

DOI:10.13215/j.cnki.jbyfktzb.2401015

• XXXX •



新疆《脊髓灰质炎病毒型内鉴定规程》 地方标准解读

王琪, 艾克达·阿布都热依木, 宁静, 朱帕尔古丽·哈那西,

凯赛尔·吾斯曼, 唐海淑

新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心, 乌鲁木齐 830011

摘要: 新疆《脊髓灰质炎病毒型内鉴定规程》地方标准规定了鉴定对象、鉴定来源、鉴定方法、96孔板的合理使用及布局简介、曲线阴性与阳性的判定、最终结果表述规则与判定规则的技术要求, 适用于全区脊髓灰质炎病毒型内鉴定实验全过程。本文对该地方标准的制定背景以及主要内容要点进行了解读, 便于全区各实验室运用此标准开展脊髓灰质炎病毒型内鉴定相关实验, 规范实验流程, 统一最终结果表述和结果判定。

关键词: 脊髓灰质炎病毒; 型内鉴定; 地方标准

中图分类号: R512.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3711(XXXX)XX-0001-03

Interpretation of local standards of code of practice for intratypic differentiation of poliovirus of Xinjiang

WANG Qi, Aikeda ABUDUREYIMU, NING Jing, Zhupaerguli HANAXI,

Kaisaier WUSIMAN, TANG Hai-shu

The Center for Disease Control and Prevention of Xinjiang Uygur Autonomous Region,

Urumqi, Xinjiang 830011, China

Corresponding author: TANG Hai-shu, E-mail: E-mail:tanghaishu2000@163.com

Abstract: The local standard of the *Code of Practice for Intratypic Differentiation of Poliovirus* of Xinjiang specified object identification, origin identification, method of identification, rational use and layout of 96-well plates, determination of negative and positive of curve, and the technical requirements for final results expression rules and determination rules. It applicable to the whole process of intratypic differentiation of poliovirus. In this paper, the background and the key points of main content of the local standard are interpreted. It is convenient for all laboratories in the region to use this standard to carry out relevant experiments on intratypic identification of poliovirus, standardize the experimental process, and unify the final result expression and result determination.

Keywords: Poliovirus; Intratypic differentiation; Local standard

脊髓灰质炎(简称脊灰)的病原体是脊灰病毒(poliiovirus, PV), 属于小核糖核酸病毒科(picornaviridae)肠道病毒属(*enterovirus*)C组成员。PV 主要经粪-口途径传播, 在肠道中复制效率很高, 可侵入神

经系统, 传染性很强。脊灰是一种急性传染病, 5岁以下儿童易感^[1]。预防脊灰所用的疫苗包括口服脊灰减毒活疫苗(oral poliovirus vaccine, OPV)和脊灰灭活疫苗(poliiovirus vaccine, inactivated, IPV), 是根据脊灰病毒3个血清型病毒分别制备后按不同比例配制而成, PV根据抗原性的不同可分为I、II、III型血清型, 各型间很少交叉免疫^[2]。通常的脊灰病例指野病毒引发的病例, 以I型最多、占80%~90%, 其次为III型。OPV在易感者体内复制可导致神经毒力增强(回升), 形成疫苗衍生脊灰病毒(vaccine-derived poliovirus,

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(2021D01C122)

作者简介: 王琪(1991-), 男, 医师, 学士, 从事疾病预防控制工作, E-mail: 349115711@qq.com

通信作者: 唐海淑, E-mail: tanghaishu2000@163.com

VDPV), 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);此外,OPV 可能使服苗者及其接触者发生疫苗相关麻痹型脊灰病例。

2011 年 8 月,新疆维吾尔自治区南部地区发生了来自巴基斯坦的 I 型脊灰野病毒输入性疫情^[3],出现了 21 例脊灰病例的暴发。新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心(简称疾控中心)迅速采取应对措施,在南部地区开展了 5 轮次 40 岁以下人群的脊灰疫苗补充免疫,同时在北部地区也开展了 3 轮次 40 岁以下人群的脊灰疫苗补充免疫。经过各级组织一系列的应急反应,2011 年 10 月,新疆成功阻断了脊灰野病毒的传播,2012 年 10 月,经过认证新疆恢复了无脊灰状态。2018 年 4 月,新疆在环境污水中分离到 II 型 VDPV,但未追溯到最终来源。经分析提出来源的假设,可能来源于境外输入,新疆与巴基斯坦商贸往来较多,且 2016 年巴基斯坦曾报道有 II 型 VDPV 循环,可能由该国输入。2020 年 9 月,新疆在环境污水中又发现了 I 型 VDPV^[5]。上述事件充分表明了新疆的消除脊灰工作面临着极大的挑战,任重道远。

