

北京市 2016 年发现流行性腮腺炎 G 基因型病毒

陈萌¹, 崔爱利², 王斌³, 陈维欣¹, 窦相峰¹, 于霞丽¹,
董梅¹, 张铁钢¹, 吴疆¹, 黄芳^{1*}

(1. 北京市疾病预防控制中心、北京市预防医学研究中心, 北京 100013;
2. 中国疾病预防控制中心 病毒病预防控制所, 北京 102206;
3. 北京市大兴区疾病预防控制中心, 北京 102600)

摘要:通过对北京市 2004~2016 年流行性腮腺炎的流行特征、病毒监测及 SH 基因序列的分析, 与我国其他省份及全球参考病毒株序列进行同源性比较, 阐述北京市腮腺炎病毒基因型分布和变异情况, 报告新发现的 G 基因型病毒与我国其他地区病毒的相似性。研究发现从 2007 年随有免疫史病例增多病毒分离率明显下降, 2010~2016 年下降到 10% 以下。2016 年分离到 3 株腮腺炎病毒, 2 株得到基因分型结果其中一株为 F 基因型, 另一株 G 基因型。G 基因型病毒与 2011 年陕西省流行的 G 基因型病毒最为接近。2004 年至今, F 基因型病毒一直为北京本地流行株。北京将腮腺炎纳入免疫规划后, 随着本地优势流行病毒株的减少, 发现了其他基因型病毒, 因此应加强病毒监测, 尽早发现并阻断新的病毒传播链。

关键词:流行性腮腺炎病毒(Mumps virus); 基因型; 病毒分离

中图分类号: R373.1+6 文献标识码: A 文章编号: 1000-8721(2017)05-0706-06
DOI: 10.13242/j.cnki.bingduxuebao.003201

全球已发现流行性腮腺炎(腮腺炎)病毒(Mumps virus)存在 12 个基因型, 分别命名为 A~L, 而中国本土只有一种基因型的优势流行株, F 基因型^[1]。北京市从 2004 年开始监测腮腺炎病毒, 监测到的本地流行株均为 F 基因型^[2]。2006 年北京市将腮腺炎疫苗列入免疫规划免费接种后, 腮腺炎发病率下降, 但同时由于有免疫史病例比例增高, 病毒分离率也明显下降, 2012~2015 年本实验室未分离到腮腺炎病毒。为此 2016 年北京市加强了腮腺炎病毒监测, 重新分离到病毒, 并新发现 G 基因型病毒。

材料与amp;方法

1 标本来源

病例标本由北京市各区县疾病预防控制中心于 2004~2016 年采集。腮腺炎病例通过中国疾病预防控制中心信息报告管理系统直接报告, 疾控中心派流调人员到现场进行个案调查, 并采集病例腮腺后 9 d 内

收稿日期: 2017-04-26; 修回日期: 2017-06-22

基金项目: 北京市自然科学基金(项目编号: 7172105), 题目: 流行性腮腺炎疫苗免疫策略及有免疫史病例发病原因研究; 国家科技重大专项(项目编号: 2016ZX10004206), 题目: 艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治

作者简介: 陈萌(1975-), 女, 副主任技师, 从事传染病病毒学研究, Tel: 010-64407106, E-mail: chenmengxx@qq.com

* 通讯作者: 黄芳(1968-), 女, 主任技师, 从事传染病研究, Tel: 010-64407032, E-mail: hhffxddd@126.com

的腮腺拭子和急性期血标本。

2 病毒分离

将腮腺拭子-40℃冻融 3 次, Vero 细胞生长成片后, 接种到 Vero 细胞上。观察到细胞出现 75% 的融合巨细胞病变, 即判为病毒分离阳性, 将病毒分离物-80℃冰箱冻存。如培养 7 d 未出现细胞病变, 进行病毒传代, 再培养 7 d 仍未发现病变迹象, 则判断为腮腺炎病毒分离阴性。

