

DOI:10.3969/j.issn.1671-9638.2016.10.015

· 论 著 ·

2014 年北京市西城区 40 例麻疹患者分离的麻疹病毒基因型及同源性

张晶波¹, 王敬辉¹, 崔京辉¹, 于霞丽², 陈 萌²

(1 北京市西城区疾病预防控制中心, 北京 100120; 2 北京市疾病预防控制中心, 北京 100013)

[摘要] **目的** 了解北京市某城区 2014 年分离的麻疹病毒基因型, 及时发现输入性麻疹病例。**方法** 采用荧光聚合酶链反应(PCR)方法, 对北京市西城区 2014 年采集的标本进行病毒核酸鉴定、RT-PCR 扩增, 扩增产物进行测序及序列比对分析。**结果** 2014 年北京市西城区共采集 81 例麻疹疑似患者的 82 份标本, 其中咽拭子 63 份, 尿 19 份。麻疹病毒核酸检测阳性 70 例, RT-PCR 扩增、测序获得基因序列 40 份, 麻疹病毒培养阳性毒株 37 例。种系进化树分析显示, 获得的 40 份麻疹病毒基因序列与 H 基因簇代表株 Chin9322/H1a, 以及世界卫生组织推荐的代表株 MVi/Hunan, CHN/0.93/7/H1 在同一分支上, 核苷酸水平上同源性分别为 98%~98.9%、96.9%~97.8%; 氨基酸水平上同源性分别为 97.3%~99.3%、95.3%~98%。**结论** 2014 年北京市西城区麻疹病例以本土基因型(H1)病例为主, 进一步加强麻疹病例病原学监测对麻疹输入性病例的控制和预防具有重要意义。

[关键词] 麻疹病毒; 核酸检测; H1 基因型; 流行病学

[中图分类号] R373.1⁺1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2016)10-0780-05

Genotypes and homology of measles virus isolated from 40 patients with measles in Beijing Xicheng District in 2014

ZHANG Jing-bo¹, WANG Jing-hui¹, CUI Jing-hui¹, YU Xia-li², CHEN Meng² (Xicheng District Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100120, China; 2 Beijing Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100013, China)

[Abstract] **Objective** To understand the genotypes of measles virus isolated from patients with measles in Beijing Xicheng District in 2014, and timely find out imported measles cases. **Methods** Measles virus nucleic acid was identified with fluorescent polymerase chain reaction (PCR), then amplified by real-time PCR (RT-PCR), amplified products were sequenced and analyzed. **Results** 82 specimens from 81 suspected measles patients in Beijing Xicheng District in 2014 were taken, 63 were throat swab specimens and 19 were urine specimens. 70 cases were positive for measles virus nucleic acid, 40 of which were obtained gene sequence through sequencing, 37 were positive culture for measles virus. The phylogenetic tree analysis showed that gene sequences of 40 measles virus isolates were belonged to the same branch as H genotype representative strain Chin9322/H1a and MVi/Hunan, CHN/0.93/7/H1 recommended by World Health Organization. The homology of nucleotide were 98% - 98.9% and 96.9% - 97.8% respectively, homology of amino acid were 97.3% - 99.3% and 95.3% - 98% respectively. **Conclusion** The main genotype of measles cases in Beijing Xicheng District in 2014 was the local genotype (H1), surveillance of measles cases should be strengthened further to control and prevent the imported measles cases.

[Key words] measles virus; nucleic acid detection; genotype H1; epidemiology

[Chin J Infect Control, 2016, 15(10):780-784]

