

水痘 - 带状疱疹病毒基因特征分析

李崇山¹, 鲁礼瑞², 陆菁¹, 翁康生¹, 汤素文¹, 丁晓光¹, 刘敏勇¹, 李云逸¹, 胡家瑜¹

摘要: **目的** 对引起上海市某小学水痘暴发的水痘 - 带状疱疹病毒进行基因特征分析。**方法** 对采集到的患者疱疹液用 MRC-5 细胞进行病毒分离,用水痘 - 带状疱疹病毒标准血清鉴定病毒分离株,并通过聚合酶链反应 - 限制性片段长度多态性分析 (PCR-RFLP) 和序列测定对分离到的病毒进行基因特征分析。**结果** 从采集的 5 份疱疹液标本中均分离到导致细胞病变的病毒,经水痘 - 带状疱疹病毒标准血清中和鉴定,证实为水痘 - 带状疱疹病毒;对分离病毒的 ORF22、38、54、62、68 等不同区段进行 PCR-RFLP 或序列测定结果显示:所有分离到的水痘 - 带状疱疹病毒均为 J 基因型野毒株 (Bgl I 阳性, Pst I 阳性, Sma I 阳性);糖蛋白 E 中 3B3 抗原决定簇的第 150 位氨基酸未发现类似北美 VZV-MSP 株或 VZV-BC 株的碱基突变。**结论** 此次水痘暴发是由 J 基因型水痘 - 带状疱疹病毒野毒引起。有 41.1% 的患者曾经接种过水痘疫苗,初免失败或者抗体水平下降可能是造成水痘突破的原因。因此有必要对病毒基因特征及水痘疫苗免疫策略进行进一步的研究。

关键词: 水痘 - 带状疱疹病毒; 暴发; 免疫策略; J 基因型

中图分类号: R511.5

文献标识码: A

文章编号: 1003 - 9961 (2009) 03 - 0168 - 04

Gene characteristics of varicella-zoster virus Li Chong-shan*, LU Li-rui, LU Jing, WENG Kang-sheng, TANG Su-wen, DING Xiao-guang, LIU Min-yong, LI Yun-yi, HU Jia-yu. * Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China

Corresponding author: HU Jia-yu, Email: jyhu@scdc.sh.cn

Abstract: **Objective** To analyze the gene characteristics of varicella-zoster virus (VZV) that caused an outbreak of chicken-pox in a primary school in Shanghai in 2007. **Methods** The virus was isolated in vesicular fluid collected from 5 patients by using MRC-5 cells and identified by standard serum for VZV. PCR-RFLP and nucleotide sequencing were performed to characterize the gene of isolated virus. **Results** The virus that can cause cytopathic effect (CPE) of MRC-5 cells was isolated from 5 vesicular fluid samples and identified as VZV by the neutralization test with standard serum for VZV. PCR-RFLP and sequencing performed on fragment ORF22, 38, 54, 62 and 68 of VZV genome showed that all the isolated VZV were wild strains of genotype J (Bgl I +, Pst I +, Sma I +). VZV-MSP or VZV-BC-like genetic mutation in antigenic determinant 3B3 of glycoprotein E was not found in these VZV isolates. **Conclusion** This outbreak of chicken-pox was caused by wild strain of VZV (genotype J). Among the patients, 41.1% had received varicella vaccine. Failure of initial immunization or decrease of antibody level might account for this chicken-pox outbreak. So it is necessary to conduct further study on the gene characteristics of VZV and varicella vaccine vaccination strategy.

Key words: varicella-zoster virus; outbreak; immunization strategy; genotype J

水痘 - 带状疱疹病毒 (Varicella-zoster virus, VZV) 属于疱疹病毒科 (Herpesviridae) α 亚科, 目前被正式命名为人疱疹病毒 3 型 (human herpesvirus 3, HHV-3)。水痘 - 带状疱疹病毒是水痘和带状疱疹的病原体。水痘是儿童期常见的疾病之一, 传染性强, 在出疹性疾病中水痘的传染性仅次于麻疹, 多见于 10 岁以下儿童。典型的临床表现是发热及水疱样皮肤损害, 重症者可并发肺炎及神经系统病

变^[1]。原发感染后病毒在体内持续存在以及多年后病毒复活引起带状疱疹是该病毒重要的生物学特性。减毒活疫苗 Oka 能为大部分接种者提供有效的保护, 1995 年该疫苗在美国注册、被推荐使用, 上海自 1996 年开始推广使用水痘疫苗。2007 年 10 月在上海某小学内发生水痘暴发, 其中 41.1% 的患者在出生后 3 ~ 4 年内曾经注射过国产或者进口水痘疫苗。为了对其进行进一步的研究分析, 对部分病例采集疱疹液进行病毒分离, 并对分离到的病毒进行基因特征分析。