3 血清学抗体检测

流行性腮腺炎 IgM 抗体使用由 Virion/serion 公司(德国)生产的流行性腮腺炎 IgM 抗体 ELISA 检测试剂盒进行检测。

4 病毒核酸(RNA)提取

手工提取腮腺炎病毒核酸, 使用的是 QIAGEN 公司(德国)的 QIAamp Viral RNA 试剂盒。

5 病毒核酸检测

使用实时荧光 PCR 核酸检测法进行腮腺炎病毒核酸检测。流行性腮腺炎实时荧光 PCR 核酸检测试剂盒由江苏硕世生物科技有限公司提供。

6 病毒基因型别鉴定与 SH 基因变异分析

首先扩增腮腺炎病毒 SH 基因及两侧区域的 378bp 片段, 具体方法见文献^[6]。测序后根据 WHO 推荐的分型依据, 剪裁 SH 基因 316bp 片段进行序列比对^[3]。RT-PCR 实验使用 Invitrogen 公司(美国)生产的 OneStep RT-PCR 试剂盒。后用 QIAGEN 公司(德国)生产的 QIAquick PCR Puri-

fication 试剂盒对阳性 PCR 产物进行纯化后送专业测序公司测序。序列拼接比对使用 DNASTAR 软件。参考序列为 WHO 推荐的 12 个基因型的 22 个代表株及中国报道的部分参考株^[1,3],用 Mega6.0 软件构建基因亲缘关系进化树,对北京病毒分离株与参考株序列之间的同源性进行分析。

结 果

1 流行性腮腺炎发病情况分析 & 实验室确诊

2006 年北京市将腮腺炎疫苗纳入免疫规划后,腮腺炎发病率从 2006 年的 28.54/100 000 下降到 2016 年的 10.3/100 000,发病年龄仍然以 1.5~14 岁免疫覆盖人群为主(图 1)。2016 年有免疫史病例比例上升至 73.7%,1.5~14 岁的病例中,94.5% 有疫苗接种史。2016 年北京市在开展主动监测中实验室确诊病例 65 例,其他病例均为临床诊断。实验室确诊方法为血清 IgM 抗体阳性或病毒核酸检测阳性。

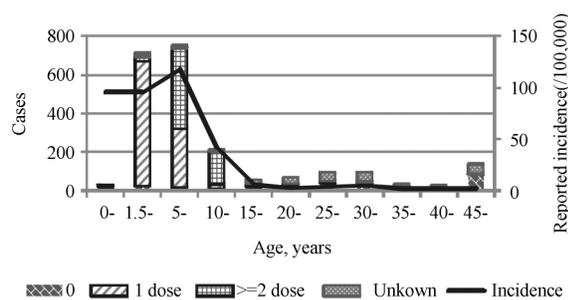


图 1 2016 年北京市流行性腮腺炎病例各年龄组发病及接种史分布

Figure 1 Incidence and distribution of immunization in mumps cases in different age groups in Beijing in 2016

2 腮腺炎病毒分离及病毒基因型

2016 年共从 65 例流行性腮腺炎病例的标本中分离到 3 株阳性分离物,经实时荧光 PCR 鉴定为腮腺炎病毒。本次病毒分离阳性的 3 例病例有 2 例有疫苗免疫史,血标本 IgM 抗体检测结果均为阴性。

北京市从开展腮腺炎病毒监测起,2004~2006 年各年的病毒分离率比较一致,2006 年北京市将腮腺炎疫苗列入计划免疫,适龄儿童接种率达 99%。后从 2007 年开始随有免疫史病例增多病毒分离率明显下降,2010 年后下降到 10% 以下(表 1)。

上述 2016 年 3 株腮腺炎病毒经 SH 基因测序分析,2 株得到核苷酸序列。其中 1 株属于中国本土 F 基因型,另 1 株属于 G 基因型。在此之前,2004 年~2011 年北京市监测到的腮腺炎病毒均为 F 基因型,2012~2015 年未分离到腮腺炎病毒(表 1)。

3 腮腺炎病毒 SH 基因特征

将北京 2016 年分离到的 G 基因型病毒与近年来我国其他省份及全球其他地区发现的 G 基因型病毒做基因亲缘关系树(图 2),发现 2016 年北京 G 基因型病毒与 2011 年在陕西省流行的 G 基因型病毒最为接近。基因同源性分析,北京 G 基因型病毒与 11 株我国其他省份 G 基因型病毒之间核苷酸差异为 1.3%~8.5%,与陕西株差异最小,与江苏株差异最大;与 12 株其他国家 G 基因型病毒核苷酸差异为 4.7%~6.0%,与 New_York 株差异最大,与 Kobe 株差异最小。

