

广州市 2009 年新出现登革 3 型病毒的分子流行病学分析

狄飏 白志军 王玉林 罗雷 陈妤 蒋力云 杨智聪 王鸣

【摘要】 目的 对广州市 2009 年新出现的 3 型登革病毒(DEN)株的 E 基因进行 RT-PCR 扩增和序列测定,探讨其来源及基因型。方法 收集广州市 2009 年登革热患者急性期血清,用 C6/36 细胞培养分离 DEN,RT-PCR 扩增病毒全长 E 基因,测序并绘制系统进化树,结合流行病学资料进行分子流行病学分析。结果 2009 年采集的 19 份患者血清标本中,分离到 7 株 3 型 DEN 株,RT-PCR 扩增后测序获得 E 基因序列,7 株 DEN3 病毒 E 基因均由 1479 个碱基组成,编码 493 个氨基酸,基因序列未见插入或缺失,分析发现 7 株病毒来自两个不同的亚型:09/GZ/1081、09/GZ/1483 和 09/GZ/10806 属于东南亚/南太平洋型,09/GZ/10616、09/GZ/11144、09/GZ/11194 和 09/GZ/13105 属于印度次大陆型,各亚型群内毒株序列同源性较高。结论 广州市 2009 年 DEN3 为输入性,分属两个基因型。

【关键词】 登革病毒; E 基因; 系统进化树

Molecular epidemiologic analysis on new emerged type 3 dengue virus in Guangzhou in 2009
DI Biao, BAI Zhi-jun, WANG Yu-lin, LUO Lei, CHEN Yu, JIANG Li-yun, YANG Zhi-cong, WANG Ming. Guangzhou Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 510080, China

Corresponding author: WANG Ming, Email: wangming@gzcdc.org.cn

This work was supported by grants from the Guangdong Science and Technology Department Program (No. 2007B031500011), Science and Technology Program of Guangzhou Health Department (No. 2009-YB-228) and Guangzhou Science and Technology Department Program (No. 2009J1-C161).

【Abstract】 Objective To analyze and trace the infection source the envelope(E) gene of the new emerged type 3 dengue virus in Guangzhou in 2009. Methods Sera were collected from patients infected with local dengue fever. Dengue virus was cultured and isolated by C6/36 cells. The whole length E gene was amplified from the positive specimen by RT-PCR, thereby sequenced and phylogenetic tree drawn by neighbor-joining method. Both data on epidemiologic and molecular studies were processed and analysed. Results 7 strains of type 3 dengue virus were isolated from samples of the 19 patients. E gene of these strains was amplified. The complete E genes of 7 strains belonged to 1479 nucleotides in length, encoding a polyprotein of 493 amino acids. Data from the phylogenetic analysis showed that 09/GZ/1081, 09/GZ/1483 and 09/GZ/10806 strains fell within the Southeast Asia/South Pacific group. 09/GZ/10616, 09/GZ/11144, 09/GZ/11194 while 09/GZ/13105 strains fell within the India group. Conclusion The type 3 dengue virus identified in Guangzhou area in 2009 was imported and could be divided into two genotypes.

【Key words】 Dengue virus; E gene; Phylogenetic tree

登革病毒(dengue virus, DEN)为单股正链 RNA 病毒, E 基因是病毒的主要包膜蛋白, E 蛋白在病毒与宿主细胞相互作用过程中发挥着重要的功能^[1-3]。DEN 分为 4 个血清型(DEN 1~4)。20 世纪 80 年代以来广州地区登革热流行一直以 DEN1 和

DEN2 型为主, 2009 年出现了多株 DEN3 型, 为了解其 E 基因序列特征和可能的传播来源, 本研究对 2009 年度广州市登革热流行期间分离到的 7 株 DEN3 毒株, 进行 E 基因的扩增和测序, 并进行初步的分子流行病学分析。

材料与方法

1. 试剂: QIAamp Viral RNA Mini Kit、QIAquick Gel Extraction Kit 均购自德国 Qiagen 公司、PrimeScript One-Step RT-PCR 试剂盒购自大连宝生

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2010.07.019

基金项目: 广东省科技厅项目(2007B031500011); 广州市医药卫生科技项目(2009-YB-228); 广州市科技局项目(2009J1-C161)

