

中华人民共和国卫生行业标准

WS 294—2016
代替 WS 294—2008

脊髓灰质炎诊断

Diagnosis for poliomyelitis

2016-04-26 发布

2016-10-20 实施

中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会 发布

前 言

本标准 3.3.1、3.3.2、第 5 章为强制性条款,其余为推荐性条款。

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 WS 294—2008《脊髓灰质炎诊断标准》。

本标准自实施之日起,WS 294—2008 同时废止。

本标准与 WS 294—2008 相比,主要技术变化如下:

- 增加了缩略语 CPE、L20B、NPEV、RD、VP;
- 增加了“或近期当地发生脊髓灰质炎野病毒输入事件”(见 3.1.1);
- 增加了“既往未接种或未全程接种 OPV 或 IPV”(见 3.1.2);
- 将“潜伏期为 3 d~35 d(一般为 5 d~14 d)”移入“临床表现”部分(见 3.2.1,2008 年版的 3.1.2);
- 修改了“早期可有发热、咽部不适,婴幼儿可烦躁不安”为“早期可有发热、咽部不适,患者可烦躁不安”(见 3.2.2,2008 年版的 3.2.1);
- 删除了“且未发现其他病因”(见 3.2.4,2008 年版的 3.2.3);
- 增加了“或 IPV”和“未接触疫苗病毒”(见 3.3.2);
- 修改了临床诊断病例,除临床表现或实验室检测 3.3.2 外,需要考虑流行病学史(见 5.2,2008 年版的 5.2);
- 将“合格粪便标本”修改为“粪便、咽部、脑脊液或脊髓组织”[见 5.4b),2008 年版的 5.4.2];
- 修改了“与 OPV 有关的其他病例”(见 5.5,2008 年版的 5.5);
- 根据脊髓灰质炎流行病学特征的变化,在附录 A 中,对脊髓灰质炎的病原学、流行病学和临床表现中的有关描述予以订正(见附录 A);
- 根据 WHO 实验室操作手册,对脊髓灰质炎病毒的分离与定型方法进一步予以标准化(见附录 B)。

本标准起草单位:山东省疾病预防控制中心、中国疾病预防控制中心、济南市传染病医院。

本标准主要起草人:徐爱强、许文波、李黎、梁晓峰、罗会明、余文周、张勇、陶泽新、陈士俊、温宁、汪海波。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- GB 16394—1996;
- WS 294—2008。

脊髓灰质炎诊断

1 范围

本标准规定了脊髓灰质炎的诊断依据、诊断原则、诊断和鉴别诊断。

本标准适用于全国各级各类医疗卫生机构及其工作人员对脊髓灰质炎的诊断。

2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

AFP:急性弛缓性麻痹(acute flaccid paralysis)

CPE:致细胞病变效应(cytopathic effect)

cVDPVs:循环的疫苗衍生脊髓灰质炎病毒(circulating vaccine-derived polioviruses)

GBS:吉兰-巴雷综合征(又称格林-巴利综合征)(Guillain-Barre syndrome)

IgG:免疫球蛋白 G(immunoglobulin G)

IgM:免疫球蛋白 M(immunoglobulin M)

IPV:脊髓灰质炎灭活疫苗(poliovirus vaccine, inactivated)

iVDPV:免疫缺陷者疫苗衍生脊髓灰质炎病毒(immunodeficiency vaccine-derived poliovirus)

L20B:转人脊髓灰质炎病毒受体基因的鼠肺细胞(mouse L cells expressing the human poliovirus receptor)

NPEV:非脊髓灰质炎肠道病毒(non-polio enterovirus)

OPV:口服脊髓灰质炎减毒活疫苗(oral poliovirus vaccine, live)

RD:人横纹肌肉瘤(rhabdomyosarcoma)

VAPP:疫苗相关麻痹型脊髓灰质炎(vaccine-associated paralytic poliomyelitis)

VDPV:疫苗衍生脊髓灰质炎病毒(vaccine-derived poliovirus)

VP:病毒蛋白(virus protein)

3 诊断依据

3.1 流行病学史(参见附录 A)

3.1.1 与确诊的脊髓灰质炎患者有接触史;近期曾经到过世界卫生组织(WHO)近期公布的脊髓灰质炎流行地区,或近期当地发生脊髓灰质炎野病毒输入事件。

3.1.2 既往未接种或未全程接种 OPV 或 IPV。

3.2 临床表现(参见附录 A)

3.2.1 潜伏期为 3 d~35 d(一般为 5 d~14 d)。

3.2.2 早期可有发热、咽部不适,患者可烦躁不安、腹泻或便秘、多汗、恶心、肌肉酸痛等症状。

3.2.3 热退后(少数可在发热过程中)出现不对称性弛缓性麻痹。神经系统检查发现肢体和(或)腹肌不对称性(单侧或双侧)弛缓性麻痹,躯体或肢体肌张力减弱、肌力下降、深部腱反射减弱或消失,但无感觉障碍。

