

浙江省衢州市 2019 年本地登革热暴发疫情的分子流行病学研究

杨瑞军, 黄世腾, 吕磊, 曹国平, 游佳玲, 万圣

衢州市疾病预防控制中心微生物检验科/传染病防治科, 浙江 衢州 324000

摘要: **目的** 对 2019 年衢州市本地登革热暴发疫情中检出的登革病毒 1 型进行序列测定和分子特征分析。**方法** 采集患者血清标本, 采用胶体金免疫层析法和实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 方法分别检测登革病毒 NS1 抗原和病毒核酸; 采用 RT-qPCR 方法扩增登革病毒 E 基因后进行序列测定, 并与不同国家和地区的登革病毒株进行同源性和进化树分析。**结果** 从患者血清标本中检测到登革病毒 NS1 抗原和病毒核酸, 经基因序列比对及进化分析, 8 株登革病毒均为登革 1 型的基因 I 型, 与 JF960228 (2010 年新加坡分离株) 互为姐妹群, 且毒力位点 1 处发生变异。**结论** 从病原学、血清学和分子生物学证实该起暴发疫情是由登革 1 型病毒引起, 该毒株有可能来源于东南亚, 应加强中国与该地区登革热跨境传播的防控。

关键词: 本地病例; 登革热; 登革病毒; 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(2020)05-0521-05

DOI: 10.11853/j.issn.1003.8280.2020.05.004

Molecular epidemiological study of local dengue outbreak in Quzhou, Zhejiang province, China, 2019

YANG Rui-jun, HUANG Shi-teng, LYU Lei, CAO Guo-ping, YOU Jia-ling, WAN Sheng

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

Supported by the Scientific and Technological Guidance Project of Quzhou City (No.2019127)

Abstract: Objective To determine the nucleic acid sequence of the dengue type 1 virus (DENV-1) detected in the local dengue outbreak in Quzhou, Zhejiang province, China, 2019, and to analyze its molecular characteristics. **Methods** Serum samples were collected from dengue patients; colloidal gold immunochromatographic assay and quantitative real-time PCR (RT-qPCR) were used to detect the NS1 antigen and nucleic acid of dengue virus, respectively. The RT-qPCR assay was used to amplify the envelope gene of dengue virus, which was then sequenced. The genotype of the isolated strains was analyzed, and the homology and phylogenetic analyses were performed with the dengue strains isolated from other countries and regions. **Results** The serum samples of patients were positive for the NS1 antigen and nucleic acid of dengue virus. The gene sequence alignment and phylogenetic analysis showed that 8 dengue virus strains all belonged to DENV-1 subgenotype GI, which had the closest phylogenetic relationship with the strain JF960228 (Singapore, 2010), with a mutation at virulence locus 1. **Conclusion** It was confirmed by etiology, serology, and molecular biology that the local dengue outbreak was caused by DENV-1, which may originate from Southeast Asia. It is necessary to strengthen the prevention and control of cross-border spread of dengue fever in China and this region.

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

登革热是由登革病毒(Dengue virus)引起,经伊蚊叮咬而传播的一种以发热、皮疹和全身疼痛为主要症状的急性传染病^[1],广泛流行于全球热带及亚热带地区^[2-3],是东南亚地区儿童死亡的主要原因之一^[4]。在我国,登革热主要分布于广东、海南、广西、福建、台湾等南方及东南沿海各省(自治区)^[5-7],浙江省杭州市于 2017 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。素有“四省通衢,五路总头”之称的衢州市于 2017 年发现 1 例输入性病例^[10],并于 2019 年暴发了一起由本地病例引起的登革热疫情。为了对该起疫情病例及时做出实验室确诊,分析毒株的基因变异和种系进化特征,从分子水平追踪传染源,对采集的患者血清标本,进行了登革热血清学、病原学和分子生物学特征研究。

基金项目: 2019 年衢州市科技计划指导性项目(2019127)

作者简介: 杨瑞军,男,副主任技师,主要从事病原微生物学研究工作,Email: qzyangruijun@126.com

1 材料与方法

1.1 病例来源 2019 年 10 月 30 日晚,衢州市疾病预防控制中心(CDC)确诊 1 例本地登革热病例,调查人员立刻前往该病例所在村庄开展流行病学调查,10 月 31 日至 11 月 3 日经现场搜索后又发现 7 例确诊病例,累计报告 8 例登革热确诊病例,基本确认是一起登革热暴发疫情。

