

· 论 著 ·

重庆市 2011—2016 年风疹病毒基因特征分析*

赵 华¹, 彭靖尧¹, 赵春芳¹, 朱 贞², 凌 华¹, 张 敏¹, 黄 为^{1△}

(1. 重庆市疾病预防控制中心, 重庆 400042; 2. 中国疾病预防控制中心病毒预防控制所, 北京 102206)

摘要:目的 通过对重庆市 2011—2016 年分离的风疹病毒进行基因型别鉴定及系统进化分析, 为预防和控制风疹提供分子流行病学依据。方法 收集重庆市 2011—2016 年风疹病毒核酸检测阳性病原学标本进行病毒分离, 通过序列测定鉴定其基因型别; 与 GenBank 中风疹各型别参考毒株及其他省市所获毒株进行进化树构建和遗传距离分析。结果 2011—2013 年风疹毒株主要为 1E 基因型(94/103); 2014—2016 年主要为 2B 基因型(50/56), 仅 2014 年有 1 株 2A 基因型毒株。重庆株系与其他省市毒株核苷酸同源性 1E 型为 97.63%~99.73%, 平均 98.90%; 2B 型为 95.77%~99.73%, 平均 98.30%。系统树上重庆毒株并未与其他省市株系相互隔离。结论 重庆市风疹优势基因型近年已经逐渐由 1E 型替代为 2B 型。重庆市的风疹病毒基因型在不断变化, 优势株与其他省市呈共同进化状态。

关键词:风疹病毒; 基因型别; 序列分析

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.19.004

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)19-2666-03

Genetic characteristics of rubella viruses in Chongqing from 2011 to 2016*

ZHAO Hua¹, PENG Jingyao¹, ZHAO Chunfang¹, ZHU Zhen², LING Hua¹, ZHANG Min¹, HUANG Wei^{1△}

(1. Chongqing Center for Disease Control and Prevention, Chongqing 400042, China; 2. Viral Disease

Control and Prevention Institute, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China)

Abstract: Objective To identify and analyze the genetic characterization of rubella viruses isolated in Chongqing from 2011 to 2016, so as to provide molecular epidemiological evidence for rubella prevention and control. Methods Virus samples isolated from Chongqing city from 2011 to 2016 for detection of rubella virus nucleic acid were collected, and their genotypes were identified by sequence analysis. Phylogenetic tree construction and genetic distance analysis were carried out among rubella virus types, reference strains and other provinces and cities in GenBank. Results The predominant genotype from 2011 to 2013 was 1E (94/103), from 2014 to 2016 was 2B (50/56). Only one strain of genotype 2A was found in 2014. The homology of 1E genotype between Chongqing and other provinces was 97.63% to 99.73%, with an average of 98.90%. The homology of 2B genotype between Chongqing and other provinces was 95.77% to 99.73%, with an average of 98.30%. The Chongqing rubella viruses strains didn't isolate form other province strains of China in phylogenetic tree. Conclusion The predominant genotype 1E of rubella virus in Chongqing was gradually replaced by 2B in recent years. The rubella virus genotypes in Chongqing are changing, and the dominant strains are in a state of coevolution with other provinces and cities.

Key words: rubella virus; genotype; sequence analysis

风疹病毒是披膜病毒科风疹病毒属唯一成员, 为有包膜的单股正链 RNA 病毒。其引发的风疹是一种急性呼吸道传染病, 妊娠期妇女感染可能导致胎儿罹患先天性风疹综合征(CRS), 严重威胁妇女儿童健康^[1-2]。

在风疹病毒型别鉴定和常规分子流行病学研究中, 世界卫生组织将风疹病毒基因组中结构蛋白 E1 基因的 739 个核苷酸划分为病毒分型标准靶核苷酸序列。为调查重庆市风疹病毒的流行趋势和基因特征, 本研究对重庆市 2011—2016 年分离出的 159 株风疹病毒进行了该片段的测序和分析, 现报道如下。