3.2.4 麻痹 60 d 后随访仍残留弛缓性麻痹(后期可出现肌萎缩)。

3.3 实验室检测

3.3.1 发病后从粪便、咽部、脑脊液、脑或脊髓组织中分离到病毒,并鉴定为脊髓灰质炎野病毒(见附录 B)。

3.3.2 发病前 6 周内未接种过 OPV 或 IPV,发病后未再接种 OPV 或 IPV,未接触疫苗病毒,麻痹后 1 个月内从脑脊液或血液中查到抗脊髓灰质炎病毒 IgM 抗体,或恢复期血清中和抗体或特异性 IgG 抗体滴度比急性期 ≥ 4 倍升高(见附录 C)。

4 诊断原则

根据流行病学史、临床表现、实验室检测等进行综合分析做出诊断。

5 诊断

5.1 疑似病例

15 岁以下病因不明的任何 AFP 病例,包括临床初步诊断为 GBS 的病例,任何年龄临床怀疑为脊髓灰质炎的病例。

5.2 临床诊断病例

符合下列一项可诊断为临床诊断病例:

- a) 疑似病例并同时符合 3.1 和 3.2。
- b) 疑似病例并同时符合 3.1 和 3.3.2。

5.3 确诊病例

疑似病例并同时符合 3.3.1。

5.4 排除病例

符合下列一项可排除脊髓灰质炎诊断:

- a) 疑似病例经实验室和临床检查有确凿证据诊断为非脊髓灰质炎的其他疾病。
- b) 疑似病例的粪便、咽部、脑脊液、脑或脊髓组织未分离到脊髓灰质炎野病毒,或麻痹后 1 个月内脑脊液或血液特异性 IgM 抗体阴性,或恢复期血清中和抗体或特异性 IgG 抗体滴度比急性期无 4 倍升高者。

5.5 与 OPV 有关的其他病例

5.5.1 服苗者 VAPP 病例:疑似病例近期曾有 OPV 免疫史,且在服用 OPV 后 4 d~35 d 内发热,6 d~40 d 出现急性弛缓性麻痹,临床表现符合 3.2。麻痹后未再服用 OPV,从粪便、咽部、脑脊液、脑或脊髓组织标本中分离到脊髓灰质炎疫苗病毒,该病毒和原始疫苗病毒 Sabin 株相比,Ⅰ型和Ⅲ型脊髓灰质炎病毒 VP1 编码区核苷酸序列变异 ≤ 9 个,Ⅱ型脊髓灰质炎病毒 VP1 编码区核苷酸序列变异 ≤ 5 个。

5.5.2 服苗接触者 VAPP 病例:疑似病例曾与 OPV 免疫者在服苗后 35 d 内有密切接触史,接触 6 d~60 d 后出现急性弛缓性麻痹;或发病前 40 d 未服过 OPV,临床表现符合 3.2。麻痹后未再服用 OPV,从粪便、咽部、脑脊液、脑或脊髓组织标本中分离到脊髓灰质炎疫苗病毒,该病毒和原始疫苗病毒 Sabin 株相比,Ⅰ型和Ⅲ型脊髓灰质炎病毒 VP1 编码区核苷酸序列变异 ≤ 9 个,Ⅱ型脊髓灰质炎病毒 VP1 编码区核苷酸序列变异 ≤ 5 个。

5.5.3 VDPV 病例:疑似病例临床表现符合 3.2,发病后从粪便、咽部、脑脊液、脑或脊髓组织中分离到 VDPV,其中,VDPV 是指 I 型和 III 型脊髓灰质炎病毒,与原始疫苗病毒 Sabin 株比较,VP1 编码区核苷酸序列变异 ≥ 10 个,且 < 135 个(变异率 $> 1\%$,且 $< 15\%$);II 型脊髓灰质炎病毒,与原始疫苗病毒 Sabin 株比较,VP1 编码区核苷酸序列变异 ≥ 6 个,且 < 135 个(变异率 $> 0.6\%$,且 $< 15\%$)。

6 鉴别诊断

主要应与具备 AFP 临床表现的神经系统和肌肉疾病相鉴别。常见的包括 GBS、急性脊髓炎、外伤性神经炎、周期性麻痹、其他肠道病毒感染引致的麻痹等。在鉴别诊断时,应结合流行病学史(如与脊髓灰质炎病例有接触史、疫苗接种史等)、临床表现(如发病的前驱症状、麻痹及恢复状况和神经反射及感觉功能检查等)及实验室检测(如病毒分离、抗体检测等)等方面资料加以综合判断。

附录 A

(资料性附录)

