

· 论著 ·

## 云南省输入性登革热病例登革病毒 1 型的分离研究\*

郭晓芳<sup>1</sup>, 李鸿斌<sup>2</sup>, 卢云兰<sup>3</sup>, 杨中华<sup>1</sup>, 朱进<sup>2</sup>, 周红宁<sup>1\*\*</sup>(1. 云南省寄生虫病防治所, 云南普洱 665000; 2. 西双版纳州疾控中心, 云南景洪 666100;  
3. 大理学院病原与媒介生物研究所(普洱分部), 云南普洱 665000)

**【摘要】** 目的 对 2011 年 8 月采集的从老挝输入的登革热病人急性期血清进行登革病毒分离, 以找出病原学证据。  
方法 用 C6/36 白纹伊蚊细胞进行病毒分离, 对有细胞病变的标本进行 RT-PCR, 检测登革病毒 RNA 及型别, 对 PCR 产物测序, 进行比对分析和进化树分析。 结果 从 8 例输入登革热病人的血清中分离到 4 株能引起细胞病变的病毒, 均为登革病毒 1 型, 与泰国毒株的同源性 >99%。 结论 云南省首次从输入登革热病人血清中分离到登革病毒 1 型, 为云南省登革热的防控提供了依据。

**【关键词】** 登革热; 登革病毒 1 型; 输入病例; 云南省**【中图分类号】** R373.33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-5234(2012)04-0241-03

[Journal of Pathogen Biology. 2012 Apr; 7(4): 241-243.]

**The first report of isolation of dengue virus type 1 from sera of patients with imported dengue in Yunnan Province**GUO Xiao-fang<sup>1</sup>, LI Hong-bin<sup>2</sup>, LU Yun-lan<sup>3</sup>, YANG Zhong-hua<sup>1</sup>, ZHU Jin<sup>2</sup>, ZHOU Hong-ning<sup>1</sup>

(1. Yunnan Institute of Parasitic Diseases, Puer, Yunnan 665000, China; 2. The Centers for Disease Control and Prevention of Xishuangbanna, Jinghong, Yunnan 666100, China; 3. Institute of Pathogens and Vectors, Dali University, Puer, Yunnan 665000, China)

**【Abstract】 Objective** To confirm dengue infection and type the dengue virus in cases of dengue imported to Yunnan Province from Lao PDR in 2011. **Methods** Isolation of the dengue virus was done using C6/36 cells. Dengue nucleic acid was detected in the isolates via a stable cytopathic effect on C6/36 cells according to RT-PCR. The dengue virus E gene was sequenced and analyzed using BLAST. Phylogenetic analyses based on the E gene of new viral isolates were conducted using MEGA4. **Results** Four dengue virus isolates were obtained from eight serum samples. All were identified as dengue virus type 1. The nucleotide homology with dengue virus type 1 isolated from Thailand was greater than 90%.

**Conclusion** This is the first isolate of dengue virus type 1 from dengue cases imported to Yunnan Province from Lao PDR. These results provide scientific evidence for dengue control in Yunnan Province.

**【Key words】** Dengue fever; dengue virus type 1; imported cases; Yunnan Province, China

登革热(dengue fever, DF)是由登革病毒(dengue virus, DENV)引起的急性蚊媒传染病,主要通过埃及伊蚊或白纹伊蚊叮咬传播,是《中华人民共和国传染病防治法》规定的乙类传染病。登革病毒有 4 个血清型。登革热是分布广、发病多、危害较大的一种虫媒病毒性疾,广泛流行于全球热带、亚热带的非洲、美洲、东南亚、西太平洋区和欧洲个别领域的 100 多个国家和地区<sup>[1]</sup>。云南省边境线总长为 4 061 km,分别与缅甸、老挝、越南接壤,而这些国家为登革热的主要流行地区,随着中国—东盟自由贸易区的建成及大湄公河次区域交通基础设施的建设,云南与南亚、东南亚国家贸易和旅游日益紧密,云南省面临着境外大量输入登革热病例的严峻形势。自 2005 年云南省实施了国家级登革热监测项目以来,每年均有输入性登革热病例的报告。其中 2008 年云南省共报告 77 例输入登革热病例和 12 例本地感染病例<sup>[2]</sup>。本研究对 2011 年 8 月从老挝输入的登革热病人急性期血清进行病毒分离

