

浙江省衢州市 2017 年输入性基孔肯雅病毒全基因组序列特征分析

王晓光¹, 杨瑞军², 黄世腾², 曹国平², 雷永良¹, 叶灵¹

¹ 丽水市疾病预防控制中心微生物检验科, 浙江 丽水 323000;

² 衢州市疾病预防控制中心, 浙江 衢州 324000

摘要: 目的 对衢州市 2017 年 1 例曾有孟加拉国旅行史的发热患者血清标本进行基孔肯雅病毒(CHIKV)全基因组序列测定及遗传进化分析。方法 无菌采集患者血液, 分离血清后采用实时荧光定量 PCR 检测 CHIKV 和登革热病毒核酸, 反转录 PCR 扩增 CHIKV 全基因组靶向基因片段并测序, 采用生物信息学软件(Contig Express、SeqMan、Clustalx V2.0、BioEdit V7.0、GENEDOC 和 MEGA X)分析全基因组序列。结果 患者血清为 CHIKV 核酸阳性。测序数据拼接处理后获得 CHIKV 全基因组序列(QZ0823 株), 包含 11 787 bp 核苷酸, 非结构蛋白主要结构位点未发现变异, 结构蛋白缺乏 E1 中的适应性突变 A226V 和 E2 中可能影响 CHIKV 神经毒力的新取代 K252Q 突变, 不存在增强埃及伊蚊的适应性突变 E1: K211E 和 E2: V264A。全基因组序列进化分析显示, QZ0823 与孟加拉国、印度、巴基斯坦流行株彼此紧密聚集, 具有密切的进化相关性。结论 衢州市输入性基孔肯雅病毒 QZ0823 全基因组和结构基因 C-E3-E2-6K-E1 核苷酸序列均符合 CHIKV 特征, 与孟加拉国流行株同属东中南非洲遗传谱系(ECSA)。

关键词: 基孔肯雅病毒; 全基因组; 序列测定; 进化分析

中图分类号: R373.9 文献标志码: A 文章编号: 1003-8280(2019)06-0621-05

DOI: 10.11853/j.issn.1003.8280.2019.06.006

Whole-genome characterization of imported Chikungunya virus in Quzhou, Zhejiang province, China, 2017

WANG Xiao-guang¹, YANG Rui-jun², HUANG Shi-teng², CAO Guo-ping², LEI Yong-liang¹, YE Ling¹

¹ Lishui Center for Disease Control and Prevention, Lishui 323000, Zhejiang Province, China;

² Quzhou Center for Disease Control and Prevention

Corresponding author: YE Ling, Email: 547336507@qq.com

Supported by the Medicine and Health Science and Technology Plan Project of Zhejiang Province (No. 2019KY237)

Abstract: Objective To perform whole-genome sequencing and phylogenetic analyses of Chikungunya virus (CHIKV) from the serum sample of a febrile patient who had traveled to Bangladesh in Quzhou, 2017. **Methods** Blood samples were collected aseptically from the patient. The serum was separated for detection of nucleic acids of CHIKV and Dengue virus by RT-PCR. The genome-wide target gene fragments of CHIKV were amplified by RT-PCR and then sequenced. The whole-genome sequence was analyzed by bioinformatic programs: Contig Express, SeqMan, Clustalx V2.0, BioEdit V7.0, GENEDOC and MEGA X. **Results** The patient's serum was positive for CHIKV nucleic acids. The sequencing data were assembled to obtain the whole-genome sequence of CHIKV strain QZ0823, containing 11 787 bp nucleotides. No mutation was found in major structural sites of non-structural proteins. For structural proteins, E1 lacked the adaptive mutation A226V; E2 lacked the new substitution mutation K252Q that might affect the neurovirulence of CHIKV; there were no *Aedes aegypti* adaptive mutations E1: K211E or E2: V264A. The whole genome-based phylogenetic analysis showed that QZ0823 was tightly clustered with the epidemic strains in Bangladesh, India, and Pakistan, suggesting a close evolutionary relationship. **Conclusion** The nucleotide sequences of whole genome and structural genes C-E3-E2-6K-E1 of the imported virus in Quzhou show obvious features of CHIKV. QZ0823 and the epidemic strains in Bangladesh are derived from the Eastern, Central, and Southern African genetic lineage.