脊髓灰质炎病原学、流行病学和临床表现

A.1 病原学

脊髓灰质炎是由脊髓灰质炎病毒引起的急性肠道传染病。脊髓灰质炎病毒(Poliovirus, PV)属于小核糖核酸病毒科、肠道病毒属,同属的其他病毒如柯萨奇病毒(Coxsackievirus)和埃可病毒(Echovirus)与其在生物学、物理化学以及流行病学方面有许多相似之处。脊髓灰质炎病毒直径为20 nm~30 nm,内含单股正链的核糖核酸,无包膜。在电子显微镜下呈小圆球形颗粒状,其衣壳蛋白由60个结构相同的亚单位组成,每一亚单位又由病毒蛋白VP1、VP2、VP3和VP4组成,其中VP1在病毒表层暴露最充分,是引起中和反应最主要的抗原决定簇,是构成病毒的最主要抗原。按其抗原性不同,可分为I型、II型、III型共3个血清型,型间无交叉免疫。目前WHO推荐使用RD和L20B两种传代细胞分离脊髓灰质炎病毒。该病毒仅感染人,无其他动物宿主;病毒在-70℃的低温下可保存活力达8年之久,在4℃冰箱中可保存数周至数月,在污水和污物中可生存6个月;但对干燥很敏感,故不宜用冷冻干燥法保存。该病毒不耐热,加热56℃30 min可使之灭活,煮沸和紫外线照射可迅速将其杀死;能耐受一般浓度的化学消毒剂,如70%酒精及5%煤酚皂液;耐酸、耐乙醚和氯仿等脂溶剂,但对高锰酸钾、过氧化氢、漂白粉等敏感,可将其迅速灭活。

预防脊髓灰质炎所用的疫苗包括OPV和IPV,是根据脊髓灰质炎病毒3个血清型病毒分别制备后按不同比例配制而成。通常的脊髓灰质炎病例是指野病毒引致的病例,以I型最多(占80%~90%),其次为III型,1999年以后全球无II型引发的病例或流行。此外,源自OPV的疫苗病毒可能使服苗者及其接触者发生VAPP病例;在一定条件下,源自OPV的VDPV是由于疫苗病毒在免疫覆盖率不高的情况下,在易感者体内复制而导致神经毒力增强(回升)。VDPV可导致一些未免疫者或未全程免疫者发病,甚至发生循环(cVDPVs)。

A.2 流行病学

脊髓灰质炎的传染源为病人、隐性感染者和病毒携带者。由于病毒携带者、无症状的隐性感染和无麻痹型患者不易被发现,因此在传播该病上起重要作用。本病的潜伏期为3 d~35 d,一般为5 d~14 d。患者自发病前2 d~3 d至发病后3周~6周都有传染性,退热后传染性减小。病毒主要存在于患者的脊髓和脑部,在鼻咽部、肠道粘膜与淋巴结内亦可查到。感染者一般通过粪便排出病毒,数量多且持续时间长,可达3周~6周,少数长达3个月~4个月;粪-口途径是本病的主要传播途径,在发病的早期咽部排毒可经飞沫传播。人对脊髓灰质炎病毒普遍易感,感染后出现不同的临床表现,其中主要是隐性感染者及不易诊断的轻型患者,麻痹型患者甚少。人感染后能产生对同型病毒的持久免疫力。

在实施疫苗免疫之前,脊髓灰质炎呈自然流行状态,发病率高,在一些国家和地区成为地方性流行的传染病。一年四季均可发生,夏、秋季为流行高峰。我国7月~9月发病最多,一般以5岁以下儿童为主。在普及儿童OPV免疫之后,发病率显著下降。1988年,世界卫生大会通过全球消灭脊髓灰质炎目标的决议;2000年我国已经实现了无脊髓灰质炎的目标,进入到消灭该病的后期阶段。但是,在全球消灭脊髓灰质炎之前,我国仍然存在发生输入性野病毒引致的脊髓灰质炎病例的风险,且输入性疫情一旦扩散,还可能引致大年龄组儿童甚至成人发病;此外,使用OPV可能引致VAPP病例和VDPV病例,但VAPP病例和VDPV病例不属于脊髓灰质炎野病毒病例。

VAPP病例多见于首剂服苗者,其发生率极低,且往往见于免疫功能低下儿童。

VDPV 病例发生率极低,主要发生在使用 OPV 且免疫接种率水平不高地区的未免疫或未全程免疫的儿童。目前 WHO 对 VDPV 通行的鉴定标准为经核苷酸序列分析,与原始疫苗病毒 Sabin 株相比,I 型和 III 型 VDPV VP1 编码区核苷酸序列变异 ≥ 10 个,且 < 135 个(变异率 $> 1\%$,且 $< 15\%$),II 型 VDPV VP1 编码区核苷酸序列变异 ≥ 6 个,且 < 135 个(变异率 $> 0.6\%$,且 $< 15\%$)。现已证实有 3 种 VDPV:由免疫缺陷病患者长期排出体外的 iVDPV、不明来源的 VDPV 和引起循环的 cVDPVs。其中,cVDPVs 是指由相关的疫苗衍生脊髓灰质炎病毒引起 2 例或 2 例以上 VDPV 病例的事件,称为疫苗衍生脊髓灰质炎病毒循环。此外,当脊髓灰质炎疫苗病毒变异尚未达到 VDPV 标准时,如 I 型和 III 型 VP1 编码区核苷酸序列变异 6 个~9 个,视为脊髓灰质炎疫苗病毒高变异株。

发生脊髓灰质炎野病毒输入性疫情和 cVDPVs 属突发公共卫生事件,应按照国家《突发公共卫生事件应急条例》、国家卫生和计划生育委员会的有关规定进行应急处置。发现脊髓灰质炎疫苗病毒高变异株时,也应按照国家卫生和计划生育委员会的相关要求进行处理。

