

· 论 著 ·

云南省首例 D₉ 基因型麻疹病毒的分离和鉴定

丁峥嵘¹, 李立群¹, 张杰¹, 赵智娴¹, 张安柱², 李召芹³, 陆林¹

1. 云南省疾病预防控制中心, 云南 昆明 650022; 2. 保山市疾病预防控制中心, 云南 保山 678000;
3. 龙陵县疾病预防控制中心, 云南 保山 678300

摘要: 目的 分离并鉴定麻疹病毒基因型, 加强麻疹病毒基因型监测。方法 使用 Vero/SLAM 细胞 (淋巴信号激活因子转染的非洲绿猴肾细胞) 分离病毒, 用逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 扩增核蛋白 N 基因羧基末端的 676 个核苷酸片段, 对扩增产物进行核苷酸序列测定, 并以 N 基因羧基末端 450 个核苷酸序列构建基因亲缘性关系树, 进行核苷酸变异分析。结果 云南省分离到的 1 株麻疹病毒 MVi/Yunnan.CHN/02.12/01, 与世界卫生组织 (WHO) D₉ 基因型代表株 Victoria.AUS/12.99 在基因亲缘性关系树上同属一个分支, 核苷酸和氨基酸同源率为 96.3% 和 95.4%, 在核苷酸水平上该云南省分离株和 WHO D₉ 基因型同源性最高。结论 云南省分离到的该麻疹病毒为 D₉ 基因型。

关键词: 麻疹病毒; 基因型; 亲缘性分析

中图分类号: R373.1+1 文献标识码: A 文章编号: 2095-0136 (2013) 01-0059-04

Identification of a D₉ strain of measles virus isolated from Yunnan province of China

DING Zheng-rong, LI Li-qun, ZHANG Jie, ZHAO Zhi-xian, ZHANG An-zhu, LI Zhao-qin, LU Lin

Center for Disease Control and Prevention of Yunnan Province, Kunming, Yunnan 650022, China

Corresponding author: LU Lin, E-mail: lulin@yncdc.cn

Abstract: Objective To identify the genetic characteristics of an isolate of measles virus in Yunnan province of China in 2012. **Methods** Virus culture was in Vero/SLAM cells expressing the human signaling lymphocyte activation molecule (SLAM). Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to amplify a 676-nucleotide acid fragment for sequencing analysis. Phylogenetic tree was constructed and homological analysis was performed based on the 450 nucleotide acids of the carboxyl end of nucleoprotein gene. **Results** Measles virus strain, Yunnan isolate MVi/Yunnan.CHN/02.12/01 was successfully isolated and the 676 nucleotides at the carboxyl end were amplified and sequenced. Clustering analysis categorized this isolate as the same genotype with the World Health Organization (WHO) D₉ genotype reference strain with the homology of nucleotide and amino acid at 96.3% and 95.4%, respectively. **Conclusions** The measles virus strain isolated in 2012 from Yunnan, China was D₉ genotype.

Key words: Measles virus; Genotype; Phylogenetic analysis

麻疹病毒属于副黏病毒科麻疹病毒属, 目前只有 1 个血清型, 但存在多个基因型。截至 2011 年, 麻疹病毒已划分成 A~H 8 个基因组共 24 个基因型, 其中 B₁、D₁、E、F、G₁ 基因型已消失, 目前只有 19 个基因型在世界各地的人群中流行^[1-3]。云南省自 2004 年开展麻疹病毒学监测, 2004—2008 年在 4 个市 11 个县分离到 27 株麻疹病毒, 均为我国的优势流行株 H_{1a} 基因型。

云南省地理位置特殊, 内与西藏、四川、贵州、广西相邻, 外与越南、老挝、缅甸三国接壤, 边境线长达 4 060 km, 疾病跨境传播时有发生。2009 年 11 月在云南省孟连县发生因缅甸输入麻疹病例引发暴发疫情, 从 1 例本地麻疹病例标本中分离出 1 株麻疹病毒, 经国家麻疹实验室 RT-PCR 及基因序列分析, 最终鉴定为 D₁₁ 基因型^[3-4]。2009—2011 年, 从与缅甸接壤的 2 个县 4 例麻疹病例中分离 4 株 D₁₁ 基因型麻疹病毒, 这 4 例患者中有 2 例为国境就诊患者, 由此可见云南省面临着巨大的麻疹病例输入的压力。

