

·论著·

浙江省衢州市 1 例输入性登革热病例分子流行病学研究

杨瑞军¹, 黄世腾¹, 王晓光², 吕磊¹, 曹国平¹, 万圣¹, 叶承华¹, 陈旭富¹

1 衢州市疾病预防控制中心, 浙江 衢州 324000; 2 丽水市疾病预防控制中心, 浙江 丽水 323000

摘要: 目的 调查浙江省衢州市 1 例登革热输入性病例流行病学特征及病原体分子溯源, 为登革热的防控提供依据。方法 对 2017 年输入性登革热病例进行流行病学调查, 采集病例血清进行登革热病毒核酸和抗体检测, 提取病毒核酸后扩增 E 基因并测序, 利用生物信息学软件进行多序列比对并构建进化树。结果 该病例登革热病毒核酸及 IgM 抗体检测结果均为阳性, 基因序列比对及进化分析, 病毒株为登革热病毒 1 型 I 亚型, 与东南亚病毒株(登录号 KY586429.1、KJ806941.2)亲缘关系最近, 核苷酸和氨基酸同源性分别为 99.1% 和 99.7%。结论 衢州市登革热病毒 1 型病例可能为来自东南亚的 1 例输入性病例。

关键词: 输入性病例; 登革热; 登革热病毒; E 基因; 序列分析; 生物信息学

中图分类号: R373.3⁺³ 文献标志码: A 文章编号: 1003-8280(2018)05-0445-04

DOI: 10.11853/j.issn.1003.8280.2018.05.006

Molecular epidemiological studies on an imported dengue fever case in Quzhou city, Zhejiang

YANG Rui-jun¹, HUANG Shi-teng¹, WANG Xiao-guang², LYU Lei¹, CAO Guo-ping¹,
WAN Sheng¹, YE Cheng-hua¹, CHEN Xu-fu¹

1 Quzhou Center for Disease Control and Prevention, Quzhou 324000, Zhejiang Province, China;

2 Lishui Center for Disease Control and Prevention

Abstract: Objective To understand the pathogen's epidemiological origination and molecular characteristics of the dengue fever case in Quzhou city, Zhejiang. **Methods** The epidemiological survey was conducted and the serum sample was collected from the imported dengue fever patient in 2017 to detect dengue virus nucleic acids and antibody. The envelope (E) gene of the virus was amplified and sequenced. The genotype of the isolate was analyzed with bioinformatics software. **Results** The serum sample of the patient was positive for dengue virus nucleic acid and anti-dengue IgM. The homologous and phylogenetic analysis showed that the isolate belonged to dengue virus type 1, and the sub genotype was GI. It had a closest phylogenetic relationship with the strain isolated from the case of Southeast Asia (accession number KY586429.1, KJ806941.2), sharing 99.1% and 99.7% homology in nucleotide sequence and amino acid sequence respectively, indicating that it might have originated from the Southeast Asia. **Conclusion** The imported dengue fever case in Quzhou city might be contracted from the Southeast Asia.

Key words: Imported case; Dengue fever; Dengue virus; Envelope gene; Sequence analysis; Bioinformatics

登革热(dengue fever)是由登革热病毒(Dengue virus, DENV)引起, 经伊蚊(*Aedes*)叮咬传播的一种以发热、皮疹和全身疼痛为主要症状的急性传染病, 是东南亚地区儿童死亡的主要原因之一^[1]。通常夏秋季节高发, 其潜伏期为 5~7 d, 具有传播迅猛、发病率高等特点。该病于 1779 年在埃及开罗、印度尼西亚雅加达及美国费城发现^[2], 主要在热带和亚热带地区流行^[3], 患者有可能出现极度疲倦及抑郁症

状, 少数病例恶化至登革出血热, 并进一步出血、休克, 甚至死亡, 登革热引起的并发症往往是患者致死的主因。20 世纪登革热在世界各地发生多次大流行, 病例达数百万, 与我国接壤的东南亚国家尤为严重^[4-5]。登革热在我国于 1978 年在广东省佛山市流行^[6], 并分离出 4 型 DENV。此后, 于 1979、1980 和 1985 年小流行中分离出 1、2、3 型 DENV^[7]。浙江省慈溪市于 2004 年^[8]、义乌市于 2009 年^[9]发生由输入