A.3 临床表现

A.3.1 隐性感染(无症状型)

占全部感染者的 90%~95%。感染后无症状出现,不产生病毒血症,不侵入中枢神经系统,但从咽部和大便中可分离出病毒,体内可查到特异性中和抗体,相隔 2 周~4 周至 4 倍以上增长。

A.3.2 顿挫型(轻型)

约占 4%~8%。病毒未侵袭中枢神经组织。临床症状缺乏特异性,可出现:

- 上呼吸道炎症状,如不同程度的发热,咽部不适、充血及咽后壁淋巴组织增生,扁桃体肿大等;
- 胃肠道症状,恶心、呕吐、腹泻或便秘,腹部不适等;
- 流感样症状,头痛、乏力、关节、肌肉酸痛等。症状持续 1 d~3 d,自行恢复。

A.3.3 无麻痹型

病毒侵入中枢神经系统,除具有顿挫型症状外,还出现神经系统症状但不发生麻痹,体温较高,头痛加剧,多汗,呕吐,烦躁不安或嗜睡,全身肌肉疼痛,腓肠肌触痛,皮肤感觉过敏,不愿抚抱,动之即哭,神情紧张,颈背肌痛、颈强直,不能屈曲,克氏征(Kernig's sign)和布氏征(Brudzinski's sign)阳性。肌腱反射开始大多正常或活跃,后期可减弱。腹壁反射减弱或消失。脑脊液检查显示压力、蛋白、细胞数轻度升高,糖、氯化物正常。患者通常在 3 d~5 d 内退热,脑膜刺激征及病理反射可持续 1 周~2 周。

A.3.4 麻痹型

A.3.4.1 分期

麻痹型约占感染者的 1%~2%,其特征为在无麻痹型临床表现基础上,出现累及脊髓前角灰质、脑及神经的病变,导致肌肉麻痹。通常的脊髓灰质炎病例是指麻痹型病例。本型分为以下 5 期:

- 前驱期。本期症状与顿挫型相似,儿童以发热伴上呼吸道感染及胃肠炎症状为主,约 1/3 有双峰热;成人以发热伴全身肌肉酸痛及皮肤感觉过敏为主。经 1 d~4 d 发热,再经 1 d~6 d 无热期后进入麻痹前期。
- 麻痹前期。本期特征与无麻痹型相似,体温再度上升或持续下降,并出现神经系统的症状、体征,肌肉疼痛以活动和体位变化时最明显,故于起坐时用双上肢向后支撑身体而呈特殊的“三角架征”,脑膜刺激征及霍伊内(Hoyne)征阳性,亦可短暂意识障碍,多汗、尿潴留等表现,此期脑脊液多有改变。

- c) 麻痹期。一般在第2次发热1 d~2 d后体温开始下降或在高热和肌痛处于高峰时发生麻痹,短期内(一般3 d~4 d)麻痹达到最严重程度,但在热退后麻痹不再进展,根据病变部位可分为4型:
- 1) 脊髓型。此型最为多见,麻痹多为下运动神经元性,多表现为急性弛缓性麻痹,其特点为:
 - 发生于单肢或数肢,以下肢多见;
 - 近端大肌群较远端小肌群麻痹出现早而重;
 - 麻痹肌群分布不均匀、不对称,同侧上下肢均麻痹者少见;
 - 不伴有感觉障碍;
 - 发生上行性麻痹者,即由下肢向上蔓延至腹、背、颈部而达延髓者,则预后严重;
 - 麻痹出现后,腱反射随之减弱或消失。
 - 2) 脑干型。本型在麻痹型中占6%~25%,常与脊髓型同时发生。由于病变在脑干的不同部位,可产生颅神经麻痹、呼吸中枢麻痹、血管运动中枢麻痹等不同症状。
 - 3) 脑炎型。个别病例可仅表现为脑炎,也可与脑干型或脊髓型同时存在。弥漫性脑炎表现为意识不清、高热、谵妄、震颤、惊厥、昏迷、强直性麻痹等。局限性脑炎表现为大脑定位症状,恢复后可长期出现阅读不能症、阵挛或癫痫大发作等。
 - 4) 混合型。兼有脊髓型麻痹和脑干型麻痹的临床表现,可出现肢体麻痹、脑神经麻痹、呼吸中枢损害、血管运动中枢损害等。
- d) 恢复期。常见于瘫痪后1周~2周麻痹肢体逐渐恢复,肌力逐步增强,一般自肢体远端开始,腱反射也渐趋正常。轻者经1个月~3个月即可恢复,重症常需12个月~18个月甚或更久的时间才能恢复。
- e) 后遗症期。本期指起病满2年以后,有些受损肌群由于神经损伤过甚而致功能不能恢复。出现持久性瘫痪和肌肉萎缩,并可因肌肉挛缩导致肢体或躯干畸形,骨骼发育也受到阻碍。