1 材料与方

1.1 标本来源 风疹疑似标本来源于 2011—2016 年重庆市风疹暴发或散发疫情中临床诊断为风疹病例的咽拭子标本, 标本存放于重庆市疾病预防控制中心微生物检验所, 置于 2% 牛血清的 DMEM 病毒保存液中保存, 温度为 -80 ℃。

1.2 毒株分离培养 分离用的 Vero/SLAM 细胞由中国疾病预防控制中心麻疹实验室提供。风疹疑似病例咽拭子标本于 -80 ℃ 冰箱取出常温融化后, 参照《麻疹和风疹病毒感染的实验室诊断手册》(第 2 版) 中风疹病毒分离的方法, 接种前向 1.0 mL 临床标本中加入 5 μL 浓度为 1 000× 的青霉素/链霉素 4 ℃ 静置处理 0.5 h 后, 吸取 0.4 mL 接种于单层覆盖 75% 以上生长良好的 Vero/SLAM 细胞, 36 ℃ 吸附 1.5 h 后, 弃上清液, 加入 1.0 mL 细胞维持液, 置于 36 ℃ 孵箱培养, 同时设置阴性细胞对照。连续培养 7 d 并每日观察细胞病变。收集悬浮于细胞表面有颗粒状物质的培养物作为疑似细胞病变标本进行下一步检测。风疹病毒不能使细胞发生明显病变, 因此, 盲传 3 代后即可获得培养液。

1.3 核酸提取及鉴定 使用 OMEGA 公司的 RNA 提取试剂盒进行风疹病毒分离物核酸提取。采用反转录 PCR(RT-PCR) 方法对风疹病毒核酸进行扩增检测。麻疹/风疹病毒核

* 基金项目: 十二五国家科技重大专项课题(2013ZX10004-202)。

作者简介: 赵华, 女, 主管技师, 主要从事肠道病毒流行病学和病原特征学研究。△ 通信作者, E-mail: hw827@163.com。

酸检测试剂盒,购自江苏硕世生物科技有限公司。核酸检测阳性标本送中国疾病预防控制中心麻疹实验室进行核酸序列测定及拼接。序列分析使用的 32 株风疹病毒各型别毒株,参考序列为世界卫生组织公布序列^[3],由中国疾控中心病毒预防控制所朱贞老师整合馈赠。本研究所用中国部分省市风疹序列均来源于 GenBank。

1.4 遗传进化分析 所获风疹拼接序列为 E1 基因中 739 个核苷酸片段(8 731~9 469 nt),该片段为世界卫生组织规定的风疹基因型鉴定的标准靶核苷酸片段,使用软件 MEGA6.06 进行序列的多重比对及核苷酸遗传距离矩阵分析并构建进化树。同年且序列完全一致的风疹毒株序列仅保留一条用于建树,同时选取系统树上 1E、2B 支系中各年部分代表株系与全国其他省市风疹毒株进行系统树构建。系统树构建使用 Kimura 2-缺省参数模式,建树方法为 Neighbour-joining 法(邻接法),构建时使用 Bootstrap 方法进行 1 000 次重复计算,并进行置信度评估。

2 结 果

2.1 病毒分离结果 本研究对 2011—2016 年所获共 319 份疑似风疹病原学标本进行了病毒分离,经检测共分离出 159 株风疹病毒毒株。见表 1。

表 1 2011—2016 年重庆市风疹病毒分离阳性结果

年份	标本数(n)	风疹病毒分离阳性数(n)	风疹病毒分离阳性率(%)
2011	50	24	48.0
2012	109	63	57.8
2013	19	16	84.2
2014	65	26	40.0
2015	64	23	35.9
2016	12	7	58.3
合计	319	159	49.8

2.2 基因型鉴定结果 将分离得到的 159 株风疹毒株送往中国疾病预防控制中心麻疹实验室进行核酸序列测定及基因分型,其中 99 株经鉴定为 1E 基因型,59 株为 2B 基因型,1 株为 2A 基因型。2011—2013 年风疹毒株主要为 1E 基因型(94/103),2014—2016 年风疹毒株主要为 2B 基因型(50/56)。见表 2。