作者简介: 丁峥嵘, 本科, 主任医师, 主要从事疫苗针对疾病流行病学与病原学研究及管理工作

通讯作者: 陆林, E-mail: lulin@yncdc.cn

1 资料与方法

1.1 患者资料 患者为云南省保山市龙陵县的 1 名福建籍自由职业者, 男性, 32 岁, 福建省泉州市人, 但已定居保山市龙陵县 3 年, 从事饮食服务行业, 麻疹疫苗接种史不详。自述发病前 1 个月未离开过龙陵县, 未到过医院, 未接触发热出疹患者。该病例于 2012 年 1 月 8 日发热, 1 月 10 日出疹, 出疹后前往德宏州芒市中医院就诊, 并于 1 月 11 日同时采集静脉血 (不加抗凝剂) 5 ml、咽拭标本及尿液标本。标本的采集和处理方法参照全国麻疹监测方案^[5], 即全血标本于常温下 1 500 r/min 离心 20 min 分离血清。咽拭标本保存在 2 ml 麻疹病毒标本运输液中 (含 2% 牛血清和 1 000 U/ml 青霉素, 1 000 mg/L 链霉素的 DMEM 细胞培养液中)。处理后的标本经 3 次冻融后保存在 4 °C 备用。

1.2 病例亲属资料 病例家中常住亲属有其妻子和儿子。妻子, 33 岁, 籍贯福建泉州市, 定居保山市龙陵县 3 年, 自由职业者, 自述曾接种过含麻疹成分疫苗, 接种时间不详。儿子, 8 岁, 籍贯福建泉州市, 定居保山市龙陵县 3 年, 学生, 预防接种证记录已接种 2 剂含麻疹成分疫苗, 最后 1 剂接种时间为 2005 年 9 月 10 日。工作人员于 2012 年 3 月 20 日前往龙陵县采集患者恢复期血清标本, 同时采集亲属静脉血标本, 采集及处理方法同前。

1.3 麻疹 IgM 抗体测定 采用北京贝尔生物有限公司麻疹 IgM 抗体酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测试剂盒 (批号 20111101, 有效期至 2012 年 11 月 22 日), 对收集到的患者急性期血清标本检测麻疹 IgM 抗体。按照说明书进行操作。

1.4 麻疹 IgG 抗体测定 采用德国 Virion/Serion 公司麻疹 IgG 抗体 ELISA 检测试剂盒 (批号 SEB. AD, 有效期至 2014 年 4 月), 对收集到的患者急性期、恢复期和家属的血清标本检测麻疹 IgG 抗体。按照说明书进行操作。

1.5 麻疹病毒分离 使用世界卫生组织 (WHO) 推荐的 Vero/SLAM 细胞 (淋巴信号激活因子转染的非洲绿猴肾细胞) 分离病毒, 吸取上述处理后的咽拭标本和尿液标本 0.3 ml, 分别接种 75% 单层覆盖的 Vero/SLAM 细胞, 吸附 1.5 h 后弃上清液, 换含 2% 牛血清的 DMEM, 每天观察细胞液 pH 值和细胞病变 (CPE), 达 75%~90% CPE 时冻收。

1.6 核糖核酸 (RNA) 提取和逆转录-聚合酶链

反应 (RT-PCR) 省级麻疹实验室使用德国 QIAGEN 公司 QIAamp Viral RNA Mini Kit 试剂盒提取麻疹病毒株中的 RNA, 具体操作方法参照试剂盒说明书。参照国家麻疹实验室的引物 Xu1 (5'-TGAGTTATCCACACTTGAGTCCTTG-3') 和 63 (5'-CCTCGGCCTCTCGCACCTAGT-3'), 使用德国 QIAGEN 公司 QIAGEN OneStep RT-PCR Kit 试剂盒对核蛋白 (nucleoprotein, N) 基因羧基末端的 676 个核苷酸进行扩增, 扩增后产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.7 基因序列测定和分析 扩增产物送上海生工生物工程有限公司完成基因序列测定和校对分析。调出基因数据库 (GenBank) 的基因型代表株 N 基因羧基末端 450 个核苷酸序列, 采用 SeqMan 整理序列资料, 用 MEGA 4.0.2 进行多重序列比对构建进化树 (邻位-连接法, bootstrap 检验, 抽样次数 500, Kimura 2 参数模型)、氨基酸同源性和核苷酸同源性分析 (p-distance 模型)。

2 结果

2.1 麻疹 IgM 检测 ELISA 检测结果显示患者血清麻疹 IgM 抗体阳性, 确诊该患者为麻疹病例。

2.2 麻疹 IgG 检测 根据德国 Virion/Serion 公司麻疹 IgG 抗体 ELISA 检测试剂盒说明书规定, 抗体定量检测 ≥ 200 IU/L 为阳性, 检测结果显示患者急性期血清麻疹 IgG 抗体为 328 IU/L, 恢复期麻疹 IgG 抗体为 3 228 IU/L, 较急性期血清 IgG 抗体含量有 4 倍以上增高。患者妻子血清麻疹 IgG 抗体为 3 619 IU/L, 患者儿子血清麻疹 IgG 抗体为 1 603 IU/L, 皆为阳性。

