

中山市 6 例疑似麻疹疫苗相关病例病原学特征分析

谢颖, 高赛珍, 欧慧, 王翠玲, 吴衍恒, 林金思

广东省中山市疾病预防控制中心, 广东 中山 528403

摘要: **目的** 分析中山市 6 例疑似麻疹疫苗相关病例的病原学特征。 **方法** 采集中山市 2014–2015 年 6 例疑似麻疹疫苗相关病例咽拭子样本并提取核酸, 采用巢式 PCR 法扩增麻疹病毒核蛋白(N)基因羧基末端 450 个核苷酸片段并测序, 分析其与世界卫生组织(WHO)参考株、麻疹病毒中国疫苗株沪₁₉₁(Shanghai₁₉₁, S₁₉₁)基因的亲缘关系、核苷酸与氨基酸序列相似度。 **结果** 6 份样本中, 2 份未检出核酸, 4 份检出核酸, 序列比对结果示 3 株病毒核苷酸、氨基酸序列相似度均为 100%, 与 S₁₉₁ 株相比, 核苷酸序列和氨基酸序列相似度也为 100%, 属于 A 基因型; 1 株病毒与 Chin9322-H_{1a} 株相比, 核苷酸序列相似度为 97.7%, 氨基酸序列相似度为 96.6%, 为 H_{1a} 基因型。 **结论** 3 例病例为疫苗株感染, 1 例为野毒株感染。

关键词: 巢式 PCR; 麻疹; 病原学; 麻疹疫苗相关病例

中图分类号: R186 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006–3110(2019)04–0437–04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006–3110.2019.04.014

Etiological characteristics of 6 suspected cases of vaccine-associated measles in Zhongshan City

XIE Ying, GAO Sai-zhen, OU Hui, WANG Cui-ling, WU Yan-heng, LIN Jin-si

Zhongshan Municipal Center for Disease Control and Prevention, Zhongshan, Guangdong 528403, China

Abstract: **Objective** To analyze the etiological features of 6 cases of suspected vaccine-associated measles in Zhongshan City.

Methods Nucleic acids were extracted from throat swabs of 6 cases of suspected vaccine-associated measles in Zhongshan City from 2014 to 2015. 450 nucleotide sequences of the C-terminus of measles virus nucleoprotein (N) genes were amplified from the isolates using nested-polymerase chain reaction. Then the genetic relationship, homology of nucleotides, amino acids and amino acid sites of N gene among the deduced sequences, World Health Organization (WHO) reference strains and measles virus vaccine strains in China Shanghai₁₉₁ (S₁₉₁) were analyzed. **Results** Among the 6 detected samples, 2 samples were negative in 450 nucleic acids. 4 samples were detected positive by RT-PCR, and sequence comparison showed that the identities of the nucleotide and the amino acid sequences among 3 viral strains were both 100%, and the homologies of nucleotide and amino acid sequences were both 100% as compared with S₁₉₁ strain. The 3 viral strains and S₁₉₁ strain both belonged to genotype A. Among the detected strains, one belonged to genotype H_{1a}, and showed 97.7% and 96.6% identity respectively at nucleotide and amino acid sequence levels as compared with Chin9322-H_{1a} strain. **Conclusions** Three cases were infected by the measles virus vaccine strain and one was infected with the wild strain.

Key words: nested-polymerase chain reaction; measles; etiology; measles vaccine-related case

基金项目: 中山市科技局医学科科研立项课题(20113A100)

作者简介: 谢颖(1983–), 男, 广东梅州人, 本科学历, 主管技师, 主要从事卫生微生物检验和相关研究工作。

因素, 应倡导居民合理进行身体行为活动, 适当减少睡眠时间, 提高生活质量^[4]。因此职业人群持续健走运动, 是有效的慢性病防控措施。

参考文献

- [1] Bauman A, Bull F, Chey T, et al. The International Prevalence Study on Physical Activity: results from 20 countries[J]. Intph J Behav Nutr, 2009, 6(1): 21–32.
- [2] 颜兴伟, 杨玉金, 付俊杰, 等. “健步走”对职业人群身体健康指标干预效果研究[J]. 中华疾病控制杂志, 2017, 21(5): 534–536.
- [3] 谢文娟, 卞晓嘉, 何志敏, 等. 身体行为活动与血脂异常、高血压、糖尿病关系的研究[J]. 实用预防医学, 2017, 24(3): 319–323.
- [4] 苏健, 向全永, 吕淑荣, 等. 成年人身体指数、腰围与高血压、糖尿病、血脂异常的关系[J]. 中华疾病控制杂志, 2015, 19(7): 696–700.

