

· 现场调查 ·

福州市 2004 年登革热流行病学和病原学特征分析

严延生 洪荣涛 沈晓娜 翁育伟 蔡少健 徐保海 李世清 何家鑫
许龙善 林云钦 郑能雄 林茂 林淑华

【摘要】 目的 对福州市 2004 年登革热疫情及病原学特征进行分析。方法 调查和分析福州市 2004 年登革热流行病学特点及影响因素;用 C6/36 细胞分离患者血清标本中病毒,并用单克隆抗体鉴定型别;通过比对核苷酸序列,分析本次疫情可能的传染源。结果 福州市 2004 年 9 月中旬起至 10 月底发生一起登革热暴发疫情,所确认的 93 例病例消长情况基本与当地的蚊媒消长情况相一致。从病例的 10 份血清标本中分离出 6 株病毒,经单克隆抗体鉴定均为登革热病毒 1 型,病毒基因的核苷酸序列比对证明同源性与柬埔寨分离株 (DENV-1/KHM/2001; GenBank Accession No. L0904278) 最为接近。结论 福州市 2004 年登革热疫情为感染登革 1 型病毒所引起;疫情的发生主要为输入性病例流行引起。

【关键词】 登革热 1 型病毒; 疫情; 序列分析

Study on the epidemiology and etiologic agent of Dengue fever outbreaks in Fuzhou in 2004 YAN Yan-sheng*, HONG Rong-tao, SHEN Xiao-na, WENG Yu-wei, CAI Shao-jian, XU Bao-hai, LI Shi-qing, HE Jia-xin, XU Long-shan, LIN Yun-qing, ZHENG Neng-xiong, LIN Mao, LIN Shu-hua. *Fujian Centers for Disease Control and Prevention, Fuzhou 350001, China

【Abstract】 Objective To study the epidemiology and etiologic characteristics of a Dengue fever outbreak in Fuzhou from the beginning of September to the end of October in 2004 in order to understand the source of infection. **Methods** Data on descriptive epidemiology was collected to study the characteristics and related factors to the epidemic. Dengue virus was isolated through the use of C6/36 cell line while viral serotypes were identified by indirect immunofluorescent assay with type-specific monoclonal antibody. The sources of infection were traced by nucleotide sequencing. **Results** During the epidemic, 93 cases occurred consistently with the region entomophily growth and decay. The viruses of 6 strains isolated from 10 patients' blood specimens were identified as dengue virus type 1. Phylogenetic evidence suggested that the viral isolate had high genetic relation with the isolates from Kampuchea (DENV-1/KHM/2001; GenBank Accession No. L0904278). **Conclusion** The epidemic was caused by introduction of patients migrating into Fuzhou.

【Key words】 Dengue virus type 1; Epidemic; Nucleotide sequencing

登革热是全球热带和亚热带地区重要的蚊媒传染病^[1],近几年来,全球登革热疫情渐趋活跃,部分东南亚国家,如菲律宾、马来西亚和缅甸等国因气候原因常年有登革热疫情报告,同时,也给周边国家控制登革热的输入带来挑战。福建省登革热最早报道于 1873 年厦门岛的暴发,另有记载福州市于 1944 年有一次暴发^[2],此后 50 多年未见报道;1999 年夏

秋季在福州市近郊发生局部暴发,流行毒株为 2 型病毒^[3],推测为境外输入传播。从 2004 年 9 月上旬起,在福州市区及所辖连江、闽侯县等地均发现登革热病例,现将该起疫情流行病学及病原学特征分析如下。

资料与方法

1. 个案材料收集:现场处置登革热疫情所掌握的个案调查情况、登革热住院临床病例,结合中国疾病预防控制中心信息系统所提供的人口资料和直报的福建省 2004 年登革热病例个案情况,采用描述流行病学方法分析其临床和流行病学特点及影响因素等。

基金项目:福建省重点专项基金资助项目(2004YZ01-1)

作者单位:350001 福州,福建省疾病预防控制中心(严延生、洪荣涛、沈晓娜、翁育伟、蔡少健、徐保海、李世清、何家鑫、许龙善);福州市疾病预防控制中心(林云钦、郑能雄);福州市台江区疾病预防控制中心(林茂、林淑华)

