

· 实验研究 ·

上海地区 2005 年麻疹流行株基因特性分析

李淑华 倪政 居丽雯 申惠国 谈逸云 蒋露芳 周连娣 林玉尊 郑英杰 姜庆五

【摘要】 目的 了解 2005 年上海部分地区麻疹暴发流行株的基因型别和特性, 加强麻疹病毒学监测。方法 采集暴发麻疹患者咽拭子标本分离病毒, 通过 RT-PCR 扩增麻疹病毒 N 基因 C 末端 450 bp 核苷酸并进行序列测定, 与 GenBank 中麻疹病毒各基因型参考株及国内其他地区的麻疹分离株进行基因比较。结果 从 10 例麻疹患者的咽拭子标本中共分离麻疹病毒 4 株, 均属 H 基因组 H1 基因型, 型内变异 0.7%~1.3%。与 H1 型代表株 China93-7 的基因同源性为 98%~98.2%; 与 H2 基因型代表株 China94-1 的基因差异为 6.4%~6.9%。与 A 型代表株 Edmonston 的基因差异为 6.7%~6.9%; 与中国麻疹疫苗株 Shanghai191 的基因差异为 7.6%~8.0%, 与国内其他地区麻疹流行株基因差异为 0.2%~3.7%。结论 2005 年上海部分地区麻疹暴发是由 H1 基因型病毒引起, 为中国本土流行株。

【关键词】 麻疹病毒; 基因型; 序列分析

Sequence analysis on measles viruses isolated in Shanghai in 2005 LI Shu-hua^{*}, NI Zheng, JU Li-wen, SHEN Hui-guo, TAN Yi-yun, JIANG Lu-fang, ZHOU Lian-di, LIN Yu-zun, ZHENG Ying-jie, JIANG Qing-wu. ^{*}School of Public Health, Fudan University, Shanghai 200032, China
Corresponding author: JIANG Qing-wu, Email: jiangqw@shmu.edu.cn

【Abstract】 **Objective** To ascertain the genetic characterization and genotype of measles viruses isolated in Shanghai region, in 2005. **Methods** Measles virus was isolated from throat swab specimens collected from suspected measles cases and 450 bp fragment of C terminus of nucleoprotein(N) gene was amplified by RT-PCR. Sequence analysis was conducted to ascertain the genotype and to compare the difference of nucleotide with other measles virus strain published in GenBank. **Results** 4 measles viruses were isolated from 10 throat swab specimens, and the sequence analysis indicated that they belonged to H1 genotype. The homogeneity of 450 nucleotides in the C terminal of the N gene was at 98%-98.2% as compared to H1 genotype (China93-7). They differed from genotype H2 (China94-1) at 6.4%-6.9% and from genotype A (Edmonston) at 6.7%-6.9%, from measles vaccine (Shanghai191) at 7.6%-8.0%. They differed from the other measles viral strain isolated in China in 1993-2005 at 0.2%-3.7%. The variation within 4 isolated measles viruses was at 0.7%-1.3%. **Conclusion** It was H1 genotype measles viruses, which are the native viruses in China that led to the outbreak of measles in Shanghai, in 2005.

【Key words】 Measles virus; Genotype; Sequence analysis

近年国内不少地区报道麻疹的暴发, 并出现小年龄组与成人组的麻疹病例。以往人们一直认为麻疹病毒(MV)只有一个血清型, 遗传稳定, 抗原性单一。但从 20 世纪 80 年代以来, 国内外陆续报道从不同地区感染患者分离到的 MV 存在基因差异, 截止 2003 年 10 月, 依据 WHO 对病毒分类及基因型命名的标准, 将 MV 划分为 8 个基因组(A~H), 共 22 个基因型。不同的 MV 基因型被限制在或多或少的地理区域。国内于 1993 年开展 MV 流行病学

监测, 1998 年第一次报道中国麻疹野病毒的分子流行病学资料^[1], 经过 10 年的监测证实 H 基因组 H1 基因型 MV 为中国本土流行株, 至少分布于全国 19 省以上的广大地区, 且其中的 H1a 亚型为中国的优势流行株^[2]。2005 年上海市部分地区麻疹暴发, 为了更好地了解目前上海市麻疹流行株的基因特性, 加强 MV 流行病学监测, 我们对本次暴发的 MV 进行了分离鉴定, 同时对其基因序列与国内其他地区分离株进行了比较。

