

长沙市 2013–2014 年麻疹野毒株与疫苗株的快速鉴定与分析

叶文, 孙边成, 陈发明, 欧新华, 张如胜, 黄政, 刘晓蕾

湖南省长沙市疾病预防控制中心, 湖南 长沙 410001

摘要: **目的** 了解 2013–2014 年长沙地区是否存在疫苗株感染, 建立实验室快速鉴别麻疹野毒株与疫苗株方法。 **方法** 按照《全国麻疹监测方案》, 采集麻疹疑似病例咽拭子标本, 应用 RT-PCR 方法进行麻疹病毒核酸检测, 再从麻疹病毒核酸阳性病例的咽拭子标本中提取核酸, 采用转录-聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析 (reverse transcription-polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, RT-PCR-RFLP) 方法进行疫苗株和野毒株的快速鉴定和基因序列分析。 **结果** 共采集到 697 份麻疹疑似病例的咽拭子标本, 检出 224 份麻疹病毒核酸阳性, 9 例出现麻疹临床症状的患者有麻疹减毒活疫苗 (measles attenuated live vaccine, MV) 接种史。经 RT-PCR-RFLP 方法鉴定, 均为野毒株感染。测序及序列比对分析结果显示均为 H1a 基因型。 **结论** 2013–2014 年长沙麻疹疑似症状者及 9 例 MV 接种史患者均为野毒株感染。成功建立 RT-PCR-RFLP 方法区别疫苗株与野毒株的感染。

关键词: 麻疹; 野毒株; 疫苗株; RT-PCR-RFLP

中图分类号: R1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2016)07-0789-03 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2016.07.006

Rapid identification and analysis of measles vaccine and wild-type strains in Changsha, 2013–2014

YE Wen, SUN Bian-cheng, CHEN Fa-ming, OU Xin-hua, ZHENG Ru-sheng, HUANG Zheng, LIU Xiao-lei.

Changsha Center for Disease Control and Prevention, Changsha, Hunan 410001, China

Abstract: **Objective** To identify whether there were infections with vaccine strains of measles virus in Changsha in 2013–2014 and to establish laboratory methods to rapidly distinguish wild-type and vaccine strains of measles virus. **Methods** According to National Measles Surveillance Programme, throat swab specimens were collected from suspected measles patients and nucleic acid of measles virus was detected by real-time PCR (RT-PCR). Then, rapid identification and gene sequence analysis of wild-type and vaccine strains of measles virus in positive samples were performed by reverse transcription-polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (RT-PCR-RFLP) after RNA was extracted. **Result** Totally, 224 positive specimens were detected in 697 samples, and 9 patients with measles clinical manifestations had been vaccinated with measles attenuated live vaccines. RT-PCR-RFLP revealed that all of the cases were infected with wild-type measles strains. Genotype sequencing and sequence alignment analysis indicated that the genotypes of the isolates were all H1a. **Conclusions** The suspected measles patients and nine measles patients with immunization of measles attenuated live vaccines in Changsha in 2013–2014 were all infected with wild-type measles virus. Rapid identification of measles vaccine and wild-type strains is established.

Key words: Measles; Wild-type strains; Vaccine strains; RT-PCR-RFLP

麻疹是儿童时期最常见的急性呼吸道传染病, 传染性极强, 在人口密集且未普及疫苗接种的区域易发生流行^[1]。麻疹仍是威胁中国儿童健康和生命的最主要的传染病之一。世界卫生组织 (WHO) 制定: 到 2020 年至少在 5 个 WHO 区域实现消除麻疹和风疹的目标, 世界卫生组织美洲区已于 2000 年实现了消除麻疹目标, 欧洲区、东地中海区和中国所在的西太平洋地区也分别提出在 2007 年、2010 年和 2012 年消除麻疹的目标, 麻疹将成为全球通过免疫手段消灭的第三个传染病。我国自 1986 年开始实施 2 剂次麻疹疫苗接种

种程序, 麻疹发病率因此大幅下降^[2]。目前沪 191 麻疹毒株是我国主要使用的减毒疫苗株 (measles attenuated live vaccine, MV)^[3]。近年来, 有报道指出我国发现已接种麻疹疫苗的人群出现感染麻疹的症状^[4–5], 如吉林省梨树县发生的一例接种麻疹疫苗后感染, 后经鉴定为麻疹野毒株^[4,6]。因此在麻疹消除阶段, 建立 RT-PCR-RFLP 快速鉴别疫苗株与野毒株的方法有助于评估消除阶段的麻疹免疫效果^[7–8]。2013–2014 年长沙市先后出现 9 例 MV 接种史发病患者, 因此实验室有必要建立 RT-PCR-RFLP 的方法对本市麻疹患者进行疫苗株与野毒株的快速鉴别, 以评估是否存在麻疹疫苗株感染的情况, 为长沙市实现控制和消除麻疹的目标提供实验室技术支持。