2.3 麻疹病毒分离和鉴定 咽拭标本接种 Vero/SLAM 细胞后, 于第二代出现了典型的麻疹巨细胞融合病变, 病毒分离物经 RT-PCR 鉴定, 扩增出特异性条带, 片段大小位于 500~700 bp, 为预期大小的片段。根据 WHO 推荐的麻疹野病毒的标准命名方法, 将分离到的麻疹病毒命名为: MVi/Yunnan. CHN/02. 12/01。

2.4 分离株基因型的确定 将所获得的麻疹病毒分离株 MVi/Yunnan. CHN/02. 12/01 编码核蛋白 (N) 羧基末端的 450 个核苷酸片段与 24 个已知基因型 WHO 参考株 (表 1) 和中国麻疹疫苗株 S₁₉₁ 构建基因亲缘性关系树 (图 1), 结果显示: 云南省分离株 MVi/Yunnan. CHN/02. 12/01 在亲缘性关系树上与 WHO D₉ 基因型参考株同在一个大的分支, 可信度为 91。上述结果提示 MVi/Yunnan.

表 1 用于麻疹野病毒株基因型分析的 24 个 WHO 参考毒株

基因型	WHO 标准命名	N 基因登记号
A	Edmonston-wt. USA/54	U01987
B ₁	Yaounde. CAE/12. 83	U01998
B ₂	Libreville. GAB/84	U01994
B ₃	New York USA/94;Ibadan NIE/97/1	L46753;AJ232203
C ₁	Tokyo. JPN/84/K	AY043459
C ₂	Maryland USA/77;Erlangen DEU/90	M89921;X84872
D ₁	Bristol. UNK/74	D01005
D ₂	Johannesburg. SOA/88/1	U64582
D ₃	Illinois. USA/89/1	U01977
D ₄	Montreal CAN/89	U01976
D ₅	Palau BLA/93;Bangkok THA/93/1	L46758;AF079555
D ₆	New Jersey. USA/94/1	L46750
D ₇	Victoria AUS/16. 85;Illinois USA/50. 99	AF243450;AY037020
D ₈	Manchester. UNK/30. 94	AF280803
D ₉	Victoria. AUS/12. 99	AF481485
D ₁₀	Kampala. UGA/51. 00/1	AY923185
D ₁₁	Menglian. Yunnan. CHN/47. 09	GU440571
E	Goettingen. DEU/71	X84879
F	MVs/Madrid SPA/94 SSPE	X84865
G ₁	Berkeley. USA/83	U01974
G ₂	Amsterdam. NET/49. 97	AF171232
G ₃	Gresik INO/17. 02	AY184217
H ₁	Hunan. CHN/93/7	AF045212
H ₂	Beijing. CHN/94/1	AF045217

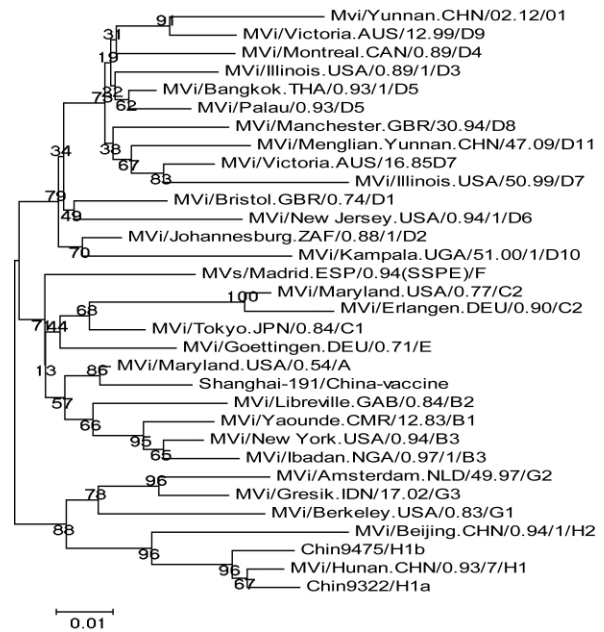


图 1 云南省分离株 MVi/Yunnan. CHN/02. 12/01 和 24 个麻疹基因型参考株的亲缘性关系树 (基于编码 N 蛋白羧基末端的 450 个核苷酸序列)