将北京 2016 年分离到的 F 基因型病毒与历年北京 F 基因型病毒株及全球参考株做基因亲缘关系树(图 3),发现它与北京往年分离株属同一分支,为北京本地流行株。2016 年分离的 F 基因型病毒与往年北京流行株之间核苷酸差异为 1.3%~4.2%。2004~2016 年 F 基因型各流行株之间核苷酸最大差异为 6.9%。

表 1 2004~2016 年北京市腮腺炎病毒分离及基因分型结果

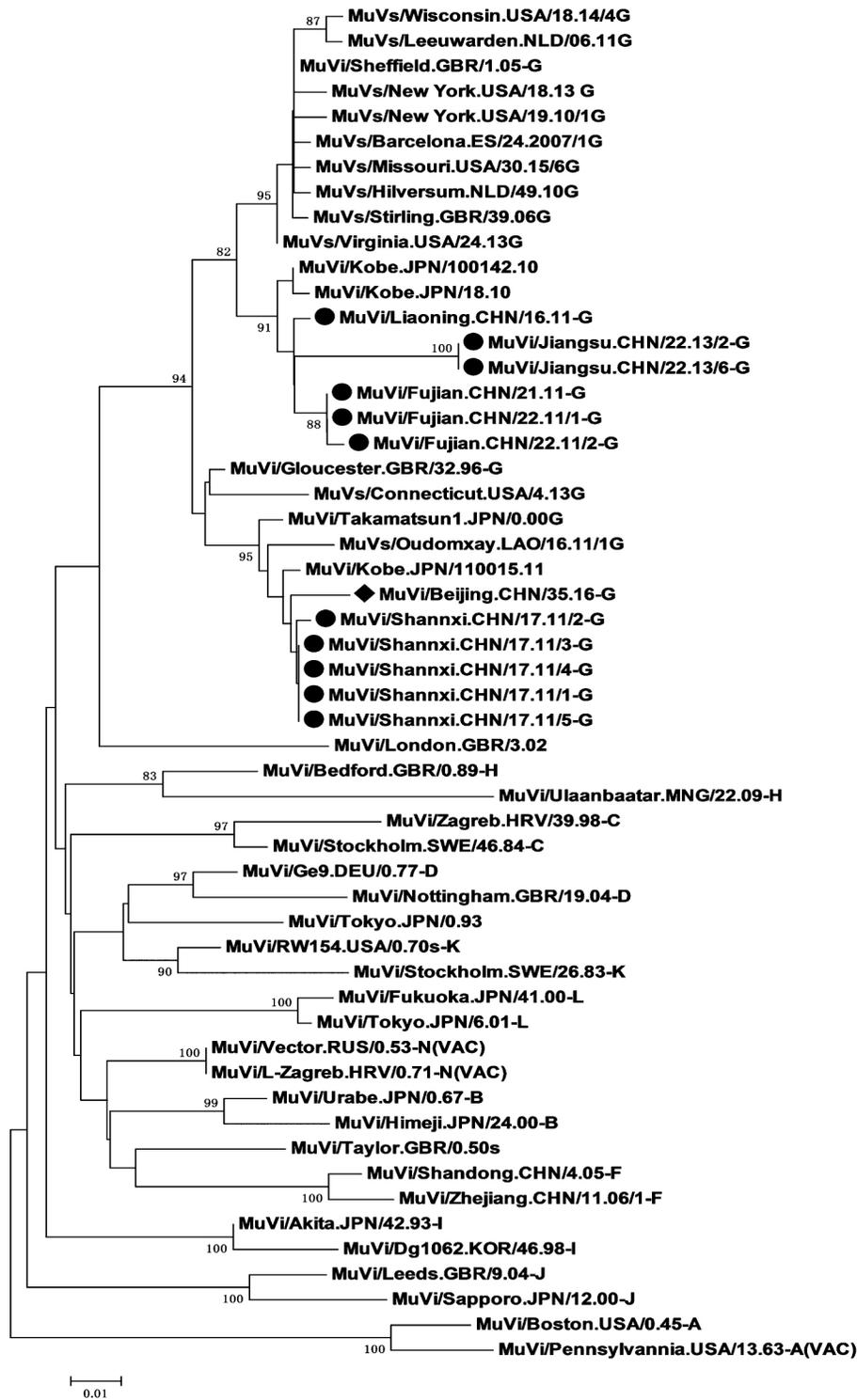
Table 1 Isolation of the mumps virus and genotype data in Beijing, China, in 2004-2016

