

基孔肯雅热诊断

Diagnosis for chikungunya fever

2018-03-06 发布

2018-08-01 实施

中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会 发布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 缩略语	1
3 诊断依据	1
4 诊断原则	2
5 诊断	2
6 鉴别诊断	2
附录 A（规范性附录） 基孔肯雅热血清学检测方法	3
附录 B（规范性附录） 基孔肯雅热病原学检测方法	8
附录 C（资料性附录） 基孔肯雅热的鉴别诊断	11
附录 D（资料性附录） 基孔肯雅热流行病学及临床表现	14
参考文献	16

前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准起草单位：广东省疾病预防控制中心、广州市第八人民医院、中国疾病预防控制中心、中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所、东莞市人民医院。

本标准主要起草人：何剑峰、张复春、李德新、王世文、王建、柯昌文、钟豪杰、殷文武、殷思纯、郭汝宁。

基孔肯雅热诊断

1 范围

本标准规定了基孔肯雅热的诊断依据、诊断原则、诊断及鉴别诊断。
本标准适用于全国各级各类医疗卫生机构及其医务人员对基孔肯雅热的诊断。

2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CHIKV: 基孔肯雅病毒 (chikungunya virus)

ELISA: 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay)

IgG: 免疫球蛋白G (immunoglobulin G)

IgM: 免疫球蛋白M (immunoglobulin M)

RNA: 核糖核酸 (ribonucleic acid)

RT-PCR: 逆转录-聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction)

3 诊断依据

3.1 流行病学史

发病前 12 d 内, 曾经到过基孔肯雅热流行区或居住场所或工作场所周围曾有本病发生。

3.2 临床表现

3.2.1 发热: 急起高热, 体温可达 39℃ 以上, 一般发热 1 d~7 d。部分病人热退后再次出现发热, 表现为双峰热, 持续 3 d~5 d 恢复正常。常伴有寒战、头痛、背痛、全身肌肉疼痛, 畏光, 恶心、呕吐等症状。

3.2.2 关节疼痛: 关节疼痛主要累及手腕和踝趾等小关节, 也可涉及膝和肩等大关节, 腕关节受压引起剧烈疼痛是本病的重要特征。急性期多个关节出现疼痛或关节炎表现, 可有肿胀或僵硬, 晨间较重, 严重者不能活动, 通常 1 周~3 周缓解。部分病例关节疼痛可持续数月。

3.2.3 皮疹: 发病后 2 d~5 d, 半数以上病例在躯干、四肢伸侧、手掌和足底出现红色斑丘疹或紫癜, 疹间皮肤多为正常, 部分伴有瘙痒感, 数天后消退, 可伴脱屑。

3.3 实验室检查

3.3.1 急性期血清特异性 IgM 抗体阳性 (见附录 A 中 A.1)。

3.3.2 恢复期血清特异性抗体 (IgG 或中和抗体) 滴度比急性期升高 4 倍及以上, 或急性期抗体阴性而恢复期抗体阳性 (见附录 A 中 A.2、A.3)。

3.3.3 急性期血清标本分离到基孔肯雅病毒 (见附录 B 中 B.1)。

3.3.4 急性期血清标本检测到基孔肯雅病毒核酸（见附录B中B.2）。

4 诊断原则

依据患者的流行病学史、临床表现及实验室检查结果进行综合判断。在从未发生过基孔肯雅热流行的地区，应以实验室检查依据为主。

5 诊断

5.1 疑似病例

符合3.1，3.2.1、3.2.2和/或3.2.3，并排除登革热和/或其他发热伴出疹性疾病者。

5.2 临床诊断病例

符合5.1，并同时符合3.3.1。

5.3 确诊病例

符合5.1或5.2，并同时符合3.3.2、3.3.3、3.3.4中任一项。

6 鉴别诊断

基孔肯雅热应与登革热、甲病毒（Alphavirus）感染、传染性红斑、感染后关节炎（包括风湿热）、猩红热、立克次体病（斑疹伤寒、恙虫病）、麻疹、药疹等相鉴别。参见附录C与附录D。

附 录 A
(规范性附录)
基孔肯雅热血清学检测方法

A.1 酶联免疫法检测基孔肯雅病毒 (chikungunya virus, 以下简称CHIKV) IgM抗体 (IgM抗体捕获酶联免疫吸附试验)

A.1.1 原理

首先用抗人IgM μ 链抗体 (捕获抗体) 包被96孔板, 如果待检血清中存在CHIKV抗IgM抗体, 则与包被的捕获抗体结合, 然后再与CHIKV抗原结合, 最后与加入酶标抗CHIKV抗体结合, 酶与显色底物相互作用就会出现显色反应。

A.1.2 材料和试剂

材料和试剂如下:

