

中国天津市一例缅甸输入基孔肯雅热病例的病毒基因分型

谢彤 吕莉琨 谭昭麟 李力 吕杰 李晓燕

天津市疾病预防控制中心 300011

通信作者: 李晓燕, Email: xiaoyanli1291@163.com

【摘要】 目的 对天津市1例输入基孔肯雅热病例开展病毒基因分型,确定基孔肯雅病毒(CHIKV)与全球主要流行株的关系。**方法** 提取临床症状疑似为CHIKV感染患者血清中RNA,采用荧光定量RT-PCR法检测CHIKV核酸。两步RT-PCR法扩增编码CHIKV包膜糖蛋白E1的基因,扩增产物经测序后开展测序分析。将测序结果与全球其他地区流行毒株一同构建系统发生树。**结果** 天津市输入型CHIKV基因分型属于能够感染白纹伊蚊并在其体内繁殖的东/中/南非基因型印度洋亚型(ECSA-IOL)。系统发生树分析表明,此次输入的CHIKV与2016—2017年在巴基斯坦、意大利、孟加拉国等国家流行的CHIKV毒株高度同源,序列的同源性高达99.4%,并与这些国家流行的CHIKV毒株共同组成1个基因分型簇。**结论** 此次输入性基孔肯雅热病例感染的毒株更容易在人群中传播,提示应加强对基孔肯雅热输入性病例的防控工作,以防止该蚊媒传染病在我国发生本地聚集性传播。

【关键词】 基孔肯雅病毒; 基孔肯雅热; 输入病例; 蚊媒传染病; 系统发生树分析

基金项目: 国家科技重大专项(2017ZX10103007)

DOI:10.3760/cma.j.cn112338-20200131-00062

Genotyping on one case with Chikungunya infection introduced into Tianjin in China from Myanmar

Xie Tong, Lyu Likun, Tan Zhaolin, Li Li, Lyu Jie, Li Xiaoyan

Tianjin Centers for Disease Control and Prevention, Tianjin 300011, China

Corresponding author: Li Xiaoyan, Email: xiaoyanli1291@163.com

【Abstract】 Objectives A clinical case caused by Chikungunya virus (CHIKV) was introduced into Tianjin, China from Myanmar. The current study is aimed to phylogenetically analyzing this imported strain and to reveal the relationship between this virus and other circulating CHIKV strains. **Methods** RNA was extracted from serum of the suspected patient presenting with symptoms compatible with CHIKV infections. Real-time reverse transcription PCR (RT-PCR) assay was used for diagnoses of the patient. For phylogenetic analysis, envelope glycoprotein 1 (E1) gene of CHIKV was amplified by two-step RT-PCR and the products were sequenced. **Results** The phylogenetic analyses revealed that the imported CHIKV belong to Indian Ocean Lineage (IOL) derived from ECSA genotype and sharing the same cluster with the *Aede albopitus*-adapted strains that triggered the outbreaks in Pakistan (2016), Italy (2017) and Bangladesh (2017). **Conclusion** The imported CHIKV strain has the potential to cause explosive outbreaks in China and this event happened in Tianjin calls for strengthening the monitoring programs on mosquito-borne diseases in China.

【Key words】 Chikungunya virus; Chikungunya fever; Imported case; Mosquito-borne infectious diseases; Phylogenetic analyses

Fund program: National Science and Technology Major Project of China (2017ZX10103007)

DOI:10.3760/cma.j.cn112338-20200131-00062

基孔肯雅热是由于被伊蚊叮咬而感染基孔肯雅病毒(CHIKV)所引起的急性发热性传染病。感染者在急性期主要临床表现为发热、头痛、肌肉痛、多发性关节炎等症状,约25%的感染者中会出现持续6个月以上慢性关节炎^[1]。CHIKV于1953年在坦桑

尼亚首次被分离出来,为有包膜的,正链RNA病毒,属于披膜病毒科甲病毒属。CHIKV的长度约为11.8 kb,其读码框架分为两个部分,包括4个非结构蛋白编码区 nsP1 ~ nsP4 和 5 个结构蛋白 C-E3-E2-6K-E1 编码区。