Key words: Chikungunya virus; Whole genome; Sequencing; Phylogenetic analysis

基金项目: 2019 年浙江省医药卫生科技面上项目计划(2019KY237)

作者简介: 王晓光, 男, 硕士, 副主任技师, 主要从事病原生物学研究工作, Email: xiaog_china@126.com; 杨瑞军, 男, 副主任技师, 主要从事病毒检测工作, Email: qzyangruijun@126.com

通信作者: 叶灵, Email: 547336507@qq.com

王晓光、杨瑞军同为第一作者

网络出版时间: 2019-09-02 16:15 网络出版地址: <http://navi.cnki.net/knavi/JournalDetail?pcode=CJFD&pykm=ZMSK>

基孔肯雅病毒(Chikungunya virus, CHIKV)是经蚊媒叮咬传播的病毒,主要传播媒介是埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)和白纹伊蚊(*Ae. albopictus*),其中白纹伊蚊在我国广泛分布,埃及伊蚊在我国广东、广西、海南和云南省(自治区)均有分布。该病毒早期流行于非洲,随后不断扩展到100余个国家和地区,呈地方性流行或具有潜在地方性流行风险^[1-3],近年在东南亚印度洋地区、岛屿发生了多次大规模的暴发流行^[4-5],该病毒可引起基孔肯雅热,临床上通常表现发热、头痛、肌肉痛、皮疹和关节疼痛等^[1]。

我国2008年首次出现基孔肯雅热输入性病例的报道^[6],之后大陆不断有输入性和本地病例的持续存在^[7-9]。2017年8月22日,浙江省衢州市人民医院感染科接诊1例曾经有孟加拉国商务旅行史(8月8—17日)的本地发热患者^[10],经流行病学调查,结合临床资料、实验室核酸检测确诊其为输入性CHIKV感染病例^[11]。为进一步了解输入性CHIKV的遗传学背景,我们测定病毒全基因组序列,通过生物学软件拼接获得病毒的基因全长信息,从分子水平对病毒的流行和变异情况进行分析,以丰富中国输入性CHIKV的基因数据。

1 材料与方法

1.1 血液标本采集 在医院感染病房现场收集患者流行病学资料,使用不含抗凝剂的真空采血管无菌采集患者血液标本5 ml,专车冷链送至衢州市疾病预防控制中心(CDC),实验室内待血液凝固、血块收缩后,离心半径15.5 cm,2 000 r/min离心15 min,吸出血清3 ml分装于3支冻存管中备用,其中1支用于检测、1支送浙江省CDC复核、1支留样复核,剩余标本置于-80℃低温保存。所有患者均表示知情同意。

1.2 CHIKV和登革热病毒核酸检测 患者血清中病毒核酸提取按照MagMAX-96(ABI Life Technologies)核酸抽取试剂说明书进行。核酸检测使用浙江省CDC微生物检验所下发的引物和探针、One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit(Perfect Real-time, TaKaRa)试剂进行,具体操作参照下发的实验室技术方案。标本同时送浙江省CDC复核。

1.3 反转录PCR和全基因组测定 自主设计的扩增CHIKV全基因组序列引物经Primer-BLAST和Primer Premier V5.0验证并在测序公司(上海伯杰医疗科技有限公司)试验通过(表1),患者血清中病毒RNA提取用QIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN)试剂,反转录PCR用Titan One Tube RT-PCR System Kit(Roche)试剂,扩增产物1% Certified Molecular Biology Agarose(BIO- RAD)电泳鉴定后送测序公司