- a) 包被液: 碳酸钠/碳酸氢钠缓冲液, pH 9.6, 1.59 g Na_2CO_3 和 2.93 g NaHCO_3 溶解于 1 L 水中;
- b) 洗液: 磷酸盐缓冲液 (PBS), 含 0.05%吐温 20, pH 7.2;
- c) 封闭液: 含 5%奶粉和 0.05%吐温 20 的 PBS;
- d) 包被抗体: 抗人 IgM μ 链抗体;
- e) 病毒抗原: 灭活的纯化 CHIKV 抗原, 无感染性;
- f) 细胞抗原: 经纯化的未感染病毒细胞培养液;
- g) 酶标抗体: 辣根过氧化物酶标记的 CHIKV 单克隆抗体;
- h) 酶底物: TMB;
- i) 终止液: 2N H_2SO_4 ;
- j) 临床标本: 急性期病人血清和/或脑脊髓液标本; 阳性和阴性血清对照;
- k) 设备: 平底 96 孔板, 洗板机, 酶标仪, 恒温箱, 单通道和多通道移液器, 试剂储液槽, 保鲜袋, 吸水纸。

A.1.3 检测方法

按以下步骤操作:

- a) 用记号笔在酶标板上标记实验编号, 明确每份临床标本的位置。
- b) 用 pH 9.6 的包被液按 1:2 000 比例稀释抗人 IgM μ 链抗体, 按 75 μL /孔加入到 96 孔板的孔中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。
- c) 倒掉抗体包被液, 把板中剩余液体在吸水纸上吸干。每孔加入封闭液 200 μL 封闭反应板。室温孵育 30 min。
- d) 用洗液在自动洗板机上洗板 5 次。每次洗涤要保证每孔加满洗液。
- e) 病人血清用稀释液进行 1:100 稀释, 脑脊髓液进行 1:10 稀释, 然后按 50 μL /孔, 各加 2 孔, 同时用稀释液按 1:100 比例稀释阳性对照血清和阴性对照血清, 各加 2 孔。37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒孵育 1 h。洗涤 5 遍。
- f) 稀释病毒抗原和细胞抗原。每排左边 1 孔按 50 μL /孔加入病毒抗原, 每排右边 1 孔按 50 μL /孔加入细胞抗原。4 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒孵育过夜。洗涤 5 遍。

- g) 按 50 μL /孔加入辣根过氧化物酶标记的单克隆抗体, 37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒孵育 1 h, 洗板 5 遍。
- h) 所有孔中加 50 μL /孔的 TMB 底物液, 包括 1 孔未加样的空白对照孔。避光室温孵育 10 min。抗体阳性的孔中会逐渐显示出蓝色。
- i) 所有孔中加 50 μL /孔的终止液, 显示蓝色的孔此时会变成黄色。把酶标板放入酶标仪中, 在 450 nm 波长处读取 OD 值。

A. 1.4 结果判断

结果判断规则如下:

- a) 如果阳性对照血清病毒抗原孔的光密度 (OD) 值与细胞抗原孔的 OD 值之比 ≥ 2.1 , 检测结果有效;
- b) 如果待检标本病毒抗原孔的 OD 值与细胞抗原孔的 OD 值之比 ≥ 2.1 , 则可判定待检标本中 CHIKV IgM 抗体阳性。

A. 1.5 意义

病人血清或脑脊髓液标本中 CHIKV IgM 抗体阳性, 表示病人新近感染 CHIKV, 可作为病例诊断的依据。

A. 2 间接免疫荧光法 (IFA) 检测基孔肯雅病毒 IgG 抗体

A. 2.1 原理

IFA 就是先用待检血清中的特异抗体 (第一抗体) 与固定在玻片上的 CHIKV 抗原反应, 如果血清中存在 CHIKV 特异性 IgM 和 IgG 抗体, 就会与荧光标记的抗人 IgM 和 IgG 抗体 (第二抗体) 结合, 荧光显微镜下可见有特异荧光。

A. 2.2 材料和试剂

材料和试剂如下:

- a) 设备: 10 μL 、100 μL 、200 μL 和 1 000 μL 移液器各一支; 荧光显微镜; CHIKV 抗原片 (可用 BHK-21、Vero 或 C6/36 等感染细胞制备, 低温、干燥、密封保存); 盖玻片;
- b) 试剂: CHIKV 抗体阳性对照血清、阴性对照血清; 荧光素标记抗人 IgG 和 IgM 荧光抗体; 待检患者血清标本; 样品稀释液; 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.2); 吐温 20。

A. 2.3 检测方法

按以下步骤操作:

- a) 取出抗原片, 平衡至室温;
- b) 如果检测 IgG 抗体, 先用标本稀释液稀释待检血清, 从 1:10 开始, 倍比稀释至所需要的滴度;
- c) 用移液器取适量稀释标本加到每个反应区域 (标本量以覆盖所有反应区为准), 避免溢出和产生气泡;
- d) 将加有标本的抗原片放置在湿盒内, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱孵育 30 min;
- e) 用含 2% 吐温 20 的 PBS 冲洗抗原片, 然后再漂洗 5 min;
- f) 取出抗原片, 用吸水纸从抗原片背面和侧面擦去洗液 (不得擦拭反应区域), 加入适量的荧光素标记抗人 IgM 或 IgG 荧光抗体, 分别用于检测 IgM 或 IgG 抗体 (荧光抗体在使用前须根据说明书用 PBS 稀释);
- g) 将抗原片放置在避光的湿盒内, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱孵育 30 min;

