

## 2014年广东省登革热大流行的病原体来源及分子进化特点

郭前方<sup>1</sup>, 崔国辉<sup>1</sup>, 方丹云<sup>1</sup>, 晏辉钧<sup>1</sup>, 周俊梅<sup>1</sup>, 司露露<sup>1</sup>, 吴德<sup>2</sup>, 江丽芳<sup>1</sup>

(1. 中山大学热带病防治研究教育部重点实验室//中山医学院微生物学教研室, 广东广州 510080; 2. 广东省疾病预防控制中心, 广东广州 510300)

**摘要:**【目的】分离培养与鉴定2014年广东省登革热暴发流行的病原体,从分子进化方向分析其来源和遗传进化特点,为登革热的监测和防控提供科学依据。【方法】在2014年登革热暴发流行期间,采集广东省不同地区登革热患者的血清标本,从中分离培养登革病毒并进行型别鉴定。采用RT-PCR和测序技术获取病毒的E基因和全基因组序列,并对其进行系统进化分析、贝叶斯进化分析和遗传变异分析。【结果】分离培养与鉴定了40株登革病毒1型(DENV-1)病毒,获得了这40株分离株的完整E基因序列和其中6株分离株的全基因组序列。E基因进化分析结果显示,40株分离株中有16株为基因I型,24株为基因V型。16株基因I型毒株中有14株与2013年广州市和2013年新加坡流行的毒株高度同源,核苷酸相似度为99.6%~99.9%,另2株基因I型毒株则与2013年马来西亚流行的毒株亲缘关系最近,核苷酸相似度为99.7%。24株基因V型毒株均与2009年孟加拉、广州市和2013年不丹流行的毒株同源性高,核苷酸相似度为99.0%~99.9%。对6株病毒全基因组进化分析结果显示,其中5株病毒与2013年广州市和中山市流行的毒株高度同源,核苷酸相似度为99.6%~99.8%,另一株病毒则与2002年的缅甸流行株亲缘关系最近,核苷酸相似度为98.8%。对E基因的遗传变异分析结果显示,与2013年广东省的流行代表株比较,2014年广东省分离株有5个氨基酸位点发生了变异,其中3个(S88V, E203G, T275R)位于EⅡ区的毒力位点区域,1个(S305P)位于EⅢ区的毒力位点区域。【结论】2014年广东省登革热的病原体主要为DENV-1,且至少有2种基因型同时在流行;其可能来源于2013年广东省流行的毒株,也可能来源于新加坡、马来西亚、缅甸等东南亚国家的毒株,其中2013年广东省流行的毒株可能是重要来源之一,提示须加强对本地毒株及传播媒介的监测和研究,以便了解登革热是否在广东省本地化的问题;在流行过程中,病毒有些氨基酸位点已发生变异,其中有4个变异位点位于登革病毒的毒力位点区域,提示有必要对这些变异的生物学意义开展进一步研究。

**关键词:**登革热;登革病毒;E基因;全基因组;系统进化分析;贝叶斯分析

中图分类号:R377.33

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2017)01-0021-08

## Origin and Phylogenetic Characteristics of Dengue Virus Isolated from the Large Outbreak of Dengue in Guangdong Province in 2014

GUO Qian-fang<sup>1</sup>, CUI Guo-hui<sup>1</sup>, FANG Dan-yun<sup>1</sup>, YAN Hui-jun<sup>1</sup>, ZHOU Jun-mei<sup>1</sup>, SI Lu-lu<sup>1</sup>, WU De<sup>2</sup>,  
JIANG Li-fang<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Tropical Diseases Control, Ministry of Education, and Department of Medical Microbiology, Zhongshan Medical College, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Guangdong Provincial Central for Disease and Prevention, Guangzhou 510300, China)

Corresponding to: JIANG Li-fang, E-mail: jianglf@mail.sysu.edu.cn, WU De, E-mail: wude68@tom.com

**Abstract:**【Objects】To isolate and identify the pathogen of the large outbreak of dengue in Guangdong province in 2014. To understand the origin and the phylogenetic characteristics of the isolates, and provide scientific foundation for the surveillance and prevention of dengue fever.【Methods】Collected the patient serum samples over all the Guangdong province during the 2014 outbreak

收稿日期:2016-10-17

基金项目:NFSC-广东省联合基金(U1132002);广东省科技计划项目(2013A020229004);广州市健康医疗协同创新重大专项(201508020263)