表 2 云南省 D₉ 基因型麻疹病毒分离株 (MVi/Yunnan. CHN/02. 12/01) N 基因型 450 个核苷酸和 150 个氨基酸与 WHO 24 个不同基因型代表株及中国麻疹疫苗株的同源性对比分析

基因型代表株	核苷酸同源性 (%)	氨基酸同源性 (%)
D ₉ : Victoria. AUS/12. 99	96. 3	95. 4
A: Edmonston-wt. USA/54	93. 2	92. 7
B ₁ : Yaounde. CAE/12. 83	92. 1	91. 4
B ₂ : Libreville. GAB/84	91. 4	91. 4
B ₃ : New York. USA/94	92. 3	90. 7
B ₃ : Ibadan. NIE/97/1	91. 7	90. 7
C ₁ : Tokyo. JPN/84/K	92. 3	91. 4
C ₂ : Maryland. USA/77	90. 8	89. 4
C ₂ : Erlangen. DEU/90	89. 9	89. 4
D ₁ : Bristol. UNK/74	93. 6	94. 7
D ₂ : Johannesburg. SOA/88/1	94. 3	95. 4
D ₃ : Illinois. USA/89/1	94. 7	95. 4
D ₄ : Montreal. CAN/89	94. 5	95. 4
D ₅ : Palau. BLA/93	95. 0	96. 0
D ₅ : Bangkok. THA/93/1	95. 6	96. 7
D ₆ : New Jersey. USA/94/1	93. 0	92. 7
D ₇ : Victoria. AUS/16. 85	92. 8	94. 7
D ₇ : Illinois. USA/50. 99	94. 3	93. 4
D ₈ : Manchester. UNK/30. 94	94. 7	94. 0
D ₁₀ : Kampala. UGA/51. 00/1	91. 4	90. 7
D ₁₁ : Menglian. Yunnan. CHN/47. 09/1	93. 9	93. 4
E: Goettingen. DEU/71	91. 9	90. 7
F: MVs/Madrid. SPA/94 SSPE	91. 9	90. 7
G ₁ : Berkeley. USA/83	90. 8	91. 4
G ₂ : Amsterdam. NET/49. 97	90. 4	91. 4
G ₃ : Gresik. INO/17. 02	91. 0	90. 7
H ₁ : Hunan. CHN/93/7	90. 1	90. 7
H ₂ : Beijing. CHN/94/1	89. 7	90. 1
A: Shanghai-191/China-Vaccine	91. 4	89. 4

CHN/02. 12/01 属于 D₉ 基因型。

2.5 云南省 D₉ 基因型麻疹病毒分离株的核苷酸与氨基酸变异分析 将云南省 D₉ 基因型麻疹病毒分离株 MVi/Yunnan. CHN/02. 12/01、WHO 24 个不同基因型代表株和中国麻疹疫苗株 S₁₉₁ 的核苷酸和氨基酸同源性进行对比分析, 发现在核苷酸水平上, 该分离株和 WHO D₉ 基因型代表株 Victoria. AUS/12. 99 同源性最高为 96. 3%; 在氨基酸水平上, 该分离株与 WHO D₅ 基因型代表株 Bangkok. THA/93/1 同源性最高, 为 96. 7%, 与其他 24 个基因型代表株和中国麻疹疫苗株 S₁₉₁ 的核苷酸和氨基酸同源性分析分别在 89. 7%~95. 6% 和 89. 4%~96. 7% (表 2)。根据 WHO 对麻疹病毒基因型别划分的规定, 云南省获得的麻疹病毒分离株为 D₉ 基因型的麻疹病毒, 这也是云南省首次分离到 D₉ 基因型麻疹病毒。

3 讨 论

麻疹病毒基因型具有地理分布特征, 不同地区有不同的本土流行株或优势流行株, 同时全球麻疹野病毒流行也和年代有一定的相关性^[6-8]。这就为全球麻疹病毒的分子流行病学监测提供了理论依据, 可以通过监测不同国家甚至同一国家不同地区流行的麻疹病毒基因型分布, 来鉴定病毒的来源, 确定病毒的传播途径, 提供评估控制麻疹策略效果的方法, 科学地阻断麻疹病毒的传播^[6-8]。随着交通方式的日益便捷, 国际间交流频繁, 多个国家发现输入性的病例。D₉ 基因型麻疹病毒在 1999 年首先被发现从印度尼西亚的巴厘岛输入澳大利亚^[9], 2000—2001 年 D₉ 基因型在哥伦比亚和委内瑞拉引起麻疹流行; 2004 年和 2006 年 D₉ 基因型麻疹病毒分别引起了日本中学生和成人的麻疹流行; 2003—2007 年曾在欧洲、美国、中国台湾和香港等地区引起流行; 2008 年在荷兰和泰国都有 D₉ 基因型麻疹病毒的流行^[10]; 2009 年在我国四川省发现了首例输入性 D₉ 基因型麻疹病毒, 该毒株与 2008 年流行于荷兰和泰国的 D₉ 基因型麻疹病毒的核苷酸和氨基酸高度同源, 所幸该病例未引起我国的麻疹病毒 D₉ 基因型的流行^[11]。