1 材料与方法

1.1 病例来源 病例来自国家疾病报告管理系统、学校卫生老师向疾病预防控制中心的报告。

作者单位: 1. 上海市疾病预防控制中心, 上海 200336; 2. 上海市技术交易所

作者简介: 李崇山, 男, 山东省青岛市人, 硕士研究生, 主要从事肠道病毒和疫苗可预防疾病的预防与控制工作

通信作者: 胡家瑜, Tel: 021 - 62758710, Email: jyhu@scdc.sh.cn

收稿日期: 2008 - 11 - 26

1.2 实验室检测

1.2.1 标本采集 暴发点标本均采集于临床诊断为水痘的患者,用无菌注射器采集患者水疱液,每位患者至少采集 5~10 个水疱的水疱液,采集到的水疱液放 0.5 ml 水痘保存液中, -80 °C 冻存。

1.2.2 病毒分离与鉴定

1.2.2.1 病毒分离 取 200 μ l 疱疹液标本,接种到长满 75%~90% 单层的 MRC-5 细胞上(上海生物制品研究所提供),同时设立细胞阴性对照,5% CO₂ 培养箱中 36 °C 培养,每天观察并记录细胞病变(cytopathic effects, CPE), CPE 达到细胞单层的 +++~++++ 时收获、冻存病毒(-80 °C 保存),收获的病毒继续扩增一代用于病毒滴定鉴定。如无 CPE,则在第 7 天收获培养液,盲传 2 代,仍为阴性者弃去。

1.2.2.2 Oka 疫苗株阳性对照病毒 葛兰素史克减毒活疫苗(Varilrix, Lot: XVARB116AA),按照疫苗使用说明书,取 0.5 ml 稀释液溶解疫苗,然后取 200 μ l 接种于长满单层的 MRC-5 细胞, CPE 达到 +++~++++ 时收获冻存病毒。

1.2.2.3 病毒鉴定 对分离株病毒的病毒悬液 1:10 稀释,取 300 μ l 病毒稀释液与等体积水痘 Oka 株多克隆抗体 37 °C 中和 1 h,同时取 300 μ l 病毒稀释液与等体积分含 4% 小牛血清维持液 37 °C 预混 1 h。取 200 μ l 中和或预混后的液体接种到长满单层的 MRC-5 细胞上,在 5% CO₂ 培养箱吸附 90 min 后加含 2% 小牛血清维持液连续观察 8 d,用亚甲基蓝染料对空斑染色后读取空斑数。Oka 疫苗株阳性对照做同样处理,同时设立细胞阴性对照。中和指数 = 中和病毒滴度(PFU/ml)/未中和病毒滴度(PFU/ml)。

1.2.3 PCR-RFLP 按照说明书操作,使用 QIAGEN 试剂提取病毒核酸(QIAGEN, Hilden, Germany);使

用水痘-带状疱疹病毒特异性引物扩增病毒不同基因片段,并对扩增产物进行限制性酶切分析^[2],引物序列及所用的限制性内切酶见表 1。聚合酶链反应(PCR)均采用 50 μ l 反应体系:Go Tag Green Master Mix 25 μ l (Promega, Madison, WI, USA),上下游引物各 1 μ l, DNA 模板 2 μ l, 去离子水 21 μ l。反应条件为:96 °C 预变性 15 min, 94 °C 变性 1 min, 50 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 32 个循环,最后 72 °C 延伸 7 min。(ABI9700 PCR 仪,美国)。实验设立试剂空白对照,取 5 μ l PCR 产物用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳分析结果。取 20 μ l 的 PCR 产物分别与 20 U 的 Sma I、Bgl I 或者 Pst I (Promega, Madison, WI, USA) 进行限制性酶切分析, 37 °C (Bgl I 和 Pst I) 或 25 °C (Sma I) 过夜,加入 2 倍体积的无水乙醇使酶切产物沉淀,用 10 μ l TE 缓冲液重悬沉淀,5%~20% 的梯度 PAGE 胶电泳(150 V, 80 min)。使用 phiX174 DNA/Hinfl Dephosphorylated Markers 作为分子大小指示剂(Promega, Madison, WI, USA)。

1.2.4 序列测定和分析 对 p22R1f/p22R1r 和 ORF68F/ORF68R1 引物对扩增产物进行序列测定(由上海基康生物技术有限公司完成)。序列校正整理使用 Sequencher 软件(Version 4.0.5)。