病毒进化研究表明 CHIKV 主要被分为 3 个基因型,包括西非型(West African)、亚洲型(Asian)和东/中/南非型(East/Central/South African, ECSA),从 ECSA 基因型毒株中又分化出印度洋(India Ocean lineage, IOL)亚型^[2]。基孔肯雅热被认为是再现性传染性疾病,在过去 15 年中全球范围内至少有两次基孔肯雅热大规模流行。2004 年由 ECSA 基因型 CHIKV 引发的基孔肯雅热疫情在非洲地区肯尼亚暴发,至 2006 年传播至南亚、东南亚地区,引发约 600 万人感染的大流行^[3]。2007 年基孔肯雅热通过输入性病例传入意大利并扩散至欧洲地区其他国家,导致基孔肯雅热首次在欧洲地区当地人群中暴发流行^[4]。第二次大规模流行是 2013 年亚洲基因型 CHIKV 传入加勒比海岛屿和美洲地区,在近 50 个美洲国家中传播流行^[5]。2019 年 11 月天津市检出 1 例输入性基孔肯雅热病例,本研究对患者感染的 CHIKV 开展基因分型研究。

材料与方法

1. 样本采集:血标本采自从事导游工作、自缅甸回国的中国天津市本地居民。患者入境后开始发热(39℃),并伴有膝关节、肘关节疼痛、结膜充血等症状。在境外停留 8 d 期间有被蚊虫叮咬史。患者血清中登革病毒 IgG 抗体、IgM 抗体和抗-NS1 抗体检测阴性,登革病毒核酸检测亦为阴性。

2. 病毒 RNA 提取:采用天隆科技 RNA/DNA 病毒核酸提取试剂盒(磁珠法)及其配套的核酸提取仪(型号:NP968-C)提取患者血清中的 RNA,操作按照说明书进行。吸取血清的量为 200 μl,病毒 RNA 溶于 80 μl 洗脱液中,-40℃ 储存。

3. CHIKV 检测:采用上海之江 CHIKV 核酸测定试剂盒,每个反应体系中加入 5 μl 提取的 RNA。实时荧光定量 PCR 反应在 ABI 公司 7500 fast 荧光定量 PCR 仪上进行,反应条件根据试剂盒操作说明进行设定。

4. CHIKV 基因组 E1 编码区的扩增:病毒 RNA 反转录采用天根生物 FastKing 第一链合成试剂盒。向上述提取的 8 μl 病毒 RNA 中加入 2 μl 含有 gDNase 的缓冲液(试剂盒提供),通过 42℃,3 min 去除基因组 DNA;去除基因组 DNA 后,加入 2 μl 10×缓冲液、1 μl FastKing 反转录酶、2 μl 随机六聚引物混合物,补充去离子水 5 μl 使反转录的反应体系至 20 μl;42℃,孵育 15 min,合成第一链互补 DNA。以第一链互补 DNA 为模板,使用两对引物分

别扩增 CHIKV E1 编码区的不同区域^[6]。50 μl PCR 反应体系中包括 25 μl Q5 2×Master Mix Taq 酶(NEB Biolabs 公司)、正反向引物(10 μmol/L)各 2.5 μl、5 μl 第一链互补 DNA 和 15 μl 去离子水。扩增条件为 94℃ 5 min;94℃ 30 s,54℃ 60 s,72℃ 30 s,35 个循环;72℃ 10 min。PCR 反应完成后,经 1.5% 琼脂糖电泳,以确定扩增产物的长度是否符合预期。

5. CHIKV E1 序列测定:PCR 扩增产物的测序工作委托英骏生物技术有限公司完成。每个扩增片段使用正反向引物双向测序以保证测序结果的准确性。

6. CHIKV 系统发生树分析:采用 DNASTar 7.1 软件包中 EditSeq 对测序结果进行复核、编辑。从 GenBank 获得 CHIKV 不同基因型序列以构建系统发生树,比较不同病毒株之间的同源性。用于构建系统发生树毒株的 GenBank 编号,流行的国家或地区。所有的序列经 Clustal W 软件进行排列比对,使用 MEGA 10 分析软件,通过邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统发生树,并用 Bootstrapping 检验系统发生树的可信度,Bootstrap 值设置为 1 000。

