

云南中缅边境一起输入性登革热暴发的分子流行病学研究

张海林 付士红 邓掌 袁军 姜红月 李铭华 高晓艳 王静林 刘永华
尹正留 杨卫红 章域震 冯云 王环宇 梁国栋

【摘要】 目的 调查云南中缅边境一起输入性登革热流行状况及其流行病毒株的分子流行病学特点。方法 采集医院就诊和口岸入境人员中登革热、疑似登革热和不明原因发热患者血清标本并进行流行病学调查,采用ELISA检测登革病毒IgM抗体,RT-PCR检测登革病毒核酸,核酸阳性标本进行登革病毒PrM-C和NS₅区的基因核苷酸序列测定和分析。结果 2008年7—11月在云南省瑞丽市共采集急性期患者血清标本103份,经登革病毒IgM抗体和核酸检测,49例确诊为登革热。其中除1例为当地感染病例,其余48例均为输入性病例,其中18例来自缅甸木姐市居民,30例为中国居民到缅甸经商或务工返回后发病者。从缅甸输入病例血清中获得2株病毒(RLB61和RLC31)的PrM-C和NS₅区基因核苷酸序列,同源性和系统进化分析表明,RLB61株为登革1型病毒,RLC31株为登革3型病毒,与东南亚登革病毒流行株具有较近的亲缘关系。结论 经血清学和分子流行病学证实瑞丽市边境地区发生输入性登革热暴发,并间接证实缅甸木姐市2008年存在登革1和3型病毒流行。

【关键词】 登革热;登革病毒;输入性流行;分子流行病学

An outbreak of imported dengue fever from Myanmar to the border of China, with its viral molecular epidemiological features ZHANG Hai-lin¹, FU Shi-hong², DENG Zhang¹, YUAN Jun¹, JIANG Hong-yue², LI Ming-hua², GAO Xiao-yan², WANG Jing-lin¹, LIU Yong-Hua³, YIN Zheng-liu³, YANG Wei-hong¹, ZHANG Yu-zhen¹, FENG Yun¹, WANG Huan-yu², LIANG Guo-dong². 1 Yunnan Institute of Endemic Diseases Control and Prevention, Dali 671000, China; 2 Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention; 3 Ruili Center for Disease Control and Prevention

Corresponding author: LIANG Guo-dong, Email: gdliang@hotmail.com

This work was supported by grants from the China-U.S. Collaborative Program on Emerging & Re-Emerging Infectious Diseases (No. U19-GH000004) and the National Natural Science Foundation of China (No. 30560142).

【Abstract】 Objective To understand the epidemiologic characteristics of dengue fever, imported from Myanmar to the border of Yunnan province, China. Viral molecular epidemiologic features were also studied. **Methods** Questionnaires were used on each diagnosed, suspected dengue fever, case or unknown cases with fever when coming from Myanmar entering the port and hospitals in Ruili city of Yunnan province. Serum samples of these patients were collected to detect IgM antibody against dengue virus and RT-PCR assay. Homology and phylogenetic tree based on the whole nucleotide sequence of PrM-C and NS₅ gene of dengue virus were further analyzed. **Results** A total of 103 sera were collected from patients at acute stage in Ruili city in July to November 2008. Among them, 49 cases were confirmed for dengue fever according to IgM and nucleic acid testings. Except one, other 48 cases were all imported into Ruili, from Myanmar. Of those, 18 patients were residents from Mujie city of Myanmar and hospitalized in Ruili and the rest 30 patients were Chinese citizens who had finished business and returned from Myanmar. Two isolates of serum samples from the

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.05.004

基金项目:中美新发和再发传染病合作项目(U19-GH000004);国家自然科学基金(30560142)

作者单位:671000 大理,云南省地方病防治所 云南省病毒立克次体研究中心(张海林、邓掌、袁军、王静林、杨卫红、章域震、冯云);中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所(付士红、姜红月、李铭华、高晓艳、王环宇、梁国栋);云南省瑞丽市疾病预防控制中心(刘永华、尹正留)

张海林、付士红同为第一作者

通信作者:梁国栋, Email: gdliang@hotmail.com

imported cases were identified and both homology and phylogenetic analysis were performed, using the nucleotide sequences of PrM and NS₅ genes. They were divided into dengue type 1 (RLB61) and dengue type 3 (RLC31) and were closer to the dengue virus strains isolated from Southeast Asia countries. **Conclusion** It is confirmed that an epidemic of dengue fever which was imported from Myanmar to Ruili city of Yunnan province, China. Evidence also showed that both type I and III epidemic strains of dengue virus did exist in Mujie city of Myanmar in 2008.