- h) 用含 2% 吐温 20 的 PBS 冲洗抗原片,再将抗原片放入含有 1:8 000 伊文思蓝的吐温 20 的 PBS 中漂洗 5 min;
- i) 取出抗原片,用吸水纸从抗原片背面和侧面擦去洗液(不得擦拭反应区域),用甘油缓冲液封片,盖上盖玻片,避免产生气泡;
- j) 荧光显微镜下观察结果。

A. 2.4 结果判断

结果判断规则如下:

- a) 特异性荧光颗粒在镜下呈现黄绿色,如果抗原片的细胞胞浆中呈现出均匀的颗粒状荧光,可判断 CHIKV 特异抗体阳性。
- b) 根据荧光光亮度和阳性细胞在细胞总数中所占的比例可将荧光反应大致区分为“+ ~ ++++”,无特异荧光者为阴性。检测抗体滴度时,抗体滴度为特异荧光达“++”时最高血清稀释度的倒数。
- c) 如果阳性对照显示非特异性荧光或阴性对照显示清晰的荧光,试验则不成立,需重复检测。

A. 2.5 意义

恢复期血清 IgG 抗体阳转,或 IgG 抗体滴度较急性期有 4 倍及以上增高,均表示病人近期感染了 CHIKV,可作为病例确诊的依据。

A. 3 蚀斑减少中和试验检测基孔肯雅病毒中和抗体

A. 3.1 原理

血清中 CHIKV 中和抗体可阻断病毒吸附细胞,而未被中和的病毒仍具有感染细胞的能力,可导致单层细胞病变、脱落等,形成一个局限性的变性细胞区,该区称之为蚀斑。在单层细胞上覆盖含有活性染料的营养琼脂可指示蚀斑的多少。“蚀斑”是感染了病毒的细胞,病变死亡后无法被染料染上颜色,形成空斑,而未感染病毒的细胞可被活性染料着色,通过颜色的对比可判定蚀斑量。检测血清的中和抗体时,需用已知蚀斑滴定度的参考毒株与待检血清反应,蚀斑数减少表示血清有中和活性,中和反应后能引起 50% 蚀斑减少的血清稀释度的倒数即为蚀斑减少中和抗体的滴度。蚀斑减少中和试验检测基孔肯雅病毒中和抗体实验应在 BSL-3 级实验室内进行。

A. 3.2 材料和试剂

材料和试剂如下:

- a) 设备: 4℃ 冰箱、37℃ 水浴锅、二氧化碳培养箱、无菌平底 6 孔组织培养板。
- b) 易感细胞: 健康单层 Vero 细胞。
- c) 细胞生长液: 100 mL 生长液中包含 Eagle's MEM 溶液 88 mL, 10 000 IU/mL 青链霉素溶液 1 mL, 1% 谷氨酰胺 1 mL, 胎牛血清 10 mL, 用 7.5% 碳酸氢钠溶液调至 pH 7.2, 用前混匀。
- d) 细胞维持液: 100 mL 维持液中包含 Eagle's MEM 溶液 96 mL, 10 000 U/mL 青链霉素溶液 1 mL, 1% 谷氨酰胺 1 mL, 胎牛血清 2 mL, 用 7.5% 碳酸氢钠溶液调至 pH 7.2, 用前混匀。
- e) 细胞消化液: 2.5 g 胰酶溶于 1 000 mL 无钙镁磷酸盐缓冲液中, 过滤除菌。
- f) 病毒储备液及其滴定: CHIKV 接种 Vero 细胞, 待细胞出现细胞病理性效应 (CPE) 达 +++ 后收获病毒, 离心后将上清分装到无菌 2 mL 螺口血清管, 冻存到 -70℃ 冰箱作为病毒储备液备用。使用前先取一支病毒液进行病毒蚀斑形成单位 (PFU) 滴定。具体操作步骤为:

- 1) 准备 3 块已长成单层的 VERO 细胞 6 孔细胞培养板, 并编号;
- 2) 将病毒液用维持液做连续 10 倍稀释至 10^{-8} , 弃去细胞培养液, 然后从最高稀释度起将各稀释度的病毒液加到 6 孔细胞板中, 每个稀释度加两孔, 每孔 0.1 mL, 最后两孔作细胞对照, 37℃ 吸附 1 h;
- 3) 准备 1% 琼脂培养基, 并使其保温在 43℃, 病毒吸附结束后加入琼脂培养基到各细胞孔, 每孔 3 mL, 轻柔摇晃混匀, 确保琼脂将病毒液完全覆盖, 大约 20 min 后, 琼脂完全凝固, 将平板倒置放入 CO₂ 培养箱中, 37℃ 培养;
- 4) 每天观察计数蚀斑量, 并在细胞板的背面用记号笔圈出蚀斑; 如果接种 10^{-4} 稀释度的病毒孔的蚀斑无法计数, 接种 10^{-5} 稀释度病毒的两个细胞孔中平均有 100 个蚀斑, 那么病毒的滴度为 10^7 PFU /mL。
- g) 其他试剂: 阳性对照血清、阴性对照血清、待测血清标本、牛血清白蛋白(BSA)、pH 7.4 的 Tris 缓冲液、琼脂糖、中性红。

