

## 2013年西安地区风疹病毒的分离与基因特征研究\*

吴 瑞<sup>1</sup>, 杨 杨<sup>1</sup>, 朱 贞<sup>2</sup>, 司 源<sup>3</sup>, 刘继锋<sup>1</sup>, 马超锋<sup>1</sup> (1. 西安市疾病预防控制中心, 西安 710054; 2. 中国疾病预防控制中心, 北京 100050; 3. 陕西省疾病预防控制中心, 西安 710054)

**摘要:**目的 了解西安地区风疹病毒基因特征, 为风疹控制工作提供分子流行病学的基线数据。方法 采集西安地区2013年3起农村学校风疹暴发疫情中27个病例的27份咽拭子标本及6份尿液标本, 利用RT-PCR法检测风疹病毒核酸, 阳性者接种Vero-SLAM细胞分离病毒, 并利用RT-PCR方法鉴定分离到的毒株, 对分离到的风疹病毒进行基因序列测定, 利用BIOEDIT, MAGA6.0软件进行风疹病毒基因特征分析。结果 27份咽拭子标本中共25份风疹核酸阳性, 6份尿液标本均为风疹核酸阳性; 从风疹核酸阳性标本分离病毒, 25份咽拭子标本和6份尿液标本分别分离到18株和5株风疹病毒株。9株测序成功, 经鉴定全部属于1E型基因型。结论 2013年西安地区分离到的风疹病毒株与我国的主要基因型一致, 应加强对西安地区风疹血清学诊断、病毒学和血清流行病学监测。

**关键词:** 西安地区; 风疹病毒; 基因型别; 基因特征

中图分类号: R373.11; R372 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2015)05-084-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2015.05.025

### Genetic Characteristics of Rubella Virus Strains Isolated in Xi'an City, 2013

WU-Rui<sup>1</sup>, YANG-Yang<sup>1</sup>, ZHU-Zhen<sup>2</sup>, SI-Yuan<sup>3</sup>, Liu Ji-feng<sup>1</sup>, MA Chao-feng<sup>1</sup>

(1. Xi'an Center for Disease Control and Prevention, Xi'an 710074, China;

2. Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China;

3. Shaanxi Provincial Center for Disease Control and Prevention, Xi'an 710054, China)

**Abstract:** Objective To investigate the genetic characteristics of rubella virus strains isolated in Xi'an city, then to provide molecular epidemiological baseline data for further control. **Methods** A total of 27 cases of pharyngeal swab specimens and 6 cases of urine specimens were collected from rubella outbreak patients in 3 rubella outbreak in 2013. RT-PCR method was used to detect rubella virus nucleic acid, rubella virus isolated by Vero-SLAM cells and identified by RT-PCR method. The genetic characteristics were analyzed with the virus isolating and RT-PCR method combining. The virus strains were amplified by RT-PCR and sequenced. Phylogenetic tree was constructed by using BIOEDIT and MEGA 4.0 software package. **Results** Among 27 swab specimens and 6 cases of urine specimens there were 25 and 4 RUV RNA positive. 18 strains of rubella virus strain isolated from 23 RUV RNA positive (swab specimens) and 5 strains from 6 (urine specimens) specimens in xi'an region, but only 9 rubella virus strains via sequencing appraisal all belong to genotype 1E genotype. **Conclusion** 1E genotype of rubella virus is the predominance genotype in Xi'an city. Should strengthen the rubella serological diagnosis, virology and serum epidemiological surveillance.

**Keywords:** Xi'an area; rubella virus; genotype; genetic characteristics

风疹是由风疹病毒(rubella virus, RUV)引起的急性呼吸道传染病, 可通过呼吸道以及直接接触进行传播。临床表现主要以发热、全身性皮疹、淋巴结肿大为主要特点, 症状大多较轻微, 但少数可引起严重的并发症, 如后天获得性感染和先天性风疹综合征(CRS)以及并发脑炎、睾丸炎<sup>[1]</sup>。风疹容易在中小学中暴发流行, 给家庭和社会造成重要的经济和社会负担。同时风疹与麻疹临床不易鉴别, 在我国处于消除麻疹的关键时期给麻疹监测和控制工作增加了难度。

风疹病毒是披膜病毒科(Togaviridae)风疹病毒属(Rubiviruses)的唯一成员, 只有1个血清型, 但有多个基因型<sup>[1,2]</sup>。为了研究西安地区风疹病毒