麻疹是由麻疹病毒感染引起的一种急性传染病, 以发热、出疹和呼吸道卡他症状为主要临床表

现。麻疹病毒属于副黏病毒科麻疹病毒属, 只有一个血清型。病毒基因组由 6 个结构基因和 2 个非结

[收稿日期] 2015-12-14

[作者简介] 张晶波(1970-), 女(汉族), 吉林省白城市人, 主任技师, 主要从事微生物检验研究。

[通信作者] 张晶波 E-mail:jingbo7099@hotmail.com

构基因组成,分别编码 6 个结构蛋白和 2 个非结构蛋白。麻疹病毒 N 基因羧基末端 450 个核苷酸基因是最大变异区,世界卫生组织(WHO)将其序列作为划分病毒基因型别的依据。根据 WHO 的建议,麻疹病毒被划分为 A~H 共八个基因组 23 个基因型,其中 B1、D1、E、F、G1 基因型已消失,目前只有 18 个基因型在世界各地人群中流行。北京市西城区于 2013 年 3 月发现了首例输入性麻疹病毒 D8 基因型病例,之后在其他区相继出现多起该基因型引起的麻疹疫情。开展麻疹病毒分子生物学监测,明确麻疹野病毒的型别与来源,及时发现输入性病例对麻疹的控制及消除具有重要的意义^[1-3]。为进一步了解北京市西城区麻疹病毒基因特征,我们对 2014 年麻疹监测结果进行了分析。

1 材料与方法

1.1 标本 咽拭子或尿,由北京市西城区疾病预防控制中心计划免疫科、辖区保健科及辖区医院采集提供,2014 年共计采集疫情及监测患者 81 例 82 份标本,其中咽拭子 63 份,尿 19 份。

1.2 标本的分装处理 实验室收到标本 4℃ 保存或 -70℃ 以下保存,标本送至实验室后立即进行处理,避免反复冻融。将原始标本分为三份,一份用于核酸检测,一份用于病毒分离,一份保存待复核。72 h 内完成标本定量聚合酶链反应(PCR)核酸鉴定,麻疹阳性标本做 RT-PCR 麻疹病毒基因片段扩增。

1.3 实验室检测

1.3.1 核酸提取 采用美国 ABI 公司核酸提取试剂盒 MagMax™-96 Viral Isolation Kit 提取核酸。

1.3.2 基因分型引物 引物序列使用美国疾病控制与预防中心(CDC)麻疹基因定型引物扩增 N 基因 COOH 末端的 634 个核苷酸片段,引物序列为:上游引物 MeV216(5'-TGG AGCTATGCCATGG-GAGT-3'),下游引物 MeV214(5'-TAACAAT-GATGGAGGGTAGG-3')。

1.3.3 仪器 CLASS II 生物安全柜为新加坡 ESCO 公司生产,低温离心机为 SIGEMA 3K15(SIGEMA 公司出品),全自动核酸提取仪 MagMax™ Express 及定量 PCR 仪 7500 Fast Real-time PCR System(ABI 公司出品),PCR 扩增仪 iCycler 伯乐公司出品。

1.3.4 核酸检测试剂盒 麻疹风疹双通道 real-

time PCR 试剂盒由江苏和创公司生产,麻疹基因片段扩增采用 Invitrogen™ One-Step RT-PCR Kit(美国 Invitrogen 公司生产)。具体操作、反应条件和结果判定见试剂盒说明书。

1.4 麻疹病毒基因片段扩增方法 采用一步法 RT-PCR,扩增麻疹 N 基因片段。反应参数:逆转录阶段:42℃,10 min;预变性阶段:94℃,10 s;预扩增阶段:变性 94℃,5 s;退火 50℃,20 s;延伸 72℃,20 s;共 5 个循环;变性 94℃,5 s;退火 56℃,50 s;延伸 72℃,15 s;共 40 个循环。PCR 完成后,用 1.7% 琼脂糖凝胶电泳分析结果,扩增片段为 634 bp。PCR 产物送至北京市疾病预防控制中心,统一送测序公司进行序列测定,然后由北京市疾病预防控制中心反馈结果。

1.5 序列分析 摘录 GenBank 中收录的 WHO 推荐的麻疹病毒代表株、中国疫苗株及 H 基因簇代表株的序列,进行核苷酸和氨基酸的相似性和差异比对,构建系统发育树。麻疹病毒基因变化最大的区域是 N 基因羧基端的 450 个核苷酸,选取 450 bp 进行序列分析,应用 BioEdit 6.0 及 Mega 6 软件进行系统发育树的构建。

