

从4例服苗后麻痹儿童分离的脊髓灰质炎I型病毒的型内血清学鉴别

翟朝阳 周云

(中国医科院医学生物研究所,昆明)

脊髓灰质炎减毒活疫苗(小儿麻痹糖丸疫苗)在我国使用20多年来,降低了该病的发病率,一些地区基本控制了流行。但有极少数儿童在服苗后发生麻痹。为弄清这些儿童的发病系疫苗所引起还是感染了自然界的野毒株,需对从患儿分离的病毒作型内鉴别试验。

60年代以来,不少血清学试验方法用于毒株间的鉴别^[1],近年又出现了核酸分析和单克隆抗体技术^[2,3]。但国内均未采用,因此对多年大规模使用活疫苗后野毒株和疫苗株在人群中的分布与传播,以及服苗有关病例的有关资料(包括鉴别技术、结果、评价和这类病例的发生率)缺乏了解^[4]。1981年以来,在一些防疫站协助下,我们开展了对服苗后麻痹病例分离毒株的鉴定和鉴别工作,现将4株结果报告如下:

材料与方 法

一、病毒株

Sabin I型 LSc2ab-aca 株及强毒株 Brunhilde 株,分别做为疫苗株的同源株和异源株对照。

鉴别毒株从贵州、四川、广东4名服苗后麻痹儿童的大便中分离。患儿在服苗后5—45天

发病,一般发病后两天出现下运动神经元性麻痹,无感觉丧失。病毒分离结果表明分离病毒与所服疫苗同型(表1)。血清标本未收集齐全。从现有实验室资料分析,除A28外,可认为患儿均属脊灰I型病毒感染。

二、免疫血清

制备 Sabin I型 LSc2ab-aca 疫苗株的免疫血清。抗原经蚀斑纯化,以5—10TCID₅₀/细胞的剂量感染原代猴肾细胞。细胞病变达+++时收获,冻融3次,3000rpm 30分钟去除细胞碎片,抗原滴度>10⁶PFU/ml。分3次接种家兔,间隔1周,每次静脉注射2ml,首次时肌肉同时注射2ml抗原和2ml佐剂的混合液。末次免疫后1周放血。血清经56℃30分灭活,-20℃冻存。

三、试验方法

基本按 Nakano 和 Gelfand 改良的 Wecker 蚀斑抑制法^[5]。具体操作如下:

在小罗氏瓶培养成致密单层的原代 MK 细胞,接种0.2ml适当稀释的病毒液,置37℃吸附1.5小时。每株病毒用6瓶细胞,分为3组,加

本文承董德祥主任指正,特此致谢。

表 1 4 名服苗后麻痹儿童的临床及实验室资料

患儿编号	年龄	性别	地址	疫苗史	疫苗—发病 间隔天数	麻痹情况	分离病毒 类型	血清抗体测定					
								急性期			恢复期		
								I	II	III	I	II	III
A18	1岁	男	四川	I	26	右下肢麻痹	I、III*	1:320	<1:5	>1:1280	1:1280	<1:5	>1:1280
A26	2岁	男	贵州	I、II + III	38	双下肢麻痹	I	—	—	—	1:80	<1:5	<1:5
A27	1岁	男	贵州	I	5	右下肢麻痹	I	—	—	—	1:160	<1:5	<1:5
A28	3岁	女	广东	I、II + III	45	麻痹	I、III**	—	—	—	—	—	—

* 未进行鉴别试验(患儿没服过 III 型疫苗)。** 另一组试验证明是非类疫苗株。“—”未获得标本。

琼脂覆盖液 10ml。其中一组为对照,覆盖液成分与常规滴定病毒者相同。另两组分别含一定浓度的免疫血清,第一个浓度使同株病毒的出斑几乎完全抑制,第二个浓度则允许有少量出斑,出斑率<5%。细胞瓶翻转,避光,置 34℃ 培养。于第 3、4、5 天计蚀斑数,按以下程序计算蚀斑突破率 (MPB):

每天蚀斑突破率 = $\frac{\text{加免疫血清的试验组蚀斑数}}{\text{对照组蚀斑数}}$

× 100 %

每个试验组平均蚀斑突破率

= $\frac{\text{该试验组第 3、4、5 天蚀斑突破率之和}}{3}$

每株病毒蚀斑突破率 (MPB)

= $\frac{\text{两个试验组的蚀斑突破率之和}}{2}$

结果判断: 分离病毒如 MPB < 10% 为类疫苗株, > 20% 为非类疫苗株, 10—20% 为中间株。

四、预备试验

在正式试验之间,对以下因素进行选择。

1. 免疫血清: 以 100 TCID₅₀ 的同源株和异源株病毒与 3 只家兔制备的免疫血清进行中和试验, 挑选出对同株病毒有高的抗体效价而对异株病毒的抗体效价相对较低的 5 号动物的血清用于正式试验 (表 2)。

