

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.15.011

2019 年汕头市登革热病例临床表现与病毒包膜蛋白分子特征研究^{*}

郭 川,张旭彬,张志华

广东省汕头市疾病预防控制中心,广东汕头 515041

摘 要:**目的** 分析 2019 年汕头市登革热疫情中病例的临床表现以及实验室检测结果之间的相关性,为临床医生及检测人员对登革热病例的判定提供数据支持。**方法** 回顾性分析患者就诊时的临床表现、核酸检测结果,根据患者的发病时间进行聚类分组,统计各个发病天数组中病例的临床表现及核酸检测呈阳性的比例;同时对 2019 年流行毒株的 E 基因进行序列测定,推导并比对分析包膜蛋白的氨基酸序列。**结果** 临床表现中发热比例最大,为 96.84%,眼眶痛比例最小,为 8.99%;头痛及骨关节肌肉疼痛在早期的病例中比例较高,皮疹则在恢复期的病例中比例较高;核酸检测结果显示,在发病第 7 天阳性病例比例下降;流行毒株间有 1~2 个位点的氨基酸发生变异,但主要潜在毒力位点的氨基酸残基保持一致。**结论** 2019 年登革热疫情中的病例临床表现以轻症为主,主要症状有:(1)头痛及骨关节肌肉疼痛,提示处于发病早期;(2)皮疹体征,提示处于恢复期。推定流行毒株属于弱毒株。

关键词:登革热; 临床表现; 发病时间; 包膜蛋白; 序列

中图法分类号:R183.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2021)15-2185-04

Study on clinical manifestations of cases of Dengue fever in Shantou City during 2019 and molecular characteristics of viral envelope protein^{*}

GUO Chuan,ZHANG Xubin,ZHANG Zhihua

Shantou Municipal Center for Disease Control and Prevention,Shantou,Guangdong 515041,China

Abstract: Objective To analyze the correlation between the clinical manifestations of the cases and laboratory detection results in the Dengue fever epidemic in Shantou City during 2019 so as to provide the data support for the judgment of the clinical doctors and laboratory detection personnel on the cases of Dengue fever. **Methods** The clinical manifestations and nuclear acid detection results when the patients visited to the hospital were retrospectively analyzed. The clustering grouping was conducted according to the onset time. The clinical manifestations of the cases in the onset days groups and ratio of nuclear acid detection positive results were statistically analyzed. Meanwhile, the E gene of the epidemic strains in 2019 conducted the sequence detection, and the amino acid sequence of the envelope protein was deduced and conducted the comparative analysis of amino acid sequence. **Results** The ratio of fever was maximal in the clinical manifestations, which was 96.84%, while the ratio of orbital pain was minimal, which was 8.99%; the proportion of headache and arthralgia in early cases were high, while the proportion of skin rash was high in convalescent cases; the result of nucleic acid detection showed that the proportion of positive cases was decreased on 7 d after the onset; there were 1—2 loci of amino acid mutation in the epidemic strains, but the amino acids of main potential toxicity loci remained the consistence. **Conclusion** The clinical manifestation in main cases of Dengue fever during 2019 epidemic was dominated by mild cases, the main symptoms were: (1) headache and arthralgia, which indicates that they are in the early stages of onset; (2) skin rash sign, indicating the recovery stage. The epidemic strains was presumed to belong to weakly toxic strains.

Key words: Dengue fever; clinical manifestations; onset time; envelop protein; sequence