A. 3.3 检测方法

按以下步骤操作:

- a) 待检血清在 56℃ 水浴灭活 30 min, 除去血清中的补体和其他干扰因子。
- b) 用含 1% BSA 的维持液稀释病毒至每 0.1 mL 含有 200 个蚀斑单位 (200 PFU/0.1 mL)。
- c) 用含 1% BSA 的维持液将待检血清先做 1:5 稀释, 然后做连续 2 倍稀释至 1:160 或是所需要的滴度, 并保证每个稀释度的工作容量为 0.1 mL。
- d) 取稀释好的 200 PFU/0.1 mL 的病毒液 0.1 mL, 分别加入 0.1 mL 不同稀释度的血清中, 混匀后, 4℃ 孵育过夜, 或者 37℃ 孵育 1h。
- e) 取稀释好的 200 PFU/0.1 mL 的病毒液 0.5 mL, 加入等量的含 1% BSA 的维持液混匀, 然后对病毒液做连续 10 倍稀释, 包括: 10^{-1} 和 10^{-2} , 这些混合稀释液各自的最终病毒含量要达到 100 PFU/0.1 mL、10 PFU/0.1 mL 和 1PFU/0.1 mL, 最后对病毒液做回滴, 并且病毒回滴液和病毒血清混合液在同样条件下孵育。
- f) 孵育结束后, 先将 6 孔板中的单层细胞培养液吸出, 然后加入病毒-血清混合液, 每孔 0.1 mL。用另外一块细胞培养板加入用于病毒回滴的病毒稀释液, 各稀释度加两孔, 37℃ 吸附 1 h。
- g) 准备含中性红的 1% 琼脂或琼脂糖培养基, 加热使其完全溶解后放置 43℃ 水浴使其保持液体状态备用, 含有中性红染料的营养琼脂配方为: 维持液中加 1% 琼脂和 0.4% 中性红。
- h) 将上述 1% 琼脂培养基逐一加入病毒血清反应孔和病毒回滴孔中, 每孔加入 3 mL, 轻柔摇晃混匀, 确保琼脂将病毒-血清混合液完全覆盖。
- i) 大约 20 min 后, 琼脂完全凝固, 将平板倒置放入 CO₂ 培养箱中, 37℃ 培养。每天观察计数蚀斑量, 并在倒置的平板上用记号笔圈出蚀斑。

A. 3.4 结果判断

结果判断规则如下:

- a) 病毒回滴试验是为了确定加入的病毒量是否合适, 计算病毒回滴试验中的蚀斑数, 计算平行孔中的蚀斑数平均值, 只有蚀斑量在 30~100 之间时才计算试验孔中的蚀斑量, 最后计算中和抗体滴度。
- b) 阳性血清对照成立, 测定抗体滴度在已知抗体滴度的上下一个稀释度范围内; 同时检测细胞对照孔, 对照孔细胞形态正常则所做试验结果可靠。只有试验孔出现 90% 的蚀斑量减少现象才可判定出现了免疫中和反应。比如, 逆滴定表明已知攻击病毒滴度为 100 PFU/0.1 mL, 那么 ≤ 10 个蚀斑量的血清稀释度就是终点。

c) 能中和病毒的最高血清稀释度的倒数就是蚀斑减少中和抗体滴度。

A.3.5 意义

恢复期血清抗体滴度比急性期升高4倍或4倍以上或抗体阳转，表示病人近期感染了CHIKV，可作为病例确诊的依据。

附 录 B
(规范性附录)
基孔肯雅热病原学检测方法

B.1 基孔肯雅病毒分离与鉴定（细胞培养）

B.1.1 原理

基孔肯雅病毒（chikungunya virus，以下简称CHIKV）可感染蚊源C6/36细胞以及非洲绿猴肾细胞（Vero）和金黄地鼠肾细胞（BHK21）等哺乳动物细胞，并引起细胞病变效应（CPE）。细胞培养分离物可用特异性免疫荧光试验或特异性核酸扩增试验鉴定是否存在CHIKV。

B.1.2 材料和试剂

材料和试剂如下：

- a) 设备：二氧化碳培养箱、生物安全柜、倒置显微镜；
- b) 易感细胞：C6/36 或 Vero 或 BHK21；
- c) 细胞消化液：2.5 g 胰酶溶于 1 000 mL 无钙镁磷酸盐缓冲液中，过滤除菌；
- d) 细胞生长液：100 mL 生长液中包含 Eagle's MEM 溶液 88 mL，10 000 IU/mL 青链霉素溶液 1 mL，1%谷氨酰胺 1 mL，胎牛血清 10 mL，用 7.5%碳酸氢钠溶液调至 pH 7.2，用前混匀；
- e) 细胞维持液：100 mL 维持液中包含 Eagle's MEM 溶液 96 mL，10 000 U/mL 青链霉素溶液 1 mL，1%谷氨酰胺 1 mL，胎牛血清 2 mL，用 7.5%碳酸氢钠溶液调至 pH 7.2，用前混匀。