表1 基孔肯雅病毒全基因测定引物序列

引物名称	引物(5'~3')	产物(bp)
CHIK-F1	ATGGCTGCGTGAGACACAC	2 390
CHIK-R2390	GYGARTCRACCYTRCGTGACAG	
CHIK-F1863	CGGTCTGAAGCGTACGACG	2 221
CHIK-R4083	GTACGACGGTGCACATCC	
CHIK-F3619	GCCTACTAAGAGAGTCAC	2 131
CHIK-R5749	CTCCARGGTRTTTACCGGC	
CHIK-F5236	GGCCGTGTCTGATTGGGT	2 284
CHIK-R7519	GGTAGCTGTAGTGCCTACC	
CHIK-F7025	CGTCTGACAAAATCYGCRT	2 308
CHIK-R9332	ACATTTGCCAGMGGRAAY	
CHIK-F8832	GGGACACTTCATCCTGGC	1 410
CHIK-R10241	CCGGTGAAGACCTTACAGCTGT	
CHIK-F9751	CCAGGAGCTACCGTCCCTT	2 048
CHIK-R11798	TACGTCCCTRTGGGTTCCGGAGAAT	

进行序列双向测定(测通)。所有操作参照试剂说明书。

1.4 全基因序列分析 生物信息学软件:Contig Express和DNASTar 7.1中SeqMan用于修正质量差的序列和全基因拼接;美国国立生物技术信息中心(NCBI)BLAST和Clustalx V2.0用于序列比对和多重序列比较;BioEdit V7.0和GENEDOC用于发现基因位点特征;MEGA X最大似然法(Maximum Likelihood)绘制系统进化树,通过自展值重复(bootstrap=1 000)估计支持率。本研究使用来源于GenBank的56个CHIKV全基因参考序列(包含国内已递交的25个全基因序列)。

2 结果

2.1 流行病学资料 患者周某,女,28岁,2017年8月21日就诊,有发热、皮疹等症状,曾于8月8—17日到孟加拉国商务旅行,发病前4~12 d在达卡逗留,该国2017年5—7月暴发基孔肯雅热疫情,首都达卡是基孔肯雅热的流行区,患者出行季节正处于当地雨季,蚊媒密度较高。

2.2 核酸检测结果 Real-time PCR扩增登革热病毒、CHIKV阳性/阴性对照和患者血清标本核酸,患者标本(2个平行样)均获得理想的对数增长曲线(图1),均为CHIKV核酸阳性,循环阈值(C_t)分别为34.61和33.85,登革热病毒为阴性。复核血清经浙江省CDC微生物检验所确证为CHIKV核酸阳性。

2.3 全基因组测序 对测序数据拼接处理后获得CHIKV全基因组序列,命名为QZ0823,提交GenBank的收录号为MH400249,全长为11 787 bp, A+T含量为49.80%,非结构蛋白中,参与合成病毒负链RNA的nsP1、具有解旋酶、三磷酸酶和蛋白酶活性的nsP2、复制酶单元一部分的nsP3、病毒RNA

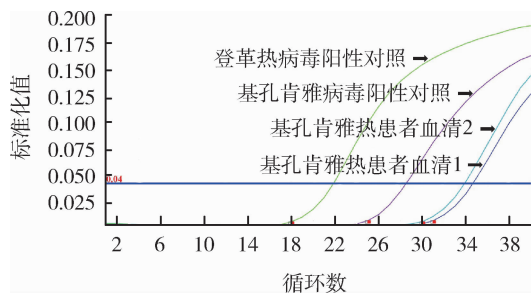


图1 浙江省衢州市2017年检出的基孔肯雅病毒 Real-time PCR 核酸检测结果

Figure 1 The Real-time PCR test results of CHIKV identified in Quzhou, Zhejiang province, China, 2017