【Key words】 Dengue fever; Dengue virus; Import epidemic; Molecular epidemiology

我国云南省边境地区与登革热地方性流行区的越南、老挝、缅甸和泰国相邻。以往调查证实云南边境地区广泛分布有登革热主要传播媒介白纹伊蚊^[1-7], 20世纪80年代曾发生登革热流行, 并从白纹伊蚊中分离到登革4型病毒^[1,2,8], 近几年还发现局部地区有埃及伊蚊的分布^[4,5], 具有引起登革热流行的风险。2008年与云南省瑞丽市相连的缅甸木姐市等地发生登革热暴发, 为防止登革热输入并引起本地流行, 本研究在瑞丽市开展登革热监测, 重点对医院就诊及口岸入境人员中疑似登革热或不明原因发热病例进行流行病学调查和血清标本采集, 并进行登革病毒IgM抗体和核酸检测以及基因序列测定与分析, 以掌握登革热在边境地区流行状况及其流行株分子流行病学特点。

对象与方法

1. 病例标本采集: 2008年7—11月在云南省瑞丽市医院、边境口岸等地开展登革热监测的所有病例均进行病史个案调查, 采集登革热疑似和临床诊断病例以及不明原因发热病例血清103份, 经3000 r/min离心5 min, 血清置于2 ml螺旋盖冻存管, -70℃冰箱保存直至检测。

2. IgM抗体检测: 采用澳大利亚Panbio公司的流行性乙型脑炎(乙脑)和登革IgM捕获ELISA试剂盒(JE/Dengue IgM Capture ELISA Kit)^[9], 批号E-DEN01M。试验前将血清标本置于56℃作用30 min。考虑到血清中的IgG抗体可能会影响IgM抗体与抗原结合, 使用德国赛润公司的IgG/RF吸附剂(如Z4和T4)去除IgG抗体。病例血清按1:100稀释, 按试剂盒说明书操作, 用全自动酶标仪450 nm波长处读数并判定结果。

3. RT-PCR试验: 用QIAamp Viral RNA Mini Kit(美国QIAGEN公司)提取病例血清中病毒RNA, 用美国Amersham Pharmacia Biotech公司的Amersham Bioscience Ready-to-Go™ You First-Strand Beads制备cDNA。采用黄病毒属引物(FU2: ACC ACA CAA TCA TCT CCG CG; cFD3: AGC ATG TCT TCC GTG GTC ATA CT)扩增黄病毒基因

片段(310 bp)。阳性标本做登革病毒PrM-C和NS₅区基因核苷酸序列测定^[10]。

4. 序列测定和分析: 所有测序均在北京博迈德科技发展有限公司完成。采用ClustalX1.83软件进行核苷酸序列比对, 采用DNASTar中MegAlign软件进行核苷酸和氨基酸同源性分析; 采用Mega 4.0软件进行系统发生树分析。本研究序列分析引用GenBank中34株登革病毒的PrM-C区核苷酸序列和44株登革病毒NS₅区核苷酸序列。

结 果

1. 登革和乙脑病毒IgM抗体检测: 采集到的103例患者血清经乙脑和登革病毒IgM抗体检测, 其中登革病毒IgM抗体阳性47例, 阳性率为45.63%; 乙脑病毒IgM抗体均为阴性。

2. 黄病毒和登革病毒核酸检测: 103份血清标本检测黄病毒属和登革病毒核酸, 结果2份阳性, 标本号分别为RLC31和RLB61。其中RLC31病例(6岁女性)为在缅甸木姐市发病后来中国瑞丽市就医, 发病时间为2008年11月10日, 采血时间为11月13日; RLB61病例(23岁男性)为从缅甸返回的中国瑞丽市居民, 发病时间为2008年10月11日, 采血时间为10月13日。此两例临床诊断均为不明原因发热, 发病至采血时间仅间隔2~3 d, 登革病毒IgM抗体检测为阴性。

3. 流行病学分析: 根据上述检测结果并结合流行病学和临床表现, 49例(IgM阳性47例, 核酸阳性2例)均诊断为登革热。其中48例为缅甸输入病例(缅甸木姐市居民18例, 中国居民到缅甸经商或务工30例), 瑞丽市本地感染病例1例(表1)。49例发病月份分别为7月1例、8月3例、9月17例、10月20例、11月8例。其中9月和10月病例占总病例数的75.51%。男30例, 女19例。0~10岁组7例、11~20岁组7例、21~30岁组13例、31~40岁组14例、41~50岁组5例、51~60岁组2例、61~70岁1例, 发病年龄最大61岁, 最小1岁, 以男性青壮年为主。

