

国内首次自患者标本中同时分离的登革 2 型和 3 型病毒的鉴定

于 曼 彭文明 范宝昌 邓永强 秦鄂德*

(军事医学科学院微生物流行病学研究所 北京 100071)

摘 要 采用间接免疫荧光方法,检测患者血清标本中的抗登革病毒 IgM 和 IgG 抗体,同时将病人急性期血清接种 C6/36 细胞进行病毒分离。从分离的病毒悬液中提取 RNA,进行 RT-PCR 扩增和序列测定。结果显示,该患者血清中存在抗登革病毒的 IgM 和 IgG 抗体。从病人血清中分离的病毒,经 RT-PCR 和序列测定证实为登革 2 型和 3 型病毒的特异序列。表明该患者为登革 2 型和 3 型病毒混合感染。

关键词 登革热 登革病毒 混合感染 抗体

中图分类号:R373.33 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2004)06-0717-03

登革热是由登革病毒(Dengue virus DEN)引起,经蚊媒传播的急性传染病。多发生于热带和亚热带地区。登革病毒有 4 个血清型,为单股正链 RNA 病毒,是黄病毒科的重要成员。登革热传播迅速,发病率高。近年来,因全球气候变暖,旅游业的快速发展,境内外交往日益频繁等因素,该病已波及全球近 2/3 的地区,受害人数达 1 亿多。尤其是近几年,美国、南美洲和东南亚地区及我国台湾、东南沿海一带,连续暴发流行登革热,病死率逐年呈增长趋势。人对登革热普遍易感,受感染蚊叮咬后,通常经过 5~8d 的潜伏期。登革热多为单一型病毒感染,而两型以上同时感染者较少见,目前国内尚未见报道。2003 年 1 月份,北京协和医院送来疑似登革热患者血液标本一份。本实验室对该病人血液标本进行了病毒分离及相关检测,证实该患者为登革病毒 2 型和 3 型感染。这是国内首次发现登革病毒两个型同时感染的病例。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 白纹伊蚊 C6/36 传代细胞,由本研究所细胞库提供。该细胞生长于含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基(GIBCO/BRL)。

1.1.2 临床标本的来源及患者相关资料 该患者男性,36 岁,工程师。于 2002 年 2 月去斯里兰卡工作,同年 10 月份曾患疑似感冒 1 次。2003 年元月 20 日返京,22 日发病,体温 38.4℃,伴随关节疼痛,全身

除面部、颈部及掌部外均出现红色丘疹,至采血时高热不退。同年元月 26 日到医院就诊并采血送检。

1.1.3 酶与试剂 AMV 反转录酶, RNasin, dNTPs, DTT, X-Gal 和 IPTG 为 Promega 公司产品。RNA 提取试剂盒(Qiagen RNeasy mini Kit)为 Qiagen 公司产品。采用的登革病毒间接免疫荧光检测试剂盒,由本实验室制备。

1.1.4 菌株 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 由本室保存。

1.2 间接免疫荧光检测

取病人血清 1:10 稀释后,于 56℃ 30min 灭活,再按 1:20、1:30、1:60、1:80、1:120 和 1:160 稀释,然后将稀释好的病人血清分别滴加到 DEN1、2、3 和 4 型的抗原片上,37℃ 温育 60min,经冲洗晾干后滴加荧光标记的羊抗人 IgM 和 IgG 抗体,37℃ 培育 30min,然后冲洗晾干,荧光显微镜下观察结果。

1.3 登革病毒的分离

取病人的血清,经除菌处理后,适当稀释,然后接种 C6/36 细胞单层(96 孔板)。放置 37℃ CO₂ (5% CO₂) 温箱吸附 60min。补加维持液 100 μ L 后,再放 37℃ CO₂ 温箱培养。逐日观察细胞病变(Cytopathic effect, CPE)。当产生病变的细胞达 50%(++)~100%(++++)时,收取培养上清液于 -70℃ 存放待用,或直接用于病毒的传代。