Year	Cases	Constituent of vaccinated cases (%)	Virus isolation positive cases	Virus isolation positive rate (%)	Genotypes
2004	16	31.25	5	31.25	F
2005	33	39.39	12	36.36	F
2006	23	21.74	9	39.13	F
2007	35	54.28	7	20.00	F
2008	29	48.28	5	17.24	F
2009	27	74.07	5	18.52	F
2010	34	65.42	3	8.82	F
2011	46	59.21	1	2.17	F
2012~2015	62	70.25	0	0	/
2016	65	73.74	3	4.62	F,G

4 新发现 G 基因型腮腺炎病例的流行病学调查

该病例女性,18岁,河南户籍,大兴榆垓镇某大学学生,3周内未离开北京。自述未接触过腮腺炎病人。该大学此病例后也未发现后续病例。G 基因

型腮腺炎病毒仅在我国辽宁、陕西、江苏、福建四个省份被发现,但都不是优势流行株。根据基因亲缘关系分析(图2),该病毒与陕西省发现的 G 基因型病毒最为接近。

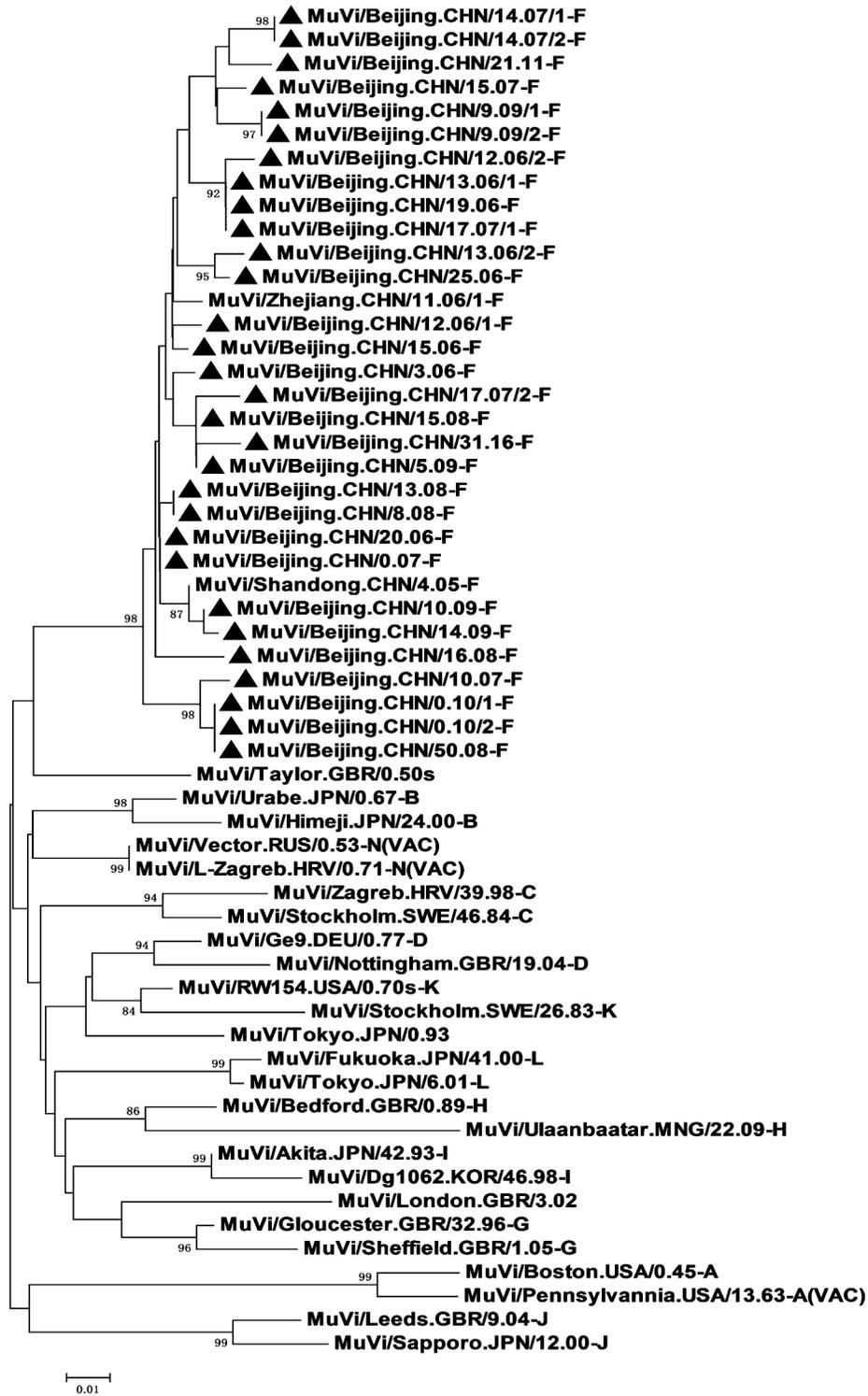


◆北京分离到的 G 基因型病毒,●我国其他省发现的 G 基因型病毒,A-L 为 12 个基因型

◆represents isolated G-genotype virus in Beijing, ●represents G-genotype virus isolated in other provinces, A-L for the 12 genotypes

图 2 北京市 G 基因型流行性腮腺炎病毒与参考株 SH 基因 316nt 片段亲缘进化树

