

26-31

2017(4)

第12卷第1期  
1997年3月中国病毒学  
VIROLOGICA SINICAVol. 12 No. 1  
Mar. 1997PCR 法检测外环境水中脊髓灰质炎  
病毒 I 型基因的研究

赵文彬 吴桃林 李家富

(连云港市卫生防疫站, 连云港 222003)

方肇寅 王秋红 章菁

(中国预防医学科学院病毒学研究所, 北京 100052)

R373.22

**A 提 要** 应用聚合酶链反应(PCR)技术检测外环境水中分离的脊髓灰质炎病毒 I 型(PV I)毒株基因型, 发现所分离的 22 株病毒, 均为疫苗 Sabin I 相关株, 脊髓灰质炎病毒的温度敏感(T 特征)试验亦提示为弱毒株, 与 PCR 试验相吻合。表明在实施强化免疫和常规免疫后, 外环境中的脊髓灰质炎病毒已被疫苗相关株循环所取代。同时证实用 PCR 作为环境中 PV I 病毒株的基因型分析的检测方法是特异和敏感的。α<sub>1</sub> 型, 基因

**关键词** 脊髓灰质炎病毒, Sabin I 疫苗相关株, 聚合酶链反应, 温度敏感试验

我国卫生部于 1991 年制定的《全国 1995 年消灭脊髓灰质炎(Polio)行动计划》中, 要求“在地方性流行县采取强化免疫措施后, 开展环境抽样调查, 以监测 Poliov 野毒株的消失情况(在建立适当的实验室方法后进行)”<sup>[1]</sup>。为此, 在连云港市选择 1989 年以来曾有确诊 Polio 病例的乡(镇), 于 1993 年秋定点监测两年, 按季节从外环境生活用水的沟塘和市水厂源水及出厂自来水中分离到脊髓灰质炎病毒(PV) I 型 22 株, 为确定所分离 PV I 毒株分子流行病学意义, 我们应用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检定所分离毒株的基因型, 同时用 T 特征试验作对比, 结果报告如下。

## 材料和方法

- 1 细胞 Hep-2c 传代细胞。
- 2 PV I ~ III 诊断血清 由卫生部中国药品生物制品检定所供给。
- 3 病毒 PV I 型 Brunhilde 株。
- 4 病毒分离和鉴定 从连云港市 2 个县监测点(乡)生活用水塘, 市水厂源水及出厂自来水按设计的季节时间和水点用消毒塑料桶采集上层水 10 L, 用 NaCl-AlCl<sub>3</sub> 沉淀法<sup>[2]</sup>浓缩集毒, 病毒分离用 Hep-2c 细胞, 标本接种采用细胞瓶接触法, 凡接种标本的 Hep-2c 细胞瓶(管)细胞出现退行性病变 III ~ IIII, 即收获置 -30℃ 保存, 无病变者盲传 2 代, 分离的病毒株用 I ~ III 型 Poliov 诊断血清作中和试验定型, 凡未被中和者均定为非脊髓灰质炎肠道病毒(NPEV), 以上实验及 T 特征实验在连云港市卫生防疫站进行。毒株分离的时间和地点见表 1。

收稿日期: 1996-02-05, 修回日期: 1996-07-08

\* 本课题得到连云港市科委资助

## 5 RT-PCR 试验

## 5.1 病毒 实验病毒经血清中和试验鉴定为 PV I 型,对照毒株 Sabin I

型疫苗株和 PV I 型自然重组株<sup>[3]</sup>由中国预防医学科学院病毒学研究所肠道病毒室提供。病毒经 Hep-2c 细胞传代,出现 4 + CPE 后冻融 3 次,低速离心去细胞碎片,病毒上清液备用。

## 5.2 引物对的选择 实验中所用

Sabin I 相关株的 PCR/(S1/PCR),其负链引物结合于核苷酸(2564 ~ 2581),引物序列为 S1/PCR(-)5' - TCC ACT GGC TTC AGT GTT - 3',正链引物结合于核苷酸(2485 ~ 2503):5' - AGG TCA GAT GCT TGA AAG C - 3',设计放大产物为 97 bp。

PV I 型重组株 负链引物 CHNR<sub>1</sub>(5' - ACC GCT TTG TTT TGG TGT CCG AAT - 3')结合于 3' 侧疫苗株序列 3388 ~ 3411 区段,正链引物 CHNR<sub>2</sub>(5' - CCA ACC ACG