B.1.3 检测方法（以Vero细胞为例）

按以下步骤操作：

- a) 生长至单层的细胞管，弃去培养液，加入 200 μ L 稀释好的血清标本液，每份血清标本用细胞维持液作 1：10、1：100 稀释，每个稀释度接种两管，置 5%CO₂ 的培养箱中 37℃吸附 1 h（C6/36 细胞为 28℃吸附 1 h）；
- b) 吸附 1 h 后吸出细胞管中的标本液，加入 1 mL 细胞维持液，同时设正常细胞对照，置 5%CO₂ 培养箱中 37℃（C6/36 细胞为 28℃）培养 7 d，每天观察是否出现 CPE；如果 7 d 后仍未出现 CPE，则需再盲传 3 代。

B.1.4 结果判断

CHIKV 感染 Vero 细胞可出现典型的 CPE，表现为细胞脱落、坏死、破碎等特征。但确定病毒分离成功需经病毒特异性 RT-PCR 或间接免疫荧光试验对分离物或病变细胞进行鉴定。

B.1.5 意义

从病人血标本中分离到 CHIKV，可作为病例确诊的依据。

B.2 基孔肯雅病毒核酸检测

B.2.1 TaqMan 探针实时荧光逆转录聚合酶链反应（Real-time RT-PCR）

B. 2. 1. 1 原理

病毒RNA在逆转录酶的作用下产生cDNA，可作为聚合酶链（PCR）扩增反应的模版。TaqMan探针实时荧光定量PCR时，在反应体系中加入一对病毒特异性引物和一条荧光基团标记的病毒特异性探针。TaqMan探针的两端分别标记荧光报告基团和淬灭基团，在探针完好的情况下，报告基团发出的荧光信号被淬灭基团所吸收，因而检测不到荧光信号。在PCR扩增过程中，探针和引物与目标序列结合，当新生链沿着cDNA模板延伸到荧光标记的探针结合位点时，Taq酶发挥5' → 3' 核酸外切酶的功能，荧光报告基团与淬灭基团分离，荧光基团释放荧光信号。这样模板每扩增一次，就产生一个游离的荧光分子，利用荧光信号累积实时监测整个PCR进程，最后通过标准曲线对未知模板可进行定量分析。其中RNA逆转录过程可以和PCR扩增反应同时进行也可先进行逆转录反应再进行PCR扩增。其他类似机制的荧光探针也可用于核酸检测。

B. 2. 1. 2 材料和试剂

材料和试剂如下：

- a) 设备：移液器（1 mL、200 μL、100 μL、20 μL、10 μL 和 2 μL）及配套吸头；离心管（1.5 mL、0.2 mL 和 0.1 mL）；试管架（5 mL、1.5 mL 和 20 μL）；高速冷冻离心机；旋涡混合器；荧光定量 PCR 仪等；
- b) 试剂：病毒核酸提取试剂盒；荧光定量 RT-PCR 试剂盒；引物及探针等（参考序列如下）：
 CHIKV-FP：5' -TTTAGCCGTAATGAGCRTCGG-3'
 CHIKV-RP：5' -CCGTGTTCGGGATCACTGTTA-3'
 CHIKV-P：5' -FAM-TGCCCACACTGTGA -BHQ1-3'（带下划线的碱基需要 LNA 修饰）。

B. 2. 1. 3 检测方法

按以下步骤操作：

- a) 病毒 RNA 提取：待检标本用病毒 RNA 提取试剂盒提取，操作步骤按说明书进行，制备的病毒核酸作为 Real-time RT-PCR 的模板。
- b) Real-time RT-PCR 扩增：一步法 Real-time RT-PCR 检测反应条件为：42℃ 15 min, 95℃ 2 min, 95℃ 10 s, 62℃ 30 s, 45 个循环，仪器设置在每一循环 62℃ 退火/延伸步骤读取荧光信号。该反应条件可根据采用的试剂要求进行适当的调整。

B. 2. 1. 4 结果判断

结果判断规则如下：

- a) 以荧光 PCR 反应的前 3~15 个循环的荧光信号作为荧光本底信号，以本底信号标准差的 10 倍作为荧光阈值，标本扩增产生的荧光信号达到荧光阈值时所对应的循环数为循环阈值（Ct 值）。
- b) 检测样品的 Ct 值 ≤ 35.0，且出现典型的扩增曲线，可报告样品特异性核酸检测阳性。检测样品的 Ct 值介于 35~45 之间时，属临界区间，建议重复检测。若重复检测结果 Ct 值 ≥ 45.0 者为阴性；若 Ct 值仍介于 35~45 之间，且扩增曲线有明显的指数增长特征者，可报告样品特异性核酸检测阳性。
- c) 阳性对照的 Ct 值应 ≤ 32.0，并出现典型的“S”型扩增曲线；阴性对照 Ct 值应 ≥ 45；否则视为实验结果无效，需重复检测。