2 结果

2.1 麻疹病毒核酸检测结果及病例相关情况

2014 年共采集麻疹疑似患者 81 例的 82 份标本,麻疹病毒核酸检测阳性 70 例,RT-PCR 扩增、测序获得基因序列 40 份,麻疹病毒培养阳性毒株 37 例。获得麻疹病毒基因序列的 40 例患者主要集中在 3~5 月,以成人(19~55 岁)居多,共 23 例(57.5%),<1 岁患儿(4 个月~1 岁)共 15 例(37.5%)。仅 2 例有疫苗接种史,其余均为不详或无;女性 22 例,男性 18 例;均为本市病例。其中 11 例患者采集了血标本,9 例为麻疹血 IgM 抗体检测阳性。见表 1。

2.2 麻疹病毒基因型进化树分析 对 40 份麻疹病毒基因序列进行分析,与 WHO 推荐的代表株、中国疫苗株及 H 基因簇代表株核酸种系进行比对,种系进化树显示,本研究 40 份序列与 H 基因簇代表株 Chin9322/H1a 和 WHO 推荐的代表株 MVi/Hunan. CHN/0.93/7/H1 在同一分支上。根据 WHO 对麻疹病毒基因型别划分的规定,西城区获得的麻疹病毒基因序列均为 H1 基因型,进一步分型为 H1a 基因型。见图 1。

表 1 2014 年北京市西城区 40 例获得基因序列的麻疹患者基本情况

Table 1 Characteristics of 40 measles cases who obtained gene sequences, Beijing Xicheng District, 2014

| 年龄(岁) | 标本数 | 性别 | | 疫苗接种 | | 血清学 | | | RT-PCR | | 病毒培养 | |
|-------|-----|----|----|------|------|-----|----|-----|--------|----|------|----|
| | | 男 | 女 | 有 | 无/不详 | 阳性 | 阴性 | 未采集 | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 |
| <1 | 15 | 9 | 6 | 0 | 15 | 1 | 0 | 14 | 15 | 0 | 13 | 2 |
| 1~ | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 6~ | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| ≥19 | 23 | 8 | 15 | 1 | 22 | 8 | 2 | 13 | 23 | 0 | 19 | 4 |
| 合计 | 40 | 18 | 22 | 2 | 38 | 9 | 2 | 29 | 40 | 0 | 34 | 6 |