基金项目: 湖南省医药卫生科研计划项目 (B2014-153)

作者简介: 叶文 (1968–), 女, 湖南长沙人, 本科学历, 副主任医师, 研究方向: 病原学检测与公共卫生。

1 材料与方法

1.1 标本来源与保存 2013-2014 年长沙市各区县采集上送的麻疹疑似病例的咽拭子,咽拭子标本置于 Hank's 液中保存,4℃ 下及时上送至实验室。

1.2 检测方法 咽拭子标本首先进行麻疹病毒核酸检测,麻疹病毒核酸阳性标本再应用 RT-PCR-RFLP 方法进行疫苗株和野毒株的鉴定以及基因型分析。

1.2.1 麻疹病毒核酸检测 咽拭子标本经苏州天隆科技核酸提取试剂盒(磁珠法)提取 RNA,核酸用江苏硕世麻疹/风疹病毒核酸检测试剂盒(荧光探针法)在 ABI 9300 PCR 荧光 PCR 仪上检测。

1.2.2 麻疹野毒株与疫苗株的鉴定^[9] RT-PCR-RFLP 方法,研究所用麻疹病毒引物序列见文献^[7],参照 TaKaRa PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver. 2 (DRR055A)试剂盒说明书进行 One step RT-PCR 扩增(逆转录反应条件:50℃,30 min;94℃,2 min;PCR 扩增反应条件 94℃,30 s;55℃,30 s;72℃,1 min;40 次循环)。反应总体积为 25 μl。扩增片段大小为 438 bp,位于 H 基因 7516bp-7953bp。使用 QuickCut™ Afl II (TaKaRa)酶对 PCR 产物进行酶切(酶切反应体系:10 μl PCR 产物,1 μl Afl II 酶,2 μl Buffer;37℃ 水浴 1 h)。酶切后 2% 凝胶琼脂糖电泳鉴定,麻疹野毒株型在 438 bp 处有阳性带,疫苗株型分别在 287 bp 和 151 bp 处各有阳性带。本研究使用北京天坛、北京民海生物科技有限公司的减毒活疫苗作为疫苗株酶切阳性对照,野毒株阳性对照分别编号为 YD008 和 YD395。

1.3 序列分析 在 Genbank 上下载麻疹疫苗毒株 H 基因序列,利用 DNA Star 7.1 对序列进行同源性分析。Mega Version 6.0 软件采用 N-J 方法绘制进化树。

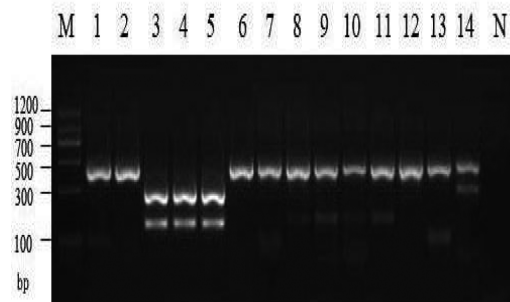
2 结果

2.1 流行病资料分析 2013-2014 年长沙市共收到麻疹疑似病例咽拭子标本 697 份,检出麻疹病毒核酸阳性 224 份,分析该人群麻疹疫苗接种情况有 146 例(65.2%)感染者未接种麻疹疫苗,69 例(30.8%)感染者疫苗接种史不详,其中有 9 例患者有麻疹疫苗株接种史。

2.2 疫苗株与野毒株鉴别 应用 RT-PCR-RFLP 方法对接种 MV 疫苗后发病的阳性病例进行野毒株与疫苗株的鉴定。研究结果见图 1,具有麻疹疫苗接种史的 9 例麻疹病毒核酸阳性标本经 PCR 扩增后均不能被 Afl II 酶切开,初步判断为野毒株型。

2.3 同源性分析与进化树分析 9 例阳性标本核酸扩增 H 基因片段测序后,与 China 93/4(H1a)和疫苗株

S191 进行同源性分析与进化树分析。氨基酸同源性表明该 9 份麻疹毒株与 China 93/4(H1a)的同源性分别在 98.6%~99.5%之间,可以确定麻疹毒株基因型别为 H1a 型。与疫苗株 S191 的同源性在 95.7%~96.6%之间。进化树分析发现与 9 例毒株遗传距离最近为 WHO 代表毒株 China 93/4(H1a),结果见图 2。



