

# 2000 年东莞市麻疹病毒流行株基因型分析

朱建琼 彭志强 雷满根 王红 郑少敏 李润深 陈清 叶临湘 *R51 A*

**【摘要】** 目的 了解东莞市麻疹病毒(measles virus, MV)流行株的基因型。方法 2000 年 4~7 月间东莞市发生有 55 例患者的麻疹流行,采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法直接检测麻疹病人急性期唾液中的麻疹病毒核糖核酸(RNA)的 N 基因和 M 基因,对任意选取的 5 份 RT-PCR 阳性标本和疫苗株沪-191 的 N 基因扩增片段进行核酸序列测定,并进行序列系统树分析。结果 用 RT-PCR 方法直接检测的阳性率为 87.3%;用血清抗-MV-IgM ELISA 方法检测的阳性率为 70.9%,抗-MV-IgM 阴性的病人唾液中有 68.8% 的标本 MV-RNA 阳性。序列分析结果表明此流行株的基因型与世界麻疹病毒流行株不同,差异为 1.4%~11.7%,可归属于 H 基因型。结论 2000 年东莞市麻疹病毒流行株核酸序列完全相同,为 H 基因型,说明本次流行的麻疹病毒具有同源性,来源于同一传染源。

**【关键词】** 麻疹病毒;核糖核酸;基因型

**Analysis on the genotype of measles virus epidemic strains in Dongguan city, Guangdong province in 2000**  
ZHU Jianqiong\*, PENG Zhiqiang, LEI Mangen, et al.\* Dongguan City Health and Anti-epidemic Station, Dongguan 523000, China

**【Abstract】** **Objective** To analyze the genotype of the measles virus epidemic strains in Dongguan according to the patients suffered measles in 2000. **Methods** The saliva of 55 patients with acute measles symptoms were collected and detected with RT-PCR. The PCR products of the 5 samples were sequenced and analyzed with the software DNASTAR. **Results** The positive detection rate was 87.3%, whereas the positive rate of anti MV-IgM in serum was only 70.9%. 68.8% of the saliva samples of patients with anti MV-IgM negative results showing MV RNA positive. The 293 bp fragment of N gene and 194 bp fragment of M gene were amplified from the vaccine virus and the specimens. The sequences of the epidemic strains were identical in both M gene and N gene. **Conclusion** These results suggested that the outbreak came from a single MV strain. The epidemic strain was obviously different from the standard strains discovered in other countries of the world (the deviation were 1.4%~11.7%) that might belong to H genotype.

**【Key words】** Measles virus; Ribonucleic acid; Genotype

长期以来,麻疹病毒(measles virus, MV)一直被认为是遗传稳定的病毒,只有一个血清型,因而对麻疹病毒基因型的研究多集中在引起严重的神经性疾病的麻疹病毒的基因特征。欧美等国家近年来的实验结果表明,麻疹病毒野毒株基因存在多个谱系<sup>[1]</sup>,我国麻疹病毒流行株的基因分析结果显示麻疹病毒存在不同的基因型<sup>[2]</sup>。我国南方地区麻疹病毒的基因分析尚未见报道,为此,我们采集了广东省东莞市麻疹病人急性期的血清、唾液,采用逆转录-聚合酶链反应(reverse transcript-polymerase

chain reaction, RT-PCR)方法直接扩增麻疹病毒核糖核酸(MV-RNA),并进行基因型分析。

## 材料与方 法

1. 标本:2000 年 4~7 月在东莞市发生麻疹爆发,对 55 例疑似麻疹病人采集病人急性期咽拭子(即唾液)、血清,采集的咽拭子置于 2 ml 0.8% 生理盐水中,标本采集后置 -20℃ 保存备用。