- [5] 刘敏, 刘昊, 张庆军, 等. 湖北省企业慢性病高风险人群体质指数及腰围与血压的关系[J]. 中国慢性病预防与控制, 2016, 24(9): 641–644.
- [6] 颜兴伟, 杨玉金, 付俊杰, 等. 江西省城乡中老年糖尿病患者营养状况及危险因素分析[J]. 实用预防医学, 2018, 25(7): 784–787.
- [7] 罗曦娟. 长期坚持太极拳锻炼和饮食调整对中老年人体成分的影响[J]. 安徽体育科技, 2011, 32(3): 45–51.
- [8] Chomistek AK, Cook NR, Flint AJ, et al. Vigorous-intensity leisure-time physical activity and risk of major chronic disease in men[J]. Med Sci Sports Exerc, 2012, 44(10): 1898–1905.
- [9] 夏莉娟, 张琳, 罗慧琴, 等. 健步走对老年高血压患者血糖、血脂的干预作用[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(21): 5233–5235.
- [10] 陆璐, 金长清, 胡华青. 静坐行为与青年职业人群睡眠质量的关系研究[J]. 健康教育与健康促进, 2016, 11(5): 321–323.

收稿日期: 2018–06–19

麻疹减毒活疫苗(live attenuated measles vaccine, MV)虽已证明是高免疫性、安全有效的疫苗,但接种麻疹减毒活疫苗后,约 2% 的受种者会出现麻疹样皮疹^[1]。这些少数个体因接种 MV 出现的麻疹样临床反应,与麻疹野病毒引起的不典型麻疹病例在临床上难以区分。而且,随着消除麻疹进程的推进,麻疹野毒株感染病例将越来越少,因此正确鉴别接种麻疹类疫苗后出现的麻疹样症状是由麻疹疫苗引起的接种后反应,还是由麻疹野病毒引起的病例就显得非常重要。麻疹病毒仅有一个血清型^[2-4],因此无法用血清学进行鉴别,采用分子生物学方法是主要鉴别手段之一。麻疹病毒核苷酸变异主要发生在核蛋白(nucleoprotein, N)基因和血凝素蛋白(hemagglutinin, HA)基因,因此可通过麻疹病毒的 HA 全长编码序列或 N 基因的碳末端 450 个核苷酸序列来进行基因定型^[5,13]。中山市自实施国家免疫规划特别是 2009 年实施麻疹疫苗强化接种,麻疹发病率呈持续下降趋势。2014 年、2015 年中山市共报告 285 例麻疹实验室确诊病例,其中报告了 6 例麻疹病例在发病之前接种了含麻疹成分的麻疹类疫苗。本文应用分子生物学方法对这 6 例接种了麻疹类疫苗后出现麻疹样症状的病例病原学特征进行了分析。现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 标本采集与处理 由中山市各镇医院对临床疑似麻疹病例直接采集鼻咽拭子标本,带冰运送至实验室,放入-70℃超低温冰箱保存,按照 WHO 推荐的麻疹疫苗相关病例的筛选标准,经流行病学调查,筛选出发病之前 3 周内接种过麻疹疫苗的标本,进行 RT-PCR 检测。采集出疹 5 d 内的鼻咽拭子标本,将棉拭子放入无菌试管中,试管内放 2 ml 5% 牛血清的 MEM 维持液(pH7.0)。

1.2 分子生物学检测方法

1.2.1 核糖核酸(RNA)提取 用磁珠法提取麻疹病毒悬液中的麻疹病毒 RNA,采用美国 Promega 公司 Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit (Promega, USA) 试剂,具体操作方法参照试剂盒说明书。

