

山西省临猗县2009年流行性乙型脑炎 媒介调查

代培芳¹, 赵俊英¹, 孔祥盛¹, 刘美德², 张久松², 刘竹萍³, 郝晓峰⁴, 张红子⁴, 程璟侠¹

1 山西省疾病预防控制中心病媒生物防控科, 山西太原 030012; 2 军事医学科学院微生物流行病研究所;

3 太原市疾病预防控制中心; 4 临猗县疾病预防控制中心

摘要: **目的** 了解临猗县4个乡镇蚊虫种类、密度及其自然感染流行性乙型脑炎(乙脑)病毒状况。**方法** 采用诱蚊灯捕蚊, 提取蚊虫核酸进行RT-PCR, 扩增乙脑病毒NS1区核酸片段, 对核酸阳性样本进行序列测定。**结果** 捕获蚊虫4属6种4424只, 三带喙库蚊构成比为52.0%, 淡色库蚊为41.2%, 中华按蚊及其他蚊种数量较少。6—8月蚊虫密度逐月增加, 三带喙库蚊构成比逐月增高。对2109只三带喙库蚊分77批进行乙脑病毒核酸检测, 阳性10批。对5个阳性标本进行测序, 经与GenBank中序列比对和分析, 均为基因I型乙脑病毒。**结论** 临猗县7、8月蚊虫密度高, 三带喙库蚊构成比及其乙脑病毒携带率均较高。三带喙库蚊密度及乙脑病毒携带率可作为乙脑防控的重要预警指标。

关键词: 流行性乙型脑炎媒介; 蚊虫密度; 带病毒率; 核酸检测

中图分类号: R373.3; R384.1 文献标志码: A 文章编号: 1003-4692(2014)05-0424-04

DOI: 10.11853/j.issn.1003.4692.2014.05.010

Investigation of Japanese encephalitis vectors in 2009 in Linyi county of Shanxi province, China

DAI Pei-fang¹, ZHAO Jun-ying¹, KONG Xiang-sheng¹, LIU Mei-de², ZHANG Jiu-song², LIU Zhu-ping³,

HAO Xiao-feng⁴, ZHANG Hong-zi⁴, CHENG Jing-xia¹

1 Shanxi Center for Disease Control and Prevention, Taiyuan 030012, Shanxi Province, China; 2 Institute of Microbiology and Epidemiology, Chinese Academy of Military Medical Sciences; 3 Taiyuan Center for Disease Control

and Prevention; 4 Linyi Center for Disease Control and Prevention

Corresponding author: CHENG Jing-xia, Email: chengjingxia007@163.com

Supported by the Natural Science Foundation of Shanxi Province (No. 2008011070), Scientific and Technological Research Project of Department of Health of Shanxi Province (No. 200759, 20100140) and "863" Program (No. 2007AA02Z481)

Abstract: Objective To investigate the species composition and population density of mosquitoes and the prevalence of Japanese encephalitis virus (JEV) infection in Linyi county of Shanxi province, China. **Methods** Mosquitoes were collected by light traps and used for identification of JEV. NS1 sequences of JEV were amplified using RT-PCR from mosquito nucleic acid. Samples with positive amplification of NS1 were further sequenced. **Results** A total of 4424 mosquitoes (6 species, 4 genera) were collected, of which 52.0% were *Culex tritaeniorhynchus*, 41.2% were *Cx. pipiens pallens*, and few were *Anopheles sinensis* and other species. Mosquito density gradually increased from June to August. The constituent ratio of *Cx. tritaeniorhynchus* among all mosquitoes increased month by month. A total of 2109 individuals of *Cx. tritaeniorhynchus* were pooled into 77 batches before nucleic acid detection of JEV, of which 10 batches were positive. Five of the positive samples were sequenced, and alignment with GenBank sequences indicated the presence of genotype I JEV. **Conclusion** The mosquito density is high in July and August in Linyi county, and the constituent ratio of *Cx. tritaeniorhynchus* and JEV positive rate are relatively high. The two indices could be used as important early warning indicators for prevention of Japanese encephalitis.