2. 标本处理:使用 RNA 一步样品处理试剂盒(华美生物工程公司产品),咽拭子于 2 ml 盐水中反复挤压后弃去,4 000 r/min 离心后弃上清,沉淀中先后加入 200 μl 变性液 A 和 50 μl 氯仿:异戊醇(24:1),充分震荡混匀,14 000 r/min 离心 10 min。小心倒去液体,加入 400 μl 75% 乙醇,颠倒混匀,14 000 r/min 离心 5 min,弃去上清,在滤纸上沾干

作者单位:523000 广东省东莞市卫生防疫站计划免疫科(朱建琼、雷满根、李润深);第一军医大学流行病学教研室(彭志强、王红、陈清);东莞市厚街医院防疫科(郑少敏);同济医科大学流行病学教研室(叶临湘)

残留部分, 65℃ 烘箱烘干。得到的 RNA 沉淀可直接用于 RT-PCR 反应, 或放置 -20℃ 待用。

3. 抗-MV-IgM 测定: 使用中国药品生物制品检定所生产的抗-MV-IgM ELISA 试剂盒, 实验按说明书进行。

4. RT-PCR: 本次实验所用引物的设计依据文献<sup>[1]</sup>, 麻疹病毒核蛋白基因(N)引物: N1、N2R、N3、N4R; 麻疹病毒基质蛋白基因(M)引物: M1、M2R、M3、M4R(表 1)。

表1 RT-PCR 所用 MV-H、M 基因引物结构

引物	位置	序列(5'-3')	PCR 产物 (bp)
MV-M1	3541~3560	TCAGAGTCATAGATCTGGT	200
MV-M2R	3740~3721	AACAACATATGTC AAGCTCAG	
MV-M3	3549~3566	ATAGATCTGGTCTAGGC	194
MV-M4R	3736~3719	ACTATGTCAAGCTCAGTG	
MV-N1	1304~1323	GCATACTACTGAGACAAGA	301
MV-N2R	1694~1676	CTCTCGCACCTAGTCTAGAA	
MV-N3	1324~1341	TCAGTAGAGCGGTTGGAC	293
MV-N4R	1641~1624	TGTCTGAGCCTGTCTT	

5. 使用 RT-PCR 酶混合物(华美生物工程公司产品), 取上述得到的标本 RNA, 每管加入 RT-PCR 酶混合物 2 μl, 20 倍反应缓冲液(无 Mg<sup>2+</sup>) 1.5 μl, 氯化镁(MgCl<sub>2</sub>) (25 mmol/L) 2 μl, 三磷酸脱氧核糖核苷(dNTP) (10 mmol/L) 3 μl, 上下游引物(M1, M2R; N1, N2R) 各 0.5 μl, 无核酸酶 H<sub>2</sub>O 补充至 30 μl, 混匀离心, 37℃ 反转录 30~60 min, 得到的 cDNA 即可进行 PCR 扩增, 95℃ 2 min 后再进行 30 次(94℃ 30 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min) 循环扩增。

6. 第二步 PCR 扩增: 取 RT-PCR 产物 5 μl, 使用高保真 PCR 试剂盒(大连宝生物工程公司产品), 加入 5 μl 10 倍反应缓冲液, MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 4 μl, dNTP (10 mmol/L) 4 μl, 上下游引物(扩增 M 基因用 M3, M4R; 扩增 N 基因用 N3, N4R) 各 1 μl, 耐热 DNA 聚合酶 0.5 μl, 加水至 50 μl, 混匀离心后, 95℃ 2 min 后再进行 30 次(94℃ 30 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min) 的循环扩增。每次同时取卫生部上海生物制品研究所生产的冻干麻疹活疫苗株沪-191(批号 20001051) 用 0.8% 盐水稀释成病毒量为 3.5 TCID<sub>50</sub>/ml, 每次取 10 μl 做阳性对照, 取双蒸水做阴性对照。

7. 电泳分析: 用 pH 7.2 的电泳缓冲液制备的 2% 琼脂糖凝胶, 取第二步 PCR 产物 5 μl 电泳(5 V/cm), 电泳后溴化乙锭染色 20 min, 紫外灯下观察凝