表 2 2011—2016 年重庆市风疹病毒毒株基因型鉴定

年份	总毒株数(n)	1E		2B		2A	
		株数(n)	占总毒株数(%)	株数(n)	占总毒株数(%)	株数(n)	占总毒株数(%)
2011	24	24	100.00	0	0.00	0	0.00
2012	63	59	93.70	4	6.30	0	0.00
2013	16	11	68.75	5	31.25	0	0.00
2014	26	5	19.20	20	76.90	1	3.80
2015	23	0	0.00	23	100.00	0	0.00
2016	7	0	0.00	7	100.00	0	0.00
合计	159	99	62.30	59	37.10	1	0.60

2.3 风疹病毒分离株系统进化分析 将重庆 2011—2016 年 71 株 RV 分离株与世界卫生组织 32 株 RV 参考序列进行系统进化树构建,结果表明,2011—2013 年大部分毒株与 1E 基因型内参考株 RVi-Shandong, CHN-0.02-1E 亲缘关系最为接近,聚为 1E 支系;2014—2016 年的大部分毒株则与 2B 基因型内参考株 RVi-Washington, USA-16.00-2B 关系最亲近,聚为 2B 支系;仅毒株 2014-151 聚在 2A 支系。在 1E 和 2B 支系内,不同年份毒株序列并未形成独立分支,见图 1。重庆 1E 组间遗传距离为 0.010,与其他省市 1E 毒株间遗传距离为 0.011;2B 组间遗传距离为 0.008,与其他省市 2B 毒株间遗传距离为 0.017。重庆地区风疹代表株与其他省市毒株在系统树中同样分为 1E 和 2B 支系,重庆株系与其他省市毒株核酸同源性 1E 型为 97.63%~99.73%,平均 98.90%;2B 型为 95.77%~99.73%,平均 98.30%,毒株间相互交织,未形成明显隔离,见图 2。