GTT ACT TCT AAG G - 3')与 5' 侧野毒株序列 3227 ~ 3248 相同。

5.3 实验方法 在 0.5 mL 离心管内加入 15 μL H<sub>2</sub>O, 5 μL 10 × 反应缓冲液(Buff 华美公司产品), 5 μL 2mmol/L dNTP, 一对引物各 1 μL(60 ng)和 5 μL 病毒上清液,加水至 28 μL,混匀后加 50 μL 矿物油封盖,经 95 ℃ 加热 5 min 后立即放入冰浴中,5 min 后加入 0.25 μL(10 U)核酸酶(RNasin Promega),0.5 μL(1.2 U)逆转录酶(AMV;Boehringer Mannheim)0.5 μL(1 U) Taq 多聚酶(华美公司产品),加水至终体积 50 μL 混匀,离心后在 42 ℃ 孵育 30 min 合成 cDNA,经 95 ℃ 3 min 加热灭活逆转录酶后,在基因扩增仪内经 30 个周期放大,94 ℃ 变性 1 min,50 ℃ 退火复性 1 min,72 ℃ 引物延伸 1 min,最后 1 个周期结束时引物延伸时间增加 8 min,待温度降至 18 ℃ 后取出。

5.4 凝胶电泳 用 3% 琼脂糖凝胶电泳后,经 0.5 μg/mL 溴化乙锭染色,在紫外光下观察扩增后特征大小的 DNA 带。

6 脊髓灰质炎病毒的温度敏感(T 特征)试验 鉴定为 PV 的毒株与相应型别减毒株(对照)进行 T 特征试验,病毒稀释液接种 Hep-2c 细胞,分别置 37 ℃ 和 40 ℃ 孵箱培养 7 d,观察并按 Karber 法计算在二种温度下 TCID<sub>50</sub>,二种温度下病毒滴度差 < 2 时,判为强(野)毒株, > 5 以上为弱毒(疫苗)株。对照野毒参考株为 PV I 型 Brunhilde 株,减毒株为 Sabin I ~ III 型株。

表 1 环境水中分离的 PV I 地点和 RT-PCR 结果

Table 1 The places of environmental water containing PV I and the result of RT-PCR

编号 No.	分离时间 Separate time	地 点 Place	S1/PCR	I 型重组株/PCR Recombinant stram/PCR
1	1993. 秋	东海县房山镇农贸市场北塘	+	-
2	1993. 秋	东海县房山镇农贸市场南塘	+	-
3	1993. 秋	东海县房山镇交管站前河	+	-
4	1993. 秋	东海县房山镇派出所东沟	+	-
5	1993. 秋	赣榆县罗阳乡前罗阳村西塘	+	-
6	1993. 秋	赣榆县罗阳乡养鱼塘	+	-
7	1993. 冬	赣榆县罗阳后罗阳村边塘	+	-
8	1993. 冬	东海县房山镇交管站前河	+	-
9	1994. 春	东海县房山镇农贸市场北塘	+	-
10	1994. 春	东海县房山镇交管站前河	+	-
11	1994. 春	赣榆县罗阳乡前罗阳村西塘	+	-
12	1994. 夏	东海县房山镇派出所东沟	+	-
13	1994. 秋	赣榆县罗阳乡养鱼塘	+	-
14	1994. 冬	东海县房山镇农贸市场南塘	+	-
15	1994. 冬	赣榆县后罗阳村边塘	+	-
16	1994. 春	东海县房山镇老党委前塘	+	-
17	1994. 春	赣榆县罗阳乡前罗阳村西塘	+	-
18	1994. 夏	赣榆县后罗阳村边塘	+	-
19	1994. 5	市 B 水厂源水	+	-
20	1994. 11	市 B 水厂源水	+	-
21	1995. 8	市 A 水厂源水	+	-
22	1995. 8	市 A 水厂出厂自来水	+	-

## 结 果

I 我们 2 年来从监测的水点计采集水样 88 份,分离致 Hep-2c 细胞病变的病毒 51 株(58%),经血清学中和试验鉴定为 PV I 型 18 株, PV II 型 1 株, PV III 型 2 株。从 8 份自来水厂

源水中分离到 PVI 型 3 株, PV III 1 株; 出厂水分离到 1 株 PV I 型病毒(1/6)。从表 2, 3 可见在全年的 4 个季节, 均能从环境水中, 包括自来水厂的源水和出厂水中分离到 PV 和非脊髓灰质炎肠道病毒。但其型别仍以 PV I 为主, 表明该型毒株在外环境中分布较广, 所占比重最大。