4. 登革病毒PrM-C区的同源性和系统进化分析: 经序列测定, 获得RLB61和RLC31病毒株

表1 2008年云南省瑞丽市登革热病例登革病毒IgM抗体阳性病例基本信息

病例	性别	年龄(岁)	发病地点	发病日期(月-日)	标本采集日期(月-日)	临床诊断	IgM检测	
							登革病毒	乙脑病毒
1	男	6	中国芒市	07-10	07-14	发热待查	+	-
2	男	14	中国芒市	08-27	09-03	疑似登革热	+	-
3	女	18	中国芒市	08-30	09-03	发热查因	+	-
4	女	38	中国保山市	08-31	09-06	疑似登革热	+	-
5	男	32	中国瑞丽市	09-02	09-17	登革热	+	-
6	女	38	中国瑞丽市	09-03	09-07	疑似登革热	+	-
7	女	38	中国瑞丽市	09-03	09-09	登革热	+	-
8	女	40	缅甸木姐市	09-03	09-09	疑似登革热	+	-
9	男	32	中国瑞丽市	09-04	09-13	发热查因	+	-
10	女	25	缅甸木姐市	09-08	09-12	登革热	+	-
11	女	43	中国瑞丽市	09-14	09-19	发热查因	+	-
12	男	36	缅甸木姐市	09-14	09-18	发热查因	+	-
13	男	36	缅甸木姐市	09-14	09-21	发热查因	+	-
14	男	28	缅甸木姐市	09-16	09-19	疑似登革热	+	-
15	女	22	中国瑞丽市	09-19	09-23	发热查因	+	-
16	女	24	中国瑞丽市	09-20	09-24	发热查因	+	-
17	女	24	中国瑞丽市	09-20	09-27	发热查因	+	-
18	男	4	缅甸木姐市	09-26	09-30	发热查因	+	-
19	男	1	缅甸木姐市	09-26	09-30	发热查因	+	-
20	女	56	中国瑞丽市	09-28	10-04	发热查因	+	-
21	女	27	缅甸木姐市	09-30	10-04	发热查因	+	-
22	女	61	不详	10-01	10-13	发热查因	+	-
23	男	3	中国芒市	10-05	10-08	发热待查	+	-
24	女	21	缅甸木姐市	10-06	10-10	发热查因	+	-
25	男	40	缅甸木姐市	10-06	10-17	发热查因	+	-
26	男	17	中国保山市	10-08	10-17	登革热	+	-
27	男	36	中国瑞丽市	10-13	10-27	登革热	+	-
28	男	29	中国瑞丽市	10-13	10-28	发热查因	+	-
29	男	45	中国瑞丽市	10-15	10-21	疑似脑膜炎	+	-
30	男	35	中国瑞丽市	10-16	10-22	皮疹查因	+	-
31	男	14	缅甸木姐市	10-17	10-21	发热查因	+	-
32	男	24	中国瑞丽市	10-17	10-27	登革热	+	-
33	男	42	中国瑞丽市	10-19	10-24	发热查因	+	-
34	女	25	中国湖南双峰	10-19	10-25	发热查因	+	-
35	男	44	缅甸木姐市	10-20	10-24	发热查因	+	-
36	男	46	中国瑞丽市	10-23	11-04	登革热	+	-
37	女	34	中国瑞丽市	10-26	11-04	发热查因	+	-
38	男	22	缅甸木姐市	10-27	11-03	发热查因	+	-
39	男	39	中国瑞丽市	10-31	11-06	发热查因	+	-
40	男	54	缅甸木姐市	10-31	11-09	登革热	+	-
41	女	5	缅甸木姐市	11-01	11-03	发热查因	+	-
42	男	11	中国瑞丽市	11-01	11-10	发热查因	+	-
43	女	10	缅甸木姐市	11-05	11-10	发热查因	+	-
44	男	24	中国瑞丽市	11-12	11-23	登革热	+	-
45	男	27	中国瑞丽市	11-12	11-25	发热查因	+	-
46	男	12	缅甸木姐市	11-17	11-18	发热查因	+	-
47	男	13	中国瑞丽市	11-24	11-28	发热查因	+	-

