

· 论 著 ·

贵阳市无偿献血人群新布尼亚病毒血清流行病学调查*

李琳^{1,2}, 张嘉², 钟江², 郑祥顺², 詹琳^{1,2△}

(1. 遵义医学院免疫教研室, 贵州遵义 563003; 2. 贵州省血液中心输血研究室, 贵阳 550002)

摘要:目的 分析新布尼亚病毒在贵阳无偿献血人群中的潜在感染或既往感染情况。方法 收集 2015—2016 年贵州省血液中心无偿献血人群血浆标本 1 187 份进行 ELISA 重复检测, 使用 Excel2007 软件对所有标本基本资料进行录入整理, 并采用 SPSS 19.0 软件对不同性别、年龄、职业、地区、采集时间及民族来源的标本进行统计学分析。结果 1 187 份标本中, 阳性标本共 63 份, 在贵阳市无偿献血人群中新布尼亚病毒血清总抗体阳性率为 5.31%, 63 份阳性标本总抗体效价为 1:2~1:64。新布尼亚病毒抗体阳性率在不同性别、年龄、职业、地区、民族之间比较, 差异均无统计学意义($P>0.05$), 而流行期与流行后期采集的标本阳性率比较, 差异有统计学意义($\chi^2=4.623, P=0.032$)。总抗体阳性标本进行核酸检测, 结果均为阴性。结论 贵阳市无偿献血人群中存在新布尼亚病毒总抗体阳性标本, 提示贵阳市无偿献血人群存在新布尼亚病毒感染的可能。

关键词:新布尼亚病毒; 抗凝血浆; 献血者; 流行病学

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.16.026

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)16-2246-03

An investigation on the serum epidemiology of the new-Bunyavirus among the blood-donors in Guiyang city*

LI Lin^{1,2}, ZHANG Jia², ZHONG Jiang², ZHENG Xiangshun², ZHAN Lin^{1,2△}

(1. Teaching-Research Office of Microbiology and Immunology, Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou 563003, China;

2. Transfusion Research Lab, Guizhou Blood Center, Guiyang, Guizhou 550002, China)

Abstract: Objective To investigate the potential infectious of the new-Bunyavirus among the blood-donors in Guiyang area. **Methods** A total of 1 187 blood samples and the basic data were collected from the blood center of Guizhou. The new-Bunyavirus total antibody in serum was tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The samples were tested repeatedly by ELISA, and general statistics description of the samples' data was did by Excel2007, and the age, gender, occupation and collecting time of the samples were analyzed by SPSS19.0. **Results** The positive rate of new-Bunyavirus total antibody among blood-donors in Guiyang was 5.31%, and the new-Bunyavirus total antibody titers was 1:20~1:64. The positive were tested by PCR for identifying, PCR results of all positive samples were negative. The positive rates between different genders, ages, occupations, and nationalities were not statistically significant ($P>0.05$), but the difference of positive rates between epidemic period and later stages of the epidemic was statistically significant ($\chi^2=4.623, P=0.032$). **Conclusion** There are new-Bunyavirus total antibody positive samples in blood-donors, noticing that there is a possibility of potential infection among Guiyang blood-donors and even healthy people.

Key words: new-Bunyavirus; anti-coagulated plasma; blood-donors; epidemiology

新布尼亚病毒是一种可引起患者发热, 白细胞、血小板减少的病原体, 又称发热伴血小板减少综合征病毒 (severe fever with thrombocytopenia syndrome virus, SFTSV)^[1]。2010 年对该病原体进行分离培养、电镜观察和测序分析, 确定其为布尼亚病毒科白蛉病毒属的新成员, 称为新布尼亚病毒。患者主要以发热、肌肉痛、关节痛、寒战、胃肠道症状、头晕、局部淋巴结肿大等非特异性症状为主, 实验室检查白细胞、血小板减少, 丙氨酸氨基转移酶、天冬氨酸脱氢酶及乳酸脱氢酶升高, 在临床诊疗过程中不易被发觉, 其病死率高达 12%~30%^[2], 严重威胁到公共卫生安全。SFTSV 的潜伏期最短为 3 d, 最长为 30 d^[3]。目前已知 SFTSV 传播方式主要为蜱虫叮咬^[4], 除蜱虫叮咬, 文献报道提示接触急性期患者体液或血液也是该病毒的重要传播途径^[5]。目前暂无 SFTSV 经输血传播的病例报道, 采供血机构并没有针对 SFTSV 的检测项目, 该病毒存在经输血传播的风险。全国已有多地进行健康人群或无偿献血人群 SFTSV 的血清学检测, SFTSV 抗体在不同地区健康人群血清中阳性率各不相同^[6], 为 0.94%~3.80%^[7-9]。目前鲜有对贵阳市无偿献血人群 SFTSV 进行血清流行病学调查的研究, 本研究以无偿献血人群为研究对象, 通过对该人群血清新布尼亚

