

北京地区流行性腮腺炎野病毒 与疫苗病毒基因特征比较

陈萌 张铁钢 陈丽娟 吴疆 杨洁 张伟

【摘要】 目的 比较北京地区流行性腮腺炎病毒流行株和疫苗株的基因特征,初步分析疫苗效果不佳的原因。方法 通过病例免疫史分析、病毒分离鉴定、SH 基因序列分析,与其他基因型参考株进行同源性比较及血凝素-神经氨酸酶(HN)基因氨基酸关键位点变异分析。结果 病毒分离阳性病例共 38 例,其中 IgM 阴性 7 例。在 2007 和 2008 年,病毒分离率、RT-PCR 阳性率、IgM 抗体阳性率都有明显下降,同时有免疫史的病例增多。实验证明无免疫史的病例病毒分离和 IgM 抗体阳性率更高。38 株病毒均属于 F 基因型,疫苗株属于 A 基因型。SH 基因流行株之间核苷酸最大差异为 5.6%,与疫苗株的差异为 16.0%~18.1%。部分北京株 SH 蛋白中保守的疏水性氨基酸发生变化,如第 8 位:6 株 L→F。各流行株之间 HN 蛋白氨基酸序列最大差异为 2.3%,与疫苗株差异为 4.2%~5.3%。在 HN 上决定交叉中和能力的氨基酸位点,北京株与疫苗株存在差异,如在 354 位和 356 位,所有北京株与疫苗株都不同。北京株在 HN 上的 N-糖基化位点也和疫苗株存在差异,如在 464~466 位置上为 NCS,疫苗株为 NCR。另有 18 个未知功能的氨基酸位点,所有北京株与疫苗株不同。结论 近年北京地区流行的腮腺炎病毒优势株为 F 基因型,未发现基因型间变异,已存在较大型内差异。北京株和疫苗株在 SH 和 HN 蛋白上都存在较大差异。

【关键词】 流行性腮腺炎病毒;疫苗;基因型

Comparison of genotype characteristics between the circulating mumps virus strain in Beijing area and the vaccine strain CHEN Meng*, ZHANG Tie-gang, CHEN Li-juan, WU Jiang, YANG Jie, ZHANG Wei. Beijing Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100013, China

【Abstract】 Objective To compare the genetic characteristics of mumps virus strain circulating in Beijing with vaccine strain and to preliminarily analysis the reasons of vaccine ineffectiveness. Methods The following methods were used: Isolation and identification of the mumps virus which had been circulating in Beijing, immunization history analysis, SH gene sequence analysis and comparison genotype homology with reference strains and analysis of the key amino acid sites of HN variation. Results In 38 mumps cases that virus had been isolated from, another seven cases were IgM negative. In 2007 and 2008, the positive rates on virus isolation, RT-PCR and IgM-decreased significantly, while the cases with immunization history had an increase. Cases without histories of vaccination had both higher positive rates on virus isolation and IgM. Thirty-eight strains belonged to F genotype virus, but vaccine strain was A genotype. The circulating viruses showed 5.6% sequence divergence on SH gene nucleotide and 16.0%~18.1% from vaccine strain. Conservative hydrophobic amino acids on SH protein of some Beijing strains had changed. For example, there were 6 strains, from No.8: L→F. The circulating viruses showed 2.3% sequence divergence on HN protein amino acid sequences and 4.2%~5.3% from vaccine strain. Amino acids sites, which deciding the ability of cross-neutralization of the Beijing strains and vaccine strains were different. At the 354 and 356 sites, all the Beijing strains were different from the vaccine strains. The N-glycosylation sites on HN of Beijing strains were also different from those on vaccine strains. Locations 464~466 appeared to be NCS on Beijing strain, but locations 464~466 were NCR on the vaccine strains. Another 18 unknown function amino acids sites of all Beijing strains were different from those on vaccine strains. Conclusion In recent years, genotype F became the main genotype of circulating strains in Beijing without genotype variation, but larger difference was found between them. There was a big difference between SH and HN protein of Beijing strains and vaccine strain, which might explain the ineffectiveness of the vaccine.