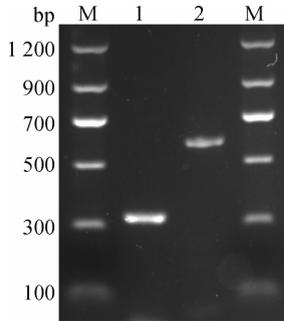
结果

1. CHIKV 核酸检测:检测患者血清标本提取 RNA 经实时定量 PCR 检测,其 Ct 值为 22.8,小于试剂盒操作说明设定 Ct≤38 的阈值,且反应曲线呈“S”形,因此判定为 CHIKV 核酸检测阳性,患者为 CHIKV 感染。

2. RT-PCR 扩增 CHIKV E1 基因:扩增 E1 基因的两对引物分别对应从南美地区分离的 CHIKV 毒株(GenBank 序列编号:MH359142)的 10 209~10 554 和 10 356~10 950 碱基,其扩增产物分别为 346 bp 和 595 bp,琼脂糖电泳中扩增产物长度与预期长度相符(图 1)。

3. CHIKV 系统发生树构建与基因分型:为揭示天津市输入的 CHIKV 与其他地区流行毒株的关系,从 GenBank 中下载了 33 株在不同时期一些地区流行的不同基因型 CHIKV 序列,与本研究的测序结果一同构建系统发生树。结果表明,天津市输入型 CHIKV 基因分型属于能够感染白纹伊蚊并在其体内繁殖的 ECSA 基因型印度洋亚型(ECSA-IOL)(图 2)。系统发生树分析表明,此次输入的 CHIKV 与 2016—2017 年在巴基斯坦、意大利、孟加拉国等国家流行的 CHIKV 毒株高度同源,序列的同源性高达

99.4%,并与这些国家流行的CHIKV毒株共同组成1个基因分型簇。



注:M:分子量标记Marker II(天根生化);1:346 bp; 2:595 bp
图1 基孔肯雅病毒E1基因2个片段经RT-PCR反应后扩增产物凝胶电泳结果

讨论

近年来我国广东、浙江等省份均发现基孔肯雅热输入性病例^[7],在广东省东莞市暴发了我国首起

基孔肯雅热社区聚集性疫情^[8]。我国报道基孔肯雅热病例主要发生在南方省份,而本次天津市出现的基孔肯雅热说明随着我国到境外疫区旅行人数逐年增长,北方地区同样会出现输入性病例,应加强针对入境人员的监测,防止疫情在本地人群中出现。

既往研究表明CHIKV发生适应性突变可引发基孔肯雅热疫情在全球的暴发流行。基孔肯雅热在非洲传播的蚊媒主要为埃及伊蚊,而导致2004年在南亚、东南亚地区大流行的ECSA型CHIKV能够在白纹伊蚊体内生存繁殖,特别是在病毒基因组编码的E1基因中存在A226V突变的毒株^[9]。对CHIKV E1基因序列分析证实本次天津市输入性基孔肯雅热的毒株属于ECSA基因型IOL亚型。通过系统发生树构建显示此次输入型CHIKV与近期引发多个国家和地区基孔肯雅热流行的毒株高度同源,与这些国家和地区分离的毒株同属一个基因分型簇。该分型簇的毒株起源于印度,随后传播至巴基斯坦(2016)^[10]、意大利(2017)^[11]、孟加拉国(2017)^[12]和伊