病毒抗体的检测, 讨论该病毒在贵阳市无偿献血人群中的血清流行病学情况, 为采供血机构和临床输血感染、医院感染防控提供科学数据。

1 材料与方

1.1 仪器与试剂 SFTSV 总抗体 ELISA 试剂盒购自无锡鑫联鑫生物科技有限公司 (批号: 20160606, 20161201, 20161202, 20170101); 焦碳酸二乙酯 (DEPC)、DEPC 处理水 (1/1 000)、氯仿、异丙醇、无水乙醇; 反转录: PrimeScript™ RT gDNA Eraser (Perfect Real Time) 试剂盒购自宝生物公司; PCR 扩增: dNTP 混合液, Taq DNA 酶, 购自北京索莱宝试剂公司; 琼脂糖凝胶电泳: 琼脂糖、DL2000、6×Loading 缓冲液、EB 染色液、50×TAE、纯水。移液枪 (Eppendorf 公司), 洗板机 (Bio-Rad 公司, ImmunoWash 1575), 酶标仪 (Bio-Rad 公司, iMARK Microplate Reader), 智能水浴锅 (LAB-BIOGEN 公司, SWB24D 型), 生物安全柜 (ESCO, AC2-5S1 II), 紫外分光光度计 (上海嘉鹏科技, ZF 型), 普通 PCR (Applied Biosystems, 2720 Thermal Cycler 型), 低温离心机 (Biofuge Fresco, D-37520), 电泳仪 (Bio-Rad 公司, PowerPac Basic), 电泳槽 (Bio-Rad 公司, Sub-Cell GT), 紫外分析仪 (赛默飞, NANODROP ONE), -80 °C

* 基金项目: 贵州省优秀青年科技人才培养对象项目 [黔科合人字 (2013) 48 号]; 贵州省高层次人才科研特助经费项目 (TZJF-2011-23 号)。

作者简介: 李琳, 女, 在读硕士研究生, 主要从事分子流行病学研究。△ 通信作者, E-mail: zhanlin300@hotmail.com。

低温冰箱(中科美菱公司),加热器(Stuart SBH200D),电子天平(QUINITIXSOP 公司,2102-1CN),旋涡震荡仪(LAB-BIOGEN 公司,VTX-E 型),微型离心机(LAB-BIOGEN 公司,MINI-C 型)。

1.2 标本来源 收集 2015—2016 年贵州省血液中心检验科无偿献血者初筛合格血液标本,标本来源人群均通过献血前筛查确认适宜献血,包括健康史问卷调查,4 项传染病抗体胶体金法快速检测,按照《献血者健康检查标准》^[8] 进行体检,共收集到无菌采集乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝血浆 1 187 份,4 000 r/min 离心 4 min,保存于-80 ℃ 冰箱待测。人群基本信息经贵州省血液中心系统查询获得并统一录入。调查人员均经过统一培训合格;检测试剂有检测质控报告。经咨询省医学研究委员会,本课题研究结果不会对无偿献血者有任何伦理学影响。

1.3 检测方法

1.3.1 ELISA 检测无偿献血人群 SFTSV 总抗体 采用 ELISA 试剂盒(无锡鑫联鑫)检测新布尼亚病毒总抗体:将所有标本进行编号,严格按照试剂盒说明书进行操作。波长 450 nm(参考波长 630 nm)下,空白孔设置为零,测定各孔吸光值。试剂盒阳性对照吸光度 A 值大于 1.5,阴性对照吸光度 A 值小于 0.1,Cutoff 值=阴性对照的平均 A 值×2.1。阳性标本进行重复确认,并进行抗体效价检测。抗体效价检测方法:将稀释液加入血清中,将血清标本分别用稀释液以 1:2,1:4,1:8,1:16,1:32,1:64,1:128 倍比稀释,随后进行 ELISA 检测,以阴性对照平均 A 值×2.1 作为 Cutoff 值,大于 Cutoff 值的最大稀释度为抗体滴度。