Key words: Japanese encephalitis vector; Mosquito density; Virus carrying rate; Nucleic acid detection

运城市是山西省流行性乙型脑炎(乙脑)高发区, 最近十多年尤以临猗县的发病率居高。临猗县东南与

运城市接壤, 西南与永济市毗邻, 西濒黄河与陕西省相望, 北面峨眉峰与万荣县相连。为了解临猗县乙脑病例高发乡镇蚊虫种类与密度、蚊虫乙脑病毒(Japanese encephalitis virus, JEV)自然携带状况、JEV基因分型状况, 探索乙脑预警指标, 我们于2009年6—8月对临猗县蚊虫进行了相关调查, 研究结果对深入探讨临猗县乃至运城市乙脑发病原因、了解山西省JEV的基因分

基金项目: 山西省自然科学基金(2008011070); 山西省卫生厅科技攻关计划项目(200759, 20100140); "863"计划(2007AA02Z481)

作者简介: 代培芳, 女, 硕士, 主管技师, 从事病媒生物学及防控研究, Email: sxydpf@sohu.com

通讯作者: 程璟侠, Email: chengjingxia007@163.com

型及我国 JEV 基因型的时空变迁有重要意义,将为该地区防控乙脑采取有效措施提供重要依据。

1 材料与方 法

1.1 调查概况 2009 年 6—8 月,选取临猗县乙脑发病较多的 4 个乡镇进行蚊虫种类及密度调查。孙吉镇、东张镇西邻黄河,两镇分别与东部耽子乡、临晋镇接壤。将 4 个乡镇按行政区划均匀分区后,随机抽取 24 个村,其中孙吉镇 7 个村,耽子乡 5 个村,临晋镇 6 个村,东张镇 6 个村,每村抽取 4 个方位各 1 户农户进行调查。4 个乡镇所有样点村地处 110°21' 660" ~ 110°36' 814" N, 35°01' 924" ~ 35°15' 924" E。

1.2 调查方法 灯诱法捕蚊,诱蚊灯为功夫小帅光催化灭蚊器(武汉吉星环保科技有限公司生产)。采集时间为当晚日落至次日日出约 10 h,数量为 1 盏/户。捕获蚊虫经筛检,剔除雄蚊,分出种属后装入冻存管,液氮保存。

1.3 JEV 核酸检测及序列比对 对 7、8 月采集的三带喙库蚊(*Culex tritaeniorhynchus*)进行 JEV 核酸检测及核酸片段测序。使用 TRIZOL 法提取 RNA,采用大连宝生物工程有限公司 TaKaRa primeScript™ RT-PCR Kit 专用试剂盒进行 RT-PCR,引物根据 JEV NS1 区设计,2 条引物的位置及序列分别为 J1(2487-2506): GTG CCA TTG ACA TCA CAA G, J3(2877-2896): TGT CTC AGG TCC ATC TAC G,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定。电泳阳性样本进行核酸测序,用 Bioedit 进行核苷酸序列比对,用 Mega 5.0 软件中的 Neighbor-Joining 法(Bootstrap 值设定为 1000)进行系统进化分析。

2 结 果

2.1 蚊虫标本采集 共捕获蚊虫 4 属 6 种 4424 只,三带喙库蚊占捕获总数的 52.0%,为优势蚊种;其次为淡色库蚊(*Cx. pipiens pallens*, 41.2%);中华按蚊(*Anopheles sinensis*)、背点伊蚊(*Aedes dorsalis*)、白纹伊蚊(*Ae. albopictus*)及骚扰阿蚊(*Armigeres subalbatus*)较少。捕获蚊虫最多的是孙吉镇,其次为临晋镇,耽子乡及东张镇较少;乙脑主要媒介三带喙库蚊构成比耽子乡最高(表 1)。

2.2 蚊虫种类及月度变化 由图 1 可见,6 月蚊虫种类最丰富的是孙吉镇、东张镇,孙吉镇、临晋镇、东张镇蚊虫数量均在 250 只左右,耽子乡最少, < 40 只;7 月蚊虫种类最丰富的是孙吉镇、临晋镇,各乡镇(除东张镇外)蚊虫数量较 6 月显著增加;8 月蚊虫种类最丰富且数量最多的是孙吉镇,耽子乡及临晋镇蚊虫数量较 7 月显著增多,东张镇蚊虫数量无显著变化。除东张镇

