

· 实验室研究 ·

广州市2011年登革病毒流行状况及E基因进化特征分析

蒋力云 曹毅敏 许杨 景钦隆 曹庆 狄飏 杨智聪

【摘要】 目的 了解2011年广州市登革热的流行情况,分析新分离毒株的E基因分子特征。方法 收集2011年广州市登革热的流行病学资料和血清标本。采用荧光定量PCR检测并确定血清型,C6/36细胞进行病毒分离,测定新分离毒株的E基因序列,利用Mega 4.0软件分析。结果 2011年广州市登革热发病高峰在9—11月。在患者血清中检测出登革热病毒1、2、4型,分离出5株登革热1型毒株。在基因型上,4株属于亚洲型,1株属于美洲/非洲型。结论 广州市登革热病毒与东南亚地区的毒株有较高同源性,且存在登革热暴发的潜在风险,该病毒在广州市可能已出现本地化趋势。

【关键词】 登革病毒; E基因; 流行特征

Epidemiological situation and the E gene evolution of dengue virus in Guangzhou, 2011 JIANG Li-yun, CAO Yi-min, XU Yang, JING Qin-long, CAO Qing, DI Biao, YANG Zhi-cong. Guangzhou Center for Disease Control and Prevention, Guangzhou 510440, China

Corresponding author: YANG Zhi-cong, Email: gdgzcdc@163.com

This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 81271880 and No. 81273139) and Key Research Program of Guangzhou Health Department (No. 201102A212006).

【Abstract】 Objective To investigate the epidemiological characteristics of Dengue and the E gene of the new isolated strains. **Methods** Epidemiological data and serum samples were collected. Serotypes were detected by real-time PCR and virus was isolated in C6/36. E gene of the new isolated strains were sequenced and analyzed by Mega 4.0. **Results** The cases of Dengue reached at the peak during September and November, with Serotype 1, 2 and 4 were involved. Five strains of serotype 1 were isolated, with 4 of them fell into the clad of Asia genotype, and 1 belonged to America/Africa genotype. **Conclusion** The strains isolated in Guangzhou showed a high identity to the Southeast Asian strains. There seemed high risk of outbreak of Dengue in this area, However, the Dengue virus might have already been localized.

【Key words】 Dengue virus; E gene; Epidemiological characters

登革病毒(DENV)有4个血清型(DENV1~4)。研究表明,任何一种血清型的感染都有可能导致严重的登革出血热(DHF)或登革休克综合征(DSS)。同时,在感染某一型别的DENV后,再次感染不同型别的DENV,出现DHF/DSS的机会大大增加^[1,2]。2011年广州市疾病预防控制中心通过对登革热监测标本进行病原学分析和对分离到的DENV进行E基因测序,分析广州市DENV与近年来国内外流行的DENV之间分子流行病学关系,从而进一步了解广州市登革热的流行趋势和特点。

材料与方法

1. 资料及标本来源:数据来自中国疾病预防控制中心系统疾病监测信息报告;患者资料来自广州市疾病预防控制中心(CDC)疫情处理档案;血清标本取自广州市各级医院、区县CDC送检的登革热病例。

2. 诊断标准:参照《登革热诊断标准》(WS 216-2008),确诊病例为有登革热临床症状,伴白细胞减少、血小板减少或者束臂实验阳性者,且同时具备以下一项:血清DENV IgM和(或)IgG阳性,或在过去14 d内到过登革热疫区,或在登革热暴发点范围内,并具备以下一项:RT-PCR检测核酸片段阳性,或病毒分离阳性,或恢复期血清IgG抗体水平较急性期有4倍以上升高。

3. 病毒分离:将患者急性期血清,按照1:20、

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2012.12.017

基金项目:国家自然科学基金(81271880,81273139);广州市卫生局重点项目(201102A212006)

作者单位:510440 广州市疾病预防控制中心病毒免疫科

通信作者:杨智聪, Email: gdgzcdc@163.com

30、40、50 的梯度稀释,取 100 μl 接种至 C6/36 细胞分离培养,吸附 1 h 后弃上清,加入含 2% 小牛血清的 1640 培养基,置 28 °C 孵箱中培养 7 d 后传代,出现细胞病变为阳性,盲传 3 代无细胞病变则判断为阴性。

