

3. 讨论:霍乱的传播途经有水、食物和生活接触等<sup>[2]</sup>。本次监测结果表明,2009年梧州市在海(水)产品中首次检出霍乱弧菌,随即2010年在外环境水中检出霍乱弧菌,且分布遍及全市3个辖区。在2009—2010年监测中,采集的样本数量及种类多,区域涉及广,持续时间长,检出阳性率相应提高;推测往年“仅几次采样和样本单一”,是无法发现霍乱弧菌的原因之一。本次监测阳性溯源养殖场水样本阳性率较高,其货源为市某养殖场,该养殖品种则来源广东与海南等地区,因此霍乱病原菌外源性输入不可避免。本次检测针对与阳性样本密切接触的养殖场人员做肛拭,霍乱弧菌检验均阴性。

霍乱毒素CT是霍乱病原体的主要致病因子,其作用于肠黏膜,引起肠液分泌增加,使人致病,小肠联结毒素Zot是随着分子生物学的发展认识到的,是CT核心区域中相对保守的毒力基因,并广泛存在于O1群流行株和O139群菌株中<sup>[3]</sup>,当霍乱弧菌毒力检测CT阴性而Zot阳性时,提示自然环境中霍乱弧菌具有遗传变异特性,标志着该菌株可由非产毒株转变为产毒株,进而有造成人间致病或流行的危险<sup>[4]</sup>。另外,在特定条件下,霍乱弧菌非产毒株CT和Zot均阴性时,也可引起水源或食源性病例甚至暴发疫情<sup>[5]</sup>。本次检出的33株霍乱菌株CT毒力基因全部阴性,但Zot阳性9株。本次监测表明,应加强在全市对霍乱弧菌的主动监测,建立对外来水产品等的检测制度;制定有针对性的防控措施,防止霍乱的发生和流行。

#### 参 考 文 献

[1] The Legal Office of the State Council of the People's Republic of

China, the Ministry of Health. Definition of contagious diseases. Beijing: China's Legal Press, 2004:206. (in Chinese)

国务院法制办公室,卫生部. 中华人民共和国传染病防治法释义. 北京:中国法制出版社,2004:206.

[2] Huang YL. Clinical Infectious Diseases. Beijing: People's Medical Publishing House, 1990:247-248. (in Chinese)

黄玉兰. 实用临床传染病学. 北京:人民军医出版社,1990:247-248.

[3] People's Republic of China KGMM. Cholera Prevention Manual. Beijing: People's Medical Publishing House, 1999. (in Chinese)

中华人民共和国卫生部疾病控制司. 霍乱防治手册. 北京:人民卫生出版社,1999.

[4] Qu M, Huang F, Yan HQ, et al. TaqMan fluorescent PCR in *V. cholerae* virulence gene detection. Chin J Prev Med, 2008, 9(6):546-549. (in Chinese)

曲梅,黄芳,严寒秋,等. TaqMan 荧光PCR技术在霍乱弧菌毒力基因检测中的应用. 中华预防医学杂志,2008,9(6):546-549.

[5] Yan HQ, Li W, Wu J, et al. Together by non-toxigenic *Vibrio cholerae* cause diarrhea outbreak investigation. Chin J Epidemiol, 2006,27(10):918-919. (in Chinese)

严寒秋,李伟,吴疆,等. 一起由非产毒霍乱弧菌引发腹泻暴发的调查. 中华流行病学杂志,2006,27(10):918-919.

(收稿日期:2011-04-05)

(本文编辑:尹廉)

## 广州市2010年登革4型病毒的分离及其E基因进化分析

和鹏 白志军 狄魔 罗雷 李魁彪 吴忠道 王鸣

【关键词】 4型登革病毒; E基因

**Isolation and E gene evolutionary analysis of new emerged type 4 dengue virus from the outbreak of Guangzhou in 2010** HE Peng<sup>1</sup>, BAI Zhi-jun<sup>2</sup>, DI Biao<sup>2</sup>, LUO Lei<sup>2</sup>, LI Kui-biao<sup>2</sup>, WU Zhong-dao<sup>1</sup>, WANG Ming<sup>2</sup>. 1 Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China; 2 Guangzhou Center for Disease Control and Prevention  
Corresponding author: WANG Ming, Email: wangming@gzcdc.

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.10.023

基金项目: 国家科技重大专项(2009ZX10004-306, 2009ZX10004-309); 广州市医药卫生科技项目(2009-YB-228)

作者单位: 510080 广州, 中山大学中山医学院(和鹏、吴忠道); 广州市疾病预防控制中心(白志军、狄魔、罗雷、李魁彪、王鸣)

和鹏、白志军同为第一作者

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

org.cn

This work is supported by grants from the National Science and Technology Major Project of China (No. 2009ZX10004-306, 2009ZX10004-309), Science and Technology Program of Guangzhou Health Department (No. 2009-YB-228).

