

2012年上海市虹口区麻疹流行株 基因特征分析

李淑华 汤显 钱晓华 袁政安 李崇山 杨彦基 于晓楠 龚向真

【摘要】 目的 鉴定2012年上海市虹口区麻疹流行株基因型,了解2000—2012年上海市麻疹流行株基因特性。方法 采集疑似麻疹病例咽拭子标本,使用Vero-SLAM细胞分离麻疹病毒,使用RT-PCR扩增分离培养阳性病毒N基因羧基末端450 bp片段并测序,与GenBank中的部分流行株构建系统进化树,分析麻疹病毒基因型,同时进行流行病学调查。结果 34份咽拭子标本中分离到麻疹病毒7株,进化树分析显示,6株为H1基因型,1株为D8基因型。流行病学调查显示,D8基因型为上海自2000年开展病毒监测以来的首次外来输入病毒。结论 2012年虹口区麻疹分离株与历年上海市麻疹流行株属于同一基因型,H1a亚型为优势流行株,首次出现D8基因型,为外来输入病毒。

【关键词】 麻疹病毒; 输入病例; D8基因型

Genetic characterization of the isolates of measles viruses in Hongkou district of Shanghai, China in 2012 Li Shuhua¹, Tang Xian¹, Qian Xiaohua¹, Yuan Zheng'an², Li Chongshan², Yang Yanji¹, Yu Xiaonan¹, Gong Xiangzhen¹. 1 Hongkou District Center for Disease Control and Prevention of Shanghai, Shanghai 200082, China; 2 Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention Corresponding author: Gong Xiangzhen, Email: hkshequ@163.com

This work was supported by grants from the Shanghai Municipal Health and Family Planning Commission (No. 20114067) and the Excellent Academic Leaders of Shanghai Public Health Field (No. GWDTR201225).

【Abstract】 Objective To ascertain the genotype of measles viruses isolated in 2012 and genetic characterization of measles viruses in Hongkou district of Shanghai during 2000–2012. **Methods** Measles virus was isolated from throat swab specimens collected from suspected measles cases and 450 bp fragment of C terminus on 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 announced by GenBank during 2000–2012. Measles virus genotype was analyzed. Epidemiological investigation was conducted. **Results** Phylogenetic analysis showed that 7 measles virus samples were isolated from 34 throat swab specimens with 6 of them belonged to H1 genotype, 1 belonged to D8 genotype of H1 genotype. H1a appeared the main part of Shanghai measles virus. Epidemiological survey showed that D8 was an imported case, also the first case detected since 2000. **Conclusion** The genotype distribution of measles virus in Hongkou was identified the same as elsewhere in Shanghai. D8 was an imported case, detected for the first time since 2000. The results suggested that viral gene sequencing and genotyping should be regularly conducted at the measles laboratories in Shanghai to strengthen the networking monitoring program of the disease.

【Key words】 Measles virus; Imported cases; D8 genotype

麻疹病毒共划分为8个基因组(A、B、C、D、E、F、G、H),共23个基因型^[1,2],H1基因型为中国本土流行

株^[3,4],为了解上海市麻疹流行株基因特性,本研究对虹口区分离的7株流行株进行测序,并对2000—2012年上海市部分流行株基因特性进行分析。

材料与方 法

1. 病毒分离:采集麻疹疑似病例咽拭子标本,接种于生长良好的Vero-SLAM细胞中,每份标本接种2孔,并设细胞对照,每日用倒置显微镜观察细胞病变(细胞融合现象)1~2周,详细记录观察结果。病

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.04.019

基金项目:上海市卫生局科研计划课题(20114067);上海市公共卫生优秀学科带头人培养计划(GWDTR201225)

作者单位:200082 上海市虹口区疾病预防控制中心(李淑华、汤显、钱晓华、杨彦基、于晓楠、龚向真);上海市疾病预防控制中心(袁政安、李崇山)

通信作者:龚向真, Email: hkshequ@163.com

变细胞占正常细胞 75% 以上时,反复冻融 3 次离心取上清液-20℃低温冰箱保存。若未出现病变,则盲传 3 代,出现细胞病变,则保存备用。实验由上海市疾病预防控制中心(CDC)实验室完成。