B. 2. 1. 5 意义

病人血清中检测到CHIKV核酸表示病人体内存在CHIKV，可作为病例确诊的依据。

B. 2. 2 逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR)

B. 2. 2. 1 原理

病毒RNA在逆转录酶的作用下先转录成模板cDNA,然后在聚合酶的作用下合成特异DNA片段,扩增主要由变性、退火和延伸三个步骤反复循环构成:即在高温(95℃)下,待扩增的靶DNA双链受热变性成为两条单链DNA模板;而后在低温(37℃~55℃)情况下,两条人工合成的寡核苷酸引物与互补的单链DNA模板结合,形成部分双链;在适宜温度下(72℃)经Taq酶催化,以引物3'端为合成的起点,以单核苷酸为原料,沿模板以5'→3'方向延伸,合成新的DNA链。

B. 2. 2. 2 材料和试剂

材料和试剂如下:

- a) 设备:移液器(1 mL、200 μL、100 μL、20 μL、10 μL和2 μL)及配套吸头;离心管(1.5 mL、0.2 mL和0.1 mL);试管架(5 mL、1.5 mL和20 μL);高速冷冻离心机;旋涡混合器;恒温振荡器;PCR仪等;
- b) 试剂:CHIKV特异性引物(CHIKV-F,CHIKV-R);RNA提取试剂;一步法RT-PCR检测试剂;CHIKV-F:5'-GGCGGGTAGTCCATGTTGTAGA-3';CHIKV-R:5'-ACGGCGTCTACCCATTCATGT-3'。

B. 2. 2. 3 检测方法

按以下步骤操作:

- a) 病毒RNA提取:待检标本用病毒RNA提取试剂盒提取,操作步骤按说明书进行,制备的病毒核酸作为RT-PCR的模板。
- b) 一步法RT-PCR扩增:反应条件为:逆转录50℃ 30 min;PCR反应,94℃ 2 min一次,再进行35个循环的94℃ 30 s,57℃ 30 s,68℃ 40 s,最后再以68℃ 5 min结束。该反应条件可根据不同的试剂进行适当的调整。

B. 2. 2. 4 结果判断

RT-PCR扩增产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测,如果条带的分子量与预期片段大小(330 bp)相同,可判定CHIKV核酸扩增阳性。

B. 2. 2. 5 意义

从病人血标本中检测到CHIKV核酸,表示存在病毒感染,可作为病例确诊的依据。PCR产物还可用于核酸序列分析。

附录 C

(资料性附录)

基孔肯雅热的鉴别诊断

C.1 登革热

基孔肯雅热与登革热的传播媒介相同，流行区域基本相同，临床表现亦类似，与登革热较难鉴别，两种疾病可同时发生于同一人。与基孔肯雅热相比，登革热发热持续时间更长，肌肉痛更明显，无明显游走性及多发性关节疼痛或关节炎表现，有出血倾向，白细胞和血小板减少明显。两者的鉴别需要依赖实验室特异性检测。

C.2 甲病毒 (Alphavirus) 感染

指阿尼昂尼昂病毒 (O'nyongnyongvirus)、马雅罗病毒 (Mayaro virus)、罗斯河病毒 (Ross river virus) 等感染疾病的统称。

阿尼昂尼昂病毒病以低热为主，多关节炎呈对称性分布，有颈部淋巴结肿大。马雅罗病毒病的关节炎或关节痛通常会持续2个月，有发热、头痛、皮疹和淋巴结病。罗斯河病毒病又称流行性多关节炎，为非对称性游走性关节炎，低热为主。

上述甲病毒感染抗原性比较接近，引起的临床表现和基孔肯雅热均相似，一般的血清学方法难以区别，需用交叉中和试验或单克隆抗体来鉴别。核酸检测和病毒分离是鉴别这些病毒感染的主要方法。

C.3 传染性红斑

由细小病毒B19引起，首先出现面部红斑，伴口周苍白，2 d~5 d后出现躯干和四肢的斑丘疹。关节受损表现为多发性关节炎，较多发生在近端指/趾关节、掌关节，可侵犯腕、膝和踝关节。鉴别方法为细小病毒B19特异性抗体和核酸检测阳性。

C.4 感染后关节炎 (包括风湿热)

表现为一处或多处关节炎，主要累及大关节，起因为感染衣原体、志贺氏菌、淋病等。风湿热更常发生于儿童，多见游走性多关节炎，常累及大关节。鉴别需要查看抗链球菌溶血素 (ASO) 滴度和咽痛史。

C.5 猩红热

发热，咽痛明显，1 d~2 d后全身出现针尖大小红色丘疹，为粟粒样皮疹，疹间皮肤充血，压之褪色，皮疹消退后多出现大片脱屑。外周血白细胞及中性粒细胞增高显著。少数患者病后可出现变态反应性关节损害。

C.6 立克次体病 (斑疹伤寒、恙虫病)