作者简介:郭前方,硕士研究生,研究方向:登革病毒的致病与免疫机制,E-mail:guoqf3@yeah.net;江丽芳,通信作者,教授,博士生导师,E-mail:jianglf@mail.sysu.edu.cn;吴德,通信作者,E-mail:wude68@tom.com

period, isolated and identified the virus from these samples. Amplified complete E gene and complete genome with certain primers and sequenced all the products. Then the Phylogenetic, Bayesian phylogeography and mutations analysis were carried. 【Results】 40 DENV-1 strains were isolated and identified. 40 complete E gene sequences and 6 complete genome sequences of DENV-1 were obtained. Phylogenetic analysis with E gene sequences revealed that the 40 isolates were classified into two genotypes including 16 genotype I (Asia) and 24 genotype V (America/Africa). 14 genotype I isolates were clustered closest with isolates from Guangdong province (2013) and Singapore (2013) which share the nucleotide identities of 99.6% ~ 99.9%, other two genotype I isolates were clustered with strains from Malaysia (2013) and both share the nucleotide identities of 99.7%; 24 genotype V isolates were all classified in one clade with strains from Bangladesh (2009), China (2009) and Bhutan (2013) which share nucleotide identities of 99.0%~99.9%. Further analysis with six complete genome sequences showed that five isolates were clustered closest with strains isolated from Guangdong province (2013) share the nucleotide identities of 99.6%~99.8% while the sixth strains closest with strains isolated from Myanmar (2002) share the nucleotide identities of 98.8%. The isolates have five amino acid mutations compared with strains epidemic in Guangdong province in 2013, three mutations (S88V, E203G, T275R) are in the E II domain and one mutation (S305P) is in the E III domain which associated with virulence. 【Conclusions】 During the outbreak in Guangdong province in 2014, DENV-1 is the predominant causative serotype, and there are at least two different kinds of genotypes of DENV-1 largely epidemiced in the whole province. Evolution analysis reveals the multiple origins of the isolates which may origin from Guangdong province, Singapore, Malaysia, Myanmar so that we should enhance the study and surveillance of autochthonous and vectors in order to understand the epidemic way of dengue in Guangdong province. The isolates have had four mutations in the domain associated with virulence which remain further study to know their biological effects.

**Key words:** Dengue fever; Dengue virus; E gene; complete genome; phylogenetic analysis; Bayesian phylogeography analysis

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2017, 38(1): 21-28]

登革热 (Dengue fever, DF) 是由登革病毒 (Dengue virus, DENV) 感染引起的一种急性传染病, 流行于热带及亚热带的 100 多个国家和地区, 通过埃及伊蚊和白蚊伊蚊传播<sup>[1-2]</sup>。据世界卫生组织资料显示, 近 50 年来, 登革热病例增长了 30 多倍, 已成为全球性严峻的公共卫生问题<sup>[3]</sup>。我国南方在 20 世纪 20~40 年代曾有过登革热流行, 但此后登革热在我国销声匿迹数十年, 直到 1978 年又卷土重来, 首先在广东省佛山市发生暴发流行, 此后, 我国南方登革热的疫情不断, 其中广东省是登革热疫情的高发地, 病例数占全国的 90% 左右<sup>[4-5]</sup>。近年来广东省的流行趋势加剧, 2013 年和 2014 年广东省连续 2 年发生了登革热的暴发流行, 其中 2014 年的暴发流行更是近 20 年来最大的流行, 发病人数达到 45 189 人, 死亡 6 人, 对人民健康造成了严重威胁<sup>[6]</sup>。登革病毒有 4 种血清型 (DENV-1 ~ 4), 每种血清型又有多种基因型, 4 种血清型的登革病毒均在广东省引起过登革热的流行<sup>[7]</sup>。但值得注意的是, 自 1997 年以来, 广东省以 DENV-1 流行为主, 已连续 10 多年每年都有该型病毒的流行, 是引起广东省登革热的主要病原体<sup>[8-11]</sup>。因此, 登革热在广东省是否本地化的问题已受到广泛关注。本研究采集了 2014 年登

革热暴发流行期间广东省不同地区的登革热患者血清标本, 进行病毒的分离培养和分子进化及遗传变异分析, 旨在了解 2014 年登革热暴发流行的病原体的来源、分子进化特点和遗传变异特点, 从病原学的角度探讨登革热是否在广东省存在本地化的问题, 为登革热的监测及防控提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本

采集 2014 年广东省登革热暴发流行期间广东省不同地区的登革热患者急性期血清标本, 所有标本均由当地疾病预防控制中心 (CDC) 和广东省 CDC 使用登革病毒快速检测试剂盒 (PanBio, Windsor, Australia) 和 RT-PCR 检测试剂盒 (Qiagen, Germany) 确诊为登革病毒阳性标本。

### 1.2 登革病毒的分离培养与鉴定

用 20 mL/L 小牛血清 MEM 维持液 1 : 10 稀释血清标本, 取 100  $\mu$ L 稀释血清加到铺有单层 C6/36 细胞的 96 细胞孔板, 吸附 2 h 后吸弃上清液, 重新加入 200  $\mu$ L 20mL/L 小牛血清 MEM 维持液, 置 37  $^{\circ}$ C, 体积分数为 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养, 观察 5 ~ 7 d, 当细胞出现病变且病变程度达到 +++ ~ ++++