2. 流行病学调查:按照上海市麻疹监测方案,进行流行病学调查及样本采样,由虹口区 CDC 免疫规划科完成。

3. 提取 RNA:采用天根生化科技(北京)有限公司 TIANamp virus RNA Kit(DP315-R),对细胞培养阳性的病毒标本进行提取核酸,按试剂盒说明书操作,提取的 RNA 于-80℃保存备用。

4. RT-PCR 及序列测定:根据麻疹病毒的分型要求,扩增病毒 N 基因羧基末端 450 bp 序列,上游引物 P1:5'-TAG GGC AAG AGA TGG TAA GGA G-3'(1 198~1 219 bp),下游引物 P2:5'-TGT GTG GAC CTG GTT CCT AAG-3'(1 745~1 765 bp),扩增产物长度 568 bp。采用天根生化科技(北京)有限公司 One step RT-PCR 试剂盒对目的基因进行扩增,反应体系为 50 μl:10×sd RT-PCR Buffer 5 μl, dNTPMix 2 μl,5×RT-PCR enhancer 10 μl,RNasin (40 U/μl)0.5 μl,Hotmaster Taq polymerase(2.5 U/μl)1 μl,Quant RTase 0.5 μl,上、下游引物(10 μmol/L)各 3 μl,模板 RNA 为 2 μl,无 DNA 酶的水 23 μl。PCR 反应条件:50℃30 min(反转录);94℃2 min;94℃0.5 min,56℃1 min,65℃2 min,40 个循环;65℃10 min。扩增产物经回收纯化,送上海生工生物工程有限公司进行序列测定。

5. 基因序列分析:检索 GenBank 数据库,获得麻疹病毒分型参考株序列及上海市麻疹病毒历年分离株序列信息,进行网上 BLAST 比对,采用 Mega 4.0 软件,对目的基因序列进行核苷酸同源性和基因亲缘性关系分析,bootstrap 值为 1 000。

结 果

1. 麻疹病毒分离:2012 年虹口区麻疹报告病例

34 例,采集咽拭子标本 34 份,接种到 Vero-SLAM 细胞中,分离病毒 7 株,病例基本信息及流行病学基本资料详见表 1。

2. 目的基因扩增及测序:7 株分离株经对 RT-PCR 扩增后,均获得 568 bp 目的片段,测序后通过 NCBI 网站进行 BLAST 比对,获得的序列均包含麻疹病毒 N 基因羧基末端 450 bp 序列。

3. 基因分型:7 株分离株基因序列不完全相同,其中 SHHK2012-01、SHHK2012-03、SHHK2012-04 序列完全相同,SHHK2012-02、SHHK2012-05、SHHK2012-06 序列完全相同,上述 6 株分离株与 H1 基因型参考株 Hunan.CHN/93/7(AF045212)核苷酸相差 2.22%~2.45%(440/450~439/450),与 H2 基因型参考株 Beijing.CHN/94/1(AF045217)核苷酸相差 6.67%(420/450),与其他 22 个基因型参考株核苷酸相差 7.11%~11.33%(418/450~399/450)。按 WHO 推荐的“麻疹病毒基因型分型标准”^[1],6 株分离株属于 H1 基因型。