1.2 病例血清标本采集 经患者知情同意后无菌采集血液标本 5 ml,专车冷链送至衢州市 CDC 实验室,分离血清立即进行检测,多余的血清标本置于 -80 °C 低温保存。

1.3 抗原检测 应用胶体金方法对血清样本进行登革病毒 NS1 抗原检测,试剂购于澳大利亚 Panbio 有限公司,在有效期内使用,详细的操作说明及结果判定都严格按照试剂说明书进行。

1.4 病毒核酸检测 病毒核酸的提取严格按照 MagMAX-96 病毒核酸抽取试剂盒使用说明书进行,取样 200 μ l,最终洗脱至 80 μ l,作为模板。采用浙江省 CDC 微生物检验所下发的引物和探针,采用实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)方法进行登革病毒核酸检测,具体参照登革热诊断标准 WS216-2018 附录 A^[11]。

1.5 E 基因扩增 参考文献[12]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),严格按试剂说明书进行。反应条件:42 °C 30 min 反转录,94 °C 2 min 后,94 °C 30 s, 51 °C 30 s, 72 °C 2 min,循环 40 次;72 °C 延伸 8 min。取扩增产物 5 μ l,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。采用 MAFFT 7.0 软件对序列进行比对,核苷酸和氨基酸相似性分析采用 DNASTar 7.1 软件,进化树的构建采用 MEGA 7.0.14 软件最大似然法。

2 结果

2.1 基本情况 指示病例余某,10 月 25 日晚自觉畏寒、乏力,于 10 月 26 日上午到当地卫生室就诊(最高时体温 39.3 °C),给予输液治疗 2 d,未好转。10 月 29 日下午到衢州市人民医院呼吸内科就诊,检测白细胞计数 $1.8 \times 10^9/L$,血小板 $4.9 \times 10^9/L$,10 月 30 日病毒 NS1 抗原阳性,以疑似登革热收治到分院住院,当晚衢州市 CDC 检测登革病毒核酸阳性,血清型为 I 型。截止到 11 月 3 日,疫情得到有效控制,本起疫情实验室共确诊 8 例。

2.2 实验室结果

2.2.1 抗原、核酸检测 应用胶体金免疫层析法对 8 例病例血清标本进行登革病毒 NS1 抗原检测,结果均为阳性;同时对标本血清核酸进行登革病毒型特异性 RT-qPCR 法测定,检测为登革病毒 1 型。病例相关信息见表 1。

表 1 浙江省衢州市 8 例病例的相关信息

Table 1 Relevant information of eight patients in Quzhou city, Zhejiang province

病例	性别	年龄(岁)	发病时间(年-月-日)	采血时间(年-月-日)	实验室检测结果	
					NS1 抗原	核酸
病例 1	男	66	2019-10-25	2019-10-30	阳性	阳性
病例 2	女	56	2019-10-26	2019-10-31	阳性	阳性
病例 3	女	50	2019-10-27	2019-10-31	阳性	阳性
病例 4	女	71	2019-10-27	2019-10-31	阳性	阳性
病例 5	女	62	2019-10-27	2019-10-31	阳性	阳性
病例 6	男	67	2019-10-30	2019-10-31	阳性	阳性
病例 7	女	51	2019-10-29	2019-11-01	阳性	阳性
病例 8	女	34	2019-10-29	2019-11-02	阳性	阳性

2.2.2 E 基因进化分析 本次采用衢州市 8 株登革病毒 1 型的 E 基因核苷酸序列,与来自 GenBank 中不同国家和地区的 35 株不同基因型代表株相应区段核苷酸序列 MEGA 7.0.14 软件最大似然法构建系统进化树,如图 1 显示,8 株毒株均聚集在登革病毒基因 I 型进化支中,且与 JF960228(2010 年新加坡分离株)亲缘性最近。

2.2.3 核酸相似性分析 采用 DNASTar 7.1 软件中 MegAlign 对项目中的 20 条序列进行核苷酸和氨基酸相似性分析。表 2 显示,衢州地区 8 株登革病毒核苷酸和氨基酸同源性均为 100%,说明他们均为同一株病毒。衢州地区 8 株病毒与 JF960228(新加坡,2010)核苷酸相似性最高,为 99.1%,与 KR057906(中国广州,2014)核苷酸相似性最低,为 97.4%。衢州地区 8 株病毒与 KP055776(中国中山,2014)、KP723474(中国广州,2014)、KJ438294(中国广州,2013)、JF967923(泰国,2010)和 EF508203(中国广州,2006)氨基酸相似性最高,均为 100%,与 EF113153(中国广州,2006)氨基酸相似性最低,为 99.0%。

