

## 第 21 章 日本脑炎和西尼罗河病毒

K.B.Platt 和 Han Soo Joo

日本脑炎病毒 (JEV) 和西尼罗河病毒 (WNV) 是动物和人共患的蚊媒病毒。JEV 是最重要的蚊媒病毒，引起人类的脑炎。人类感染 JEV 的显性感染与隐性感染的比例是 1: 200~300，其病死率超过 40% (Burke 和 Monath, 2001)。从经济意义上来说，JEV 引起猪的生殖障碍、马的脑炎和死亡。它广泛分布于亚洲，从东南俄罗斯贯穿日本、中国东部、东南亚到南部的北澳大利亚和西部的印度。

Fujita (1933) 和 Taniguchi 等 (1936) 最先描述了 JEV 在人类的分离与鉴定，Hosoya 等 (1950) 逐渐认识到人类“夏季脑炎”和马的脑炎以及猪的流产和死胎之间的关系，Shimizu 等 (1954) 证明了 JEV 与猪的生殖障碍有关。

Murgue (2002) 描述，1937 年首次从 Uganda 的一个发烧的妇女身上分离到 WNV，1999 年以前该病毒分布在整个非洲、中东以及欧洲和亚洲的部分地区。1999 年 WNV 爆发于美国纽约，该病毒的作用机制没有查明，迅速扩散到整个北美和南部、墨西哥、中美、加勒比海地区 (Gould 和 Fikrig, 2004; Roehrig 等, 2002)。人类 WNV 的病死率随着年龄的增加而增加，变动在 2%~15% 之间 (O'Leary 等, 2004; Tsai 等, 1998)。WNV 与 JEV 一样引起马的死亡，与 JEV 不同的是，作为猪的一种病原还未得到完全的研究，至今未见猪的死亡和生殖障碍报道。

### 病因学

JEV 和 WNV 属于黄病毒科黄病毒属，这个科另外还包括两个属：瘟病毒属和丙型肝炎病毒属，其中瘟病毒属以猪瘟病毒、牛病毒性腹泻病毒、边缘病毒为代表；丙型肝炎病毒属以人类的 C 型肝炎为代表 (Lindenbach 和 Rice, 2001)。黄病毒属根据血清交叉中和试验分为 8 种分离的抗原复合物：日本脑炎、Ntaya、DEN、TBE、Uganda、Tyuleny、Rio Bravo 和 Modoc 血清复合物。

黄热病毒是黄病毒属的模型病毒，无任何特异的血清复合型 (Burke 和 Monath, 2001)。日本脑炎的血清复合型的主要成员包括：JEV、组型、圣·路易斯 (St.Louis) 脑炎病毒、墨雷山谷 (Murray Valley) 脑炎病毒，WNV 和 Kunjin 病毒，后者在澳大利亚发现，当前认为是 WNV 的一个亚型 (Lanciotti 等, 2002)。

JEV 分成 4 类，也可分成 5 类，不同的基因型基于编码衣壳、prM 和 E 蛋白的核苷酸序列。基因型 I 在整个亚洲分布最广，基因型 I 和 III 与最常见的流行病有关，基因型 II 和 IV 发生在东南亚，且与常见的地方性疾病有关（Solomon 等，2003）。目前 JEV 的两个主要的免疫型通过动力学中和试验、单克隆抗体反应和其他血清学方法而认识。这些免疫型以 Nakayama 株（1935 年从人脑中分离到）和 JaGAr 01 株（1959 年从蚊子中分离到）为代表，抗原和基因的差异存在于相同基因型的分离之中（Burke 和 Monath，2001），通过核苷酸分析来证明基因型与免疫型内毒株之间的差异（Holbrook 和 Barrett，2002）。

WNV 按基因差异分为 2 个遗传家系，家系 1 病毒进一步分为 3 个进化体：1a、1b、1c，分布在非洲、中东、亚洲、欧洲和北美。家系 2 病毒主要在非洲发现（Lanciott 等，2002）。一般来说，家系 1 病毒比家系 2 病毒更具有致病性，血清学和分子生物学技术能用来区别 WNV 株。