1.3.2 阳性标本的核酸检测 参考文献报道选择 SFTSV RNA 的引物序列,SFTSVS 片段质粒由 SFTSV sSgp1 sSgp2 片段串联于亚克隆到 pET21a 中,酶切位点为 Nde I,Xho I。引物及质粒由上海生工科技合成,包括 SW-F1:AAG GAT TCC CTT GGC CTT CA;SW-R1:ATG TCA GAG TGG TCC AGG ATT。

采用 Trizol 法进行全血 RNA 提取,并采用宝生物公司的 PrimeScript™ RT gDNA Eraser 试剂盒进行反转录。根据文献进行 PCR 扩增^[9],扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,并用 EB 显色。体系:10×PCR 缓冲液 5 μL,模板 5 μL,上游引物 1 μL,下游引物(10 mol/μL)1 μL,dNTP 1 μL,Taq DNA Polymerase(5 U/μL)1 μL,DEPC-treated H2O 36 μL。步骤:95 ℃ 5 min 预变性;按照 94 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s 共 30 循环,72 ℃ 1 min 进行扩增;72 ℃ 10 min 进行延伸。

结果判定:在 PCR 扩增时加入 5 μL 质粒一同进行扩增,并在琼脂糖凝胶电泳时加入 10 μL 标记物,观察成像,判断有无扩增产物。

1.4 统计学处理 用 Excel 2007 软件录入所有检测资料,并进行一般描述统计;采用 SPSS19.0 软件进行独立标本 χ^2 检验统计学分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 调查人群的总体特征及新布尼亚病毒总抗体感染情况特征 本次调查共收集标本 1 187 份,将标本进行重复检测,表明共有新布尼亚病毒总抗体阳性标本 63 份,占总检测人群的 5.31%。将 63 份确认阳性标本进行抗体滴度确定分析,并以性别、年龄、地区、采血时间、民族进行分类统计及分析。对其中 60 份阳性标本的全血进行核酸检测(3 份未找到全血标本),结果均为阴性。

2.2 无偿献血人群阳性标本抗体效价 将阳性标本进行抗体滴度检测,所有标本抗体滴度在 1:2~1:64。

2.3 无偿献血人群中新布尼亚病毒总抗体阳性者的性别、年龄分布情况 本次调查无偿献血人群标本共 1 187 份,其中来自男性 385 份,来自女性 802 份,男女比例为 1.00:2.08。显示阳性的标本来自男性 21 份,女性 42 份,分别占各性别检测总份数的 5.45%和 5.23%。不同性别间的检出率比较,差异无统计学意义($\chi^2 = 0.0025, P > 0.05$)。献血法规定献血年龄为 18~55 岁,长期稳定适宜献血者献血年龄延长至 60 岁,平均年龄为 32.9 岁。本文按 6 岁 1 个组,最后 48~60 岁为 1 组,将所有研究对象共分为 6 组。无偿献血人群中新布尼亚病毒总抗体阳性人群年龄分布情况见图 1。

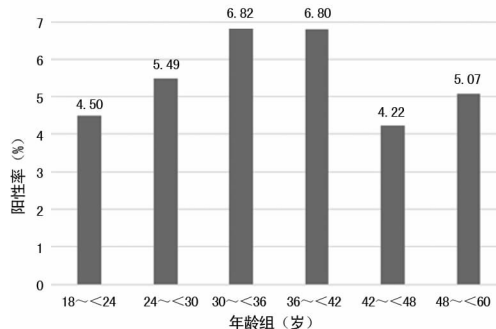


图 1 无偿献血人群中新布尼亚病毒总抗体阳性人群年龄分布情况

2.4 无偿献血人群中新布尼亚病毒抗体 IgG 阳性者的职业分布情况 按职业分类,将检测人群按填写资料经归纳后分为 4 类,即学生、农民、其他(包括填写“其他”,以及除学生和农民的其他行业)、无资料者(不参加统计)。农民阳性率最高为 7.54%。学生、农民、其他职业人群的阳性率比较,差异无统计学意义($\chi^2 = 3.423, P > 0.05$)。见表 1。