4. RT-PCR 扩增及序列测定:采用中山大学达安基因股份有限公司生产的登革病毒核酸检测试剂盒,按说明书操作。收集病变细胞的上清液,用 QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) 提取病毒 RNA,用 TaKaRa One Step RNA PCR Kit 进行 RT-PCR 扩增,反应条件:50 °C 反转录 30 min,94 °C 预变性 5 min,94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 3 min,循环 30 次,72 °C 延伸 7 min。将 PCR 产物进行凝胶电泳,电泳阳性的样品用 QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) 挖胶回收,送上海英潍捷基公司测序。测定结果采用 Bioedit 软件拼接,形成完整的 E 基因序列,并计算核苷酸和氨基酸的同源性。引物序列: DEN750(5'-CAA GAA CCG AAA CGT GGA TG-3'), DEN2639(5'-TGT GGA AGC AAA TAT CAC CTG-3')。

5. 基因组序列进化分析:使用 Mega 4.0 软件, Kimura 2 parameter 模型绘制基因系统进化树,步长设为 100。

结 果

1. 发病概况:2011 年广州市共报告本地登革热确诊病例 58 例,发病率为 0.455/10 万,明显低于 2002 年(20.14/10 万)、2006 年(10.19/10 万)两个暴发年份发病率,间于非暴发年份(2001—2010 年)发病率(<1.076/10 万);2011 年流行高峰为 9—11 月,较 2001—2010 年流行高峰(8—10 月)略有推迟,其中 10 月为最高峰(发病 30 例,占全年总病例数的 51.72%)。58 例中本地病例 37 例(63.79%),输入病例 21 例(36.21%),输入国以东南亚国家为主。

2. 病原检测:

(1) 荧光定量 PCR:58 例确诊病例中有 3 例无标本送检,共检测登革热病例急性期血清 55 份,检出 DENV 阳性 21 份,分别为 1 型 16 份、2 型 3 份、4 型 2 份。

(2) 病毒分离:将 21 份荧光定量 PCR 检测阳性急性期血清标本进行细胞分离培养,共分离到 5 株病毒。根据 E 基因测序结果,5 株均为 DENV1。其中分离自本地病例 2 株(11-8214、11-8255),输入病例 3 株(11-8581、11-7360、11-7243),病例分别来自马来西亚、柬埔寨、印度。

3. 病毒 E 基因特征:

(1) 核苷酸及氨基酸同源性比较:对分离的 5 株 DENV1,针对 E 基因扩增,并进行序列分析。核苷酸同源性为 90.8%~100%,氨基酸同源性为 96.9%~100%。与其他国家分离到的 DENV1 如 JF960211(新加坡 2009 年)、AY732411(泰国 1980 年)、FJ639679(柬埔寨 2003 年)、FJ882529(越南 2006 年)、GU131722(越南 2008 年)和 HM181943(柬埔寨 2007 年)有很高的相似性,与这些毒株的核苷酸同源性最高达 99.8%,氨基酸同源性最高达 100%(表 1)。

(2) 基因组序列进化分析:将 5 株 DENV1 的 E 基因序列与 NCBI 上的标准株和国内外历年 DENV1 的序列相比对,绘制基因系统进化树(图 1)。根据 Rico-Hesse^[1] 的基因分型法,5 株 DENV1 中有 4 株基因亚型为亚洲型,1 株为美洲/非洲型。编号 11-8214、11-8255、11-8581、11-7360 与 2010 年广州地区分离到的毒株及越南、柬埔寨近年来分离到的毒株同源性较高,11-7243 与 2009 年广州地区分离到的毒株及新加坡 2009 年分离的毒株同源性较高。