作者单位: 510080 广州市疾病预防控制中心

狄飏和白志军同为第一作者

通信作者: 王鸣, Email: wangming@gzcdc.org.cn

物科技有限公司。

2. 引物设计与合成: 参照方美玉等^[4]设计的序列合成 DEN3 型特异性引物; 参考 DEN3 (H87) 株基因组序列, 用 Premier Primer 5.0 软件分别设计合成 DEN3 的 E 基因引物 3 对 (表 1), 引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

表 1 DEN E 基因引物及扩增片段长度

引物	全基因位置	序列 (5' - 3')	扩增片段长度 (bp)
TF	2253 ~ 2272	GTGCTTACACAGCCCTATTT	320
TR	2553 ~ 2572	TCCATTCTCCCAAGGCGCCTG	
E1F	622 ~ 640	AGACATTGACTGGTGGTGC	733
E1R	1336 ~ 1355	TGATGACGGGTATTTGAGG	
E2F	1243 ~ 1260	CGGTTGTGGTTTGGTTGG	633
E2R	1855 ~ 1876	CTGCGTTTCTGAGACTTCTTTC	
E3F	1711 ~ 1728	TACCGCACTGACAGGAGC	973
E3R	2663 ~ 2684	CCACAACCTACCGTTAATTTGAT	

注: 引物命名中 T 字母为 DEN3 型特异引物, E 字母为 E 基因引物, F 字母表示为正向引物, R 字母为反向引物

3. 病毒培养及 RNA 提取: 收集 2009 年广州市 DEN 抗体监测为阳性的患者 (共 19 例) 急性期血清, 1:10 稀释后取 100 μ l 接种到单层 C6/36 白纹伊蚊传代细胞, 吸附 1 h 后弃去上清, 加入含 15% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基, 置 34 $^{\circ}$ C 孵箱中培养, 7 d 后传代, 出现细胞病变为阳性, 连续传代 3 次均无细胞病变则判断为阴性。在细胞病变达 75% 时取细胞培养液上清, -70 $^{\circ}$ C 冻存。取病变细胞上清 140 μ l, 用 QIAamp Viral RNA Mini Kit 提取病毒 RNA。

4. RT-PCR 扩增: 用 PrimeScript One-Step RT-PCR 试剂盒进行 RT-PCR 反应, 反应条件如下: 50 $^{\circ}$ C 30 min 反转录; 94 $^{\circ}$ C 2 min 变性, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。用 TBE 缓冲液配制含 0.5 μ g/ml 溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶, 取 5 μ l PCR 产物与 1 μ l 上样缓冲液混和, 在 TBE 缓冲液中以 80 V 恒压电泳 1 h, 在透射式紫外分析仪上观察, 以出现相应的特异性条带为阳性结果, 用 QIAquick Gel Extraction Kit 进行回收。

5. 序列测定和拼接: 经纯化后的 PCR 产物由上海英骏生物技术有限公司进行序列测定, 然后采用 DNASTAR 软件中的 Seqman 程序进行拼接并组装成完整的 E 基因序列, 经过校对校正后上传至 GenBank。

6. 基因序列的同源性和进化分析: 应用 DNASTAR 软件中的 MegAlign 程序将 2009 年广州市 DEN3 流行株与 GenBank 中选取来源于中国的 2 株

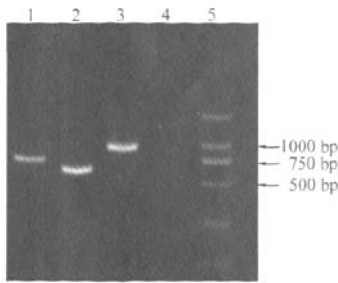
DEN3 流行株 (80-2, China, Guangxi, AF317645) 和 (98TW407, Taiwan, DQ675528) 的 E 基因序列, 进行核苷酸和氨基酸的同源性比对; 应用 DANMAN version 6 软件, 将 2009 年广州市 DEN3 流行株序列同其他 28 株 DEN3 参考株各亚型病毒 E 基因序列, 进行序列多重比对, 然后采用 Kimura 校正模型的邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建系统进化树 (phylogenetic tree)。28 株参考株按照名称、来源地和 GenBank 序列号排列: (80-2, China, Guangxi, AF317645)、(98TW407, Taiwan, DQ675528)、(ThD3-1687-98, Thailand, AY676348)、(GWL-25, India, AY770511)、(29472, Fiji, L11422)、(H-87, Philippines, L11423)、(1416, India, L11424)、(228761, Indonesia, L11425)、(1280, Indonesia, L11426)、(29586, Malaysia, L11427)、(85-159, Indonesia, L11428)、(1300, Malaysia, L11429)、(1559, Mozambique, L11430)、(1326, Sri Lanka, L11431)、(168.AP-2, Philippines, L11432)、(PR6, Puerto Rico, L11433)、(1340, Puerto Rico, L11434)、(1696, Samoa, L11435)、(1594, Sri Lanka, L11436)、(260698, Sri Lanka, L11437)、(2783, Sri Lanka, L11438)、(1327, Tahiti, L11439)、(5987, Thailand, L11440)、(D86-007, Thailand, L11441)、(MK-315, Thailand, L11442)、(2167, Tahiti, L11619)、(CH53489D73-1, Thailand, L11620)、(DEN1-16007, Thailand, AF180817)。