表 1 无偿献血人群中新布尼亚病毒总抗体检测人群职业分布

职业	检测人数(n)	阳性[n(%)]
学生	234	7(2.99)
农民	53	4(7.54)
其他	900	52(5.78)
总计	1 187	63(5.31)

2.5 无偿献血人群中新布尼亚病毒总抗体阳性者的民族分布情况 本文涉及的无偿献血人群中,无资料 2 例(不参加资料分析),共检测汉族 921 例,阳性率为 5.86%;少数民族 264 例阳性 21 例,阳性率为 7.89%。其中,苗族共检测 86 例,阳性 7 例,阳性率为 8.14%;布依族共检测 60 例,阳性 3 例,阳性率为 5.00%。其他民族 120 例,共 11 例为阳性,阳性率为 9.17%。汉族与少数民族人群间阳性率比较,差异无统计学意义($\chi^2 = 0.929, P > 0.05$)。

2.6 无偿献血人群中新布尼亚病毒总抗体阳性者采集时间分布情况 无偿献血人群血清标本于 2015—2016 年取样。将时间分为“流行期(5—10 月份)”和“流行后期(11 月至次年 4 月份)”,其中流行期共收集标本 903 份,阳性率为 6.20%,流行后期 284 份,阳性率为 2.47%。流行期与流行后期阳性率比较,差异有统计学意义($\chi^2 = 4.623, P = 0.032$)。

3 讨 论

在进行 SFTSV 抗体检测时,SFTSV 的 IgM 和 IgG 抗体滴度水平变化对 SFTSV 的诊断有着重要的意义。目前有研究表明,IgM 抗体在发病第 4 天至第 6 个月可以检测到,发病第 4 周达到峰值。目前有研究表明,在发病后第 3 周可以检测

到 IgG 抗体,第 6 个月达到峰值,IgG 抗体持续超过 3 年。本课题采用的双抗原夹心法,检测的 SFTSV 总抗体为 IgM 和 IgG 两种抗体。SFTSV 总抗体阳性的判定标准参考试剂盒检测标准,所有阳性标本均经过重复检测确认得到。检测结果显示 63 份为阳性,抗体滴度为 1:2~1:64,提示贵阳市无偿献血人群甚至健康人群中存在 SFTSV 隐性感染或既往感染,SFTSV 对输血安全仍存在着潜在威胁,需引起公共卫生、医疗及采供血机构的重视。SFTSV 核酸在发病第 3 天阳性检出率达到最高水平,第 6 天拷贝数达到峰值^[10],而此时并未出生临床症状,即隐性感染,因此可能存在输血传播的可能性。贵阳目前无 SFTSV 病例出现,其分布在性别、年龄、职业、民族、采集时间等方面差异均无统计学意义($P>0.05$)。采集时间差异有统计学意义($\chi^2=4.623, P=0.032$)。

本研究数据分析过程中发现献血者资料登记不全、数据的采集不够充分的现象。尤其是职业分析,登记除了“农民”、“学生”外,其他职业登记模糊,这不利于数据分析,也不利于疾病干预及卫生行政决策。因此建议采供血系统进一步完善献血者基础数据的采集工作。

由于市区人口流动性大,因此不排除从其他省市输入新布尼亚病毒的可能性。随着流动人口的增加,类似新布尼亚病毒的地区性疾病不再受地域限制,需要加强对输入性病例的预防。

贵阳市无偿献血人群存在 SFTSV 总抗体阳性情况。SFTSV 总抗体阳性率具体危险因素的分析需做进一步调查。

参考文献

- [1] Yu XJ, Liang MF. Severe fever with thrombocytopenia Associated with a novel Bunyavirus in China[J]. N Engl J Med, 2011, 364(16): 1523-1532.
- [2] Yu L, Zhang L, Sun L, et al. Critical epitope in the nucleocapsid protein of SFTS virus recognized by a panel of

SFTS patients derived human monoclonal antibodies[J]. PLoS One, 2012, 7(1): 1-10.