分子生物学鉴定,为云南省的登革热防控提供科学依据。

## 材料与方法

## 1 病例来源与血清标本的采集

2011 年 8 月,一批中国农民工因病从老挝南勃拉邦返回景洪市,由西双版纳州疾控中心对发热病人的急性期和恢复期血清进行登革抗体检测,诊断为登革热。对其中的 8 例急性期病人采血,分离血清, -70℃低温冰箱保存。

## 2 病毒分离

病人血清用 2% 1640 细胞维持液以 1:10 稀释,吸出 1 ml,用美国 PALL 一次性针头滤器(孔径 0.2

\* 【基金项目】 国家自然科学基金项目(No. 30960327)。

\*\* 【通讯作者】 周红宁, E-mail: zhnn@yipd.org

【作者简介】 郭晓芳(1977—),女,本科,主要从事虫媒病毒性疾病的防控工作。E-mail: gxf@yipd.org

μm)过滤后接种在生长近单层的 C6/36(白纹伊蚊纯系细胞株)传代细胞瓶中,置 30 °C 温箱吸附 1 h 后,补加 5 ml 维持液,逐日观察细胞,每代培养 7~10 d,对有无细胞病变的所有标本均盲传 3~4 代。连续传代阴性者弃之,收集有稳定细胞病变的标本,置于-70 °C 待检。

### 3 分子生物学鉴定

对有稳定细胞病变的标本,用 RT-PCR 扩增登革病毒目的基因。采用北京天恩泽基因科技有限公司生产的柱式病毒 RNAout Column Vrial RNAout 提取 RNA(CAT #: 71001-50),操作按试剂盒使用说明进行。参照文献[3]合成 cDNA,用美国 Promega 公司生产的 M-MLV Reverse Transcriptase 和 Takara 公司生产的 Cloned Ribonuclease Inhibitor 和 Random Primer(9mer)制备 cDNA。登革病毒分型特异引物和登革病毒 I 型 E 蛋白基因引物分别按我国登革热诊断标准 WS216-2008<sup>[4]</sup>和文献[5]合成(由北京六合华大基因科技股份有限公司完成)。PCR 使用日本 Takara 公司生产的 rTaq DNA Polymerase 和 10 mmol/L each dNTP Mixture。扩增条件均参照诊断

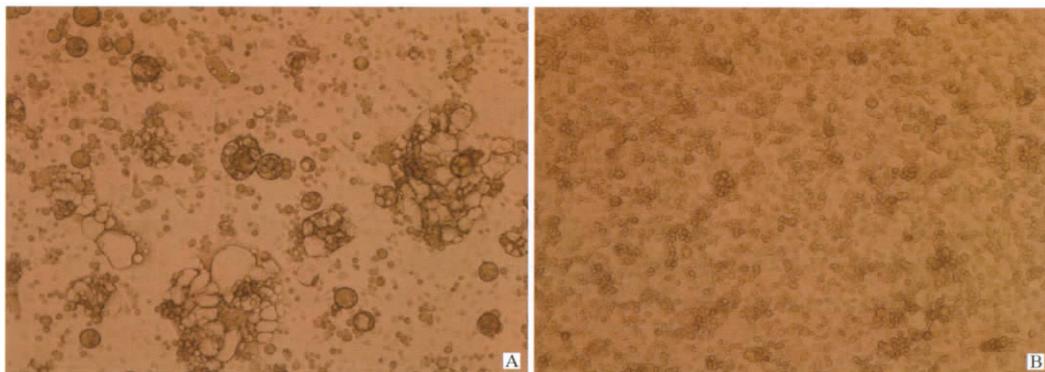
标准[4]和文献[5]。

对用登革病毒 I 型 E 蛋白基因引物扩增出阳性条带的标本,选出 1 株(编号:JH8/2011)的 PCR 产物,送华大基因测序。测序结果经 BLAST 比对,从 GenBank 中选出 31 株登革病毒 E 蛋白基因序列作为对照进行序列进化树分析,以其余 3 个型的登革病毒株(2 型:GD19,3 型:H87,4 型:H241)作为进化树的外群。用 MEGA4.1 进行碱基配对后用 Neighbor-Joining 方法完成病毒进化树的构建,模型采用 Kimura2-parameter model。Bootstrap 值设定为 1 000, Cut-off 值设置为 70%。E 蛋白基因序列分析采用 DNASTar 中的 MegAlign 软件进行分析。