2.2.4 氨基酸位点分析 对 8 株登革病毒与 12 株同型参考株进行 E 蛋白氨基酸位点差异分析显示,仅在 E 基因的毒力位点区域发现了 1 处氨基酸变异,为 E 基因 I 区中的 V6I。II 和 III 区未发现氨基酸的变异。

3 讨论

根据本次疫情确诊的 8 例病例临床表现、流行

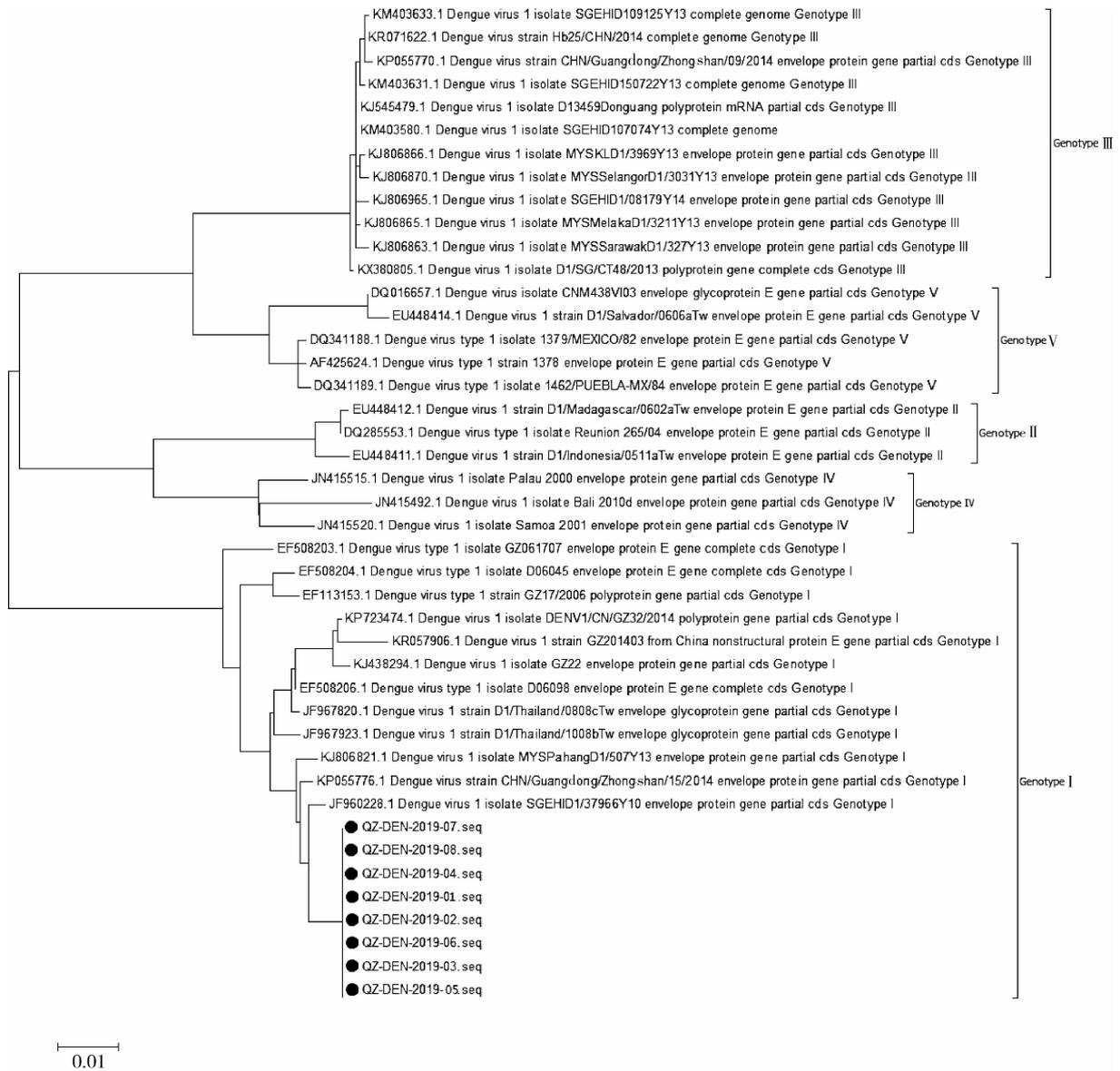


图1 2019年浙江省衢州市8株登革病毒与35株登革病毒1型参考株的E区核苷酸序列系统进化分析
 Figure 1 Phylogenetic analysis based on the envelope gene sequence of 8 dengue type 1 virus (DENV-1) strains isolated from Quzhou in 2019 and 35 DENV-1 strains from GenBank

