

陕西省赴柬埔寨务工人员归国后 暴发登革热疫情调查分析

王芹¹, 董建华², 王丽², 王敬军², 邓勇², 张义², 余鹏博², 邢爱华², 张全福¹, 李群¹

摘要: **目的** 确定 2007 年陕西省赴柬埔寨务工人员归国后发热疫情病因。**方法** 采集陕西省 70 例赴柬埔寨务工人员归国人员的血清标本, 使用血清学方法进行登革病毒 IgM 和 IgG 检测; 使用逆转录-巢式-聚合酶链反应 (RT-nPCR) 扩增发热患者血清中登革病毒 RNA; 同时, 对发热患者血清进行登革病毒的分离培养。**结果** 使用 CORTEZ 公司快检试剂共检出 7 份 IgM 阳性血清, 其中发热患者 5 例; 使用 IBL 公司 IgM 试剂盒共检出 6 份 IgM 阳性血清, 其中发热病例 4 例。使用 IBL 公司登革热 IgG ELISA 试剂盒共检出 13 份 IgG 阳性血清, 包括 2 例发热患者。使用 RT-nPCR 方法从首例发热患者的血清中扩增出登革病毒目的片段, 经序列比对结果证实是 DEN-1 型病毒核酸片段。用 C6/36 细胞和 BHK 细胞未分离出登革病毒。**结论** 根据患者的临床症状、流行病学史以及实验室诊断结果, 共确诊了 4 例输入性登革热病例, 其中首发病例为 DEN-1 型病毒感染。血清学检测结果表明, 在归国人员中还存在隐性感染者。

关键词: 登革热; 疫情; 调查分析

中图分类号: R373.3⁺3

文献标识码: A

文章编号: 1003-9961(2009)07-0481-03

Analysis of dengue fever outbreak among workers returning from Cambodia in Shaanxi province, 2007 WANG Qin^{*}, DONG Jian-hua, WANG Li, WANG Jing-jun, DENG Yong, ZHANG Yi, YU Peng-bo, XING Ai-hua, ZHANG Quan-fu, LI Qun. ^{*} Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China

Corresponding author: LI Qun, Email: fyklq@vip.sina.com

Abstract: **Objective** To identify the cause of an outbreak of fever among the workers returning from Cambodia in Shaanxi province in 2007. **Methods** Blood samples were taken from 70 workers returning from Cambodia to detect IgM and IgG to dengue virus, dengue virus RNA in serum of the febrile cases was amplified by RT-nested-PCR, and dengue virus isolation from serum of the febrile cases was conducted. **Results** Seven samples (including 5 samples from the febrile cases) were positive for IgM and none of the serum samples were positive for IgG by reagent from CORTEZ, and 6 samples (including 4 samples from the febrile cases) were positive for IgM by IgM kit from IBL and 13 samples (including 2 samples of the febrile cases) were positive for IgG by IgG kit from IBL. A specific DNA fragment of DEN-1 virus was amplified from serum of the index case, which was confirmed by sequence analysis. No virus was isolated by C6/36 and BHK cells. **Conclusion** Four imported dengue fever cases were confirmed according to the experiment results, symptoms and epidemiology history, and the index case was infected with DEN-1 virus. The serological results indicated that there was asymptomatic infection among the returned workers.

Key words: dengue fever; outbreak; analysis

2007 年 4 月 10 日, 陕西省机械工业勘察设计研究院组织 70 名陕西省籍劳务人员赴柬埔寨野外勘探施工, 先后于 5 月初至 6 月底陆续返回。从 6 月 22 日以来, 该人群中分别由陕西省西安、宝鸡、咸阳和商洛市陆续报告了 9 例发热病例, 发病时间在 6 月 15 日至 7 月 2 日, 均在回国后 2 周内发病。首