结 果

1. 病毒分离: 共收集 19 份血清标本, 用 C6/36 细胞进行分离培养, 其中 12 份标本出现细胞肿胀、融合、空泡结构等细胞病变现象。

2. DEN E 基因的扩增及序列测定: 细胞病变阳性的培养上清液, 提取病毒 RNA, 利用 DEN3 型特异性引物进行 RT-PCR, 电泳鉴定看到 7 份培养上清可扩增出约 320 bp 的产物。然后扩增 E 基因, 经电泳鉴定, 发现这 7 份培养上清可扩增出 733 bp、633 bp 和 973 bp 的产物, 各片段分子质量均与预期相符 (图 1), 对 E 基因 PCR 产物进行回收并进行双向测序。

3. 基因特征: 应用 Seqman 程序进行序列拼接并组装成完整的 E 基因。7 株 DEN3 病毒 E 基因均由 1479 个碱基组成, 编码 493 个氨基酸, 基因序列未见插入或缺失, 序列已上传至 GenBank, 7 株 DEN 流行病学资料表示如下: 毒株编号分别为 09/GZ/1081、09/GZ/1483、09/GZ/10806、09/GZ/10616、09/GZ/11144、09/GZ/11194、09/GZ/13105 (简称 1081、1483、



注：1：E1F-E1R；2：E2F-E2R；3：E3F-E3R；4：阴性对照；5：Marker DL2000

图 1 DEN3 E 基因引物 RT-PCR 电泳结果

10806、10616、11144、11194、13105), GenBank 号分别为：Hm466962、Hm466963、Hm466965、Hm466964、Hm466966、Hm466967、Hm466968, 对应的病例发病时间分别为 2009 年 2 月 28 日、3 月 18 日、7 月 22 日、7 月 25 日、8 月 6 日、8 月 6 日、9 月 8 日。除了 1483、11144、11194 发病前无境外史, 1081、10806、10616、13105 在发病前均有境外史, 他们分别来自越南、柬埔寨、泰国和国籍不明(10616)。

4. E 基因序列的同源性分析: 7 株 DEN3 病毒核苷酸序列同源性在 93.6% ~ 100% 之间, 推测的氨基酸序列同源性在 97.0% ~ 100% 之间; 1081、1483、10806 毒株核苷酸(氨基酸)同源性较高, 在 99.9% ~ 100%(99.8% ~ 100%) 之间, 而 10616、11144、11194、13105 毒株核苷酸(氨基酸)序列同源性较高, 在 99.7% ~ 100%(99.8% ~ 100%) 之间。7 株 DEN3 序列与 2 株中国流行株 98TW407、80-2 比较, 发现 1081、1483、10806 与 80-2 的核苷酸(氨基酸)序列高度相似, 在 99.55% ~ 99.6%(99.4% ~ 99.6%) 之间, 而 10616、11144、11194、13105 与 2 株中国流行株的同源性相对较低(表 2)。

5. 基因序列的进化分析: Rico-Hesse^[5]利用 E 基因进行系统进化分析将 DEN3 分为 4 个亚型。本研究的 7 株 DEN3 流行株可划为 2 个基因型(图 2)。1081、1483、10806 毒株属于东南亚/南太平洋型, 10616、11144、11194、13105 毒株属于印度次大陆型。