材料与与方法

1. MV 分离: 2005 年 4-5 月, 采集暴发高峰期疑似麻疹病例咽拭子标本 10 例, 保存在 2 ml MV 标

作者单位: 200032 上海, 复旦大学公共卫生学院流行病学教研室公共卫生安全教育部重点实验室(李淑华、居丽雯、蒋露芳、周连娣、林玉尊、郑英杰、姜庆五); 上海市闵行区疾病预防控制中心(倪政、申惠国、谈逸云)

通讯作者: 姜庆五, Email: jiangqw@shmu.edu.cn

本运输液(含 5% 牛血清、终浓度 2000 U/ml 青霉素、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素和 25 U/ml 制霉菌素的细胞培养液)中,4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏,经抗生素处理过夜后接种已培养长成单层 Vero-SLMA 细胞,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 7-10 d,观察细胞病变(CPE)。CPE(+)连续传代 5 代,建株,并经麻疹单克隆免疫荧光抗体(IFA)进行病原学鉴定,CPE(-)者继续传代 3 代仍为阴性弃除。实验所用 Vero-SLMA 细胞为 WHO 推荐的分离 MV 细胞,由复旦大学公共卫生学院公共卫生安全重点实验室提供。IFA 试剂盒购于 Chemicon international 公司。

2. MV 基因型的鉴定标准方法^[3]:WHO 要求鉴定麻疹基因型别至少要扩增和序列测定 N 基因 C 碱末端 450 bp,或者扩增测定整个 HA 编码区的序列,如果与标准基因型参考株序列比较,N 基因 C 末端 450 bp 差异超过 2.5%,或 HA 基因差异超过 2.0%,则为 MV 新基因型。

3. RNA 提取:抽提经 Vero-SLMA 细胞培养的 2 代标本病毒 RNA,同时抽提来自于上海生物制品研究所生产的麻疹疫苗(Shanghai191)RNA,疫苗批号为 20050501303。RNA 抽提试剂为上海 invitrogen 公司的 TRIZOL-LS Reagent。

4. 设计引物:检索麻疹 N 基因序列,设计 1 对引物,扩增 N 基因 C 末端 450 bp 核苷酸序列,上游引物 P1:5'-TAG GGC AAG AGA TGG TAA GGA G-3'(1198~1219 nt),下游引物 P2:5'-TGT GTG GAC CTG GTT CCT AAG-3'(1745~1765 nt),扩增产物长度 568 bp。

5. RT-PCR:采用美国 Promega 公司的 Access RT-PCR System Kit, RNA 为模板,反应体系为:5 \times Reaction buffer 10 μl , MgSO_4 (25 mmol/L) 2 μl , dNTPMix(10 mmol/L) 1 μl , 上游引物(50 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 和下游引物(50 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 各 0.5 μl , AMA 逆转录酶(5 U/ μl) 1 μl , TflDNA 聚合酶(5 U/ μl) 1 μl , 总体积 50 μl 。37 $^{\circ}\text{C}$ 逆转录 30 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min 变性, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 62 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s 循环 40 次, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。扩增产物经回收纯化,送上海 Invitrogen 公司及上海基康公司进行序列测定。

6. 基因序列分析:在 NCBI 基因库中检索 1993-2005 年发表的中国各地区分离株 N 基因 C 末端 450 bp 核苷酸序列,WHO 麻疹 N 基因分型参考株,以及其他国家分离的同型 MV 株,采用 MEGA 3.1 软件对所需序列进行核苷酸同源性分析

和基因亲缘性关系分析。

结 果

1. MV 分离与鉴定:对 10 例疑似麻疹病例咽拭子标本进行病毒分离,有 4 份标本出现 CPE,分别来源于 3、4、8、9 号标本。经麻疹单克隆免疫荧光抗体(IFA)鉴定,可见细胞周边分布的阳性荧光颗粒,证实所分离到的 4 株病毒株均为 MV。按 WHO 麻疹野病毒的命名标准^[3],分别命名为 MV_i/shanghai. CHN/18. 2005/3, MV_i/shanghai. CHN/18. 2005/4, MV_i/shanghai. CHN/18. 2005/8, MV_i/shanghai. CHN/18. 2005/9。以下简称为 05-3MV, 05-4MV, 05-8MV, 05-9MV 分离株。

2. RT-PCR 结果:经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳观察,4 株分离株及 2 株疫苗株均可见 568 bp 目的基因条带。

3. 基因型别鉴定:序列分析表明,4 株分离株基因序列不完全相同,05-4MV, 05-9MV 基因序列完全相同,与 05-8MV 的基因相差 3 bp,基因差异为 0.7% (447/450),与 05-3MV 的基因差异 6 bp,为 1.3% (444/450)。4 株分离株与麻疹疫苗 Shanghai191 基因相差 34~36 bp,为 7.6%~8.0%。