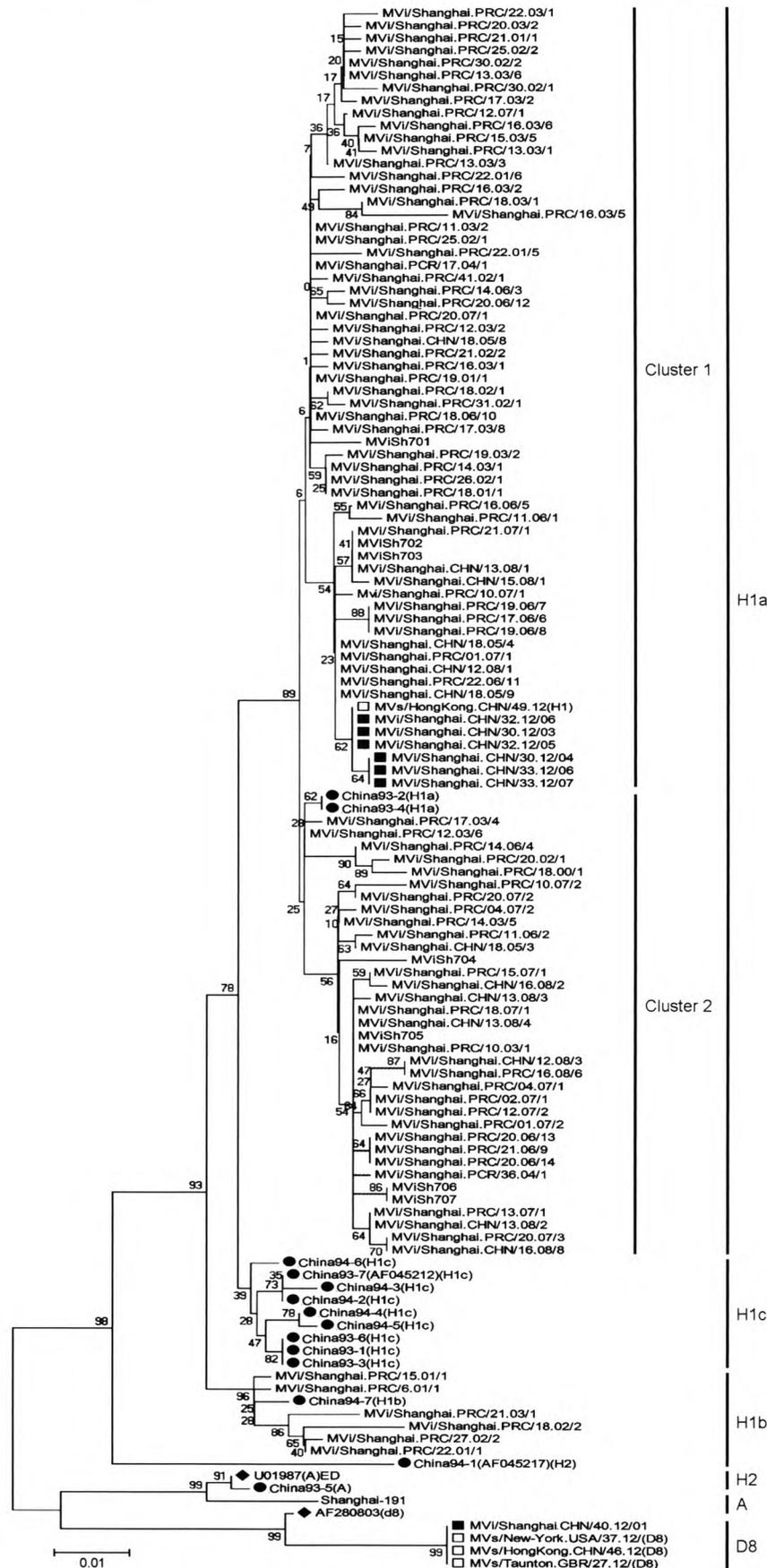
SHHK2012-07 分离株与其他 6 株分离株核苷酸相差 8.89%~9.11%(410/450~409/450),与 D8 基因型参考株 Manchester.UNK/30.94(AF280803)核苷酸相差 2.22%(440/450),与其他基因型参考株核苷酸相差 4.89%~10.0%(428/450~405/450),属于 D8 基因型。

4. 与 2000—2012 年上海市部分麻疹流行株基因特性比较:检索 NCBI 网站,获得 2000—2012 年上海市麻疹部分分离株 97 株,中国 1993—1994 年分离的 14 株(麻疹病毒基因亚型参考株^[4,5])及疫苗株 S191 等基因序列,与 2012 年新分离 7 株流行株共同构建基因进化树,如图 1。

2012 年新分离 6 株 H1 型流行株与 2000—2012 年上海 91 株流行株及 1993—1994 年 H1a 亚型参考株 China93-2 和 China93-4 共同构成分支,分支内核苷酸差异为 0~2.22%(440/450),分支内呈现 2 个亚分支,分支 1(Cluster 1)62 株,分支 2(Cluster 2)35