聚合酶的 nsP4^[12] 共包含有 7 425 个核苷酸, 编码 2 474 个氨基酸, 蛋白编码区主要结构位点未见变异。结构基因 C-E3-E2-6K-E1 包含 3 747 bp 核苷酸序列, 编码 1 248 个氨基酸, 无碱基的缺失和插入, 未观察到 E1 中的适应性突变 A226V^[13-14] 和对膜融合与病毒体装配很重要的区域变化 A226V 和 D284E^[15], 未观察到 E2 中可能影响 CHIKV 神经毒力的新取代 K252Q^[6], 未发现增强埃及伊蚊的适应性突变 E1: K211E 和 E2: V264A^[16]。

2.4 全基因组进化分析 通过 BLAST N 检索 QZ0823 全基因组序列和结构基因序列后, 发现序列相似度最高的均为 CHIKV。多重比对后与我国和东南亚等东中南非洲遗传谱系 (East, central and South African Lineage, ECSA) 参考序列核苷酸同源性和氨基酸同源性分别为 98.7%~99.9%, 氨基酸同源性为 95.6%~99.8%, 与孟加拉国流行株 MF773566、巴基斯坦流行株 MF774614~MF774619 核苷酸和氨基酸同源性分别为 99.9% 和 99.5%。以 CHIKV 同源物种西部非洲谱系代表株为外群, 对 57 个 CHIKV 全基因组核苷酸序列系统进化分析显示 QZ0823 与来自孟加拉国的 CHIKV 关系密切 (图 2), QZ0823 与 MF773566 (Australia: imported from Bangladesh, 2017)、MF774613-19 (Pakistan, 2016)、KY751908 (Australia: imported from India, 2016)、KY057363 (India, 2016)、MF503628 (Hong Kong: imported from India, 2016) 彼此紧密聚集, 并与 ECSA 谱系^[17] 流行株聚类在一起, 具有密切的进化相关性。