4 株分离株及麻疹疫苗与麻疹 N 基因参考株构成基因进化树如图 1 所示,图中各基因型代表株各自构成分支,4 株分离株与 H 基因组 H1 基因型代表株 China93-7 分在同一基因型分支,基因同源性为 98%~98.2% (441~442/450)。与 H2 基因型代表株 China94-1 的基因差异为 6.4%~6.9%;与 A 基因型代表株 Edmonston 基因差异为 6.7%~6.9%;与其他 18 个基因型代表株中 WTF(c2) 的基因差异最大,为 10.7%~11.1%。按 WHO 推荐的分型标准,此次分离的 4 株 MV 株属于 H 基因组 H1 基因型。

同理麻疹疫苗 Shanghai191 与 A 基因组代表株 Edmonston 分在同一基因型分支,基因同源性为 98.2% (442/450),属于 A 基因型,与 H1 基因型代表株 China93-7 的基因差异为 7.3%。

4. 分离株与国内麻疹流行株基因比较:GenBank 共检索国内各地区不同年代的麻疹流行株 34 株,其中山东(SD)5 株,河北(HB)2 株,湖南(HN)5 株,北京(BJ)3 株,安徽(AH)4 株,浙江(ZJ)7 株,宁波(NB)8 株,除 BJ94-1(H2),SD93-5(A)外,其余 32 株均为 H1 基因型。许文波等^[2]报道 H1 亚型根据型内 2% 的变异又可划分为 H1a、H1b、H1c。

已报道^[2] 山东 SD93-2、SD93-4, 安徽 AH98-1、AH98-2、AH99-3、AH99-4 属于 H1i 基因型中 H1a 亚组; 湖南 HN94-7、HN95-13 属于 H1b 亚组; 山东 SD93-1、SD93-3, 河北 HB94-2、HB94-3、湖南 HN93-6、HN93-7、HN94-6 及北京 BJ94-4、BJ94-5 属于 H1c 亚组。

BJ94-4、BJ94-5 等 9 株 MV 共同构成 H1c 亚型分支, 基因同源性为 98.7%~99.8%, 与 4 株分离株的基因差异为 1.6%~2.5%。中国的麻疹疫苗株与山东 SD93-5(A) 病毒株及 A 基因型代表株 Edmonston 构成 A 基因型分支, 基因同源性为 98%~99.8%。BJ94-1(H2) 为独立的一支。