基因型别, 本文对西安地区2013年3起农村学校风疹暴发疫情中分离出的风疹病毒进行分子流行病学特征分析。

#### 1 材料与试剂

1.1 研究对象 标本采集于西安市2013年3起农村学校风疹暴发疫情共27例, 小学2起(共16例), 中学1起(11例); 3起发病时间均在3月底至4月初间; 病例年龄范围为7~17岁, 平均年龄为12岁; 男性11例, 女性16例。所有病例均为临床诊断为RUV感染且获得病例监护人知情同意。采集病例咽拭子标本共27份, 尿液标本6份, 低温保存运送至实验室, -70℃保存。

1.2 试剂及仪器 风疹病毒核酸检测试剂盒(硕

\* 作者简介: 吴 瑞(1982-), 女, 博士, 主管检验技师, 研究方向: 病毒病分子诊断, Tel: 029-85520062, E-mail: wur2003@163.com。  
通讯作者: 马超锋(1974-), 男, 博士, 副主任医师, E-mail: mark7447@tom.com。

世生物);用于病毒分离的细胞为 Vero-SLAM 细胞,DMEM,胎牛血清等为 Gibco 公司产品;细胞培养瓶为 Corning 公司产品;核酸提取试剂、一步法扩增试剂盒、纯化试剂盒 QIA quick gel extraction kit 均为 QIAGEN 公司产品;风疹分型及测序引物由中国疾病预防控制中心病毒所国家麻疹实验室提供。PCR 仪(C1000)和凝胶成像仪(Gel Doc XR)为美国 BIORAD 公司,二氧化碳培养箱为美国 Shellalab。

### 1.3 方法

1.3.1 咽拭子及尿液标本 RUV RNA 检测:咽拭子使用 QIAamp Viral RNA Extraction Mini Kit 提取病毒 RNA,用风疹病毒核酸检测试剂盒(实时荧光探针 PCR 法)扩增检测,按照试剂盒判定结果。

1.3.2 病毒分离:咽拭子或尿液标本接种长成 75%单层的 Vero-SLAM 细胞(带有特异性麻疹病毒受体的非洲绿猴肾细胞)上,35℃吸附 1.5 h,弃去标本液,HANKS 液洗 2 遍,用含 2 ml/dl 胎牛血清的 DMEM 培养液培养 7~10 天。10 天后无细胞病变时,盲传 1 代,取培养上清荧光定量 PCR 检测 RUV RNA,阳性者,收集毒株,-70℃保存;阴性者视为病毒分离失败。

1.3.3 序列测定:从病毒悬液中使用利用 QIAamp Viral RNA Extraction Mini Kit 提取病毒 RNA。采用参考文献中的方法<sup>[2,3]</sup>,利用一步法扩增试剂盒 Qiagen One-step RT-PCR kit 进行 RT-PCR 扩增大约 1 107nt (8 656~9 762)产物,包括 WHO 推荐的 739 个分型基因(8 731~9 469)。目的片段用纯化试剂盒(QIA quick gel extraction kit,QIAGEN)进行回收纯化,按照使用说明进行操作,纯化后产物直接用于序列测定与分析。

1.3.4 毒株序列整理及进化分析:对测到的风疹毒株 739nt E1 序列进行比对,利用邻接法和最大相似率构建系统发生树,利用 BIOEDIT,MEGA 6.0 软件进行进一步分子流行病学分析,分析西安地区风疹病毒与其他毒株的亲缘性。

## 2 结果

2.1 咽拭子及尿液标本 RUV RNA 检测结果 经检测 27 份咽拭子标本和 6 份尿液标本中 RUV RNA 阳性分别为 25 份和 6 份。

2.2 风疹病毒的分离和鉴定 从 RUV RNA 阳性的 25 份咽拭子和 6 份尿液标本中共分离到 23 株风疹病毒,其中从 25 份咽拭子中分离到 18 株,从 6 份尿液标本中分离到 5 株。咽拭子标本中分离到的毒株依次标记为 Shaanxi13-01 ~

Shaanxi13-18;其中 5 份尿液标本中分离到的毒株标记为 Shaanxi13-X-U(X 为标本编号)。

2.3 风疹病毒分型及进化分析 将从咽拭子中分离到的 18 株及尿液中分离到的 5 株风疹病毒经一步法扩增常规靶序列,21 株检测到 1 107 bp 处有一明显特异性条带,见图 1。测序成功 9 株,对成功测序的 9 株风疹病毒 E1 基因 739 个核苷酸片段进行核苷酸序列测定和鉴定,西安地区 2013 年分离到的风疹毒株其基因序列高度同源,Blast 结果显示这 9 株风疹毒株均属 1E 基因型。对分离到的 9 株毒株与 WHO 风疹病毒 13 个基因型的 32 株参考株相对应的核苷酸片段进行基因序列分析,构建基因亲缘关系树,9 株分离株成一聚类,与近年来分离自我国各地的风疹病毒及 1E 基因型原型株成一聚类,见图 2。