讨 论

登革热在我国东南沿海地区(广东、福建、江苏

表 1 2011 年广州市 DENV E 基因核苷酸与氨基酸同源性分析

Seq->	09-9236	10-11801	11-8581	11-8214	11-8255	11-7243	11-7360	Singapore 2009	Thailand 1980	Cambodia 2003	Vietnam 2006	Vietnam 2008	Cambodia 2007
09-9236		0.971	0.967	0.967	0.967	0.997	0.971	1.000	0.995	0.971	0.971	0.971	0.971
10-11801	0.913		0.989	0.989	0.989	0.973	0.995	0.971	0.971	0.995	0.995	0.995	0.995
11-8581	0.905	0.969		1.000	1.000	0.969	0.993	0.967	0.967	0.993	0.993	0.993	0.993
11-8214	0.905	0.969	0.998		1.000	0.969	0.993	0.967	0.967	0.993	0.993	0.993	0.993
11-8255	0.905	0.969	0.998	1.000		0.969	0.993	0.967	0.967	0.993	0.993	0.993	0.993
11-7243	0.994	0.914	0.908	0.908	0.908		0.973	0.997	0.993	0.973	0.973	0.973	0.973
11-7360	0.912	0.978	0.973	0.973	0.973	0.914		0.971	0.971	1.000	0.995	0.995	1.000
Singapore2009	0.996	0.911	0.903	0.903	0.903	0.993	0.910		0.995	0.971	0.971	0.971	0.971
Thailand1980	0.984	0.921	0.908	0.908	0.908	0.981	0.919	0.982		0.971	0.971	0.971	0.971
Cambodia2003	0.914	0.981	0.976	0.976	0.976	0.915	0.997	0.912	0.919		0.995	0.995	1.000
Vietnam2006	0.910	0.977	0.991	0.991	0.991	0.912	0.979	0.908	0.914	0.982		1.000	0.995
Vietnam2008	0.910	0.977	0.991	0.991	0.991	0.913	0.980	0.908	0.915	0.983	0.999		0.995
Cambodia2007	0.914	0.979	0.974	0.974	0.974	0.915	0.998	0.912	0.919	0.998	0.981	0.981	

注:白体字为核苷酸同源性,黑体字为氨基酸同源性

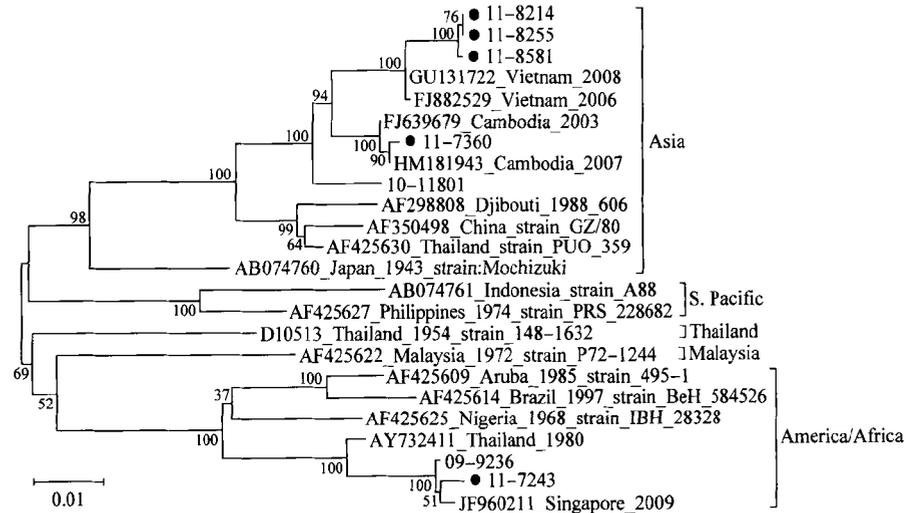
和浙江等省)普遍流行^[4]。广州地区有 DENV 的 4 种血清型,其中以 DENV1 流行为主,曾在 2002 年和 2006 年引起暴发^[5,6]。2011 年的监测显示,流行高峰在 9—11 月,优势型别仍是 DENV1,输入病例仍占较大比例,以东南亚地区输入为主。5 株 DENV1 的核苷酸和氨基酸同源性分析表明,与东南亚地区流行株同源性极高,其中 11-7360 与 HM181943 (柬埔寨 2007 年)核苷酸同源性达 99.8%,氨基酸同源性达

100%。DENV 基因系统进化树分析证实,2011 年广州市 DENV1 毒株与东南亚地区前几年曾出现的毒株极为相近。这可能与地缘及人口流动相关^[7]。5 株 DENV1 中有 3 株分离自不同国家的输入病例,说明周边国家或地区登革热的流行已对广州市登革热的发病有很大影响。