发病例出现高热、寒颤, 伴头痛、周身酸痛, 白细胞总数不高, 血小板偏低, 尿常规检查红细胞和蛋白阳性, 提示有肾功能损害。由于该患者 6 月中旬自柬埔寨返回, 当地流行登革热, 有蚊虫叮咬史, 而且患者曾在柬埔寨患过疟疾, 所以高度怀疑“登革热”和“疟疾”; 其他发热患者也出现高热、寒颤和全身酸痛等症状, 但都没有出血症状。陕西省疾病预防控制中心 (CDC) 立即展开了流行病学调查和病原学检测, 以确定此次发热疫情的病因。

作者单位: 1. 中国疾病预防控制中心, 北京 100050; 2. 陕西省疾病预防控制中心

作者简介: 王芹, 女, 山东人, 主要从事传染病预防控制和医学病毒学研究工作

通信作者: 李群, Tel: 010-63045571, Email: fyklq@vip.sina.com

收稿日期: 2008-12-15

1 材料与方法

1.1 标本采集 采集 70 名赴柬埔寨归国人员血清,

其中 9 例发热患者在急性期不同时间内采集 1~3 次血清。

1.2 登革热血清学检测试剂

1.2.1 登革热 IgM 和 IgG 快速检测 ① 登革热 IgM 和 IgG ICT 检测试剂 (Dengue IgM/IgG) (美国 CORTEZ 公司); ② 登革热 IgM 和 IgG 胶体金检测试剂 (澳大利亚 Panbio 公司)。

1.2.2 ELISA 法检测 IgM ① 登革热 IgM 间接法 ELISA 检测试剂 (德国 IBL 公司); ② 登革热 IgM 捕获法 ELISA 检测试剂 (澳大利亚 Panbio 公司)。

1.2.3 ELISA 法检测 IgG 登革热 IgG 间接法 ELISA 检测试剂 (德国 IBL 公司)。

1.3 逆转录-巢式-聚合酶链反应 (RT-nPCR) 扩增登革病毒核酸 对发热患者的急性期血清进行登革病毒 RT-nPCR 检测。登革热 PCR 诊断引物: 黄病毒科通用外侧引物: FLAVF1 5' - CAC GGA ACT CCA CCC ATG AGA TGT - 3', FLAVR1 5' - GTG TCC CAG CCT GCT GTG TCA TC - 3'; 黄病毒科通用内侧下游引物: FLAVR2 5' - CGT GCT CCC AGC CAC ATG TAC C - 3'; 黄病毒科登革病毒 1~4 型内侧上游引物: DEN1 5' - CAT GGG CCT ATC ATG GAT CA - 3', DEN2 5' - CGG AAG CGG AAC CCG TAA CA - 3', DEN3 5' - GCG GAG TGG CTT TGG AGG AC - 3', DEN4 5' - CAG TCT TTC AGG AAG AAC AGG G - 3'。

用 RNeasy Mini Kit 试剂盒 (QIAGEN 公司) 提取血清中的 RNA。逆转录反应采用 SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR 试剂盒 (Invitrogen)。使用随机引物按照试剂盒要求进行逆转录, 反应产物进行如下 PCR 扩增。外侧 PCR 反应体系 (50 μ l): 10 \times PCR buffer 5 μ l, 2.5 mmol/L dNTP 4 μ l, 10 μ mol/L FLAVF1 2 μ l, 10 μ mol/L FLAVR1 2 μ l, cDNA 模板 4 μ l, rTaq DNA polymerase (5 U/ μ l) 1 μ l; 反应条件: 预变性 95 $^{\circ}$ C 10 min; 变性 95 $^{\circ}$ C 30 s, 退火 55 $^{\circ}$ C 30 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C 60 s, 35 个循环; 延伸 72 $^{\circ}$ C 10 min; 内侧 PCR 反应体系 (50 μ l): 10 μ mol/L DEN1 - 4 2 μ l, 10 μ mol FLAVR2 2 μ l, 外侧 PCR 产物 2 μ l, 其余同外侧体系; 反应条件: 每循环延伸时间 30 s, 其余同外侧体系。德国 Eppendorf 5331 梯度 PCR 仪。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 结果。