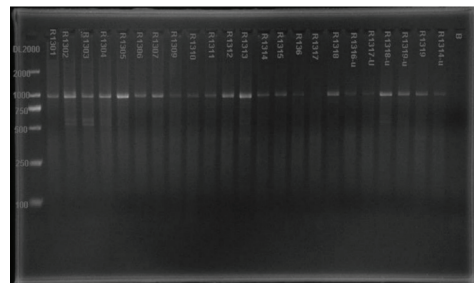


图1 风疹毒株一步法扩增常规序列结果

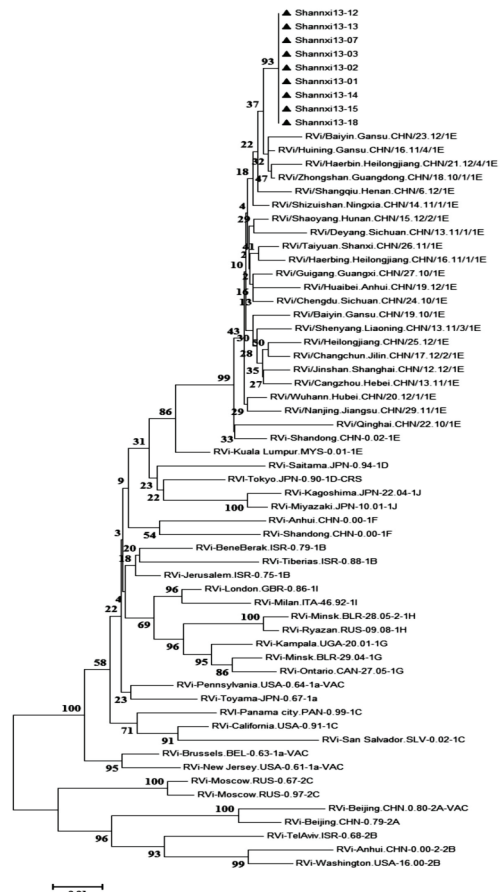


图2 2013年风疹毒株与各基因型参考株构建的基因亲缘关系树

3 讨论 风疹是由风疹病毒引起的急性呼吸道传染病,在中国(未包括香港、澳门特别行政区和台湾地区)目前规定为丙类传染病<sup>[4]</sup>,主要通过空气飞沫传播,其在流行病学特征上与麻疹相似,临床上不易鉴别,风疹的发病增加了麻疹监测和控制工作的难度。作为一种疫苗可预防传染病,接种疫苗是预防控制风疹最有效的措施,我国2008年开始将风疹疫苗纳入扩大国家免疫规划。2008年我国风疹发病主要集中在<15岁人群,而且风疹暴发主要发生在学校<sup>[5]</sup>。据中国疾病预防控制中心网络直报的个案资料显示,2004~2012年西安市共报告风疹5 027例,年平均发病率为7.2/10万,其中2007年和2011年发病率较高,发病率分别为16.58/10万和19.80/10万,低于国内部分地区<sup>[1,6]</sup>。2013年西安市共报告风疹病例228例,发病率为2.67/10万,无死亡病例。其中男性病例137人。实验室诊断病例共有22例,占总病例数的9.65%;临床诊断病例206例(占90.35%)。5岁及以下儿童占总病例的14.91%;6~14岁儿童为主要发病年龄,占55.26%;15岁及以上人群占29.82%。学生为高发人群,占总病例的67.98%;其次为幼托儿童,占8.77%。由于出疹性疾病在临床上较难区别,因此,在消除麻疹的目标基础上,监测风疹的流行状况,有利于掌握西安地区的风疹分子流行病学特征。

风疹病毒分离培养目前较多使用Vero细胞和Vero-SLAM细胞,由于产生的细胞病变不易观察或不产生明显的细胞病变效应,传代后还需依赖病毒核酸检测来确证。本文对2013年风疹暴发疫情中采集到的27份咽拭子标本及6份尿液标本,经实时定量PCR方法检测25份咽拭子和6份尿液标本为RUV RNA阳性。利用Vero-SLAM细胞分离毒株,经鉴定,共从咽拭子标本中分离到18株病毒株,从尿液中分离到5株病毒株,毒株分离率较高。由于采集到尿液标本同时还采集同一病例的咽拭子标本,故而测序标本全部为咽拭子标本中分离到的毒株。