2 血清中和试验检定为 PVI 的 22 株病毒株, 经 RT-PCR 试验, 其扩增产物均为单一核酸带, 其分子量与 Sabin I 对照的放大产物一致

(图 1.2), 经与 pBR322/Hae 分子量标准比较, 该核酸带在 89 bp 和 104 bp 带之间, 与 Sabin I 相关(设计)放大产物 97 bp 大小一致, 即 Sabin I /PCR 全部阳性, I 型重组株/PCR 为阴性, 经以上病毒基因组分子水平检测, 所分离的 PV I 均为 PV I 型疫苗(Sabin I)相关株。

表 3 自来水厂源水和出厂水病毒分离结果

Table 3 Results of virus isolation in the original water and tap water from the two plants

水源 Source of water	采样日期 Collection date			
	1994.5	1994.11	1995.4	1995.8
A 厂源水 Original water in A plant	-	NPEV	NPEV	PV I
A 厂出厂水 Tap water in A plant	-	-	-	PV I
B 厂源水 Original water in B plant	PV I	PV I	-	PV III
B 厂出厂水 Tap water in B plant	NPEV	-	-	-

3 所分离的 22 株 PV I, 1 株 PV II 和 2 株 PV III 经 T 特征试验, 经计算二种温度培养的病毒滴度差均大于 5, 判为弱毒(疫苗相关)株, 表 4 所列为部分分离 PV 株的 T 特征试验结果。

表 2 不同季节环境水病毒分离结果

Table 2 Results of virus isolation from environmental water in different seasons

季节 Season	标本数 Number of sample	阳性数 Positive	PV			非脊灰肠道病毒(NV) (NP)Enterovirus
			I	II	III 计 Count	
1993	秋 Autumn	10	9(90.0)	8	8(80.0)	1(10.0)
	冬 Winter	10	4(40.0)	1	1(10.0)	3(30.0)
	春 Spring	12	9(75.0)	3	1 4(33.3)	5(41.7)
1994	夏 Summer	12	6(50.0)	1	1(8.3)	5(41.7)
	秋 Autumn	11	9(81.8)	1	1(9.1)	8(72.7)
	冬 Winter	11	5(45.5)	2	2(18.2)	3(27.3)
1995	春 Spring	11	5(45.5)	2	2(18.2)	3(27.3)
	夏 Summer	11	4(36.4)	1 1	2(18.2)	2(18.2)
	合计 Count	88	51(58.0)	18 1 2	21(23.9)	30(34.1)

表 4 PV 的温度敏感试验  
Table 4 Temperature sensitivity test of PV

毒株来源 Viral strain source	型别 Type	37℃ -logTCID <sub>50/0.1mL</sub>	40℃ -logTCID <sub>50/0.1mL</sub>	滴度差 Titre difference
93 秋塘水 pond water Autumn 93	I	7.0	<1.0	>6.0
94 夏沟水 ditch water Summer 94	I	7.5	1.0	6.5
95 春河水 river water Spring 95	I	6.5	<1.0	>5.5
94 春水厂源水 original water Spring 94	I	7.5	1.5	6.0
95 夏水厂出厂水 tap water Summer 95	I	7.0	1.0	6.0
95 夏塘水 pond water Summer 95	II	6.5	<1.0	>5.5
94 春河水 river water Spring 94	III	7.5	1.5	6.0
95 夏水厂源水 original water Summer 95	III	7.0	<1.0	>6.0
对照野毒株 Brunhilde	I	7.5	7.0	0.5
对照减毒株 Sabin	I ~ III	7.0~7.5	<1.0~1.0	>6.0~6.5

## 讨 论

方肇寅等 1994 年成功地用 PCR 方法对 Polio 病人分离的 PV I 型作基因型分析<sup>[4]</sup>, 此次用于外环境水中 PV I 型毒株的基因型检定, 结果表明该地区外环境水中所分离的 PV I 型毒株均为 Sabin I 型疫苗相关株。

我们原设计方案第一步 PCR 试验用 S1/PCR 和自然重组株 1/PCR 二对特异性引物作 RT-PCR, 如实验中分离株中有 Sabin I/PCR 阴性结果, 再用 W1/PCR, 等野毒株的特异性引物作基因型分析, 以判定是否为野毒株, 由于所分离的 PV I 型 S1/PCR 全部为阳性, 所以第二步试验就省去。

