

河南省首例输入性基孔肯雅热病例的发现和病原特征分析

李幸乐 李懿 王若琳 张白帆 苏佳 郭大城 许汴利 黄学勇

河南省疾病预防控制中心传染病预防控制所, 郑州 450016

通信作者: 黄学勇, Email: hxyzzu@163.com, 电话: 0371-68089080

【摘要】 针对河南省 2017 年首例基孔肯雅热病例开展流行病学调查和病原特征分析。采用荧光定量 RT-PCR 方法诊断病例, 采用金黄地鼠肾细胞 BHK-21 分离基孔肯雅热病毒, 测定病毒全基因组序列、开展进化分析。分离株 CHIKV/Henan001/2017 属于 ECSA 基因型, 与 2016 年中国香港输入株 hk02 在 E1 基因区段核苷酸同源性最为接近 (99.8%)。流行病学调查和分子进化分析同时证实河南省 2017 年首例基孔肯雅热病例为输入性病例, 病例未在河南境内引起继发流行。

【关键词】 切昆贡亚病毒; 虫媒病毒; 基孔肯雅热; 全基因测序

基金项目: 国家自然科学基金 (81573204); 河南省科技创新人才基金 (16410051008)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2019.04.017

Analysis on the epidemiology and etiology characteristics of first imported Chikungunya fever case in Henan Province in 2017

Li Xingle, Li Yi, Wang Ruolin, Zhang Baijan, Su Jia, Guo Dacheng, Xu Bianli, Huang Xueyong

Institute for Infectious Disease Control and Prevention, Henan Center for Disease Control and Prevention, Zhengzhou 450016, China

Corresponding author: Huang Xueyong, Email: hxyzzu@163.com, Tel: 0086-371-68089080

【Abstract】 To study the epidemiology and etiology characteristics of first imported Chikungunya fever case in Henan province, China, 2017. The patient was confirmed by Chikungunya virus (CHIKV) infected as CHIKV ribonucleotide was continuously detected in his serum specimens. BHK-21 cell line was used for virus isolation, the strain was named CHIKV/Henan001/2017. CHIKV/Henan001/2017 belonged to genotype ECSA. The highest ribonucleotide homology sequence of highly conserved region E1 with CHIKV/Henan001/2017 was hk02 strain (99.8%), who was an imported strain to Hong Kong, China, 2016. Epidemiological information and laboratory testing confirmed it was an imported Chikungunya fever case in Henan province, 2017. No secondary case has been reported.

【Key words】 Chikungunya virus; Arboviruses; Chikungunya fever; Complete gene sequencing

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81573204); Excellent Youth Foundation of Henan Scientific Committee (164100510008)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2019.04.017

基孔肯雅热是由基孔肯雅病毒 (Chikungunya virus, CHIKV) 引起, 经伊蚊传播, 以发热、皮疹和关节疼痛为主要特征的急性传染病。基孔肯雅热的地理分布与媒介伊蚊的地理分布相关, 在非洲次撒哈拉地区、东南亚地区、印度洋沿岸及岛屿、西太平洋地区的热带或亚热带区域呈地方性流行。20 世纪 80 年代我国云南地区发现一例基孔肯雅热病例。2008 年以来, 广州、深圳等地先后报告数起输入性病例。2010 年 9 月东莞发生国内首次基孔肯雅热流行^[1-3]。2017 年 12 月, 河南省发现本省首例基孔肯雅热输入病例, 现报道如下。

一、对象与方法

(一) 对象

2017 年 12 月 15 日, 调查对象为 1 例基孔肯雅热疑似病

例, 男, 40 岁, 河南洛阳人, 有疫区旅行史和相应的临床表现。采集病例急性期血清样本行基孔肯雅热病毒核酸检测, 结果呈阳性。

(二) 研究方法

1. 流行病学调查: 以《基孔肯雅热预防控制技术指南 (2012 年版)》^[4] 为依据, 采用《基孔肯雅热流行病学调查方案》开展进行流行病学调查。

2. 病毒核酸检测: 采用 Qiagen QIAamp[®] Viral RNA Mini Kits (德国 Qiagen 公司) 提取总 RNA, 上海之江生物科技有限公司生产的基孔肯雅热病毒核酸检测试剂盒 (荧光 PCR 法) 进行核酸检测, 所有操作均按照试剂盒操作说明进行。