Figure 2 Phylogenetic relationships between G-genotype mumps viruses circulating in Beijing based on SH gene.



▲北京分离到的 F 基因型病毒, A-L 为 12 个基因型

▲represents isolated F genotype virus in Beijing, A-L for the 12 genotypes

图 3 北京市 F 基因型流行性腮腺炎病毒与参考株 SH 基因 316nt 片段亲缘进化树

Figure 3 Phylogenetic relationships between F-genotype mumps viruses circulating in Beijing based on the SH gene.

讨 论

北京市从 2006 年,全国从 2008 年将流行性腮腺炎疫苗纳入免疫规划后,腮腺炎发病率有所下降,但是腮腺炎有免疫史病例大幅增加^[4],发病主要人群仍集中在 1.5~14 岁的免疫覆盖人群,这说明腮腺炎疫苗有一定的免疫效果,但是可能并不能完全保护接种者不发病。由于北京市腮腺炎监测并不要求对所有病例都采集临床标本,而且有免疫史病例的增加使病例实验室诊断越来越困难,所以 2016 年本实验室只确诊了 65 例腮腺炎病例。在发病初期实验室通常采集血标本检测 IgM 抗体作为确诊指标,但 2016 年 3 例病毒分离阳性病例有 2 例有免疫史,血标本 IgM 抗体检测均为阴性。分析原因可能是采血时间在发病早期,IgM 抗体还未升高,或者是由于继发性免疫失败的病例急性期血 IgM 抗体不升高造成的^[5]。2016 年北京市有免疫史病例比例已经增加到 73.74%,本实验室对腮腺炎疑似病例采取了同时开展血标本 IgM 抗体检测和腮腺拭子 real-time PCR 核酸检测的方法,以提高诊断率。尽管如此,目前腮腺炎病例的检测阳性率仍非常低。针对有腮腺炎免疫史病例,实验室有必要建立新的检测方法来提高腮腺炎病例确诊率^[5]。