PrM-C和NS₅区核苷酸序列。两株病毒的PrM-C区核苷酸同源性为78.2%,氨基酸同源性为80.0%,表明差异度较大。RLB61株与来自东南亚等地的8株

登革1型代表株核苷酸同源性为96.3%~98.0%,氨基酸同源性为97.1%~98.2%;与登革2、3、4型代表株的核苷酸和氨基酸同源性分别仅为68.0%~

70.4% 和 70.0% ~ 72.4%，表明 RLB61 株为登革 1 型。RLC31 株与 11 株登革 3 型代表株核苷酸同源性为 94.5% ~ 98.4%，氨基酸的同源性为 95.3% ~ 98.2%；与登革 1、2、4 型代表株的核苷酸和氨基酸同源性较低，证实 RLB31 病毒株为登革 3 型。

用获得的 RLC31 和 RLB61 病毒株 PrM-C 区核苷酸序列与来自 GenBank 中不同国家和地区的 34 株登革 1 ~ 4 型病毒各年代代表株 PrM-C 区序列构建系统进化树 (图 1)，RLB61 病毒与缅甸 (D1.Myanmar.31987/98、D1.Myanmar.49440/02、D1.Myanmar.305/01)、泰国 (DENV-1/TH/BID-V2274/2001)、柬埔寨 (DENV-1/KH/BID-V1991/2003) 和越南 (DENV-1/VN/BID-V4021/2008) 流行株位于一个分支，同属登革 1 型。RLC31 病毒株与泰国、柬埔寨和越南等东南亚流行株 (ThD3_0007_87、DENV-3/IPC/BID-V4306/2007、D3MY04-33077、BDH02-7、DENV-3/VN/BID-V1013/2006、Singapore 8120/95) 位于一个分支，同属登革 3 型，并与马来西亚流行株 (D3MY04-33077) 亲缘关系最近。

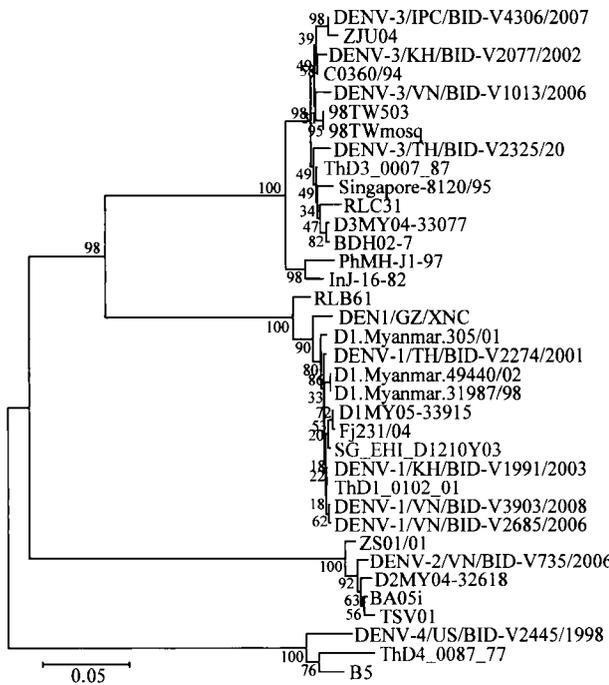


图 1 登革病毒 PrM-C 区基因核苷酸序列系统进化分析

5. 登革病毒 NS₅ 区的同源性和系统进化分析: RLB61 和 RLC31 病毒株核苷酸同源性为 81.0%，氨基酸的同源性为 95.5%。表明两株病毒间的核苷酸同源性差异度较大。其中 RLB61 株与缅甸、泰国等东南亚登革 1 型病毒流行株核苷酸和氨基酸同源性最高。RLC31 株与东南亚登革 3 型流行株的核苷酸和氨基酸同源性较高。用获得的 RLC31 和 RLB61

株 NS₅ 区核苷酸序列，与来自 GenBank 中分离自不同国家和地区的 44 株登革 1 ~ 4 型各年代代表株 NS₅ 序列构建系统进化树 (图 2)，其中 RLB61 株与缅甸和泰国等东南亚登革 1 型流行株 [D1.Myanmar.31987/98、D1.Myanmar.49440/02、D1.Myanmar.305/01、DENV-1/KH/BID-V2005/2007、DENV-1/TH/BID-V2277/2001、DENV-1/VN/BID-V4021/2008、DEN1/GZ/XNC、DENV-1/TH/BID-V2277/2001、SGEHI (D1) 1494y08] 位于一个分支，同属登革 1 型。RLC31 株与东南亚诸国登革 3 型流行株 (D3MY04-33077、PhMH-J1-97、InJ-16-82、BDH02-3、DENV-3/VN/BID-V1013/2006) 位于一个大分支，同属登革 3 型，并与印度尼西亚 (InJ-16-82)、马来西亚 (D3MY04-33077)、菲律宾 (PhMH-J1-97) 流行株亲缘关系最近。