1.4 病毒 RNA 提取和 RT-PCR 扩增

4 个型登革病毒通用引物和各型特异引物按 NCBI 参考株(GenBank 号为 M29095)序列设计。通用

* 通讯作者。Tel 86-10-66948614 E-mail: qinade@sohu.com

作者简介: 于 曼(1953-)女,山西长治人,高级实验师,主要从事医用病毒学研究。E-mail: yu_man@sohu.com

其他作者: 姜 涛,段鸿元,陈水平

收稿日期 2004-06-07,修回日期 2004-09-23

引物为 5'-AAACCGTGTTCCTGTAC-3'(上游)和 5'-TCTCTCCCAGCGTCAATA-3'(下游);登革 1 型病毒引物:5'-GGAGCGATTAAAGTGTACAG-3'(上游)和 5'-CGCCTGAACCATGACTCCTAG-3'(下游);2 型病毒引物:5'-CTGAACATCTTGAACAGGAG-3'(上游)和 5'-GGCCTGCACCATAACTCC-3'(下游);3 型病毒引物:5'-CTGAGCATTATCAACAAACG-3'(上游)和 5'-AGCT-TGCACGACTCG-3'(下游);4 型病毒引物:5'-CT-GACTGGATTGAGGAAGGAG-3'(上游)和 5'-TGCTT-GAACTGTGAAACCTAG-3'(下游)。上述引物均由上海生工生物工程有限公司合成。病毒 RNA 提取和 RT-PCR 扩增均按文献[1]的方法进行。

1.5 序列测定

将纯化的 RT-PCR 扩增产物克隆至载体 pGEM-T 然后转化 *E. coli* DH5 α 于含 IPTG 和 X-Gal 的 LB 平板上挑取白色菌株,提取质粒。经 PCR 扩增鉴定后,进行登革病毒基因组序列测定。序列测定由上海生工生物工程有限公司完成。运用 DNASTAR 软件进行序列比较分析。

2 结果和讨论

2.1 病人血清病毒分离

本研究首先对患者的血清中是否存在登革病毒进行了病毒分离。取患者血清经除菌处理后,作适当的稀释,取 10 μ L 接种 C6/36 细胞单层进行病毒分离。接种后第 3 天,被接种的 C6/36 细胞产生了细胞病变(CPE),其 CPE 呈现登革病毒特有的特征,与同种属的乙脑和西尼罗病毒明显不同。初起细胞圆缩堆积、融合,然后形成空泡和网状结构(图版 II-A-b)。第 4、5 天时 CPE 达 100% 时,收取培养液,再连续传 2 代。传代的病毒均能在第 3 天产生 CPE,表明分离的病毒能稳定传代。

2.2 抗登革病毒 IgM 和 IgG 抗体检测

与此同时,我们又进行了登革病毒特异抗体的检测。采用由本实验室制备的登革病毒间接免疫荧光检测试剂盒对患者的血清分别进行 IgM 和 IgG 抗体检测。检测结果显示,病人血清与登革 2、3 和 4 型病毒呈阳性反应,但与登革 1 型病毒为阴性反应。登革 2 型 IgM 抗体效价为 1:80,IgG 抗体效价 1:160(图版 II-B-a,b)。登革 3 型 IgM 抗体效价 1:60,IgG 抗体效价大于 1:120(图版 II-B-c,d)。登革 4 型 IgM 抗体效价 1:60,IgG 抗体效价 1:120。表明病人血清中同时存在多种型别的登革病毒抗体,揭示可能被多个型别的登革病毒感染。