风疹病毒的分子流行病学研究实现风疹控制和消除工作的基础性工作之一。中国流行的风疹病毒基因随年代发生更替,1999年许文波等<sup>[7]</sup>开展了我国的风疹分子流行病学研究,初步建立了风疹病毒毒株库和基因数据库,文献表明1979~2007年间我国风疹病毒可能发生了基因型的更替,这种现象在其他国家的研究中也有发现。中国内陆风疹病毒以1E型为主要流行株,关于全国其他地区风疹病毒的分子流行病学数据已经有很多报道<sup>[2,8,9]</sup>。2013年,对西安地区风疹病毒分子流

行病学监测,以期补充风疹病毒的基因数据库。此次为首次从分离到的风疹病毒中获得西安地区风疹的分子流行病学数据,这对于我们了解病毒来源追踪病毒的传播途径起到重要作用。通过基因亲缘关系分析,西安地区此次分离到19株风疹病毒,对其中9株进行基因测序,全部属于1E型基因型,没有发现其他基因型,且这9株病毒基因序列高度相似。这9株病毒与甘肃、黑龙江、湖南、河南等地的毒株相似度较高,与宁夏石嘴山的病毒序列相似度99.4%。提示西安地区风疹病毒仍属本土病例,尚未发现有输入性的或其他基因型的病毒。

#### 参考文献:

- [1] 刘继锋,相晓妹,马超锋,等. 2004~2012年西安市风疹流行病学分析[J]. 现代预防医学, 2015, 42(2): 208-210.  
Liu JF, Xiang XM, Ma CF, et al. Analysis of the epidemiological characteristics of rubella in Xi'an city from 2004~2012[J]. Modern Preventive Medicine, 2015, 42(2): 208-210.
- [2] Wang Y, Ma Y, Xu XT, et al. Genetic characterization analysis on epidemic rubella virus strains isolated in Liaoning from 2007 to 2012[J]. Bing Du Xue Bao, 2013, 29(6): 589-595.
- [3] 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.
- [4] 朱 贞, 郭学斌, 崔爱利, 等. 中国2007~2008年风疹流行病学和病毒基因特征分析[J]. 中国疫苗和免疫, 2009, 15(3): 201-204.  
Zhu Z, Guo XB, Cui AL, et al. Analysis of epidemiological and genetic characteristics of rubella viruses in china from 2007 to 2008[J]. Chinese Journal of Vaccines and Immunization, 2009, 15(3): 201-204.
- [5] 马 静, 罗会明, 郝利新, 等. 中国2005~2011年风疹流行病学特征分析[J]. 中国疫苗和免疫, 2012, 18(6): 500-503, 540.  
Ma J, Luo HM, Hao LX, et al. Analysis on epidemiological characteristics of rubella in China during 2005~2011[J]. Chinese Journal of Vaccines and Immunization, 2012, 18(6): 500-503, 540.
- [6] 马玉杰, 薄 芳, 黄 鹤, 等. 黑龙江省消除麻疹阶段风疹流行特征分析[J]. 中国公共卫生管理, 2015, 31(1): 71-73.  
Ma YJ, Bo F, Huang H, et al. Analysis of characteristics of rubella epidemic in measles elimination phase, in Heilongjiang province[J]. China Journal Public Health Management, 2015, 31(1): 71-73.
- [7] 朱 贞, 许文波, 蒋小泓, 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.  
Zhu Z, Xu WB, Jiang XH, et al. Genetic characterization of Chinese rubella virus isolates from 2003~2007[J]. Chinese Journal of Virology, 2008, 24(1): 7-16.
- [8] Chen M, Zhu Z, Liu D, et al. Rubella epidemic caused by genotype 1E rubella viruses in Beijing, China, in 2007~2011[J]. Virol J, 2013(10): 122.
- [9] 杜 慧, 郭 玉, 赵 娜, 等. 河北省风疹病毒的分离鉴定及基因型分析[J]. 河北医药, 2012, 34(21): 3315-3316.  
Du H, Guo Y, Zhao N, et al. Rubella virus isolation and identification of genotype analysis in hebei province[J]. Hebei Medical Journal, 2012, 34(21): 3315-3316.

收稿日期: 2015-06-26

修回日期: 2015-07-08