胶。

8. 核酸序列的测定: 对疫苗株和任意选取的 5 个 RT-PCR 阳性标本的扩增产物回收纯化, 送中山大学安达生物技术公司针对 N 基因和 M 基因进行正反向测序。

9. 计算机分析: 采用美国 DNASTAR 软件 MegAlign 程序<sup>[3]</sup>, 依据目前各基因型的代表株的 N 基因 1234~1516 核苷酸序列为对照, 做序列系统树分析。

## 结 果

1. 抗-MV-IgM ELISA 检测结果: 55 例疑似麻疹病人标本中, 39 份阳性, 16 份阴性, 阳性率为 70.9%。

2. RT-PCR 检测结果: 55 例疑似麻疹病人的咽拭子标本处理液中, 48 份 RT-PCR 阳性, 7 份阴性, 阳性率为 87.3%。疫苗株沪-191 和病人标本均可扩增得到 N 基因和 M 基因核酸片段, 阴性对照无此片段。

3. 疫苗株沪-191 和其中 2 个咽拭子标本处理液 N 基因 293 bp 的核酸序列测定结果如图 1。5 份标本的核酸序列完全相同, 属同一流行株, 但不同于疫苗株沪-191。M 基因的 154 bp 中, 流行株有 5 bp 不同于疫苗株, 其中有义突变 3 处, 3 584 bp 处 G→C, 引起氨基酸改变 W→C; 3 595 bp 处 C→T, 引起氨基酸改变 T→M; 3 702 bp 处和 3 704 bp 处 A→G, 引起氨基酸改变 K→E。流行株 N 基因的突变数较多, 293 bp 中, 有 18 bp 不同于疫苗株, 其中有义突变 9 处, 引起 8 个氨基酸发生突变。其中 1408 处 G→A, 引起氨基酸改变 G→S; 1421 处 G→A, 引起氨基酸改变 A→D。

4. 依据 N 基因 1234~1516 核酸序列, 将东莞市 5 株麻疹病毒流行株与麻疹病毒疫苗株沪-191 以及各基因型的代表株做序列系统树分析, 如图 2。结果显示东莞市麻疹病毒流行株明显不同于以前的流行株的基因型 A、B、C、D、E、F、G, N 序列与世界其他地区流行株的差别为 1.4%~11.7%, 与 1993 年湖南麻疹病毒流行株以及 1995 年大连麻疹病毒流行株核酸序列相近<sup>[2]</sup>, 可归属于 H 基因型。