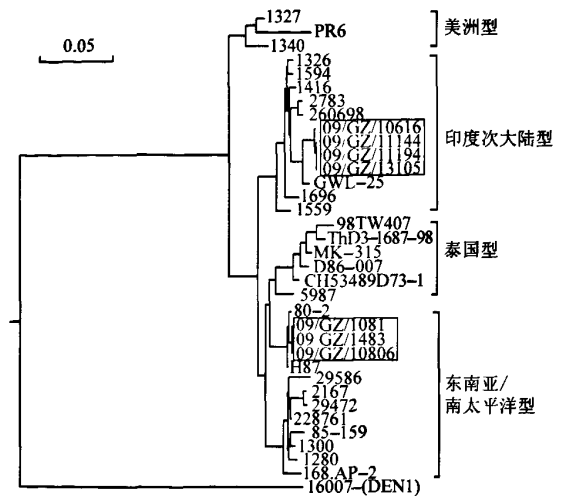


图 2 基于 E 基因绘制的 2009 年 35 株 DEN3 的系统发育树

讨论

广州市自 1978 年以来曾发生 10 次登革热流行, 并且 DEN 1~4 血清型都曾流行, 1995、2002、2006 年为 DEN1 型感染导致流行; 1985、1986、1987 年为 DEN2 型; 1980 年为 DEN3 型; 1978、1990、1991 年为 DEN4 型流行^[4,6]。广州市 2006 年发生 DEN1 型病毒本地感染暴发与流行后^[7,8], 2007、2008 年都是非本地散发病例, 2009 年登革热流行趋势较前两年有所上升, 陆续出现本地和非本地散发病例, 查清其序列特征和可能的传播来源, 将会为下一年度登革热防控工作提供依据。

Rico-Hesse^[5]对 26 株 DEN3 病毒的全长 E 基因进行系统进化分析, DEN3 分为 4 个基因型, 分别为美洲型、印度次大陆型、泰国型和东南亚/南太平洋型。本研究将 7 株 DEN3 病毒与 GenBank 中 28 株全球不同地区的 DEN3 型 E 基因序列, 绘制系统进化树, 结果表明 1081、1483、10806 株属于东南亚/南太平洋型, 10616、11144、11194、13105 株属于印度次大陆型, 提示 7 株毒株由两个独立的来源组成。由于 1~3 号病例(分别对应 1081、1483、10806 株)中发病

表 2 DEN3 核苷酸及推导氨基酸同源性比较(%)

毒株编号	09/GZ/1081	09/GZ/1483	09/GZ/10806	09/GZ/10616	09/GZ/11144	09/GZ/11194	09/GZ/13105	98TW407	80-2
09/GZ/1081		99.8	100.0	97.4	97.2	97.2	97.2	97.2	99.6
09/GZ/1483	99.9		99.8	97.2	97.0	97.0	97.0	97.0	99.4
09/GZ/10806	100.0	99.9		97.4	97.2	97.2	97.2	97.2	99.6
09/GZ/10616	93.9	93.7	93.9		99.8	99.8	99.8	98.0	97.4
09/GZ/11144	93.7	93.6	93.7	99.7		100.0	100.0	97.8	97.2
09/GZ/11194	93.8	93.6	93.8	99.8	99.9		100.0	97.8	97.2
09/GZ/13105	93.8	93.6	93.8	99.8	99.9	100.0		97.8	97.2
98TW407	93.6	93.5	93.6	92.1	92.0	92.0	92.0		97.2
80-2	99.6	99.5	99.6	93.6	93.4	93.5	93.5	93.6	

注: 白体字为核苷酸; 黑体字为氨基酸

时间较早的1号病例在病前从越南入境,并有蚊虫叮咬史,发病较晚的3号病例病前从柬埔寨入境,可根据发病时间推测,1~3号病例感染的均为输入性毒株。4~7号病例(分别对应10616、11144、11194、13105)中5和6号病例为广州本地居民病例,病前没有出境史。通过流行病学资料分析发现在5和6号病例发病前约半个月时间,境外4号病例被确诊为登革热,而且4号病例曾经在以上2例本地病例居住地(广州市越秀区三元里)附近有商业活动和短暂居住史,时间方面存在一定因果关联,极有可能是该病例引发本地居民的感染,但因为该病例发病前境外史资料不齐全,至今尚未追溯到其致病来源地。本研究推测5和6号病例感染的均为输入性毒株,如果能从该两例生活区域的蚊虫媒介标本和人群血清中获得病原学和血清学检测数据,则能使病毒的传播链更加清楚。此外,根据2009年DEN3病例的病前出境史记录可看出当年东南亚地区DEN3病毒的流行具有多种亚型同时出现的特点。因此,及时发现和控制传染源,加强对外来特别是疫区归来人员的监控,对登革热的预防和控制有重要意义。