时,收集培养上清,保存于-80℃。使用登革病毒 serotype-specific real-time RT-PCR 检测试剂盒 (Qiagen, Germany) 进行型别鉴定。

### 1.3 登革病毒 1 型 E 基因和全基因组的扩增与测序

1.3.1 引物设计与基因扩增 用Primer5.0软件参考 DENV-1 的标准株 (US/Hawaii/1944) 设计 2 对 DENV-1 E 基因引物和 15 对 DENV-1 全基因组引物,为方便测序,每对全基因组引物 5' 端加上测序通用引物 (M13) 序列,引物序列见表 1。所有引物均在 Invitrogen (Life) 公司合成。先使用 Prime Script™ RT Reagent Kit (TaKaRa) 逆转录试剂盒将病毒 RNA 逆转录为 cDNA,然后再使用 TaKaRa LA Taq® (TaKaRa) PCR 试剂盒对 40 株分离株进行 E 基因扩增,并对其中 6 株进行全基因组扩增,所有 PCR 产物均进行琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.3.2 测序与拼接 所有的 PCR 产物均送 Invitrogen (Life) 公司测序,获得的序列经在线 Blast 比对,确认为 DENV-1 序列。用 DNASTar 中的 EditSeq 软件进行拼接,获得完整的 E 基因和全基因组序列。

### 1.4 E 基因和全基因组的分子进化分析

1.4.1 参考毒株的选择 在 Genbank 上下载 2015 年 12 月以前上传的具有代表性的 DENV-1 毒株的 E 基因和全基因组序列作为参考序列。共下载 230 条 DENV-1 E 基因和 69 条 DENV-1 全基因组序列。参考株入选标准: DENV-1 不同流行地区及不同流行年份的代表性毒株;有明确分离时间和分离地点的毒株; DENV-1 的 5 种基因型的代表株;登革病毒 4 个血清型 (DENV-1 ~ 4) 的标准株作为外群<sup>[12-15]</sup>。

1.4.2 系统进化分析 首先用 MEGA5.03 中的 Clustal W 方法对 40 株分离株和参考株的 E 基因序列进行比对,然后选择 MEGA5.03 中的 Neighbor-Joining (NJ) 方法构建系统进化树,进化树中每条序列命名按照 Genbank 系列号、分离地点和分离时间的顺序显示,Bootstrap 值取 1000。用 DNASTar 7 中的 MegAlign 计算核苷酸遗传距离和相似度。

1.4.3 贝叶斯进化分析 贝叶斯进化分析是将贝叶斯分析方法用于进化分析的一种分子进化分析方法,它基于马尔可夫链——蒙特卡罗 (Markov Chain Monte Carlo, MCMC) 计算方法,结合毒株的分离时间和分离地点,使用合理的核苷酸替换模

表 1 登革病毒 1 型 E 基因和全基因组的扩增和测序引物  
Table 1 Primers used for amplifying and sequencing E gene and complete genome of DENV-1

Gene	Primer sequences(5'-3')	Products
E gene	F1:TCATTTTGTGATGCTGGTAACAC	1-927
	R1:ACATCCCTTTTAAGGTCAGTTTG	
	F2:CGACAGAAATCCAAACGCTCTGGA	835-1804
	R2:CCACTAACATCTCCTACGACCACT	
M13	F:TGTAACACGACGGCCAGT	1-18
	R:CAGGAAACAGCTATGACC	
Complete Genome	F1:AGTTGTTAGTCTACGTGGACCGACAAG	1-705
	R1:TGTCTCGTCCGGTTCGCCAGTT	
	F2:CTATGGAACGTGTTCTCGAACTGGC	665-1498
	R2:CTGGGTGAGCAATCCAATGTAAGAG	
	F3:GCAACCATAACACCTCAAGCTCCTAC	1419-2290
	R3:GAAACACCGCTGAACAAAACCTCCAT	
	F4:GTACACCAGATCTTTGGAAGTCGATA	2241-3029
	R4:TTCTATCCAGTATCCCATATCGGCAT	
	F5:ATTGCGTACTCCTACACCCAAAGT	2930-3755
	R5:AAATAATAACCCGACAGCGAACA	
	F6:TGGAGCCAATGCTTCAGACAGGA	3656-4341
	R6:AGGCACCAGAGTGTCTCTGCTTCT	
	F7:GATTTATCACTGGAGAAAGCGGC	4278-5076
	R7:TCCTAAACACCTCGTCTCAATC	
	F8:GGAAATGGAGTGGTGACAACAAG	4971-5747
R8:TGTTGTGACGACATAGTCCCAGT		
F9:ATTGAGCAGAAAAACCTTTGATA	5675-6398	
R9:TATTAGATCACCTGAGACGCTTC		
F10:CCACAGGCTCTGCGCGAGTTTAAA	6333-7144	
R10:AGCGGGTTCACCTGGGAATAGCA		
F11:CACTCCTCGCCTTGGGGTGCTATT	7105-7866	
R11:TGACTTTCTTCAGCCCAGACAAT		
F12:AAGTCATAGACCTCGGTTGTGGAA	7801-8609	
R12:AGTGTCACTCATGGCTATTGTGT		
F13:GTCACACAAATAGCCATGACTGACAC	8583-9347	
R13:GACATCCATCACGGTTCATTTT		
F14:CGAACATGCCCTATTGGCTACGTCA	9248-9924	
R14:TTGGAACGGCTGAACAGATGGCA		
F15:AGGAGAGACCTGAGACTAGCGGCCA	9876-10734	
R15:AGAACCTGTTGATTCAACAGCACCA		