【Key words】 Mumps virus; Vaccine; Genotype

流行性腮腺炎(腮腺炎)病毒目前已发现存在 12 个基因型,分别命名为 A~L,我国特有的基因型为 F^[1,2]。腮腺炎病毒的凝集素-神经氨酸酶(HN)是病毒主要抗原^[3]。北京市从 2006 年开始免费接种腮腺炎疫苗,报告接种率为 99% 以上,但 2007 年和 2008 年发病率仍达到 22/10 万以上,无明显下降。北京市于 2004 年就开展了腮腺炎病毒监测,对临床标本进行病毒分离和核酸序列分析,比较地区流行株和疫苗株基因特征,分析腮腺炎疫苗的免疫效果,结果报告如下。

材料与方 法

1. 标本来源:标本由北京市 18 个区县疾病预防控制中心于 2004 年 2 月至 2008 年 6 月采集。

2. 血清学抗体检测:使用德国 Virion 公司的腮腺炎 IgM 和 IgG 抗体 ELISA Kit。

3. 病毒分离培养和 RNA 提取^[4]:含漱液标本低温冻融 3 次,接种至已生长成片的 Vero 细胞上,当 75% 的细胞出现典型的融合巨细胞病变时,判为病毒分离阳性,冻存于 -80 °C 冰箱。如经 7 d 培养未出现细胞病变,盲传 2 代,再培养 7 d 仍未出现病变,则判为病毒分离阴性。病毒 RNA 的提取使用德国 QIAGEN 公司的 QIAamp Viral RNA Mini Kit。

4. RT-PCR 扩增目的基因:使用德国 QIAGEN 公司的 OneStep RT-PCR Kit 进行 RT-PCR。

(1)SH 基因 RT-PCR:方法来自 Wu 等^[2]发表的中国 F 基因型测定方法。扩增片段为腮腺炎 SH 基因及旁侧区的 378 个核苷酸的片段。位置为:(1~41)位于 F 基因 3' 非编码区;(42~48)F-SH 基因间区域;(49~364)SH 基因;(365~366)SH-HN 基因间区域;(367~378)HN 基因 5' 非编码区。用于序列分析的片段为上述片段中 SH 基因 316 个核苷酸片段。

(2)HN 基因 RT-PCR:腮腺炎病毒 HN 蛋白基因包括 1746 个核苷酸,编码 582 个氨基酸。本研究使用 One-Step RT-PCR Kit 试剂盒分三段扩增 HN 基因及其旁侧区的核苷酸片段,大小分别为 850、797、863 bp。引物(位置)为腮腺炎病毒 P1F(6378~6397)和腮腺炎病毒 P5R(7227~7208);腮腺炎病毒 P3F(7109~7128)和腮腺炎病毒 P4R(7905~7885);腮腺炎病毒 P2F(7741~7761)和腮腺炎病毒 P6R(8603~8584)^[5]。

5. 基因序列测定和比较:

(1)对阳性结果的 PCR 产物用德国 QIAGEN 公司 QIAquick PCR Purification Kit 回收。用美国 ABI

公司 BigDYE Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit 进行测序的标记反应。用美国 PRINCETON 公司的 Centrisep Spin Columns 试剂盒纯化,用美国 ABI 公司 3100 自动测序仪完成测序和校对。双向测序,并拼接。

(2)用 DNASTar 软件进行序列拼接比对。参考国际上报道的 12 个基因型的 22 个代表株,用国际通用的 316 nt 片段通过 DNASTar 软件中的 Clustal W 分析方法做基因亲缘关系树,并分析流行株与参考株序列之间的同源性关系^[1]。

