 男, 在读硕士, 主要从事虫媒病毒相关研究。Email: happyamyjack@163.com; 付士红(1967-), 女, 主管技师, 主要从事病毒性病原生物相关研究。Email: shihongfu@hotmail.com

通讯作者: 梁国栋, Email: gdliang@hotmail.com

唐承军、付士红同为第一作者。

虫媒病毒(Arbovirus)是指一类通过吸血昆虫叮咬敏感的脊椎动物在人、畜间传播的病毒^[1-2]。虫媒病毒主要集中在披膜病毒科甲病毒属、黄病毒科、布尼亚病毒科和呼肠孤病毒科,引起的症状有3种类型,分别表现为发热、皮疹和关节痛,发热和脑炎以及发热和出血^[1-2]。虫媒病毒的传播媒介为吸血节肢动物(主要为蚊和蜱^[1-3])。全世界已经发现的大约3000种蚊虫中,约300种可以传播虫媒病毒,其中以伊蚊(*Aedes mosquitoes*)和库蚊(*Culex mosquitoes*)为主^[1]。西双版纳地区曾分离到版纳病毒和流行性乙型脑炎(乙脑)病毒等多种虫媒病毒^[4-6]。本研究于2011年在当地继续开展虫媒病毒研究,为虫媒病毒病的预防控制提供依据。

1 材料与方法

1.1 标本采集

1.1.1 蚊虫标本采集 2011年4月24—30日及8月4—7日,在西双版纳州的景洪市、勐腊及勐海县选择临近稻田或植被丰富的居民区为调查点,在人房和畜圈进行蚊虫采集。采集工具为紫外诱蚊灯(功夫小帅),于20:00至次日08:00在畜圈采集蚊虫标本,-20℃冰箱冷冻致死,在冰排上分类鉴定,根据蚊种及采集地不同,按照50~100只分装,液氮保存运输至实验室备检。

1.1.2 临床病例患者标本采集 2011年6—8月,在当地医疗机构采集不明原因发热及病毒性脑炎患者血清及脑脊液标本。

1.2 病毒检测及其分离

1.2.1 蚊虫标本的研磨 将蚊虫标本从液氮中取出,迅速放入冰盒。在生物安全柜内将蚊虫按对应管号倒入2 ml EP管。每管加研磨液(10%双抗的细胞培养

液)1.5 ml,用组织研磨机(Tissuelyser)处理,25次/s的速度振荡3 min。将研磨液转移到1.5 ml EP管(研磨珠留在原管中),采用Eppendorf公司5415 R型离心机离心,4℃,12 000 r/min离心30 min。吸取上清200 μl于另一套1.5 ml EP管用于细胞接种和空斑试验,原管用冷冻盒保存置-80℃冰箱备用;另取200 μl上清液混于事先加有800 μl Trizol的另一套1.5 ml EP管中,用于分子生物学鉴定。

1.2.2 细胞培养 BHK-21细胞(金黄地鼠肾细胞)株及C6/36细胞株为本实验室保存。事先准备足量单层BHK-21细胞生长至70%~80%时的细胞板(24孔板),弃去细胞培养液(要留取少量),每板孔加入100 μl分装的标本研磨液,置37℃、5%CO₂培养箱(C6/36细胞置28℃温箱),每隔15 min轻摇以促进病毒的吸附,1 h后取出,在生物安全柜内弃去液体,加入2 ml含1% FBS的细胞维持液,置37℃、5%CO₂培养箱中(C6/36细胞置28℃温箱)继续培养。每24 h观察1次,显微镜下观察约有75%细胞发生病变时收获,冻存于-20℃冰箱。如果未出现病变则继续观察,连续观察6~7 d后置-20℃冰箱。将冻存-20℃冰箱的细胞板拿出并迅速反复冻融3次,置相应编号的1.5 ml EP管中,离心后取上清按上述方法在细胞内连续传代3次后,保留有病变的管,无病变的则弃掉。

1.2.3 分子生物学鉴定 Trizol法提取核酸,用随机引物以及英国GE Healthcare公司的Ready-to-Go™ You-Prime First-Strand Beads制备cDNA文库。用乙脑病毒、版纳病毒、布尼亚病毒属、黄病毒属、甲病毒属、卡地皮诺病毒、辽宁病毒、环状病毒引物对蚊虫标本进行PCR扩增,经1%琼脂糖凝胶电泳显示PCR结果。引物均由生工生物工程(上海)有限公司合成(表1)。