型和先验概率模型来模拟序列进化史进而可推算出基因的进化速率和毒株群的到最近共同祖先的时间 (the time of the most recent common ancestor, tMRCA), 并获得经优化的进化树 (maximum clade credibility tree, MCC), 通过贝叶斯进化分析对毒

株的溯源工作可以达到一个相对精准的水平。本研究用 Beast v2.4.2 进行分析,其中核苷酸替代模型选用 GTR+G4(经在线模型检测服务器 Findmodel 检测),分子钟模型采用 Relaxed clock:Uncorrelated lognormal,计算代数和取样频率的取值分别为 100 000 000 和 10 000 以确保 Effective sample size (ESS) value > 200 为标准,ESS 值等参数用 Tracer v1.6 查看,用 TreeAnnotator v1.6.1 构建 MCC 进化树,得到的 MCC 进化树用 FigTree v1.4.2 进行编辑。

1.4.4 遗传变异分析 统计分析分离株与广东省 2013 年的流行株的氨基酸变异情况及特征。

## 2 结果

### 2.1 病毒分离培养与鉴定的结果

成功分离培养与鉴定了来自广东省 8 个不同县市的 40 株 DENV-1,其中,患者年龄分布在 16~72 岁,男女比例为 5:3,发病月份在 9、10 和 11 月,毒株的分离地、命名及型别见表 2。

表 2 40 株分离株的分离地、命名及型别

Table 2 Location, name and serotype of the 40 isolates

Location	Name	Serotype	Quantity
Guangzhou	GD/GZ/01/2014—GD/GZ/03/2014	DENV-1	3
Foshan	GD/FS/01/2014—GD/FS/02/2014	DENV-1	2
Huizhou	GD/HZ/01/2014—GD/HZ/04/2014	DENV-1	4
Chaozhou	GD/CZ/01/2014—GD/CZ/06/2014	DENV-1	6
Jieyang	GD/JY/01/2014—GD/JY/10/2014	DENV-1	10
Shanwei	GD/SW/01/2014—GD/SW/04/2014	DENV-1	4
Maoming	GD/MM/01/2014—GD/MM/08/2014	DENV-1	8
Meizhou	GD/MZ/01/2014—GD/MZ/03/2014	DENV-1	3
Total			40

### 2.2 基因扩增与测序的结果

通过基因扩增与测序获得了 40 株分离株的完整 E 基因序列(1 485 bp)和 6 株分离株的全基因组序列(10 734 bp)。

### 2.3 分离株 E 基因的分子进化分析

2.3.1 分离株 E 基因的系统进化分析 由 40 株分离株与参考株 E 基因构建的进化树可以看出, DENV-1 分为 5 种基因型,40 株分离株有 16 株为基因 I 型(亚洲型),24 株为基因 V 型(美洲/非洲型)。16 株基因 I 型毒株分布在 3 个不同的分支上,其中, GD/GZ/01/2014 等 14 株(clade A)集中分

布在一个分支上,与 2013 年广州市流行的毒株和 2013 年新加坡流行的毒株高度同源,核苷酸相似度为 99.6%~99.9%; GD/MZ/03/2014 (clade B) 和 GD/GZ/02/2014 (clade C) 均分别与 2013 年马来西亚流行的毒株亲缘关系最近,核苷酸相似度为 99.7%。全部 24 株基因 V 型分离株在一个分支上 (clade D),与 2009 年孟加拉、广州市,2013 年不丹流行的毒株同源性高,核苷酸相似度为 99.0%~99.9%(图 1)。