结 果

1. 腮腺炎疑似病例的实验室确诊及病毒分离:2004-2008 年共从 136 例腮腺炎疑似病例的标本中分离到 40 株阳性分离物,其中 38 株经 SH 基因 RT-PCR 实验鉴定为腮腺炎病毒。分离到病毒的病例中 34 例采集到急性期血标本,其中 27 例为 IgM 抗体阳性,7 例阴性。

2004-2006 年各年的病毒分离率和 RT-PCR 阳性率比较一致,IgM 抗体阳性率也比较接近,2007、2008 年都有明显下降(表 1、2)。对 2007、2008 年急性期血标本做 IgG 抗体检测,发现 IgG 抗体阳性率很高(表 2)。

表 1 2004-2008 年北京地区腮腺炎病毒分离鉴定及含漱液标本 RT-PCR 结果

年份	病例数	病毒分离		含漱液标本份数	RT-PCR	
		例数	阳性率(%)		份数	阳性率(%)
2004	16	5	31.25	16	10	62.50
2005	33	12	36.36	33	21	63.64
2006	23	9	39.13	8	5	62.50
2007	35	7	20.00	35	9	25.71
2008	29	5	17.24	29	7	24.14
合计	136	38	27.94	121	52	42.98

表 2 2004-2008 年北京地区腮腺炎病例急性期血标本诊断结果

年份	标本份数	IgM 抗体		IgG 抗体	
		份数	阳性率(%)	份数	阳性率(%)
2004	13	11	84.62	-	-
2005	27	19	70.37	-	-
2006	17	13	76.47	-	-
2007	32	12	37.50	30	93.75
2008	29	11	37.90	28	96.60
合计	118	66	55.93	-	-

注:-未检测

2. 病例免疫史分析:2004-2008 年均发现有免疫史病例和不发热的非典型病例,2007、2008 年有免疫史病例明显增多(表 3)。去除免疫史不详的 40

例,表 4 显示了免疫史状况对病毒分离和 IgM 抗体检测结果的影响,即无免疫史的病例病毒分离和 IgM 抗体阳性率更高。

表 3 2004 - 2008 年北京地区腮腺炎有免疫史病例和不发热病例的比例

年份	病例数	有免疫史病例		不发热病例	
		例数	率(%)	例数	率(%)
2004	16	5	31.25	2	12.50
2005	33	13	39.39	5	15.15
2006	23	5	21.74	2	8.70
2007	35	19	54.28	10	28.57
2008	29	14	48.28	14	48.28

表 4 腮腺炎病例免疫史状况与病毒分离和 IgM 抗体检测结果的关系

病例免疫史	病例数	病毒分离阳性		IgM 抗体阳性	
		例数	率(%)	份数	率(%)
有	56	11	19.64	48	35.42
无	40	15	37.50	27	69.23

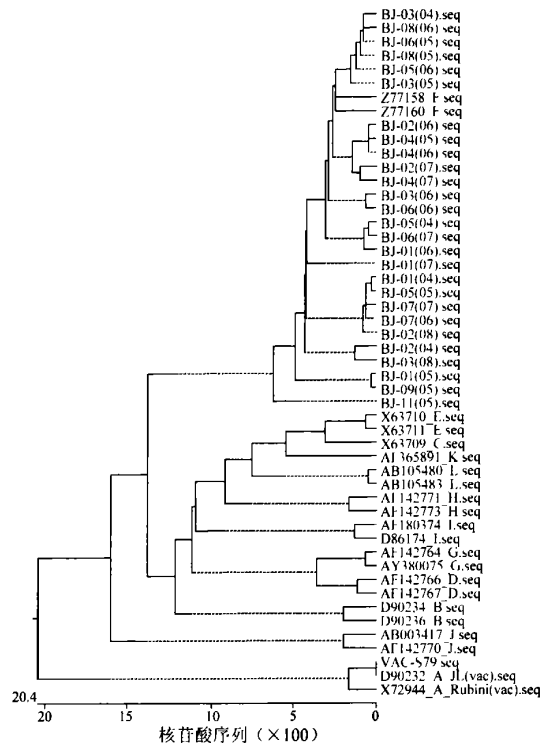
3. 腮腺炎病毒基因型鉴定与 SH 基因特征:挑选不完全相同序列的 27 株流行株与参考株分析基因亲缘关系(图 1)。北京地区 2004 - 2008 年分离到的 38 株腮腺炎病毒均属于 F 基因型,疫苗株 VAC-S79 属于 A 基因型。将流行株病毒和 VAC-S79 疫苗株与参考株序列比较,结果 VAC-S79 疫苗株 316 nt 片段与 Jeryl-Lynn(D9023)疫苗株序列 100% 相同。流行株与疫苗株的核苷酸差异较大,为 16.0% ~ 18.1%。