1.4 PCR 扩增片段的核苷酸序列测定和序列比对 用 QIAquick 凝胶回收试剂盒 (QIAGEN) 回收 PCR 扩增条带, 将 PCR 扩增产物进行核苷酸序列测定, 用 Blast 软件将测定的序列与 GenBank 所有序列进

行比对, 确定序列的性质和病毒型别。

1.5 病毒的分离培养和鉴定 参照《全国登革热监测方案》(试行) 附件 4 用 C6/36 (ATCC) 细胞和 BHK21 (ATCC) 细胞进行登革病毒 (发热患者急性期血清) 分离培养; 参照附件 6 的免疫荧光法 (检测病毒抗原) 和 RT-PCR 法 (本文 1.3.2 中的外侧引物和 PCR 条件) 对分离的病毒进行鉴定。

2 结果

2.1 流行病学调查处理 流行病学调查发现, 在 70 名赴柬埔寨施工人员中有 8 人曾在柬埔寨出现过发热等症状, 其中有 1 例在当地确诊为登革热病例, 有 3 例在柬埔寨患过疟疾。归国后有 9 人相继出现发热等症状, 均在归国 2 周内发病。对 9 例病例实施了医院隔离治疗, 其余的 61 人自回国之日起实施了居家隔离观察一个最长潜伏期 15 d, 对患者密切接触者, 自患者隔离治疗之日起也实施了居家隔离观察 15 d。对所有发病人员家庭院落及周围 100 m 范围实施了灭蚊处理, 落实防蚊措施, 控制了疫情扩散。

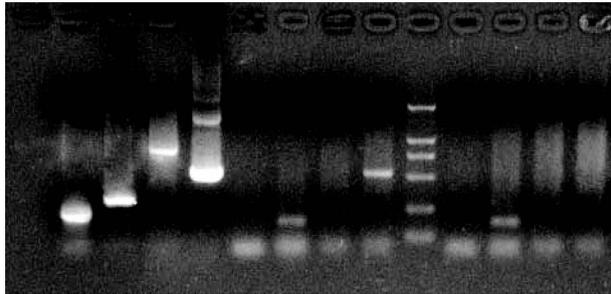
2.2 登革热血清学检测结果 用登革热抗体检测试剂对 70 名务工归国人员的血清进行检测。使用 Panbio 公司两种试剂均阴性。而使用 CORTEZ 公司登革热快检试剂共检出 7 份 IgM 阳性血清, 其中包括 5 份发热患者标本; 所有标本 IgG 阴性。使用 IBL 公司登革热 IgM 间接法 ELISA 试剂共检出 6 份阳性血清, 其中有发热病例 4 例。使用 IBL 公司登革热 IgG 间接法 ELISA 试剂共检出 13 份阳性血清, 包括 2 份发热病例。9 例发热患者经两种登革热 IgM 抗体检测试剂确诊 4 例登革热现症病例 (必须两种登革热 IgM 抗体检测试剂结果均阳性, 才算实验室确诊)。

2.3 RT-nPCR 扩增结果 外侧 PCR 未出现明显的扩增条带, 而使用内侧分型引物从首发病例的血清中扩增出 DEN - 1 型登革病毒的目的片段, 约 541 bp; 而其他型别无扩增条带或没有特异的扩增条带, 阴性对照未出现特异性扩增条带, 见图 1。其他发热患者血清标本 PCR 检测阴性。

经过核苷酸序列测定和比对结果证实: 此株病毒的扩增序列被命名为 ShaanxiIC - 07 (Accession number: EU325572 in GenBank), 它与日本 Mochizuki 株 (AB074760) 的核苷酸序列同源性达到 97%, 与泰国 ThD1 - 0081 - 8L 株 (AY732481)、中国广州 GZ/80 株 (AF350498)、缅甸 31987/98 株 (AY726554), 柬埔寨

寨的 D1/H/IMTSSA - CAMB/98/658 株 (AF309641) 等同源性均达 96%, 属于 DEN-1 型病毒。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