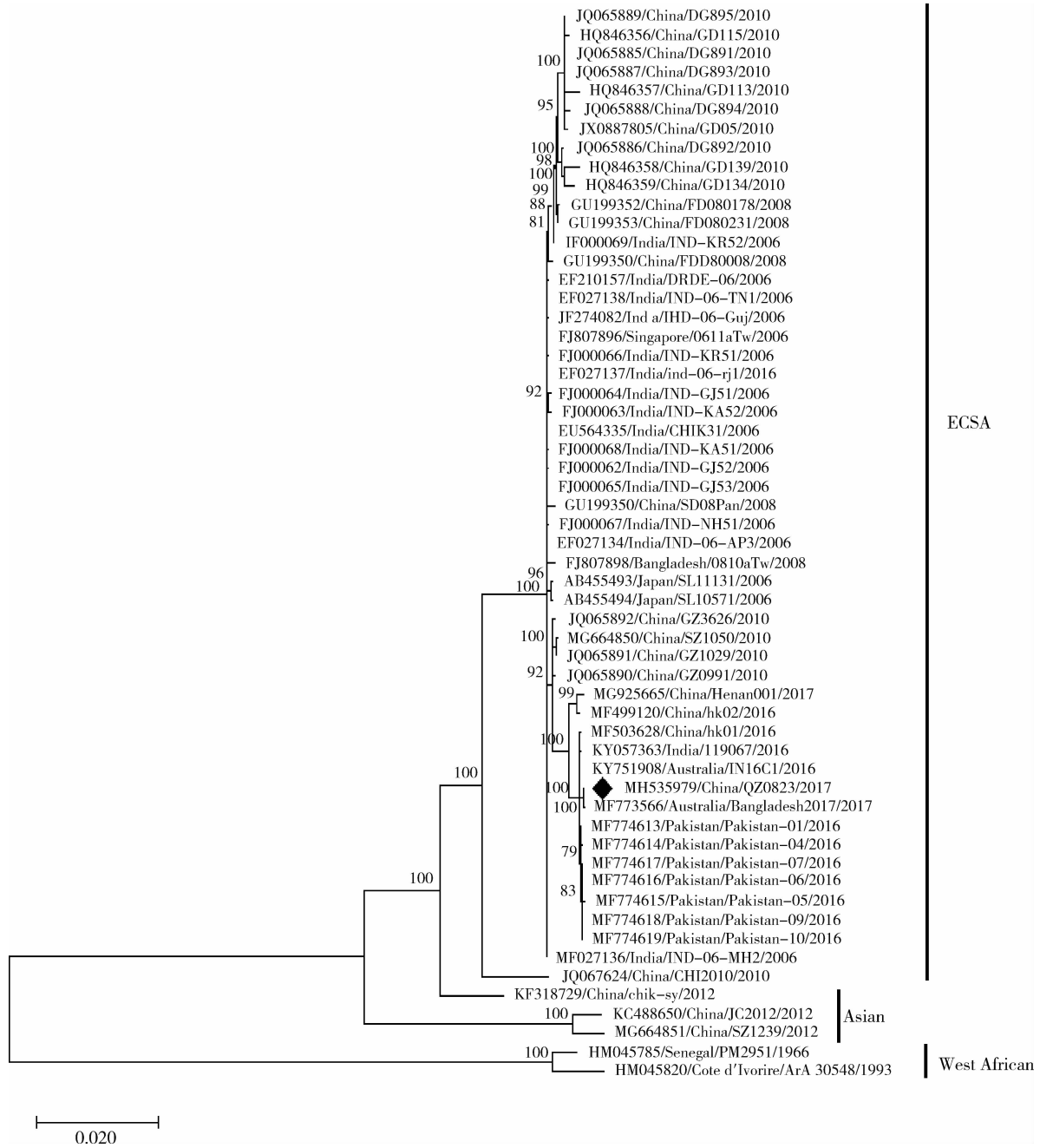
3 讨论

CHIKV 属于披膜病毒科 (Togaviridae) 甲病毒属 (Alphavirus) 的单股正链 RNA 病毒, 基因组全长约 (11 000~12 000 bp), 共编码 5 个结构蛋白 C-E3-E2-6K-E1 和 4 个非结构蛋白 NS1~4, 有 4 种遗传谱系: ECSA、西部非洲谱系、亚洲谱系和印度洋谱系, 其中亚洲谱系和印度洋谱系来源于 ECSA, ECSA 主

要由埃及伊蚊传播^[18], 2005—2006 年 ECSA 病毒传入亚洲, 引发了印度洋群岛、印度及东南亚地区的大暴发流行^[19]。衢州市输入性 CHIKV 全基因组和结构基因 C-E3-E2-6K-E1 核苷酸序列均符合 CHIKV 特征, 靠近基因组 5' 末端前 77~7501 区域编码 4 个非结构蛋白, 靠近基因组 3' 末端后 7567~11313 区域编码 5 个结构蛋白, (C+G) 含量为 50.20%, 其组成的一个明显特点是 G 和 C 连结所形成串状结构在基因组中出现的频率非常高, 此与蚊虫宿主相似。

全基因组系统进化表明 QZ0823 属于 ECSA 型, 与孟加拉国分离株的核苷酸和氨基酸同源性分别为 99.9% 和 99.5%, 与东南亚、印度洋地区的单一点源报道一致^[20], 在进化上与印度、巴基斯坦的相关性高于印度洋群岛的分离株, 使用 E1 基因序列的系统进化分析得到了类似结果。进化树显示我国有 3 株分离株为亚洲谱系, 这可能是通过多次独立输入造成的, 我国其他分离株和多个亚洲分离株都归属于 ECSA, 该型已蔓延肆虐至多个国家和地区, 很可能是结构蛋白上位点的变化, 增强了 CHIKV 对于媒介和人的感染性, 在进化的过程中病毒为适应不同地区的媒介宿主而产生了不同的分支, 扩大了流行区域, 遗传距离较近和同源性高的毒株之间分离时间和地点相近, 不同分支病毒通过伊蚊传播的流行可相互融合^[18]。