表1 实验所用的引物序列

Table 1 Primers used in study

引物名称	引物扩增区段	引物序列	扩增片段(bp)	参考文献	
LNV12S2	第12片段	CAC TGG CTC CGG CTG TAG TAA CAG	435		
LNV12R2	第12片段	CTG TTC GGA TCA TCT GGA ATT TGA			
LNV10SF0R1	第10片段	ATG AGT AAC GTG ACA GAG ATT CGT GC	844		
LNV10SREV1	第10片段	GTT CCC GGA CTT TCA CAG CTA CTT TC			
KDV12S	第12片段	GAC GCT TTG AGA TTA TCT CGA C	354		
KDV12R	第12片段	GCT CAA TCG CAT TCT CAC C			
FU1		TAC CAC ATG ATG GGA AAG AGA GAG AA	310		[7-8]
eFD2		GTG TCC CAG CCG GCG GTG TCA TCA GC			
BUP	Bunyavirus	ATG ACT GAG TTG GAG TTT GAT GTC GC	250		[7-8]
BDW	Bunyavirus	TGT TCC TGT TGC CAG GAA AAT			
BAV-12-S	第12片段	CAC GAC GCT TTG AGA TTA TCT CG	850		
BAV-12-R	第12片段	GCC CAG TAC GAT TAT CAG TTA TC			
JE-251F	C/PrM	CgT TCT TCA AGT TTA CAg CAT TAg C	674		
JE-925R	C/PrM	CCY RTG TTY CTG CCA AGC ATC CAM CC			

1.3 血清及脑脊液标本检测 乙脑病毒 IgM 检测采用捕获法 ELISA (EEB-IgM Enzyme Immunoassay Test Kit, 上海贝西生物科技有限公司), 单纯疱疹病毒 IgM 检测用间接法 ELISA (HSV1/2 Virus IgM, Virion/Serion), 腮腺炎病毒 IgM 检测采用间接法 ELISA (Mumps virus IgM, Virion/Serion), 埃可病毒 IgM 检测采用间接法 ELISA (Echo virus IgM, Virion/Serion), 乙脑病毒 IgM 及登革热病毒 IgM 采用捕获法 ELISA (JE-DENGUE IgM COMBO ELISA, PANBIO)。

2 结果

2.1 蚊虫采集及地点分布 在西双版纳州景洪市、勐腊及勐海县的 7 个乡镇共采集到蚊虫 5 属 29 种 13 337 只, 其中三带喙库蚊 (*Culex tritaeniorhynchus*) 10 667 只, 中华按蚊 (*Anopheles sinensis*) 1060 只, 带足按蚊 (*An. peditaeniatus*) 984 只, 致倦库蚊 (*Cx. pipiens quinquefasciatus*) 186 只, 白斑阿蚊 (*Armigeres inchoatus*) 53 只, 须喙按蚊 (*An. barbirostris*) 54 只, 白纹伊蚊 (*Aedes albopictus*) 51 只, 微小按蚊 (*An. minimus*) 38 只, 刺扰伊蚊 (*Ae. vexans*) 35 只, 棕头库蚊 (*Cx. fuscocephata*) 33 只, 其它蚊种的蚊虫 (每种 < 30 只) 共 176 只。三带喙库蚊、中华按蚊及带足按蚊分别占蚊虫标本总数的 79.98%、7.95% 和 7.38% (表 2), 三带喙库蚊为优势蚊种。

表 2 2011 年云南省西双版纳州采集的主要蚊虫数量及地区分布
Table 2 Numbers and distributions of main mosquito samples collected in Xishuangbanna, Yunnan province in 2011

蚊种	勐腊县		勐海县		景洪市		合计	
	数量 (只)	构成比 (%)						
三带喙库蚊	353	43.85	8 739	83.40	1575	76.72	10 667	79.98
中华按蚊	124	15.40	611	5.83	325	15.83	1 060	7.95
带足按蚊	4	0.50	952	9.09	28	1.36	984	7.38
致倦库蚊	131	16.27	55	0.52	0	0.00	186	1.39
其它蚊种	193	23.98	122	1.16	125	6.09	440	3.30
合计	805	100.00	10 479	100.00	2053	100.00	13 337	100.00

2.2 病毒分离 用 BHK-21 及 C6/36 细胞对采集到的 214 批共计 13 337 只蚊虫进行病毒分离, 盲传 3 代后, 显示均为阴性。

2.3 PCR 扩增检测 使用乙脑病毒、版纳病毒、布尼亚病毒属、黄病毒属、甲病毒属、Kadipiro 病毒、辽宁病毒、环状病毒等多种虫媒病毒引物对蚊虫标本进行 PCR 检测, 结果均为阴性。

2.4 血清及脑脊液标本检测 共采集到 70 例患者的 52 份血清及 54 份脑脊液。使用 ELISA 方法对所采集到的全部血清和脑脊液标本进行病毒 IgM 抗体检测, 结果显示 16 例为乙脑病毒 IgM 抗体阳性, 4 例为单纯