## 结 果

### 1 病毒分离情况及其致细胞病变作用

从 8 例急性期患者的血清标本中分离到 4 株能致 C6/36 传代细胞病变的病毒。病变特征主要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 新分离毒株第 3 代培养第 7 d 的细胞形态(100×) B 对照细胞培养第 7 d 的细胞形态(100×)

图 1 新分离毒株致 C6/36 细胞病变作用

A CPE to new isolated virus passed 3 times on the seventh day(100×) B C6/36 control on the seventh day(100×)

Fig. 1 Cytopathic effect (CPE) to C6/36 of new isolated virus (original magnification)

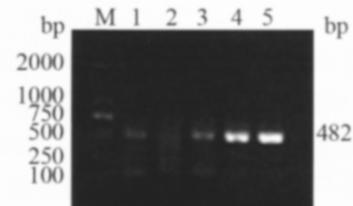
### 2 RT-PCR 产物电泳结果

4 株新分离病毒的 cDNA 先以登革病毒 4 种血清型通用引物进行 PCR,再以通用引物 PCR 产物为模板进行登革病毒型特异引物的多重 PCR。通用引物 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,用登革病毒分型引物多重 PCR 扩增出 482 bp 的条带(图 2),用登革病毒 I 型 E 蛋白基因引物扩增出 1 889 bp 的条带(图 3)。表明 4 株新分离病毒为登革病毒 1 型。

### 3 E 蛋白基因核苷酸相似性和氨基酸同源性分析

分析 JH8/2011 株 E 蛋白基因序列,与 2001 年泰国株 ThD1-0102-01 和 V2273 的 E 蛋白基因核苷酸序列相似性分别是 99.1%和 99.0%,氨基酸同源性达

99.8%;与我国浙江株 ZJ01、广东株 GD02 和 GD05 的 E 蛋白基因核苷酸序列相似性分别为 98.6%、98.5%和 98.4%,氨基酸同源性为 99.2%、98.5%和 98.4%。



M 2 000 bp DNA marker 1,3~5 分别为 JH1/2011、JH3/2011、JH4/2011 和 JH8/2011 的 PCR 产物 2 空白对照

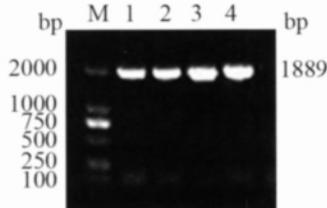
图 2 登革病毒分型引物 PCR 扩增结果

M 2 000 bp DNA marker 1,3-5 Results of PCR detection by dengue virus type-specific primers for new isolated virus 2 Blank control

Fig. 2 Results of PCR detection by type-specific dengue virus primers

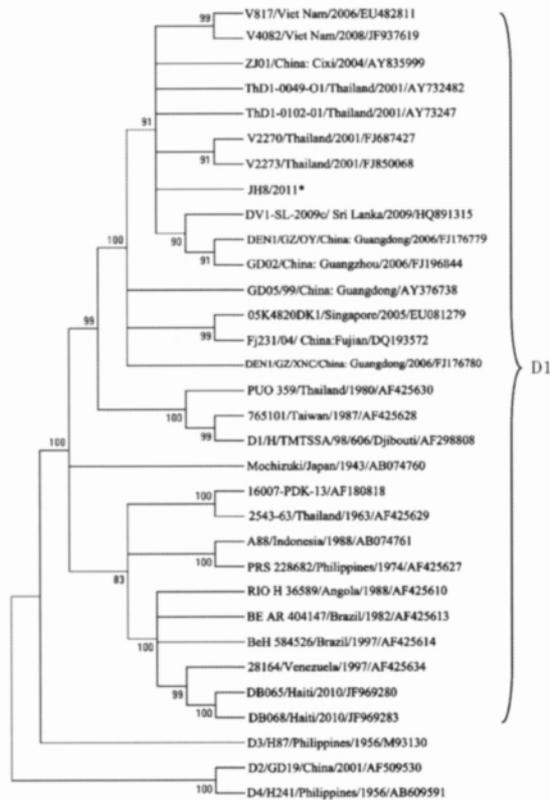
#### 4 系统发育树分析

以 JH8/2011 株 E 基因的核苷酸序列构建系统发育树,显示新分离株与登革病毒 1 型(DENV1)亚洲分离株在同一分枝上,属于 DENV1 病毒中基因型中的亚洲型<sup>[6]</sup>(图 4)。