【Key words】 Type 4 dengue virus; E gene

登革病毒(DEN)E蛋白在病毒与宿主细胞融合和诱导机体产生抗体等过程中发挥重要作用<sup>[1]</sup>。本研究通过对分离株E基因全序列测定,从分子水平确定其型别,并与广州市历年同型DEN流行株及相关国际流行株进行同源性比较,构建系统进化树,追踪其可能输入来源。

1. 材料与方法:

(1) 材料: DEN IgM/IgG 捕捉 ELISA 试剂盒(Dengue IgM/IgG Capture Elisa Kit)、DEN 快速检测试剂盒(Dengue

Duo Cassette) 购自澳大利亚 PanBio 公司, RNA 提取试剂盒 (QLAamp Viral RNA Mini Kit)、DNA 凝胶抽提试剂盒 (QLAquick Gel Extraction Kit) 购自荷兰 Qiagen 公司, PrimeScript One-step RT-PCR 试剂盒购自大连宝生物技术有限公司, DEN 通用型、1~4 型荧光 PCR 核酸检测试剂盒 (Dengue Fever Virus Real Time RT-PCR Kit) 购自上海之江生物科技有限公司。标本来源于广州市各监测点医院疑似登革热病例血清。引物参照 DEN4 Dominica 814669/81 株 (NCBI accession No. AF326573) 基因组序列, 用 Premier Primer 5.0 软件设计, 由上海英俊生物技术有限公司合成: E1F: GAC AAC AGA AGG AAT CAA TAA GTG; E1R: CGT TGC CCC ACC CTC TAT CT; E2F: CAT AAC CAC GGC AAC AAG AT; E2R: GCA CTG TCT CCT ACA CCT ATT ACT AT; E3F: TAC CGC ACT GAC AGG AGC; E3R: TGC CAA ATC CAT AGT CTT CC。

(2) 方法: 用 DEN IgM/IgG 捕捉 ELISA 试剂盒和 DEN 快速检测试剂盒检测疑似登革热患者血清, 阳性急性期血清标本用 C6/36 细胞分离 DEN, 当出现病变时收集细胞培养液上清, 按 QLAamp Viral RNA Mini 试剂盒说明书提取 RNA, 根据试剂盒说明书对 DEN 进行型别鉴定。确定为 DEN4 病毒的标本, 再用其 E 基因特异引物进行 PCR 扩增, 反应条件: 50 °C 反转录 30 min; 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 3 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 7 min。PCR 产物进行凝胶电泳, 出现特异性条带为阳性, 并按试剂盒说明书进行纯化。分别选用 E1F、E1R、E2F、E2R、E3F、E3R 作为测序引物, 以纯化的 PCR 产物为模板, 由上海英俊测序有限公司进行序列测定。测定结果采用 DNASTar 软件中的 Seqman 程序拼接成完整的 E 基因序列。

2. 结果:

(1) 一般情况: 共收集 85 份急性期阳性血清标本, C6/36 细胞进行分离, 29 份出现细胞肿胀、融合、空泡结构等病变, 分离率为 34%。用 RT-PCR 方法对 DEN 进行型别鉴定, 共鉴定出登革 4 型病毒 (DEN4) 14 株, 用 DEN4 特异性引物扩增 E 基因, PCR 产物大小为 730 bp、956 bp 和 1003 bp, 各分子质量均与预期相符。产物测序后拼接获得 E 基因全长序列, 14 株 DEN4 均由 1485 个 bp 组成, 编码 495 个氨基酸, 基因序列未见插入或缺失。

(2) E 基因同源性分析: 14 株 DEN4 病毒核苷酸同源性在 99.9%~100.0% 之间, 氨基酸同源性为 100.0%, 推测 14 株

DEN4 均为同一毒株。选取 14 株中代表株 10/GZ/11580 (上传 GenBank, 登录号发表后公布) 和广东省佛山市 1978 年 DEN4 流行株 (CN78-56)、广州市 1990 年流行株 (B5)、印度尼西亚 2004 年 (SW38i)、2007 年 (0712aTw) 流行株、森林株 P7321120b 进行同源性分析 (表 1), 发现广州市 2010 年 DEN4 毒株与 SW38i 毒株、0712aTw 毒株同源性很高, 核苷酸同源性均为 98.5%, 氨基酸序列同源性为 99.5%、99.7%。而与广东省 CN78-56 和 B5 核苷酸 (氨基酸) 同源性相对较低, 分别为 93.8%~96.7%、97.9%~98.7%, 与森林毒株 P7321120b 同源性最低, 核苷酸为 86.5%, 氨基酸为 96.1%。进一步选取本研究分离的 10/GZ/11580 与 38 株 DEN4 各亚型 E 基因序列构建系统进化树, 结果显示, 10/GZ/11580 离 SW38i、0712aTw 最近, 属于同一分支 (图 1)。