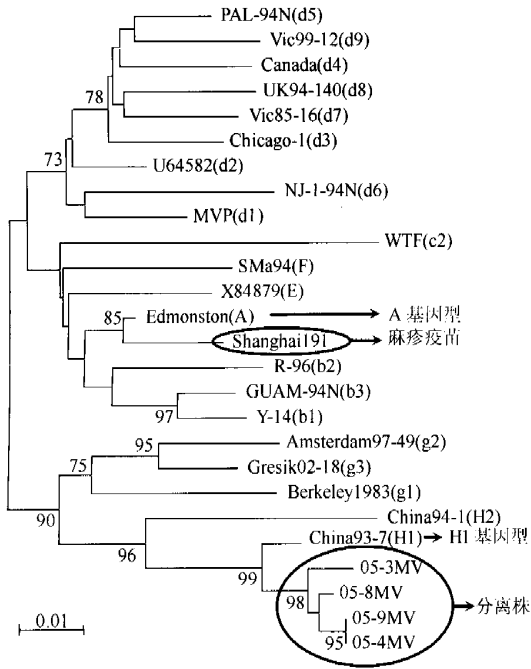


图1 4株分离株与各基因型参考株基因进化树

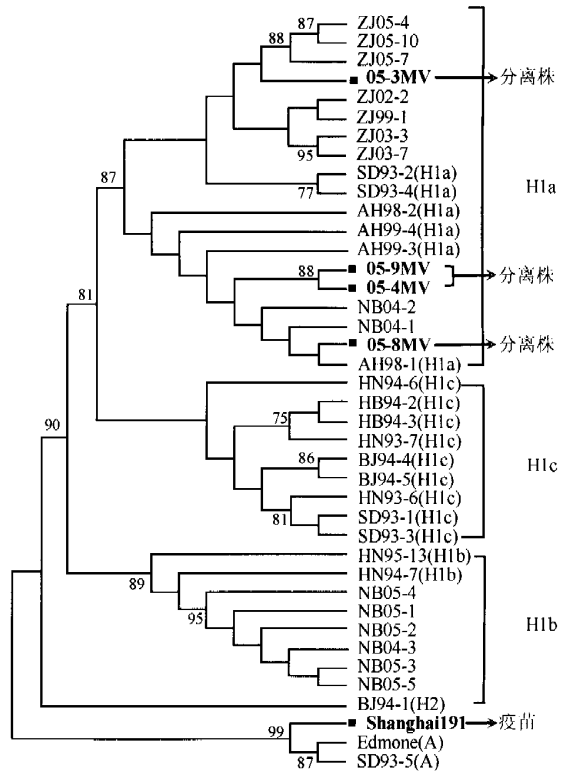


图2 4株分离株与中国各地区不同年代分离株基因进化树

4 株分离株与上述 34 株中国以往麻疹分离株构成的基因进化树(图 2)所示, 4 株分离株及浙江、宁波等 9 株分离株共同与山东、安徽的 6 株 H1a 基因亚型 MV 构成 H1a 亚型分支, 属于 H1a 亚型, 基因同源性为 98%~99.8%。其中 05-4MV, 05-9MV, 05-8MV 分离株与 AH98-1、AH98-2, AH99-3、AH99-4 及 NB04-1、NB04-2 分离株构成小分支, 基因同源性为 98%~99.8% (441~449/450); 05-3MV 分离株主要与浙江 ZJ05-4、ZJ05-7、ZJ05-10 分离株及 ZJ99-1、ZJ02-2、ZJ03-3、ZJ03-7, SD93-2, SD93-4 构成小分支, 基因同源性为 98.2%~99.1% (442~446/450)。

5. 分离株与其他国家分离的 H1 型 MV 株基因比较: GenBank 中, 与 4 株分离株同源性在 99.3% (447/450) 以上的毒株共 48 株, 来自中国台湾的 18 株、日本 7 株、美国 1 株、加拿大 3 株、澳大利亚 4 株、韩国 5 株、俄国 1 株、中国内蒙古 2 株、宁波 2 株、安徽 3 株、山东 2 株。其中 05-4MV、05-9MV 与 1993 年中国台北的分离株 MVs/Taipei. TWN/11.93 同源性为 100%; 05-3MV 与 2002 年来自于中国内蒙古的分离株 MVi/MGL/26.02, MVi/Ulanbataar. MOG/50.02 基因同源性为 99.8%。日本 2000 年分离株 MVi/Tokyo. JPN/20.00 (S), 与 05-8MV 基因同源性为 99.8%。

同理, 宁波 NB05-1、NB05-2、NB05-3、NB05-4、NB05-5、NB04-3 等 8 株分离株与湖南 HN94-7、HN95-13 等 H1b 基因亚型病毒构成 H1b 亚型分支, 属于 H1b 亚型, 基因同源性为 98.4%~99.8%, 与 4 株分离株的基因差异为 2.7%~3.7%。而属于 H1c 亚型病毒的山东 SD93-1、SD93-3、河北 HB94-2、HB94-3、湖南 HN93-6、HN93-7、HN94-6、北京

讨 论

2005 年, 上海市部分地区麻疹暴发, 患者大多为 15 岁以上成年人及部分未足 8 月龄的小儿, 本市

病例以 <8 月龄和 20 岁以上年龄组为主,外来户籍的流动人口分布在 20 岁以上、8 月龄~4 岁、<8 月龄及 15~19 岁年龄组不等,我们选取疫情较重的闵行区为监测点,从急性期疑似麻疹患者中共采集咽拭子标本 10 例,经细胞培养及单克隆荧光抗体免疫鉴定,共分离到 MV 4 株,基因型别鉴定为 MV H 基因组 H1 基因型,为中国本土流行株。2005 年上海部分地区麻疹的暴发流行是由中国本土流行株引起,非境外输入。

由基因进化分析可见(图 2),上海地区 2005 年分离的 4 株 MV 株全部属于 H1a 基因亚型,而检索的浙江省地区 MV 分离株中 9 株为 H1a 亚型、6 株为 H1b 亚型。已报道^[2],上海市自 1999 年建立麻疹病毒学监测,2000-2001 年从上海地区共分离 MV 15 株,其中 12 株为 H1a,3 株为 H1b,由此可见,H1a 亚型 MV 为上海的优势流行株,这与中国以往^[2]及 2005 年全国其他 6 省报道一致^[4]。