利用基因特征研究病毒株亲缘关系,掌握本地区腮腺炎病毒的循环状况、分析疫源地和传播途径,并进行连续的分子流行病学监测,这对于科学有效控制腮腺炎有重要意义^[6,7]。2004~2011 年北京市监测到的野病毒均为中国特有的 F 基因型,没有发现其他基因型病毒流行,也没发现基因型间的变异。这证明尽管疫苗大量使用后发病率下降,但在 2004~2011 年间并没有阻断本土流行株在北京的持续循环。由于有免疫史病例比例升高,腮腺炎病毒分离率降低,2011 年病毒分离率下降到 2.17%,此现象在其他省份实验室也同样存在,这对腮腺炎病毒监测非常不利^[8,9]。加之腮腺炎病例监测病原学样本采集率低,2012~2015 年北京市未分离到病毒,无法了解腮腺炎病毒在此期间是否被阻断,是否有新型病毒株的出现。2016 年北京市下发了加强腮腺炎病毒监测的通知,采样数量增加,因此才重新分离到腮腺炎病毒。

截止到 2016 年,中国共发现 F 和 G 两个基因型病毒,G 基因型仅在 2011 年和 2013 年,在辽宁、陕西、江苏、福建 4 个省份被发现,共分离到 11 株病

毒,不是当地优势流行株^[8,9]。2011 年之前只发现 F 基因型在中国流行^[10-12]。推测这个现象可能的原因是由于我国 2008 年大量使用疫苗后,本土株受到一定程度抑制,G 基因型病毒有可能从国外输入到中国。本实验发现的 G 基因型病例为在校大学生,三周内未离开过北京,未接触过腮腺炎病人。推测病人发病时正值大学开学,该病例有可能从在京人员或外省来京上学的隐性携带者感染 G 型腮腺炎病毒。从进化亲缘关系分析,此病毒有可能来源于陕西。由于腮腺炎病毒可以发生隐性感染^[13],虽然没有发现后续病例,但此病毒也有可能在小范围流行传播。北京 2006 年就将腮腺炎纳入免疫规划,随着 F 基因型病毒的减少,可能会有其他基因型病毒的输入或循环,因此加强病毒监测,阻断新型病毒传播链,对控制腮腺炎非常重要。

SH 基因作为基因组高变区可代表和反映不同流行性腮腺炎病毒的分子特性,是国际上通用的基因型别鉴定的依据^[6,14]。同源性分析发现,北京 G 基因型病毒与我国其他省份 G 基因型病毒之间 SH 基因核苷酸差异为 1.3%~8.5%,与陕西株非常接近,推测为同一来源的病毒。2004~2016 年 F 基因型各流行株之间核苷酸最大差异为 6.9%,2016 年 F 基因型病毒与北京流行株之间核苷酸差异为 1.3%~4.2%,说明此病毒未发生变异,为北京既往流行株。

参考文献:

- [1] Aili Cui, Zhen Zhu, Ying Hu, Xiuying Deng, Zhaodan Sun, Yan Zhang, Naiying Mao, Songtao Xu, Xueqiang Fang, Hui Gao, Yuan Si, Yake Lei, Huanying Zheng, Jilan He, Hongwei Wu, Wenbo Xu. Mumps epidemiology and mumps virus genotypes circulating in mainland china during 2013-2015 [J/OL]. PLoS One, 2017, 12 (1):1-15.
- [2] 陈萌,张铁钢,陈丽娟,吴疆,杨洁,张伟. 北京地区流行性腮腺炎野病毒与疫苗病毒基因特征比较[J]. 中华流行病学杂志,2009,30(11):1178-1182.
- [3] Li Jin, Claes Örvell, Richard Myers, Paul A. Rota, Tetsuo Nakayama, Dubravko Forcic, Joanne Hiebert, Kevin E. Brown. Genomic diversity of mumps virus and global distribution of the 12 genotypes [J]. Reviews in Medical Virology,2015, 25: 85-101.
- [4] 刘东磊,陈萌,卢莉. 北京市 2010 年流行性腮腺炎流行病学分析[J]. 现代预防医学, 2012, 39(16): 4251-4252.
- [5] Donald R. Latner, Marcia McGrew, Nobia Williams, Luis Lowe, Roniel Werman, Eli Warnock, Kathleen