1.2.2 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR) 使用 TaKaRa 公司的 PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver. 2 (Dye Plus) 试剂盒进行 RT-PCR 反应,扩增核蛋白(nucleoprotein, N)基因羧基末端的 450 个核苷酸序列。引物 216:5'-TGG AGC TAT GCC ATG GGA GT-3'(1 104~1 123 bp),引物 MV214:5'-TAA CAA TGA

TGG AGG GTA GG-3'(1 737~1 718 bp)。RT-PCR 反应条件:50℃ 30 min、95℃ 2 min;94℃ 30 s、55℃ 30 s、72℃ 1 min,35 个循环扩增;72℃ 延伸 10 min,4℃ 保存。

1.2.3 巢式 PCR 使用 Qiagen 公司的 Hot PCR Kit 试剂对 RT-PCR 产物二次扩增。引物 MN60:5'-GCT ATG CCA TGG GAG TAG GAG TGG-3'(1 109~1 132 bp);引物 MN63:5'-CCT CGG CCT CTC GCA CCT AGT-3'(1 765~1 785 bp)。以第一次的 RT-PCR 的产物作为模版。普通 PCR 反应条件:98℃ 10 s、55℃ 30 s、72℃ 1 min,30 个循环;72℃ 延伸 10 min;4℃ 保存。扩增后的产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,在 450 bp 出现条带者为阳性结果。

1.2.4 序列测定 巢式 PCR 产物送广州艾基生物公司完成序列测定。

1.2.5 使用 MEGA 5.1 和 BioEdit 软件对测定所得序列和麻疹病毒 A-H 型 24 株参考株、麻疹病毒中国疫苗株沪₁₉₁(S₁₉₁)N 基因 450 bp 进行相似度和基因亲缘关系分析。

2 结果

2.1 流行病学资料 6 例疑似麻疹疫苗相关病例发病前均在不同预防接种门诊进行麻疹类疫苗接种,接种疫苗种类均为麻疹风疹联合疫苗,均为初次接种,发病出现在接种疫苗后的 7~15 d。咽拭子样本采集离发热时间间隔 2~6 d,离出疹 0~6 d(有一例出疹当天采集咽拭子样本)。见表 1。

表 1 疑似麻疹疫苗相关病例部分流行病学与检测结果资料

病例 编号	病毒株 编号	年龄 (月)	发病距 接种天数	样本采集距		RT-PCR 结果
				发热天数	出疹天数	
病例 1	MV-201505	9	7	4	4	+
病例 2	MV-201503	10	7	5	4	+
病例 3	MV-201509	9	8	3	0	-
病例 4	MV-201405	9	8	2	1	+
病例 5	MV-201404	9	12	6	6	-
病例 6	MV-201406	17	15	6	3	+

2.2 巢式 PCR 结果 4 株病毒巢式 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,在 450 bp 处有一明显阳性带,见图 1。



注:marker:DL-2000 DNA Marker;1: MV-201505;2: MV-201503;3: MV-201405;4: MV-201406。

图 1 麻疹疫苗疑似病例病毒 N 基因巢式 PCR 产物电泳图

2.3 基因亲缘性关系分析 从 6 例疑似麻疹疫苗相关病例的 6 份鼻咽拭子中,4 份麻疹病毒核酸阳性。利用 MEGA 5.1 软件对分离的 4 株麻疹病毒 N 基因羧基末端 450 个核苷酸序列,与 24 株已知基因型的 WHO 参考株 以及 S₁₉₁ 株的对应序列做基因亲缘性关系分析,根据 Neighbor-Joining 方法(N-J 法)构建麻疹病毒 N 基因核苷酸种系进化树,见图 2。结果显示,3 株与 S₁₉₁ 株同属一个分支,为 A 基因型,bootstrap 值为 100%;1 株与 China9322-H_{1a} 株相距较近,为 H_{1a} 基因型,bootstrap 值为 93%。

