

## · 实验室研究 ·

新疆地区 2003-2004 年麻疹野病毒分离株  
基因特征分析

杨学磊 张燕 孙荷 许文波

**【摘要】** 目的 了解新疆地区流行的麻疹野病毒基因型和亚型特征。方法 对 2003-2004 年用健康产婴儿脐带血单个核细胞分离的麻疹野病毒进行分子流行病学分析。采用逆转录-聚合酶链反应对麻疹病毒 N 基因 C 末端 676 个核苷酸片段进行扩增,并对扩增产物进行核苷酸序列测定。通过分析 C 末端 450 个核苷酸序列构建基因亲缘关系树,并分析毒株变异情况。结果 2003 年和 2004 年各分离麻疹病毒 3 株(XJ03-26、XJ03-27、XJ03-74、XJ04-146、XJ04-150、XJ04-152),除 XJ03-26 株与沪 191 株核苷酸差异 < 1%,属疫苗相关株 A 基因型外,其余 5 株均为 H1 基因型。其中 XJ03-27、XJ03-74、XJ04-150 和 XJ04-152 与 H1a 参考株 China9322 的核苷酸差异为 0.5%~1.6%,同属于 H1a 亚型;XJ04-146 与 H1b 参考株 China9475 的核苷酸同源性为 98.7%,属于 H1b 亚型。4 株 H1a 毒株分属两组(即 XJ03-27 与 XJ04-150, XJ03-74 与 XJ04-152),每组内毒株 N 基因 C 末端 450 个核苷酸序列几近相同无差异,但两组间毒株却存在较大变异,核苷酸差异达 6.1% (27 个核苷酸差异)。结论 新疆地区 2003-2004 年流行的麻疹病毒以 H1a 亚型为主,亦存在 H1b 亚型。

**【关键词】** 麻疹病毒; 基因型; 序列分析

**Genetic characterization of wild-type measles viruses isolated in Xinjiang in 2003 and 2004** YANG Xue-lei\*, ZHANG Yan, SUN He, XU Wen-bo. \*Pediatric Institute of People's Hospital of Xinjiang Uighur Autonomous Region, Urumqi 830001, China

**【Abstract】 Objective** To study the genetic characterization of wild-type measles viruses isolated in Xinjiang in 2003 and 2004. **Methods** Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 19 suspected measles cases collected between June 2003 and April 2004 were used to isolate measles virus by cocultivation with phytohemagglutinin (PHA)-stimulated cord blood mononuclear cells (CBMC). For positive samples, 676 nucleotides of the C-terminus of the nucleoprotein (N) gene of the measles virus genome were amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction and then sequenced. These sequences were compared with those of other measles reference strains available in GenBank or measles isolates elsewhere in China using BLAST searches and phylogenetic analyses. **Results** 6 measles virus strains were isolated with 3 strains (XJ03-26, XJ03-27, XJ03-74) from 2003 and 3 (XJ04-146, XJ04-150, XJ04-152) from 2004. The strain XJ03-26, differed from the Chinese measles vaccine strain S-191 (genotype A) by less than 1% at nucleotide level, and therefore appeared a vaccine-associated strain. The other 5 strains as XJ03-27, XJ03-74, XJ04-146, XJ04-150 and XJ04-152 were proved to be genotype H1 strains, among which XJ03-27, XJ03-74, XJ04-150 and XJ04-152, showing their nucleotide diversity were varied from 0.5% to 1.6%, when compared to the H1a reference strain China9322, and identified as H1a strains. XJ04-146 showed a nucleotide similarity of 98.7% when compared to H1b reference strain China9475, and was identified as H1b strain. Additionally, we found that there were two sets of strain (XJ03-27 and XJ04-150; XJ03-74 and XJ04-152), with almost identical nucleotide sequences, circulating in 2003 and 2004 and both having more nucleotide variability (up to 6.1%, 27 nucleotides). **Conclusion** Genotype H1 measles virus had been proven to have been circulated in Xinjiang, China during 2003 and 2004. H1a was the predominant epidemic strain while H1b strain stood the next.