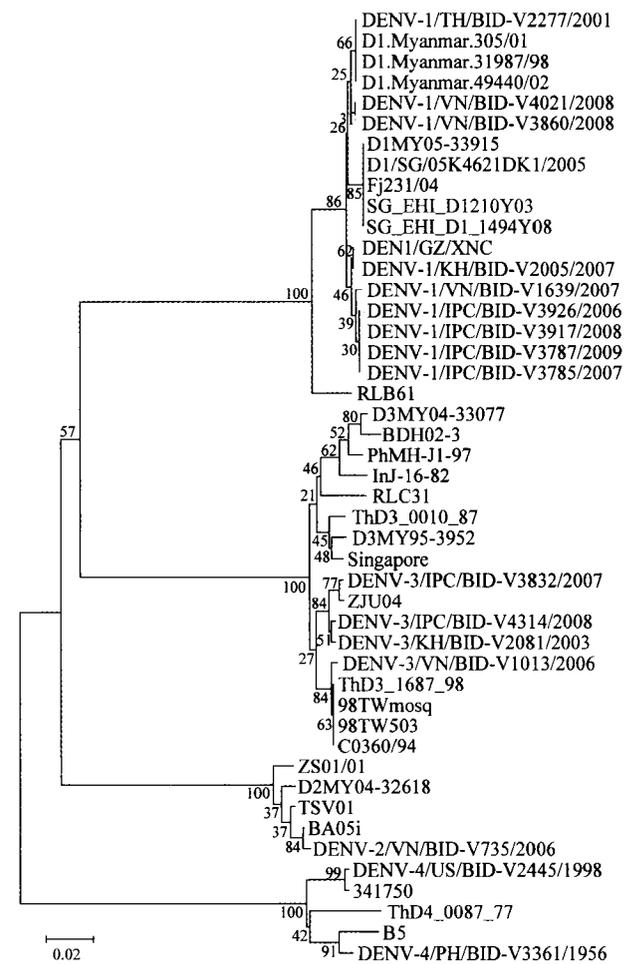


图 2 登革病毒 NS₅ 区基因核苷酸序列系统进化树分析

讨 论

缅甸等东南亚国家是登革热地方性流行地区，并存在登革 1 ~ 4 型病毒的流行，全年均有病例发生，发病数和死亡数处于较高水平 [11, 12]。瑞丽市为云南省中缅边境地区的重要城市，与缅甸木姐市接

壤,自然地理环境极为相似,两国边境贸易较为活跃,存在输入登革热的风险。2008 年瑞丽市发生一起以输入性流行为主的登革热暴发,根据登革病毒 IgM 抗体和核酸检测,确定 49 例登革热病例,其中 48 例为来自缅甸的输入性病例,1 例为本地感染病例,季节分布主要在 9 月和 10 月,发病人群以男性青壮年为主,职业以在缅甸务工人员 and 从事国际贸易的商人及其随从的儿童居多,也有缅甸边民来我国就医的患者。在东南亚地区,登革热对儿童及婴幼儿危害较大^[13],本次输入性病例中,也有 ≤6 岁的 6 例儿童,提示应加强该类人群的预防。调查中还发现 1 例瑞丽市当地感染病例,提示缅甸木姐市登革热的流行已通过伊蚊媒介扩散至我国瑞丽边境地区。

本次调查从 1 例来自缅甸木姐市患者急性期血清中检测到登革 1 型病毒,还从 1 例由缅甸木姐市返回我国瑞丽市发病者血清检测到登革 3 型病毒,间接证实 2008 年缅甸木姐市发生了登革 1 型和 3 型病毒的流行。在登革病毒感染循环中,登革热患者和隐形感染者是主要传染源。瑞丽市每年 7—10 月均能监测到白纹伊蚊,口岸地区还发现有埃及伊蚊分布^[4],一旦有登革热病例输入,就有可能引起登革热局部暴发或流行。

鉴于我国云南省与东南亚诸国广泛接壤,随着全球化日益扩大,跨国经商和务工人员流动增加,导致输入性登革热病例分布逐渐扩大,云南省边境地区应加强监测,尤其是及时发现管理输入性病例对防止因输入性病例引起本地流行有重要意义。