登革热(DF)是流行于热带与亚热带地区的一种 虫媒传染病。它以登革病毒(DENV)为病原体,以白

^{*} 基金项目:广东省汕头市科技计划项目(ST2018032)。

作者简介:郭川,男,副主任技师,主要从事病原微生物学方面的研究。

本文引用格式:郭川,张旭彬,张志华. 2019 年汕头市登革热病例临床表现与病毒包膜蛋白分子特征研究[J]. 检验医学与临床, 2021, 18

纹伊蚊和埃及伊蚊为主要传播媒介,每年在世界上造成超过 5 000 万人感染^[1],给世界公共卫生体系带来较大冲击。登革热根据所呈现的症状分为普通型和重症两种。普通型主要临床表现以发热(通常超过 38℃)以及关节和肌肉疼痛为主;重症则以登革出血热(DHF)及登革休克综合征(DSS)为代表,较为严重时会危及生命^[2]。有报道称登革病毒包膜蛋白上的潜在毒力位点决定了毒株的毒力,从而影响了病毒感染机体后的临床表现^[3-4]。因此,对流行毒株包膜蛋白的分子特征,特别是氨基酸进行序列分析,可以对该毒株的毒力做出评估和预测,从而为登革热疫情流行期间病例所呈现的临床特征分析提供分子生物学依据^[5]。本文将汕头市 2019 年登革热疫情期间的病例所呈现的临床表现及实验室检测的结果进行分析及总结,探讨临床表现、实验室结果同疾病病程之间的关系,为临床医生识别与判断登革热病例提供数据及技术支持;同时对主要流行毒株的包膜蛋白氨基酸序列进行比对分析,对潜在毒力位点进行判别和毒力评估,从分子生物学的角度为该年疫情中患者所呈现的临床特征进行解释。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2019 年汕头市登革热病例就诊时所口述的发病时间,主要症状(剧烈头痛、骨关节肌肉疼痛、眼眶痛)及呈现的体征(体温、皮疹)等信息,以及病例的核酸检测结果。

1.2 方法 将该年发现的所有登革热病例根据口述的发病时间进行聚类分组,发病 24 h 之内的归为 0 d、列为 0 组,发病 24~48 h 的归为 1 d、列为 1 组,以此类推,将发病 ≥ 10 d 列为 10⁺组,共分 11 个组。统计每个组的病例中各种临床表现的比率(具有该临床表现的病例数/该组病例数),以及实验室核酸检测的阳性率。对核酸阳性的确诊病例标本进行包膜蛋白编码基因(E 基因)的全长扩增和序列测定,方法参照之前的报道^[6]。获得序列以后,采用生物信息学软件 DNASTAR/SeqMan 进行序列剪切和拼接,用 MEGA 6.0 进行编码蛋白氨基酸翻译和比对(氨基酸序列系统进化树的构建采用 Neighbor-Joining 邻接法),同时参考赵卫等^[7]所报道的潜在毒力位点,对流行毒株的毒力位点氨基酸进行分析。

2 结果

2.1 核酸检测结果随发病时间增加的变化 2019 年所报道的 943 病例中,根据发病到标本采集的时间进行聚类分组,一共分为 11 个组,每组分别检测 63、172、177、141、136、104、66、32、27、11、14 份标本。从图 1 可以看出绝大部分就诊病例处于发病时间 0~5 d 的阶段,此阶段的核酸检测结果大部分呈阳性(构成比 $>80\%$)。也有一部分病例在发病 6 d 后才就诊,可

见该部分病例的核酸检测结果阳性率明显下降。发病时间越长阳性率下降越明显,但也有病例发病 10 d 后核酸检测结果依然呈阳性。

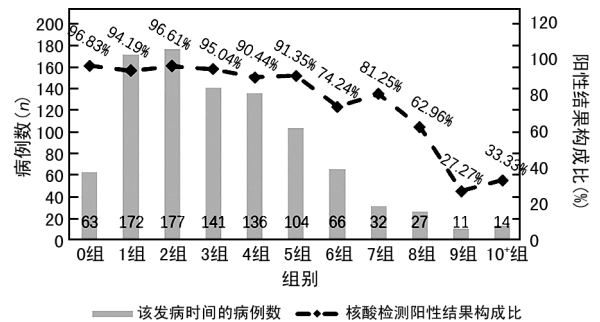


图 1 不同发病时间组核酸检测阳性率的变化

2.2 临床表现的分析结果 943 例病例中共追溯到了 790 例就诊时的临床表现情况,根据追溯到的病例的发病时间分为 11 组(分别代表发病从 0~ ≥ 10 d),每组分别分析了 41、139、147、120、126、83、51、32、27、10、14 例,见表 1。从总体上看,发热是病例最主要的临床表现,约有 96.84% 的病例有发热体征,而且发热体征在发病后 10 d 内都基本存在,可见发热是登革热病例最重要的体征;具有骨关节肌肉疼痛临床表现的病例构成比也较高(53.16%),主要分布在病程的前 7 d,从第 8 天开始,有该症状的病例数迅速下降;有头痛症状的病例与骨关节肌肉疼痛类似,病程前期所占比例较高,后期较低;有皮疹出血体征的病例随着发病时间的延长,构成比逐渐上升,可见在病程后期,有较高比例的病例呈现皮疹出血体征;有眼眶痛症状的病例在整个病程中都呈现较低的构成比。临床上主要以轻症为主,尚未发现 DHF 或 DSS 的病例,未发现死亡病例。