2 结果

2.1 流行病学特征 此次水痘暴发发生于上海市某民办小学,涉及 3~5 年级共 20 个班。首例患者出现于 2007 年 10 月 29 日,末例发生于 2007 年 12 月 27 日。首发病例出现一周后出现发病高峰(11 月 7~15 日),此时恰逢学校运动会彩排,共发生病例 43 例。本次暴发共报告病例 73 例,所有病例年龄中位数为 9.7 岁(8.1~10.8 岁),男、女生性别比为 1:1。

2.2 病毒分离和鉴定 采集的 5 份疱疹液在接种

表 1 引物序列及限制性内切酶
Table 1 Primer sequences and restriction endonuclease

编号	名称	序列 (5'~3')	扩增区域	扩增产物长度 (bp)	限制性内切酶
1	PKVL6U	TTC CCA CCG CGG CAC AAA CA	ORF62	268	Sma I
	PKVL1L	GGT TGC TGG TGT TGG ACG CG			
2	Nla	GGA ACC CCT GCA CCA TTA AA	ORF54	222	Bgl I
	Fok	TCC CTT CAT GCC CGT TAC AT			
3	Pst A	TTG AAC AAT CAC GAA CCG TT	ORF38	350	Pst I
	Pst B	CGG GTG AAC CGT ATT CTG AG			
4	p22R1f	GGG TTT TGT ATG AGC GTT GG	ORF22	546	/
	p22R1r	CCC CCG AGG TTC GTA ATA TC			
5 ⁽¹⁾	ORF68F	AGA ACG CAC ACG AAC ACC AT	ORF68	498	/
	ORF68R1	TCC GCT TCC TTC TTA CCT TG			

注: (1): Designed by author

MRC-5 细胞后,其中 4 份标本在接种第 1 代 2~3 天后出现典型规律病变(CPE),感染细胞融合形成多核巨细胞,在第 5 天 CPE 达到 ++~+++ 后收获,接种第 2 代的第 1~3 天出现 +++~++++ 的细胞病变后收获用于鉴定;另一份标本接种第 1 代为阴性,接种第 2 代的第 2 天出现典型 CPE。选择其中的 3 株病毒用水痘-带状疱疹病毒 Oka 株多克隆抗体进行鉴定,均为水痘-带状疱疹病毒,见表 2。

表 2 病毒鉴定结果
Table 2 Result of isolates identification

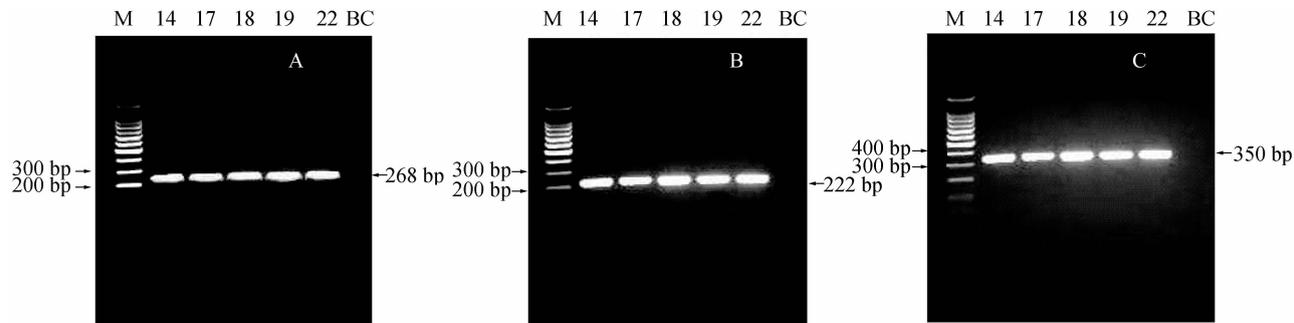
标本编号	中和病毒滴度 (PFU/ml)	未中和病毒滴度 (PFU/ml)	中和指数
14	300	1200	0.25
18	200	1200	0.17
19	1900	2800	0.67
Vaccine strain	1800	2800	0.64

注:3 份标本中和指数均 ≤ 2.0,可以证明分离到的病毒株为水痘-带状疱疹病毒

Note: Virus isolates were VZV while the neutralization index is smaller than 2.0.