3. 病毒分离: 采用 BHK-21 细胞常规分离培养基孔肯雅热病毒, 在生物安全三级实验室进行操作。

4. 引物设计与合成:参照 CHIKV hk02 株(GenBank 序列号:MF499120)利用 Primer 5.0 软件设计 CHIKV 全基因测序

引物,引物序列见表 1,由南京金斯瑞科技有限公司合成。

5. 全基因扩增:采用宝日医生生物技术(北京)有限公司

表 1 基孔肯雅病毒全基因测序引物

引物	序列(5'~3')	基因组定位	片段长度(bp)
P1			
上游	CTGCAAAGCAAGAGATTAATAAC	2~24	
下游	TAAATGGAACACCGATGGCA	808~827	827
P2			
上游	GCTAAAACCGTGCGACCGTG	725~744	
下游	TCTGCTTCTCGTTCTTCTCCTC	1 521~1 540	816
P3			
上游	CAAAAACCGACCTGATCCCA	1 456~1 475	
下游	TTCTTGGCAGTTTCTTCT	2 263~2 282	827
P4			
上游	GTCTTCGGAGTACCGGATC	2 184~2 203	
下游	ATGCTCCACCTCCCACTCCT	2 977~2 996	813
P5			
上游	AAGGTAAACTGGTATGGAAG	2 887~2 906	
下游	ATGGTGTATGCGAAAAGGTG	3 697~3 716	830
P6			
上游	CGGACTACACATACAACCTA	3 619~3 638	
下游	CTTCTCCGATTTTGTGCGC	4 459~4 478	860
P7			
上游	TCACTGAACCACCTCTTTAC	4 398~4 417	
下游	AGTCAGGTTTCTCCCTCGCC	5 242~5 261	864
P8			
上游	CCGTGTCTGACTGGTAATG	5 191~5 210	
下游	GGTATGATGAGACAGTTGGA	6 017~6 036	846
P9			
上游	TTGTCCAATCCCGAGTCCGC	5 961~5 980	
下游	CTAACAGCATCAAAGCAGTA	6 773~9 792	833
P10			
上游	TTGGAACCGACATAGCCTC	6 720~6 739	
下游	AAAAGTTTGGGTTGGGATGA	7 527~7 546	827
P11			
上游	GCAGAAGCCGACAGCAAGTA	7 479~7 498	
下游	CACATAACTGGGATGGCAAG	8 306~8 325	847
P12			
上游	TCTCGGTGGTGACCTGGAAT	8 238~8 257	
下游	ATCTTTACGTTGCCGACTG	9 044~9 063	826
P13			
上游	AGCACCGCCGCAACTACCGA	8 969~8 988	
下游	AATAAAGGTTGCTGCTCGTT	9 797~9 816	848
P14			
上游	ACCGTCCCTTTCTGCTTAG	9 713~9 732	
下游	CTCTCAGGTGTGCCACTTTG	10 556~10 575	863
P15			
上游	ATGGACTACCCGCCCTTTGG	10 505~10 524	
下游	TCCCTGTGGGTTGGGAGAATCGTG	11 709~11 733	1 229

的Takara Reverse Transcriptase XL (AMV)逆转录酶和随机引物合成cDNA,采用宝日生物技术有限公司(Takara Premix Taq® Version 2.0>Loading dye mix)试剂,用上述引物扩增基孔肯雅病毒全基因序列。扩增条件为:95℃预变性5 min,94℃30 s,42℃30 s,72℃60 s,共40个循环,最后于72℃延伸10 min。产物用1%琼脂糖凝胶电泳,送南京金斯瑞生物科技有限公司测序。

6. 进化分析:序列拼接采用DNASar 8.0软件,序列排列采用Clustalx 8.0软件,系统进化分析采用MEGA 5.0软件,依据软件使用说明进行操作。

二、结果

(一)发病及就诊情况

2017年12月3日,病例至斯里兰卡首都科伦坡旅游,2017年12月13日搭乘飞机经马来西亚吉隆坡中转回国,2017年12月14日凌晨5:00到达北京,上午9:00返回居住地洛阳。2017年12月15日凌晨5:00病例出现腰部疼痛并发热、体温37.8℃,上午8:00腰部及全身疼痛加重,波及胸部及双肩,胸部自查有皮疹,随至洛阳市中心医院住院治疗。病例外出及归国无同行人员。自病例住院,于2017年12月15和16日采集急性期血清样本进行相关检测。