## 讨 论

2000 年 4 月 29 日至 7 月 2 日东莞市发生麻疹爆发, 患者以成人为主, 大多数为外省来东莞市 2~

```

1234      1249      1264
1  CCCAGACAAGCCCAAGTATCATTTATACACGGTGTCAAAGTGAG
2  P R O A Q D V O S E
3  CCCAGACAAGGCCAAGTCTCATTTTACACGGTGTCAAAGTGAG
4  CCCAGACAAGGCCAAGTCTCATTTTACACGGTGTCAAAGTGAG
5
1275      1294      1309
1  AATGAGCTACCGAGATTGGGGGCAAGGAAGATAGGAGOGTCAA
2  N E L P R L G G K E D R R V K
3  AATGAGCTACCGGATTTGGGGGCAAGGAAGATAGAAGGGTCAA
4  AATGAGCTACCGGATTTGGGGGCAAGGAAGATAGAAGGGTCAA
5
1324      1339      1364
1  CAGAGTCGAGGAGGACCCAGGAGAGCTACAGAGAAACCGGCCC
2  O S R G E A R E S Y R E T G T
3  CAGAGTCGAGGAGGAAACCCAGGAGAGCTACAGAGAAACCGGCCC
4  CAGAGTCGAGGAGGAAACCCAGGAGAGCTACAGAGAAACCGGCCC
5
1369      1384      1399
1  AGCAGAGCAAGTGTGCGAGAGCTGCCCATCTTCCAAACCGGCACA
2  S R A S D A R A A H L P T G T
3  AGCAGAGCAAGTGTGCGAGAGCTGCCCATCTTCCAAACCGGCACA
4  AGCAGAGCAAGTGTGCGAGAGCTGCCCATCTTCCAAACCGGCACA
5
1414      1429      1454
1  CCCCTAGCCATTGACACTGCATCGGAGTCCAGCCAGATCCGCAG
2  F L A P R S A D A L L R L O A H
3  CCCCTAGCCATTGACACTGCATCGGAGTCCAGCCAGATCCGCAG
4  CCCCTAGCCATTGACACTGCATCGGAGTCCAGCCAGATCCGCAG
5
1459      1474      1489
1  GACAGTCGAAGGTCAGCTGACGCCCTGCTTAGGCTGCAAGCCATG
2  A G S A D A L L R L O A H
3  GACAGTCGAAGGTCAGCTGACGCCCTGCTTAGGCTGCAAGCCATG
4  GACAGTCGAAGGTCAGCTGACGCCCTGCTTAGGCTGCAAGCCATG
5
1504      1519
1  GCAGGAATCTCGGAAGAACAAGG
2  A G S
3  GCAGGAATCTCGGAAGAACAAGG
4  GCAGGAATCTCGGAAGAACAAGG
5

```

图中黑体字为不同的核苷酸或氨基酸

图1 MV 疫苗株沪-191 与东莞市流行株 DG1China2000、DG2China2000 的 N 基因 293bp 核酸、氨基酸序列比较

3 个月的打工者,从同一批病人血清和咽拭子处理液标本的检测结果来看,RT-PCR 法敏感性要高于血清抗体的 ELISA 检测方法。按照卫生部对麻疹的诊断标准,具有麻疹的临床症状且血清抗-MV-IgM 阳性方可确诊为麻疹,因此,目前采用 RT-PCR 方法检测,其结果仅作为参考。另外,PCR 产物可以进一步测序<sup>[3]</sup>,进行麻疹病毒某些基因序列的分析,为病毒株的变异和基因分型提供信息。本次流行株核酸序列完全相同,说明为同一传染源,传播途径为病人间的密切接触。这一结果说明本流行期内的麻疹病毒几乎是同源的,在持续的人与人传播的过程中几乎不发生基因变异。

尽管麻疹病毒被认为是单一血清型别,但是序列分析表明,存在着截然不同的麻疹野病毒基因型并共同在人类中传播,多样性程度最高的是 N 基因 C 端的 450 个氨基酸,在编码病毒的 6 个基因中, H 基因和 N 基因是变异最多的两个。故设计引物扩增 M 基因一端相对保守区的序列,以明确麻疹的诊断; N 基因编码产物 C 末端是高变区,设计引物扩增片段为高变区侧翼的相当保守区。此次流行株的 N 基因明显不同于疫苗株(Edmonston 株)。

氨基酸 457~476(核苷酸 1370~1429)是 B 细胞表型位点,此区段中的氨基酸变化可能引起麻疹病毒的抗原性变异,东莞麻疹病毒流行株 N 基因 1408 处 G→A,引起氨基酸改变 G→S; 1421 处 G→A,引起氨基酸改变 A→D。这些氨基酸的变异到底在多大程度上影响麻疹病毒的抗原性尚需进一步研究,资料显示目前麻疹病毒的基因型的变化尚未影响到麻疹疫苗的效果<sup>[3]</sup>。