**【Key words】** Measles virus; Genotype; Sequence analysis

麻疹是由麻疹病毒感染引起的一种高传染性的急性发热出疹性疾病。虽然麻疹病毒只有一个血清

型,但基因变异广泛存在于野病毒株中。通过实施麻疹病毒基因监测和免疫接种,全球麻疹控制和消除计划正在进行。本文旨在报道 2003-2004 年新疆地区麻疹野病毒分离株基因特点,为有效控制和消除新疆地区麻疹提供背景资料。

作者单位:830001 乌鲁木齐,新疆维吾尔自治区人民医院儿科研究所(杨学磊、孙荷);中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所(张燕、许文波)

## 材料与方 法

1. 标本的收集:采集新疆维吾尔自治区人民医院门诊和病房麻疹疑似病例(发热3-6 d,出疹2-5 d)肝素抗凝外周血标本 17 份,配对咽拭子标本 2 份。其中,2003 年6-9 月血标本 10 份;2004 年2-4 月血标本 7 份,配对咽拭子标本 2 份。年龄 6 月龄至 12 岁,平均 3.4 岁。自患者血标本取少部分血浆用于病毒抗体测定,其余用 Ficoll 按常规方法分离出外周血单个核细胞(PBMCs),用于病毒分离。咽拭子经抗生素处理后,离心,取沉淀细胞悬浮接种。

2. 病毒分离与鉴定:分离健康产婴儿脐带血单个核细胞(CBMCs),用含有 20% 胎牛血清、PHA (10 μg/ml)、IL-2(5 μg/ml)的 RPMI1640 培养基(均购自上海生工生物工程技术有限公司)加入 24 孔细胞培养板,每孔 2 ml,37℃,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。3 d 后取 1 ml 培养后的 CBMCs 和 1 ml 患者的 PBMCs 或咽拭子沉淀细胞,用上述相同条件共同培养,取 2 ml 培养后的 CBMCs 作正常细胞对照。每日观察细胞病变(CPE),1 周后若无 CPE 出现视为阴性弃之。高度可疑时可盲传 1 代。当阳性标本 CPE 达 75%~90% 时,收集冷冻于液氮。使用兔抗麻疹病毒免疫血清[购自欧蒙(德国)医学实验诊断有限公司]对分离株做初步鉴定。

3. 麻疹 IgM 抗体测定:采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测患儿血清中麻疹 IgM 抗体,试剂盒购自欧蒙(德国)医学实验诊断有限公司。

4. RNA 提取和逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR):在国家麻疹实验室进行。用 Trizol 法提取病毒悬液中病毒 RNA,具体方法参照说明书。参照美国疾病预防控制中心(CDC)麻疹分型引物设计,上游引物为 60(序列为 5'-GCT ATG CCA TGG GAG TAG GAG TGG -3'),下游引物为 63(序列为 5'- CCT CGG CCT CTC GCA CCT AGT -3')。60 和 63 引物分别位于 N 基因起始编码 1109~1132 和 1765~1785 处。用于扩增 N 基因碳末端的 676 个核苷酸片段。在逆转录酶的作用下,用下游引物 63 于 PCR 仪上 42℃ 45 min,95℃ 5 min 反转录合成 cDNA。用 60 和 63 引物及 PCR 试剂盒进行 PCR 扩增,95℃ 2 min 后进行 30 个循环扩增,95℃ 45 s,50℃ 45 s,72℃ 1 min;最后 72℃ 延伸 10 min。每次实验用去离子水作为阴性对照。扩增后产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。所用莫洛尼氏鼠白血病病毒(M-MuLV)逆转录酶和 TaqDNA

聚合酶购自 BioLab 公司。

5. 序列测定:在国家麻疹实验室进行。扩增产物用 QIA quick PCR purification Kit 试剂盒纯化后,分别用 60、63 引物和 Big Dye™ Terminator V 3.0 Cycle Sequencing Ready Kit 试剂盒进行双向标记,反应如下:96℃ 10 s,50℃ 15 s,60℃ 2 min,25 个循环后 70℃ 延伸 10 min。标记后的产物用 CENTRI-SEP SPIN COLUMNS 试剂盒再次纯化,去除多余非特异性荧光。纯化后的产物在 ABI 3100 测序仪上,自动完成序列测定和校对分析。

6. 序列分析:调出 GenBank 麻疹各基因型参考株和我国 H1 基因型代表株及沪 191(S-191)疫苗株等 N 基因碳末端的 450 个碱基序列,用 BioEdit、MEGA 2.1 软件对这些参考株和本文分离株进行序列变异对比分析和基因亲缘性关系分析。