表 2 免疫血清选择试验(A)用同株病毒不同中和时间(B)用不同株病毒相同中和时间 (37℃ 1 小时)

实验动物号	A. 不同时间下对同株病毒的中和抗体效价			B. 相同中和时间对不同病毒的抗体效价	
	37℃ 1 小时	37℃ 2 小时	37℃ 2 小时后 4℃ 过夜	同株病毒*	异株病毒**
2	1:1280	1:1280	1:5120	1:1280	1:640
5	1:2560	1:5120	1:5120	1:2560	1:640
9	1:2560	1:5120	1:5120	1:2560	1:1280

* Sabin I 型 LSc2ab-aca 疫苗株。

** Brunhilde 株。

2. 血清浓度: 选择使同株病毒的出斑率近于零和<5%的两个浓度,较 Nakano 和 Gelfand 所报告的(<5%和<10%)要浓,目的在于能更好地鉴别出有抗原性漂移的疫苗株和野毒株。

3. 病毒稀释度: 病毒按 0.2ml 含 15—40 PFU 稀释。

4. 计数时间: 覆盖琼脂液后第 3、4、5 天计蚀斑数,此时对照组蚀斑数达最高。

结 果

从 4 名服疫苗后麻痹病例分离的 4 株脊灰 I 型病毒进行型内鉴别试验的结果见表 3。所有 4 株病毒在抗原性上均为非类疫苗株,又具有 T⁺ 特征,说明它们可能为自然界的野毒株。

表 3 由服疫苗后麻痹病例分离的 4 株脊灰 I 型病毒的鉴别试验结果

患儿编号	分离病毒的型内血清学鉴别试验		T 特征	结 论
	MPB	抗 原 性		
A18	43.0	非类疫苗	T ⁺	野 毒 株
A26	33.8	非类疫苗	T ⁺	野 毒 株
A27	35.4	非类疫苗	T ⁺	野 毒 株
A28	35.8	非类疫苗	T ⁺	野 毒 株
对照				
Sabin I 型疫苗株	2.6	疫 苗 株	T ⁻	同 源 株
Brunhilde	54.9	非疫苗株	T ⁺	异 源 株

讨 论

1. 对服苗后麻痹儿童所分离毒株的鉴别, 通常要考虑两个方面。一是分离的病毒是否会引起麻痹的病原。这种检测最可靠的指标是通过猴体神经毒力试验获得的。但一般实验室只测定病毒对高温的敏感性, 即所谓 T 特征^[6], 强毒株在高温下的繁殖不受影响, 显示 T⁺; 弱毒株则反之。第二是考虑分离病毒在抗原性上是类似疫苗株还是非类似疫苗株。大量的血清学鉴别试验及单克隆抗体技术都是从这里着手的。所用的改良 Wecker 蚀斑抑制试验, 简单易行, 结合病毒的其它性质, 所作的结论是可靠的。

2. 脊髓灰质炎减毒活疫苗的口服者和服苗接触者发生麻痹的事例很早就受到人们的注意, 从麻痹患者分离毒株的鉴别结果证明, 确有少数人的发病是与疫苗有关。我国过去缺乏对这类病例的系统研究, 从服苗现场观察来看, 国产活疫苗是安全的^[7]。本结果也支持这一点。

作者对云南、贵州一些未服过疫苗的麻痹

儿童分离的病毒所作的鉴别试验, 结果与本试验结果相同, 而服苗后的健康儿童分离的病毒基本为类疫苗株 (材料未发表)。这说明, 在我国一些地区仍有野毒株在人群中循环, 没有服苗的儿童最容易感染患病。造成这种状况的原因是部分地区服苗工作质量不好, 与国外大规模使用活疫苗后野毒株在人群中的消失^[8]相比仍有差距, 这提示我们在计划免疫工作上还要继续努力。

参 考 文 献

- [1] 姜述德: 医学生物资料选编, 1—2: 48, 1975.
- [2] Notay, B. K. et al.: *Virology* 108: 405, 1981.
- [3] Humphrey D. D. et al.: *Infect. Immun.* 36: 841, 1982.
- [4] 董德祥: 医学研究通讯 1: 16, 1979.
- [5] Nakano J. H. and Gelfand H. M.: *Am. J. Hyg.* 75: 363, 1962.
- [6] Nakano J. H. et al.: *Prog. Med. Virol.* 24: 178, 1978.
- [7] 中国医学科学院医学生物学研究所疫苗室: 医学生物资料选编 4: 27, 1975.
- [8] Tagaya I. et al.: *Bull. W. H. O.* 48: 547, 1973.