2.3 PCR-RFLP 琼脂糖电泳图片显示(图 1), PKVL6U/PKVL1L、Nla/Fok 和 PstA/PstB 引物对均获得单一的特有的目的条带。5%~20% 的梯度 PAGE 电泳结果显示(图 2):PKVL6U/PKVL1L 引物对的扩增产物被限制性内切酶 Sma I 切割成 3 部分(153 bp、79 bp、36 bp),也就是说只有 2 个 Sma I 酶切位点;Bgl I 和 Pst I 将 PCR 扩增产物分别切割成 2 部分(137 bp、85 bp 和 250 bp、100 bp)。因此,所有病毒分离株均为水痘-带状疱疹病毒野毒株,且 Bgl I 和 Pst I 酶切结果均为阳性。

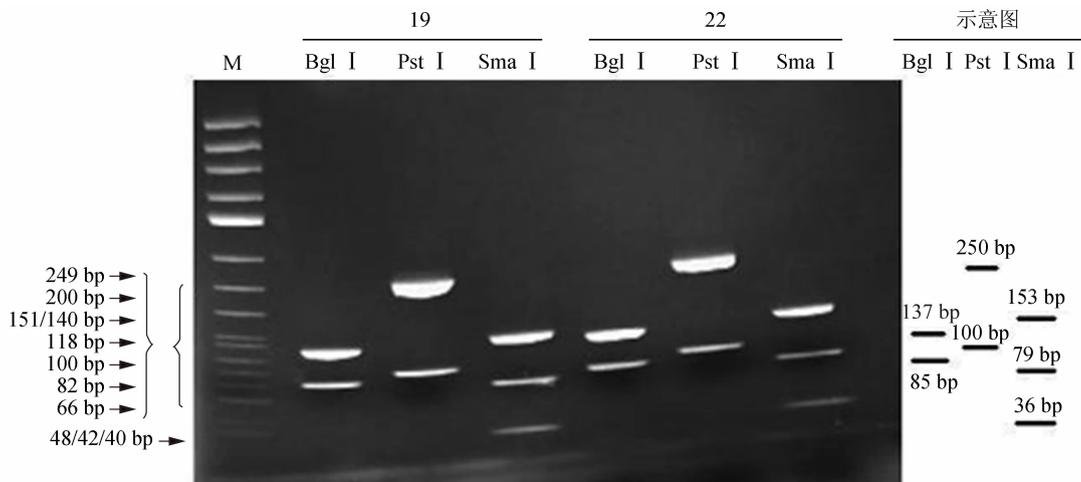
2.4 序列分析 所有分离株的 ORF22 部分区域序列与 Oka 亲本株(GenBank Accession No. AB097933)序列完全一致,属于 J 基因型^[3]。ORF68 部分区域序列与原型株 Dumas 株(GenBank Accession No. X04370)和 Oka 亲本株序列完全一致;糖蛋白 E 中 3B3 抗原决定簇的第 150 位氨基酸未发现类似北美 VZV-MSP 株(GenBank Accession No. AY548170)或 VZV-BC 株(GenBank Accession No. AY548171)的碱基突变。



M 为分子质量标准,100 bp 的 DNA 梯度(Promega, Madison, WI, USA);BC 为空白对照(DNA 模板提取自 MRC-5 细胞对照);其他为标本

图 1 PCR 扩增产物电泳结果

Figure 1 Electrophoretic result of PCR amplification products



M 为分子质量标准(Promega, Madison, WI, USA)

图 2 RFLP 酶切产物 5%~20% 梯度 PAGE 电泳结果

Figure 2 Electrophoretic result of RFLP products with 5% to 20% gradient PAGE gels

