

• 论 著 •

2014年肇庆市登革I型病毒流行株E基因序列分析

朱颖梅,谭海芳,苏乐斌,管大伟,谭翰清,程洁萍
(广东省肇庆市疾病预防控制中心 526060)

摘要:目的 了解肇庆市2014年登革热病I型病毒流行毒株E基因序列。**方法** 收集肇庆市2014年登革热患者病例资料及急性期血清,用C6/36细胞培养分离登革热病毒,阳性分离株采用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法扩增E基因,绘制系统发生树,进行生物信息学分析。**结果** 36份标本中20份病毒分离培养阳性,获得肇庆市2014年I型登革热病毒流行20株毒株的E基因序列,其同源性与中山市的2株流行毒株接近,但与广州市I型登革病毒流行株相差较远。**结论** 肇庆市登革热疫情同中山市登革热流行程度相关联且流行特点为输入性流行。

关键词:登革病毒; E基因; 序列分析; 系统进化树

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.03.031

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)03-0370-03

Analysis on gene E sequence of Dengue type I virus strains in Zhaoqing during 2014

ZHU Yingmei, TAN Haifang, SU Lebin, GUAN Dawei, TAN Hanqing, CHENG Jieping

(Zhaoqing Municipal Center for Disease Control and Prevention, Zhaoqing, Guangdong 526060, China)

Abstract: Objective To understand the gene E sequences of prevalent strains of Dengue fever type I virus in Zhaoqing City during 2014. **Methods** The medical record data and acute stage serum of the patients with Dengue fever in Zhaoqing City during 2014 were collected. Dengue virus was cultured and isolated by using the C6/36 cell culture. Gene E of positive strains was amplified with RT-PCR. The phylogenetic tree was drawn and the bioinformatics analysis was conducted. **Results** Of 36 samples, 20 samples were positive in viral isolation and culture. The gene E sequences of 20 strains of type I Dengue virus prevalence in Zhaoqing during 2014 were obtained; the homology of these sequences was close to that of the 2 prevalent strains found in Zhongshan City, but was distant from that found in Guangzhou City. **Conclusion** The epidemic situation of Dengue fever in Zhaoqing City is closely related to the prevalence situation of Zhongshan and is characterized by imported prevalence.

Key words: Dengue virus; gene E; sequence analysis; phylogenetic tree

登革热是由登革病毒引起,经伊蚊传播的一种急性传染病,属于黄病毒科,按照血清学的方法可分为登革热-1、2、3、4型,病毒基因组为单股正链RNA,由核蛋白所包被,外面由膜蛋白、外套膜蛋白两个表面蛋白及磷脂的外套膜蛋白包围而成。其潜伏期通常约5~7 d,具有传播迅猛、发病率高等特点,在亚、非、南美的热带地区发病率呈上升趋势。患者有可能出现极度疲倦及抑郁症状,少数病者会恶化至登革出血热,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要原因。2014年由于受广东省登革热疫情扩散影响,肇庆市也爆发了登革热疫情。本文利用2014年肇庆市登革热流行期间分离到的登革病毒毒株,针对其E基因序列进行生物信息学分析,以揭示肇庆市登革热的流行规律。

1 材料与方法

1.1 标本来源 随机收集2014年肇庆市登革热确诊患者病例急性期血清样品36份,送相关实验室进行检测。

1.2 核酸检测病毒核酸提取 采用德国QIAGEN公司的总RNA提取试剂盒,按试剂盒说明书进行。具体取血清标本200 μL或细胞阳性分离物100 μL,最终洗脱至60 μL,作为RNA模板。核酸检测采用DF通用和DF型特异性荧光反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法,引物序列和实验方法参照中华人民共和国卫生行业标准方法进行检测^[1]。

1.3 病毒分离 患者血清接种C6/36细胞,置28℃5%CO₂孵箱培养,当细胞出现肿胀、融合、空泡结构等细胞病变现象时为阳性表现即细胞病变(CPE),或细胞培养上清液经登革热特

异性荧光RT-PCR方法检测到病毒核酸者为阳性。

1.4 RT-PCR扩增E基因根据登革热I型病毒E基因序列设计1对引物,用于登革病毒的基因序列同源性比较引物序列为登革热-1引物自行设计,上引物:CAA GAA CCG AAA CRT GGA TGT C,下引物:GGC TGA TCG AAT TCC ACA CAC,扩增片段为1 849 bp碱基;试剂采用宝生物工程(大连)有限公司RNA PCR试剂盒(DRR024A),按试剂盒说明书进行。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,根据标志物位置确认反应产物。

1.5 序列测定和分析 采用PCR扩增产物纯化后上送广东省疾病预防控制中心测序完成。进化树、E基因核苷酸同源性差异和E基因氨基酸同源性差异比较均采用MEGA软件构建。

1.6 病毒E基因序列分析 从美国国立生物技术信息中心数据库上检索出7株不同地区的I型登革热病毒E基因序列见表1,与本实验测序结果用DNAstar软件进行序列分析,碱基局部对准检索工具基因库进行比较,多重序列比对进行序列排队,用邻接法绘制系统发生树。