2.3 RT-PCR 检测和序列分析

在上述结果的基础上,为进一步确定所分离的病毒是登革病毒的哪一型别,取上述分离的病毒悬液提取 RNA 后进行 RT-PCR 扩增检测。首先采用登革 4 个型病毒的通用引物扩增出一条分子量为 238bp 条带,其大小与预期的结果一致(图 1-A)表明分离的病毒为登革病毒。为进一步鉴定所分离的登革病毒的型别,又分别用登革 1、2、3 和 4 型的特异引物进行扩增。图 1-B 显示,采用登革 1、4 型引物未扩增出任何条带,而用 2 型和 3 型引物则分别扩增出大小为 119 和 290bp 的条带,表明所分离的毒株为 2 型和 3 型病毒。进一步对扩增产物进行核苷酸序列测定的结果显示,这两个扩增片段分别为登革 2 型和 3 型病毒的相应序列。将这两个片段的序列分别与登录 GenBank 的登革 2 型病毒 New Guinea Q(NGC_D00346)株和登革 3 型病毒 H87(M93130)株的基因组序列比较,其同源性均为 98%(图 2)。表明所分离的毒株为登革 2 型和 3 型病毒。

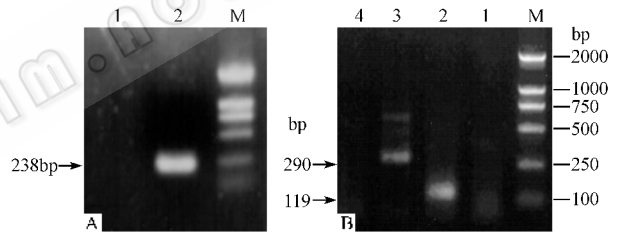


图 1 分离病毒的 RT-PCR 扩增结果

Fig.1 Amplification of isolated viruses by RT-PCR

A: Amplification of dengue 1~4 viruses with conserved primers. 1. Supernatant from C6/36 cells 2. Supernatant from C6/36 cells inoculated with patient's serum.

B: Amplification of dengue viruses 1~4 serotype-specific primers. 1~4. DEN type 1 2 3 and 4 respectively M. Marker.

本研究所涉及的患者,曾在斯里兰卡工作 1 年,该国也是登革热的流行区。该患者在返京后第 3 天发病,因而不可能在国内感染,可能是在斯里兰卡被感染。类似本例多型登革病毒同时感染,在国内尚属首次发现。但国外有几例混合感染的报道:如登革 1 型和 4 型病毒(GublerDJ,1985)^[3],登革 1 和 3 型病毒(Laille M,1991)^[4],登革 1 和 2 型病毒及登革 2 和 3 型病毒(Maneekarn N,1993^[5];Kanesa-athan N,1994^[6];Rocco IM,1998^[7])的同时感染。同时混合感染多种病毒的原因,可能是与传播的媒介蚊虫有关。蚊虫既是传播媒介,又是病毒的贮存宿主。在频繁的登革热流行期,蚊虫叮咬被不同型别病毒感染的病人,当再次叮咬时就将其所携带的病毒传给了人。

由于: 个不同型别的登革病毒在血清学上存在交叉反应,故在血清学检测中难以区分。中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

(A) NGC : 58 TCAATATGCTGAAACGCGAGAGAAACCGCGTGTGACTGTACAACAGCTGACAAAGAGAT
QUERY1: 1 -----C-----
NGC : 118 TCTCACTTGAATGCTGCAGGGACGAGGACCATTAAACTGTTTCATGGCCCTGGTGGCG
QUERY1: 61 -----
(B) H87 : 134 AATATGCTGAAACGCGTGAGAAACCGTGTGTCAACTGGATCACAGTTGGCGAAGAGATTTC
QUERY2: 3 -----C-----
H87 : 194 TCAAGAGGATTGCTGAACGGCCAAGGACCAATGAAATTGGTTATGGCGTTTATAGCTTTC
QUERY2: 63 -----C-----
H87: 254 CTCAGATTTCTAGCCATTCCACCGACAGCAGGAGTCTTGGCTAGATGGGGTACCTTTAAG
QUERY2: 123 -----
H87: 314 AAGTCGGGGGCTATTAAGGTCTTAAAAGGCTTCAAGAAGGAGATCTCAAACATGCTGAGC
QUERY2: 183 -----C-----
H87: 374 ATTATCAACAAACGGAAGACATCGCTCTGTCTCATGATGATGTTA
QUERY2: 243 -----