疱疹病毒 IgM 抗体阳性, 13 例腮腺炎病毒 IgM 抗体阳性, 3 例埃可病毒 IgM 抗体阳性, 1 例登革热病毒 IgM 抗体阳性。这几种病毒抗体检测的总阳性率为 52.9% (37/70), 其中乙脑阳性率为 22.9% (16/70), 腮腺炎病毒阳性率为 18.6% (13/70), 单纯疱疹病毒阳性率为 5.7% (4/70), 埃可病毒阳性率为 4.3% (3/70), 登革热病毒阳性率为 1.4% (1/70)。

3 讨论

云南省是虫媒病毒高发省, 西双版纳州地处我国西南边陲, 与缅甸和老挝接壤, 泰国及越南为近邻, 国境线长达 966 km。该州辖景洪市、勐海和勐腊县, 面积为 19 582.45 km², 人口 100 多万^[3]。当地曾有基孔肯雅、乙脑、辛德毕斯、版纳和环状病毒等报道^[6,9-10]。本研究所选西双版纳地区以往曾有乙脑病毒流行的报道, 也曾在患者脑脊液及蚊虫中分离到版纳病毒^[11-19], 提示当地存在多种虫媒病毒。

2011 年 4、8 月我们在西双版纳地区的景洪市、勐腊及勐海县共采集到蚊虫 5 属 29 种 13 337 只。蚊虫标本研磨后经过细胞培养病毒分离, 并对常见虫媒病毒核酸进行检测均未获得阳性结果, 此与细胞培养病毒分离结果一致。虫媒病毒作为媒介传播疾病, 受气候、地理、环境改变而明显改变。此外, 不同时间采集的蚊虫体内病毒含量有明显差异。本研究阴性结果提示, 由于蚊虫的生活周期及活动范围等影响, 所检测病毒在此次蚊虫标本采集地区局部及时间段内并不活跃, 即在采集活动发生时点相应媒介蚊种带病毒率不高; 另外, 本研究检测所用引物均为当地及附近地区较为流行的虫媒病毒, 并未涉及其他已知或未知虫媒病毒的检测, 更系统的研究也许有助于其他虫媒病毒的发现。

对西双版纳州 70 例不明原因发热患者 52 份血清及 54 份脑脊液进行多种病毒性脑炎的 ELISA 检测, 显示当地夏季病毒性脑炎病例中具有多病原感染特性, 乙脑、单纯疱疹及腮腺炎等病毒是主要病原体。该结果说明当地人群中存在以上病毒感染, 此发现为当地夏季临床不明原因发热及脑炎等疾病的诊断提供了线索。基于此发现, 建议下一步应当加大对患者标本血清学方面的研究, 为当地不明原因发热患者的病因诊断提供科学依据。

参考文献

- [1] 梁国栋. 虫媒病毒是我国亟待加强的研究领域[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2005, 19(4): 305-306.
- [2] 梁国栋. 我国虫媒病毒的研究现状[J]. 中国人畜共患病杂志, 1997, 13(4): 61-65.

(下转第 416 页)

SCID-LO2 小鼠,感染后 SCID-LO2 小鼠发病时间较集中,出现病毒血症和器官损伤,感染后第 7 天血清 DENV2 和 DENV4 检出率分别为 75% 和 80%。组织病理学检测发现,SCID-LO2 小鼠在 DENV2 感染后第 7 天肝脏表现为严重的出血、淤血、水肿和炎症细胞的浸润;脑也有出血表现;同时小肠肠腔内有较多分泌物,肠绒毛排列不规则,有出血。SCID-LO2 小鼠感染 DENV4 后具有相似的表现,说明本研究构建的小鼠模型对不同的病毒株具有良好的适应性和稳定性。进一步实验中,将继续探讨 DENV1 和 DENV3 对 LO2-SCID 的感染情况。

本研究构建的 SCID-LO2 小鼠模型与既往研究相比,其优点:① SCID-LO2 小鼠感染病毒后未出现神经系统麻痹等无关症状。② LO2 是正常细胞,对机体的损害远小于 HepG2 细胞,小鼠的生存期延长,能够用于观察时间相对长的实验;并且腹腔注射的移植方法,相比之前的脾脏移植,更加简单易行。

综上所述,腹腔移植的 LO2 细胞能够支持 DENV 在体内复制,并部分复制了人类 DENV 感染的症状,进一步说明 SCID 小鼠腹腔移植 LO2 细胞是一种简便有效的构建 DENV 感染动物模型的方法。

参考文献

[1] Casseti MC, Durbin A, Harris E, et al. Report of an NIAID workshop on dengue animal models [J]. *Vaccine*, 2010, 28 (26) : 4229-4234.

[2] An J, Kimura-Kuroda J, Hirabayashi Y, et al. Development of a novel mouse model for Dengue virus infection [J]. *Virology*, 1999, 263(1):70-77.