性病例引起的登革热疫情。衢州市于2017年发现1例登革热病例,提示衢州地区存在因登革热病例输入引起本地感染的风险。为查明病例可能的感染来源及分离株的生物学性状,我们对该病例进行了流行病学调查及病原学检测。

1 材料与方法

1.1 病例来源 病例临床资料来源于衢州市人民医院感染科,流行病学调查资料来源于衢州市CDC传染病防制科。

1.2 标本采集 在医院无菌采集患者血液标本5 ml,专车冷链送至衢州市CDC实验室,分离血清备用,多余的血清标本置-80 ℃低温保存。

1.3 抗体检测 应用胶体金免疫层析法对血清样本进行DENV IgM抗体检测,试剂购于澳大利亚Panbio有限公司,于有效期内使用,具体操作说明和结果判读按照试剂说明书进行。

1.4 病毒核酸检测 DENV核酸的提取按照MagMAX-96病毒核酸抽取试剂盒使用说明书操作,取样100 μl,最终洗脱至50 μl,作为模板。采用浙江省CDC微生物检验所下发的引物和探针,采用荧光定量RT-PCR方法进行DENV核酸检测,具体参照文献[10]。

1.5 E基因扩增 参考文献[11]设计引物,试剂采用宝生物工程(大连)有限公司One Step RNA PCR Kit (Code No: DRR024A),按试剂说明书进行。反应条件:42 ℃ 30 min反转录,94 ℃ 2 min后,94 ℃30 s,51 ℃ 30 s,72 ℃ 2 min,循环40次,72 ℃延伸8 min。取扩增产物5 μl,用1.5%琼脂糖凝胶电泳,根据Marker位置确认反应产物。

1.6 序列测定与分析 采用PCR扩增产物纯化后直接测序,由上海伯杰生物科技有限公司完成。数据处理采用Dnaman和ClustalX软件,进化树的构建采用MEGA 7.0软件(最大似然法)。

2 结果

2.1 病例基本情况 徐某,女,52岁,发病前在缅甸小勐拉镇制售烤饼,于2017年9月29日发病,在缅甸当地以感冒治疗,10月4日凌晨回衢州市,5日上午到衢江区人民医院就诊,后转至衢州市人民医院就诊,当日傍晚衢州市人民医院以“登革热疑似病例”收入分院进行隔离治疗,6日衢州市CDC实验室检测登革热病毒核酸阳性,DENV IgM抗体阳性,结合近期缅甸有登革热流行情况,确诊为登革热输入性病例。

2.2 流行病学处置 衢州市CDC对患者所在医院

立即进行防蚊隔离治疗;对患者开展流行病学调查,采集患者血液进行病原学检测;并对患者家中和曾逗留的兄弟、朋友家进行成蚊快速杀灭;同时对患者生活区域进行伊蚊幼虫应急监测,严格控制布雷图指数<5。

2.3 实验室检测结果

2.3.1 病例标本抗体及核酸检测 病例血清标本DENV IgM抗体检测结果为阳性;对病例标本血清核酸进行DENV型特异性荧光定量PCR测定,检测到1型DENV。

2.3.2 同源性分析 经DENV E基因序列测定,该病毒获得E基因序列全长为2 325个核苷酸,推导编码775个氨基酸,未发现有碱基缺失与插入;与从GenBank下载的基因序列进行比对,本例病毒株与54株DENV核苷酸和氨基酸的相似性分别为98.3%~99.1%和97.8%~99.7%,其中与东南亚病毒株(登录序列号KY586429.1、KJ806941.2)的亲缘关系最近,核苷酸和氨基酸同源性分别为99.1%和99.7%。

2.3.3 进化树构建 将病例标本E基因序列与从GenBank中下载的不同国家、不同年份、不同基因亚型的病毒株基因序列进行比对,构建进化树。该病毒株(DEVQuZhouCDC)位于DV-1分支上,而DV-1型又可分为G I~GV共5个亚型,该病毒株位于G I亚型上,与东南亚病毒株(登录序列号KJ806941.2)在同一亚型分支,见图1。