2. 蚊媒密度:现场处置登革热疫情调查的外环境白纹伊蚊孳生地状况,用布雷图指数表示^[4]。

3. 登革热实验室诊断:诊断标准参照中华人民共和国卫生行业标准 WS 216-2001:登革热诊断及处理原则。ELISA 检测登革热特异性 IgM、IgG,试剂盒购自澳大利亚 PanBio 公司。

4. 病毒分离及鉴定:参照文献[3]方法,采用 C6/36 传代细胞(广东省疾病预防控制中心赠)从早期登革患者血清标本分离,病毒分离株用登革热型特异性单克隆抗体(中山医科大学产品)为二抗的间接免疫荧光试验鉴定。

5. 逆转录(RT)-巢式 PCR:采集感染者急性期血清分析。按 QIAamp Viral RNA Mini Kit 试剂盒说明提取病毒 RNA,140 μl 血清病毒 RNA 提取物,悬于 50 μl 洗脱液中(含 60 U Rnasin);取 10 μl 悬液为病毒 RNA 模板,用通用引物 D1、D2(引物浓度为 0.5 μmol/L, MgCl₂ 浓度 1.5 mmol/L)进行一步法 RT-PCR 反应。反应程序为:50℃ 35 min, 95℃ 15 min, 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 90 s, 共 35 个循环;72℃ 10 min。将反应产物 100 倍稀释后,取 3.0 μl 加入第二轮 PCR 反应混合液中(引物与 MgCl₂ 浓度同第一轮),各份产物分别使用通用引物 D1 和型特异性引物 D3~D6 配对,进行第二轮扩增。反应程序为:94℃ 5 min, 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 60 s, 共 30 个循环;72℃ 5 min。试剂来源:病毒 RNA 提取试剂盒、One Step RT-PCR 试剂盒、胶回收试剂盒均购至 QIAGEN 公司, Rnasin 购至 TaKaRa 公司,引物设计见参考文献[5],引物由 TaKaRa 公司合成(表 1)。

6. 核苷酸序列分析:PCR 产物测序和比对,将 PCR 扩增产物经 QIAquick Gel Extraction Kit 试剂盒纯化回收后,通过 D1、D2 引物进行正、反向测序,测序试剂盒购至 ABI 公司,测序由 ABI 310 测序仪完成。正、反序列经互补配对验证后,拼接成完整扩增

片段序列,利用 Blast 软件将所测序列与 GenBank 数据库进行比对,进一步判定型别并初步分析同源性。

结 果

福州市登革热的流行从 2004 年 9 月上旬至 10 月下旬止,按照诊断标准,福州市区及其郊区县共报告发现登革热患者 93 例,多为轻症病例,主要集中在福州市台江区。

1. 临床表现:对 93 例登革热个案分析表明,出现发热症状者达 93.14%,头痛 58.82%,肌肉关节痛 56.86%,颜面潮红 52.94%,出疹 52.94%,出血 37.25%;有 79 例患者做过血常规,其中白细胞下降者(<4.0×10⁹/L)占 89.87%,血小板下降者(<100×10⁹/L)占 54.93%,两者皆下降者 54.93%。

2. 流行病学特征

(1)现场血清流行病学调查情况:为核实疫情,以指针病例家周围 50 m 范围内的居民采血样,用 ELISA 法测定登革热特异性 IgM、IgG。台江区疫点共采集了血清标本 89 份, IgM 阳性 7 份, IgG 阳性 12 份,单阳性 12 份,双阳性 6 份;闽侯疫点共采集血清标本 62 份, IgM 阳性 3 份, IgG 阳性 2 份,单阳性 3 份,双阳性 2 份;连江疫点共采集血清标本 80 份, IgM 阳性 5 份, IgG 阳性 3 份,单阳性 5 份,双阳性 1 份。

(2)三间分布:

①地区分布:病例分布在福州市的 3 个县 6 个乡镇街道,其中台江区 71 例(发病率 227.71/10 万),闽侯县 6 例(发病率 9.79/10 万),连江县 16 例(发病率 17.12/10 万)。县区之间在地理位置上不毗邻,但同一个县区的街道、乡镇则是毗邻的。

②时间分布:台江区最早发现病例是 9 月 8 日,发现指针病例 9 月 21 日,无新病例发生 10 月 15 日,疫情蔓延 37 天;连江县最早发现病例是 9 月 12 日,发现指针病例 10 月 4 日,无新病例发生 10 月