70-80 年代,上海的麻疹发病率始终控制在 1/10 万以下,发病以 5 岁以下儿童多见。90 年代,全国麻疹疫情回升,上海市自 2001 年起麻疹发病率上升^[5],2001-2004 年共报告麻疹暴发 73 起,262 例,流行特征表现为 1 周岁以下及 15 岁以上病例明显增多,2005 年上海地区麻疹病例急剧突增,1-4 月,报告麻疹病例 1195 例,高于去年同期 1305.88%,与全国的麻疹疫情趋势基本一致。目前由于缺乏上海及周边地区麻疹流行病学及病毒学监测资料的支持,还难于阐明 4 株分离株的传播来源,但从基因序列分析可见,上海地区的麻疹流行株与上海以往及中国其他地区的麻疹流行株基因序列没有明显差异,属于同一个基因型。4 株分离株基因序列不完全相同,至少可能来源于 3 个不同的传染源。

同时,基因序列分析表明,中国麻疹疫苗“Shanghai191”属于 A 基因组,与 4 株分离株的基因差异为 7.6%~8.0%,与检索到的 32 株 H1 型病毒株基因差异为 7.9%~9.2%。A 基因组疫苗与 H1 基因型流行株的基因差异是否引起 MV 的氨基酸以及抗原性变异以致影响疫苗的免疫效果有待于进一步研究。近年来麻疹疫情的回升及流行特征的改变使人们对麻疹疫苗免疫的持久性产生怀疑,因此

有必要加强对 MV 其他重要结构基因的分子水平的研究。

与 GenBank 中其他国家分离的 H1 型 MV 比较表明,4 株分离株与来自日本^[6]、美国^[7]、澳大利亚^[8]、韩国^[9]、加拿大^[10]等分离株的基因同源性在 99.3% 以上,其中 05-4MV、05-9MV 分离株与 1993 年中国台北的分离株 MVs/Taipei. TWN/11. 93 的基因同源性为 100%。上海是国际交流频繁的大都市,人口关系复杂,随着国际交往的日益频繁,增加了国内、外麻疹传播的可能性,在麻疹疫情回升的情况下,应加强麻疹的病原学监测,避免 MV 的输入及输出。

综上所述,2005 年上海地区麻疹暴发是由中国本土流行株 H1 基因型 MV 引起,与中国其他地区的麻疹流行株基因序列没有明显差异,其中 H1a 病毒为优势流行株。MV 分子流行病学的监测,对于分析麻疹的传染源,不同地域间传播途径以及研究 MV 的抗原漂移及最终控制和消除麻疹等具有十分重要的意义。

参 考 文 献

- [1] Xu WB, Tamin A, Rota JS, et al. New genetic group of measles virus isolated in the People's Republic of China. *Virus Res*, 1998, 54(2):147-156.
- [2] 许文波,朱贞,张珍英,等.麻疹野病毒 H1 基因型在中国流行的分析. *中国计划免疫*, 2003, 9(1):1-7.
- [3] Paul Rota. 麻疹的分子流行病学与监测. *中国计划免疫*, 2002, 8(3):174-177.
- [4] 姬奕昕,许文波,张燕,等.中国 6 省 2005 年麻疹病毒分离株分子特征分析. *病毒学报*, 2005, 21(6):407-414.
- [5] 胡家瑜,张金芳,陶黎纳,等.上海市 2001-2004 年麻疹暴发疫情流行病学特征分析. *中国计划免疫*, 2005, 11(6):473-475.
- [6] Zhou J, Fujino M, Inou Y, et al. H1 genotype of measles virus was detected in outbreaks in Japan after 2000. *J Med Virol*, 2003, 70(4):642-648.
- [7] Rota PA, Liffick S, Rota JS, et al. Molecular epidemiology of measles viruses in the United States, 1997-2001. *Emerg Infect Dis*, 2002, 8(9):902-908.
- [8] Chibo D, Riddell M, Catton M, et al. Studies of measles viruses circulating in Australia between 1999 and 2001 reveals a new genotype. *Virus Res*, 2003, 91(2):213-221.
- [9] Na BK, Lee JS, Shin GC, et al. Sequence analysis of hemagglutinin and nucleoprotein genes of measles viruses isolated in Korea during the 2000 epidemic. *Virus Res*, 2001, 81(1-2):143-149.
- [10] Tipples GA, Gray M, Garbutt M, et al. Genotyping of measles virus in Canada: 1979-2002. *J Infect Dis*, 2004, 189: S171-176.

(收稿日期:2006-06-02)

(本文编辑:王多春)