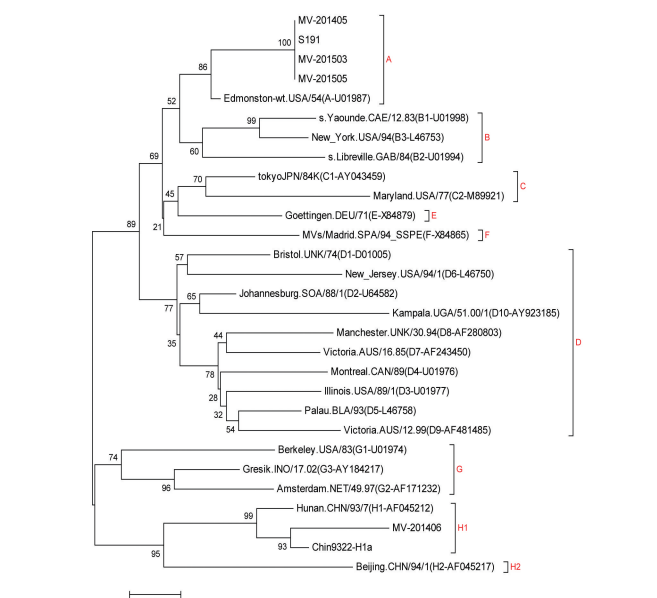


图 2 基于麻疹病毒 N 基因 C 末端 450 bp 序列构建的种系进化树(N-J 法)

2.4 核苷酸及氨基酸序列相似度分析 将 4 株疑似麻疹疫苗相关病例病毒株与 Chin9322-H_{1a} 株、S₁₉₁ 株进行核苷酸及氨基酸序列对比,结果显示,疑似麻疹疫苗相关病例病毒株 MV-201505、MV-201503、MV-201405 核苷酸序列的相似度为 100%,氨基酸序列的相似度也为 100%;与 S₁₉₁ 株的核苷酸相似度、氨基酸相似度也为 100%。MV-201406 病毒株与 Chin9322-H_{1a} 株的核苷酸序列相似度为 97.7%,氨基酸序列相似度为 96.6%。见表 2。

表 2 疑似麻疹疫苗相关病例毒株与 Chin9322-H_{1a} 株、S₁₉₁ 株 N 基因的核苷酸和氨基酸序列相似度分析

毒株	MV-201505	MV-201503	MV-201405	S ₁₉₁	Chin9322-H _{1a}	MV-201406
MV-201505		1	1	1	0.924	0.911
MV-201503	1		1	1	0.924	0.911
MV-201405	1	1		1	0.924	0.911
S ₁₉₁	1	1	1		0.924	0.911
Chin9322-H _{1a}	0.9	0.9	0.9	0.9		0.977
MV-201406	0.88	0.88	0.88	0.88	0.966	

注:右上区域为核苷酸相似度比较,左下区域为氨基酸相似度比较。

3 讨论

按照 WHO 推荐的麻疹疫苗相关病例的筛选标准(病例的筛选标准:综合流行病学特征特别是麻疹疫苗接种史、临床、实验室检测结果,发热伴皮疹病例,出疹前 3 周内明确的麻疹疫苗免疫史,发病呈散发,且当地无麻疹和风疹流行,血清麻疹 IgM 为阳性,风疹 IgM 为阴性),本研究中的 6 例病例均应归类于麻疹疫苗相关病例,但是通过对麻疹 N 基因羧基末端 450 个核苷酸基因型别鉴定分析发现病例 6(病毒株 MV-201406)系被 H_{1a} 基因型野病毒感染。这也提示麻疹疫苗相关病例的筛选标准还需要进一步的修改完善。

由于麻疹减毒活疫苗中含有微量的鸡胚细胞、胎牛血清和抗生素等,可能引起个别儿童过敏反应,但大多于接种后十至数十小时内出现皮疹^[6]。本次病例均在接种后 7~19 d 出疹,不符合过敏性皮疹规律。麻疹疫苗作为减毒活疫苗,其免疫学机理类似轻度的人工感染,部分接种者可能出现类似麻疹野病毒感染的轻度症状,重者可出现发热、皮疹等典型麻疹病例的症状和体征。同时,麻疹疫苗在体内繁殖需要一定时间,经过数天的“潜伏期”后才出现临床症状,显然比过敏性皮疹出现的时间要晚。本研究基于麻疹病毒 N 基因 C 末端 450 bp 序列的亲缘关系树显示,病毒株 MV-201505、MV-201503、MV-201405 与 S₁₉₁ 株同属一个分支,为 A 基因型,推测其为麻疹疫苗株病毒;病毒株 MV-201406 与 China9322-H_{1a} 基因型病毒株同属一个分支,为 H_{1a} 基因型。说明病例 1(MV-201505)、病例 2(MV-201503)、病例 4(MV-201405)是被麻疹疫苗株病毒感染,而病例 6(MV-201406)是被 H_{1a} 基因型野病毒感染。同时从核苷酸、氨基酸同源性分析可看出,病毒株 MV-201505、MV-201503、MV-201405 与 S₁₉₁ 株无论是核苷酸还是氨基酸序列相似度都为 100%,提示病毒株 MV-201505、MV-201503、MV-201405 属于 A 基因型,而病毒株 MV-201406 与 Chin9322-H_{1a} 株的核苷酸序列相似度为 97.7%,氨基酸序列相似度为 96.6%,提示其为 H_{1a} 基因型。