外,其他 3 个乡镇 6—8 月蚊虫数量逐渐增多;蚊虫种类耽子乡最少,捕获 3 属 4 种,临晋镇、东张镇捕获蚊虫 4 属 5 种,孙吉镇蚊虫种类最多为 4 属 6 种。

表 1 山西省临猗县 4 个乡镇蚊虫种类及构成比
Table 1 The species and constituent ratios of mosquitoes in four villages or towns in Linyi county of Shanxi province

| 调查乡镇 | 三带喙库蚊 | 淡色库蚊 | 中华按蚊 | 骚扰阿蚊 | 白纹伊蚊 | 背点伊蚊 | 总计 |
|---------|-------|------|------|------|------|------|-------|
| 孙吉镇 | 1026 | 460 | 149 | 57 | 3 | 40 | 1735 |
| 耽子乡 | 444 | 233 | 5 | 1 | 0 | 0 | 683 |
| 临晋镇 | 671 | 716 | 8 | 1 | 9 | 0 | 1405 |
| 东张镇 | 159 | 412 | 5 | 5 | 0 | 20 | 601 |
| 合计 | 2300 | 1821 | 167 | 64 | 12 | 60 | 4424 |
| 构成比 (%) | 52.0 | 41.2 | 3.8 | 1.4 | 0.2 | 1.4 | 100.0 |

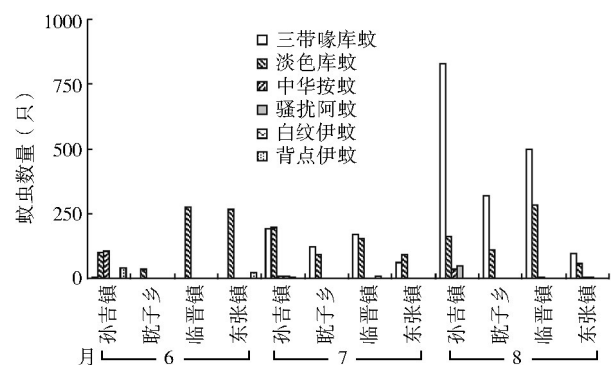


图 1 山西省临猗县 2009 年 6—8 月蚊虫种类及月度变化
Figure 1 Mosquito species and monthly variation in Linyi county of Shanxi province from June to August, 2009

2.3 养猪与蚊虫种类数量的关系 在受调查的 96 户农户中, 33 户养猪, 养殖规模不等, 多数散养 < 50 头, 3 户养猪数量 > 100 头。从捕获蚊虫与养猪的关系上看, 33 户养猪户捕获蚊虫 3470 只, 63 户非养猪户捕获 954 只; 养猪户三带喙库蚊构成比较高(60.4%), 非养猪户淡色库蚊构成比较高(69.8%), 其他蚊种在非养猪户构成比稍高(表 2)。

表 2 山西省临猗县养猪户和非养猪户捕获蚊虫种类及数量
Table 2 The comparison of mosquito species and number between pig-breeding and non-pig-breeding farmers

| 组别 | 调查户数 | 捕蚊数(只) | 三带喙库蚊 | | 淡色库蚊 | | 其他蚊虫 | |
|------|------|--------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|
| | | | 数量(只) | 构成比 (%) | 数量(只) | 构成比 (%) | 数量(只) | 构成比 (%) |
| 养猪户 | 33 | 3470 | 2096 | 60.4 | 1155 | 33.3 | 219 | 6.3 |
| 非养猪户 | 63 | 954 | 204 | 21.4 | 666 | 69.8 | 84 | 8.8 |
| 合计 | 96 | 4424 | 2300 | 52.0 | 1821 | 41.2 | 303 | 6.8 |

2.4 三带喙库蚊 JEV 核酸检测 对 7、8 月捕获的三带喙库蚊 2109 只分为 77 批进行 JEV 核酸检测, 结果阳性 10 批, 批总阳性率为 13.0%; 7、8 月批阳性率分别为 26.7% 和 9.7%。东张镇蚊虫均为阴性; 孙吉镇 7 月为阴性, 8 月批阳性率为 3.4%; 临晋镇 7、8 月批阳性率分