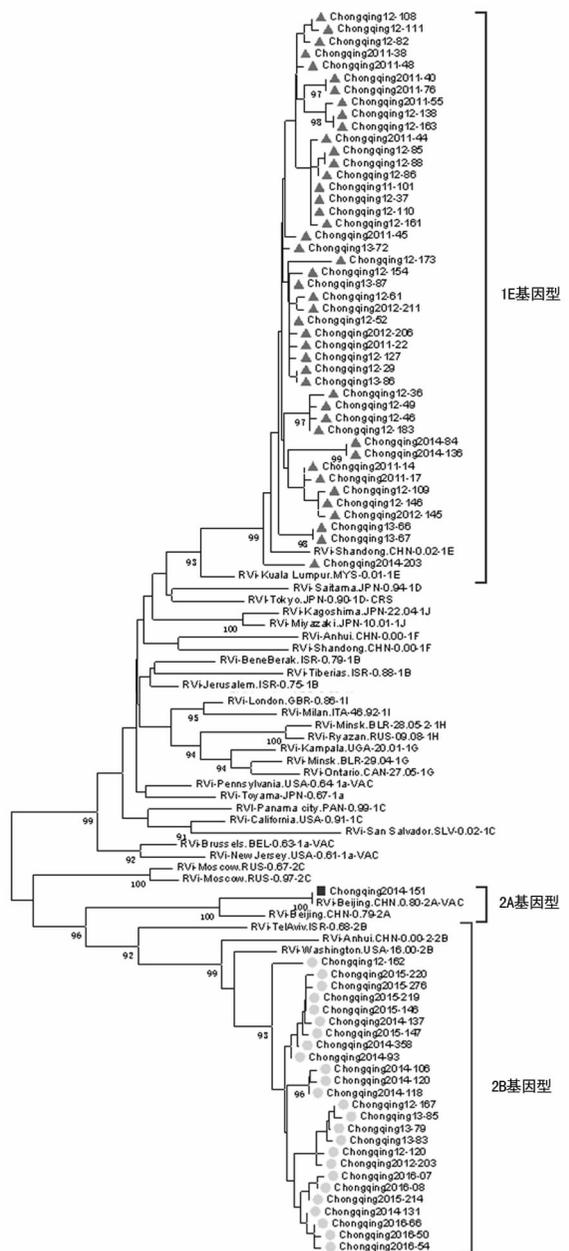


图 1 2011—2016 年重庆风疹毒株与世界卫生组织参考株 E1 基因 739 个核苷酸的系统进化树

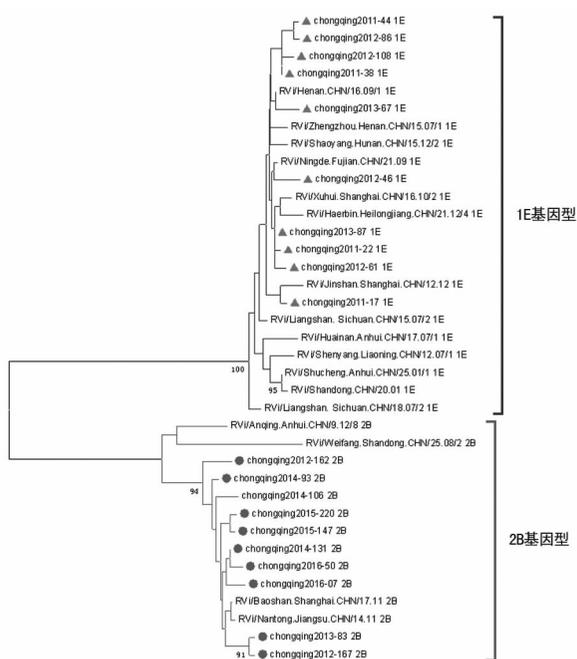


图 2 2011—2016 年重庆风疹代表株与全国其他省市代表株系 E1 基因 739 个核苷酸的系统进化树

3 讨 论

感染风疹病毒虽然临床症状较轻,但因其可能导致妊娠期妇女出现流产或胎儿畸形而受到广泛关注^[4]。2008 年原卫生部将风疹疫苗纳入国家免疫规划,为防控风疹病毒传播提供了有力的支持。重庆市从 2007 年开始开展风疹病毒分离工作,早期标本主要来自重庆医科大学附属儿童医院,标本来源较单一。自 2011 年起重庆市建立了比较完善的风疹病毒监测方案,由各区县采集全市疑似风疹或风疹暴发病例血清及病原学标本并进行血清学诊断,病原学标本由重庆市疾病预防控制中心进行核酸检测及病毒分离,所获标本覆盖全市大部分区域,总体已能体现重庆市风疹病毒流行状况。

本研究对重庆分离获得的 159 株风疹毒株进行序列分析和进化树构建,结果显示,重庆 2011—2013 年风疹毒株主要为 1E 基因型(94/103),证明 1E 基因型毒株至 2013 年仍为重庆地区风疹流行的优势株。有研究者对 1979—2007 年中国流行的风疹病毒基因型进行分析表明,2001 年之后中国流行的优势株为 1E 基因型^[5-9],后续研究表明,直到 2012 年 1E 仍为中国风疹病毒的优势株基因型^[10],本研究结果支持该结论。2012 年重庆首次测获 2B 基因型毒株,此后所分离毒株中 2B 基因型所占比例逐年增高,其中 2014—2016 年以 2B 基因型毒株为主(50/56),说明重庆地区风疹病毒的流行优势株基因型在 2012—2014 年逐步由 1E 替换为 2B。该趋势与我国其他省市已有研究相似^[11-12],符合中国风疹病毒的流行状况^[13]。从遗传距离来看,重庆市 2011—2016 年 1E 及 2B 毒株与全国其他省市的同型别毒株同源性很高(1E 型平均 98.90%;2B 型平均 98.30%),且构建的系统进化树显示,重庆市 2011—2016 年的风疹病毒分离株与我国其他省市的分离株交互聚在一起,并未形成明显的时间和地理隔离,这说明重庆市 1E 和 2B 基因型风疹病毒与其他省市毒株亲缘关系非常接近,呈全国性的流行分布和共同进化状态。本研究所获 1 株 2A 基因型毒株,经序列比对,发现其与 2001 年于山东所获 2A 型毒株序列(Gen-