各流行株之间核苷酸最大差异为 5.6%;与 F 基因型代表株 Z77158(兰州)核苷酸差异均 < 5.0%,最大差异为 4.9%;与另一代表株 Z77160(上海)核苷酸差异均 > 5.0%,最大差异为 7.3%。根据 5.0% 的分型依据^[1,6,7],2004 - 2007 年流行株没有发生基因型变异,也没有监测到其他基因型的野毒株流行。但型内变异较大,最大差异为 4.9%,接近 5.0%。

4. 腮腺炎病毒 SH 蛋白保守性分析:北京地区个别野毒株在 SH 基因编码的氨基酸保守位点发生变化。如:11 位 T→K,23 位 I→N,45 位 Q→H/L,57 位 L→P。在高度保守的疏水性氨基酸位点也发生变化,如:第 8 位:6 株北京株发生 L→F;另有 1 株毒株在 48 位 L/R→P;1 株在 57 位 L→P。

北京株 SH 蛋白的第 28 ~ 30 位置上的氨基酸三联体^[8]大部分为 IML,即典型的 F 基因型特征,但有 6 株为 IIL,是 D, I, K, L 和部分 G 基因型特征;另有 3 株为 ILL,2 株为 IVL。

另外,北京株不同毒株之间存在 1 ~ 4 个氨基酸差异,与 F 基因型代表株相比,有 1 ~ 6 个氨基酸差异。



注:“BJ-”为北京地区分离并测序的病毒株,括号内数据为年份,VAC-S79 为本实验自测疫苗株,A ~ L 为 12 个基因型,参考株序列来源于 NCBI,使用 DNASTar 软件 Clustal W 分析法

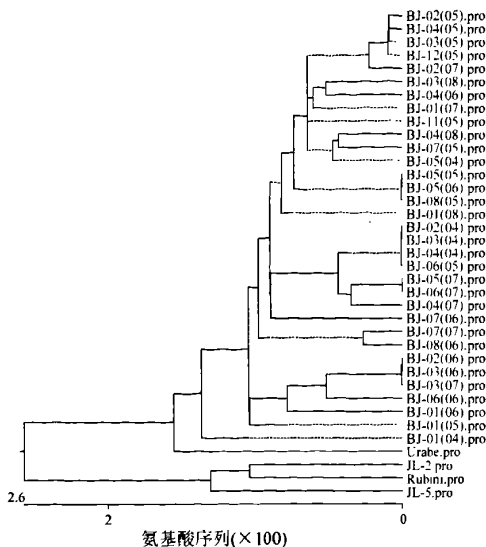
图 1 北京地区腮腺炎流行株与参考株 SH 基因 316 nt 片段亲缘进化树

5. 腮腺炎病毒 HN 蛋白同源性分析:阳性分离株 HN 基因测序成功的为 33 株。翻译成氨基酸序列后比较发现,不同分离株之间的差异为 0 ~ 2.3%。流行株与 Jeryl-Lynn 疫苗株之间的差异为 4.2% ~ 5.3%。