表1 登革病毒型别鉴定使用的引物

编号	序 列*	位置#	片段(bp) [△]	型特异性
D1	5'-TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG-3'	134~161		通用
D2	5'-TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTTC-3'	616~644	511	通用
D3	5'-CGTCTCAGTGATCCGGGG-3'	568~586	482	登革热 1
D4	5'-CGCCACAAGGGCCATGAACAG-3'	232~252	119	登革热 2
D5	5'-TAACATCATCATGAGACAGAGC-3'	400~421	290	登革热 3
D6	5'-CTCTGTTGTCTTAACAAGAGA-3'	506~527	392	登革热 4

* 所用的引物序列参照文献[5]; # 引物位置以登革热 Jarnacia 株为参照,参照文献[6]; △ 片段大小指各引物和通用引物 D1 配对所扩增的产物的大小

19 日,疫情蔓延 22 天;闽侯县最早是 9 月 16 日,发现指针病例 9 月 24 日,无新病例发生 10 月 8 日,疫情蔓延 22 天;9 月上旬 1 例,中旬 2 例,下旬 25 例;10 月上旬 53 例,中旬 12 例(表 2),其中 9 月下旬和 10 月上旬的病例数和占本土发病病例数的 83.87%。

表 2 福州市 2004 年登革热病例发生地区和时间分布

地 区	9 月			10 月		合计
	上旬	中旬	下旬	上旬	中旬	
台江区	1	-	21	43	6	71
闽侯县	-	1	1	4	-	6
连江县	-	1	3	6	6	16
合 计	1	2	25	53	12	93

③人群特征:男性 41 例,女性 52 例,男女性别比 0.79:1;年龄最小的 3.3 岁,最大的 86.3 岁,中壮年(30 岁 ≤ 中壮年 < 60 岁)占 87.8%;职业分布中以工人、学生、家务人员占比例较大,分别是 37.6% (35/93)、15.1% (14/93)、15.1% (14/93)。

3. 流行因素:

(1)人口因素:台江区、连江县、闽侯县发生疫情的乡镇或者街道是交通的主要干道,人口密度相对集中。尤其是台江区,是福州市的经济文化中心之一,日人员流动量大。

(2)环境媒介因素:对 3 个疫点作白纹伊蚊密度监测。台江区 9 月 25 日查 86 户,布雷图指数 33.72,闽侯县 9 月 24 日查 107 户,布雷图指数 76,连江县 10 月 5 日查 93 户,布雷图指数 128,调查证明外环境白纹伊蚊密度大。调查后,分别对 3 个疫点翻盆倒罐铲除白纹伊蚊孳生地,在一个最正常周期内(病毒在蚊媒体内复制繁殖需要的一般时间加上患者常见潜伏期约 18 天^[7]),3 个疫点的新发病例明显下降,累积发病率曲线倾向缓和,而在此前的病例数占发病总数的 91.40% (图 1),表明蚊媒密度与病例发生密切相关。

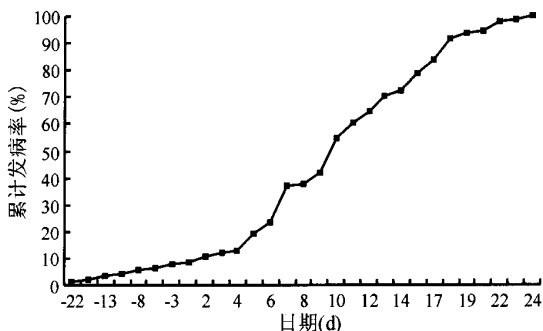


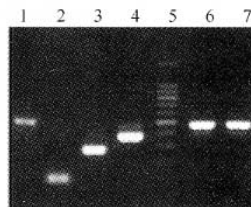
图 1 福州市 2004 年 3 个疫点发现指针病例后的累积发病率 (%)

(3)临床因素:流行早期一些轻型或亚临床病例未去就诊,或被误诊、漏诊,这与早期疫情较严重有关。

4. 病原学特征:

(1)对临床送检的血液样本,选择发病在 3 天之内、症状典型的 10 份用 C6/36 细胞进行病毒分离,其中 6 份阳性,阳性率 60.0%;所有分离株经型特异性单克隆抗体为二抗的间接免疫荧光试验鉴定为登革热 1 型病毒。

