

江苏省输入性登革热 1 例病毒分离鉴定及分子特征分析

王慎骄,朱小娟,付建光,单 军,秦圆方,李志峰,王笑辰,汤奋扬,朱叶飞,鲍昌俊,祁 贤*

(江苏省疾病预防控制中心急性传染病防制所,江苏 南京 210009)

[摘要] **目的:**从江苏省 2012 年 4 月 1 例菲律宾输入的疑似登革热患者急性期血清中分离病毒并分析其分子生物学特征,以找出病原学证据。**方法:**收集患者血清样本,采用胶体金法检测登革病毒的 IgM、IgG 抗体;用 C6/36 细胞分离病毒,对细胞病变的标本进行 RT-PCR 及荧光定量 PCR 检测登革病毒 RNA 和鉴定型别;采用高通量测序技术对该分离株进行编码区基因测序,用 MEGA6.0 软件对其进行序列比对和进化分析。**结果:**从患者血清样本中检测到登革病毒的 IgM 抗体,分离到的毒株经鉴定为登革病毒 1 型,与美国 Haw03663 毒株的核苷酸同源性>98%。**结论:**该病例是由登革病毒 1 型引起的输入性病例。

[关键词] 登革热;登革病毒 1 型;输入病例;序列分析

[中图分类号] R181.2*6

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)09-1324-05

doi:10.7655/NYDXBNS20150932

Identification and molecular characteristics analysis of dengue virus isolated from an imported dengue fever case in Jiangsu province

Wang Shenjiao, Zhu Xiaojuan, Fu Jianguang, Shan Jun, Qing Yuanfang, Li Zhifeng, Wang Xiaochen, Tang Fenyang, Zhu Yefei, Bao Changjun, Qi Xian*

(Department of Acute Infectious Disease Control and Prevention, Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective:**To identify the virus strain isolated from a suspected dengue case imported to Jiangsu province from Philippines in April 2012 and analyze its molecular characteristics. **Methods:**The serum sample collected from the patient was detected for IgM and IgG by colloidal gold method. The sample was further inoculated in C6/36 cells for virus isolation. Dengue nucleic acid was detected in the isolates via a stable cytopathic effect on C6/36 cells according to reverse translation-PCR and real-time PCR. Genome sequence information from the isolated strain was obtained by next-generation high-throughput sequencing. Nucleotide alignment and phylogenetic tree construction were conducted by MEGA6.0 software. **Results:**IgM and RNA of type 1 dengue virus were detected in the serum sample. The nucleotide homology with dengue virus 1 isolated from American Haw 03663 was more than 98%. **Conclusion:**The imported case of fever was caused by the dengue virus type 1.

[Key words] dengue fever; dengue virus type 1; imported case; sequence analysis

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(09): 1324-1328]

登革热(dengue fever, DF)是由登革病毒(dengue virus, DV)引起、经伊蚊传播的急性传染病,广泛流行于热带、亚热带的非洲、美洲、东南亚、西太平洋区和欧洲的 100 多个国家和地区^[1-3],菲律宾等东南亚国家和非洲国家是 DF 等虫媒传染病的高发区,常年均有病例发生。根据抗原性及遗

传特性差异, DV 分为 1~4 型,不同的型别具有地理分布上的差异。随着人口流动频繁和经济、贸易、国际旅游的迅猛发展, DV 型别的地域性分布被破坏, DF 的流行区域不断扩大,发病人数不断增加,已成为全球性的严重公共卫生问题。近年来,江苏省输入性病例常有发生。本研究在对 2012 年 4 月从菲律宾输入的 1 例 DF 患者的血清学检查、病毒分离的基础上,测定分离毒株的编码区基因组序列,并分析其分子生物学特征,追踪其来源。

[基金项目] “十二五”科教兴卫工程(ZX201109);江苏省医学重点人才基金(RC2011084)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: qix@jscdc.cn