2.3 毒株包膜蛋白分子特征分析 从 811 例病例中共获得 85 条登革病毒 E 基因序列,其中 1 型病毒 62 条,2 型病毒 23 条。3 型和 4 型病毒由于阳性较弱无法获得其毒株序列。流行毒株包膜蛋白氨基酸序列经过精简(对氨基酸相似度 100% 的序列进行精简,1 型病毒 62 条序列精简后剩下 12 条,2 型病毒 23 条序列精简后剩下 8 条)后进行遗传进化分析。从分析(图 2)结果可以看出,2019 年流行的登革病毒毒株大致可分为主要流行毒株和次要毒株。主要流行毒株包括登革 1 型病毒中序号为 D1/China/GDSt19/9、D1/China/GDSt19/16、D1/China/GDSt19/600、D1/China/GDSt19/604、D1/China/GDSt19/793、D1/China/GDSt19/961、D1/China/GDSt19/1164 等毒株(图 2A),以及登革 2 型病毒中序号为 D2/China/GDSt19/25、D2/China/GDSt19/340、D2/China/GDSt19/413、D2/China/GDSt19/532、D2/China/GDSt19/846、D2/China/GDSt19/983 等毒株(图 2B);同型主要流行毒株之间的氨基酸序列相似度达 100%。次要毒株与主

要流行毒株有 1~2 个位点的氨基酸发生变异,包括登革 1 型病毒中序号为 D1/China/GDSt19/3、D1/China/GDSt19/13、D1/China/GDSt19/591、D1/China/GDSt19/1117 和 D1/China/GDSt19/1159 等毒株(图 2A),以及登革 2 型病毒中序号为 D2/China/GDSt19/53 和 D2/China/GDSt19/584 等毒株(图 2B)。将氨基酸序列相似度 100% 主要流行毒株序列

中选择一条作为代表序列(登革 1 型选序号 D1/China/GDSt19/9,登革 2 型选序号 D2/China/GDSt19/25)与次要毒株氨基酸序列进行比对的结果显示,主要流行毒株与次要毒株的氨基酸序列在潜在的毒力位点(DENV-1 的 E44-E、E156-T、E366-N 和 DENV-2 的 E71-A、E126-E、E383-385-E-P-G、E390-S)氨基酸残基都保持一致。

表 1 各种临床表现的病例数及构成比[% (n/n)]

临床表现	具有该临床表现的构成比	各发病时间的临床表现构成比			
		0 d	1 d	2 d	3 d
发热	96.84(765/790)	92.68(38/41)	99.28(138/139)	99.32(146/147)	95.83(115/120)
剧烈头痛	31.90(252/790)	17.07(7/41)	34.53(48/139)	36.73(54/147)	31.67(38/120)
骨关节肌肉疼痛	53.16(420/790)	46.34(19/41)	53.96(75/139)	53.74(79/147)	46.67(56/120)
眼眶痛	8.99(71/790)	2.44(1/41)	7.19(10/139)	9.52(14/147)	9.17(11/120)
皮疹出血	24.43(193/790)	14.63(6/41)	11.51(16/139)	13.61(20/147)	22.50(27/120)