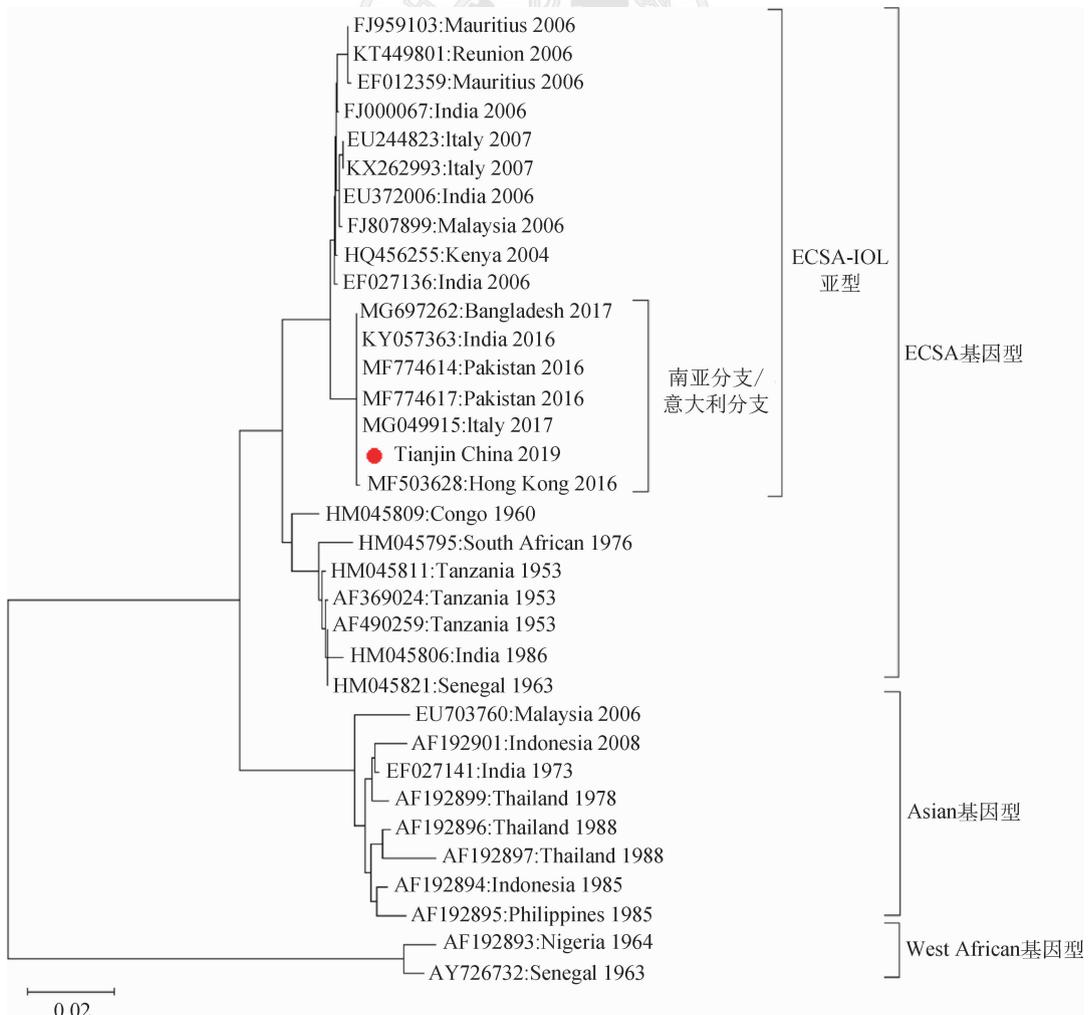


图2 基于天津市输入型基孔肯雅病毒E1序列的系统发生树分析

朗(2019)^[13]并引发基孔肯雅热在当地暴发流行,此分型簇的毒株还通过访问印度的旅行者输入至中国香港地区(2018)^[14]和澳大利亚^[15]。值得关注的是 CHIKV 在意大利只能以白纹伊蚊为媒介传播,说明该分型簇中的毒株在白纹伊蚊体内具有较强的生存和繁殖能力。这一基因分型簇中的毒株被认为是 IOL 亚型毒株经适应性突变进化而形成的一个新的分支,不同研究将其命名为巴基斯坦/意大利分支^[11]或南亚分支^[12]。本研究发现,该入境人员感染的 CHIKV 属于这一分支,尚属国内第一次发现该分支的毒株输入。IOL 亚型中南亚分支 CHIKV 毒株广泛传播的机制尚未阐明,对其病原学特征的初步研究发现这一分支的 CHIKV 毒株在 E1 基因并未发生 A226V 突变,但该分支毒株的 nsP2、nsP4 等编码区的一些位点与其他毒株相比发生了特异性突变,这些突变对增强 CHIKV 传播能力的机制还需要进一步研究^[11]。

对基孔肯雅热全球流行的监测中发现从 ECSA 基因型 IOL 亚型毒株中最新进化出来的南亚分支在短时间内造成全球多个国家基孔肯雅热暴发流行和病例输入,提示该分支的 CHIKV 毒株具有较强的传播能力。除本次输入病例外,2019 年多个国家报告的基孔肯雅热输入病例均来自缅甸^[16]。虽然未见有关基孔肯雅热在缅甸的分子流行病学研究,但本次从缅甸输入的毒株属于南亚分支,提示这一分支 CHIKV 已经传播至缅甸,并在当地人群中流行。缅甸与我国相邻且人员交往频繁,同时白纹伊蚊在我国大部分地区均有分布,因此本次输入病例为我国可能出现的基孔肯雅热本地传播疫情提供了预警。此外,对输入的基孔肯雅热病例开展分子流行病学研究可以及时掌握病毒的基因特征和变异情况,为研究可能出现的本地传播病例的起源、传播链追踪以及传播动力学提供数据支持。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

[1] Pathak H, Mohan MC, Ravindran V. Chikungunya arthritis [J]. Clin Med (Lond), 2019, 19(5): 381–385. DOI: 10.7861/clinmed.2019-0035.