## 形态学

JEV 和 WNV 是单股、直径大约 50nm 的阳性囊状 RNA 病毒，它们的基因组大约长 11kb，围绕成一个多层的囊鞘状结构，组成 11kd 的单线蛋白（C），囊鞘有 E 和 M 两种蛋白质组成，分子量大约分别为 50 kDa 和 8kDa，E 和 M 蛋白一起在囊鞘的表面形成大约 6nm 的小螺旋。M 蛋白在从成熟病毒粒子的感染细胞释放之前以 prM 蛋白的形式存在。非结构蛋白包括 NS1、2A、2B、3、4A、4B 和 5。E 和 NS1 蛋白与诱导免疫有关（Kurane，2002）。有趣的是，人们已经注意到另一个黄病毒 Dengue 的 prM 蛋白，可以诱导免疫（Lindenbach 和 Rice，2001）。JEV 和 WNV 株的神经毒力与 E 蛋白上的普通决定簇有关（Ni 和 Barrett，1998；Lee 等，2004）。

黄病毒的结构蛋白在基因组的 5' 一末端编码，非结构蛋白在 3' 一末端编码，黄病毒基因组作为一个单个的多蛋白表达，在转录过程中和转录之后通过细胞和病毒编码蛋白酶而将结构蛋白和非结构蛋白分开。

## 理化特征

黄病毒在氯化铯中的密度为  $1.22 \sim 1.24 \text{g/cm}^3$ ，它们的沉淀速度为 140～200S<sub>20w</sub>。一般来说，黄病毒在低 pH、胆汁和蛋白水解酶的全血中，56℃放置 30min 便失活（Burke 和 Monath，2001）。Remington 等（2004）的研究表明：

WNV 在 5% 和 25% 的白蛋白溶液中 60℃ 放置 30min 感染性丧失 6 个数量级以上。Mayo 和 Beckwith (2002) 研究表明: WNV 保存在含 10% 胎牛血清的细胞培养基中, 在 28℃ 以每 24h 1 个数量级的速率丧失感染性, 相比之下, 当病毒保存在 4℃、4d 时, 没有丧失感染性, 这一点在临床上诊断时应当考虑, 有关 JEV 在干燥条件下的稳定性未见报道。然而 Johansen 等 (2002) 报道: 当死于感染 JEV 的蚊子在一定湿度、28~32℃ 条件下, 24h 之内丧失活性, 这表明 WNV 和 JEV 病毒在它们的活的宿主之外迅速丧失感染性。

## 流行病学

大多数家养和野生的禽类、哺乳动物 (包括人类、马、猪) 都易感染 WNV 和 JEV, 虽然这些病毒大多数都是通过感染蚊子的叮咬而传播的, 但是 WNV 也有通过螨传播的报道 (Lawrie 等, 2004), Rosen (1986) 印证了 2 个研究: 一个是 JEV 从以人类为生的蠓、蚋等小虫上分离到, 另一个是来自螨。没有病毒在猪之间接触传播的报道, 然而 WNV 在禽类之间的接触传播以及 WNV 来自喉咙和泄殖腔擦拭已有报道。在短吻鳄之间 WNV 的接触传播也有报道, 与猫的口服感染一样。

WNV 和 JEV 在自然情况下维持在蚊子——鸟——蚊子的循环中, JEV 在人群的流行发生于北方气候夏末秋初, 这发生于刚学飞的幼鸟和青年鸟筑巢期间增殖之后, 随后易感于猪和其他哺乳动物。在地方性热带地区, JEV 感染在蚊子季节开始之后立即在猪群发生, 猪作为 JEV 的自然增殖动物, 其条件性和嗜动物(血)的蚊类能传播给终末宿主人类。

在亚洲涉及 JEV 传播的主要蚊子种类是库蚊, 它的作用已有 Rosen(1986)、Endy 和 Nisalak(2002)在综述中做了很好的描述。库蚊是条件性的, 并且以禽类和哺乳动物为生。根据蚊子和病毒的毒株攻毒每毫升  $LD_{50}10^{2.9} \sim 10^{4.8}$ , 使血液中浓度达到 50%。病毒血症的含量超过了青年禽类 (Boyle 等, 1983; Buescher 等, 1959) 和青年猪, 有 Kodama 等 (1968) 报道的在 2 日龄猪攻毒  $10^1$  或  $10^2$  时, 最大血清浓度每毫升超过了  $10^{6.0}LD_{50}$ 。Gresser 等 (1958) 用一只 3 个月和一只 5 个月的猪攻毒  $10^{5.3}LD_{50}$ , 每毫升血清中最大病毒滴度分别为  $10^{4.7}$  和  $10^{3.9}LD_{50}$ , Konish 等 (1992) 报道攻毒 JEV $10^{5.2}$ PFU 的 10 只 25kg 猪中 6 只猪血清的病毒滴度每毫升超过  $10^3$ PFU, 另外 2 只猪血清的病毒滴度每毫升超过  $10^4$ PFU, 这些研