注: M: Mark; 1: YD008; 2: YD395; 3: MV 株(北京天坛 201310244-1); 4: MV 株(北京民海生物 20131235-1); 5: MV 株(北京民海生物 20140101-1); 6-14: 9 例接种 MV 株后感染者; N: Negative。(YD: 野毒株)

图 1 RT-PCR-RFLP 鉴定野毒株与疫苗株电泳图

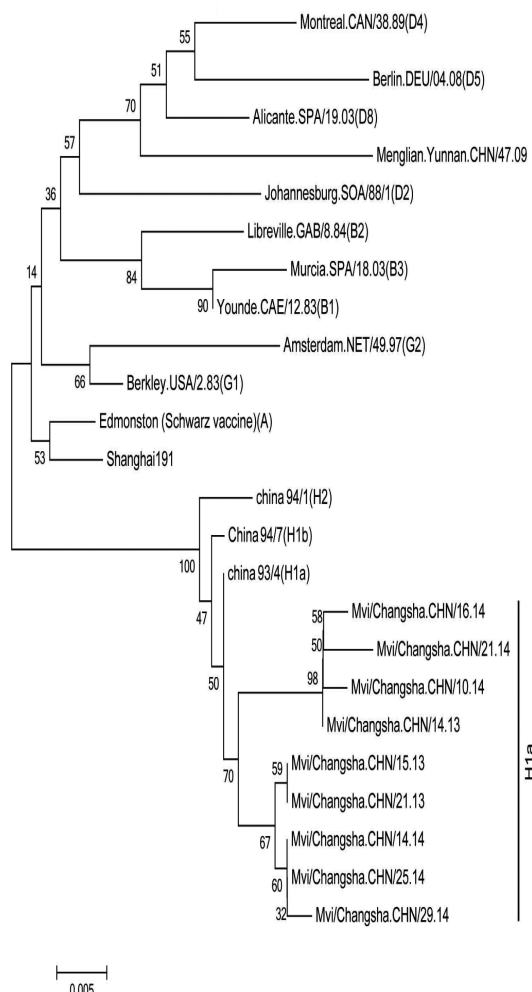


图 2 9 例接种 MV 株后感染麻疹毒株进化树分析

(转 884 页)

3 小 结

本研究建立了多功能柱净化-高效液相色谱柱后光化学衍生-荧光检测法检测食品中的黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2。实验表明,本方法灵敏度高,操作简便,结果准确可靠,安全环保,适于一般实验室对黄曲霉毒素的分析与监测。

参考文献

- [1] 刘立芳. 黄曲霉毒素的检测及其降解方法进展[J]. 中国酿造, 2014, 33(1): 23-26.
- [2] 中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量 GB2761-2011 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [3] 李军, 于一茫, 田苗, 等. 免疫亲和柱净化-柱后光化学衍生-高效

液相色谱法同时检测粮谷中的黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素 A [J]. 色谱, 2006, 24(6): 581-584.

- [4] 张英, 蔡志斌, 郑志伟. 超高效液相色谱法同时测定油炸食品中 4 种黄曲霉毒素[J]. 实用预防医学, 2011, 18(8): 1556-1559.
- [5] 国家质量监督检验检疫总局. 牛奶和奶粉中黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2、M1、M2 的测定 液相色谱-荧光检测法 GB/T 23212-2008 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [6] 王新丽, 张玉黔. HPLC 柱后衍生同时测定黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 的探讨[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(2): 225-226.
- [7] Waliking AE, Wilson D. Liquid chromatographic analysis of aflatoxin using post-column photochemical derivatization: collaborative study [J]. J AOAC Int, 2006, 89(3): 678-692.