A.3.4.2 肢体麻痹的轻重程度

肢体麻痹的轻重可按肌肉活动程度分为6级:

- a) 0级(全麻痹),刺激肌肉时,毫无收缩现象;
- b) 1级(次全麻痹),刺激肌肉时,肌腱或肌体略见收缩或触之有收缩感,但不引起动作;
- c) 2级(重度麻痹),肢体不能向上抬举,只能在平面上移动;
- d) 3级(中度麻痹),可自动向上抬举,但不能承受任何压力;
- e) 4级(轻度麻痹),可自动向上抬举,亦能承受一定压力,但不能对抗阻力;
- f) 5级,肌力正常。

附录 B

(规范性附录)

脊髓灰质炎病毒的分离与定型

B.1 标本的采集、运送

在病人出现麻痹后 14 d 内采集 2 份粪便标本,2 次采集的间隔至少为 24 h,每份标本量 5 g~8 g。

采集的粪便标本应放在无菌的容器内,4℃以下冷藏保存并带冰运送,采集后应按规定贴好标签,7 d 内送到指定的实验室进行病毒分离。

B.2 病毒的分离

B.2.1 在 50 mL 耐氯仿的塑料(带盖)离心管上标记标本号。

B.2.2 在每支离心管中加入 10 mL 的 pH 7.2~7.4 的 PBS(+)缓冲液、1 g 直径约为 3 mm 的玻璃珠和 1 mL 的氯仿。

B.2.3 在生物安全柜中将 2 g 左右的粪便标本加入到标记好的离心管中(确保离心管上的标号与原始标本的标号一致)。拧紧盖后剧烈机械振荡 20 min,制成 20%的粪便悬液。

B.2.4 3 000 r/min 条件下,在冷冻离心机中离心 20 min,在生物安全柜中吸出不含氯仿的上清液,分别装入 2 个有外螺旋盖的冻存管中,1 管存于 4℃~8℃以备接种细胞,另 1 管在-20℃条件下保存备用。

B.2.5 将每份粪便标本悬液同时接种到生长良好并至少 75%以上融合成单层的 RD 细胞和 L20B 细胞上,每管接种 0.2 mL 粪便标本悬液,每种细胞至少接种 2 管,正确标记每支试管(包括标本的编号、日期、传代数等);对每一种细胞标记 1 管作为阴性对照。

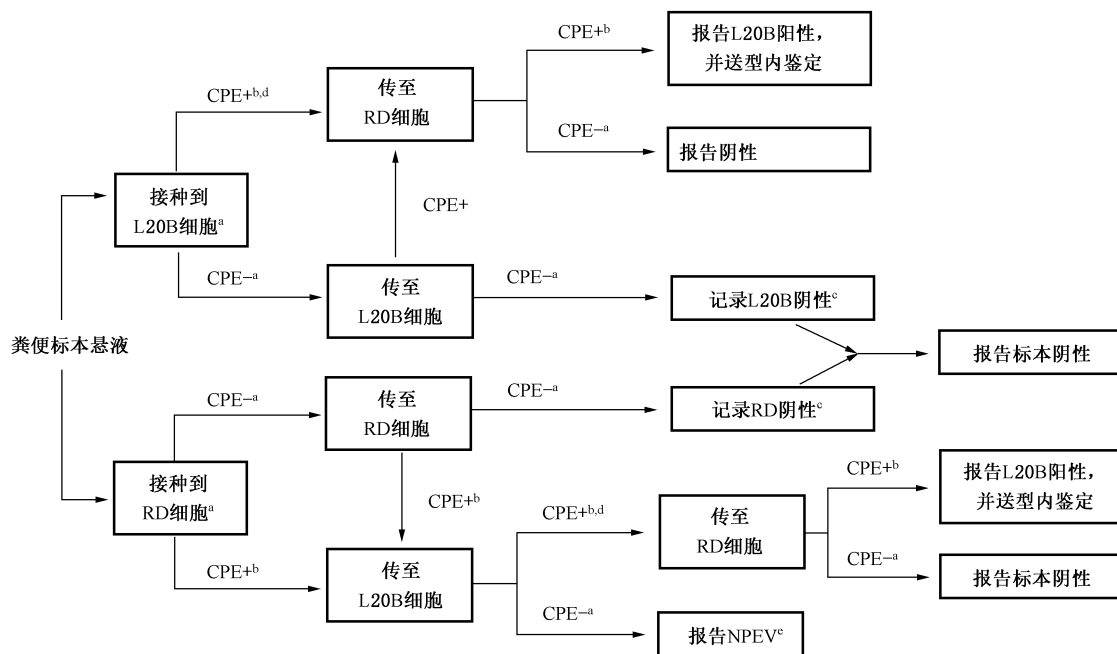
B.2.6 试管放 36℃的孵箱中倾斜 5°静置培养。

B.2.7 每天使用倒置显微镜观察细胞状态,记录接种标本的细胞和阴性对照细胞出现的所有变化,包括记录以 1+~4+表示受感染细胞比例的 CPE(1+代表<25%的细胞出现 CPE;2+代表 25%~50%的细胞出现 CPE;3+代表 50%~75%的细胞出现 CPE;4+代表 75%~100%的细胞出现 CPE)、毒性反应、老化或者污染。