M 2 000 bp DNA marker 1~4 分别为 JH3/2011、JH4/2011、JH8/2011 和 JH1/2011 的 PCR 产物 5 空白对照  
图 3 4 株病毒用登革病毒 1 型 E 基因 PCR 扩增结果  
M 2000bp DNA marker 1~4 Results of PCR detection by E gene primers for new isolated virus 5 Blank control

Fig. 3 Results of PCR detection by E gene primers for new isolated virus



病毒代号分依次由毒株名、分离的国家、分离时间和序列号 4 部分构成 \* 新分离的病毒株 D1 登革病毒 1 型 D2 登革病毒 2 型 D3 登革病毒 3 型 D4 登革病毒 4 型

图 4 新分离病毒 JH8/2011 株 E 基因核苷酸序列系统发育树分析  
Strains are denoted by strain name, country, isolation year and GenBank accession number \* Newly isolated DENV strain D1 dengue virus type 1 D2 dengue virus type 2 D3 dengue virus type 3 D4 dengue virus type 4

Fig. 4 Phylogenetic tree derived from E gene of newly isolated DENV JH8/2011 strains and representative of the four genotypes and accessible DENV strains isolated in China using nucleotide sequences from the E gene

#### 讨论

由于云南省特殊的地理位置,2004 年来每年均有大量的登革热输入病例报告<sup>[7]</sup>。此外,20 世纪 70 年代中期和 80 年代,在云南省的河口和西南边境地区采集的发热病人和健康人血清中曾检查到登革 CF 抗体,从而证实该地区有登革热散发病例和隐性感染存在<sup>[8]</sup>。特别是 2008 年,云南省共报告了 12 例登革热本地病例,均来自云南省的西南部边境地区<sup>[7]</sup>,说明在云南边境地区存在登革热的流行条件。

此次通过血清学和病原学检测,证实 2011 年 8 月从老挝输入景洪市的登革热属于登革病毒 1 型。这是云南省首次从输入登革热病人血清中分离到登革病毒 1 型。进化树分析显示,新分离株与以往亚洲分离株和中国分离株聚在同一分枝上,但 2004 年浙江分离株和 2006 年广东分离株均为输入性病毒<sup>[5,9]</sup>。根据 Rebeca Rico-Hesse<sup>[6]</sup>的研究结果对比分析发现,新分离的病毒株属于登革病毒 1 型(血清型)中的亚洲型(基因型)。

研究结果提示,云南省应继续加强对从边境地区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的登革热暴发流行。

#### 【参考文献】

- [1] 卫生部疾病预防控制局. 登革热防治手册 [M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社,2008. 1.
- [2] 郭晓芳,吴超,王丕玉,等. 云南西部边境地区健康人群登革热血清学调查[J]. 中国人兽共患病学报,2010,26(5):502-4.
- [3] 龚道方,郭晓芳,周红宁,等. 云南景东县乙型脑炎流行状况调查[J]. 中国病原生物学杂志,2010,5(1): 57-9.
- [4] 中华人民共和国卫生行业标准. 登革热诊断标准 WS216-2008 [S].
- [5] 吴新伟,蒋力云,伍业健,等. 广州市 2006 年 I 型登革病毒流行株 E 基因序列分析[J]. 热带医学杂志,2009,9(5): 521-3.
- [6] Rebeca Rico-Hesse. Microevolution and virulence of dengue viruses[J]. Adv Virus Res,2003,59: 315-41.
- [7] 李华宪,周红宁,杨沅川,等. 2004-2008 年云南省登革热流行现状[J]. 中国媒介生物学及控制杂志,2010,21(6):576-80.
- [8] 张海林,自登云,龚正达. 云南省登革热流行病学调查分析[J]. 地方病通报,1999,14(3): 50-4.
- [9] Xu GZ, Dong HJ, Shi NF, et al. An outbreak of dengue virus serotype 1 infection in Cixi, Ningbo, People's Republic of China, 2004, associated with a traveler from Thailand and high density of *Aedes Albopictus*[J]. Am J Trop Med Hyg,2007,76(6):1182-8.

【收稿日期】 2012-01-28 【修回日期】 2012-03-09