在对云南省首例 D₉ 基因型麻疹病例的流行病学调查中发现, 该患者是从事饮食服务行业的自由职业者, 在龙陵县的边贸商场中经营一家餐厅, 其工作性质决定了其接触人群较为复杂, 并且很难追溯所接触的人群是否有发热、出疹症状。由于龙陵县与缅甸接壤, 边贸繁荣, 民间便道众多, 在该患者工作的边贸商场中有缅甸籍居民经商, 虽然缅甸目前不能提供该国麻疹病毒流行株基因型的本底资料, 但是根据 WHO 提供的全球麻疹病毒流行趋势, 缅甸所在的东南亚地区持续有 D₉ 基因型麻疹病毒的流行, 因此推测为输入性病毒。云南省有必要加强边境地区麻疹病毒的基因型监测。

对该例患者的密切接触者的调查结果显示, 其妻子和孩子无发热、出疹症状, 同一餐厅的服务员均无发热、出疹症状, 省级麻疹实验室对病例急性期、恢复期血清以及病例亲属的血清标本进行检测, 实验结果显示病例亲属麻疹 IgG 抗体定量检测 ≥ 200 IU/L 为阳性, 说明我国使用的麻疹疫苗株或 H₁ 基因型本土病毒株的自然感染可以保护 D₉

基因型病毒。

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. Global measles and rubella laboratory network-update [J]. *Wkly Epidemiol Rec*, 2005, 80 (44): 384-388.
- [3] Zhang Y, Ding ZR, Wang HL, *et al*. New measles virus genotype associated with outbreak, China [J]. *Emerg Infect Dis*, 2010, 16 (6): 943-947.
- [4] Pang YK, Li LQ, Ding ZR, *et al*. An analysis about an epidemic outbreak of Myanmar input new measles virus (Genotype d11) [J]. *Zhonghua Liuxingbingxue Zazhi*, 2011, 32 (1): 17-19. (in Chinese)
庞颜坤, 李立群, 丁峥嵘, 等. 一起缅甸输入新型麻疹病毒 (d11 基因型) 引发暴发疫情的调查分析 [J]. *中华流行病学杂志*, 2011, 32 (1): 17-19.
- [5] Ministry of Health of the People's Republic of China. National measles surveillance program [S]. (2009) No 9. (in Chinese)
卫生部. 全国麻疹监测方案 [S]. 卫办疾控发 (2009) 9 号.
- [6] Mulders MN, Truong AT, Muller CP. Monitoring of measles elimination using molecular epidemiology [J]. *Vaccine*, 2001, 19 (17): 2245-2249.
- [7] Rota JS, Heath JL, Rota PA. Molecular epidemiology of measles virus: identification of pathways of transmission and implications for measles elimination [J]. *J Infect Dis*, 1996, 173 (1): 32-37.
- [8] Jin L, Brown DW, Ramsay ME, *et al*. The diversity of measles virus in United Kingdom, 1992-1995 [J]. *J Gen Virol*, 1997, 78 (Pt 6): 1287-1294.
- [9] Doris C, Michael R, Michawl C, *et al*. Studies of measles virus circulating in Australia between 1999 and 2001 reveals a new genotypes [J]. *Virus Res*, 2003, 91 (2): 213-221.
- [10] Jacques RK, Kevin EB, Li j, *et al*. High genetic diversity of measles virus. World Health Organization European Region, 2005-2006 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2008, 14: 107-114
- [11] Zhang Y, He JL, Sun L, *et al*. The first Chinese input D₉ genotype of measles virus isolation and identification [J]. *Zhongguo Yimiao He Mianyi*, 2009, 15 (4): 304-309. (in Chinese)
张燕, 何吉兰, 孙莉, 等. 我国首例输入性 D₉ 基因型麻疹病毒的分离和鉴定 [J]. *中国疫苗和免疫*, 2009, 15 (4): 304-309.

收稿日期: 2012-08-07 修回日期: 2012-11-28 责任编辑: 李川