(2)采用 RT-nPCR 鉴定分型,用通用引物 D1 和型特异性引物 D3~D6 配对,进行第二轮 PCR 反应。利用型特异性引物扩增,理论上各型产物的分子量分别为:登革热 1 型 482 bp、2 型 119 bp、3 型 290 bp、4 型 392 bp,实验结果均得以证实,被检标本均在 482 bp 的位置上出现一条特异性扩增带,进一步判断为登革热 1 型病毒。图 2 显示其中 2 个病例血清标本 PCR 鉴定图谱。



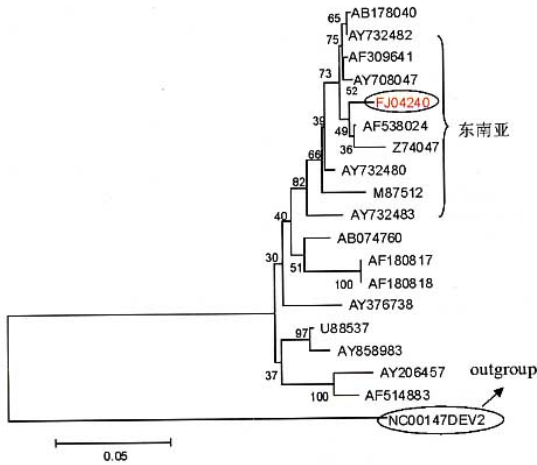
1~4:登革热病毒代表株泳道,分别为 1 型(Hawaii),2 型(NGC),3 型(H87)和 4 型(H241);5:MW Standard;6,7:临床标本

图 2 RT-nPCR 分型鉴定检测图谱

(3)核苷酸序列分析比对:取其中 1 份扩增产物进行序列测定(标本号:FJ04240),其序列资料见图 3。通过 Blast 软件将该序列与 GenBank 数据库进行比对,检索结果发现序列相似程度最高的均为登革热 1 型病毒,进一步证实本次福州市登革热流行系登革热 1 型病毒引起,FJ04240 与东南亚分离株遗传最为接近,其中相似性最高的病毒株为 DENV-1/KHM/2001 (Accession No. L0904278),该毒株 2001 年分离自柬埔寨(图 4)。

```
CGCTGTCAGTGTTCAGTTGGCGAAGAGATTCTCAAAGGAT
TGCTCTCAGGCCAAGGACCTATGAAACTGGTGATGGCTTTCAT
AGCATTCTTAAGATTTCTAGCCATACCCCCAACAGCAGGAATT
TTGGCTAGATGGGGCTCATTCAAGAAGAATGGAGCGATCAAA
GTGCTACGGGGTTTCAAGAAAGAAATCTCAAGCATGTTGAAT
ATAATGAATAGAAGGAAAAGATCTGTGACCATGCTCCTTATG
CTGATGCTACAGCCTTGGCGTTCATTGACTACACGAGGGG
GAGAGCCGCACATGATAGTCAGCAAGCAGGAAAGAGGAAAGT
CACTTTTGTTTAAGACCTCAGCAGGTGTCAACATGTGCACCCT
TATAGCGATGGATTTGGGAGAGTTATGTGAGGACACAATGAC
TTACAAATGCCCTCGAATCACTGAGGCGGAACCTGAAGACATT
GCTTGGNTGGGTGCAAA
```

图 3 FJ04240 部分核苷酸序列



图示代号为病毒株在基因库中登录号, AB178040(日本, 2004), AY732482(泰国, 2001), AF309641(柬埔寨, 2001), AY708047(缅甸, 2001), FJ04240(福建, 2004), AF538024(柬埔寨, 2001), Z74047(越南, 1996), AY732480(泰国, 1994), M87512(新加坡, 1993), AY732483(泰国, 1981), AB074760(日本, 2001), AF180817 和 AF180818(美国, 2000), AY376738(广州, 1999), U88537(美国, 1997), AY858983(印度尼西亚, 2004), AY206457 和 AF514883(阿根廷, 2000), NC00147DEV2 为登革热 2 型病毒