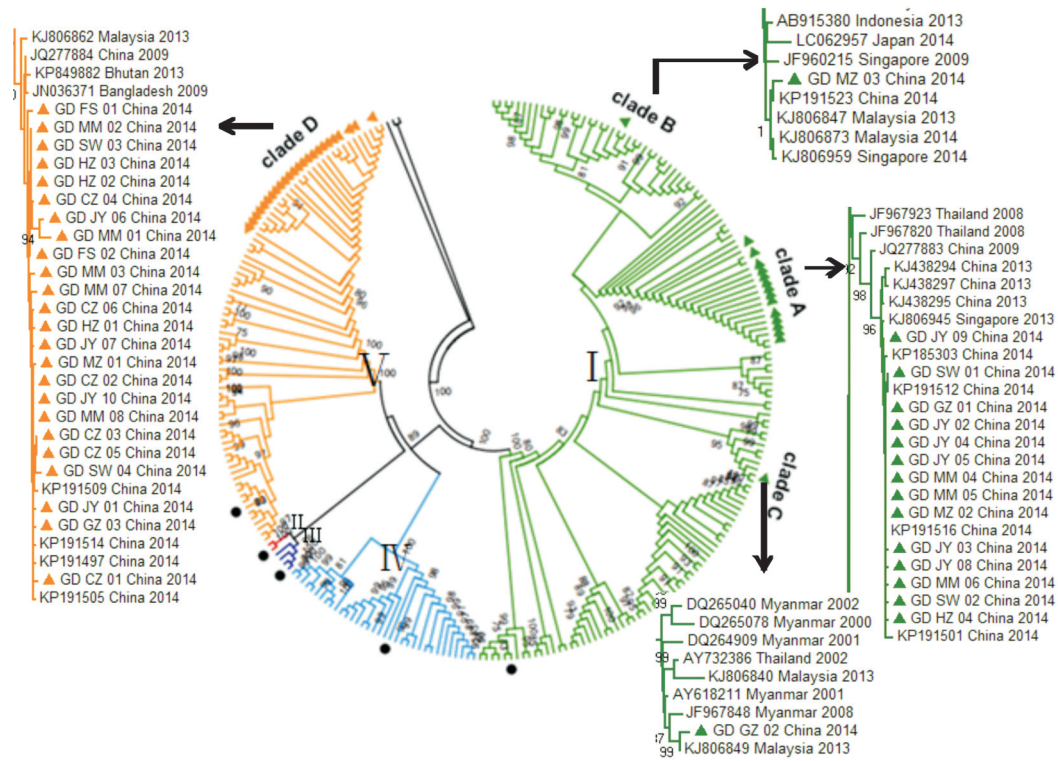
2.3.2 分离株的流行地域分布 根据分离地点和基因分型将 40 株分离株在地图上标示后,2 种基因型均广泛分布于广东省的珠三角、粤东、粤西及粤北各个区域(图 2)。

2.3.3 分离株 E 基因的贝叶斯分析 贝叶斯进化分析结果显示 DENV-1 的 E 基因进化速率是  $6.217 \times 10^{-4}$  substitutions/site/year (95% HPD:  $5.464 \times 10^{-4} \sim 7.003 \times 10^{-4}$ )。由 40 株分离株和参考株 E 基因的 MCC 进化树(图 3)发现, MCC 树的拓扑结构与系统进化分析构建的 NJ 树的拓扑结构基本一致,40 株分离株也是在 4 个不同的分支上 (clade 1~4)。其中, GD/GZ/01/2014 等 14 株 (clade 1) 的 tMRCA 是 2010.8 年 (95%HPD: 2009.6~2012.3),表示 clade 1 的 14 株分离株可往前追溯至 2010 年 9~10 月,是从那时开始分化来的, clade 4 的 tMRCA 是 2008.8 年 (95% HPD: 2006.9~2008.9), GD/MZ/03/2014 和 GD/GZ/02/2014 分别单独在 clade 2 和 3 上。

2.3.4 分离株 E 基因的遗传变异分析 与广东省 2013 年的流行株比较,16 株广东省 2014 年的 DENV-1 基因 I 型分离株 E 蛋白共有 5 个氨基酸位点的变异,其中有 3 株毒株有 1 个变异,1 株毒株有 2 个变异,12 株毒株无变异。5 个变异位点中有 4 个位于登革病毒毒力位点区域, S88V、E203G、T275R 位于 E II 区的毒力位点区域, S305P 位于 E III 区的毒力位点区域(表 3)。

### 2.4 分离株全基因组的遗传进化分析

6 株分离株与参考株的全基因组序列进化分析发现,其中 5 株分离株与 2013 年广东省广州市流行的毒株和 2013 年广东省中山市流行的毒株高度同源,核苷酸相似度为 99.6%~99.8%,第 6 株则在基因 I 型的另一个小分支上,与 2002 年缅甸流行的毒株亲缘关系最近,核苷酸相似度为 98.8%(图 4)。



The green, dark blue, red, blue and orange branch represent genotype I ~ V of DENV-1. The represent strains of five genotypes of DENV-1 was marked with dark solid dot. 40 isolates were in four differents clades and classified into two genotypes including 16 genotype I (▲) and 24 genotype V (●).