本文 11-8214 和 11-8255 均分离自当地病例,且两株的核苷酸序列相同,很可能具有相同的传染源。在 2011 年报告的 58 例登革热病例中,本地病例达 37 例(63.79%),且近年来每年均有本地病例报告,在流行中几乎均以 DENV1 为主^[8,9]。表明 DENV 可能已出现本地化倾向,广州市已成为登革热新疫区。而在 2009 年和 2010 年曾出现非 DENV1 的优势型别^[10]。同时提示引起广州市登革热流行的 DENV 优势型别有转换的可能性。随着新毒株的输入和本地毒株的变异、进化,病毒出现多样化和复杂化,极易导致流行和暴发^[11]。加上再次感染不同类型的病毒将增加导致 DHF/DSS 的机会,使得感染人群中重症病例增加^[1,2]。因此,广州市存在登革热暴发的潜在风险。

参 考 文 献

[1] Kliks SC, Nimmanitya S, Nisalak A, et al. Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. *Am J Trop Med Hyg*, 1988, 38: 411-419.
 [2] Kliks SC, Nisalak A, Brandt WE, et al. Antibody-dependent enhancement of dengue virus growth in human monocytes as a risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg*, 1989, 40: 444-451.
 [3] Rico-Hesse R. Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv Virus Res*, 2003, 59: 315-341.



注:●为 2011 年广州市分离的 5 株 DENV1 序列(GenBank 序列号为 JX088739—JX088743);另有 2 株分别为 2010 年和 2009 年广州市分离到的 DENV1 (10-11801 和 09-9236);其余均为在 NCBI 上下载的病毒序列

图 1 2011 年广州市 DENV1 基因系统进化树分析

[4] Qiu FX, Gubler DJ, Liu JC, et al. Dengue in China: a clinical review. *Bull WHO*, 1993, 71(3/4): 349-359.
 [5] Luo L. Comparison of epidemiological characteristics of dengue fever between 2002 and 2006, Guangzhou. *South Chin J Prev Med*, 2008, 34(15): 18-21. (in Chinese)
 罗雷. 广州市 2002 年与 2006 年登革热流行特征比较分析. *华南预防医学*, 2008, 34(5): 18-21.
 [6] Zhang FC, Chen YQ, Lu YC, et al. Analysis on clinical and epidemiological characteristics of 1032 patients with Dengue fever in Guangzhou. *Chin J Epidemiol*, 2005, 26(6): 421-423. (in Chinese)
 张复春, 陈燕清, 卢业成, 等. 广州市 2002—2003 年 1032 例登革热患者流行病学特征分析. *中华流行病学杂志*, 2005, 26(6): 421-423.
 [7] Ding J, Li LF. A study on tourist behavior of outbound travel for Guangzhou resident. *Geograph Res*, 2004, 23(5): 705-714. (in Chinese)
 丁健, 李林芳. 广州市居民的出境旅游行为. *地理研究*, 2004, 23(5): 705-714.
 [8] Fang MY, Zhao WZ, Liu JW. The dengue fever molecular epidemiology research survey. *Chin J Epidemiol*, 2002, 23(2): 148-150. (in Chinese)
 方美玉, 赵文忠, 刘建伟. 登革热分子流行病学研究概况. *中华流行病学杂志*, 2002, 23(2): 148-150.
 [9] Luo HM, He JF, Zheng K, et al. Analysis on the epidemiologic features of dengue fever in Guangdong province. *Chin J Epidemiol*, 2002, 23(6): 427-430. (in Chinese)
 罗会明, 何剑峰, 郑夔, 等. 广东省 1990—2000 年登革热流行病学分析. *中华流行病学杂志*, 2002, 23(6): 427-430.
 [10] He P, Bai ZJ, Di B, et al. Isolation and E gene evolutionary analysis of new emerged type 4 dengue virus from the out break of Guangzhou in 2010. *Chin J Epidemiol*, 2011, 32(10): 1051-1053. (in Chinese)
 何鹏, 白志军, 狄飏. 广州市 2010 年登革热 4 型病毒的分离及其 E 基因进化分析. *中华流行病学杂志*, 2011, 32(10): 1051-1053.
 [11] Lee KS, Lo S, Tan SS, et al. Dengue virus surveillance in Singapore reveals high viral diversity through multiple introductions and in situ evolution. *Infect Genet Evol*, 2012, 12(1): 77-85.

(收稿日期: 2012-05-28)

(本文编辑: 张林东)