斑疹伤寒多见于冬春季节及寒冷地区，有虱寄生或叮咬史，发热伴有寒战、乏力、剧烈头痛等全身毒血症状，皮疹多于病程第4天～第5天出现，多孤立存在，不融合。外斐试验（变形杆菌OX19凝集试验）阳性。一般无关节痛症状。

恙虫病是人被带有病原体的恙螨幼虫叮咬而得病。发热伴有寒战、乏力、剧烈头痛等全身毒血症状，可有皮疹、浅表淋巴结肿大，焦痂或特异性溃疡最具临床诊断价值。外斐试验（变形杆菌OXk凝集试验）阳性。一般无关节痛症状。

C.7 麻疹

典型麻疹前驱期主要为发热伴有上呼吸道卡他症状、结膜充血、畏光、口腔麻疹黏膜斑。典型的皮疹及出疹顺序，麻疹的血清特异性IgM抗体阳性。一般无关节痛症状。

C.8 药疹

附 录 D
(资料性附录)
基孔肯雅热流行病学及临床表现

D.1 流行病学

D.1.1 传染源

人和非人灵长类动物是CHIKV的主要宿主。急性期患者、隐性感染者和感染病毒的非人灵长类动物是本病的主要传染源。

人患该病时,在出现症状后1 d~5 d内可产生高滴度病毒血症,因此急性期患者有较强的传染性。流行期间,隐性感染者也是重要的传染源。在丛林型疫源地内,非人灵长类动物为本病的主要传染源,已证实非洲绿猴、狒狒、红尾猴、黑猩猩、长臂猿、猕猴和蝙蝠可自然或实验感染CHIKV,并能产生病毒血症。

D.1.2 传播途径

主要通过感染病毒的伊蚊叮咬而传播。实验室内可能通过气溶胶传播,目前尚无直接人传人的报道。

雌性伊蚊叮咬病毒血症期的人后感染上CHIKV,病毒在蚊唾液腺细胞内大量增殖,经2 d~10 d的外潜伏期后,随着再次吸血,将病毒传播给易感者。

D.1.3 传播媒介

埃及伊蚊和白纹伊蚊是本病的主要传播媒介。埃及伊蚊与白纹伊蚊主要孳生在室内或房屋周边较为洁净的容器积水中,一般在白天叮咬人,活动高峰在日出后2 h和日落前2 h。病毒在蚊体内存活时间较长,甚至终生具有传染性。

D.1.4 潜伏期

1 d~12 d(通常3 d~7 d)。

D.1.5 传染期

患者在出现症状后1 d~5 d内可产生高滴度病毒血症,可引起媒介伊蚊的感染从而传播该病。

D.1.6 易感性和免疫力

未曾暴露于CHIKV的人群普遍易感。一般认为,人感染CHIKV后,可产生持久免疫力,不会再次感染。

D.1.7 地理分布

基孔肯雅热的地理分布与媒介伊蚊的地理分布相关,目前亚洲、非洲、欧洲以及美洲有百余个国家和地区已确认有基孔肯雅热疫情发生。

近年来非洲、美洲地区、亚洲地区常发生基孔肯雅热的暴发和流行。自2005年起,该病在印度洋各群岛大范围流行,印度、印度尼西亚、马尔代夫、缅甸和泰国报告病例超过190万例。印度2006—2007年的大规模流行报告疑似病例超过139万,部分地区的发病率超过45%;法属留尼旺岛的发病数高达27万人,约占当地人口的40%。2007年欧洲的意大利东北部首次报告了一次局部暴发。2008—2009年,泰

国、新加坡、印度、马来西亚继续报告基孔肯雅热疫情。2010年中国广东东莞报告国内首宗输入病例引发的本地基孔肯雅热暴发。

2013年12月,法国报告了法属圣马丁岛两例经实验室确诊的本地基孔肯雅热病例。此后,在美洲区域超过43个国家和地区确认发生了本地传播,截至2015年4月,加勒比岛屿、拉丁美洲国家和美国已记录的基孔肯雅热疑似病例近138万。美洲地区的国家通报了近70万例基孔肯雅热疑似病例和3.7万例确诊病例,其中哥伦比亚出现35.6万疑似病例。2016年,美洲地区国家报告近35万疑似病例和14.7万例确诊病例,报告病例数最多的国家是巴西(26.5万例),玻利维亚和哥伦比亚阿根廷发病较多。非洲的肯尼亚报告了一起1 700多例疑似病例的疫情。2016年至2017年,巴基斯坦发生基孔肯雅热的暴发。

D. 1.8 发病季节特点

发病季节与当地的媒介伊蚊季节消长有关。在热带和亚热带地区,基孔肯雅热一年四季均可发病,发病高峰一般在8月份~10月份。

D. 2 临床表现

D. 2.1 急性期

D. 2.1.1 发热

急性起病,寒战、发热,体温可达39℃,热程通常1 d~7 d,可自行退热;部分病人热退后再次出现发热,表现为双峰热,持续3 d~5 d恢复正常。

D. 2.1.2 关节疼痛

发热时,多个关节出现疼痛和肿胀,关节痛多为对称性,且进展迅速,可数分钟或数小时内关节功能丧失。多侵犯小关节如指、趾、腕、踝关节等,也可累及膝、肩等大关节,可持续数天或数月。