- [3] 魏艳艳,邹桂舟,叶珺,等. 新兴布尼亚病毒感染病原学检测与预后研究[J]. 中国医院感染学杂志, 2016, 26(23): 5339-5341.
- [4] Liu K, Zhou H, Sun RX, et al. Anational assessment of the epidemiology of Severe fever with thrombocytopenia syndrome, China[J]. Science Reports, 2016, 6(1): 1-8.
- [5] Chen H, Hu K, Zou J, et al. A Cluster of cases of human-to-human transmission caused by severe fever with thrombocytopenia syndrome bunyavirus[J]. Int J Infect Dis, 2013, 3(2): 206-208.
- [6] 占建波,霍细香,官旭华. 湖北省发热血小板减少综合征布尼亚病毒健康人群抗体水平分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(4): 992-993.
- [7] Cui F, Cao HX, Wang L, et al. Clinical and epidemiological study on severe fever with thrombocytopenia syndrome in Yiyuan County, Shandong Province, China [J]. Ame J Trop Med Hyg, 2013, 20(5): 510-512.
- [8] 中华人民共和国卫生部. GB18467-2011 献血者健康检查要求[S]. 北京: 中华人民共和国卫生部, 2012.
- [9] 迟媛媛,翟慎勇,温红玲. 发热伴血小板减少综合征患者血清中新型布尼亚病毒 RNA 的检测[J]. 山东大学学报, 2012, 50(1): 119-121.
- [10] Lu QB, Cui N, Hu JG, et al. Characterization of immunological responses in patients with severe fever with thrombocytopenia syndrome: a cohort study in China[J]. Vaccine, 2015, 33(10): 1250-1255.

(收稿日期:2017-02-17 修回日期:2017-04-17)

(上接第 2245 页)

- of operable non-small cell lung cancer and effects on disease prognosis [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(38): 3955-3960.
- [3] 张国庆,韩峰,房新志,等. CD4 IL-17 和 Foxp3 在非小细胞肺癌组织中的表达及意义[J]. 中华肿瘤杂志, 2012, 34(5): 596-599.
- [4] Wu S, Singh S, Varney ML, et al. Modulation of CXCL-8 expression in human melanoma cells regulates tumor growth, angiogenesis, invasion, and metastasis[J]. Cancer Med, 2012, 1(3): 306-317.
- [5] Carus A, Ladekarl M, Hager H, et al. Tumor-associated neutrophils and macrophages in non-small cell lung cancer: no immediate impact on patient outcome [J]. Lung Cancer, 2013, 81(1): 130-137.
- [6] 魏星,冀静,宁芬茹,等. Sox-2 及 Wnt 信号通路蛋白在宫颈鳞癌中的表达及相互作用[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2013, 34(6): 813-817.
- [7] Liu P, Cheng H, Santiago S, et al. Oncogenic PIK3CA-driven mammary tumors frequently recur via PI3K pathway-dependent and PI3K pathway-independent mechanisms[J]. Nat Med, 2011, 7(9): 1116-1120.

- [8] 贾慧民,房新志,张国庆,等. 白介素 17 与 Foxp3 在 III A 期肺鳞癌和腺癌中的表达及与预后的关系研究[J]. 中国全科医学, 2012, 15(12): 1345-1349.
- [9] Boyauh S, Drouet Y, Navarro C, et al. Mutational characterization of individual breast tumors: Tp53 and PI3K pathway genes are frequently and distinctively mutated in different subtypes[J]. Breast Cancer Res Treat, 2012, 132(1): 29-39.
- [10] Fang Y, Gao YA, Geng JS, et al. Elevated expression of SOX2 and FGFR1 in correlation with poor prognosis in patients with small cell lung cancer [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2013, 6(12): 2846-2854.
- [11] 韩峰,马晓梅,张国庆,等. 非小细胞肺癌组织中白细胞介素 17、基质金属蛋白酶 9 表达与 pTNM 分期的关系[J]. 肿瘤研究与临床, 2012, 24(5): 580-583.
- [12] Maucksch C, Jones KS, Connor B. Concise review: the involvement of SOX2 in direct reprogramming of induced neural stem/precursor cells[J]. Stem Cells Transl Med, 2013, 2(5): 579-583.

(收稿日期:2017-02-24 修回日期:2017-04-24)