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病例及标本来源

患者,男,23岁,南京市玄武区人。2012年4月18日去菲律宾旅游,回国后出现不适,4月21日发病,4月24日于南京市第二医院就诊。血清标本由医院送检。

1.1.2 细胞

C6/36 细胞株由军事医学科学院微生物流行病学研究所媒介生物学与防治研究室惠赠,本研究室液氮保存,复苏待用。

1.1.3 引物及探针设计

根据我国 DF 诊断标准 WS 216-2008^[4]分别合成检测 DV 4 种血清型通用引物(D1、D2)和分型特异引物(分别为 TS1、TS2、TS3、TS4),以及分型特异性荧光 RT-PCR 检测 DV1、2 型特异性引物(D1/D2-FP、D1/D2-RP)和探针 D1/D2-probe,引物序列见文献^[4]。引物和探针均由上海生物技术工程有限公司合成。

1.1.4 主要试剂

RPIM-1640 培养基、及胎牛血清 (FBS)(Gibco 公司,美国);QIAamp Viral RNA Mini Accessory Set 试剂盒、OneStep RT-PCR Kit (Qiagen 公司,美国);TaKaRa Tap、dNTP Mixture、PCR Buffer 及 DL-2000 DNA Marker(TaKaRa 公司,日本);Dengue Duo Cassette(Panbio 公司,美国);登革热病毒 1 型核酸测定试剂盒(上海之江公司)。High Pure PCR Product Purification Kit(Roche 公司,美国),Qubit® dsDNA HS Assay Kit(Invitrogen 公司,美国),High Sensitivity DNA assay kit(Agilent Technologies 公司,美国),Nextera XT DNA Sample Preparation Kit 及 Illumina MiSeq 测序系统(Illumina 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 病毒血清学检测

采用 DF 抗体快速检测试剂盒(胶体金法)检测患者血清中 DV 的 IgM 及 IgG 抗体,实验方法按试剂 Dengue Duo Cassette 使用说明书进行。

1.2.2 病毒分离

采用 C6/36 细胞分离患者早期血清样本中 DV,按常规方法进行^[4]。

1.2.3 病毒型别鉴定

用 QIAamp Viral RNA Mini Accessory Set 试剂盒,按照说明书操作,取血清标本和病毒分离阳性

物各 200 μ L 提取病毒 RNA,最终收集 RNA 提取液各 60 μ L。

DV 通用引物对上述样本核酸进行 RT-PCR 扩增,采用 25 μ L 体系:5 \times Qiagen OneStep RT-PCR Buffer 5 μ L,5 \times Q-Solution 5 μ L,dNTP Mix 1 μ L,引物 D1、D2 各 0.5 μ L,Rnase-free 水 7 μ L,Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix 1 μ L,DV RNA 提取液 5 μ L。反应条件:50 $^{\circ}$ C 30 min 逆转录;95 $^{\circ}$ C 15 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 40 s,循环 35 次;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 恒温。扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分离。

DV 型特异性引物的多重 PCR 扩增,以上述 PCR 产物作为模板,用 D1、TS1、TS2、TS3、TS4 引物进行多重 PCR 扩增目的基因,反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 40 s,循环 35 次;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 恒温。扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分离。

1.2.4 DV 型特异性荧光定量 PCR 方法进行型别鉴定

对 DV1 型特异性引物扩增出阳性条带的标本,进行型特异性荧光定量 PCR。DV1 型核酸测定试剂盒对上述样本进行 RT-PCR 扩增,采用 25 μ L 体系:DV1 型核酸荧光 PCR 混合液 18 μ L,RT-PCR 酶 1 μ L,内对照 1 μ L,登革病毒 RNA 提取液 5 μ L。反应条件:45 $^{\circ}$ C 10 min;95 $^{\circ}$ C 15 min;95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 60 s,循环 40 次,单点荧光检测在 60 $^{\circ}$ C。荧光通道检测选择:选用 FAM 和 HEX(或 VIC/JOE)通道。

1.2.5 DV 基因组编码区序列测定

采用该分离株的样本 cDNA 制备测序模板,按照 Nextera XT DNA Sample Preparation Kit 说明构建测序文库。在二代测序平台进行测序反应(MiSeq platform,Illumina 公司,美国),主要步骤包括 DNA 的 Tagmentation、PCR 扩增、纯化、文库标化及混合。取 800 μ L 混合样加入 MiSeq 测序试剂样品孔进行基因序列测定。