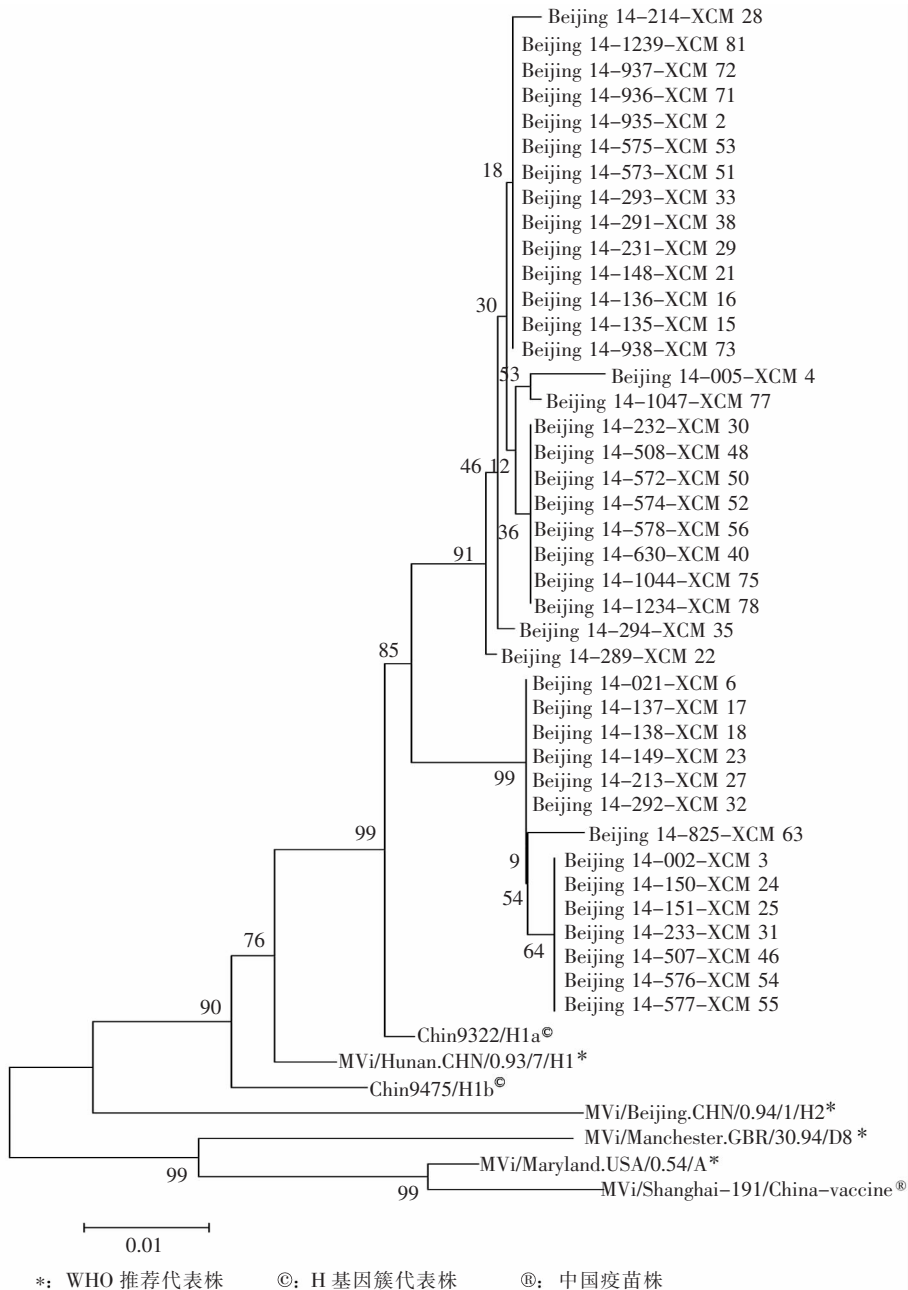


图 1 2014 年北京市西城区 40 份麻疹病毒基因序列进化树分析

Figure 1 Phylogenetic tree of 40 measles virus gene sequences, Beijing Xicheng District, 2014

2.3 核苷酸和氨基酸变异情况 将 40 份麻疹病毒基因序列与 Chin9322/H1a, 以及 WHO 推荐的代

表株 MVi/Hunan.CHN/0.93/7/H1 的核苷酸和氨基酸同源性进行对比分析,核苷酸水平上同源性分

别为 98%~98.9% 和 96.9%~97.8%; 氨基酸水平上同源性分别为 97.3%~99.3% 和 95.3%~98%。见表 2。

表 2 2014 年北京市西城区 40 例麻疹病毒基因序列与参考株序列的核苷酸和氨基酸同源性对比

Table 2 Comparison of nucleotide and amino acid homology between 40 cases of measles virus gene sequences and reference strain sequences, Beijing Xicheng District, 2014