D. 2.1.3 皮疹

半数以上病例会在发热后2 d~5 d出现皮疹,皮疹呈典型的斑疹、丘疹或紫癜,主要分布在躯干、四肢的伸侧、手掌和足底,疹间皮肤多为正常,可伴瘙痒感。数天后消退。

D. 2.1.4 其他

急性期可出现肌肉痛、弥散性后背痛、头痛、恶心、呕吐、食欲减退、淋巴结肿大等症状和体征。少数患者可有结膜充血、轻度畏光的结膜炎表现,可出现脑膜炎、肝肾功能异常、心肌炎及皮肤黏膜出血等。基孔肯雅热引起的死亡病例极为罕见。

D. 2.2 亚急性和慢性期

出现症状10 d后,大多患者会感觉好转,关节痛减轻。但有部分病人会随后出现风湿病症状,包括末梢多发性关节炎、发病初期受累关节和骨骼疼痛再次加剧、腕和踝关节亚急性增殖性腱鞘炎。部分病人还可发展成短暂性外周血功能障碍,如Raynaud's综合征。

慢性期多指病症持续到3个月以上,最常见的慢性期症状是急性期受累的关节出现持续性炎性关节痛,但受累部位X线和实验室检查通常无阳性发现。然而,部分患者进而可发展为破坏性的关节炎或关节痛,类似类风湿或银屑病性关节炎。

其他慢性症状还有疲倦和抑郁等。

D.3 高危人群

高龄和新生儿患者、既往关节功能障碍、急性期症状严重、有基础疾病者是不良预后的高危因素。

D.4 实验室检查及治疗

白细胞计数多数为正常，少数病例白细胞总数及淋巴细胞减少，血小板正常或轻度降低。血清学检测及病原学检测（见附录A和附录B）。

本病目前尚无疫苗及特效抗病毒治疗药物，主要采取对症支持治疗。高热病人采用物理降温，避免使用阿司匹林。关节剧烈疼痛者可使用抗炎镇痛药物如布洛芬、奈普生、对乙酰氨基酚等。脑膜脑炎治疗主要为预防脑水肿，可使用甘露醇、速尿等药物降低颅内压等。

急性期感染者应采取防蚊隔离等措施。

参 考 文 献

- [1] Organization PAH. Preparedness and Response for Chikungunya Virus Introduction in the Americas Washington, D.C 2011.
- [2] World Health Organization ROfS-EA. Guidelines for Prevention and Control of Chikungunya Fever. India 2009.
- [3] Mohan A, Kiran DH, Manohar IC, et al. Epidemiology, clinical manifestations, and diagnosis of Chikungunya fever: lessons learned from the re-emerging epidemic. *Indian journal of dermatology*. 2010;55(1):54-63.
- [4] Renault P, Solet JL, Sissoko D, et al. A major epidemic of chikungunya virus infection on Reunion Island, France, 2005-2006. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2007;77(4):727-731.
- [5] Flahault A, Aumont G, Boisson V, et al. Chikungunya, La Reunion and Mayotte, 2005-2006: an epidemic without a story?. *SantePublique*. 2007;19 Suppl3:S165-195.
- [6] Talarmin F, Staikowsky F, Schoenlaub P, et al. Skin and mucosal manifestations of chikungunya virus infection in adults in Reunion Island. *Medecinetropicale : revue du Corps de sante colonial*. 2007;67(2):167-173.
- [7] Borgherini G, Poubeau P, Staikowsky F, et al. Outbreak of chikungunya on Reunion Island: early clinical and laboratory features in 157 adult patients. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2007;44(11):1401-1407.
- [8] Staikowsky F, Le Roux K, Schuffenecker I, et al. Retrospective survey of Chikungunya disease in Reunion Island hospital staff. *Epidemiology and infection*. 2008;136(2):196-206.
- [9] Jossieran L, Paquet C, Zehgnoun A, et al. Chikungunya disease outbreak, Reunion Island. *Emerging infectious diseases*. 2006;12(12):1994-1995.
- [10] Mohan A. Chikungunya fever: clinical manifestations & management. *The Indian journal of medical research*. 2006;124(5):471-474.
- [11] 翟洁卿, 李鸿超, 林炳亮, 等. 中国首次基孔肯雅热流行患者的临床特点. *中华传染病杂志*. 2011;39(6):344-347.
- [12] Qiaoli Z, Jianfeng H, De W, et al. Maiden outbreak of chikungunya in dongguan city, guangdong province, china: epidemiological characteristics. *PloS one*. 2012;7(8):e42830.
- [13] Wu D, Wu J, Zhang Q, et al. Chikungunya outbreak in Guangdong Province, China, 2010. *Emerging infectious diseases*. 2012;18(3):493-495.
- [14] 中华人民共和国卫生部. 基孔肯雅热诊断和治疗方案 (卫办医发【2008】99号) .