图 2 分离病毒的部分序列分别与登革 2 型和 3 型病毒株的相应序列比较

Fig.2 Comparison of partial sequences of the isolated dengue viruses with those of DEN-2 and DEN-3 registered in GenBank

A : Query 1(119bp) : Compared with dengue virus 2 NGC strain(D00346) ; B : Query 2(290bp) : Compared with dengue virus 3 H87 strain(M93130).

叉反应 ,这给实验室诊断造成困难。尤其是对多型别病毒混合感染的鉴定就更为不易。在间接免疫荧光检测中 ,登革 2、3 和 4 型病毒与患者的血清均有反应。如果仅用间接免疫荧光方法则很难区分。我们采用间接免疫荧光法 ,结合病毒分离 ,RT-PCR 和序列测定而确定为 2 型和 3 型病毒混合感染。

参 考 文 献

[1] 于 曼 ,秦鄂德 ,邓永强 ,等 . 3 种重要虫媒病毒的 RT-PCR 检测 . 军事医学科学院院刊 , 2003 , 27 (4) : 262 - 264 .
[2] Meyers R M , Carey D E . Concurrent isolation from patient of two arboviruses , Chikungunya and dengue type 2 . Science , 1967 , 157 : 1307 - 1308 .

[3] Gubler D J , Kuno G , Sather G , et al . A case of natural concurrent human infection with two dengue viruses . Amer J Trop Med Hyg , 1985 , 34 : 170 - 173 .
[4] Laille M , Deubel V , Sainte-Marie F F . Demonstration of concurrent dengue 1 and dengue 3 infection in six patients by the polymerase chain reaction . J Med Virol , 1991 , 34 (1) : 51 - 54 .
[5] Maneekarn N , Morita K , Tanake M , et al . Application of polymerase chain reaction for identification of dengue viruses isolated from patient sera . Microbiol Immunol , 1993 , 37 (1) : 41 - 47 .
[6] Kanesa-athan N , Lacono-Connors L , Magill A , et al . Dengue serotypes 2 and 3 in US forces in Somalia . Lancet , 1994 , 12 : 343 (8898) : 678 .
[7] Rocco I M , Barbosa M L , Kanomata E H . Simultaneous infection with dengue 1 and 2 in a Brazilian patient . Rev Inst Med Trop San Paulo , 1998 , 40 (3) : 151 - 154 .

Demonstration of Simultaneous Infection with Dengue Type 2 and 3 in A Chinese Patient

YU Man PENG Wen-Ming FAN Bao-Chang DENG Yong-Qiang QIN E-De*
(Institute of Microbiology and Epidemiology , Academy of Military Medical Sciences , Beijing 100071 , China)

Abstract : IgG and IgM antibodies to dengue virus (DEN) in patient serum sample were detected with an indirect immunofluorescence assay . The patient ' s serum was inoculated into the culture of C6/36 cells to isolate dengue virus . Viral RNA was extracted from cultured supernatant and RT-PCR amplification and sequencing were carried out . The result showed that there were anti-dengue virus IgG and IgM antibodies in the serum . Both dengue type 2 and 3 virus specific sequences were confirmed by RT-PCR and sequence analysis . The results presented here demonstrated the simultaneous infection with dengue type 2 and 3 viruses in the Chinese patient .

Key words : Dengue fever , Dengue virus , Mixed infection , Antibody

* Corresponding author . Tel 86-10-66948614 ; E-mail : qinede@sohu . com
Other authors : JIANG Tao , DUAN Hong-Yuan , CHEN Shui-Ping
Received date : 06-07-2004