| 序号 | 样本标号 | 核苷酸 | | 氨基酸 | |
|----|----------------------|--------------|---------------------|--------------|---------------------|
| | | Chin9322/H1a | Hunan.CHN/0.93/7/H1 | Chin9322/H1a | Hunan.CHN/0.93/7/H1 |
| 1 | Beijing14-002-XCM3 | 98.4 | 97.3 | 97.3 | 96 |
| 2 | Beijing14-005-XCM4 | 98 | 96.9 | 98 | 96.7 |
| 3 | Beijing14-021-XCM6 | 98.4 | 97.3 | 96.7 | 95.3 |
| 4 | Beijing14-135-XCM15 | 98.7 | 97.6 | 99.3 | 98 |
| 5 | Beijing14-136-XCM16 | 98.7 | 97.6 | 99.3 | 98 |
| 6 | Beijing14-137-XCM17 | 98.7 | 97.6 | 97.3 | 96 |
| 7 | Beijing14-138-XCM18 | 98.7 | 97.6 | 97.3 | 96 |
| 8 | Beijing14-148-XCM21 | 98.7 | 97.6 | 99.3 | 98 |
| 9 | Beijing14-149-XCM23 | 98.7 | 97.6 | 99.3 | 98 |
| 10 | Beijing14-150-XCM24 | 98.4 | 97.3 | 97.3 | 96 |
| 11 | Beijing14-151-XCM25 | 98.4 | 97.3 | 97.3 | 96 |
| 12 | Beijing14-213-XCM27 | 98.7 | 97.6 | 97.3 | 96 |
| 13 | Beijing14-214-XCM28 | 98.4 | 97.3 | 98.7 | 97.3 |
| 14 | Beijing14-231-XCM29 | 98.7 | 97.6 | 99.3 | 98 |
| 15 | Beijing14-232-XCM30 | 98.9 | 97.8 | 99.3 | 98 |
| 16 | Beijing14-233-XCM31 | 98.7 | 97.6 | 97.3 | 96 |
| 17 | Beijing14-289-XCM22 | 98.9 | 97.8 | 99.3 | 98 |
| 18 | Beijing14-291-XCM38 | 98.7 | 97.6 | 99.3 | 98 |
| 19 | Beijing14-292-XCM32 | 98.7 | 97.6 | 97.3 | 96 |
| 20 | Beijing14-293-XCM33 | 98.7 | 97.6 | 99.3 | 98 |
| 21 | Beijing14-294-XCM35 | 98.9 | 97.8 | 99.3 | 98 |
| 22 | Beijing14-507-XCM46 | 98.4 | 97.3 | 97.3 | 96 |
| 23 | Beijing14-508-XCM48 | 98.9 | 97.8 | 99.3 | 98 |
| 24 | Beijing14-572-XCM50 | 98.9 | 97.8 | 99.3 | 98 |
| 25 | Beijing14-573-XCM51 | 98.7 | 97.6 | 99.3 | 98 |
| 26 | Beijing14-574-XCM52 | 98.9 | 97.8 | 99.3 | 98 |
| 27 | Beijing14-575-XCM53 | 98.7 | 97.6 | 99.3 | 98 |
| 28 | Beijing14-576-XCM54 | 98.4 | 97.3 | 97.3 | 96 |
| 29 | Beijing14-577-XCM55 | 98.4 | 97.3 | 97.3 | 96 |
| 30 | Beijing14-578-XCM56 | 98.9 | 97.8 | 99.3 | 98 |
| 31 | Beijing14-630-XCM40 | 98.9 | 97.8 | 99.3 | 98 |
| 32 | Beijing14-825-XCM63 | 98.2 | 97.1 | 96.7 | 95.3 |
| 33 | Beijing14-935-XCM2 | 98.7 | 97.6 | 99.3 | 98 |
| 34 | Beijing14-936-XCM71 | 98.7 | 97.6 | 99.3 | 98 |
| 35 | Beijing14-937-XCM72 | 98.7 | 97.6 | 99.3 | 98 |
| 36 | Beijing14-938-XCM73 | 98.7 | 97.6 | 99.3 | 98 |
| 37 | Beijing14-1044-XCM75 | 98.9 | 97.8 | 99.3 | 98 |
| 38 | Beijing14-1047-XCM77 | 98.4 | 97.3 | 99.3 | 98 |
| 39 | Beijing14-1234-XCM78 | 98.9 | 97.8 | 99.3 | 98 |
| 40 | Beijing14-1239-XCM81 | 98.7 | 97.6 | 99.3 | 98 |