1.2.6 BLAST 分析、多序列比对、进化树构建分析

采用 CLC Genomics workbench (CLC Bio)对测序结果进行拼接整理,从 Genbank 上选取 DV1 型毒株序列,用 MEGA6.0 软件进行多序列比对,然后采用邻近归并法(Neighbor-Joining)法,构建系统发生树,用 Bootstrap 重复抽样 1 000 次,对进化树进行验证。

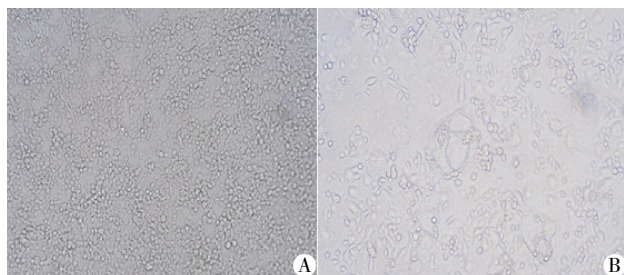
2 结果

2.1 血清学检测

患者血清登革热胶体金检测结果显示 DV 特异性抗体 IgM 阳性。

2.2 病毒分离

从患者的血清标本中分离到 1 株病毒,命名为 Su1,病毒株能致 C6/36 细胞病变,特征是形成大的融合细胞,病变细胞脱落,细胞集聚,细胞融合后形成大空泡(图 1)。

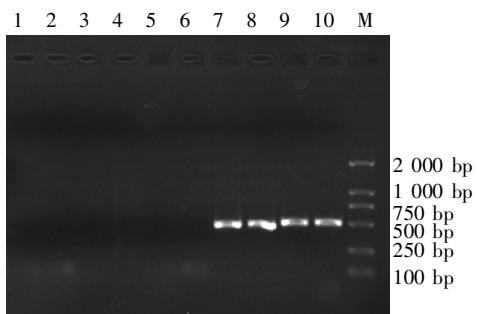


A: 正常 C6/36 细胞; B: C6/36 病变细胞。

图 1 DV 患者血清标本接种 C6/36 细胞后出现的细胞病变
Figure 1 Cytopathic effect of C6/36 cell by inoculating with the serum samples

2.3 RT-PCR 检测

对出现细胞病变的 C6/36 细胞分离物提取病毒 RNA 后,RT-PCR 扩增,产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,均出现大小为 511 bp 的阳性条带,用 DV 分型引物多重 PCR 扩增出 482 bp 的条带(图 2)。该条带的分子量与 DV1 型的预期片段大小相同,未见有其他型特异性产物,说明新分离的 Su1 病毒株为 DV1 型。



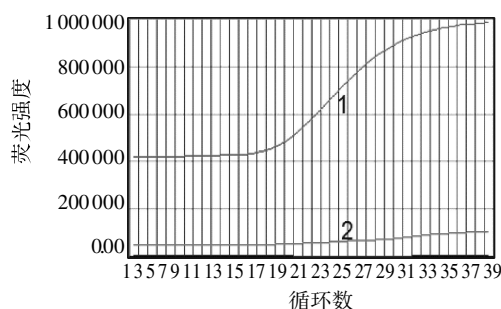
M: DL2000; 1、2: DV4 型引物扩增产物; 3、4: DV3 型引物扩增产物; 5、6: DV2 型引物扩增产物; 7、8: DV1 型引物扩增产物; 9、10: DV 病毒通用引物扩增产物。

图 2 RT-PCR 扩增结果

Figure 2 RT-PCR analysis

2.4 荧光定量 RT-PCR 检测结果

对 C6/36 细胞阳性分离物提取病毒 RNA 后采用 DV 荧光定量 PCR 方法鉴定。结果显示 DV1 型出现明显的 S 型曲线峰图,阴性对照均没有出峰(图 3)。实验进一步证实本次分离的 Su1 病毒株为 DV1 型。