Bank 登陆号为 FJ875032 和 FJ875031)同源性为 100.00%^[5],此 2 株山东 2A 毒株经研究发现与我国风疹疫苗株 BRD II 的序列相同,提示本研究所获 2A 毒株或为疫苗株而非野毒。

由于风疹疫苗的广泛使用,重庆地区风疹病例数近年得到有效控制,据统计,2011 年重庆地区的风疹发病率为 11.15/100 000,至 2016 年仅为 0.50/100 000,整体呈逐年下降趋势。但风疹仍是严重威胁妊娠期妇女及胎儿健康的卫生问题之一。近年来风疹病毒全国性优势株基因型替换和流行表明,风疹病毒在中国仍然存在广泛的传播链,提示需警惕因免疫选择压力增大而导致的病毒变异甚至免疫逃逸。持续的风疹分子病原学监测对于了解地区风疹病毒特征和分布、疫苗免疫效果有重要意义,同时,也可为风疹疾病的防控乃至消除提供必要的基础数据和科学依据。因此,为及时掌握风疹病毒在重庆市的流行情况和制订防控措施,进一步加强和完善风疹分子病原学监测体系是十分必要的。

参 考 文 献

- [1] 李秀义,温和. 风疹病毒研究进展[J]. 安徽卫生职业技术学院学报,2008,7(6):72-74.
- [2] Frey TK. Molecular biology of rubella virus[J]. Adv Virus Res,1994,44(44):69-160.
- [3] No authors listed. Rubella virus nomenclature update: 2013[J]. Wkly Epidemiol Rec,2013,88(32):337.
- [4] Frey TK. Molecular biology of rubella virus. [J]. Adv Virus Res,1994,44(44):69.
- [5] Zhu Z, Abernathy E, Cui AL, et al. Rubella virus genotypes in the People's republic of China between 1979 and 2007: a shift in endemic viruses during the 2001 rubella epidemic[J]. J Clin Microbiol,2010,48(5):1775-1781.
- [6] 王艳,马艳,徐晓婷,等. 辽宁省 2007—2012 年流行风疹病毒基因特征分析[J]. 病毒学报,2013,29(6):589-595.
- [7] 朱贞,许文波,毛乃颖,等. 2003—2007 年中国风疹病毒基因特征分析[J]. 病毒学报,2008,24(1):7-16.
- [8] 王常银,朱贞,徐爱强,等. 2000—2007 年山东省风疹病毒分子流行病学研究[J]. 病毒学报,2010,26(6):471-476.
- [9] 莫建军,谭毅,莫兆军,等. 2004—2007 年广西风疹流行病学分析[J]. 应用预防医学,2009,15(2):92-94.
- [10] Zhu Z, Cui A, Wang H, et al. Emergence and continuous evolution of genotype 1E rubella viruses in China[J]. J Clin Microbiol,2012,50(2):353-363.
- [11] 邓丽丽,刘巍,马宇燕,等. 2013—2014 年广西风疹病毒分子流行病学分析[J]. 中国疫苗和免疫,2015,21(6):606-610.
- [12] 刘李,何吉兰,马小珍,等. 2015 年四川省风疹病毒分离株的基因特征分析[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2016,30(5):425-429.
- [13] Zhu Z, Rivailler P, Abernathy E, et al. Evolutionary analysis of rubella viruses in mainland China during 2010-2012: endemic circulation of genotype 1E and introductions of genotype 2B[J]. Sci Rep,2015,5:7999.