Hapuarachchi 等^[5] 在分析 95.7% (133/139) 的 CHIKV 分离株中发现了 E1-A226V 替代增强了白纹伊蚊对 CHIKV 的传播性, 基于 E1 基因序列的进化网络表明, 印度洋谱系毒株获得 E1-A226V 被认为是关键的进化事件, 其有助于 CHIKV 在该区域的传播和空间分布, QZ0823 缺乏病毒包膜蛋白可有效地适应在白纹伊蚊中蔓延并进入蚊虫细胞复制的替代突变, QZ0823 同时缺少 E1 中可增加 CHIKV 感染白纹伊蚊能力的适应性突变 A226V。Agarwal 等^[16] 依次构建 8 种不同的 CHIKV 突变体口服感染埃及伊蚊和白纹伊蚊, 研究这些突变体在调节 2 种不同伊蚊物种的传染性和传播中的作用, 含有 E1: K211E 和 E2: V264A 的双突变病毒显示出更高的伊蚊适应性, 埃及伊蚊与亲本 E1: 226A 病毒相比, 病毒感染性显著增加, 结果表明 CHIKV 中的适应性突变导致伊蚊中有效的 CHIKV 循环, QZ0823 不存在可能提高伊蚊亲和力及传播力的突变, 也不存在增强埃及伊蚊适应性的突变 (E1: K211E 和 E2: V264A)。E2 蛋白上与中和抗体结合的 2 个重要糖基化抗原位点 263N 和 345N 高度保守^[21], 可以推测衢州市输入性 CHIKV 并未表现出较强的进化潜力、更高的毒力以及人或蚊虫宿主的适应性。



注：◆ 为衢州输入性病例全基因组序列；ECSA. 东中南非洲遗传谱系；Asian. 亚洲谱系；West African. 西部非洲谱系

图2 基于最大似然法的57个CHIKV全基因组核苷酸序列进化分析

Figure 2 A phylogenetic analysis of 57 whole-genome sequences of CHIKV by the maximum-likelihood method

中国不属于基孔肯雅热地方性流行区,与该病流行国家往来频繁的人员,存在病毒传播的风险,衢州市尚属首次输入,患者发病前在基孔肯雅热的流行区孟加拉国达卡逗留,当地正处于雨季,蚊媒密度高,其逗留期间穿短裤短裙,未做好防蚊措施,被蚊虫叮咬概率增大可能是该患者感染的主要原因。虽然衢州市辖区卫生部门采取了积极措施,在疫点设立监测点,对核心区和预警区开展应急监测,在疫点及其周边开展灭蚊和清理蚊虫孳生地工作,但是该病例确诊后仍然出现了3例与患者同村居住、无外出旅行史的本地实验室确诊病例。患者居住地现场布

雷图指数达到了114,叮咬指数为10只/(人·h)^[10],如此高的蚊媒密度为传播CHIKV导致本地流行创造了有利条件,本地病例的全基因测定和溯源分析工作正在进行中,以期发现与输入性病例之间的分子流行病学证据。

参考文献

[1] Burt FJ, Rolph MS, Rulli NE, et al. Chikungunya: a re-emerging virus [J]. Lancet, 2012, 379 (9816) : 662-671. DOI: 10.1016/S0140-6736(11)60281-X.

[2] Weaver SC, Lecuit M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease [J]. N Engl J Med, 2015, 372(13) :