1: DV1 型病毒; 2: 阴性对照 DV2 型病毒。

图 3 荧光定量 RT-PCR 扩增曲线

Figure 3 Amplification curve of real-time RT-PCR

2.5 DV 基因组序列测定结果及序列进化分析

通过高通量测序结果表明, Su1 病毒株的编码区基因序列大小为 10 689 bp, 含有 1 个开放读码框, 位于第 95~10 273 位, 编码 3 393 个氨基酸。将已测定的序列提交至 NCBI, 登录号为 KJ933413。将该新分离病毒的全基因组序列与 GenBank 收录的国内外不同时期的地方流行株的编码区序列(表 1) 进行同源性进行比较, 结果显示该 Su1 株与美国分离株 HawO3663 的核苷酸同源性最高, 其核苷酸一致性为 98.3%。与 2002 年广州输入性 DF 患者分离的 DV1 型病毒毒株 (71/02GZ) 核苷酸一致性为 94.6%。而与中国境内流行株(广东、福建)的核苷酸同源性仅为 25.5%~27.3%。

用 Su1 病毒株编码序列与来自不同国家和地区的 DV1 型病毒株采用邻位相连法构建进化树(图 4)。从图中可以看出, 在进化树的同一分支上, Su1 病毒株与美国分离株 HawO3663 的亲缘关系最近, 其次与太平洋中西部的密克罗尼亚西群岛瑙鲁分离株 (45AZ5-PDK27) 的亲缘关系较近。相比之下, 与中国广东、福建等流行株处于不同的进化分支上, 表明遗传关系较远。