3 讨论

过去对 VZV 的鉴定主要是通过限制性酶切的方法,而且需要从坏死组织中培养到 VZV 病毒。Argaw 等^[4]鉴定了 Oka 疫苗株及其母本毒株 ORF62 中的序列变异,并将这些资料作为 PCR-RFLP 方法的基础。Loparev 等^[2]建立了一种新的方法鉴定和区别 VZV 野毒株和减毒疫苗株 Oka,用 Sma I 对 ORF62 扩增产物进行酶切,能够对毒株进行准确鉴定:疫苗株中有 3 个 Sma I 酶切位点,其他毒株中只有 2 个。该方法准确的将 Oka 疫苗株和流行于 6 个洲的 VZV 野毒株区别开来,而且该方法将日本野毒株和疫苗株更好的区别开来。通过对 ORF22 内 447 bp 单一可变的短 DNA 序列进行分析^[3],Loparev 等^[2]鉴定了 VZV 的 3 个主要基因型:与欧洲参考株 Dumas 在 ORF22 几乎完全同源的毒株定义为欧洲 E 基因型;所有的日本分离株定义为日本 J 基因型, J 基因型与 E 基因型偏离最大;其余的毒株兼有 E 和 J 基因型的变异,因此被定义为 M 基因型。M 基因型的毒株中还发现了 2 个主要的型间变异,这表明 M 基因型可能进一步划分成不同的基因型,从中国华南地区 (South China) 临床标本中检测到的 VZV 被鉴定为 M2 基因型。Schmidt-Chanasit 等^[5]对坦桑尼亚水痘-带状疱疹病毒流行株的基因分析证实了 M1 基因型的存在。本次水痘暴发中分离到的水痘-带状疱疹病毒经过限制性酶切分析和序列测定证实为:J 基因型野毒株 (Bgl I 阳性, Pst I 阳性, Sma I 阳性)。但是仅靠此次研究尚不能证实上海市区域内是否存在其他基因型水痘-带状疱疹病毒的流行,有待进一步的研究。本次结果证实,仅靠限制性内切酶 Sma I 对 ORF62 的分析就可以判断水痘分离株是野毒株还是疫苗株,该方法比 ORF54-ORF38 分析方法简单快捷且费用低,通过对 ORF22 的基因分析可以判断病毒分离株的基因型。水痘-带状疱疹病毒基因稳定,本研究中没有发现类似北美株 VZV-MSP 和 VZV-BC 的点突变,该突变可能只是个例或者病毒复制过程中的一个偶然发现。

美国自从 1996 年在 12~18 月龄儿童中开展常规接种以及为所有大于 13 岁的易感者接种以来,水痘疫苗预防了 95% 以上的发病。另外,美国耶鲁医学院曾经报告,水痘疫苗的效果在接种 1 年后显著降低,水痘疫苗接种后第 1 年的有效率为 97%,而

在接种后第 2~8 年,有效率仅为 84%^[6]。

最近的一些研究表明,与大年龄免疫接种比较, <15 月龄儿童的免疫接种可能与水痘的发生率增高有关,这个观点仍有待证实^[7]。有报道,在接种年龄 ≥15 月龄的儿童中,接种后第 1 年内的有效率为 99%,显著高于 15 月龄以下的幼儿 (73%),但接种年龄并不影响接种 1 年以后的效果^[6]。健康青少年与成人接种后抗体与细胞免疫应答不如健康儿童强,而与免疫抑制的白血病儿童相仿。本次水痘暴发中,病例中有既往水痘疫苗接种史者占 41.1% (30/73),除一名患者是在 4 岁 6 个月时接种外,其余患者接种疫苗在 19~30 月龄。初免失败或抗体水平下降可能是接种者再次感染的原因。

1~3 岁儿童是水痘-带状疱疹病毒最为易感的人群; <15 月龄幼儿接种效率较低;水痘疫苗的作用已经被证实,但是接种一年以后免疫水平显著下降。考虑到上述 3 个因素,笔者建议学龄前儿童有必要进行 2 剂次接种:除在 2~3 岁进行第一次免疫接种外,还应该在接种后 6~10 周进行第二次接种,以加强免疫效果。

参考文献

- [1] Bonhoeffer J, Baer G, Muchleisen B, et al. Prospective surveillance of hospitalisations associated with varicella-zoster virus infections in children and adolescents [J]. *Eur J Pediatr*, 2005, 164:366-370.
- [2] Loparev VN, Argaw T, Krause PR, et al. Improved identification and differentiation of varicella-zoster virus (VZV) wild-type strains and an attenuated varicella vaccine strain using a VZV open reading frame 62-based PCR [J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38: 3156-3160.
- [3] Loparev VN, Gonzalez A, Deleon-Carnes M, et al. Global identification of three major genotypes of varicella-zoster virus: longitudinal clustering and strategies for genotyping [J]. *J Virol*, 2004, 78:8349-8358.
- [4] Argaw T, Cohen JI, Klutch M, et al. Nucleotide sequences that distinguish Oka vaccine from parental Oka and other varicella-zoster virus isolates [J]. *J Infect Dis*, 2000, 181:1153-1157.
- [5] Schmidt-Chanasit J, Olschlager S, Gunther S, et al. Molecular analysis of varicella-zoster virus strains circulating in Tanzania demonstrating the presence of genotype M1 [J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46:3530-3533.
- [6] Vazquez M, LaRussa PS, Gershon AA, et al. Effectiveness over time of varicella vaccine [J]. *Jama*, 2004, 291:851-855.
- [7] Galil K, Fair E, Mountcastle N, et al. Younger age at vaccination may increase risk of varicella vaccine failure [J]. *J Infect Dis*, 2002, 186:102-105.