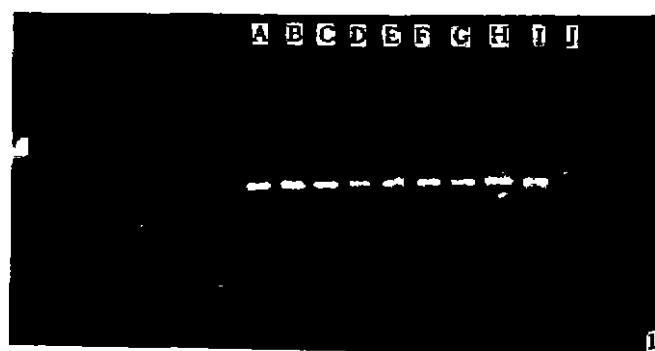


图 1 RT-PCR 检测环境水中 PV I 分离株结果

Fig 1 Results of tested PVI in environment water by RT-PCR

A: Sabin I 产物对照 Sabin I product control

B: Sabin I 阳性对照 Sabin I positive control

C~I: PVI 分离株 PVI isoletes

J: 自然重组株产物对照 Natural recombinant product control

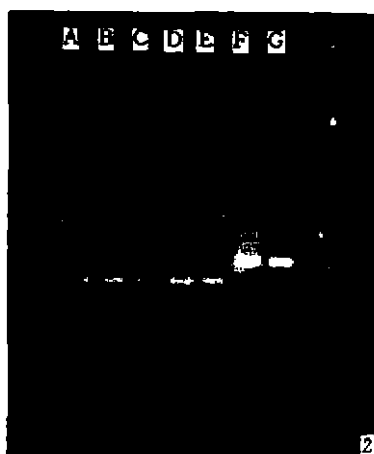


图 2 S/PCR 和重组株 I/PCR 检测环境中 Sabin 相关分离株

Fig 2 Sabin related isolations in environmental water tested by S/PCR and Recombinant I/PCR

A: Sabin I 产物对照  
Sabin I product control

B: Sabin I 阳性对照  
Sabin I positive control

C~E: Sabin I 相关分离株  
Sabin I - derived isolations

F: 自然重组株阳性对照  
Natural recombinant positive control

G: 自然重组株产物对照  
Natural recombinant product control

从两年所监测的外环境水中分离的 PV I 病毒经基因组分子水平 RT-PCR 检测, 为 PV I 型疫苗 Sabin I 相关株, 另经脊髓灰质炎病毒的温度敏感试验, 所分离到的 I ~ III 型 PV 毒株, 二种温度滴度差均大于 5, 判为弱毒株 ( $T^-$ ), 与 PCR 基因分析结果相符, 以上结果表明该市在实施消灭 Polio 方案中, 切实抓好常规免疫和强化服苗 (易感儿童 4 岁以下年龄组、服苗率达 99.9% 以上)。以乡为单位四苗覆盖率达 85% 以上。易感人群服用有效剂量的活疫苗, 疫苗株病毒通过肠道繁殖, 随粪便排出体外, 成为优势群, 使外环境中循环的 PV 被疫苗相关 (减

毒)株替代。从该市 Polio 疫情看,自 1993 年来未有野毒确诊病例,但仍不能忽视有野毒存在的可能,仍应加强对 AFP 病人的监测。

### 参 考 文 献

- 1 国家卫生部.全国 1995 年消灭脊髓灰质炎行动计划.卫防发(1991)18 号文.
- 2 尤凤兴,刘秉辉,张玲妹等.水标本中脊髓灰质炎病毒三种浓缩方法的比较及改进方法的建立.病毒学杂志,1991,6(1):125
- 3 方肇寅,O.keN,任斌等.在我国流行的脊髓灰质炎中发现脊灰病毒 I 型自然重组株病毒学报,1993,9(3):195
- 4 方肇寅,温乐英,章菁等.PCR 方法检测我国脊髓灰质炎病毒 I 型野毒株的研究.病毒学报,1994,10(1):51

## Study on the Genes of Poliovirus Type I Isolated from Environmental Water by PCR

Zhao Wenbing Wu Taolin Li Jiafu

(Lianyungang City Sanitary and Anti-epidemic Station, Lianyungang 222003)

Fang Zhaoyin Wang Qihong Zhang Jing

(The Institute of Virus, CAPD, Beijing 100052)

The genes of poliovirus type I isolated from environmental water were studied by PCR (polymerase chain reaction). It was found that 22 strains of the virus were all Sabin-related. The result showed that the wild polioviruses in the environmental water were substituted by the sabin strain completely after carrying on the conduct of mass immunization campaigns and EPI in this area. The method was suitable for the gene analysis of poliovirus type I.

**Key words** Poliovirus, Sabin I-related isolation, Polymerase chain reaction, Sensitivity test of temperature