[3] 盛子洋,王娟,吴江漫,等.利用甲基纤维素改良的病毒噬斑技术[J].*免疫学杂志*,2012,28(4):280-283.

[4] Blaney JE Jr, Johnson DH, Manion GG, et al. Genetic basis of attenuation of Dengue virus type 4 small plaque mutants with restricted replication in suckling mice and in SCID mice transplanted with human liver cells [J]. *Virology*, 2002, 300 (1) : 125-139.

[5] Johnson AJ, Roehrig JT. New mouse model for Dengue virus vaccine testing [J]. *J Virol*, 1999, 73(1) : 783-786.

[6] Shresta S, Sharar KL, Prigozhin DM, et al. Murine model for dengue virus - induced lethal disease with increased vascular permeability [J]. *J Virol*, 2006, 80(20) : 10208-10217.

[7] Huang KJ, Li SY, Chen SC, et al. Manifestation of thrombocytopenia in dengue-2-virus-infected mice [J]. *J Gen Virol*, 2000, 81 (Pt 9) : 2177-2182.

[8] Chen L, Ewing D, Subramanian H, et al. A heterologous DNA prime-Venezuelan equine encephalitis virus replicon particle boost dengue vaccine regimen affords complete protection from virus challenge in cynomolgus macaques [J]. *J Virol*, 2007, 81 (21) : 11634-11639.

[9] Paes MV, Pinhao AT, Barreto DF, et al. Liver injury and viremia in mice infected with dengue-2 virus [J]. *Virology*, 2005, 338 (2) : 236-246.

[10] 张复春,杨智聪.登革热[M].北京:科学出版社,2008:202.

收稿日期:2012-07-05

(上接第 412 页)

[3] 张海林.云南省虫媒病毒研究进展[J].*中国媒介生物学及控制杂志*,2004,15(5):410-414.

[4] 孙肖红,付士红,张海林,等.云南省虫媒病毒的分离鉴定[J].*中华实验和临床病毒学杂志*,2005,19(4):319-324.

[5] 梁国栋.我国新分离虫媒病毒及其传播媒介[J].*中国媒介生物学及控制杂志*,2010,21(3):181-183.

[6] Wang JL, Zhang HL, Sun XH, et al. Distribution of mosquitoes and mosquito-borne arboviruses in Yunnan province near the China-Myanmar-Laos border [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2011, 84 (5) : 738-746.

[7] Kuno G. Universal diagnostic RT-PCR protocol for arboviruses [J]. *J Virol Methods*, 1998, 72(1) : 27-41.

[8] Pfeffer M, Proebster B, Kinney RM, et al. Genus-specific detection of alphaviruses by a semi-nested reverse transcription-polymerase chain reaction [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 1997, 57(6) : 709-718.

[9] 黄文丽,张海林,侯宗柳,等.云南西双版纳发热病人血清虫媒病毒抗体调查[J].*地方病通报*,2001,16(2):29-30.

[10] 张海林,自登云,施华芳,等.云南省自然蚊体乙型脑炎病毒带病毒率研究[J].*中华预防医学杂志*,1990,24(5):265-267.

[11] 张海林,自登云,俞永新,等.从云南省蝙蝠中分离基孔肯雅病毒及血清抗体调查[J].*病毒学报*,1989,5(1):31-35.

[12] 孙肖红,张晓龙,刘宇夫,等.云南省一株版纳病毒的分离和鉴定[J].*中华流行病学杂志*,2010,31(6):685-687.

[13] 张海林,自登云,龚正达.云南省乙型脑炎病毒宿主和媒介研究[J].*中国预防兽医学报*,2000,22(2):81-83.

[14] 张海林,自登云,施华芳,等.从云南白纹伊蚊分离到登革热 4 型病毒[J].*中华流行病学杂志*,1984,5(4):251.

[15] 周国林,梁国栋,李蕾,等.我国分离的甲病毒 YN87448 株基因组序列的初步分析[J].*中华实验和临床病毒学杂志*,1998,12(1):81.

[16] 徐普庭,王逸民,左建民,等.从云南无明热病人和脑炎病人分离到新环状病毒[J].*病毒学报*,1990,6(1):27-33.

[17] 张海林,陶三菊,张云智.云南省澜沧江下游地区虫媒病毒研究状况[J].*中华实验和临床病毒学杂志*,2006,20(1):95-98.

[18] 何继波,李琼芬,黄玉芬,等.云南省西双版纳州 2008—2009 年病毒性脑炎监测[J].*中华流行病学杂志*,2011,32(3):324.

[19] Liu H, Li MH, Zhai YG, et al. Banna virus, China, 1987-2007 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2010, 16(3) : 514-517.

收稿日期:2012-07-19