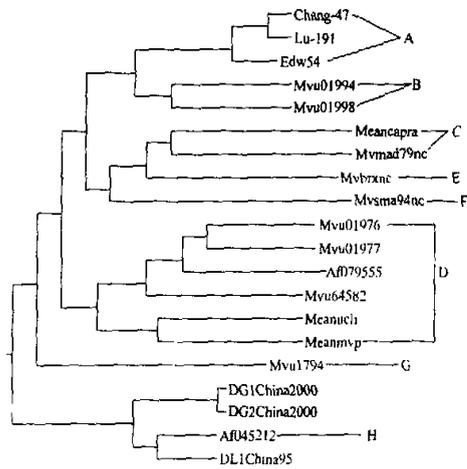


图2 依据 N 基因 1234~1516 核酸序列,东莞市麻疹病毒流行株与世界其他地区麻疹病毒流行株(N 基因 Genbank 号)及疫苗株核酸序列的系统树分析

目前,麻疹病毒分子流行病学的研究尚不够深入,主要原因是培养保存较困难而不容易获取材料,尽管应用 EB 病毒转化的狨猴淋巴细胞样细胞株 B95a 提高了病毒分离的成功率,但从细胞培养中分离麻疹病毒仍然是比较困难的,而且,对麻疹的诊断通常依据临床症状和血清学的确诊,一般得不到用于病毒分离或基因鉴定的标本,所以在实际工作中要逐步采用 RT-PCR 的方法来迅速确定病毒基因型和提高检测灵敏度。在病原体的分型上,基因型与表型相比,有更直接、更稳定、分辨率更高的特点<sup>[4]</sup>,研究人员找到病毒的起源地和流行途径,并及时监测病毒流行株,为麻疹控制策略提供强有力的支持。虽然序列分析并不能完全确定麻疹病毒株的地理起源,但可以确认不同流行期、不同地域的麻疹病毒株的关系及鉴别优势的、固有的毒株。在全球根除麻疹的这一战役中,分子流行病学调查将会及时准确地反映出各国的实际状况,以利于提出最佳的免疫策略,最终消灭麻疹。

参 考 文 献

1 Jin L, Richards A, Brown DWG. Development of a dual target-PCR for detection and characterization of measles virus in clinical specimens. *Molecular and Cellular Probes*, 1996, 10:191-200.

2 葛力, JIN Li, 邵燕, 等. 1995 年大连麻疹病毒流行株的部分基因分析. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1999, 19:9-12.

3 李永明, 赵玉琪, 主编. 实用分子生物学方法手册. 北京: 科学出版社, 1999. 274-281.

4 Jin L, Sun YJ, Ge L, et al. Characterization of a new genotype of measles virus detected in China and England. *Epidemiol Infect*, 1998, 121:691-697.

(收稿日期: 2001-01-30)  
(本文编辑: 尹廉)

· 短篇报道 ·

卢龙县 1998 年婴幼儿轮状病毒腹泻的流行病学和病毒血清型调查

R51 B

唐景裕 方肇寅 郝玉军 杨辉 宁剑 齐锦 赵振海 章菁 胡海宽

轮状病毒是引起婴幼儿腹泻的重要病原之一, 由其引起的腹泻也是儿童疾病引起死亡较多的一种. 为搞好婴幼儿腹泻的预防, 国内外正在积极研制轮状病毒疫苗<sup>[1]</sup>. 调查轮状病毒腹泻流行病学及病毒血清型分布状况对于今后实施疫苗免疫有重要的意义. 我们选择卢龙县作为调查点. 对该县县医院、妇幼保健院收治的婴幼儿腹泻患儿进行流行病学调查并采集粪便样本进行轮状病毒分离、鉴定和血清分型. 现将结果报告如下.

1. 材料与方 法: (1) 样本采集及流行病学调查: 1998 年 12 月至 1999 年 1 月由调查组人员专门到县医院和妇幼保健院采集样本, 送中国预防医学科学院病毒学研究所进行检测, 采集样本同时进行流行病学调查, 填写调查表. (2) 轮状病毒检测: 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法 (PAGE), 简言之, 取 0.3 ml 粪液样本, 经酚提核酸垂直板型电泳后硝酸银染色, 观察轮状病毒核酸带. (3) 轮状病毒血清型分型方法: 采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 和聚合酶链反应试验 (PCR). ELISA 分型用单克隆抗体, 购自日本 Serotec 株式会社, 方法详见文献<sup>[2]</sup>. 对 ELISA 分型结果不明确样本再用巢式 PCR 方法分型.