图1 40株DENV-1分离株与参考株E基因的系统进化树

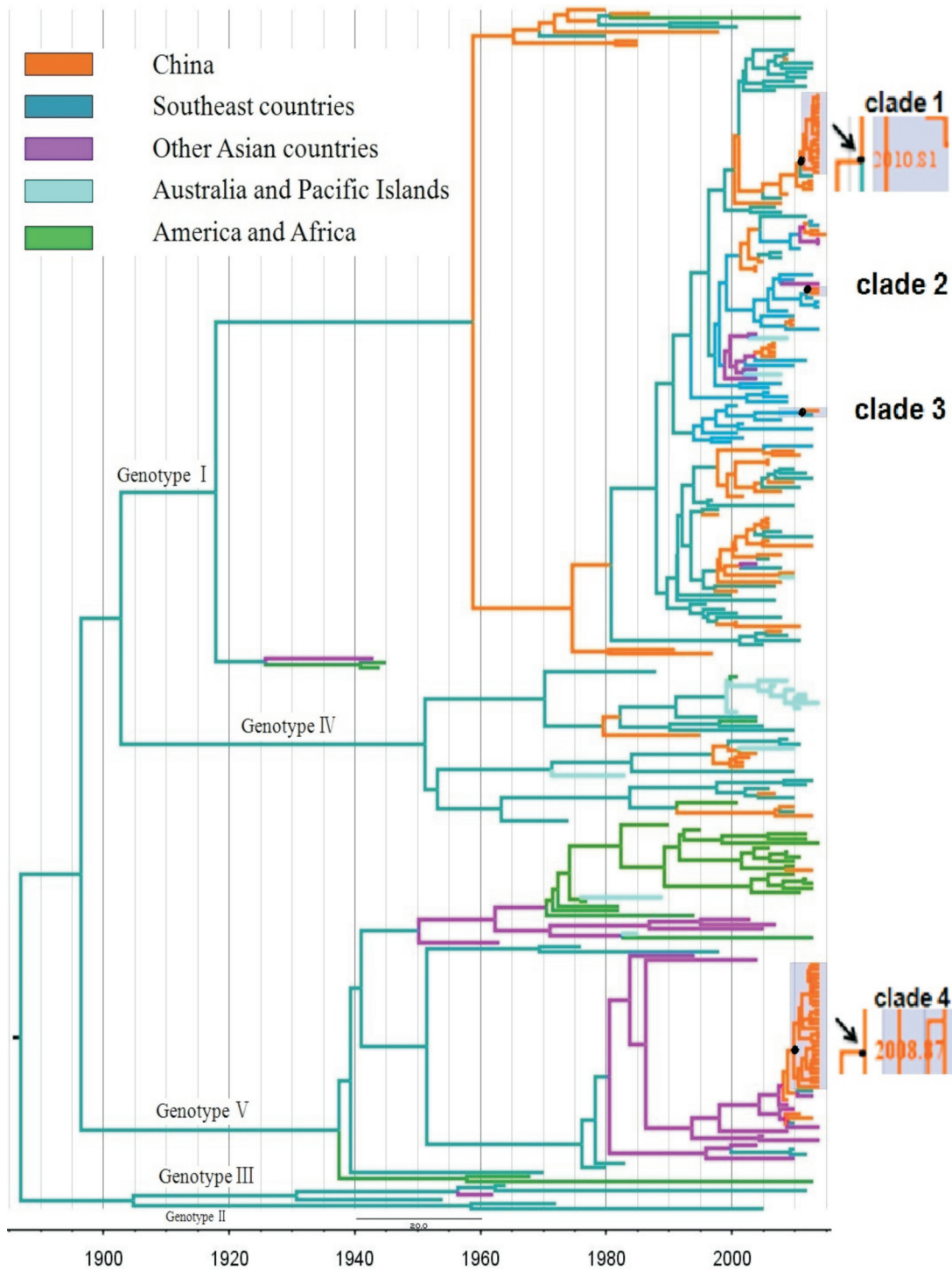
Fig.1 Phylogenetic tree of 40 DENV-1 isolates and references constructed with E gene sequences



Every orange and green solid dot represent one genotype I and genotype V isolate respectively.

图2 40株分离株在广东省的流行分布图

Fig.2 Distribution of the 40 isolates in Guangdong province



The strains from different regions were marked in indicated colors. The 40 isolates in present study are placed in gray box. Estimated age (tM-RCA) of some relevant nodes on the tree are enlarged and showed beside the tree.