表 1 2012 年上海市虹口区 7 株分离株病例流行病学信息

性别	年龄(岁)	职业	户籍	发病日期(月/日)	诊断日期(月/日)	分离株标准命名	基因型
男	26	干部职员	本县(区)	08/06	08/10	MVi/Shanghai.CHN/30.12/04	H1
男	26	商业服务	其他省份	07/26	07/29	MVi/Shanghai.CHN/32.12/05	H1
男	36	餐饮食品业	本县(区)	08/16	08/19	MVi/Shanghai.CHN/32.12/06	H1
女	36	家政、家务及待业	本县(区)	08/08	08/12	MVi/Shanghai.CHN/33.12/06	H1
女	36	干部职员	本县(区)	07/22	07/29	MVi/Shanghai.CHN/33.12/07	H1
女	42	家政、家务及待业	其他省份	08/17	08/20	MVi/Shanghai.CHN/40.12/01	H1
女	1	散居儿童	本县(区)	05/23	05/29	MVi/Shanghai.CHN/30.12/03	D8



注：■ 2012 年分离株，◆ D8 标准分型参考株，□ 2012 其他地区流行株，● 1993—1994 年亚型流行株

图 1 2000—2012 年上海市部分麻疹流行株和参考株基因(N)进化树分析

株,分支内 6 株 H1 型流行株与 H1a 亚型参考株 China93-2 和 China93-4 的核苷酸差异为 1.11% ~ 2.22%(444/450 ~ 445/450), 根据 H1 基因型亚型的分型标准^[4,5],该 6 株分离株属于 H1a 基因亚型,且分布在 Cluster 1 分支。

2012 年 D8 型分离株与 D8 基因型标准参考株及 2012 年美国分离株 MVs/New-York.USA/37.12 [D8] (gb|KC492072.1|)、香港分离株 MVs/HongKong.CHN/46.12 [D8] (gb|KC288107.1|)、英国分离株 MVs/Taunton.GBR/27.12/[D8] (gb|JX984461.1|) 的同源性为 100%(450/450)。

5. D8 基因型流行病学调查: 流行病学调查表明,患儿,女, 2012 年 1 月 26 日出生,本市户籍,于 2012 年 9 月 28 日上午开始发热,经复旦大学附属儿科医院诊断为“疑似麻疹”,于 10 月 2 日 14 时 34 分进行网络直报,并采集患儿咽拭子标本和血清标本分别送检。10 月 9 日血清检测显示麻疹 IgM 抗体阳性。11 月 6 日上海市 CDC 报告麻疹病毒分离阳性,并于 12 月将病毒株送中国 CDC 复检。12 月 24 日,中国 CDC 报告该麻疹病毒株的基因型为 D8 型。对患儿麻疹接触史的调查表明,患儿发病前无外出和出国史,患儿父亲于 2012 年 9 月 18 日出现发热,9 月 23 日 14 时至上海市公共卫生临床中心以“疑似麻疹”住院隔离治疗。9 月 24 日,其血清学检测报告显示麻疹 IgM 抗体阳性,并住院至 9 月 28 日,未采集咽拭子标本。进一步调查表明,其父在发病前 7 ~ 21 d 曾 2 次往返于韩国与上海之间做批发生意,期间在飞机上、机场内及韩国的机场大巴上均有外籍人士,客户来自韩国、日本、中国及中国台

湾等不同国家和地区,未见明显发热、出诊症状的人员,之后也均未发生麻疹疾病。

讨 论

本研究在上海市区 CDC 对 2012 年虹口区监测的 7 株流行株进行目的基因扩增及测序结果表明:6 株为 H1 基因型,1 株为 D8 基因型。对 7 株流行株基因序列进一步分析表明,6 株分离株属于 H1a 亚型,与上海市历年麻疹流行株基因型及其亚型的分布相一致,为本土优势流行株;D8 基因型为上海市自 2000 年开展病毒监测以来首次出现的基因型,不属于国内本土流行株,根据其地域分布特征^[2],D8 基因型主要流行于孟加拉国、印度和尼泊尔,2000 年以后曾在美国、英国、澳大利亚和中欧出现输入性病例。本研究对 D8 基因型溯源追踪结果表明,传染源可能为该患儿的父亲(境外感染),但具体的传播途径尚不明确。