[2] Schneider ADB, Ochsenreiter R, Hostager R, et al. Updated phylogeny of chikungunya virus suggests lineage-specific RNA architecture [J]. Viruses, 2019, 11(9): 798. DOI: 10.3390/v11090798.

[3] Silva LA, Dermody TS. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies [J]. J Clin Invest, 2017, 127(3): 737–749. DOI: 10.1172/JCI84417.

[4] Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, et al. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region [J]. Lancet, 2007, 370(9602): 1840–1846. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)61779-6.

[5] Leparc-Goffart I, Nougairède A, Cassadou S, et al. Chikungunya in the Americas [J]. Lancet, 2014, 383(9916): 514. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)60185-9.

[6] Cardoso FD, de Rezende IM, Barros ELT, et al. Circulation of Chikungunya virus East-Central-South Africa genotype during an outbreak in 2016–17 in Piauí State, Northeast Brazil [J]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2019, 61(10): e57. DOI: 10.1590/S1678-9946201961057.

[7] Wang YL, Wang X, Liu XB, et al. Epidemiology of imported infectious diseases, China, 2005–2016 [J]. Emerg Infect Dis, 2019, 25(1): 33–41. DOI: 10.3201/eid2501.180178.

[8] Zhang QL, He JF, Wu D, et al. Maiden outbreak of chikungunya in Dongguan city, Guangdong province, China: epidemiological characteristics [J]. PLoS One, 2012, 7(8): e42830. DOI: 10.1371/journal.pone.0042830.

[9] Schuffenecker I, Itaman I, Michault A, et al. Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak [J]. PLoS Med, 2006, 3(7): e263. DOI: 10.1371/journal.pmed.0030263.

[10] Shi JM, Su ZY, Fan ZJ, et al. Extensive evolution analysis of the global chikungunya virus strains revealed the origination of CHIKV epidemics in Pakistan in 2016 [J]. Virol Sin, 2017, 32(6): 520–532. DOI: 10.1007/s12250-017-4077-5.

[11] Lindh E, Argentini C, Remoli ME, et al. The Italian 2017 outbreak chikungunya virus belongs to an emerging *Aedes albopictus*-adapted virus cluster introduced from the Indian subcontinent [J]. Open Forum Infect Dis, 2019, 6(1): ofy321. DOI: 10.1093/ofid/ofy321.

[12] Melan A, Aung MS, Khanam F, et al. Molecular characterization of chikungunya virus causing the 2017 outbreak in Dhaka, Bangladesh [J]. New Microbes New Infect, 2018, 24(7): 14–16. DOI: 10.1016/j.nmni.2018.03.007.

[13] Pouriaevali MH, Rezaei F, Jalali T, et al. Imported cases of Chikungunya virus in Iran [J]. BMC Infect Dis, 2019, 19: 1004. DOI: 10.1186/s12879-019-4637-4.

[14] Ho DTW, Chan DPC, Lam CY, et al. At the advancing front of Chikungunya fever in Asia: Two imported cases in Hong Kong with novel amino acid changes [J]. J Microbiol Immunol Infect, 2018, 51(3): 419–421. DOI: 10.1016/j.jmii.2017.08.006.

[15] Huang BX, Pyke AT, McMahon J, et al. Complete coding sequence of a case of chikungunya virus imported into Australia [J]. Genome Announc, 2017, 5(19): e00310–17. DOI: 10.1128/genomeA.00310-17.

[16] Díaz-Menéndez M, Esteban ET, Ujjié M, et al. Travel-associated chikungunya acquired in Myanmar in 2019 [J]. Euro Surveill, 2020, 25(1): 190072. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.1.1900721.

(收稿日期: 2020-01-31)

(本文编辑: 斗智)