3 讨论

目前,对于我国是否为登革热自然疫源地的争议较大,尚无明确定论,较多学者认为我国登革热病例主要以输入性病例^[12~13]或以输入传播为主。因登革热传播方式为“伊蚊-人-伊蚊”,比较特殊,若当地有输入性病例,则疫情暴发流行的可能性较大,如2014年广东省大规模暴发疫情^[14~15]及浙江省2004年慈溪市^[8]、2009年义乌市^[9]疫情暴发。衢州市作为其相邻城市,有必要对本次分离的DENV进行基因测序及核苷酸和氨基酸同源性分析,为研究DENV的来源、流行、毒力变异及后期防控等提供科学依据。

目前,E基因区域作为DENV基因分型广为人们所接受。根据抗原性不同将DENV分为1~4血清型,根据E基因又可分为多种亚型,不同地域基本有不同的血清型和基因亚型^[11]。通过对病原体的测序、比对、基因进化树分析推断病原体的来源、发生、发展及传播为分子流行病学研究的主要方法^[16]。衢州市本例登革热病例为DENV1型G I亚型,与东南亚

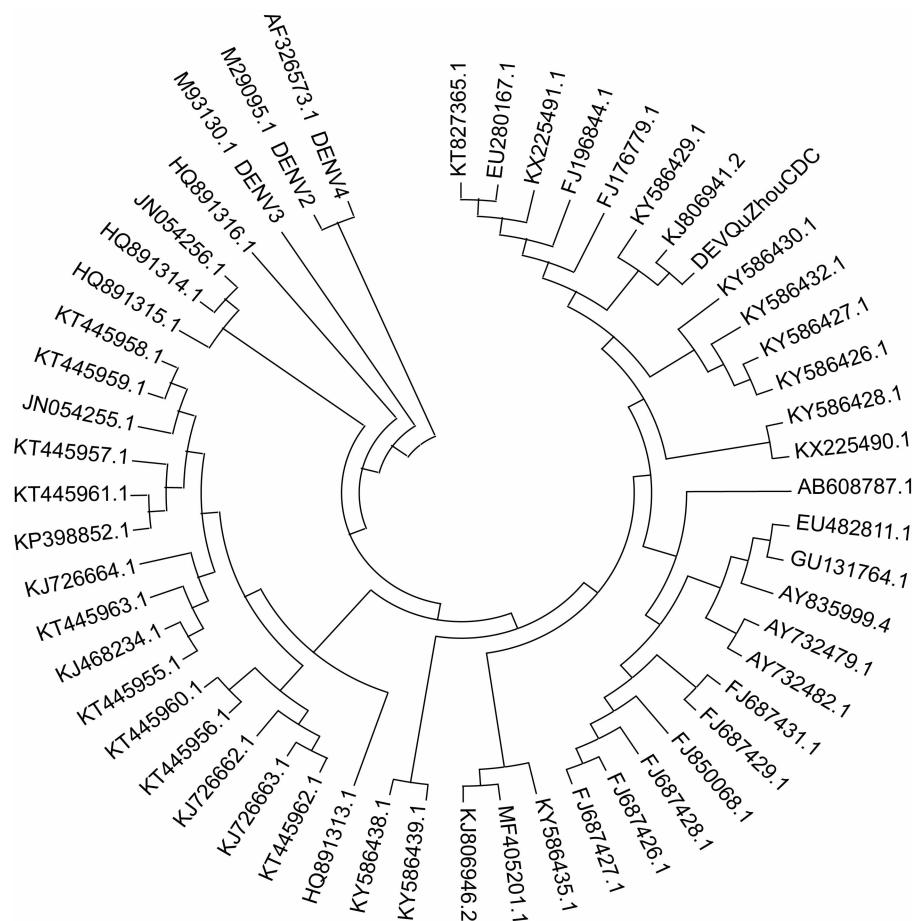


图1 衢州市1例输入性登革热病毒1型株E基因进化树

Figure 1 Phylogenetic tree of E gene of Dengue virus type 1 from imported dengue fever case in Quzhou city

病毒株(登录序列号KY586429.1、KJ806941.2)亲缘关系最近,核苷酸和氨基酸同源性为99.1%和99.7%,与流行病学调查来源完全吻合,进一步推断本例登革热为一起输入性病例,且最有可能来源于东南亚一带。