别为25.0%和20.0%;耽子乡批阳性率较高,7月甚至达到100%(表3)。

表3 山西省临猗县三带喙库蚊JEV核酸检测情况

Table 3 The detection of JEV sequences from nucleic acid of *Cx. tritaeniorhynchus* captured in Linyi county of Shanxi province

| 采集时间 | 采集地点 | 检测蚊虫数(只) | 电泳批次 | 阳性批次 | 阳性率(%) |
|---------|------|----------|------|------|--------|
| 2009-07 | 孙吉镇 | 121 | 5 | 0 | 0.0 |
| | 耽子乡 | 124 | 3 | 3 | 100.0 |
| | 临晋镇 | 134 | 4 | 1 | 25.0 |
| | 东张镇 | 51 | 3 | 0 | 0.0 |
| | 小计 | 430 | 15 | 4 | 26.7 |
| 2009-08 | 孙吉镇 | 814 | 29 | 1 | 3.4 |
| | 耽子乡 | 310 | 13 | 2 | 15.4 |
| | 临晋镇 | 440 | 15 | 3 | 20.0 |
| | 东张镇 | 115 | 5 | 0 | 0.0 |
| | 小计 | 1679 | 62 | 6 | 9.7 |
| 合计 | | 2109 | 77 | 10 | 13.0 |

2.5 JEV 核酸片段测序及序列比对 对三带喙库蚊 JEV 核酸阳性的 5 份样本(SXLY09-58、SXLY09-44、SXLY09-66、SXLY09-79、SXLY09-78;其中孙吉镇 1 份,耽子乡、临晋镇各 2 份)的扩增产物进行核酸测序,用获得的 JEV NS1 区部分基因序列与来自 GenBank 中的 12 株基因 I ~ V 型 JEV 相应序列进行系统进化分析,结果显示,这 5 株 JEV 均为基因 I 型(图 2)。

3 讨论

此次调查临猗县 4 个乡镇发现蚊虫 4 属 6 种,较以往蚊虫调查种类少^[1],这是由于此次调查仅以诱蚊灯捕获夜间活动为主的蚊虫所致。与 2006—2007 年调查相比^[2],此次诱蚊灯法捕获蚊虫种类中增加了白纹伊蚊。

此次调查蚊虫种类和数量的变化规律与以往调查

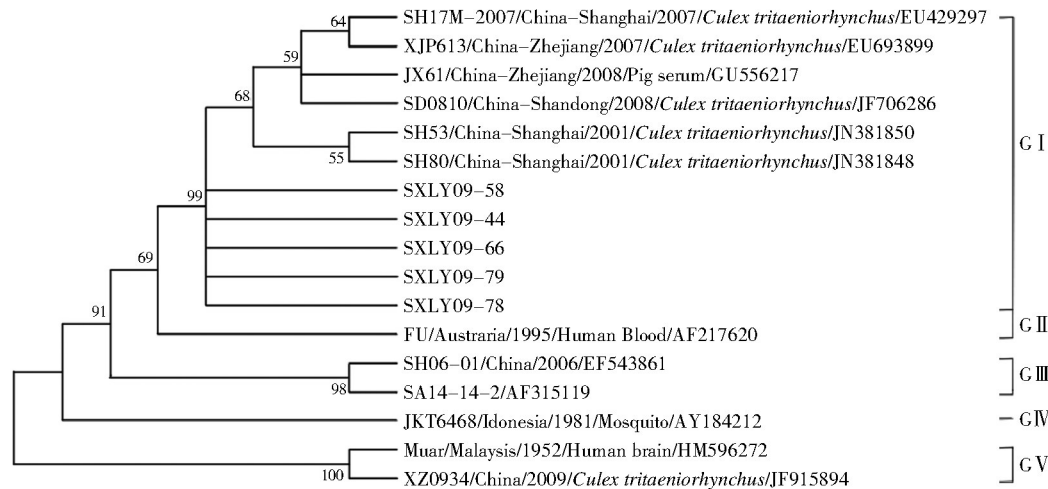


图2 山西省临猗县 5 株 JEV NS1 区部分核苷酸序列系统发生树

Figure 2 The phylogenetic tree based on the partial NS1 sequences of five JEV isolates detected in mosquitoes captured from Linyi county of Shanxi province