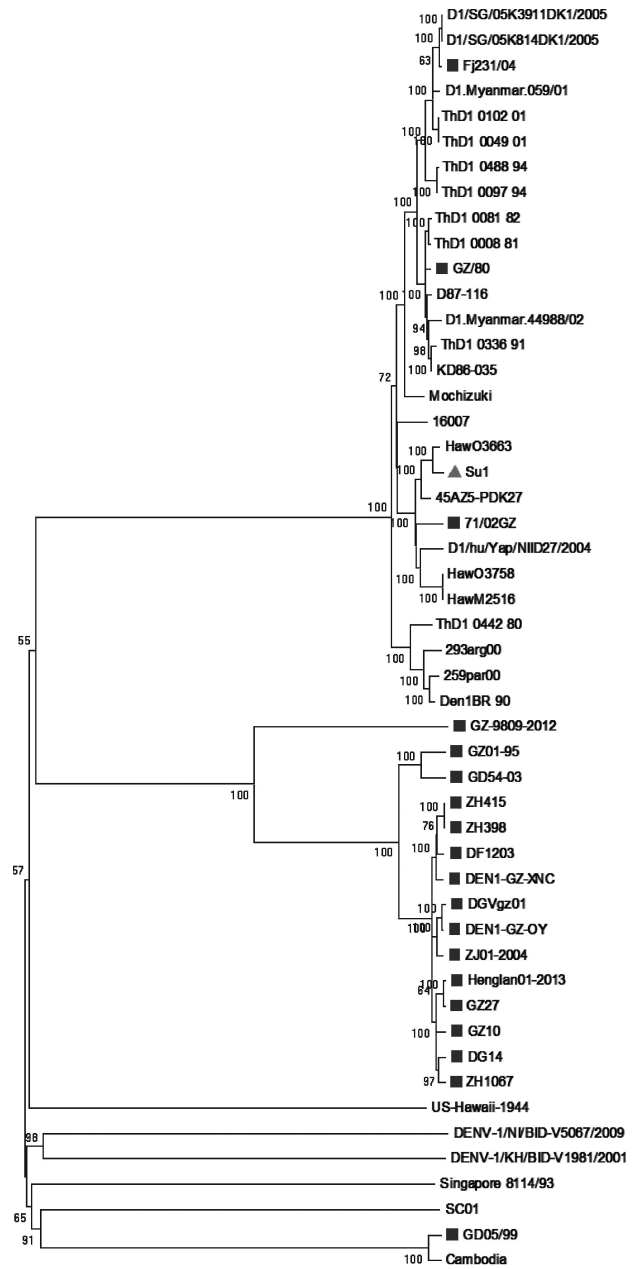
3 讨论

近年来, 全球 DF 发病率不断增长, 随着国际旅游业的发展, 人员往来频繁, 发生输入性传播的机会也显著增多^[5]。DF 流行呈地方性、季节性、突然性^[6]。由于我国许多地区存在着适宜 DV 生存和传播的条件, 因此使 DF 由一种输入性传染病转变为地方性传染病成为可能。在我国, DF 流行的地区主要是广东、海南和广西。非地方性流行的地区从东南亚、大洋洲、非洲等地回国的输入性病例常有报道^[7-10]。一旦有 DF 病例输入, 就有可能引起 DF 局部暴发或流行, 2004 年 8~10 月在江苏泰州兴化市从新加坡输

表 1 用于序列分析的病毒株

Table 1 Dengue virus isolates used for sequence analysis

毒株	年份	分离地点	GenBank 登录号
HawO3663	2001	美国	DQ672564
HawO3758	2001	美国	DQ672563
HawM2516	2001	美国	DQ672560
71/02GZ	2002	广东	EF025110
Cambodia	2001	柬埔寨	AF309641
Fj231/04	2004	福建	DQ193572
GZ01/95	1995	广东	EF032590
Den1BR/90	1990	巴西	AF226685
DENV-1/KH/BID-V1981/2001	2001	美国	FJ639671
ThD1_0442_80	1980	泰国	AY732476
D1/SG/05K814DK1/2005	2005	新加坡	EU081226
D1/SG/05K3911DK1/2005	2005	新加坡	EU081247
ThD1_0049_01	2001	泰国	AY732482
ThD1_0102_01	2001	泰国	AY732479
ThD1_0336_91	1991	泰国	AY732477
ThD1_0488_94	1994	泰国	AY732475
ThD1_0097_94	1994	泰国	AY732480
D87-116	1987	泰国	JN638341
KD86-035	1986	泰国	JN638336
ThD1_0081_82	1982	泰国	AY732481
US/Hawaii/1944	1944	新加坡	EU848545
293arg00	2000	阿根廷	AY206457
D1.Myanmar.059/01	2001	缅甸	AY708047
ThD1_0008_81	1981	泰国	AY732483
Mochizuki	2001	日本	AB074760
16007	2000	美国	AF180817
GD05/99	1999	广东	AY376738
45AZ5-PDK27	1997	美国	DVU88537
SC01	2004	印度尼西亚: 雅加达	AY858983
259par00	2000	阿根廷	AF514883
DENV-1/NL/BID-V5067/2009	2009	尼加拉瓜	JF937644
D1/hu/Yap/NIID27/2004	2004	日本	AB204803
D1.Myanmar.44988/02	2002	缅甸	AY726552
GZ/80	1980	广东	AF350498
Singapore 8114/93	1993	新加坡	AY762084



▲:本研究分离株 DV1 型(Su1);■:中国国内流行株。

图 4 DV1 型病毒全序列系统发生树

Figure 4 Phylogenetic tree analysis of genetic nucleotide sequence of dengue virus 1

入病例引起本省 DV1 型的局部流行就是很好的例证^[8]。因此,加强对输入性病例的监测和报告具有重要意义。

自江苏省开展 DF 监测工作以来,针对 DF 的监测报告病例均为输入性病例^[7]。为防止 DF 输入并引起本地流行,本研究通过血清学和病原学检测,证实 2012 年 4 月从菲律宾旅游回国的输入性 DF 病例属于 DV1 型。通过对已测定的核苷酸序列同源性比较,结果显示本研究分离的病毒株与美国分离

株 HawO3663 的核苷酸同源性最高,达 98.3%;而与中国分离株同源性达到最高的是 2002 年广州分离的 DV1 型病毒毒株 (71/02GZ),核苷酸一致性为 94.6%。通过进化树分析显示,该分离株与 2001 年美国分离株 HawO3663 亲缘关系最近,处于进化树的同一分支上。而在中国境内的流行株中仅广州分离株 71/02GZ 与本研究分离株在同一分支上。文金生等^[11]推测 71/02GZ 分离株是 1 株输入性病毒株,可能由印度尼西亚输入。因此,通过核苷酸同源性