另外,登革热传播媒介主要是埃及伊蚊(*Ae. aegypti*)和白纹伊蚊(*Ae. albopictus*),浙江省仅有白纹伊蚊分布。病毒通过蚊虫叮咬传染给人类,蚊虫通常在吸食被感染的人血时获得病毒,被感染的蚊虫终生均可传播病毒,少数还可经卵将病毒传给后代。白纹伊蚊在衢州市分布较广泛,该地的自然环境和气候条件非常适宜该蚊的生长繁殖;近年来,本地气温受气候变暖影响,较2005—2015年偏高,11月蚊虫活动仍较频繁^[17],提示存在蚊虫孳生现象,一旦有登革热疫情输入,条件适宜可能引起登革热本地感染,继而暴发与流行。

随着经济的快速发展,国际商贸、劳务、旅游、探亲访友活动日渐频繁,尤其与登革热发病较多的东南亚地区交流增加,登革热病例输入的概率可能增加。因此,应密切注意境外疫情动态,加强对来自登革热疫区人员的观察,尽早发现病例并立即进行流

行病学应急处置及标本检测,做好蚊虫杀灭工作,防止疫情扩散蔓延。

参考文献

- Prommalikit O, Thisayakorn U. Dengue virus virulence and diseases severity[J]. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2015, 46 Suppl 1:S35–42.
- 刘志文,俞永新,贾丽丽,等.建国后首次登革热暴发分离的2株登革4型病毒prM和E基因序列测定及其系统发生分析[J].中国人兽共患病学报,2007,23(7):678–682,686. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2007.07.012.
- Guzman MG, Harris E. Dengue[J]. Lancet, 2015, 385 (9966) : 453–465. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)60572-9.
- Fahri S, Yohan B, Trimarsanto H, et al. Molecular surveillance of dengue in Semarang, Indonesia revealed the circulation of an old genotype of Dengue virus serotype-1 [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2013, 7(8):e2354. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002354.
- Thangarathnam PS, Rajendran R, Paramasivan R, et al. Clinical spectrum during dengue haemorrhagic fever epidemics in Tirupur (India)[J]. J Vector Borne Dis, 2013, 50(4):311–313.
- 马洪波,朱汉荣,孙虹,等.珠海登革病毒分离株的型别鉴定与序列分析研究[J].中国国境卫生检疫杂志,2006,29增刊: 51–54. DOI: 10.3969/j.issn.1004-9770.2006.z1.015.

(下转第487页)

- [5] 邓国藩,王敦清,顾以铭,等.中国经济昆虫志.第40册.蜱螨亚纲.皮刺螨总科[M].北京:科学出版社,1993:182-244.
- [6] Mašan P, Fenda P. A review of the laelapid mites associated with terrestrial mammals in Slovakia, with a key to the European species (Acari: Mesostigmata: Dermanyssoidae) [M]. Bratislava: NOI Press, 2010: 71-117.
- [7] 温廷桓.真厉螨亚科(新亚科)和真厉螨属三新种[J].昆虫学报,1976,19(3):348-356. DOI:10.16380/j.kxb.1976.03.013.
- [8] Ryszard H. Haemogamasidae oudemans, 1926 (Acari: Mesostigmata) of Poland [J]. Pol Pismo Entomol, 1988, 58: 635-661.
- [9] 周曼殊,顾以铭,温廷桓.中国血革螨科记述及一新属的建立(蜱螨亚纲:寄螨目)[J].动物分类学报,1995,20(2):172-175.
- [10] Vinarski MV, Korallo-Vinarskaya NP. An annotated catalogue of the gamasid mites associated with small mammals in Asiatic Russia. The family Haemogamasidae (Acari: Mesostigmata: Gamasina) [J]. Zootaxa, 2017, 4273(1): 1-18. DOI: 10.11646/zootaxa.4273.1.1.
- [11] Dowling APG, OConnor BM. Phylogeny of Dermanyssoidae (Acari: Parasitiformes) suggests multiple origins of parasitism [J]. Acarologia, 2010, 50 (1): 113-129. DOI: 10.1051/acarologia/20101957.
- [12] 田杰.血革螨科二新种(蜱螨亚纲)[J].动物分类学报,1990,15(4):453-456.
- [13] 刘井元,马立名.颤西北神农架真厉螨属一新种(蜱螨亚纲:血革螨科)[J].动物分类学报,1998,23(1):21-24. DOI: 10.3969/j.issn.1000-0739.1998.01.005.
- [14] 马英,杨锡正,唐新元.青海真厉螨属一新种(蜱螨亚纲,中气门目,厉螨科)[J].动物分类学报,2005,30(2):355-357.
- [15] Uchikawa K. Studies on mesostigmatid mites parasitic on mammals and birds in Japan. V. Mites of the genus *Eulaelaps* Berlese, 1903 (Haemogamasidae) [J]. Bull Natl Sci Mus Ser A (Zool), 1978, 4(1):11-26.
- [16] Uchikawa K, Rack G. *Eulaelaps stabularis* (Koch, 1839) and *Eulaelaps oudemansi* Turk, 1945 (Mesostigmata: Haemogamasidae) [J]. Acarologia, 1979, 20(2):163-172.
- [17] 王敦清,廖灏溶.蜱螨亚纲,中气门亚目,皮刺螨总科[M]/黄邦侃.福建昆虫志.第9卷.福州:福建科学技术出版社,2000:1-45.
- [18] 周淑娟,李述杨,陈文锦,等.福建省三都澳岛鼠体螨类调查[J].中国媒介生物学及控制杂志,2008,19(6):546-549. DOI:10.3969/j.issn.1003-4692.2008.06.017.
- [19] Turk FA. Studies of Acari. Second series: descriptions of new species and notes on established forms of parasitic mites [J]. Parasitology, 1945, 36(3/4): 133-141. DOI: 10.1017/S0031182000012099.
- [20] 马立名.革螨新同物异名(蜱螨亚纲:中气门亚目)[J].蛛形学报,2006,15(1):23-26. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9628.2006.01.004.