(二)实验室检测结果

1. 核酸检测:2017年12月15和16日血清样本检测结果均呈基孔肯雅病毒核酸阳性,Ct值分别为17.459和20.346。

2. 病毒分离:将急性期血清样本接种至单层BHK-21细胞,于接种后第二代第3天开始出现细胞病变,表现为细胞圆缩、融合、脱落现象,传代后病变表现稳定。分离培养物经荧光RT-PCR方法检测基孔肯雅病毒核酸,结果呈阳性,命名为CHIKV/Henan001/2017。

3. 序列扩增:基孔肯雅病毒全基因序列扩增均获得特异性条带,经测序、拼接得基孔肯雅病毒全基因序列,递交GenBank获得序列号为MG925665。

4. 进化分析:将CHIKV/Henan001/2017 E1基因序列与自GenBank筛选的基孔肯雅病毒毒株进行序列分析。CHIKV/Henan001/2017属于ECSA基因型;与2016年中国香港输入株hk02同源性最高(核苷酸和氨基酸同源性均为99.8%);其次与2016年印度株119067同源性较高(核苷酸和氨基酸同源性均为99.5%),与2016年澳大利亚输入株IN16C1同源性较高(核苷酸和氨基酸同源性均为99.5%)。CHIKV/Henan001/2017在E1基因区段与2010年广东东莞疫情株(GD05/2010),2008年马来西亚输入株(FD080178和FD080231),2008年斯里兰卡输入株(FD080008和SD08Pan)核苷酸同源性为98.7%~99.2%,氨基酸同源性同为98.7%~99.2%,见图1。

三、讨论

本研究采用核酸检测、病毒分离和序列测定的方法确诊病例为基孔肯雅热病例。疫情输入时值冬季,蚊虫活动相对静止,因此仅对病例采取了防蚊、隔离治疗措施。病例痊愈、潜伏期结束即解除隔离,没有发现疫情扩散和蔓延。

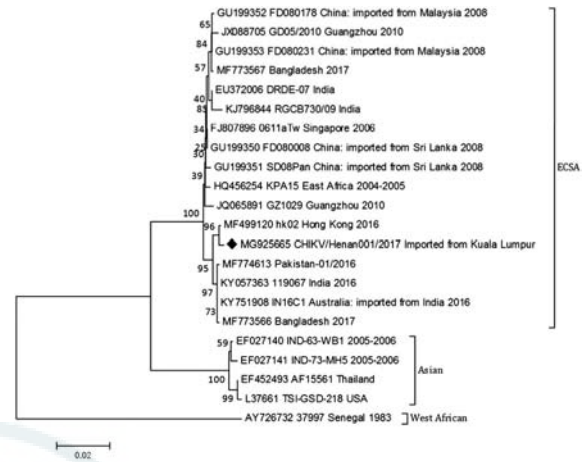


图1 河南基孔肯雅病毒分离株CHIKV/Henan001/2017 E1基因系统进化树

流行病学调查显示病例可能在斯里兰卡期间感染基孔肯雅病毒,为输入性病例。进化分析显示,CHIKV/Henan001/2017株与2016年中国香港hk02株在E1基因区段亲缘关系最为密切,其次与2016年印度119067株、与2016年澳大利亚IN16C1株亲缘关系较近。hk02株同为输入株,输出地不详;119067株为2016年印度流行株,IN16C1株为输入株,输出地为印度,进化分析结果显示CHIKV/Henan001/2017株与印度地缘关系更为密切。但是,考虑到基孔肯雅病毒E1基因序列高度保守、斯里兰卡基孔肯雅病毒毒株序列有限以及基孔肯雅热近年主要在印度洋地区流行等因素^[5-6],研究认为CHIKV/Henan001/2017株与印度的密切关系具有一定的偶然性,病例自斯里兰卡输入的可能性更大。