- Gallagher, Peter Doyle, Sandra Smole, Susan Lett, Norelle Cocoros, Alfred DeMaria, Raimond Konomi, Cedric J. Brown, Paul A. Rota, William J. Bellini, and Carole J. Hickman. Enzyme-linked immunospot assay detection of mumps-specific antibody-secreting B Cells as an alternative method of laboratory diagnosis [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2011, 18(1): 35-42.
- [6] Jin L, Rima B, Brown D, Orvell C, Teclé T, Afzal M, Uchida K, Nakayama T, Song J W, Kang C, Rota P A, Xu W, Featherstone D. Proposal for genetic characterisation of wild-type mumps strains: preliminary standardisation of the nomenclature [J]. *Arch Virol*, 2005, 150(9): 1903-1909.
- [7] Lena Kenny, Edwin O'Kelly, Jeff Connell. Mumps outbreaks in a highly vaccinated population: Investigation of a neutralization titre against the current circulating wild-type genotype G5 mumps virus [J]. *J Clin Virol*, 2016, 74:8-12.
- [8] 司源, 马钰, 李平, 张少白, 刘毅, 崔爱利. 2011 年陕西省流行性腮腺炎病毒株基因型别分析[J]. *中华疾病控制杂志*, 2014, 18(2): 176-177.
- [9] 李芳彩, 崔爱利, 张红, 邓莉, 向星宇, 黄一伟, 李文超, 刘运芝. 2011 年湖南省某些地区流行性腮腺炎病毒基因特性分析[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2013, 27(1): 25-27.
- [10] 崔爱利. 流行性腮腺炎病毒的分子流行病学研究[J]. *中国计划免疫*, 2006, 12(6): 52-526.
- [11] 邓秀英, 陆培善, 胡莹, 刘元宝, 冷红英, 吴响, 马福宝. 江苏省 2014 年流行性腮腺炎病毒基因特征分析[J]. *江苏预防医学*, 2015, 26(6): 13-15.
- [12] Wu L, Bai Z, Li Y, Rima B K, Afzal M A. Wild type mumps viruses circulating in China establish a new genotype [J]. *Vaccine*, 1998, 16(2-3): 281-285.
- [13] Laura Z, Susan R, Melinda W. VPD Surveillance Manual, 3rd Edition[M]. 2002, Chapter 7, Mumps: 7-1.
- [14] 马绍辉, 施海晶, 何春艳, 陈俊英, 杨卉娟, 孙强明. 云南省 2007~2009 年流行性腮腺炎病毒 SH 和 HN 基因的遗传特征分析[J]. *中华流行病学杂志*, 2011, 32(4): 370-375.

G Genotype Mumps Virus Found in Beijing, China, in 2016

CHEN Meng¹, CUI Aili², WANG Bin³, CHEN Weixin¹, DOU Xiangfeng¹,
YU Xiali¹, DONG Mei¹, ZHANG Tiegang¹, WU Jiang¹, HUANG Fang^{1*}

(1. *Beijing Centers for Disease Control and Prevention, Beijing 100013, China*; 2. *National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China*;
3. *Beijing Daxing District Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102600, China*)

Abstract: We wished to analyze the epidemic characteristics, virus isolation and small hydrophobic gene sequences of the mumps virus in Beijing, China, during 2004~2016, and compare its homology with the mumps virus in other provinces in China and the sequence of the global reference strain. In this way, we could elaborate the distribution and variation of the genotype of the Beijing mumps, explain how the G genotype virus was imported and from where originated. Since 2007, with an increase in the number of immunized patients, the prevalence of virus isolation decreased significantly, and, in 2010~2016, it fell to < 10%. In 2016, we isolated three strains of the mumps virus, and obtained the sequence of two of them. One of them was genotype F and other was genotype G. The G genotype virus was closest to the G-genotype virus isolated in Shaanxi Province in 2011. The F-genotype virus was a local strain in Beijing. From 2006, mumps immunization program was started in Beijing. With the reduction of local virus and the emergence of other genotypes of the virus import, it is necessary to strengthen the monitoring of the virus as soon as possible to detect and block the spread of the virus strain.

Key words: Mumps virus; Genotype; Virus isolation

Funding: The present work was supported by the Beijing Natural Science Foundation of China, (7172105, Study on optimization of the vaccination protocol and the causes of the failure of mumps vaccination) and National Science and technology major project (2016ZX10004206 Prevention and treatment of major infectious diseases such as AIDS and viral hepatitis).

*Corresponding author: HUANG Fang, E-mail: hffxddd@126.com