参 考 文 献

[1] Weaver SC, Vasilakis N. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infect Genet*

Evol. 2009,9(4):523-540.
 [2] Vasilakis N, Weaver SC. The history and evolution of human dengue emergence. *Adv Virus Res*, 2008, 72:1-76.
 [3] Clarke T. Dengue virus: break-bone fever. *Nature*, 2002, 416 (6882):672.
 [4] Fang MY, Lin LH, Liu JW. *Arthropod-borne infectious diseases*. Beijing: Military Medicine Science Press, 2005: 20-122. (in Chinese)
 方美玉,林立辉,刘建伟. 虫媒传染病. 北京:军事医学科学出版社,2005:20-122.
 [5] Rico-Hesse R. Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv Virus Res*, 2003, 59:315-341.
 [6] Qin ED, Qin CF, Jiang T. Dengue virus and dengue virus disease. Beijing: Science Press, 2008:20-53. (in Chinese)
 秦鄂德,秦成峰,姜涛. 登革病毒和登革病毒病. 北京:科学出版社,2008:20-53.
 [7] Wu XW, Jiang LY, Wu YJ, et al. Analysis of E gene of type 1 dengue virus from the outbreak in Guangzhou in 2006. *J Trop Med*, 2009, 9(5):521-524. (in Chinese)
 吴新伟,蒋力云,伍业健,等. 广州市2006年1型登革病毒流行株E基因序列分析. *热带医学杂志*, 2009, 9(5):521-524.
 [8] Luo L, Yang ZC, Wang YL, et al. Analysis on characteristics of dengue fever epidemic in Guangzhou 2006. *South Chin J Prev Med*, 2007, 33(5):11-14. (in Chinese)
 罗雷,杨智聪,王玉林,等. 广州市2006年登革热疫情流行病学特征分析. *华南预防医学*, 2007, 33(5):11-14.

(收稿日期:2010-01-10)

(本文编辑:万玉立)

中华流行病学杂志第六届编辑委员会通讯编委名单

- | | | |
|---------------------|-------------------|-----------------------|
| 陈 曦(湖南省疾病预防控制中心) | 樊丰满(成都市疾病预防控制中心) | 高 婷(北京市疾病预防控制中心) |
| 姜宝法(山东大学公共卫生学院) | 李 杰(北京大学医学部) | 李十月(武汉大学公共卫生学院) |
| 李秀央(浙江大学医学院公共卫生学院) | 廖苏苏(中国医学科学院基础医学院) | 林 玫(广西壮族自治区疾病预防控制中心) |
| 林 鹏(广东省疾病预防控制中心) | 刘爱忠(中南大学公共卫生学院) | 刘 刚(四川省疾病预防控制中心) |
| 刘 静(北京安贞医院) | 刘 莉(四川省疾病预防控制中心) | 刘 玮(军事医学科学院微生物流行病研究所) |
| 鲁凤民(北京大学医学部) | 欧剑鸣(福建省疾病预防控制中心) | 彭晓雯(北京市疾病预防控制中心) |
| 邱洪斌(佳木斯大学) | 赛晓勇(解放军总医院) | 苏 虹(安徽医科大学公共卫生学院) |
| 汤 哲(首都医科大学附属宣武医院) | 田庆宝(河北医科大学公共卫生学院) | 王 蓓(东南大学公共卫生学院) |
| 王素萍(山西医科大学公共卫生学院) | 王志萍(山东大学公共卫生学院) | 谢 娟(天津医科大学公共卫生学院) |
| 徐爱强(山东省疾病预防控制中心) | 徐慧芳(广州市疾病预防控制中心) | 严卫丽(新疆医科大学公共卫生学院) |
| 阎丽静(中国乔治中心) | 杨春霞(四川大学华西公共卫生学院) | 余运贤(浙江大学医学院公共卫生学院) |
| 曾哲涛(北京安贞医院) | 张 波(宁夏回族自治区卫生厅) | 张宏伟(第二军医大学) |
| 张茂俊(中国疾病预防控制中心传染病所) | 张卫东(郑州大学公共卫生学院) | 赵亚双(哈尔滨医科大学公共卫生学院) |
| 朱 谦(河南省疾病预防控制中心) | 祖荣强(江苏省疾病预防控制中心) | |