1~4: DEN-1 病毒阳性对照; 5~8: 首发病例血清 RT-PCR 扩增结果, 分别是 DEN-1 型; 9: DNA Marker DL2000 (2000 bp, 1000 bp, 750 bp, 500 bp, 250 bp, 100 bp); 10~13: DEN-1 PCR 阴性对照

图1 首发病例血清登革病毒 RT-nPCR 扩增结果

Figure 1 Amplification of dengue virus from serum of index case by RT-nested-PCR

2.4 登革病毒分离培养结果 用 C6/36 细胞和 BHK21 细胞分离培养登革病毒, 细胞一直未出现病变, 盲传 3 代后也未出现病变; 用间接免疫荧光和 RT-PCR 未检测出登革病毒抗原和核酸。

3 讨论

根据实验室检测结果、临床特点及流行病学史, 本次疫情确定 4 例发热患者为登革热实验室诊断病例, 有 3 例在柬埔寨患过疟疾。经过追踪调查, 这些患者回国后均在其疾病的最长潜伏期内发病, 证实此次发热疫情部分是由输入性登革热引起的。

通过 PCR 扩增和序列比对结果表明: 首发病例 (1 号) 登革热是由 DEN-1 型病毒感染引起。有 11 名未发热的回国人员 ELISA IgG 抗体阳性, 提示这些人员在柬埔寨曾感染过登革病毒; 还有 1 例 ELISA IgG 和 IgM 均阳性的人员没有任何临床症状和体征, 说明这些人员中存在登革病毒隐性感染; 而且陕西省当地刚进入夏季, 白纹伊蚊逐渐增多, 为登革病毒的传播带来了隐患, 因此对这名隐性感

染者采取了严格的隔离观察, 加强了防蚊措施, 没有造成疫情扩散。

东南亚、美洲和西太平洋地区部分国家登革热疫情比较严重^[1]。近年来中国从这些地区输入的登革热病例逐渐增多, 引起的暴发疫情时有发生^[2]。2004-2006 年柬埔寨每年都有几千乃至上万登革热病例报道。在广东省多次发生的输入性登革热疫情也与柬埔寨登革病毒株相关, 推测这些登革热可能来自境外相关地区^[3,4]。因此需要做好输入性登革热疫情的防控工作, 尤其是从登革热高发或流行地区归国的人员, 需要选择高敏感性和高特异性检测试剂盒进行筛选, 并加大病例的筛查力度, 进一步加强疫情的传入和蔓延的防范工作。

参考文献

- [1] Zheng NQ. The epidemic situation of dengue fever and the control of vector mosquitoes in the world [J]. *Chinese Journal of Public Health Management*, 2004, 20(1): 48-49. (in Chinese)
郑能雄. 全球登革热流行态势与媒介蚊虫控制 [J]. *中国公共卫生管理*, 2004, 20(1): 48-49.
- [2] Meng ZQ. The globally prevalent trend of dengue and dengue hemorrhagic fever and surveillance and management at seaport and airport in China [J]. *China Tropical Medicine*, 2005, 5(7): 1463-1468. (in Chinese)
蒙中秋. 全球登革热/登革出血热的流行态势及我国口岸监测管理 [J]. *中国热带医学*, 2005, 5(7): 1463-1468.
- [3] Tian XD, Liu JW, Fang MY, et al. Analysis of the E gene sequences of three dengue virus type 1 isolates in Guangdong province [J]. *Journal of First Military Medical University*, 2005, 25(1): 54-57. (in Chinese)
田小东, 刘建伟, 方美玉, 等. 广东流行的三株登革 1 型病毒包膜蛋白基因的序列测定与分析 [J]. *第一军医大学学报*, 2005, 25(1): 54-57.
- [4] Zhang FC, Chen YQ, Lu CY, et al. Analysis on clinical and epidemiological characteristics of 1032 patients with dengue fever in Guangzhou [J]. *Chinese Journal of Epidemiology*, 2005, 26(6): 421-423. (in Chinese)
张复春, 陈燕青, 卢业成, 等. 广州市 2002-2003 年 1032 例登革热患者流行病学特征分析 [J]. *中华流行病学杂志*, 2005, 26(6): 421-423.