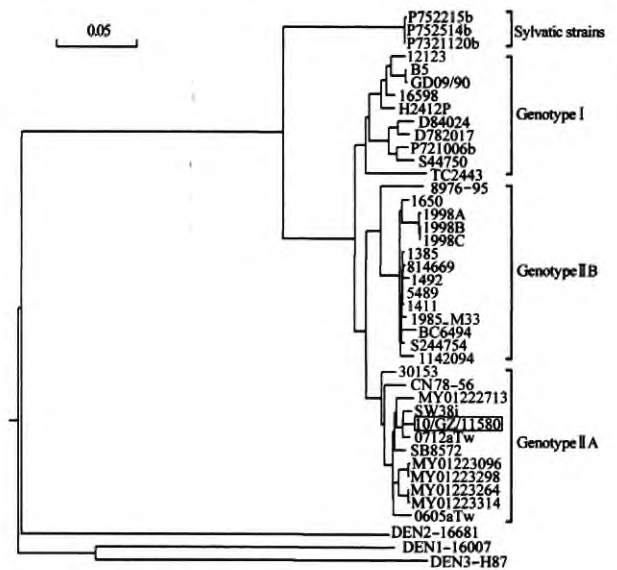


图 1 2010 年广州市 DEN4 E 基因系统进化树

3. 讨论: 广州市近年来主要流行 DEN1<sup>[2]</sup>, 2009 年以 DEN3 型为主<sup>[3]</sup>, 但在 2010 年散发病例中 9 月前以 DEN3 为主, 9 月后开始出现 DEN1 和 DEN4, 随后 DEN4 逐渐成为广州市 2010 年主要流行株。2010 年登革流行病学资料显示, DEN4 型 14 例病例均为广州市本地居民, 未找到可能的外源病例。而广州市及其附近仅于 1978、1990 年暴发 DEN4 型登革热疫情, 1991、1992 和 2002 年有散发病例, 此后长时间未出现 DEN4。E 基因同源性分析发现, 广州市 2010 年流行株与佛山市 1978 年、广州市 1990 年流行株序列同源性较低, 而

表 1 2010 年广州市 DEN4 核苷酸及推导氨基酸同源性比较 (%)

毒株编号	10/GZ/11580	B5	CN78-56	Bahamas1998	Indonesia2004	Indonesia2007	Malaysia1973
10/GZ/11580		<b>0.979</b>	<b>0.987</b>	<b>0.987</b>	<b>0.995</b>	<b>0.997</b>	<b>0.961</b>
B5	0.938		<b>0.975</b>	<b>0.979</b>	<b>0.979</b>	<b>0.981</b>	<b>0.957</b>
CN78-56	0.967	0.948		<b>0.979</b>	<b>0.987</b>	<b>0.989</b>	<b>0.953</b>
Bahamas1998	0.939	0.933	0.948		<b>0.987</b>	<b>0.989</b>	<b>0.957</b>
Indonesia2004	0.985	0.936	0.969	0.940		<b>0.997</b>	<b>0.961</b>
Indonesia2007	0.985	0.942	0.969	0.942	0.987		<b>0.963</b>
Malaysia1973	0.865	0.865	0.867	0.863	0.864	0.865	

注: 白体为核苷酸, 黑体为氨基酸

与印度尼西亚 2004 年 SW38i、2007 年 0712aTw 流行株同源性相对较高,推测 2010 年广州市新出现的 DEN4 可能来源于印度尼西亚。近几年广州市多种型别 DEN 的流行增加人群患登革出血热或登革休克综合征(DHF/DSS)的风险,而且有研究表明 DEN4 正在取代其他型别毒株逐渐成为太平洋地区主要流行株<sup>[4]</sup>,因此应该加强对该型别毒株的监测。

参 考 文 献

[1] Klungthong C, Putnak R, Manmen MP, et al. Molecular genotyping of dengue viruses by phylogenetic analysis of the sequences of individual genes. *J Virol Methods*, 2008, 154: 175-181.  
 [2] 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 Tropi*