- 1231-1239. DOI:10.1056/NEJMra1406035.
- [3] Ross RW. The Newala epidemic: III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic[J]. J Hyg (Lond), 1956, 54 (2): 177-191. DOI: 10.1017/S0022172400044442.
- [4] Pastorino B, Muyembe-Tamfum JJ, Bessaud M, et al. Epidemic resurgence of chikungunya virus in democratic Republic of the Congo: identification of a new central African strain[J]. J Med Virol, 2004, 74(2): 277-282. DOI: 10.1002/jmv.20168.
- [5] Hapuarachchi HC, Bandara KBAT, Sumanadasa SDM, et al. Re-emergence of chikungunya virus in South-east Asia: virological evidence from Sri Lanka and Singapore[J]. J Gen Virol, 2010, 91(4): 1067-1076. DOI: 10.1099/vir.0.015743-0.
- [6] Zheng K, Li JD, Zhang QF, et al. Genetic analysis of chikungunya viruses imported to mainland China in 2008[J]. Virol J, 2010, 7: 8. DOI: 10.1186/1743-422X-7-8.
- [7] Li XF, Jiang T, Deng YQ, et al. Complete genome sequence of a chikungunya virus isolated in Guangdong, China[J]. J Virol, 2012, 86(16): 8904-8905. DOI: 10.1128/JVI.01289-12.
- [8] Sun Y, Yan JY, Mao HY, et al. Characterization of the complete genome of chikungunya in Zhejiang, China, using a modified virus discovery method based on cDNA-AFLP[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e83014. DOI: 10.1371/journal.pone.0083014.
- [9] Lu X, Li XB, Mo ZY, et al. Chikungunya emergency in China: microevolution and genetic analysis for a local outbreak[J]. Virus Genes, 2014, 48(1): 15-22. DOI: 10.1007/s11262-013-0991-2.
- [10] 赵瑞芳, 余新, 郑楷增. 浙江省衢州市一起基孔肯雅热疫情流行病学调查[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2018, 29(5): 505-507. DOI: 10.11853/j.issn.1003.8280.2018.05.022.
- [11] 杨瑞军, 王晓光, 黄世腾, 等. 浙江省衢州市首例输入性基孔肯雅热病毒基因特征分析[J]. 疾病监测, 2018, 33(10): 875-878. DOI: 10.3784/j.issn.1003-9961.2018.10.019.
- [12] Schwartz O, Albert ML. Biology and pathogenesis of chikungunya virus[J]. Nat Rev Microbiol, 2010, 8(7): 491-500. DOI: 10.1038/nrmicro2368.
- [13] Singh RK, Tiwari S, Mishra VK, et al. Molecular epidemiology of chikungunya virus: mutation in E1 gene region[J]. J Virol Methods, 2012, 185(2): 213-220. DOI: 10.1016/j.jviromet.2012.07.001.
- [14] Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, et al. A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential[J]. PLoS Pathog, 2007, 3(12): e201. DOI: 10.1371/journal.ppat.0030201.
- [15] Schuffenecker I, Iteman 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.
- [16] Agarwal A, Sharma AK, Sukumaran D, et al. Two novel epistatic mutations (E1:K211E and E2:V264A) in structural proteins of chikungunya virus enhance fitness in *Aedes aegypti*[J]. Virology, 2016, 497: 59-68. DOI: 10.1016/j.virol.2016.06.025.
- [17] Powers AM, Brault AC, Tesh RB, et al. Re-emergence of chikungunya and o'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships[J]. J Gen Virol, 2000, 81(2): 471-479. DOI: 10.1099/0022-1317-81-2-471.
- [18] Tsetsarkin KA, Chen RB, Weaver SC. Interspecies transmission and chikungunya virus emergence[J]. Curr Opin Virol, 2016, 16: 143-150. DOI: 10.1016/j.coviro.2016.02.007.
- [19] Yergolkar PN, Tandale BV, Arankalle VA, et al. Chikungunya outbreaks caused by African genotype, India[J]. Emerg Infect Dis, 2006, 12(10): 1580-1583. DOI: 10.3201/eid1210.060529.
- [20] Rodas JD, Kautz T, Camacho E, et al. Genetic characterization of northwestern Colombian chikungunya virus strains from the 2014-2015 epidemic[J]. Am J Trop Med Hyg, 2016, 95(3): 639-646. DOI: 10.4269/ajtmh.16-0091.
- [21] Sun SY, Xiang Y, Akahata, W, et al. Structural analyses at pseudo atomic resolution of chikungunya virus and antibodies show mechanisms of neutralization[J]. eLife, 2013, 2: e00435. DOI: 10.7554/eLife.00435.

收稿日期: 2019-03-07 (编辑: 卢亮平)