结果一致^[2-3],6月蚊虫数量较少,7月增多,8月达到最高;三带喙库蚊在6月偶然出现,7—8月构成比持续增高达到70%左右。在调查中还发现,东张镇6—8月蚊虫数量无增长甚至降低,可能因为调查时间和农户进行药物杀灭时间间隔较短所致。蚊虫密度与养猪规模呈正相关,随养猪数量的增加,蚊虫捕获数量亦增加。养猪户捕获蚊虫数量占蚊虫总数的近80%,三带喙库蚊绝大多数在养猪户中捕获,此与三带喙库蚊的生态习性相一致。

方美玉等^[4]指出在蚊虫标本中 JEV 的阳性率可达 10%~20%,笔者此次调查发现,经核酸检测的三带喙库蚊 JEV 批总阳性率为 13.0%,个别农户捕获的三带喙库蚊 JEV 批阳性率高达 100%。由于核酸检测与细胞培养在检测蚊虫样本 JEV 携带率上有所差异,加之核酸检测亦有批次检验与单只检验的差别,因此蚊虫

标本 JEV 携带率的高低仍然需要统一标准来衡量。

孙玉杰和张海林^[5]综述了我国不同地区、不同年代、不同来源的 293 株 JEV 的基因分型,2000 年之前,基因 III 型 JEV 为我国主要流行型,2001—2005 年为基因 I、III 型混合流行期,2005 年以后基因 I 型为主要流行型,在近 30 年中 JEV 发生了从基因 III 型向 I 型的演变。在上述的 293 株 JEV 中,来自山西省的 JEV 有 12 株,11 株^[6]分离自 2006 年山西省运城地区乙脑暴发时期,1 株^[7]分离自 2009 年临猗一名 82 岁女性患者。2006 年分离的 11 株 JEV 中,6 株来自患者,5 株来自蚊虫,基因 III 和 I 型 JEV 在患者及蚊虫中同时存在,2009 年分离的 1 株病毒为基因 I 型。笔者对 2009 年采自临猗县的三带喙库蚊进行 JEV 核酸片段检测,并对部分阳性样本进行测序,NS1 区的部分序列显示 5 个病毒

(下转第 431 页)

参考文献

- [1] 范滋德. 中国常见蝇类检索表[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1992:30-825.
- [2] 陆宝麟, 吴厚永. 中国重要医学昆虫分类与鉴别[M]. 2 版. 郑州: 河南科学技术出版社, 2003:375-442.
- [3] Frezal L, Leblois R. Four years of DNA barcoding: current advances and prospects [J]. *Infect Genet Evol*, 2008, 8 (5): 727-736.
- [4] Navajas M, Fournier D, Lagnel J, et al. Mitochondrial CO I sequences in mites: evidence for variations in base composition[J]. *Insect Mol Biol*, 1996, 5(4):281-285.
- [5] 肖金花, 肖辉, 黄大卫. 生物分类学的新动向: DNA 条形码[J]. *动物学报*, 2004, 50(5):852-855.
- [6] Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, et al. Biological identifications through DNA barcodes [J]. *Proc Biol Sci*, 2003, 270 (1512): 313-321.
- [7] Smith MA, Wood DM, Janzen DH, et al. DNA barcodes affirm that 16 species of apparently generalist tropical parasitoid flies (Diptera: Tachinidae) are not all generalists [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(12):4967-4972.
- [8] Ball SL, Hebert PDN. Biological identification of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes [J]. *J N Am Benthol Soc*, 2005, 24 (3):508-524.
- [9] Herbert PD, Ratnasingham S, de Warrd JR. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species[J]. *Proc Biol Sci*, 2003, 270 Suppl 1:S96-99.
- [10] Tautz D, Arctander P, Minelli A, et al. A plea for DNA taxonomy [J]. *Trends Ecol Evol*, 2003, 18(2):70-74.
- [11] Smith PJ, McVeagh SM, Steinke D. DNA barcoding for the identification of smoked fish products [J]. *J Fish Biol*, 2008, 72 (2):464-471.
- [12] Hebert PD, Stoeckle MY, Zemplak TS, et al. Identification of birds through DNA Barcodes[J]. *PLoS Biol*, 2004, 2(10):e312.
- [13] Lunt DH, Zhang DX, Szymura JM, et al. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies[J]. *Insect Mol Biol*, 1996, 5(3):153-165.
- [14] 师永霞, 相大鹏, 李祖海, 等. 广东国境口岸不同蚊种 CO I 序列分析和分子鉴定方法[J]. *中国国境卫生检疫杂志*, 2008, 31(2): 103-107.
- [15] 岳巧云, 邱德义, 黄艺文, 等. 应用 DNA 条形码技术鉴定未知双翅目蝇[J]. *中国国境卫生检疫杂志*, 2011, 34(5):343-347.
- [16] 莫帮辉, 屈莉, 韩松, 等. DNA 条形码识别 I. DNA 条形码研究进展及应用前景[J]. *四川动物*, 2008, 27(2):303-306.
- [17] Ivanova NV, Zemplak TS, Hanner RH, et al. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding[J]. *Mol Ecol Notes*, 2007, 7(4): 544-548.