1 标准主要规范的内容和特点

1.1 明确了适用范围 新疆《脊髓灰质炎病毒型内鉴定规程》地方标准适用于任何脊灰病毒型内鉴定的相关实验活动,规定了实验过程中待测反应孔检测结果,对脊灰病毒进行血清型和基因型的鉴定结果判定。

1.2 制定标准的意义及可行性 目前与新疆接壤的阿富汗脊灰野病毒仍然流行,风险评估结果表明,新疆面临着极大的脊灰野病毒输入风险,2011 年新疆南部地区的 I 型脊灰野病毒输入疫情时长波及 2 个月。自 2013 年开始,脊灰病毒型内鉴定工作由省级实验室开展,而我国尚未建立脊灰病毒型内鉴定实验活动相应的规范化标准,目前使用的方法及流程均参考相关的培训手册,该手册不具有法律效力,不能作为检验检测机构出具检验检测报告的有效依据,因此制定相应的标准是必然趋势。本标准起草小组自 2013 年起,运用该标准中的技术方法参加世界卫生组织举办的脊灰病毒型内鉴定盲样考核,通过与全国各省脊灰实验室的室间比对,均以优异成绩通过考核;运用该标准中的技术方法对 420 株脊灰病毒进行了型内鉴定,正确率为 100%,积累了大量实验数据,充分验证了该标准的科学性及可行性,为标准的制定夯实了基础。

1.3 制定标准的原则 制定新疆《脊髓灰质炎病毒型内鉴定规程》地方标准的遵循如下原则:①适用性和适用范围。标准所涵盖的领域既不能过宽,使其没有

实际技术内容,也不能过窄,导致标准的碎片化,无谓地增加项目;②先进性。制定标准时以满足既定需求、满足实际需要为出发点,避免一味地追求高性能、高指标而造成经济浪费;保证统一性和协调性;编写草案过程中,充分调查研究,在预期可达到的条件下,积极地纳入先进技术。

1.4 制定标准的依据及与现行法规的关系 依据 WS 294—2016《脊髓灰质炎诊断》是指导脊灰网络实验室进行脊髓灰质炎病毒分离实验活动的行业标准,也是制定新疆《脊髓灰质炎病毒型内鉴定规程》地方标准的依据。《脊髓灰质炎诊断》规定,分离到的脊灰病毒要用实时荧光定量 RT-PCR 方法进行型内鉴定,但未说明详细的型内鉴定流程。因此,本标准是对《脊髓灰质炎诊断》的补充和完善,详细说明了脊灰病毒型内鉴定的操作流程,与《脊髓灰质炎诊断》并无冲突。

2 主要内容的解读

2.1 鉴定方法解读 目前脊灰网络实验室开展脊灰病毒型内鉴定采用的是 rRT-PCR 方法。该方法由于具有探针和引物双重保证,因而特异性高、灵敏度高、线性关系好,通过荧光信号的检测可以直接对产物进行定量,利用荧光标记探针可以提高检测的特异性,不需要考虑引物二聚体和其他非特异性扩增,只与特异性的模板发生反应,因而特异性很好,尤其是 Taq-Man 探针法利用荧光标记探针可以提高检测的特异性^[6],假阳性率低。此方法无需提取核酸,而且 PCR 产物不污染环境,操作简单、快速,实现了多重反应、自动化程度高、无污染,具有实时性和准确性等特点。

2.2 鉴定原理解读 脊灰病毒所用的 rRT-PCR 检测方法包括型内鉴定(ITD)rRT-PCR 和 VDPV rRT-PCR,可对脊灰病毒进行血清型和基因型的鉴定。根据两者检测目的不同,设计了多套不同的引物和探针,每套引物和探针均高度特异对应于不同血清型和基因型的病毒检测^[7],不同引物和探针既可用于 3 种血清型病毒单独检测,也可用于 3 种混合血清型病毒的同时检测,使用更加灵活,并且单独检测与同时检测效果没有显著差异。ITD rRT-PCR 结果为疫苗类似株时,需要进行下一步的 VDPV 筛查。

2.3 结果表述规则和判定规则解读 实时荧光定量 RT-PCR 方法有探针和引物双重保证,同时还实现了对 DNA 模板的定量,因而具有灵敏度高、特异性好、可靠性强、实时性和准确性等特点^[7],结合 ITD rRT-PCR 和 VDPV rRT-PCR 的结果形成最终的结果表述。脊灰病毒型内鉴定结果判定规则解读如下:ITD rRT-