图4 福建分离株与其他登革热 1 型病毒遗传系统发生关系的分析

讨论

1999 年福州市城门镇、盖山镇、螺洲镇等曾出现登革热爆发性流行^[8], 事隔 5 年, 福州市其他一些乡镇、街道又出现登革热的局部暴发, 说明福州市的登革热疫情不容乐观, 应该加强监测, 时刻保持警惕。病例集中在 9-10 月份, 与福州市的白纹伊蚊孳生状况随季节消长的高峰是相吻合的^[9], 清除白纹伊蚊孳生地控制登革热疫情有明显效果, 与之前的报道相符合。

与福州市 1999 年的登革热疫情相比较, 2004 年出现的 3 个疫点在地理位置上没有毗邻; 发病时间上台江区最早, 首发病例为在某农贸市场工作的女商贩, 在约一周的时间内连江县和闽侯县相继出现首例病例, 三地病例间无明显流行病学关联。福建省沿海是近年来外商投资的热点地区, 登革热主要流行地如中国广东、海南、台湾等省和东南亚等地区的人员来往频繁, 当地居民到亚太地区旅游者日渐增多, 近年来每年均有报道从东南亚输入登革热病例, 2004 年发现 9 例, 是较多的一个年份, 主要由菲律宾引入。流行病学调查连江县的指针病例在

发病的潜伏期内曾在台江区该农贸市场附近逗留过, 实验室的病毒分离结果也证实 3 个疫点流行的登革热都是由登革热病毒 1 型引起的, 不同于 1999 年由 2 型病毒引起的福州登革热局部暴发^[3], 提示本次流行不可能为上次流行后形成本土疫源地的结果; 其次, 序列比对结果表明与柬埔寨分离株高度同源, 且近年东南亚、中国台湾等地均主要流行登革热 1 型病毒, 因此, 推测最大可能传染源系从东南亚输入。

临床上登革热的症状表现没有特异性, 因此实验室诊断对于流行病学无关联、非疫区首发病例的确定至关重要, 而首发病例的确定对于疫点的确定又是十分重要。一般认为, 登革热显性感染病例多于亚临床或隐性感染病例, 基于这种认识, 我们在确定三个互不相关疫点时, 均采用了现场血清流行病学调查的方法, 在指针病例的周围均检出亚临床或隐性感染病例, 这对于确定疫点、尽快采取紧急措施控制本病的流行具有十分重要的意义。

对本次登革热疫情的流行病学及病原学特征分析, 提示今后福建省登革热流行的发生仍主要为输入性的。因此要加强登革热的常规哨点和出入境口岸监测, 特别是在蚊媒孳生的高峰期, 要加大对群众尤其是东南亚往返人群的重点宣传教育力度, 要让群众懂得登革热的防治基本知识和防治的重要性与必要性, 自觉投入到爱国卫生运动的潮流中去, 这对于福建省登革热的控制具有重要意义。

参考文献

- 1 Halsetead SB. Dengue haemorrhagi fever — a public health problem and a field for research. Bull WHO, 1999, 58: 1-22.
- 2 陈韵冬. 登革热在全球主要流行区的流行概况. 中华流行病学杂志, 1990, 11: 5.
- 3 李世清, 何似, 陈润, 等. 福建省首次从病人血清及蚊体分离出登革病毒的研究. 中国人兽共患病杂志, 2000, 16(1): 55.
- 4 徐宝海, 许龙善, 李世清, 等. 福州郊区登革热传播媒介的调查研究. 中国人兽共患病杂志, 2000, 16(6): 96-97.
- 5 Lanciotti RS, Caslisher CH, Gubler DJ, et al. Rapid detection and typing of Dengue viruses from clinical samples by using reverse transcription-polymerase chain reaction. J Clin Microbiol, 1992, 30: 545-551.
- 6 Duebel V, Kinney RM, Trent DM. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the structural proteins of Dengue type 2 virus: Jamaica genotype. J Virology, 1988, 155: 365-377.
- 7 彭文伟, 主编. 传染病学. 北京: 人民卫生出版社, 2001. 56-60.
- 8 郑能雄, 许龙善, 王宗汉, 等. 福州市仓山区登革热流行及防制效果的调查研究. 海峡预防医学杂志, 2000, 6(1): 4-6.
- 9 郑能雄, 王宗汉, 张晓阳, 等. 福州市白纹伊蚊的孳生状况季节消长及其影响因素. 海峡预防医学杂志, 2001, 7(6): 6-9.

(收稿日期: 2005-10-21)

(本文编辑: 尹廉)