图3 40株DENV-1分离株与参考株E基因分析的MCC进化树

Fig.3 The maximum clade credibility (MCC) tree of 40 isolates and reference strains constructed with E gene sequences

### 3 讨论

本研究分离的40株广东省2014年的流行毒

株均为DENV-1,16株是基因I型(亚洲型),24株是基因V型(美洲/非洲型),这2种基因型的毒株均在省内广泛分布。40株分离株E基因系统进化分析和贝叶斯进化分析的结果均显示16株基因

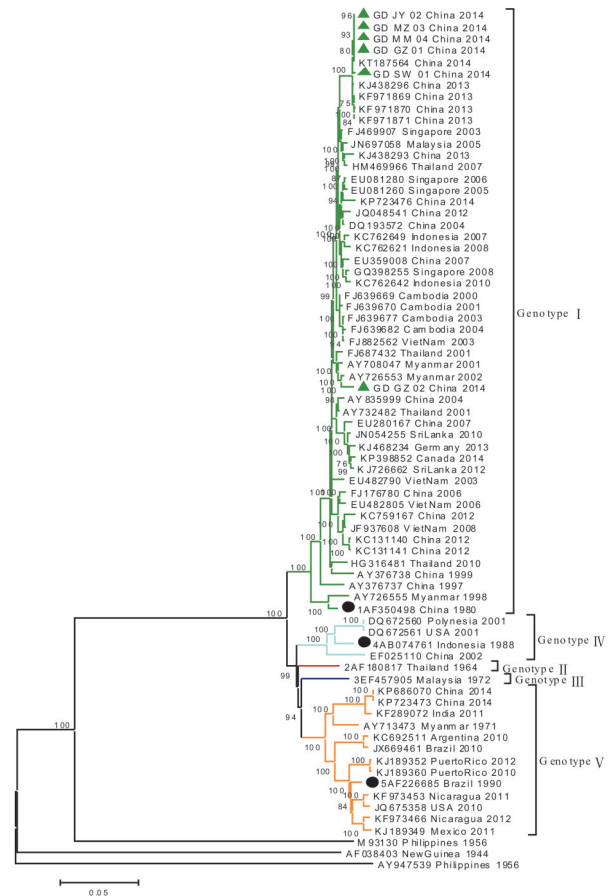
表3 DENV-1 基因 I 型分离株与广东省 2013 年流行株 E 蛋白氨基酸变异统计表

Table 3 Summary of amino acid mutations in E protein of DENV-1 genotype I isolates and 2013 isolates in Guangdong province

Name of strain	Year	Amino acid positions in E protein				
		88	203	275	301	305
GZ22(KJ438294)	2013	S	E	T	M	S
GZ23(KJ438294)	2013	-	-	-	-	-
GZ28(KJ438297)	2013	-	-	-	-	-
GD/GZ/01/2014	2014	-	-	-	-	-
GD/GZ/02/2014	2014	-	G	-	-	-
GD/HZ/04/2014	2014	V	-	-	-	-
GD/JY/03/2014	2014	-	-	-	-	-
GD/JY/04/2014	2014	-	-	-	-	-
GD/JY/05/2014	2014	-	-	-	-	-
GD/JY/08/2014	2014	-	-	-	-	-
GD/JY/09/2014	2014	-	-	-	-	-
GD/MZ/03/2014	2014	-	-	R	I	-
GD/MM/04/2014	2014	-	-	-	-	-
GD/MM/05/2014	2014	-	-	-	-	-
GD/MM/06/2014	2014	-	-	-	-	-
GD/SW/01/2014	2014	-	-	-	-	-
GD/SW/02/2014	2014	-	-	-	-	P

I 型毒株中有 14 株与 2013 年在广东省广州市的毒株和 2013 年在新加坡的毒株高度同源,核苷酸相似度达 99.6%~99.9%,另外 2 株分离株则均与 2013 年马来西亚的毒株亲缘关系最近;24 株基因 V 型分离株均与 2009 年孟加拉、广东省广州市,2013 年不丹的毒株同源性高。因此,2014 年广东省登革热大暴发的病原体不是单一来源,是多途径来源,可能来源于 2013 年广东省本省的毒株,也可能是来源于新加坡、马来西亚、孟加拉等国家的毒株,值得注意的是,2013 年广东省流行的毒株可能是重要来源之一。

为了进一步验证上述结果,选择 6 株有代表性的 2014 年 DENV-1 基因 I 型分离株作全基因组进化分析,结果显示有 5 株与 2013 年广东省广州市和中山市 DENV-1 毒株高度同源,核苷酸相似度达 99.6%~99.8%,第 6 株则与 2002 年缅甸流行的毒株亲缘关系更近。全基因组进化分析的结果与 E 基因进化分析的结果相一致,共同提示 2014 年广东省登革流行毒株是多途径来源,且与 2013



Six isolates were marked with dark solid triangle, the represent strains of five genotypes of DENV-1 was marked with dark solid dot.