目前 S₁₉₁ 麻疹病毒株是我国主要使用的减毒活疫苗株(measles attenuated live vaccine, MV)^[7]。近年来,我国出现已经接种过麻疹疫苗的人群再次出现感染麻疹的现象^[8-9],如北京市丰台区儿童免疫首剂接种使用麻疹风疹联合减毒活疫苗后出现 7 例麻疹疫苗相关病例,后经实验室病原学检测为麻疹疫苗株感染^[10];吉林省梨树县发生 1 例接种麻疹疫苗后感染,经鉴定该病例感染的病毒属于 H_{1a} 基因型麻疹野病毒^[11-12];长沙市 2014 年、2015 年共发现 9 例接种麻疹

湖南省城乡居民常见动物性食品储存和加工方式调查

柳恒卓¹, 刘晓革², 赖天兵², 梁进军², 任国峰¹

1. 中南大学湘雅公共卫生学院, 湖南 长沙 410078; 2. 湖南省疾病预防控制中心, 湖南 长沙 410005

摘要: **目的** 了解湖南省居民动物性食品储存、加工习惯现状, 比较处理习惯对不同食物中微生物卫生状况影响的差异, 探究微生物风险有关行为环节。 **方法** 根据人口及地区生产总值分层随机抽取长沙市、益阳市、衡阳市, 随机抽取城市、乡镇各 12 个居民区共 648 户居民家庭, 2017 年 8-9 月使用自编问卷开展入户调查, 了解家庭及主要烹饪人员人口学信息及 5 种动物性食品(鲜畜肉、鲜禽肉、鲜动物性水产、熟肉制品、鲜蛋)储存、加工及剩菜处理习惯。 **结果** 储存习惯: 24.1% (95% CI: 22.7%~25.5%) 家庭无将食物单独包装存放习惯, 15.8% (95% CI: 13.0%~18.6%) 家庭鲜蛋常温存放常超过 1 周, 鲜蛋经过家庭储存过程后其中细菌含量可能增长约 1 000 倍, 显著高于其他食品的增长倍数 ($P < 0.05$)。加工习惯: 73.0% (95% CI: 69.6%~76.4%) 家庭无生熟食物砧板分开习惯, 52.9% (95% CI: 49.0%~56.8%) 家庭烹饪前无清洗鲜蛋壳习惯, 18.7% (95% CI: 15.6%~21.8%) 家庭熟肉制品、7.0% (95% CI: 5.0%~9.0%) 家庭鲜蛋无彻底加热习惯。剩菜处理习惯: 24.8% (95% CI: 24.0%~25.6%) 有食用剩菜习惯的家庭重新食用前加热不彻底, 且习惯常温保存、再食用超过 1 餐的, 再食用前不彻底加热比例更高 ($P < 0.05$)。 **结论** 湖南省居民动物性食品储存、加工方式存在食品安全隐患, 食品风险管理及宣教中应注意以下环节有关的风险: 鲜蛋存放过久, 熟肉制品食用前再加热程度不足, 剩菜菜肴常温存放、再食用前加热不彻底等。

关键词: 动物性食品; 储存; 加工

中图分类号: R155.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2019)04-0440-06 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2019.04.015

Habits of storing and processing animal products among urban and rural residents in Hunan Province