收稿日期:2014-05-15

(上接第 426 页)

样本均为基因 I 型 JEV, 由于未进行病毒的细胞培养及 E 基因序列的测定, 进一步的实验对于揭示 2009 年山西省 JEV 基因分型非常必要。近几年来, 全国多省包括东北^[8]、华北^[9]、华东^[10-12]、华中^[13]、西南^[14]已在蚊虫中分离到基因 I 型 JEV, 山西省蚊虫中单独分离到基因 I 型 JEV 尚属首次, 仅限核酸水平检测, 能以细胞培养的方式分离到基因 I 型 JEV 是需要努力的方向。志谢 太原师范大学张猛和李敏老师在核酸序列比对中给予指导和帮助, 特此志谢

参考文献

- [1] 高国顺, 高生华, 赵俊英, 等. 爱国卫生运动在蚊虫综合治理中的作用[J]. *中国药物与临床*, 2011, 11(5):489-491.
- [2] 代培芳, 赵俊英, 刘美德, 等. 蚊虫密度的气象影响因素分析[J]. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2011, 22(6):547-549.
- [3] 代培芳, 赵俊英, 孔祥盛, 等. 山西省部分地区流行性乙型脑炎媒介蚊虫调查[J]. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2010, 21(1): 51-53.
- [4] 方美玉, 林立辉, 刘建伟. 虫媒传染病[M]. 北京: 军事医学科学院, 2005:127-146.
- [5] 孙玉杰, 张海林. 中国流行性乙型脑炎病毒基因型及分布[J]. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2012, 23(5):436-439.
- [6] Wang LH, Fu SH, Wang HY, et al. Japanese encephalitis outbreak, Yuncheng, China, 2006 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2007, 13 (7): 1123-1124.
- [7] 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:e16418.
- [8] 曹玉玺, 付士红, 张稷博, 等. 辽宁省部分地区 2008 年虫媒病毒分离鉴定[J]. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2012, 23(2):93-97.
- [9] 吴彤宇, 李力, 秦娜, 等. 天津市首次从淡色库蚊检测出基因 I 型流行性乙型脑炎病毒[J]. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2012, 23 (4):301-302, 323.
- [10] 贾慧丽, 李铭华, 付士红, 等. 2010 年安徽省蚊虫标本分离到基因 I 型流行性乙型脑炎病毒[J]. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2012, 23(5):395-397.
- [11] 王环宇, 付士红, 何英, 等. 两种基因型流行性乙型脑炎在上海市共同流行[J]. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2012, 23(5): 398-401.
- [12] 李铭华, 付士红, 姜红月, 等. 江西省流行性乙型脑炎病毒的分离与鉴定[J]. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2012, 23(5):388-390, 394.
- [13] 王环宇, 郝宗宇, 付士红, 等. 河南省唐河县分离到基因 I 型流行性乙型脑炎病毒[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2008, 22(2): 83-86.
- [14] 李铭华, 付士红, 冯云, 等. 贵州省不同地区 2008 年虫媒病毒调查[J]. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2012, 23(5):417-420.

收稿日期:2014-06-18