图4 6株 DENV-1 分离株与参考株全基因组分析的系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of 6 isolates and reference strains constructed with complete genome sequences

年广东省流行毒株高度同源,2013 年广东省流行的毒株可能是本次流行重要来源之一。

DENV 的基因型分布具有地理分布特点, DENV-1 有 5 种基因型 (I ~ V), 研究发现, 基因 I 型主要在亚洲(中国、日本等)和东南亚国家(越南、老挝、缅甸等)流行, 基因 II 型和基因 III 型分别主要在泰国和马来西亚国家流行, 基因 IV 型主要在澳大利亚、印度尼西亚等国家流行, 基因 V 型则主要是在美洲和非洲一些国家流行<sup>[7, 14, 16-17]</sup>。随着国家和洲际间贸易和旅游交流的发展, 这种基因型分布也发生变化, 出现流行基因型多样化的特点。本研究贝叶斯进化分析的结果同样提示基因型分布具有地理分布特点, 且其地理分布整体格局还没有大的改变, 但更趋多样性和复杂性, 在

我国,DENV-1的5种基因型中有3种基因型(I、IV、V型)发生过流行,以基因I型为主。

进化分析发现2014年广东省DENV-1基因I型分离株与广东省2013年的毒株成簇分布,高度同源,因而我们进一步分析了2014年的基因I型分离株与广东省2013年的流行毒株的氨基酸变异特点。研究发现,与广东省2013年的流行株比较,16株2014年的DENV-1基因I型分离株E蛋白共有5个氨基酸位点发生变异,其中的4个位于登革病毒毒力位点区域,S88V,E203G,T275R位于EⅡ区的毒力位点区域,S305P位于EⅢ区的毒力位点区域,提示应该对上述变异的生物学意义进行进一步的研究。

现有的研究资料显示,在2004-2015年的11年间广东省每年都有DENV-1基因I型的流行或暴发流行,有研究者提出登革热在广东省可能已经由以输入为主的流行方式转向地方性流行<sup>[5,8,14]</sup>。然而要证实广东省登革热是否已转变为地方性流行的问题,尚需对其病原学、流行病学和传播媒介进行大量的研究,需进一步阐明登革病毒在广东省的生态学、流行病学及传播媒介带毒越冬等问题<sup>[18]</sup>。

#### 参考文献

- [1] 秦鄂德,秦成峰,姜涛. 登革病毒与登革病毒病[M]. 北京:科学出版社,2008:1-5
- [2] Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, et al. Flavivirus genome organization, expression, and replication [J]. *Annu Rev Microbiol*, 1990, 44: 649-688.
- [3] World Health Organization. Fact sheet no. 117 [EB/OL]. (2015-15)[2016-3-14]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/zh/>
- [4] Qiu FX, Gubler DJ, Liu JC. Dengue in China: a clinical review [J]. *B World Health Organ*, 1993, 71(3-4): 349-359.
- [5] 熊益权,陈清. 1978-2014年我国登革热的流行病学分析[J]. *南方医科大学学报*, 2014, 34(12): 1822-1825.
- [6] 广东省卫生和计划生育委员会. 广东省登革热疫情通报[EB/OL]. (2015-02-15)[2016-03-14]. <http://www.gdwst.gov.cn/a/yiqingxx/2015021513046.html>.
- [7] Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in Nature [J]. *Virology*, 1990, 174(2): 479-493.
- [8] Shen SQ, Wei HX, Fu YH, et al. Multiple sources of infection and potential endemic characteristics of the large outbreak of dengue in Guangdong in 2014 [J]. *Sci Rep*, 2015, 5, e: 16913.
- [9] Wu JY, Lun ZR, James AA, et al. Dengue fever in mainland China [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2010, 83(3), 664-671.
- [10] Jiang C, Schieffelin JS, Li J, et al. Dengue fever: a new challenge for China [J]? *Glob Health Action*, 2014, 7, 26421.
- [11] Guo RN, Lin JY, Lin JH, et al. The prevalence and endemic nature of dengue infections in Guangdong, South China: an epidemiological, serological, and etiological study from 2005-2011 [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1), e85596.
- [12] Rico-Hesse R. Microevolution and virulence of dengue viruses [J]. *Adv Virus Res*, 2003, 59: 315-341.
- [13] Goncalvez AP, Escalane AA, Pujol FH, et al. Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1 [J]. *Virology*, 2002, 303(1), 110-119.
- [14] Villabona-Arenas CJ, Zanotto PM. Worldwide spread of dengue virus type 1 [J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e62649.
- [15] Kyle JL, Harris E. Global spread and persistence of dengue [J]. *Annu Rev Microbiol*, 2008, 62: 71-92.
- [16] Wang BH, Yang HL, Feng Y, et al. The distinct distribution and phylogenetic characteristics of dengue virus serotypes/genotypes during the 2013 outbreak in Yunnan, China [J]. *Infect Genet Evol*, 2016, 37: 1-6.
- [17] Sun Y, Meng SL. Evolutionary history and spatiotemporal dynamics of dengue virus type 1 in Asia [J]. *Infect Genet Evol*, 2013, 16: 19-26.
- [18] Sun JF, Wu D, Zhou HQ, et al. The epidemiological characteristics and genetic diversity of dengue virus during the third largest historical outbreak of dengue in Guangdong, China, in 2014 [J]. *J Infect*, 2016, 72: 80-90.

(编辑 徐杰)