LIU Heng-zhuo¹, LIU Xiao-ge², LAI Tian-bing², LIANG Jin-jun², REN Guo-feng¹

基金项目: 中南大学-湖南省疾病预防控制中心横向科研基金

作者简介: 柳恒卓 (1991-), 男, 湖南浏阳人, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全风险监测。

通信作者: 任国峰, E-mail: renguofeng@csu.edu.cn; 梁进军, E-mail: 45029523@qq.com。

疫苗后感染, 经鉴定此 9 例感染的病毒同样属于 H_{1a} 基因型麻疹野病毒^[14]。麻疹消除的要求是全国麻疹发病率控制在 1/100 万以下 (不包括输入病例)。在这个情况下, 每一例麻疹病例的正确诊断显得尤为重要, 因此对疑似麻疹相关病例的型别鉴定的方法必须及早建立。随着消除麻疹进程的推进, 由麻疹野病毒引起的麻疹病例会逐渐减少, 而由麻疹疫苗株病毒引起的麻疹相关病例将越来越得到重视。针对麻疹野病毒感染病例和疫苗相关病例是两种完全不同的处理方法, 所以对接种疫苗后出现的麻疹样病例进行早期诊断和型别鉴定显得尤为重要。同时, 科学正确地分析每一例麻疹病例的发病原因, 了解麻疹病毒遗传变异规律, 对疫苗效价的评估也具有指导意义。

志谢: 本文撰写中, 广东省疾病预防控制中心郑焕英老师给予了精心指导, 在此表示诚挚的感谢!

参考文献

- [1] 王真行译, 徐冰审校. WHO 关于麻疹疫苗的意见书[J]. 国外医学预防诊断治疗用生物制品分册, 2005, 28(1): 8-12.
- [2] Westover KM, Hughes AL. Molecular evolution of viral fusion and matrix protein genes and phylogenetic relationships among the paramyxo-

- ridae[J]. Mol Phylogenet Evol, 2001, 21(1): 128-134.
- [3] Ito Y, Tsurudome M, Hishiyama M, et al. Immunological interrelationships among human and non-human paramyxoviruses revealed by immunoprecipitation[J]. J Gen Virol, 1987, 68: 1289-1297.
- [4] 金奇. 麻疹病毒[M]. 医学分子病毒学. 北京: 科学出版社, 2001: 430-449.
- [5] World Health Organization. Global measles and rubella laboratory network-update[J]. Wkly Epidemiol Rec, 2005, 80(44): 384-388.
- [6] 刁连东. 麻疹[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2001: 220-222.
- [7] 马雷钧, 徐闻青, 徐帆洪, 等. 沪₉₉麻疹病毒疫苗株的核蛋白基因分析[J]. 中国计划免疫, 2005, 11(3): 175-180.
- [8] 郝佳玲, 高学军. 接种 MV 所致麻疹 1 例报告[J]. 中国保健营养, 2012, 23(18): 3830.
- [9] 李惠, 张晓曙, 漆可发, 等. 麻疹发病与麻疹疫苗接种的病例对照研究[J]. 中国计划免疫, 2006, 12(1): 29-31.
- [10] 张东彦, 毛雯雯, 王中战, 等. 7 例首剂麻疹风疹联合减毒活疫苗相关麻疹病例分析[J]. 疾病检测, 2012, 27(12): 957-959.
- [11] 张帆, 周剑惠, 陈超, 等. 麻疹减毒活疫苗接种偶合麻疹野病毒感染病例的麻疹病毒基因特征分析[J]. 中国生物制品学杂志, 2012, 25(2): 209-211.
- [12] 赵国涛, 张帆, 周剑惠, 等. 麻疹疫苗株和野毒株病毒鉴别方法应用于接种麻疹减毒活疫苗后的麻疹样病例标本鉴定[J]. 中国疫苗和免疫, 2010, 16(5): 427-429.
- [13] World Health Organization. Update of the nomenclature for describing the genetic characteristics of wild-type measles viruses: new genotypes and reference strains[J]. Wkly Epidemiol Rec, 2003, 78(27): 229-232.
- [14] 叶文, 孙边成, 陈发明, 等. 长沙市 2013-2014 年麻疹野毒株与疫苗株的快速鉴定与分析[J]. 实用预防医学, 2016, 23(7): 789-790, 884.

收稿日期: 2018-05-14