收稿日期: 2015-11-12

(接 790 页)

3 讨 论

近年来,通过常规免疫和强化免疫,我国麻疹报告发病率下降至历史最低水平,但 2013 年我国报告麻疹发病率有所上升,明显高于前 4 年同期水平^[10-12]。随着麻疹减毒活疫苗的广泛使用,由此带来的一系列问题逐渐出现,如免疫后出现麻疹症状,免疫不成功等^[13]。湖南省近年来通过高强度免疫计划,已使麻疹发病率降低到较低的水平,但在临床上发现一些具有接种史的麻疹疑似患者,很难判断其由麻疹疫苗株感染还是由于接种不成功感染野毒株。因此通过建立一种实验室检测方法来区别野毒株和疫苗株感染,以及评价麻疹免疫效果显得尤为重要。周剑惠等^[14]建立的 RT-PCR-RFLP 方法能从分子水平鉴定麻疹疫苗株与野毒株,给各省市陆续报道的接种麻疹疫苗后感染的病例提供了确证的技术依据。本研究利用 RT-PCR-RFLP 方法成功建立了本市诊断麻疹疫苗株与野毒株感染的实验室检测方法,为麻疹的临床诊断与清除计划提供帮助。

本文对长沙 2013-2014 年麻疹核酸阳性标本进行了疫苗株与野毒株的鉴定。对发现的 9 例具有麻疹疫苗接种史患者,进行 RT-PCR-RFLP 方法鉴定,结果为野毒株型,排除由减毒疫苗株造成的感染。进一步研究发现,9 例麻疹毒株在遗传距离上与 China 93/4 较近,基因型为 H1a。说明长沙市目前流行的麻疹毒株基因型较为稳定。流行病学资料调查发现这 9 例感染者为儿童和学生,且 4 例儿童患者疫苗接种时间与发病时间间隔不超过 3 个月,说明免疫存在一定的失败率,因此麻疹清除阶段应进行强化免疫,特别是幼儿阶段应提高接种质量^[5,15],进行第二次免疫。从麻疹接种覆盖率来看,224 例患者中仅有 9 例患者有明确

的疫苗接种史,其余为未接种或者接种史不详,因此在本市麻疹疫苗接种的普及率还有待提升。

临床上由于很难区分疫苗株和野毒株的感染,给麻疹的诊断工作带来很大困扰,RT-PCR-RFLP 由于其简单快捷的优点,给麻疹清除阶段的免疫效果评价带来极大的方便。因此,将使用该方法从分子生物学水平加大对长沙麻疹疫苗接种情况及免疫效果的监测。

参考文献

- [1] 许文波. 麻疹病毒的分子流行病学[J]. 中国计划免疫, 2001, 7(1): 57-62.
- [2] 杨宏, 余文周. 世界卫生组织关于消除麻疹和风疹证实框架文件[J]. 中国疫苗和免疫, 2013, 19(4): 372-374.
- [3] 马雷钧, 徐闻青, 徐帆洪, 等. 沪-(191)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.
- [4] 郝桂玲, 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.
- [5] 李慧, 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.
- [6] 赵国涛, 周剑惠, 张帆, 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.
- [7] 周剑惠, 王爽, 陈超, 等. 中国麻疹病毒疫苗株与野毒株鉴别方法的建立[J]. 中国疫苗和免疫, 2009, 15(4): 310-315.
- [8] 周剑惠, 王爽, 陈超, 等. 限制性片段长度多态性分析方法应用于中国麻疹野病毒基因型别的鉴定[J]. 中国计划免疫, 2005, 11(1): 7-10.
- [9] 李立群, 余文, 赵智娟, 等. 应用限制性片段长度多态性分析方法鉴别 H-1 基因型麻疹病毒感染病例和麻疹疫苗相关病例[J]. 中国疫苗和免疫, 2012, 18(5): 429-431+47.
- [10] 罗美玲, 林希建, 刘浩, 等. 长沙市 2013 年麻疹流行病学特征分析[J]. 公共卫生与预防医学, 2014, 25(4): 90-92.
- [11] 陈定仪. 长沙县 2007-2010 年麻疹疫情流行病学分析及强化免疫效果评价[J]. 实用预防医学, 2011, 18(8): 1442-1443.
- [12] 戴德芳, 张红, 刘运芝, 等. 湖南省麻疹实验室网络运转状况分析[J]. 现代预防医学, 2009, 36(11): 2134-2136.
- [13] 黄晖, 阮峰, 关天姬, 等. 珠海市 2005-2011 年麻疹减毒活疫苗强化免疫前后麻疹流行病学特征[J]. 实用预防医学, 2013, 20(2): 183-184.
- [14] 徐宏基, 李微, 夏建华, 等. 国产冻干麻疹腮腺炎风疹联合减毒活疫苗的接种反应和免疫原性观察[J]. 中国生物制品学杂志, 2008, 19(12): 1111-1114.
- [15] 张绍丽, 晁灵, 杨奇春. 南阳市 2010 年麻疹疫苗强化免疫后麻疹发病情况分析[J]. 实用预防医学, 2014, 21(12): 1460-1461.

收稿日期: 2016-01-20