## 结 果

1. 病毒分离与鉴定:17 例患者 PBMCs 与培养 3 d 后的健康产婴儿 CBMCs 混合培养,有 6 份于培养后 48-60 h 发生细胞融合的多核巨细胞病变,经兔抗麻疹免疫血清鉴定,6 株均为麻疹病毒。2003 和 2004 年各 3 株(实验室命名为:XJ03-26、XJ03-27、XJ03-74、XJ04-146、XJ04-150、XJ04-152),具体见表 1。2 份咽拭子标本分离阴性,但其配对血标本分离阳性。6 株分离阳性病毒株 PCR 扩增后,经 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定在 676 bp 处均有一明显阳性扩增带。

表 1 新疆地区 2003-2004 年麻疹野病毒分离株流行病学资料

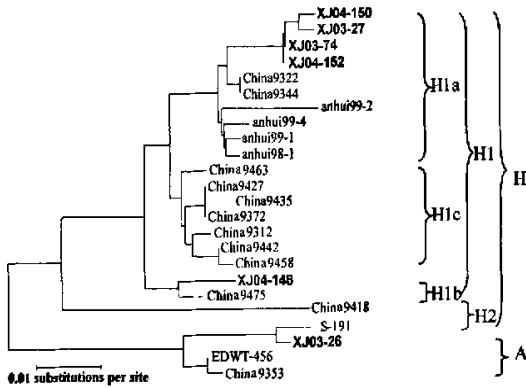
实验室编号	日期(月/年)	基因型	亚型	年龄(岁)	性别	族别	麻疹 IgM	流行情况	预防接种史
XJ03-26	6/03	A		9 月龄	男	回	+	流行	有
XJ03-27	6/03	H1	H1a	1.8	男	汉	+	流行	无
XJ03-74	8/03	H1	H1a	1.5	女	回	+	散发	有
XJ04-146	3/04	H1	H1b	8.5	男	汉	+	流行	无
XJ04-150	3/04	H1	H1a	2.0	男	维	+	流行	无
XJ04-152	4/04	H1	H1a	12.0	男	维	+	流行	有

注:分离细胞为 CBMCs,标本来源均为 PBMCs

2. 麻疹 IgM 抗体检测:17 例疑似麻疹病例的血清标本中,麻疹 IgM 抗体阳性 12 例,阳性率 70.6% (12/17)。6 例麻疹病毒分离阳性者,IgM 抗体均为阳性(表 1)。

3. 序列分析和基因分型:6 株麻疹病毒 N 基因碳末端 450 个核苷酸序列与已知麻疹基因型参考株的对应序列做基因亲缘性关系分析及核苷酸变异分析。分析结果表明,XJ03-26 与中国疫苗株沪 191

(S-191)距离最近,核苷酸同源性为98.2%,属于疫苗相关 A 基因型;其余 5 株(XJ03-27、XJ03-74、XJ04-146、XJ04-150、XJ04-152)均为 H1 基因型。其中 4 株(XJ03-27、XJ03-74、XJ04-150、XJ04-152)与 China9322 (H1a 参考株)核苷酸差异为 0.5%~1.6%,同属于 H1a 亚型;1 株(XJ04-146)与 China9475(H1b 参考株)核苷酸差异为 1.3%,属于 H1b 亚型。4 株 H1a 毒株分属两组(即 XJ03-27 与 XJ04-150、XJ03-74 与 XJ04-152),每组内毒株 N 基因碳末端 450 个核苷酸序列几近相同无差异,但两组间毒株却存在较大变异,核苷酸差异达 6.1% (27 个核苷酸差异)。见基因亲缘性关系树(图 1)。