本次监测到 D8 基因型病例对上海市麻疹监测工作有较大警示意义,从溯源结果看,从疑似病例咽拭子样本采集到病毒基因型鉴定报告历时是 82 d。病毒分离阳性报告结果是 34 d。耗时较长,应考虑尽快在本区的麻疹病毒的分子流行病学监测中开展

病毒测序和分型工作,以提高本市实验室监测敏感性,提高早期预警能力,逐步增加对麻疹基因变异、抗原变异等的监测。

参 考 文 献

[1] WHO. Update of the nomenclature for describing the genetic characteristics of wild-type measles viruses: new genotypes and reference strains[J]. Wkly Epidemiol Rec, 2003, 78 (27) : 229-232.

[2] WHO. New Genotype of measles viruses and update on global distribution of measles genotypes[J]. Wkly Epidemiol Rec, 2005, 80(40):347-351.

[3] Zhang Y, Xu S, Wang H, et al. Single endemic genotype of measles virus continuously circulating in China for at least 16 years [J]. PLoS One, 2012, 7(4):e34401.

[4] Ji YX, Xu WB, Zhang Y, et al. Genetic characterization on wild-type measles viruses isolated in six provinces of China in 2005 [J]. Chin J Virol, 2005, 21(6):407-414. (in Chinese)
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 [J]. 病毒学报, 2005, 21(6):407-414.

[5] Xu WB, Tamin A, Rota JS, et al. New genetic group of measles virus isolated in the people's Republic of China [J]. Virus Res, 1998, 54(2):147-156.

(收稿日期:2013-09-13)

(本文编辑:万玉立)

读者·作者·编者

本刊常用医学词汇缩略语

本刊对以下较为熟悉的一些常用医学词汇将允许直接用缩写,即在文章中第一次出现时,可以不标注中文和英文全称。

A 值	吸光度值	HBcAg	乙型肝炎核心抗原	PBS	磷酸盐缓冲液
AIDS	艾滋病	HBeAg	乙型肝炎 e 抗原	PCR	聚合酶链式反应
ALT	丙氨酸氨基转移酶	HBsAg	乙型肝炎表面抗原	RR	相对危险度
AST	天冬氨酸氨基转移酶	Hb	血红蛋白	RT-PCR	反转录聚合酶链式反应
BMI	体重指数	HC	臀围	SARS	严重急性呼吸综合征
CHD	冠心病	HDL-C	高密度脂蛋白胆固醇	SBP	收缩压
CI	可信区间	HFRS	肾综合征出血热	SCr	血清肌酐
COPD	慢性阻塞性肺疾病	HI	血凝抑制试验	T2DM	2 型糖尿病
CT	计算机断层扫描技术	HIV	人类免疫缺陷病毒	TC	总胆固醇
DBP	舒张压	HPV	人乳头瘤病毒	TG	甘油三酯
DNA	脱氧核糖核酸	ICU	重症监护病房	UA	尿酸
ELISA	酶联免疫吸附试验	IDD	碘缺乏病	WBC	白细胞
FPG	空腹血糖	IFG	空腹血糖受损	WC	腰围
GMT	几何平均滴度	LDL-C	低密度脂蛋白胆固醇	WHR	腰臀围比值
HAV	甲型肝炎病毒	M 值	中位数	WHtR	腰围身高比
HBV	乙型肝炎病毒	MRI	磁共振成像	WHO	世界卫生组织
HCV	丙型肝炎病毒	MS	代谢综合征	抗-HBs	乙型肝炎表面抗体
HDV	丁型肝炎病毒	MSM	男男性行为者	抗-HBc	乙型肝炎核心抗体
HEV	戊型肝炎病毒	OR	比值比	抗-HBe	乙型肝炎 e 抗体