收稿日期:2018-05-20 (编辑:卢亮平)

(上接第447页)

- [7] 熊益权,陈清.1978—2014年我国登革热的流行病学分析[J].南方医科大学学报,2014,34(12):1822-1825. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4254.2014.12.24.
- [8] 严菊英,卢亦愚,翁景清,等.浙江省登革热暴发疫情的病原学和分子生物学研究[J].病毒学报,2006,22(5):339-344. DOI:10.3321/j.issn:1000-8721.2006.05.003.
- [9] 严菊英,张严峻,茅海燕,等.2009年浙江省义乌市登革热暴发疫情实验诊断和病原分子溯源[J].中华预防医学杂志,2010,44(12):1091-1096. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2010.12.007.
- [10] 中华人民共和国卫生部. WS 216—2008 登革热诊断标准 [S].北京:人民卫生出版社,2008.
- [11] 严菊英,周佳锐,楼秀玉,等.浙江省2013年输入性登革热病例病原分子溯源[J].中国媒介生物学及控制杂志,2015,26(1):23-27. DOI:10.11853/j.issn.1003.4692.2015.01.006.
- [12] 洪荣涛,蔡少健,陈彩粼,等.福建省2004—2007年突发公共卫生事件态势分析[J].中华流行病学杂志,2008,29(10):1013-1016. DOI:10.3321/j.issn:0254-6450.2008.10.014.
- [13] Li TG, Yang ZC, Luo L, et al. Dengue fever epidemiological status and relationship with meteorological variables in Guangzhou, Southern China, 2007-2012 [J]. Biomed Environ Sci, 2013, 26(12):994-997. DOI:10.3967/bes2013.036.
- [14] Huang L, Luo X, Shao J, et al. Epidemiology and characteristics of the dengue outbreak in Guangdong, Southern China, in 2014 [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2016, 35 (2): 269-277. DOI:10.1007/s10096-015-2540-5.
- [15] Zhao H, Zhao LZ, Jiang T, et al. Isolation and characterization of Dengue virus serotype 2 from the large dengue outbreak in Guangdong, China in 2014 [J]. Sci China Life Sci, 2014, 57 (12):1149-1155. DOI:10.1007/s11427-014-4782-3.
- [16] 杜燕华,张白帆,李懿,等.河南省登革热1型病毒的发现与全基因组序列分析[J].中华预防医学杂志,2015,49(10):892-895. DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2015.10.011.
- [17] 樊景春,刘起勇.气候变化对登革热传播媒介影响研究进展[J].中华流行病学杂志,2013,34(7):745-749. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2013.07.020.

收稿日期:2018-05-30 (编辑:陈秀丽)