

# 河南省2013年登革热暴发的登革热病毒基因组序列测定及分析

马红霞 杜燕华 黄学勇 李幸乐 许汴利

【关键词】 登革热病毒; 遗传进化分析

**Analysis of the genome sequences of Dengue virus caused an outbreak of Dengue Fever in Henan province, 2013** Ma Hongxia, Du Yanhua, Huang Xueyong, Li Xingle, Xu Bianli. Institute for Infections Disease Control and Prevention, Henan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Zhengzhou 450016, China

Corresponding author: Xu Bianli, Email: xubl@hncdc.com.cn

This work was supported by grants from the Project of Science and Technology Department of Henan Province (No. 142300410077); and Henan Provincial Health Department and Ministry of Health of China Co-build Project (No. 201201003).

【Key words】 Dengue virus; Phylogenetic analysis

登革热病毒(DENV)通过蚊虫叮咬进行传播, DENV感染后可引起登革热(DF)、登革出血热(DHF)和登革休克综合征(DSS)。在全世界范围内, 主要分布在热带和亚热带地区。在我国主要分布在广东、福建、浙江和云南等地区。DENV属黄病毒科黄病毒属, 是单股正链RNA病毒, 基因组全长约11 kb, 包括4个血清型, 每个血清型又分不同基因亚型。2013年以前河南省未发生过DF本地流行, 偶有输入性病例报告。2013年河南省禹州市首次出现DF暴发疫情<sup>[1]</sup>, 共有73例确诊病例报告, 本研究对这次暴发疫情的DENV基因组序列进行分析。

## 1. 材料与方法:

(1) 标本来源: 血清标本来源于河南省禹州市DF患者, -70℃保存。所有标本采集均经知情同意。

(2) 病毒分离及鉴定: 将27份急性期血清标本接种于单层非洲绿猴肾细胞(Vero), 36℃ 5%CO<sub>2</sub>培养箱培养, 盲传3代后收集出现细胞病变的培养物, 用于序列扩增及鉴定分型。

(3) RT-PCR扩增及序列测定: 病毒阳性分离产物首先使用DENV核酸荧光RT-PCR试剂(江苏硕士股份有限公

司)进行鉴定分型, 初步鉴定后参照文献[2]进行基因组分段扩增并测序。

(4) 序列分析: 使用DNASTar软件包中的SeqMan程序进行序列拼接, 拼接后的序列在美国国立生物技术信息中心(NCBI)网站进行BLAST, 初步发现同源序列。使用DNASTar 5.01软件包中的MegAlign软件分析核苷酸序列同源性, 最后用Mega 5.05软件采用最大似然法构建进化树(Bootstrap=1000)。本次分离得到9株DENV分离株的核苷酸序列提交至GenBank数据库。遗传进化树中的DENV毒株命名规则为国家(省份)/毒株来源日期/GenBank序列号。

## 2. 结果:

(1) 病毒分离及鉴定: 病毒培养后, 收集12份阳性分离物上清, 保存于-70℃冰箱。所有阳性病毒分离产物经DENV核酸荧光RT-PCR试剂鉴定, 分型为DENV-3核酸阳性。

(2) 全基因组序列测定及分析: 经分段扩增测序, 共获得9株病毒的全基因序列, 将序列提交GenBank, 序列号为KJ622191~KJ622199。基因组全长约10710 bp, 测序结果经过BLAST分析, 所有序列与DENV-3同源性最高。含有一个开放读码框, 编码3390个氨基酸。两端各有一个非翻译区, 长度分别为94个核苷酸和约444个核苷酸。

(3) 核苷酸和氨基酸序列同源性比较: 引起此次DF暴发的9株病毒分离株之间全基因组核苷酸同源性为99.9%~100.0%, 编码区氨基酸同源性为99.9%~100.0%。GenBank中同此批分离株同源性最高的为2013年的中国云南省分离株YN1/2, 其中基因组核苷酸同源性为99.5%~99.6%, 编码区氨基酸同源性为99.7%~99.8%; 其次为1987年分离的泰国株ThD3\_0010\_87, 基因组核苷酸同源性为97.6%~97.7%, 编码区氨基酸同源性为99.2%~99.3%。

(4) 进化树分析: 将9株DENV-3分离株E基因序列与GenBank下载的不同国家、不同年份、不同基因亚型的其他27株DENV毒株序列构建进化树, 以1945年分离于美国的DENV-1型毒株序列作为外围序列。DENV-3共由5个基因型(I~V)组成, 近年来, I、II、III、V型在我国东南沿海地区及与我国临近的东南亚国家均有出现。此次暴发的分离株自成一簇, 关系最近的为同年分离于云南省的YN1/2 DENV毒株, 其次为马来西亚分离株, 见图1。