寨卡、登革热和基孔肯雅热等虫媒病毒病主要通过节肢动物叮咬传播,虫媒病毒在全球分布广泛,可以随着人员流动、宿主和/或媒介迁移而传播至异地,在当地引起暴发或流行。随着中国与国际社会的合作交流日益深入、人员流动更加广泛和频繁,虫媒病毒病异地传播的种类、范围和影响也随之增大。2014年河南省禹州发生一起输入性登革热病例引发本地流行的事件^[7],2016年河南郑州发现并控制一起输入性寨卡病毒病事件。河南地跨热带和亚热带气候,存在多种媒介昆虫,人口众多,交通发达,有利于虫媒病毒的增殖和虫媒病毒病的传播。掌握河南虫媒病毒病流行规律,密切关注国际社会虫媒病毒病发展态势,做好技术和物资储备,是防控虫媒病毒病的有效措施。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- 王大虎,董智强,陈纯,等.广州首起输入性基孔肯雅热的调查分析[J].微生物学免疫学进展,2010,38(2):54-56. DOI: 10.3969/j.issn.1005-5673.2010.02.012.
- 阳帆,许少坚,张仁利,等.深圳市输入性基孔肯雅热病例的流行病学和病原学特征分析[J].中华实验和临床病毒学杂志,2015,29(4):306-309. DOI: 10.3760 / cma. j.

- issn.1003-9279.2015.04.006.
- [3] 林炳亮, 谢冬英, 翟洁卿, 等. 东莞基孔肯雅热确诊病例的调查分析[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2011, 32(2): 208-212.
- [4] 中华人民共和国卫生部.《基孔肯雅热预防控制技术指南(2012年版)》[J]. 中国实用乡村医生杂志, 2012, 19(24): 10-12. DOI: 10.3969/j.issn.1672-7185.2012.24.006.
- [5] Chattopadhyay S, Mukherjee R, Nandi A, et al. Chikungunya virus infection in West Bengal, India[J]. Indian J Med Microbiol, 2016, 34(2): 213-215. DOI: 10.4103 / 0255-0857.176839.
- [6] Barde PV, Shukla MK, Bharti PK, et al. Co-circulation of dengue virus serotypes with chikungunya virus in Madhya Pradesh, central India[J]. WHO South East Asia J Public Health, 2014, 3(1): 36-40. DOI: 10.4103/2224-3151.206881.
- [7] Huang XY, Ma HX, Wang HF, et al. Outbreak of dengue Fever in central China, 2013 [J]. Biomed Environ Sci, 2014, 27(11): 894-897. DOI: 10.3967/bes2014.125.
- (收稿日期: 2018-04-20)
(本文编辑: 梁明修)

·文献速览·

2005—2011 年中国主要城市自我报告过敏性鼻炎患病率增加

Wang XD, Zheng M, Lou HF, et al. An increased prevalence of self-reported allergic rhinitis in major Chinese cities from 2005 to 2011[J]. Allergy, 2016, 71(8): 1170-1180. DOI: 10.1111/all.12874.

近几十年来过敏性鼻炎(AR)的患病率在全球范围内有所增加,它的大量流行无论是对鼻炎患者还是社会均会产生相当大的负担,对患者个人的生活质量也会产生负面影响。2005年,作者所在研究小组对中国AR的现患情况进行了第一次多中心调查。但中国城市人口的比例从2004年的41.76%增加到2010年的49.95%,国内生产总值也从2004年的世界排名第七上升到第二(2010年),社会经济的快速发展可能会影响了疾病的患病率和发病率。2011年, Wang 等对中国大陆 18 个主要城市的居民自我报告 AR 的流行程度进行了调查,对 2005 和 2011 年的调查结果进行了比较,并对空气污染等因素与过敏性鼻炎的关系进行了探讨。调查发现 2011 年 18 个城市成人自我报告 AR 标准化患

病率为 17.6%。相比 2005 年的调查结果,在 2011 年有 8 个城市成人自我报告 AR 患病率显著增加($P < 0.01$)。SO₂ 浓度与 AR 的患病率呈正相关($r = 0.504, P = 0.033$),未发现其他污染物与 AR 显著相关。多元回归分析发现在调整 PM₁₀, SO₂, NO₂, 温度和湿度后,家庭年收入的绝对变化与 AR 患病率的变化显著相关($R^2 = 0.68$)。该研究发现了在 6 年期间中国一般成年人自我报告的 AR 患病率显著增加,识别了影响这一趋势的可能因素(空气污染、收入水平等),为采取措施应对这种日益增长的 AR 患病挑战,保护公众健康提供支持。

(杨一兵编译 中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所)