参 考 文 献

- [1] Zhang HL, Zi DY, Gong ZD. Epidemiological survey of dengue fever in Yunnan province China. *Endemic Dis Bull*, 1999, 14(3): 50-54. (in Chinese)
张海林, 自登云, 龚正达. 云南省登革热流行病学调查分析. *地方病通报*, 1999, 14(3): 50-54.
- [2] Zhang HL, Zi DY, Mi ZQ, et al. Characterized distribution of *Aedes albopictus* and their relation with arbovirus in Yunnan province. *Chin J Vector Bio Control*, 2001, 12(2): 103-105. (in Chinese)
张海林, 自登云, 米竹青, 等. 云南省白纹伊蚊分布特点及与虫媒病毒的关系. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2001, 12(2): 103-105.
- [3] Wang PY, Wu C, Zhang CL, et al. Survey of transmitting vector of dengue fever in Yunnan province. *Chin Trop Med*, 2006, 6(11): 1933-1934. (in Chinese)
王丕玉, 吴超, 张苍林, 等. 云南部分地区登革热传播媒介调查. *中国热带医学*, 2006, 6(11): 1933-1934.
- [4] Wang PY, Zhou HN, Wu C, et al. Survey of *Aedes aegypti* of dengue fever vector in Yunnan province. *Chin J Vector Bio Control*, 2006, 17(6): 507-508. (in Chinese)
王丕玉, 周红宁, 吴超, 等. 云南省登革热媒介埃及伊蚊的分布调查. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2006, 17(6): 507-508.
- [5] Fan JH, Wang P, Chen R, et al. Results in surveillance of dengue fever in Xishuangbanna prefecture in 2005-2007. *Chin Trop Med*, 2009, 9(1): 110-111. (in Chinese)
范建华, 汪萍, 陈然, 等. 西双版纳州 2005-2007 年登革热监测分析. *中国热带医学*, 2009, 9(1): 110-111.
- [6] Yang J, Dong CL, Jiang W, et al. Survey of prevalence of dengue fever and management of infections in Dehong prefecture bordering Myanmar. *Chin Trop Med*, 2010, 10(2): 144-145. (in Chinese)
杨捷, 董朝良, 江伟, 等. 德宏州边境地区登革热流行状况调查及疫情处置效果. *中国热带医学*, 2010, 10(2): 144-145.
- [7] Dong SH, Pan SH, Lei J, et al. Survey of prevalence of dengue fever and evaluation of control measures in border areas of Luxi city. *Chin Trop Med*, 2010, 10(2): 155-156. (in Chinese)
董书华, 潘绍虎, 雷剑, 等. 潞西市边境地区登革热流行病学分析. *中国热带医学*, 2010, 10(2): 155-156.
- [8] Wang JL, Zhang HL, Sun XH, et al. Identification and sequence analysis of NS1 and NS2a of two strains of dengue type-4 virus from mosquitoes in Yunnan province. *Chin J Zoonoses*, 2008, 24(7): 636-640. (in Chinese)
王静林, 张海林, 孙肖红, 等. 云南登革 4 型病毒的鉴定及 NS1 和 NS2a 基因序列分析. *中国人兽共患病杂志*, 2008, 24(7): 636-640.
- [9] Vazquez S, Hafner G, Ruiz D, et al. Evaluation of immunoglobulin M and G capture enzyme-linked immunosorbent assay Panbio kits for diagnostic dengue infections. *J Clin Virol*, 2007, 39(3): 194-198.
- [10] Fu SH. Strategy of isolation and identification for arboviruses. *Chin J Vector Bio Control*, 2012, 23(5): 432-435. (in Chinese)
付士红. 虫媒病毒的分离与鉴定. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2012, 23(5): 432-435.
- [11] Thu HM, Lowry K, Myint TT, et al. Myanmar dengue outbreak associated with displacement of serotypes 2, 3, and 4 by dengue 1. *Emerg Infect Dis*, 2004, 10(4): 593-597.
- [12] Mackenzie JS, Williams DT. The zoonotic flaviviruses of southern, south-eastern and eastern Asia, and Australasia: the potential for emergent viruses. *Zoonoses Public Health*, 2009, 56(6-7): 338-356.
- [13] Halstead SB, Lan NT, Myint TT, et al. Dengue hemorrhagic fever in infants: research opportunities ignored. *Emerg Infect Dis*, 2002, 8(12): 1474-1479.

(收稿日期: 2013-01-22)

(本文编辑: 张林东)