注:黑体字为新疆麻疹病毒分离株

图 1 2003-2004 年新疆地区 6 株麻疹病毒分离株和参考株基因亲缘性关系树

### 讨 论

新疆地区于 2002 年首次从麻疹患者的咽拭子中用猴肾细胞 B95a 分离出了 1 株麻疹野病毒<sup>[1]</sup>。此后未见相关报道。用 CBMCs 分离麻疹野病毒,国外曾报道其敏感性仅次于 B95a<sup>[2]</sup>,国内未见报道。本文用健康产婴儿 CBMCs 与麻疹患者 PBMCs 共同培养分离麻疹野病毒,有 6 份标本于接种后 48-60 h 发生细胞融合的多核巨细胞病变,3-5 d CPE 达 75% 以上,经鉴定确定为 6 株麻疹病毒,2003 和 2004 年各为 3 株。证实 CBMCs 分离麻疹野病毒敏感可行且无感染性,与国外报道一致。基于网络实验室分离监测麻疹病毒的大量稳定传代细胞需求,日本学者将 SLAM (signaling lymphocyte-activation molecule, CDw150) 受体转染到 Vero 细胞上解决了分离麻疹病毒时 B95a 细胞释放 EB 病毒而 Vero 细胞不敏感的问题,目前麻疹网络实验室已

普遍使用 Vero/SLAM 细胞分离监测麻疹病毒<sup>[3]</sup>。

根据对麻疹病毒主要基因变异区-核蛋白(N)基因 COOH-末端 450 个核苷酸序列和(或)血凝素蛋白(HA)全长编码序列的分析,已发现 8 个基因型(A-H)和 23 个基因型(A、B1~3、C1~2、D1~10、E、F、G1~3、H1~2)曾或正在世界各地的人群中流行<sup>[4,5]</sup>。国内的研究证实,麻疹病毒 H1 基因型是中国首先发现的本土毒株,也是中国优势流行株;H1 基因型进而分为 H1a、H1b、H1c 3 个亚型;H1a 为优势流行亚型,并呈逐年上升趋势,其次为 H1b 基因亚型,并逐年转为弱势,而 H1c 亚型近年几近消失<sup>[3,6,7]</sup>。本研究分离的 6 株麻疹病毒中,除 XJ03-26 与中国疫苗株沪 191(S-191)距离最近,属于疫苗相关 A 基因型,由接种疫苗发病所致麻疹外,其余 5 株(XJ03-27、XJ03-74、XJ04-146、XJ04-150、XJ04-152)均为 H1 基因型。其中 4 株(XJ03-27、XJ03-74、XJ04-150、XJ04-152)属于 H1a 亚型;1 株(XJ04-146)属于 H1b 亚型。此结果表明,新疆地区流行的麻疹野病毒仍为 H1 基因型,以 H1a 亚型为主,亦存在 H1b 亚型流行。4 株 H1a 毒株明显分属两组(即 XJ03-27 与 XJ04-150;XJ03-74 与 XJ04-152),每组内毒株 N 基因碳末端 450 个核苷酸序列几近相同无差异,说明 2003-2004 年存在相同麻疹毒株的持续循环传播。但两组间毒株却存在较大变异,核苷酸差异达 6.1% (27 个核苷酸差异),证实 H1 基因型存在型内最大变异。

因此,需加强新疆麻疹的免疫接种,阻断相同毒株的持续传播,降低麻疹发病率;同时继续监测新疆麻疹病毒基因型,追踪麻疹传播途径、流行基因型变化及毒株变异情况,有效控制麻疹,最终实现在全国及全世界消除麻疹。

### 参 考 文 献

- [1] 俞雪莲,蒲尔哈提,崔惠,等. 新疆维吾尔自治区首次分离到麻疹野病毒. 中国计划免疫, 2003, 9(1):12.
- [2] Forthal DN, Blandin J, Aarnaes S, et al. Comparison of different methods and cell lines for isolating measles virus. J Clin Microbiol, 1993, 31(3):695-697.
- [3] 张燕,许文波,朱贞,等. 中国 2003 年流行的麻疹野病毒分子流行病学分析. 中国计划免疫, 2005, 11(3):165-174.
- [4] WHO. New genotype of measles virus and update on global distribution of measles genotypes. WER, 2005, 80(40):341-352.
- [5] WHO. Update of the nomenclature for describing the genetic characteristics of wild-type measles viruses; new genotypes and reference strains. WER, 2003, 78(27):229-232.
- [6] Xu WB, Tamin A, Rota JS, et al. New genetic characterization of measles virus isolated in People's Republic of China. Virus Res, 1998, 54(2):147-156.
- [7] 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):1-8.

(收稿日期:2007-01-11)

(本文编辑:尹廉)