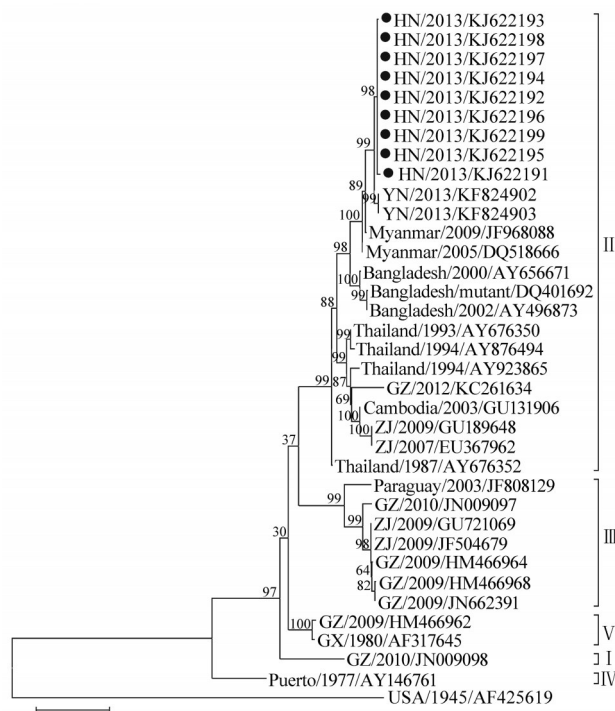
3. 讨论: 2013年, 在广东省<sup>[3]</sup>和云南省<sup>[4-5]</sup>均出现了DF疫

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2015.10.032

基金项目: 河南省科技厅项目(142300410077); 河南省医学科技攻关计划省部共建项目(201201003)

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: 许汴利, Email: xubl@hncdc.com.cn



注: ● 本研究分离株

图1 DENV-3病毒分离株全长E编码区核苷酸序列进化树

病学调查显示,疫情出现前期,当地就曾有马来西亚归国人员,同我国东南沿海省份的往来也非常频繁。

[感谢河南省许昌和禹州市疾病预防控制中心工作人员的大力支持]

参 考 文 献

[1] Huang XY, Ma HX, Wang HF, et al. Outbreak of Dengue fever in central China, 2013[J]. Biomed Environ Sci, 2014, 27(11): 894-897.

[2] Zhou WZ. The characteristics of family-clustered dengue fever cases and analysis the full genomic sequence of dengue virus type-3 strain in Guangdong[D]. Guangzhou: Guangzhou Medical University, 2010: 1-85. (in Chinese)

周伟泽. 广东家庭聚集性登革3型病例特征及其病毒株全基因组序列分析[D]. 广州: 广州医学院, 2010: 1-85.

[3] Yang EL, Jing QL, Zeng WF, et al. The epidemic characteristics analysis of dengue fever in Liwan district of Guangzhou city in 2013[J]. J Trop Med, 2014, 14(10): 1367-1369. (in Chinese)

杨丽莉, 景钦隆, 曾伟锋, 等. 2013年广州市荔湾区登革热疫情流行病学特征分析[J]. 热带医学杂志, 2014, 14(10): 1367-1369.

[4] Feng Y, Fan JH, Zhu J, et al. Molecular epidemiology of an outbreak of Dengue fever in Jinghong city, Yunnan province, China, 2013[J]. Chin J Epidemiol, 2014, 35(12): 1409-1411. (in Chinese)

冯云, 范建华, 朱进, 等. 云南省景洪市2013年登革热暴发的分子流行病学研究[J]. 中华流行病学杂志, 2014, 35(12): 1409-1411.

[5] Feng Y, Liu YH, Yin ZL, et al. Molecular epidemiologic analysis of an outbreak of dengue fever in 2013 at Ruili city, Yunnan province of China[J]. Chin J Viral Dis, 2014, 10(4): 306-311. (in Chinese)

冯云, 刘永华, 尹正留, 等. 云南省瑞丽市2013年登革热暴发的分子流行病学研究[J]. 中国病毒病杂志, 2014, 10(4): 306-311.

(收稿日期: 2015-03-25)

(本文编辑: 万玉立)

情,并且存在不同血清型的DENV混合流行。云南省景洪市在2013年8月开始出现了由DENV-3引起的DF疫情<sup>[1]</sup>,河南省禹州市也在该时间段出现DF病例,并且引起本地流行,具有家庭聚集性现象<sup>[2]</sup>。而且,引起河南省此次DF疫情的DENV分离株同2013年的云南省DENV-3分离株全基因组核苷酸序列具有高度同源性(99.5%~99.6%)。进化树也显示,两者关系最近,同属G II。近年来,该血清型的DENV在东南亚地区长期流行,所以,冯云等<sup>[4]</sup>推测2013年中国云南省景洪市DF疫情与2013年6-8月来自老挝等相邻国家的DF输入性病例(或隐性感染者)密切相关。2013年河南省首次出现的DF暴发疫情发生在禹州地区,当地属于钧瓷产地,长期和我国东南沿海及东南亚国家存在着贸易往来。流行