比较和进化分析,该分离株与中国境内的其他流行株(如福建、广东分离株)同源性较低、遗传关系较远,进一步证明本研究的病毒不是来源于国内。该病毒最有可能与美国分离株 HawO3663 起源相似。由于 2001 年美国分离株 HawO3663 在夏威夷引起 DF 流行^[12],推测从菲律宾返回江苏的 DF 患者感染的毒株最有可能来源于美国夏威夷一带,属于输入性感染。

多项研究表明,与 DF 输入有关的危险因素有年龄、旅行时间长短、旅行目的地、旅行的季节等^[13-15]。因此,应密切注意境外的疫情动态,查找传染来源和可能的暴露因素,为明确诊断疫情提供充分依据。同时应加强来自 DF 流行区人员的观察,发现病例及时报告,并进行流行病学调查,采取控制措施,防止疫情扩散。本研究结果提示,江苏省仍需继续加强对输入的发热病例进行严密监测和管理,以防止因境外输入病例引起 DF 暴发流行。

[参考文献]

- [1] 卫生部疾病预防控制局. 登革热防治手册[M]. 2 版. 北京:北京人民卫生出版社,2008:1
- [2] Huang JH, Su CL, Yang CF, et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of dengue viruses imported into Taiwan during 2008-2010[J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2012, 87(2):349-358
- [3] Ernst T, McCarthy S, Chidlow G, et al. Emergence of a new lineage of dengue virus type 2 identified in travelers entering Western Australia from Indonesia, 2010-2012[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2015, 9(1):e0003442
- [4] 中华人民共和国卫生部. 中华人民共和国卫生行业标准. 登革热诊断标准 WS216-2008S[S]. 北京:人民卫生出版社,2008:2
- [5] 王夏, 罗同勇, 周旺, 等. 武汉地区首次发生输入性登革热疫情的调查[J]. *中华流行病学杂志*, 2004, 25(10):1897
- [6] 侯旭宏, 姜庆五, 王建华, 等. 登革热的流行特征及防治措施[J]. *上海预防医学杂志*, 2005, 17(8):379-380
- [7] 彭维斌, 杨开玺, 徐文斌. 一起由输入病例引起登革热暴发的流行病学调查[J]. *现代预防医学*, 2007, 34(14):2752-2753
- [8] 郭晓芳, 李鸿斌, 卢云兰, 等. 云南省输入性登革热病例登革病毒 1 型的分离研究[J]. *中国病原生物学杂志*, 2012, 7(4):241-243
- [9] 谢淑云, 王臻, 杨仕贵, 等. 浙江省一起输入性登革热暴发的流行病学调查分析[J]. *疾病监测*, 2005, 20(7):353-355
- [10] 阳帆, 张仁利, 吴春利, 等. 深圳市一起输入性登革热疫情的分子流行病学研究[J]. *中国人兽共患病学报*, 2012, 28(9):942-946
- [11] 文金生, 江丽芳, 晏辉钧. 广州市登革 1 型病毒基因组测序及系统进化分析[J]. *温州医学院学报*, 2009, 39(6):546-550
- [12] Imrie A, Roche C, Zhao Z, et al. Homology of complete genome sequences for dengue virus type-1, from dengue-fever and dengue-haemorrhagic-fever-associated epidemics in Hawaii and French Polynesia[J]. *Ann Trop Med Parasitol*, 2010, 104(3):225-235
- [13] Lindback H, Lindback J, Tegnell A, et al. Dengue fever in travelers to the tropics, 1998 and 1999[J]. *Emerg Infect Dis*, 2003, 9(4):438-442
- [14] Schwartz E, Mendelson E, Sidi Y. Dengue fever among travelers[J]. *Am J Med*, 1996, 101(5):516-520
- [15] Ratnam I, Leder K, Black J, et al. Dengue fever and international travel[J]. *J Travel Med*, 2013, 20(6):384-393

[收稿日期] 2015-01-29