病史和实验室诊断,判定其为一起本地登革热暴发疫情的可能性较大,传染来源不详。分析如下:①8例病例发病前1个月均未离开过衢州市,基本上在同一村庄活动,均属于本地病例;②该村庄户籍人口1700人,实际居住人口超过4000人,村中人员流动性大,出租户多,人员密集,难以确认具体的传染来源;③近期雨水偏多,高温、高湿,非常有利于白纹伊蚊(*Aedes albopictus*) (登革病毒的主要媒介)的生长繁殖;④截止到11月3日,衢州市2019年已报告约20例输入性登革热病例,较2018年上升600%,病例主要来自柬埔寨、越南、印度尼西亚等东南亚流行地区,分布于衢州市下辖的各县(市、区);⑤该村庄环境复杂,村中多处废弃房屋,垃圾乱堆,杂草丛生,蚊媒密度高;10月31日监测显示,布雷图指数仍高达

18,叮咬指数3只/(人·h),极有可能是村中流动人员感染登革病毒而未及时发现,导致村中出现暴发疫情。

目前,最广为接受的登革病毒基因分型使用的基因区域是E基因区域。根据病毒包膜蛋白E的抗原性不同,将登革病毒分为4个血清型(1~4型)。据报道,2007年在马来西亚沙捞越1名37岁的农民身体上又发现了5型登革病毒血清型(森林型)^[13],但其中尤以登革病毒1型流行较为广泛^[14]。将衢州市本起暴发疫情与来自GenBank中不同国家和地区的病毒代表株进行比较并构建系统进化树,发现8株毒株均聚集在登革病毒1型的Genotype I中,与JF960228互为姐妹群,且与JF960228核苷酸及氨基酸相似性较高;同时,对E蛋白氨基酸位点差异进行