PCR 同一个标本不同引物鉴定结果若出现 Sabin I 和(或)Sabin III 为阳性(两种情况均可,下同),则结果表述为 I 型疫苗类似株和(或)III 型疫苗类似株;若出现 WPV1 和(或)WPV3 阳性,则结果表述为 I 型非疫苗类似株和(或)III 型非疫苗类似株,且高度怀疑为野毒株;若出现 Sabin II 和(或)PV2 阳性,则结果表述为 II 型脊灰病毒,若出现 PanPV 为阳性且 Sabin I、Sabin II、Sabin III 均为阴性,则再次进行重复实验或开展测序工作;若出现 PanEV 为阳性且 PanPV 为阴性,则结果表述为非脊灰肠道病毒;若出现 PanEV 为阴性且 PanPV 为阳性,则结果无效再次重复实验;若出现 PanEV 为阴性,则结果为非肠道病毒;当表述为 I 型疫苗类似株和(或)III 型疫苗类似株时,需要进行 VDPV rRT-PCR。VDPV rRT-PCR 同一个标本不同引物鉴定结果若出现 VDPV1 或(和)VDPV3 为阳性,则结果表述为 I 型疫苗类似株或(和)III 型疫苗类似株;若出现 VDPV1 或(和)VDPV3 为阴性,则结果表述为 I 型非疫苗类似株或(和)III 型非疫苗类似株。最终结果表述为:当 ITD rRT-PCR 和 VDPV rRT-PCR 结果表述一致时,则为 I 型疫苗类似株或(和)III 型疫苗类似株;当 ITD rRT-PCR 和 VDPV rRT-PCR 结果表述不一致时,则为不一致的 I 型疫苗类似株或(和)III 型疫苗类似株。

目前实时荧光 PCR 定量分析技术,已成为公认的最具应用前景的靶模板拷贝数的定量分析技术,在基因表达、基因工程、药物疗效、病原体检测和转基因成分检测等领域中得到广泛应用^[8],该方法经历了 4 次发展与完善,扩增引物和探针、扩增条件、扩增时间、以及荧光报告基团、淬灭基团和操作步骤均有所优化^[9]。新疆维吾尔自治区疾控中心脊灰实验室是全球脊灰网络实验室成员之一,2013 年正式开展脊灰病毒型内鉴定工作。建立新疆《脊髓灰质炎病毒型内鉴定规程》地方标准后,使全区脊灰病毒型内鉴定实验活动有法可依、有据可循,保证了相关实验活动的实验报告的科学性和准确性,拓展全区地方标准的涵盖

面,同时也为新疆维吾尔自治区疾控中心检验检测项目认证认可和脊灰实验室能力验证提供依据和标准;若再次出现 2018 年新疆外环境污水中分离到 II 型疫苗衍生脊灰病毒的类似情况^[4],各级疾控中心也可使用该标准对脊灰病毒进行型内鉴定,及时获得检测结果;若发生脊灰疫情,可及早为决策提供依据,使预防关口前移。

利益冲突 无

参考文献

- [1] 范明,刘桂艳,周剑惠,等.吉林省 2000—2012 年急性弛缓性麻痹病例中脊髓灰质炎病毒的鉴定[J].中国疫苗和免疫,2015,21(1):24-28.
- [2] 唐海淑,崔惠,翟啸虎,等.脊髓灰质炎病毒检测方法的研究进展[J].中国疫苗和免疫,2017,23(3):337-341.
- [3] 温宁,罗会明,汪海波,等.2011 年新疆维吾尔自治区发生输入脊髓灰质炎疫情后对各省(自治区、直辖市)输入传播风险评估及应对的研究[J].中国疫苗和免疫,2013,19(3):193-198.
- [4] 唐海淑,李晓嫒,凯塞尔·吾斯曼,等.2018 年新疆维吾尔自治区外环境污水中分离到 1 株 II 型疫苗衍生脊髓灰质炎病毒[J].中国疫苗和免疫,2019,25(4):368-372.
- [5] 唐海淑,沙吾拉西·热加甫,李晓嫒,等.2020 年新疆维吾尔自治区喀什市环境污水中首次分离到 I 型疫苗衍生脊髓灰质炎病毒的早期应对[J].中国疫苗和免疫,2022,28(4):381-384.
- [6] 杨晓瑞,吴学炜,臧利敏,等.HBV cccDNA SYBR Green I 荧光定量检测方法的建立及初步应用[J].现代预防医学,2012,39(16):4200-4204.
- [7] 田燕,梁洁,陆志刚.流感病毒不同检测方法的探讨[J].现代预防医学,2013,40(20):3845-3847,3850.
- [8] 邓平建,杨冬燕.探讨降低实时荧光 PCR 定量分析系统误差的对策[J].中国卫生检验杂志,2011,21(2):287-289.
- [9] 唐海淑,杜相品,甫尔哈提·吾守尔,等.脊髓灰质炎病毒实时荧光定量 RT-PCR 方法的应用与发展[J].国际检验医学杂志,2016,37(18):2603-2605.

收稿日期:2024-01-05 修回日期:2024-01-08 本文编辑:应瑞洁