2 结 果

2.1 肇庆市2014年登革病毒检测 36份样本用C6/36细胞分离培养,其中20份样本出现细胞病变,特征为细胞肿大、蚀斑、部分细胞坏死脱落。当CPE达到75%~100%时,收获未

出现细胞病变的样本继续盲传方式,对所有分离物上清液检测登革热核酸,阳性 20 份。36 份样本中分离到 20 株病毒,分离率为 55.6%。

2.2 不同地区登革病毒 E 基因序列分析 从 20 份样本分离株与选定 7 株 I 型登革病毒序列绘制系统发生树,见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。将它们转换成氨基酸序列,发现 20 株毒株与中山市分离的毒株 ZS-D1402、ZS-D1405 的核苷酸同源性和氨基酸序列同源性较接近,核苷酸与氨基酸序列同源性分别达 99.8%~90.6%、99.9%~98.0%,而与广州的分离毒株 JN029819.1 和 JN029824.1、JQ317775.1 反而较远。见表 2、3。

表 1 7 株不同地区 I 型登革热病毒

编号	毒株	分离地点
1	ZS-D1402	中山
2	ZS-D1405	中山
3	AB915373.1	印尼
4	KJ806954.1	新加坡
5	JN029819.1	广州
6	JN029824.1	广州
7	JQ317775.1	广州

表 2 2014 年肇庆市 I 型登革热分离毒株 E 基因核苷酸同源性差异比较(%)

毒株	ZS-D1402	ZS-D1405	AB915373.1	KJ806954.1	JN029819.1	JN029824.1	JQ317775.1
ZQ_D14583-2	99.90	87.00	97.80	99.90	60.60	78.10	33.30
ZQ_D14590	99.90	89.40	88.70	99.40	63.90	77.80	35.80
ZQ_D14597	88.70	100.00	94.90	84.40	89.90	51.50	24.70
ZQ_D14600	88.70	100.00	94.90	84.40	89.90	51.50	24.70
ZQ_D14602	100.00	88.70	98.50	99.70	63.80	76.20	31.80
ZQ_D14605	100.00	88.70	98.50	99.70	63.80	76.20	31.80
ZQ_D14610	88.70	100.00	94.90	84.40	89.90	51.50	24.70
ZQ_D14617	100.00	88.70	98.50	99.70	63.80	76.20	31.80
ZQ_D14618	88.00	98.40	93.70	83.90	93.40	40.30	3.20
ZQ_D14627-2	100.00	88.70	98.50	99.70	63.80	76.20	31.80
ZQ_D14629	88.10	97.70	93.50	84.10	93.30	38.70	100.00
ZQ_D14630-2	99.90	89.40	88.70	99.40	63.90	77.80	35.80
ZQ_D14632	99.40	92.80	99.50	98.20	72.50	69.70	26.60
ZQ_D14639	90.20	99.90	95.90	86.20	88.30	55.00	27.70
ZQ_D14640	100.00	88.70	98.50	99.70	63.80	76.20	31.80
ZQ_D14654	100.00	88.70	98.50	99.70	63.80	76.20	31.80
ZQ_D14660	88.70	100.00	94.90	84.40	89.90	51.50	24.70
ZQ_D14686	99.70	86.90	97.60	99.70	63.10	72.60	23.50
ZQ_D14687	88.00	96.90	93.20	84.20	93.00	37.00	100.00
ZQ_D14689	100.00	88.70	98.50	99.70	63.80	76.20	31.80

表 3 2014 年肇庆市 I 型登革热分离毒株 E 基因氨基酸同源性差异比较(%)

毒株	ZS-D1402	ZS-D1405	AB915373.1	KJ806954.1	JN029819.1	JN029824.1	JQ317775.1
ZQ_D14583-2	99.80	98.30	98.50	99.80	43.00	71.50	42.80
ZQ_D14590	99.80	98.50	99.00	99.60	48.00	74.40	45.90
ZQ_D14597	98.50	100.00	98.30	98.10	44.40	69.00	40.90
ZQ_D14600	98.50	100.00	98.30	98.10	44.40	69.00	40.90
ZQ_D14602	100.00	98.50	98.70	99.80	43.00	71.70	41.70
ZQ_D14605	100.00	98.50	98.70	99.80	43.00	71.70	41.70
ZQ_D14610	98.50	100.00	98.30	98.10	44.40	69.00	40.90
ZQ_D14617	100.00	98.50	98.70	99.80	43.00	71.70	41.70
ZQ_D14618	98.50	100.00	98.30	98.10	44.40	69.00	40.90
ZQ_D14627-2	100.00	98.50	98.70	99.80	43.00	71.70	41.70

续表3 2014年肇庆市I型登革热分离毒株E基因氨基酸同源性差异比较(%)