表2 登革病毒1型分离株E基因的核苷酸和氨基酸相似性分析结果

毒株名称		Similarity analysis of nucleotide and amino acid sequences of the envelope gene of dengue type 1 virus strains																			
QZ-DEN-2019-01	QZ-DEN-2019-02	QZ-DEN-2019-03	QZ-DEN-2019-04	QZ-DEN-2019-05	QZ-DEN-2019-06	QZ-DEN-2019-07	QZ-DEN-2019-08	JF	KP	KJ	KP	KJ	KP	KJ	KJ	EF	JF	EF	EF	EF	KR
100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.6	100.0	99.8	100.0	100.0	100.0	100.0	438294	508206	967820	508204	113153	508203	057906
100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.6	100.0	99.8	100.0	100.0	100.0	100.0	438294	508206	967820	508204	113153	508203	057906
100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.6	100.0	99.8	100.0	100.0	100.0	100.0	438294	508206	967820	508204	113153	508203	057906
100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.6	100.0	99.8	100.0	100.0	100.0	100.0	438294	508206	967820	508204	113153	508203	057906
100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.6	100.0	99.8	100.0	100.0	100.0	100.0	438294	508206	967820	508204	113153	508203	057906
100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.6	100.0	99.8	100.0	100.0	100.0	100.0	438294	508206	967820	508204	113153	508203	057906
100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.6	100.0	99.8	100.0	100.0	100.0	100.0	438294	508206	967820	508204	113153	508203	057906
100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.6	100.0	99.8	100.0	100.0	100.0	100.0	438294	508206	967820	508204	113153	508203	057906
99.2	99.2	99.2	99.2	99.2	99.2	99.2	99.2	99.6	99.6	99.4	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.6	99.4	98.6	99.6	99.0
99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.4	99.4	99.8	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	99.0	99.0	99.4
98.9	98.9	98.9	98.9	98.9	98.9	98.9	98.9	99.2	99.4	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.8	99.6	99.6	98.8	99.8	99.2
98.0	98.0	98.0	98.0	98.0	98.0	98.0	98.0	98.0	98.2	98.1	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	99.8	99.8	99.0	100.0	99.4
97.8	97.8	97.8	97.8	97.8	97.8	97.8	97.8	98.0	98.2	98.1	99.6	98.1	99.6	98.1	99.6	100.0	99.8	99.8	99.0	100.0	99.4
98.5	98.5	98.5	98.5	98.5	98.5	98.5	98.5	98.7	98.9	98.9	99.3	99.1	99.3	99.1	99.3	100.0	99.8	99.8	99.0	100.0	99.4
98.4	98.4	98.4	98.4	98.4	98.4	98.4	98.4	98.7	98.9	98.8	99.1	98.9	99.1	98.9	98.9	99.8	99.8	99.6	98.8	99.8	99.2
98.4	98.4	98.4	98.4	98.4	98.4	98.4	98.4	98.7	98.9	98.9	98.7	98.7	98.7	98.9	98.7	99.3	99.2	99.8	99.0	100.0	99.4
97.6	97.6	97.6	97.6	97.6	97.6	97.6	97.6	97.9	98.1	98.0	97.6	97.6	97.6	98.1	97.6	98.4	98.3	98.2	99.2	99.8	99.2
97.4	97.4	97.4	97.4	97.4	97.4	97.4	97.4	97.7	97.9	97.8	97.4	97.4	97.4	97.4	97.4	98.2	98.1	98.1	99.3	99.0	98.4
97.3	97.3	97.3	97.3	97.3	97.3	97.3	97.3	97.6	97.8	97.7	97.8	97.7	97.8	97.8	97.8	98.2	98.1	98.0	98.0	98.0	99.4
97.4	97.4	97.4	97.4	97.4	97.4	97.4	97.4	97.6	97.8	97.8	99.5	99.2	98.9	98.7	98.2	97.2	97.0	97.4	97.4	97.4	97.4

注:上三角为氨基酸相似性分析;下三角为核苷酸相似性分析。

分析,发现在 E 基因的毒力位点区域有 1 处氨基酸变异,为 E I 区中的 V6I, II 和 III 区未发现氨基酸变异。本次衢州病毒株为登革病毒 1 型 G I 亚型,与新加坡 2010 年分离的病毒株(序列号 JF960228)亲缘关系最近,其同源也相对较高,据此推测病毒株来源于新加坡等东南亚国家的可能性较大。

衢州市位于浙江省西部,钱塘江上游,以山地丘陵地带为主,生态良好,森林覆盖率达 71.5%。近年来衢州市蚊媒监测发现,主要蚊种有淡色库蚊(*Culex pipiens pallens*)、致倦库蚊(*Cx. pipiens quinquefasciatus*)、骚扰阿蚊(*Armigeres subalbatus*)、中华按蚊(*Anopheles sinensis*)、三带喙库蚊(*Cx. tritaeniorhynchus*)和白纹伊蚊,这些蚊种的存在,提示衢州市存在登革热等蚊媒传染病的传播风险。同时,衢州市的气候条件以及人们的生活环境适宜蚊虫孳生,大大增加了人类同蚊媒的接触机会,也增加了登革热等蚊媒传染病的发病概率。

随着改革开放和招商引资的进一步发展,国际商贸、劳务、旅游活动、探亲访友等越来越频繁,尤其是与疫情流行国家及地区人员之间的往来,增加了登革病毒传播的潜在风险;该病病情一般轻微,但易误诊,诊治不及时,易引起扩散,导致暴发流行。因此要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采样检测,做好蚊虫杀灭工作,防止疫情扩散蔓延。