临床表现	各发病时间的临床表现构成比						
	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	≥10 d
发热	95.24(120/126)	97.59(81/83)	98.04(50/51)	93.75(30/32)	96.30(26/27)	100.00(10/10)	78.57(11/14)
剧烈头痛	31.75(40/126)	26.51(22/83)	35.29(18/51)	43.75(14/32)	29.63(8/27)	10.00(1/10)	14.29(2/14)
骨关节肌肉疼痛	60.32(76/126)	57.83(48/83)	66.67(34/51)	59.38(19/32)	29.63(8/27)	40.00(4/10)	14.29(2/14)
眼眶痛	11.90(15/126)	9.64(8/83)	15.69(8/51)	3.13(1/32)	7.41(2/27)	10.00(1/10)	0.00(0/14)
皮疹出血	25.40(32/126)	36.14(30/83)	41.18(21/51)	62.50(20/32)	37.04(10/27)	50.00(5/10)	42.86(6/14)



注:A 为登革 1 型病毒;B 为登革 2 型病毒。

图 2 2019 年登革病毒包膜蛋白序列的遗传进化分析

3 讨 论

每年夏秋之际,登革热疫情的预警及防控都得到各地卫生行政及疾病控制部门的重视。2018 年卫生行政部门出台了新版的《登革热诊断标准:WS218-2018》^[8],该方案将具有发热、头痛/骨关节痛/眼眶痛和皮疹临床表现的患者作为疑似病例。病例的临床表现判断在该病的早期识别中起到至关重要的作用。2019 年,汕头市暴发了严重的登革热疫情,截至 2019 年末共报道了 943 例病例^[9]。在所报道的病例

中,大多数患者为症状轻微和普通型病例,未发现重症登革热病例。主要临床表现为发热(96.84%)和骨关节肌肉疼痛(53.16%)。之前有报道称登革热患者最主要的临床表现为发热和肌肉关节疼痛^[10-11],本文结论与之基本一致。症状轻微有可能是因为流行毒株属于弱毒株。对登革病毒的包膜蛋白氨基酸序列分析结果显示,主要潜在毒力位点登革 1 型病毒为 E44-E、E156-T、E366-N;登革 2 型病毒为 E71-A、E126-E、E383-E-P-G-E385、E390-S,不但 2019 年的所有毒株氨基酸残基都保持一致,而且与 2015—2017 年的流行毒株氨基酸序列保持一致^[5]。因此可以解释病例的症状普遍与前些年流行的毒株十分相似,以发热和骨关节肌肉疼痛为主,未见重症病例。虽然在潜在毒力位点之外的区域,2019 年毒株的包膜蛋白还是发生了 1~2 个氨基酸的变异,但是产生的变异对病例的临床表现没有产生明显的影响。感染主要流行毒株与次要毒株的病例的临床症状和体征没有表现出明显的差异。

症状轻微,虽然说明该病未对患者身体造成严重伤害,但也会造成患者未及时就医导致病例控制上的遗漏,给社区的登革热防控造成较大的压力。在疫情流行期间,临床医生为了防止遗漏病例,往往将具有

轻微临床表现的患者列为疑似病例进行实验室筛查检测。一般来说,登革病毒的实验室检测共需要进行 NS1 抗原、核酸及 IgM 和 IgG 抗体 4 个项目的检测。其中 NS1 抗原在发病 1 d 后便可在患者体液中检测到,并持续到第 9 天左右。在检出 NS1 抗原的同时也可在体液中检出登革病毒核酸,并持续到第 7 天^[12]。核酸检测结果作为登革热病例的确诊依据^[8],确立了核酸检测在该病诊断中的地位。但核酸检测主要适合应用于发病早期病例标本的检测,此时血液中病毒核酸的丰度较高。在病程后期由于机体产生了免疫应答,病毒在血液中的浓度逐渐下降,此时无法在标本中检出核酸。但本文发现登革病毒核酸在发病 7 d 后的病例中仍有大部分能够被检出,可能是由于商业化检测试剂的不断优化改进,使得原来丰度较低的病毒核酸标本依然能被检出。这提示可将发病 10 d 之内的病例都进行核酸检测及分型,以提高确证病例的比例。发病 10 d 之后的病例需辅以抗体检测以区分恢复期病例或既往感染。