分析北京株与疫苗株的亲缘关系(图 2),发现北京株与 Urabe 株属于同一分支,而 Jeryl-Lynn 2 (JL2)、Jeryl-Lynn 5 (JL5) 和 Rubini 属于另一分支。Urabe 株属于基因型 B, JL2、JL5 和 Rubini 都属于基因型 A。

6. 腮腺炎病毒 HN 蛋白保守性分析:在 HN 蛋白上决定病毒交叉中和的氨基酸位点中^[9-11]的 354 和 356 位置,所有北京株与疫苗株都为不同的氨基酸。在 354 位,北京株为 Q,疫苗株为 P;在 356 位,北京株为 D,疫苗株为 E。在 329 ~ 340 位置也有 4 株北京株与疫苗存在差异。如:334 位 V→F,338 位 R→C/R→K。

在 HN 蛋白上决定副黏病毒神经氨酸酶活性的一个重要功能区 NRKSCS(aa240 ~ 245)^[12],所有北京株与疫苗株完全一样。另一个与硅酸受体结合的



注:疫苗株序列来源于NCBI,使用DNASar软件Clustal W分析法

图2 北京地区腮腺炎流行株与疫苗株HN氨基酸水平亲缘进化树

保守区 GAEGRV(aa405~410)^[13]也全部相同。HN蛋白上横跨膜的疏水区包括19个氨基酸 ILVLSVQAVTLILVIVTLG(aa35~53)^[5],北京株中1株的42位A→S,46位T→V;另1株51位T→N。

Urabe和Rubini株HN蛋白上9个潜在的N-糖基化位点(N-X-T或N-X-S)的位置为aa12~14,127~129,284~286,329~331,400~402,448~450,464~466,507~509,514~516^[13]。实验发现北京地区流行株也存在此9个N-糖基化位点,但在464~466位置上为NCS,疫苗株此位置为NCR。

此外,实验还发现全部北京株与疫苗株在18个未知功能的氨基酸位点存在差异(表5)。

表5 2004-2008年北京地区腮腺炎流行株与疫苗病毒HN蛋白氨基酸差异

氨基酸位置	病毒株		氨基酸位置	病毒株	
	疫苗株	流行株		疫苗株	流行株
8	I	T	205	R	H
9	M	LT	214	T	M
21	V	I	287~288	IK	VT
25	G	D	172	S	N
56	I	V	462	L	S
73	D	N/Y	470	I	V
80	A	T	474	V	A
98	V	I	552	V	A
121~123	NRN	SKK	577	A	T

讨 论

实验室诊断通常在发病初期采集血标本检测

IgM抗体,作为确诊指标。但本次实验中7例病毒分离阳性病例的急性期血标本IgM抗体检测阴性,证实仅依靠IgM抗体检测会造成病例漏检,漏检率为18.42%。

利用基因型别研究腮腺炎病毒株亲缘关系,掌握本地区病毒的循环状况、分析疫源地和传播途径,并进行连续的分子流行病学监测,对于科学有效地控制腮腺炎疫情有重要意义。SH基因作为基因组高变区可代表和反映不同腮腺炎病毒的分子特性,是国际上通用的基因型鉴定依据^[1,6]。国际上已经报道了12个基因型(genotype A~L),分型依据为在SH基因316个核苷酸中与所有参考株差异≤5%。近年来北京地区流行的优势株为中国特有的F基因型,没有发现其他基因型的野病毒流行,也没发现基因型间的变异。但同源性分析发现,北京株与F基因型代表株最大差异为4.9%,存在到达临界值的型内差异,因此需要持续监测。

对SH蛋白氨基酸序列分析发现,北京株的变异程度较高,部分北京株SH蛋白上一些被认为是比较保守的氨基酸位点发生了变化,而且蛋白中的疏水性氨基酸如脯氨酸(P)、色氨酸(W)、亮氨酸(L)是高度保守的,往往决定着蛋白发生折叠的位置^[7]。北京株的这些疏水性氨基酸也有些发生变化。提示SH蛋白结构有可能发生变化,从而引起抗原性的改变。