毒株	ZS-D1402	ZS-D1405	AB915373.1	KJ806954.1	JN029819.1	JN029824.1	JQ317775.1
ZQ_D14629	98.50	100.00	98.30	98.10	44.40	69.00	40.90
ZQ_D14630-2	99.80	98.50	99.00	99.60	48.00	74.40	45.90
ZQ_D14632	99.40	97.90	98.70	99.40	47.60	75.50	44.70
ZQ_D14639	98.10	99.80	98.30	97.70	46.60	71.10	43.20
ZQ_D14640	100.00	98.50	98.70	99.80	43.00	71.70	41.70
ZQ_D14654	100.00	98.50	98.70	99.80	43.00	71.70	41.70
ZQ_D14660	98.50	100.00	98.30	98.10	44.40	69.00	40.90
ZQ_D14686	100.00	98.50	98.70	99.80	43.00	71.70	41.70
ZQ_D14687	98.50	100.00	98.30	98.10	44.40	69.00	40.90
ZQ_D14689	100.00	98.50	98.70	99.80	43.00	71.70	41.70

3 讨论

近年来,登革热在全球的发病率增加了近30倍,我国究竟是否存在登革热的自然疫源地目前仍存在较大的争议,尚无明确的结论,多数学者都认为我国登革热流行特点为输入性流行^[2-3]。由于存在输入病例引起本地登革热暴发疫情的风险,如慈溪市登革热I型暴发疫情,导致113例发病,义乌市登革热3型暴发疫情,导致180例发病。由于登革热主要传播媒介之一的白蚊伊蚊在广东分布广泛,一旦有传染源输入,易引起局部暴发流行,广州市登革热疫情分别在2002、2006、2014年都曾暴发与流行^[4-9]。因此,疑似登革热病例早期实验室诊断,对于及时采取针对性防控措施非常重要,疑似病例应尽早采集样本,由于样本采集的时间不同,其抗体、核酸和病毒的检出率也不一样。本研究对36份样本采集于发病后1~7 d检测登革热IgM抗体,结果32份阳性,4份阴性,发病小于或等于5 d内采集的样品共28份,其中20份登革病毒阳性,分离阳性率为56%。有报道称发病时间大于或等于5 d采集的样本核酸和病毒检出率较低^[10]。因此,当临幊上对疑似登革热患者需实验室诊断时,应尽早进行样本采集,尤其是发病3 d内采集的样本当登革热IgM抗体阴性而临床症状典型又具有流行病学史时,需考虑做核酸检测,防止漏检,以便早期诊断。

本研究36份样本采自患者急性期,通过细胞分离培养,36份样本分离得到20份毒株。20份毒株构建系统进化树结果显示,编码495个氨基酸,未见序列插入或缺失。与7株不同地区的I型登革病毒E基因序列比较发现,20株阳性分离毒株与中山市2株分离毒株接近,核苷酸与氨基酸序列同源性分别达90.6%、98.0%。因此,当临幊发现疑似登革热患者时,应采集标本进行实验检查,尤其是急性期患者。采集样本须考虑发病时间的不同选择合适的检测项目,如登革热病毒IgM,核酸检测等,以防漏检,做到早发现、早治疗。

肇庆市地处亚热带,气候条件适合登革热传播媒介白蚊伊蚊的生长,客观上利于登革热疫情的发生,并且随着广东省泛珠三角经济一体化发展,肇庆对外交往频繁,本地人群又普遍易感,使得肇庆市2014年登革热流行呈爆发、输入性流行的特征,目前对于登革热的治疗主要采用对症治疗和中西医结合治疗,有学者认为早期抗登革热病毒治疗可能有益^[11]。而中医上常采用银翘散、清瘟败毒饮、清气凉营汤等,也取得较好的疗效^[12]。预防对控制登革热十分重要,市民应积极参与灭蚊防蚊及消除蚊虫滋生地,行政部门应加强干预及监督,而医务人员应提高登革热诊断的警惕性,才能做到有效预防疫情

的发生。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部. WS216-2008 登革热诊断标准 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [2] 梁伟波, 谢文源, 刘云涛, 等. 2013年广州地区257例登革热病例临床分析[J]. 中国中医急症, 2014, 23(9): 1659-1661.
- [3] 姜舒, 柯昌文. 全球登革热流行现状分析[J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2011, 38(3): 194-197.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 周端华, 王鸣, 邱季春, 等. 广州市2002年登革热爆发疫情流行病学特征分析[J]. 热带医学杂志, 2004, 4(5): 559-562.
- [7] 何丽娟, 吴新伟, 高阳, 等. 2002年广州市暴发的登革热流行特点分析[J]. 疾病监测, 2004, 19(3): 90-93.
- [8] 罗雷, 杨智聪, 王玉林, 等. 广州市2006年登革热疫性流行病学特征分析[J]. 华南预防医学, 2007, 33(5): 11-14.
- [9] 邓勤勤, 刘琦. 2014年广州登革热患者流行病学及实验室特征分析[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(1): 121-123.
- [10] 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学分子溯源[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2015, 26(1): 23-27.
- [11] 丁雨声, 毛家荣, 蒋丽梅, 等. 登革热47例临床治疗分析及策略探讨[J]. 中国实用内科杂志, 2010, 30(7): 654-656.
- [12] 韩凡, 罗翌. 当代名老中医治疗登革热的辩证治疗经验挖掘[J]. 中国中医急症, 2012, 21(7): 1066-1067.

(收稿日期:2016-08-05 修回日期:2016-10-25)