究中由三带喙库蚊将 JEV 传播给宿主，攻毒量在 JEV 的含量之内或接近其含量。

几种其他的蚊子是 JEV 的理想载体，包括致倦库蚊、白纹伊蚊和日本伊蚊。这些蚊子出现在西半球，因此如果 JEV 进入这个地区，它将最可能确定。

JEV 和 WNV 交互流行病学的生存机制还没有完全阐明。在亚洲的热带地区，JEV 的爆发是季节性的，并且在刚学飞的鸟群增殖之后的夏末（Buescher 和 Scherer, 1959），鹭科的苍鹭和白鹭，在 JEV 的流行病学中扮演一个重要的作用已经频繁的被引用，是否鹭科在 JEV 的流行病学中比其他禽类起一个更重要的作用还未确定，Rosen(1986)认为鹭科已经比其他禽类引起更多的注意，因为它们常在库蚊出现的地方有充足的血供给。由于感染的蚊子从更暖和的地区随风携带而来使病毒能重新进入同样的地区。然而，Takashima 等（1988）提出一个令人信服的论点来支持 JEV 呈地方性流行的争论。可能机制包括病毒在滞育的成年库蚊属的永久存在（Nasci 等，2001）以及在伊蚊中垂直传播（Rosen 等，1978；1989）、冬眠的蝙蝠和冷血动物持续不断的感染而造成的。

WNV 的流行病学与 JEV 的类似，在美国来自 11 个属中的 60 个种类的蚊子易感 WNV(CDC2005)，但是所有这些种类传播 WNV 的能力仍未确定。库蚊属主要以鸟类为食，如尖音库蚊和环跗库蚊，被认为是主要的 WNV 蚊子载体，几个其他的蚊子种类主要以哺乳动物为食，包括人类，能作为鸟和哺乳动物（如猪）之间的桥梁载体，这些种类包括热带家蚊、白纹伊蚊、刺扰伊蚊等其他种类。共同特征是 WNV 的主要贮存宿主是鸟类，特别是乌鸦、松鸭、家麻雀和鹌鹑，哺乳动物（包括猪）在 WNV 的流行病学中的作用还没有完全评价。

## 临床特征

**JEV 在母猪和小母猪感染的主要特征是：以流产和产死胎、木乃伊胎儿和带有脑积水和皮下水肿的虚弱初生儿等为特征的生殖障碍**（如图 21.1）。正常的小猪也出现在这些窝小猪中，性成熟的猪没有显示任何明显的临床症状，而是出现一时的厌食和温和的发热反应。生殖障碍在非免疫母猪配种的 60~70 天之前已经感染。在这个时间后感染对小猪没有明显影响（1974），由于 WNV 感染而引起母猪的生殖障碍尚未见报道。



图 21.1 自然感染 JEV 的木乃伊胎儿和死胎

JEV 也和公猪的不育有关。Hashimura 等（1976）从患睾丸炎公猪的睾丸中分离到 JEV，Ogasa 等（1977）表明易感公猪的感染导致睾丸的水肿、充血，睾丸产生的精液中含有大量不正常的游动精子，明显降低了有自动力的总精子数。病毒也能从精液中分泌出来，这些变化通常是暂时的，大多数公猪能完全恢复。

青年小猪自然感染 JEV 没有导致全部发生临床症状，可能是由于 JEV—特异性母源抗体在地方性地区的普遍性。然而 Yamada 等（2004）报道：在 4 只 40 日龄的猪中有 2 只从扁桃体中分离到 JEV，并出现衰竭症状，这些猪未见神经症状，但是组织学检查显示出非化脓性脑脊髓炎，这些调查者能够用分离到的病毒在 3 周龄小猪复制出非化脓性脑脊髓炎，这些感染猪也表现出不同程度的衰弱和后肢震颤，是否与衰竭症状存在关系还未确定，但是值得注意的是，JEV 感染人类能出现由于瘫痪而造成的肢体衰弱，Kodama 等（1968）也报道 2 日龄的小猪实验性感染引起震颤和后肢瘫痪。然而其他研究者用 JEV 感染 10 日龄到 2~3 月龄的猪没有出现任何明显的临床症状，这些差异认为是由于毒株、病毒剂量、遗传背景和小猪日龄的不同而造成的。