SH蛋白第28~30位置上的氨基酸三联体与基因分型有关^[8],不同的基因型有着较特异的氨基酸三联体。同一基因型内的与基因分型有关的氨基酸三联体更应该是保守的,但北京株虽都属于F基因型,却在部分流行株中出现了其他基因型的氨基酸三联体,这也证明了北京株在基因型内部发生的变异已经较大。同时,不同基因型具有不同程度的保守性,A,C,E,G,J基因型比B,D基因型更加保守^[8,10]。A基因型内仅发现过1个氨基酸的差异;C基因型被发现的最大差异只有3个氨基酸;B基因型变异程度高,不同毒株间氨基酸差异达1~10个;型内差异最大的是基因型D^[8,10]。北京株与F基因型内代表株之间氨基酸最大差异为6个氨基酸,推断F基因型属于变异程度较高的基因型。

腮腺炎疫苗为减毒活疫苗,近年来国内外曾多次报道^[4,5,14,15]有免疫史的腮腺炎病例发生。北京市从2000年将腮腺炎疫苗列入计划免疫,2006年开始免费接种麻疹、腮腺炎、风疹(MMR)三联疫苗,并在2006年对中小学进行大规模的MMR 0剂次的补种。但大规模接种后,2007、2008年的发病率没有

明显下降,同时出现大量有免疫史病例。与此同时,本项研究中2007年和2008年病毒分离率和PCR阳性率明显降低,这就提出了疫苗效果的问题。但是,2005年和2007年北京市MMR疫苗腮腺炎的初免成功率分别为92.11%和90.70%;浙江省报道S79株腮腺炎疫苗的初免抗体阳转率为79.59%~88.46%,MMR疫苗的抗体阳转率为82.86%^[16,17],证明腮腺炎疫苗的免疫成功率高,可以排除疫苗生产的质量问题。

腮腺炎病毒只有单一血清型,因此虽然疫苗株属于A基因型,仍对其他基因型的病毒有交叉保护的能力^[18-20]。但也有文献指出疫苗株免疫产生的血清对不同基因型的野病毒的中和能力并不相同^[21,22]。病毒的中和抗体决定簇位点主要在HN和融合蛋白(F)基因上,HN蛋白是病毒主要的免疫原性蛋白,高度保守^[3]。本研究一方面证实一些重要的功能位点上,北京株与疫苗株基本相同,证明了HN蛋白的保守性;另一方面,由于不同病毒株的HN蛋白氨基酸序列中,某些位置(如329~340,354和356)的变异有降低交叉中和的能力^[9-11],研究中发现北京株在这些位置和疫苗株存在差异,有可能影响疫苗株对北京株的中和能力。此外,北京株在HN蛋白上的N-糖基化位点也和疫苗株存在差异。糖基化位点的变化通常引起蛋白结构的变化,从而改变抗原决定簇,影响病毒和宿主细胞的结合^[13]。同时,本研究证明北京株HN蛋白上一些未知功能的氨基酸位点和疫苗株存在差异,为今后开展此项研究提供了资料。