参考文献

- [1] 张拥军,吴生根,王金章,等.福建省 2015 年本地登革热病例的病原学特征[J]. 中国人兽共患病学报, 2019, 35(1): 28-33. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2018.00.210.
Zhang YJ, Wu SG, Wang JZ, et al. Etiological characterization of indigenous dengue cases in Fujian province, 2015 [J]. Chin J Zoonoses, 2019, 35(1): 28-33. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2018.00.210.
- [2] 范建华,冯云,朱进,等. 2017 年云南省西双版纳州登革 1 型病毒暴发疫情的调查研究[J]. 疾病监测, 2019, 34(5): 427-434. DOI: 10.3784/j.issn.1003-9961.2019.05.013.
Fan JH, Feng Y, Zhu J, et al. Investigation on an outbreak of dengue serotype 1 virus in Xishuangbanna prefecture of Yunnan province, China, 2017 [J]. Dis Surveill. DOI: 10.3784/j.issn.1003-9961.2019.05.013.
- [3] 薛志静,王君,宋秀平,等. 登革热病毒分子生物学特性及检测方法研究进展[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2019, 30(2): 224-227. DOI: 10.11853/j.issn.1003.8280.2019.02.027.
Xue ZJ, Wang J, Song XP, et al. Research progress in molecular biological characteristics and detection methods of dengue virus [J]. Chin J Vector Biol Control, 2019, 30(2): 224-227. DOI: 10.11853/j.issn.1003.8280.2019.02.027.
- [4] Prommalikit O, Thisyakorn U. Dengue virus virulence and diseases severity[J]. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 2015, 46 Suppl 1: S35-42.
- [5] WHO. Dengue and severe dengue[EB/OL]. (2015-05-01)[2015-08-24]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>.
- [6] Wu WL, Bai ZJ, Zhou HQ, et al. Molecular epidemiology of dengue viruses in southern China from 1978 to 2006[J]. Virol J, 2011, 8(1): 322. DOI: 10.1186/1743-422X-8-322.
- [7] 胡挺松,刘永华,张海林,等. 云南省瑞丽市 2016 年登革病毒包膜蛋白基因进化特征分析[J]. 病毒学报, 2017, 33(6): 854-860. DOI: 10.13242/j.cnki.bingduxuebao.003256.
Hu TS, Liu YH, Zhang HL, et al. Phylogenetic analyses of the envelope protein genome of four serotypes of the dengue virus in Ruili city of Yunnan province, China in 2016 [J]. Chin J Virol, 2017, 33(6): 854-860. DOI: 10.13242/j.cnki.bingduxuebao.003256.
- [8] 祝祥飞,袁寒艳,王芝敏,等. 2017 年浙江省杭州市拱墅区登革热暴发疫情调查分析[J]. 疾病监测, 2019, 34(5): 422-426. DOI: 10.3784/j.issn.1003-9961.2019.05.012.
Zhu FF, Yuan HY, Wang ZM, et al. Survey of an outbreak of dengue fever in Gongshu district of Hangzhou, 2017 [J]. Dis Surveill, 2019, 34(5): 422-426. DOI: 10.3784/j.issn.1003-9961.2019.05.012.
- [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.
Yan JY, Zhang YJ, Mao HY, et al. Diagnosis of a dengue fever outbreak in Yiwu city, Zhejiang province in 2009 and its molecular tracing of the pathogen[J]. Chin J Prevent Med, 2010, 44(12): 1091-1096. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2010.12.007.
- [10] 杨瑞军,黄世腾,王晓光,等. 浙江省衢州市 1 例输入性登革热病例分子流行病学研究[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2018, 29(5): 445-447, 487. DOI: 10.11853/j.issn.1003.8280.2018.05.006.
Yang RJ, Huang ST, Wang XG, et al. Molecular epidemiological studies on an imported dengue fever case in Quzhou city, Zhejiang [J]. Chin J Vector Biol Control, 2018, 29(5): 445-447, 487. DOI: 10.11853/j.issn.1003.8280.2018.05.006.
- [11] 国家卫生和计划生育委员会. WS 216-2018 登革热诊断[S]. 北京:中国标准出版社, 2018.
National Health and Family Planning Commission of People's Republic of China. WS 216-2018 Diagnosis for dengue fever [S]. Beijing: China Standard Press, 2018.
- [12] 严菊英,周佳悦,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.
Yan JY, Zhou JY, Lou XY, et al. Molecular tracing of pathogen from patients with imported dengue fever in Zhejiang province, China, 2013 [J]. Chin J Vector Biol Control, 2015, 26(1): 23-27. DOI: 10.11853/j.issn.1003.4692.2015.01.006.
- [13] Mustafa MS, Rasotgi V, Jain S, et al. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): a new public health dilemma in dengue control [J]. Med J Armed Forces India, 2015, 71(1): 67-70. DOI: 10.1016/j.mjafi.2014.09.011.
- [14] Villabona-Arenas CJ, De Andrade Zanotto PM. Worldwide spread of dengue virus type 1 [J]. PLoS One, 2013, 8(5): e62649. DOI: 10.1371/journal.pone.0062649.