2. 结 果: (1) 流行病学调查结果: 经确诊的 47 例轮状病毒腹泻患儿, 男性 28 例, 女性 19 例, 男女之比为 1:0.68. 年龄最小为 2 月龄, 最大为 24 月龄, 平均为 9.3 月龄. 临床症状: 发热 25 例占 53.2%, 呕吐 38 例占 80.9%, 伴有呼吸道症状 2 例. (2) 轮状病毒 RNA 电泳检测结果: 本次调查中采集的 120 份婴幼儿腹泻样本, 经用 PAGE 检测, PCR 证实, 结果轮状病毒阳性 47 份占 39.2%, RNA 电泳型均为长型. 核酸电泳带呈 4212 (即基因节段 7, 8, 9 紧靠一起, 形成一条带) 和 4222 (即基因节段 7, 8 紧靠一起, 与基因节段 9 稍分开) 两种

类型, 其中 4212 电泳型占 57%, 4222 型占 43%. (3) 轮状病毒血清分型检测结果: 血清 3 型 29 例占 61.7%, 血清 1 型 17 例占 36.2%, 血清 4 型 3 例占 6.4%, 混合感染 2 例 (血清型 1+3 和 1+4). (4) 轮状病毒不同血清型在发病时间上的分布: 调查结果表明, 轮状病毒血清 3 型主要出现在 1998 年的 12 月中旬和 1999 年 1 月中旬, 分别占 32.14% 和 35.71%; 而血清 1 型主要分布在两年度的 12 月下旬和 1 月下旬, 分别占 28.57% 和 42.86%. 不同血清型在不同月龄患儿的分布情况: 血清 3 型主要分布在 8~12 月龄的患儿, 占 78.57%; 而血清 1 型各月龄的患儿分布差别不大.

3. 讨 论: A 组轮状病毒主要引起婴幼儿腹泻, 病毒基因组有 11 个节段, 利用 PAGE 可分为长型和短型, 根据 11 个节段的排列还可分成不同类型. 本调查中 47 株轮状病毒均为电泳长型, 其核酸排列主要为 4212 电泳型, 这种类型的电泳型在本县 1987 年的轮状病毒监测结果中未发现过, 在国内其他地区报道也较为少见.

国内方肇寅等<sup>[3]</sup>报道, 我国 1982~1998 年全国 16 个地区 1 830 株轮状病毒分型结果, 血清 1 型占 58.4%, 2 型占 18.7%, 3 型占 8.1%, 4 型占 1.9%. 而本次调查表明, 较罕见的血清 3 型在卢龙县占 61.7%, 为优势株, 这在国内少见, 值得流行病学工作者注意, 我们将继续在这方面进行跟踪调查.

参 考 文 献

1 方肇寅. 轮状病毒疫苗研究的突破. *国外医学病毒学分册*, 1998, 5:45-48.

2 方肇寅, 董虹, 温乐英, 等. 婴幼儿 A 组轮状病毒的单克隆抗体 ELISA 分型. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1988, 2:9-12.

3 方肇寅, 齐锦, 杨辉, 等. 我国 1998~1999 年流行的婴幼儿腹泻轮状病毒的分型研究. *病毒学报*, 2001, 1:17-23.

(收稿日期: 2001-05-27)  
(本文编辑: 杨莲芬)

作者单位: 066400 河北省卢龙县卫生防疫站肠道病毒室 (唐景裕、郝玉军、宁剑、赵振海、胡海宽); 中国预防医学科学院病毒学研究所肠道病毒组 (方肇寅、杨辉、齐锦、章菁)