参 考 文 献

- [1] Jin L, Rima B, Brown D, et al. Proposal for genetic characterisation of wild-type mumps strains: preliminary standardisation of the nomenclature. *Arch Virol*, 2005, 150(9): 1903-1909.
- [2] Wu L, Bai Z, Li Y, et al. Wild type mumps viruses circulating in China establish a new genotype. *Vaccine*, 1998, 16(2-3): 281-285.
- [3] 崔爱利. 流行性腮腺炎病毒的分子流行病学研究. *中国计划免疫*, 2006, 12(6): 524-526.
- [4] Laura Z, Susan R, Melinda W. *VPD surveillance manual*. 3rd ed. 2002.
- [5] Lim CS, Chan KP, Goh KT. Hemagglutinin-neuraminidase sequence and phylogenetic analyses of mumps virus isolates from a vaccinated population in Singapore. *J Med Virol*, 2003, 70(2): 287-292.
- [6] 杨文焜. 腮腺炎病毒的基因分型及当前疫苗的免疫效果. *国外医学预防诊断治疗用生物制品分册*, 2005, 28(2): 49-52.
- [7] Teclé T, Johansson B, Jelicic A, et al. Characterization of three co-circulating genotypes of the small hydrophobic protein gene of mumps virus. *J Gen Virol*, 1998, 79: 2929-2937.
- [8] Teclé T, Bottiger B, Orvell C, et al. Characterization of two decades of temporal co-circulation of four mumps virus genotypes in Denmark: identification of a new genotype. *J Gen Virol*, 2001, 82: 2675-2680.
- [9] Orvell C, Alsheikhly AR, Kalantari M, et al. Characterization of genotype-specific epitopes of the HN protein of mumps virus. *J Gen Virol*, 1997, 78: 3187-3193.
- [10] Orvell C, Kalantari M, Johansson B. Characterization of five conserved genotypes of the mumps virus small hydrophobic(SH) protein gene. *J Gen Virol*, 1997, 78: 91-95.
- [11] Kovamees J, Rydbeck R, Orvell C, et al. Hemagglutinin-neuraminidase (HN) amino acid alterations in neutralization escape mutants of Kilham mumps virus. *Virus Res*, 1990, 17: 119.
- [12] Mirza AM, Deng R, Iorio RM. Site-directed mutagenesis of a conserved hexapeptide in the paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein: effects on antigenic structure and function. *J Virol*, 1994, 68: 5093-5099.
- [13] Jorgensen ED, Collins PL, Lomedico PT. Cloning and nucleotide sequence of Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase mRNA: identification of a putative sialic acid binding site. *Virology*, 1987, 156: 12-24.
- [14] Yates PJ, Afzal MA, Minor PD. Antigenic and genetic variation of the HN protein of mumps virus strains. *J Gen Virol*, 1996, 77: 2491-2497.
- [15] 仲兆军. 一起接种腮腺后发生的流行性腮腺炎暴发疫情分析. *江苏预防医学*, 2002, 13(3): 51.
- [16] 王树巧, 顾祖万, 张亚达, 等. 国产腮腺炎和进口麻疹疫苗免疫后腮腺炎HI抗体比较. *微生物免疫学进展*, 1998, 26(2): 51-52.
- [17] 郭绍红, 徐天强, 吴维寿, 等. 冻干流行性腮腺炎减毒活疫苗人体反应及免疫效果观察. *中国计划免疫*, 1997, 3(1): 1-4.
- [18] Amexis G, Rubin S, Chizhikov V, et al. Sequence diversity of Jeryl Lynn strain of mumps virus: quantitative mutant analysis for vaccine. *Virology*, 2002, 300(2): 171-179.
- [19] Cohen BJ, Jin L, Brown DW, et al. Infection with wild-type mumps virus in army recruits temporally associated with MMR vaccine. *Epidemiol Infect*, 1999, 123: 251-255.
- [20] Georgios A, Steven R, Vladimir C, et al. Sequence diversity of Jeryl Lynn strain of mumps virus: quantitative mutant analysis for vaccine quality control. *Virology*, 2002, 300: 171-179.
- [21] Chamot E, Toscani L, Egger P, et al. Estimation of the efficacy of three strains of mumps vaccines during an epidemic of mumps in the Geneva Canton (Switzerland). *Rev Epidemiol Sante Pub*, 1998, 46: 100-107.
- [22] Committee on Epidemic Diseases. Efficacy of mumps virus vaccine. *Epidemiol News Bull*, 2000, 26: 45-47.

(收稿日期:2009-07-31)

(本文编辑:张林东)