感染 WNV 的猪没有观察到临床症状，Ilkal 等报道 4 只猪注射了亚洲分离的 WNV，发展为病毒血症，持续 1~4 天达到每毫升  $10^{2.2}LD_{50}$  的最大滴度，没有提到对小猪有害的临床症状。Platt(2004)最近的研究描述：26 只刚断乳的小猪通过注射和蚊子叮咬纽约 1999WNV，出现病毒血症的平均持续期是 4.2 天，所有猪的平均日 WNV 滴度是每毫升  $10^{3.3} \pm 0.5TCID_{50}$ ，某单个的猪滴度为每毫升超过  $10^{5.0} TCID_{50}$ ，没有观察到明显的临床症状。Platt(2004)也报道，在一些猪观察到非化脓性脑炎和脊柱损伤，表明能出现诸如不协调性、震颤和瘫痪的临床症状。Bowen（2003）用 NY1999WNV 株报道了类似的研究，该研究感染 6 只刚断乳的猪，在平均病毒血症持续期为 2.5 天时，有 3 只发展为血清中最大 WNV 滴度，每毫升为  $10^{1.9} \sim 10^{3.1}PFU$ 。而感染 6 只成年猪，只有 1 只达到可检测的每毫升

$10^1$ PFU 的滴度。并且持续时间不到一天，没有猪形成感染的临床症状。

## 发病机理

关于猪黄病毒的发病机理还未完全研究清楚，然而，用鼠和幼仓鼠作为模型的几个研究已经报道（见 Burke 和 Monath, 2001），从这些研究中可推断出：通过蚊子叮咬的病毒注射后，病毒最初在皮肤和局部淋巴结处复制，最初的病毒血症随之发生，是包括连接组织、骨骼、心脏和平滑肌细胞、淋巴网状细胞以及内分泌和外分泌系统细胞的感染来源。来自这些组织的病毒构成第二次病毒血症，一般发生在感染后 1~2 天内，这个时期在怀孕的小母猪和母猪经胎盘感染，并且在感染后第 7 天病毒能到达胎儿，**感染造成产出的一窝小猪中有不同大小的正常小猪、虚弱的新生儿、死胎和木乃伊胎儿，表明在子宫内胎儿连续不断的发生感染。**这些试验表明：猪的日本脑炎的发病机理和猪细小病毒类似。

是否病毒血症的含量和经胎盘感染之间存在偶然的的关系还未确定。Shimizu 等（1954）研究，用 9 只母猪接种日本脑炎的 Fuji 株或 Kanagawa 株  $10^{6.0} \sim 10^{9.5}$ LD<sub>50</sub>，没有发现任何这样的联系，病毒血症持续 1~4 天，并且血清中单个母猪的最大滴度为每毫升  $10^{1.5} \sim 10^{5.7}$  LD<sub>50</sub>。9 只母猪中有 4 只在配种后 40~97 天（平均 62 天）感染，这时胎儿感染发生。这些母猪的血清中最大病毒滴度为每毫升  $10^{1.7} \sim 10^{5.7}$  LD<sub>50</sub>。胎儿没有感染的母猪在配种后 36~92 天（平均 85 天）接种病毒，最大病毒滴度为每毫升  $10^{2.1} \sim >10^{5.7}$  LD<sub>50</sub>。Fujisaki 等（1982）用老鼠模型的试验得出：经胎盘感染是依靠胎盘和胎儿组织之间发展的程度，而不是依靠病毒血症的含量，因为在老鼠由于 JEV 引起的经胎盘感染的最高发生率发生在配种后的 7~10 天。

**日本脑炎病毒在感染后 3 天能穿过血脑屏障到达中枢神经系统**（Yamada 等，2004），在新生儿和青年比老龄动物更常见，JEV 破坏血脑屏障的精确机制还未完全确立。Liou 和 Hsu(1998)通过电子显微镜表明：JEV 能穿过感染鼠内皮血管的内皮细胞，血脑屏障的渗透作用也通过日本脑炎诱导因子而得到提高。

## 损伤

在母猪由 JEV 引起的肉眼可见的或显微的损伤还未见报道，自然情况下感染公猪的睾丸在鞘膜处有大量的黏液，在附睾的边缘和鞘膜内脏层可看到纤维增厚。微观上可见在附睾、鞘膜和睾丸的间质组织有水肿和炎症变化，输送精子的

上皮常常可以看到变质性变化。

全部的损伤可能或可能不见于死胎和虚弱的新生儿，当出现损伤时，它们包括脑积水、皮下水肿、胸膜积水、腹水、浆膜有淤斑的出血，淋巴结充血、肝和脾的坏死灶和堵塞脑膜和脊髓、小脑发育不全和脊柱的低髓鞘形成也有描述。显微性损伤局限于脑和脊髓，可观察到分散性的非化脓性脑炎和脊椎炎。Yamada 等描述了试验感染 JEV 的 3 周龄猪出现的类似损伤，这些损伤分布到整个大脑、中脑、小脑，出现围管现象、神经坏疽、噬神经现象和神经胶质小结。在其他的器官系统没有明显的肉眼或显微损伤，试验用纽约株 WNV 感染刚断乳的猪，在中枢神经系统观察到类似的损伤（Platt, 2004）。