*Med*, 2009, 9(5): 521-524. (in Chinese)  
 吴新伟, 蒋力云, 伍业建, 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.  
 [3] Di B, Bai ZJ, Wang YL, et al. Molecular epidemiologic analysis on new emerged type 3 dengue virus in Guangzhou in 2009. *Chin J Epidemiol*, 2010, 31(7): 804-807. (in Chinese)  
 狄飏, 白志军, 王玉林, 等. 广州市 2009 年新出现登革 3 型病毒的分子流行病学分析. *中华流行病学杂志*, 2010, 31(7): 804-807.  
 [4] Li DS, Liu W, Guigon A, et al. Rapid displacement of dengue virus type 1 by type 4, pacific region 2007-2009. *Emerg Infect Dis*, 2010, 16(1): 123-125.

(收稿日期: 2011-03-28)  
 (本文编辑: 万玉立)

## 河南省鲁山县 2010 年重症手足口病空间聚集性分析

孙建伟 许汴利 陈豪敏 康锴 王彦霞 王海峰

【关键词】 手足口病; 负二项分布; 空间聚集性

**Analysis on the spatial distribution of severe hand-foot-mouth disease cases in Lushan county Henan province in 2010** SUN Jian-wei, XU Bian-li, CHEN Hao-min, KANG Kai, WANG Yan-xia, WANG Hai-feng. *Institute of Infectious Disease, Henan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Zhengzhou 450016, China*

Corresponding author: CHEN Hao-min, Email: chenhm@hncdc.com.cn

This work was supported by a grant from the Henan Medical Science and Technigue Foundation (No. 2011020175)

【Key words】 Hand-foot-mouth disease; Negative binomial distribution; Spatial clustering

手足口病发病时间存在季节性变化,但有地区差异<sup>[1]</sup>。进行重症手足口病空间分布特征的分析 and 研究有利于更好掌握重症病例的地理分布特征与规律,为此本研究对 2010 年河南省报告重症病例最多的鲁山县的病例空间分布聚集性进行了分析,现将结果报道如下。

1. 资料与方法:数据来自于疫情网络直报系统鲁山县 2010 年重症手足口病疫情数据及病例报告卡有关信息。利用负二项分布对鲁山县乡(镇)空间层面(以“各乡镇重症病例数/10”的四舍五入数值作为发病等次)及重症病例最多的

张店乡的村空间层面进行重症病例分布拟合。负二项分布参数  $\mu$  用均数  $\bar{x}$  作为其估计值,聚集性参数  $k$  值本文应用最大似然法估算。

2. 结果:鲁山县重症手足口病在乡(镇)层面及张店乡各村层面均服从负二项分布,具有空间聚集性,重症病例集中分布于以县城(鲁阳镇)为中心的近似圆形的区域之内,该区域的鲁阳、张店、董周、张良、让河、马楼、滚子营等 7 个乡(镇)重症病例数占全县的 62.55%,地形则以平原为主;而西部及西北部山区重症病例相对较少。张店乡重症病例较多的村则大多分布在县城周边即城乡结合部。鲁山县各乡(镇)及张店乡各村重症病例数见表 1,负二项分布拟合结果见表 2、3。

表 1 2010 年鲁山县各乡(镇)重症手足口病病例分布

各乡(镇)重症病例分布		张店乡各村重症病例分布					
乡(镇)	例数	乡(镇)	例数	村	例数	村	例数
张店乡	75	辛集乡	19	王瓜营	6	白象店	3
鲁阳镇	65	熊背乡	16	雷队村	6	邢沟村	3
董周乡	55	库区乡	14	大王庄	5	白庄村	3
张良镇	40	瓦屋乡	13	新华村	5	郭庄村	2
让河乡	36	背孜乡	11	后营村	4	宗庄村	2
马楼乡	35	梁洼镇	11	王湾村	4	李村	2
滚子营	33	观音寺	9	林王村	4	张爻村	2
赵村乡	31	尧山镇	5	余堂村	4	军王村	2
张官营	25	团城乡	2	宋村	4	下洼村	1
仓头乡	22	四棵树	2	申庄村	3	张店村	1
下汤镇	21	土门	2	赵庄村	3	马洼村	1

3. 讨论:负二项分布在医学中主要用于聚集性疾病分布模型等的研究<sup>[2]</sup>,当个体间发病概率不相等即可以拟合负二项分布,如单位人数内某传染病的发病人数等。国内曾有学

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.10.024

基金项目:河南省医学科技攻关项目(2011020175)

作者单位:450016 郑州,河南省疾病预防控制中心传染病预防控制所

通信作者:陈豪敏, Email: chenhm@hncdc.com.cn