3 讨论

麻疹是一种全球广泛传播的病毒性传染病,是导致儿童死亡最多而疫苗可以预防的疾病,也是 WHO 拟消除的疾病之一。2006 年我国卫生部发布了《2006—2012 年全国消除麻疹行动计划》,我国麻疹发病率大幅下降,2010 年又进行了全国强化免疫,从 2010 年的 2.86/10 万下降至 2012 年的 0.46/10 万,达到有记录以来的最低水平。但是 2013 年又出现了反弹,分离的麻疹病毒达到历史最高水平,输入性麻疹病毒基因型有所增加。目前,世界上有 18 个麻疹病毒基因型流行,中国流行的麻疹病毒本土基因型为 H1 基因型,2009 年开始陆续出现输入性病例,先后监测到 D9、D4、D11 等基因型^[2,4-8]。1993—2013 年中国麻疹实验室网络病毒学监测结果显示,5 163 株麻疹病毒,5 013 株为 H1a 型,其他基因型按照数量依次为 D9、D8、A、D11、B3、H2 和 D4,说明我国麻疹病毒基因型以 H1a 型为本土优势基因型,其他基因型散在存在^[8]。北京市 1999—2008 年麻疹监测结果显示,除 1 例 D9 基因型外,其余麻疹病毒均为 H1 基因型,说明北京市流行的麻疹病毒基因型与全国一致。2013 年北京市加强了麻疹病例病原学监测,发现了输入性 D8、D9 基因型麻疹病毒病例,除 5 例为 D8 基因型外,西城区其他麻疹病例均为 H1 基因型^[3,9-12]。

为进一步监测西城区麻疹病例的病毒基因型,我们对 2014 年北京市西城区获得的 40 份麻疹病毒基因片段进行序列分析,结果显示均为 H1 基因型 H1a 基因亚型,与北京市、江苏省、辽宁及全国的优势本土毒株基因型一致^[8,10,13-14]。40 份麻疹病毒基因序列与 Chin9322/H1a,以及 WHO 推荐的代表株 MVi/Hunan.CHN/0.93/7/H1 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其同源性分别为 98%~98.9%、96.9%~97.8%,在氨基酸水平上其同源性分别为 97.3%~99.3% 和 95.3%~98%,说明西城区流行的麻疹病毒相对保守,变异不大。40 例获得基因序列的麻疹患者均为本市病例,以成人人居多,一岁以下儿童次之,与北京市麻疹流行病学特征一致^[15]。儿童是麻疹的易感人群,但疫苗接种初次为 8 个月,因此,小月龄儿童

发病率高与未接种疫苗和疫苗接种时间有关;成人发病率高也与疫苗接种有关,免疫空白使得成人成为麻疹的易感人群。

由于北京市西城区监测范围小,病例少,数据有限,不具有北京市的代表性,但本辖区监测数据及时有效,2013 年西城区发现了北京市首例输入性麻疹病毒 D8 基因型病例,对北京市的监测系统具有预警作用^[3]。我国已进入加速消除麻疹阶段,对麻疹的实验室监测提出了新要求,加强麻疹病毒基因型监测,不仅可以发现输入性病例,也可提高该病毒本土基因型的检出率。通过分子流行病学溯源,严密监测麻疹发病和病毒基因型特征变化,及时发现麻疹病毒的流行趋势,发现输入性病例,可以有效控制麻疹疫情蔓延,为消除麻疹提供病毒基因水平的证据。疫苗接种是消除麻疹的关键,成人的免疫空白导致成人发病率高,此部分人群逐年累积,很容易引起麻疹暴发,提示有效地控制成年人麻疹病例的发生,在人口较集中的区域进行针对性麻疹疫苗的免疫接种,对麻疹防控具有重要的指导意义。

[参 考 文 献]

- [1] Rota PA, Brown K, Mankertz A, et al. Global distribution of measles genotypes and measles molecular epidemiology[J]. *J Infect Dis*, 2011, 204 (Suppl 1): S514 - S523.
- [2] World Health Organization. Measles virus nomenclature update: 2012[J]. *Wkly Epidemiol Rec*, 2012, 87(9): 73 - 80.
- [3] 张晶波, 吉彦莉, 崔京辉, 等. 北京市西城区 2013 年输入性麻疹病毒 D8 基因型流行分析[J]. *中国病毒病杂志*, 2014, 4(4):

272 - 276.