降低排查门槛(将具有轻微临床表现的患者列为疑似病例进行实验室筛查检测),增加排查检测项目,虽然提高了检出率,降低了遗漏病例的风险,但却给实验室带来较大的排查压力。本研究结果表明,可根据病例的临床表现,对该病例进行一定程度的病程研判,进而采取不同的检测策略。其中最有判别意义的两个临床表现为骨关节肌肉疼痛和皮疹。以发病 7 d 为界,骨关节肌肉疼痛提示病例可能处于发病 7 d 以内,核酸可能为阳性;而皮疹出现预示着病例发病已有 7 d,核酸丰度降低,可能检测结果为阴性,必须进行抗体检测。

参考文献

[1] GUZMAN M G, HALSTEAD S B, ARTSOB H, et al. (上接第 2184 页)
cn/guihuaxxs/s3586s/201610/21d120c917284007ad9c7aa8e9634bb4.shtml.

[6] 李海燕,杨晓红,曾莉萍,等.成都市某乡村居民健康素养现状及干预对策研究[J].成都医学院学报,2019,14(5):658-661.

[7] 石建辉,刘秀荣,黄丽巧.北京市 2012 年城乡常驻居民健康素养水平分析[J].中国公共卫生,2016,32(3):394-397.

[8] 奚艳花,徐伟,任文军,等.上海市原闸北区 2015 年城乡居民健康素养状况调查[J].上海预防医学,2017,29(4):327-330.

[9] 张岚,戴世英,张丽,等.我国居民健康素养状况研究进展[J].护理管理杂志,2015,15(10):717-718.

[10] 李志新,李朗悦.2014 年四川省居民健康素养现状及影

Dengue:a continuing global threat[J].Nat Rev Microbiol,2010,8(12 Suppl):S7-S16.

[2] 姜舒,柯昌文.全球登革热流行现状分析[J].国际流行病学传染病学杂志,2011,38(3):194-197.

[3] 李粤平,王建,赵令斋,等.9 例重症登革热死亡病例分析[J].中华传染病杂志,2019,37(11):646-650.

[4] 方丹云,周经姣,黄骥斌,等.登革病毒流行株的分离鉴定及其毒力位点变异研究[J].生物技术,2006,16(2):26-27.

[5] 郭川,钟秀珠,张旭彬,等.2015—2017 年汕头市登革病毒分子流行病学研究[J].现代预防医学,2020,47(17):3228-3233.

[6] 杨慧勤.广东登革 2 型及 4 型病毒致病性研究及毒力位点分析[D].广州:广州医科大学,2015.

[7] 赵卫,杨佩英.登革病毒毒力研究进展[J].中华实验和临床病毒学杂志,2001,15(2):197-199.

[8] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会.登革热诊断标准:WS 216-2018[S].北京:中国标准出版社,2018.

[9] 郭川,钟秀珠,林洁敏,等.2018 年和 2019 年汕头市登革病毒 E 基因分子特征比较分析[J].中华微生物学和免疫学杂志,2021,41(4):295-300.

[10] 周钿,洪英极,孙铭繁,等.登革热病程影响因素及临床特征分析[J].汕头大学医学院学报,2019,32(3):154-156.

[11] 张霞意,张复春,胡凤玉,等.2010 年广州登革热患者临床及实验室特征分析[J].实用医学杂志,2011,27(19):3480-3482.

[12] 郭川,林洁敏,陈婉,等.1 例急性期的 2 型登革病毒感染病例的检测分析[J].中华实验和临床病毒学杂志,2019,33(4):437-439.

(收稿日期:2020-11-08 修回日期:2021-05-17)

响因素分析[J].预防医学情报杂志,2017,33(10):1032-1041.

[11] 刘美彤.吉林省就业流动人口健康认知及健康教育情况研究[D].长春:吉林大学,2017.

[12] 庄润森,向月应,韩铁光,等.健康短信平台对公众健康素养的干预效果:基于深圳市健康素养快速评价系统的研究[J].中国社会医学杂志,2016,33(5):4.

[13] 唐美玲,邓立鹏,王宏秀,等.2016 年北流市城乡居民健康素养现状调查分析[J].应用预防医学,2018,24(2):139-142.

[14] 王刚,高皓宇,李学军,等.2012 年天津市居民健康信息素养水平分析[J].中国健康教育,2014,30(8):675-678.

(收稿日期:2020-12-26 修回日期:2021-04-28)