## 诊断

JEV 引起猪生殖病的确诊是基于胎儿、死胎、新生儿和青年猪病毒的分离与鉴定，鉴别诊断必须考虑猪细小病毒、猪繁殖与呼吸障碍病毒、伪狂犬病病毒、猪瘟病毒、细胞巨化病毒、肠道病毒、Getah 病毒（Shibata 等，1991）、弓形体病和细螺旋体病，在感染母猪和小猪的季节性发生和缺乏临床症状是排除许多疾病的有益标准。

**JEV 在胎儿和新生儿分离到的组织包括：脑、肝、脾、肺和胎盘。**但是从不正常的一窝猪中成功的分离到 JEV 是依靠猪在子宫内接触病毒的时间而定的。Shimizu 等（1954）从 3 窝试验感染母猪 Kanagawa 株 7~22 天后的胎儿中分离到 JEV，而在母猪感染 62~84 天的 2 窝猪中没有分离到。**病毒分离的易感细胞包括 Vero 细胞、婴儿仓鼠肾细胞、猪肾细胞和来自白纹伊蚊的 C6/36 细胞群**，病毒也能从感染组织（如脑和胎盘）通过吃奶幼鼠的脑内接种而分离到。通常在接种后的 4~14 天出现神经症状和死亡，分离病毒的鉴定应用黄病毒特异性单克隆抗体和（或）通过 RT-PCR 等血清学方法最后确定（Huang 等，2004）。

JEV 的感染也能通过免疫组织化学方法来检测胎儿组织和胎盘的病毒抗原而确定。在这些过程中，应用黄病毒特异性单克隆抗体提高了试验的特异性。**日本脑炎特异性抗体在流产胎儿、弱胎和仔猪的体液中通过血凝抑制、血清病毒中和试验和 ELISA 对诊断具有重要作用。**在青年猪，血清学结果的解释必须考虑疫苗史和母源抗体，某些猪的 JEV-特异性母源抗体到 8 个月还能检测到。配对血清的应用以及检测 JEV 反应性 IgM 的试验有利于血清学试验的解释。Burke

等的试验表明：JEV 的猪 IgM 抗体在感染后 2~3 天内能检测到，并且持续 2 周左右。血清学试验的解释必须考虑受感染的猪是否受其他黄病毒（如 WNV）的影响，因为日本脑炎血清复合物的成员间存在高度的血清学交叉反应（William 等，2001）。在临床标本中 RT-PCR 已经成为检测和鉴别 JEV 和 WNV 基因组的技术（Kleiboeker 等，2004；Shirato 等，2003；Yang 等，2004）。

## 预防

JEV 通过阻止猪接触感染 JEV 的蚊子而得到控制。然而，这种控制方法不符合实际，除非把猪保持在合适的封闭环境里。因此，疫苗成为首选的方法，Monath（2002）综述了 JE 疫苗的发展史。第一个有效的疫苗是福尔马林灭活感染 JEV 鼠脑疫苗，这些疫苗最初在 30 年代日本开发，高纯度的灭活鼠脑疫苗当前应用于全世界的人类。来源于感染细胞培养基的灭活疫苗处于不同的发展阶段，一个活的 JE 弱毒苗是基于 1988 年中华人民共和国认证的 SA-14-2 株在人类的应用。基于致弱的牛痘和金丝雀痘病毒的活载体疫苗包括 prM、E 和 NS<sub>1</sub> 的 JEV 基因，诱使中和抗体和细胞毒性 T 细胞。针对马的一个有效的 WNV 金丝雀重组疫苗在开发中，并将进入市场。一个嵌合的、包含 JEV 致弱 SA-14-2 株的 prM 和 E 基因的日本脑炎黄热病毒疫苗在猴子和鼠可以诱导保护性免疫（Lai 和 Monath，2003）。包含 JEV 和 WNV 的 prM 和 E 基因的试验性的 DNA 疫苗已经研制出来，并且能诱导猪 JEV（Konishi 等，2000）和马 WNV（Davis 等，2001）的保护性免疫，活的弱毒和灭活的 JEV 疫苗在亚洲市场上可以获得。猪细小病毒和 Getah 病毒的疫苗也可以获得。在蚊子季节到来之前的危险期，公猪、小母猪和母猪推荐接种 JEV。

（周海云 译 神翠翠 校）