B.2.8 如果观察至少 5 d 后仍未出现 CPE,在同一细胞系上进行盲传,随后再观察 5 d(每一份原始粪便标本接种两管相同细胞后,即使两管结果都为阴性,也不能合并后进行再传代)。在判定每一份细胞培养物为阴性并丢弃之前,观察细胞形态时间不少于 10 d。

B.2.9 在标本接种后任何阶段出现特征性的肠道病毒 CPE,如细胞变圆,折光增强,从细胞培养管壁脱离,应记录观察到的结果,并观察 CPE 发展到至少 75%的细胞受到感染($\geq 3+$ CPE)。在这个阶段,使用另一细胞系传第二代。同一份标本接种到两管相同细胞系的细胞培养管,同一天内都出现 $\geq 3+$ CPE 时,此时可以合并,再传至另一种细胞系的细胞培养管中,细胞培养管内含新更换的 1 mL 维持液。

B.2.10 L20B 细胞上出现 CPE 的阳性细胞培养物,转种到 RD 细胞上,然后在 36℃孵育,并每天观察 CPE(图 B.1)。大部分的 RD 细胞将会出现特征性的肠道病毒 CPE,观察直至出现 $\geq 3+$ CPE。随后在-20℃冷冻细胞培养管,直至将其送型内鉴定实验室进行血清型别鉴定和型内鉴定。少部分病毒在 L20B 细胞上出现 CPE,但将其传至 RD 细胞上 CPE 不会重现。RD 细胞培养物应在接种后连续观察 5 d 后报告阴性结果。



^a 观察至少 5 d;

^b 观察至出现 ≥ 3 +CPE(通常 1 d~2 d,最多 5 d;如果出现毒性反应或污染,需重新接种);

^c 未出现病变时,至少传两代,每代 5 d;

^d 合并阳性分离物(两管在同一天出现 3+CPE),然后传至 RD 细胞上;

^e 根据诊断和工作的需要,可对分离到的 NPEV 进行血清型鉴定。

图 B.1 脊髓灰质炎病毒分离的检测流程

B.2.11 RD 细胞上出现 CPE 的阳性细胞分离物,转种到 L20B 细胞上,然后在 36 °C 孵育,并每天观察 CPE(图 B.1)。如果观察至少 5 d 后,L20B 细胞仍然没有出现 CPE,那么这份细胞培养物可以被认为不含有脊髓灰质炎病毒,并以 NPEV 报告。某些情况下,特征性的肠道病毒 CPE 会在 L20B 细胞上出现,观察直至出现 ≥ 3 +CPE。然后将该细胞培养物再次传代至 RD 细胞上,继续观察至 CPE 的出现,此过程的目的是将脊髓灰质炎病毒从混合有其他肠道病毒的混合物中分离出来,并且扩增脊髓灰质炎病毒的滴度。任何出现 ≥ 3 +CPE 的阳性 RD 细胞培养物需保存在 -20 °C 直至将其送至型内鉴定实验室。少部分的 RD 细胞培养物,观察 5 d 后仍然为阴性结果,这时应报告为阴性结果。

B.2.12 除肠道病毒外,某些病毒(如呼肠孤病毒、腺病毒或某些非肠道病毒也可在鼠肺细胞上生长,但这样的病毒产生的 CPE 与肠道病毒产生的特征性 CPE 明显不同。如果定型结果不能确定或无法解释,应将此标本送上级脊髓灰质炎实验室进行进一步分析。

B.3 脊髓灰质炎病毒血清型别鉴定和型内鉴定

B.3.1 型内鉴定实验室将接到两种不同种类的病毒分离物进行鉴定,即:在任何阶段中 L20B 细胞上出现 CPE 的标本,和病毒分离物传至 RD 细胞上,CPE 重现的病毒分离物(种类分别是 L20B+RD+病毒分离物和 RD+L20B+RD+病毒分离物)。

B.3.2 按照 WHO 脊髓灰质炎实验室手册第四版补充材料描述的荧光定量 PCR 方法对所有 L20B+RD+病毒分离物进行型别和型内鉴定。在 PCR 实验之前,不用进行传代和血清型鉴定。

B.3.3 使用荧光定量 PCR 方法对 RD+L20B+RD+病毒分离物进行鉴定时,需要限定使用条件:某份标本只获得了该种阳性分离物,或者同一份标本的相应的 L20B+RD+病毒分离物的 PCR 结果是阴性或 NPEV。

B.3.4 按 WHO 的规定,只有被指定的国家实验室或 WHO 地区参比实验室的型内鉴定结果才被认可,故具体操作步骤从略。

B.4 脊髓灰质炎病毒中和试验鉴定血清型别

B.4.1 准备 4 份组合脊髓灰质炎病毒标准抗血清,各组的组合如下:

- 组合抗 I + II + III 型 3 个型的血清,每型血清在 0.05 mL 内含 20 个单位的中和抗体;
- 组合抗 I + II 型血清,每型血清在 0.05 mL 内含 20 个单位的中和抗体;
- 组合抗 I + III 型血清,每型血清在 0.05 mL 内含 20 个单位的中和抗体;
- 组合抗 II + III 型血清,每型血清在 0.05 mL 内含 20 个单位的中和抗体。

B.4.2 将 4 组抗血清储存液分别加入到如图 B.2 所示的 1 列~8 列,A 行~D 行中去,每孔 50 μ L,加不同的组合血清时需要更换吸尖。

	混合 P ₁ +P ₂ +P ₃		混合 P ₁ +P ₂		混合 P ₁ +P ₃		混合 P ₂ +P ₃		病毒 对照		细胞 对照	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
病毒分离株 X 10 ⁻³	A	◎ ◎	◎ ◎	◎ ◎	◎ ◎	◎ ◎	● ●	● ●	● ●	● ●	◎ ◎	◎ ◎
	B	◎ ◎	◎ ◎	◎ ◎	◎ ◎	◎ ◎	● ●	● ●	● ●	● ●	◎ ◎	◎ ◎
病毒分离株 Y 10 ⁻³	C	◎ ◎	◎ ◎	◎ ◎	◎ ◎	● ●	◎ ◎	◎ ◎	● ●	● ●	○ ○	○ ○
	D	◎ ◎	◎ ◎	◎ ◎	◎ ◎	● ●	◎ ◎	◎ ◎	● ●	● ●	○ ○	○ ○
滴定分离株 X	E	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	◎ ◎	◎ ◎	◎ ◎	◎ ◎	◎ ◎	◎ ◎
	F	● ●	● ●	● ●	● ●	● ●	◎ ◎	◎ ◎	◎ ◎	◎ ◎	◎ ◎	◎ ◎
滴定分离株 Y	G	● ●	● ●	● ●	● ●	● ◎	◎ ◎	◎ ◎	◎ ◎	◎ ◎	◎ ◎	◎ ◎
	H	● ●	● ●	● ●	● ●	● ◎	◎ ◎	◎ ◎	◎ ◎	◎ ◎	◎ ◎	◎ ◎
		-3	-4	-5	-6	-7						

●=CPE ◎=无CPE ○=未用孔

图 B.2 用 96 孔微量板鉴定脊髓灰质炎病毒分离株

B.4.3 加 50 μ L 维持液到病毒对照孔中,A9~D10;加 50 μ L 维持液到回滴孔中,E1~H10;加 100 μ L 维持液到细胞对照孔中,G11~H12,然后盖上盖子。

B.4.4 按 10⁻¹~10⁻⁷ 标记 7 支稀释管,取 0.9 mL 维持液到 1 号~2 号管和 5 号~7 号管中,取 1.8 mL 维持液到 3 号和 4 号管中,用无菌移液器和带滤芯的移液管加 0.1 mL 病毒悬液到第一个管(10⁻¹ 稀释度)中,换一个吸尖,轻轻地并彻底地混匀,避免产生气溶胶。

B.4.5 取 0.1 mL 到第 2 个管子中,丢弃使用过的吸尖,重复稀释的步骤直到第 7 管,注意取 0.2 mL 到第 3 管和第 4 管中。

B.4.6 在第 9 和第 10 列,E 和 F 行中加入 1 号病毒标本 10⁻⁷ 稀释度的病毒到 4 个回滴孔中,在第 7 和第 8 列,E 和 F 行中加入 1 号病毒标本 10⁻⁶ 稀释度的病毒到 4 个回滴孔中,依此类推。

B.4.7 取一个病毒可以使用同一支带滤芯的吸尖,顺序为从高稀释度向低稀释度加,即 10⁻⁷~10⁻³,加

入 50 μL 的病毒到待测孔中;标本 1 的 10^{-3} 稀释度加入到 A1~A10, 10^{-4} 稀释度加入到 B1~B10 等等;重复上两个步骤,加入 2 号病毒标本, G 和 H 行作病毒滴度回滴, 2 号病毒 10^{-3} 稀释度加入到 C1 孔~C10 孔, 10^{-4} 稀释度加入到 D1 孔~D10 孔。

B.4.8 盖上盖子,在 36 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h~3 h,在孵育期间,用胰酶消化细胞,并制备细胞悬液,浓度大约为 1.5×10^5 个/mL 细胞,每块板子至少需要 10 mL。加入 100 μL 细胞悬液到每个待测和对照孔中,如果不使用 CO_2 孵箱,要使用无毒性的封口膜封闭板子。

B.4.9 在 36 $^{\circ}\text{C}$ 孵育。

B.4.10 使用倒置显微镜每天观察并记录有无 CPE 的产生,在病毒对照孔出现 100% CPE 时(通常在 3 d~5 d),继续观察并记录 24 h。

脊髓灰质炎病毒的鉴定和定型结果判定见表 B.1。

表 B.1 脊髓灰质炎病毒血清型鉴定结果

抗血清 I + II + III	抗血清 I + II	抗血清 I + III	抗血清 II + III	病毒鉴定
0	0	0	+	脊髓灰质炎病毒 I 型
0	0	+	0	脊髓灰质炎病毒 II 型
0	+	0	0	脊髓灰质炎病毒 III 型
0	0	+	+	脊髓灰质炎病毒 I 和 II 型混合病毒
0	+	0	+	脊髓灰质炎病毒 I 和 III 型混合病毒
0	+	+	0	脊髓灰质炎病毒 II 和 III 型混合病毒
0	+	+	+	脊髓灰质炎病毒 I、II 和 III 型混合病毒
+	+	+	+	非脊髓灰质炎病毒或脊髓灰质炎病毒与其他肠道病毒的混合病毒