- [4] 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[J]. *中国计划免疫*, 2003, 9(2): 1 - 8.
- [5] 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与鉴定[J]. *中国疫苗和免疫*, 2009, 15(4): 304 - 309.
- [6] 王慧玲, 郑蕾, 王骥涛, 等. 中国境内首次发现输入性 D4 基因型麻疹病例[J]. *病毒学报*, 2010, 26(2): 103 - 108.
- [7] 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.
- [8] 毛乃颖, 蒋小泓, 王慧玲, 等. 中国 2013 年麻疹/风疹实验室网络的运转与监测[J]. *中国疫苗和免疫*, 2014, 20(5): 403 - 408.
- [9] 李娟, 卢莉, 马蕊, 等. 北京市 2013 年新发现 D8 基因型麻疹病例的流行病学调查[J]. *中华流行病学杂志*, 2013, 34(11): 1111 - 1114.
- [10] 杨洁, 张铁钢, 陈萌, 等. 北京市 1999 年—2008 年麻疹/风疹网络实验室运转情况分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2010, 20(8): 2063 - 2065.
- [11] 高艳, 赵剑虹, 王恒伟, 等. 2013 年北京市首例输入性 D9 基因型麻疹毒株的分离与鉴定[J]. *疾病监测*, 2014, 29(1): 25 - 27.
- [12] 张晶波, 崔京辉, 王永全, 等. 北京市西城区 2013 年麻疹病毒 H1 基因型的流行情况分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2014, 24(23): 3475 - 3478.
- [13] 胡莹, 陆培善, 邓秀英, 等. 江苏省 2012 年麻疹病毒的基因特征分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2015, 25(2): 226 - 228.
- [14] 王艳, 马艳, 徐晓婷, 等. 辽宁省 1997~2014 年 H1a 基因型麻疹野病毒流行株血凝素(H)基因特征分析[J]. *病毒学报*, 2015, 31(4): 410 - 419.
- [15] 李娟, 卢莉, 刘东磊, 等. 2005—2010 年北京市麻疹流行病学特征与消除麻疹措施分析[J]. *疾病监测*, 2012, 27(5): 353 - 357.

(本文编辑:左双燕)

(上接第 779 页)

- [2] 柯雅娟, 许晨耘, 俞诗娃, 等. 三磷酸腺苷生物荧光法快速监测医务人员手清洁消毒效果[J]. *中国消毒学杂志*, 2010, 27(2): 161 - 162.
- [3] 王绍鑫, 周艳琴, 张帆, 等. 医疗机构 ATP 荧光检测和实验室细菌计数法检测结果比较[J]. *江苏预防医学*, 2013, 24(2): 21 - 23.
- [4] 李金娜, 庄玉梅, 王红梅, 等. ATP 生物荧光检测法用于医院感染管理现场干预的研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2013, 23(15): 3815 - 3817.
- [5] 宁培勇, 贾珉, 丁津华, 等. ATP 生物荧光技术在医务人员手卫生质量监测中的应用研究[J]. *中国消毒学杂志*, 2014, 31(12): 1295 - 1297.
- [6] 唐艳琴, 曾娟, 杨芳琴. 医务人员手卫生依从性调查与干预[J]. *现代医院*, 2012, 12(5): 154 - 156.

- [7] Boyce JM. Environmental contamination makes an important contribution to hospital infection [J]. *J Hosp Infect*, 2007, 65 (Suppl 2): 50 - 54.
- [8] 陈春燕, 陈翠芳, 邹义春. 重症监护病房鲍氏不动杆菌感染流行病学调查及控制[J]. *中华医院感染学杂志*, 2011, 21(12): 2430 - 2431.
- [9] 谷继荣. 环境及物体表面消毒在预防和控制医院感染中的作用[J]. *中国感染控制杂志*, 2012, 11(3): 231 - 235.
- [10] 唐毅, 糜琛蓉, 何景雄, 等. ATP 检测系统在临床清洁消毒效果评价中的应用[J]. *中华医院感染学杂志*, 2011, 21(12): 2523 - 2525.

(本文编辑:周鹏程)