注: + 表示有病变(CPE)。
0 表示无病变(无 CPE)。

附录 C

(规范性附录)

脊髓灰质炎病毒特异性 IgM 抗体测定

C.1 原理

脊髓灰质炎病毒感染机体, IgM 抗体的免疫应答反应最早在感染后 10 d~15 d 即可被捕捉 ELISA 法检测到。一般持续 1 个月后消失。在疑似脊髓灰质炎病人血液中, 尤其是脑脊液中查到 IgM 抗体是一种早期快速特异的诊断方法。但目前所测的 IgM 抗体不能区别疫苗株和野毒株, 故 IgM 阳性的意义, 只有在明确近期无服苗和未接触过疫苗病毒的情况下才能应用。但从脑脊液中查到特异性 IgM 抗体, 如血脑屏障正常, 则即可结合病史诊断为疫苗相关病例或为野病毒病例。在 AFP 患者因故未收集到合格的大便标本如在麻痹 1 个月内血液 IgM 抗体阴性可排除诊断。

C.2 操作步骤

C.2.1 加 0.1 mL 抗人 IgM μ 链抗体于塑料微孔板, 37 °C 过夜。

C.2.2 倒掉液体, 不洗, 用 10% 牛血清的 0.05% 吐温 (Tween-20) 生理盐水 0.2 mL 封闭每孔, 放于 37 °C。

C.2.3 1 h 后倒去上述牛血清封闭液加 1:100 稀释的待测病人血清 (或 1:2 稀释的待测病人脑脊液), 37 °C 作用 1.5 h~2 h。

C.2.4 倒出待测血清 (或脑脊液), 用 0.05% 吐温生理盐水液洗 3 次, 然后分别于上述孔内分别加已知 I 型、II 型和 III 型的脊髓灰质炎抗原, 每型加 2 孔, 每孔 0.1 mL, 置 4 °C 过夜。

C.2.5 吸出抗原, 洗 3 次后, 各相应孔加已知对应的抗血清 (即加 I 型病毒抗原孔加 I 型抗血清, II 型抗原孔加 II 型血清……) 0.1 mL。

C.2.6 37 °C 1 h~1.5 h 后倒去抗体, 洗 3 次后各加酶标抗抗体 0.1 mL。

C.2.7 37 °C 结合 1 h~1.5 h 后倒出酶标抗体, 用洗液洗 3 次, 加邻苯二胺底物, 每孔 0.1 mL。

C.2.8 避光作用 5 min~15 min。

C.2.9 待加正常细胞为对照抗原的孔, 即将显色之时各孔立即加 0.05 mL 2 mol/L 硫酸终止反应。

C.3 测定

在 490 nm 光源下测定 OD 值。

C.4 结果判定

I 型抗原孔阳性即为 I 型 IgM 阳性。

II 型抗原孔阳性即为 II 型 IgM 阳性, 余类推。

C.5 说明

具体说明如下:

a) 邻苯二胺底物的配制为 10 mL pH5.0 柠檬酸磷酸缓冲液中加邻苯二胺 4 mg 再加 30% 过氧化氢 5 μ L。

b) 空白对照即为抗 μ 链抗体包被孔加邻苯二胺底物加硫酸的对照。

参 考 文 献

- [1] David L.Heymann.Control of Communicable Diseases Manual(18th Edition).2004
- [2] Olen M.Kew,Peter F.Wright,Vadim I.Agol,et al.Circulating Vaccine-derived Polioviruses: Current State of Knowledge.Bulletin of the WHO 2004;82(1):16-23
- [3] WHO.WHO-recommended Standards for Surveillance of Selected Vaccine-preventable Diseases.2003
- [4] WHO.Polio Laboratory Manual.4th Edition,2004.Document World Health Organization/IVB/04.10.Geneva,Switzerland
- [5] WHO.Supplement to the WHO Polio Laboratory Manual,An Alternative Test Algorithm for Poliovirus Isolation and Characterization
http://apps.who.int/immunization_monitoring/Supplement_polio_lab_manual.pdf
- [6] WHO.16th Informal Consultation of the Global Polio Laboratory Network.22-23 September 2010.Geneva,Switzerland.WHO/HQ
- [7] WHO.Polio Vaccines and Polio Immunization in the Pre-eradication Era: WHO Position Paper. Wkly Epidemiol Rec 2010;85(23):213-228
- [8] WHO.Polio Vaccines;WHO Position Paper,January 2014.Wkly Epidemiol Rec2014;89(9): 73-92
-