

手足口病实验室手册

2010年第4版

国家脊髓灰质炎和国家麻疹实验室

2010年08月01日

手册由国家脊髓灰质炎实验室和国家麻疹实验室依据《卫生部手足口病预防控制指南》相关指导原则编制。

主要写作和编辑人员：张勇，祝双利，严冬梅，王东艳，崔爱利，毛乃颖，许文波。

缩略语

Hand, Foot, and Mouth Disease (HFMD): 手足口病

HEV-71 (Human Enterovirus 71): 肠道病毒71型

CAV-16 (Coxsackievirus A-16): 柯萨奇病毒A组16型

IgM: 免疫球蛋白M

IgG: 免疫球蛋白G

目 录

| | |
|---------------------------------------|----|
| 手足口病简介和实验室检测基础 | 4 |
| 一. 手足口病病原学 | |
| 二. 手足口病流行病学 | |
| 三. 手足口病诊断标准 | |
| 四. 手足口病实验室检测原则 | |
| | |
| 实验室检测标准操作规程(SOP) | 10 |
| 一. 细胞培养技术 | 10 |
| 二. 肠道病毒分离技术 | 22 |
| 三. 测定人双份血清标本的中和抗体滴度 | 29 |
| 四. 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测肠道病毒核酸 | 35 |
| 五. 实时荧光RT-PCR(rRT-PCR)法检测肠道病毒核酸 | 41 |
| 六. HEV71(或CVA16) IgM抗体检测 | 47 |
| 七. 实验室生物安全 | 49 |

手足口病简介和实验室检测基础

手足口病（Hand-foot-mouth disease, HFMD）又名发疹性水疱口腔炎，是由一组人肠道病毒引起的常见传染病，临床表现以发热和手、足、口腔和臀部等部位出现皮疹为主要临床特征的一种急性传染病。绝大多数HFMD患者预后良好，一般可在5~7d痊愈，属于自限性疾病。病毒还可以侵犯呼吸系统、中枢神经系统心血管系统等引起脑炎、心肌炎、肺水肿、弛缓性麻痹等症状，个别危重患儿可因多种原因导致死亡。该病全年均可发病，好发于夏秋季，常见于5岁以下的儿童。HFMD的主要传播途径是粪-口途径，亦可通过呼吸道传播。HFMD传染性强，易导致流行或暴发。

一、病原学

引起 HFMD 的病原体主要为微小核糖核酸病毒科（*Picornaviridae*）肠道病毒属的柯萨奇病毒（Coxsackie virus）A 组的 2、4、5、7、9、10、16 型，柯萨奇病毒 B 组的 1、2、3、4、5 型；部分埃可病毒（ECHO-viruses）和肠道病毒 71 型。最常见为柯萨奇病毒 A 组 16 型（CA16）及肠道病毒 71 型（EV71）。肠道病毒适合于在温暖、潮湿的环境中生存与传播。对外界有较强的抵抗力，对乙醚、去氯胆酸盐等不敏感，75%酒精、5%来苏都不能将其杀灭。对紫外线及干燥敏感，各种氧化剂（高锰酸钾、漂白粉等）、甲醛、碘酒或 56℃30 分钟都能将其灭活。但 1mol 浓度二价阳离子环境可提高病毒对热灭活的抵抗力，病毒在 4℃可存活 1 年，在- 20℃可长期保存，在外环境中病毒可长期存活。

二、流行病学

1. 传染源

人是人肠道病毒的唯一自然宿主，因此病人和隐性感染者是 HFMD 的主要传染源。患者在发病前数天即有传染性，通常以发病后一周内传染性最强。患者疱疹液中的病毒含量大，破溃时病毒即溢出。咽部分泌物的排毒时间一般可持续 1~2 周，粪便约 3~5 周。

2. 传播途径

该病传播方式多样，以粪-口传播途径为主。主要是由于人接触了被患者或隐性感染者的粪便、咽部分泌物、疱疹液污染的毛巾、手绢、牙杯、玩具、食具、奶具以及床上用品、内衣等，经口感染发病。也可通过呼吸道（飞沫，咳嗽或打喷嚏）传染，亦可经由接触病人皮肤水泡的液体而

受到感染。HFMD 患者粪便污染环境水、蔬菜和海产品等，人食用也可引起感染。在发病前数天，喉咙部位与粪便就可发现病毒，此时即有传染性，通常以发病后一周内传染力最强。

3. 人群易感性

人对引起 HFMD 的肠道病毒普遍易感，各年龄组均可感染发病，但以隐性感染为主，隐性感染与显性感染之比约为 100:1。由于机体受病毒感染后，产生的中和抗体可在体内存留较长时间，对同型病毒感染产生比较牢固的免疫力，因此，HFMD 的患者主要为学龄前儿童，尤其是 5 岁以下儿童，占发病数 90% 以上。而大多数成人可携带病毒但不发病。1 岁以内的儿童发生心肌炎、脑炎等重症的比例较 1 岁以上儿童高。

4. 流行特征

HFMD 是一种全球性常见传染病，世界大部分国家和地区均有此病流行的报导。1957 年新西兰首次报导，1958 年分离出柯萨奇病毒，1959 年国际上正式命名为手足口病 (HFMD)，1972 年美国科学家证实 EV71 也可引起 HFMD。此后 EV71 感染与 CA16 感染交替出现，成为 HFMD 的主要病原体。

HFMD 分布极广泛，无严格地区性。HFMD 全年均可发病，有明显的季节特点，以夏秋季多见。常从 3、4 月份增多，9 月以后减少。可出现间隔 2~3 年的周期性流行。本病常呈暴发流行后散在发生，该病流行期间，幼儿园和托儿所易发生集体感染。家庭也有此类发病集聚现象。医院门诊的交叉感染和口腔器械消毒不严格，也可造成传播。天津市两次较大流行，托幼单位儿童发病率明显高于散居儿童。家庭散发，常一家一例；家庭暴发，一家多人或小孩子与成人全部感染发病。此病传染性强，传播途径复杂，流行强度大，传播快，在短时间内即可造成大流行。

三、HFMD 诊断

- 1. 流行病学史：**与确诊的手足口病患者有接触史或近期到过曾经手足口病流行地区，经过 3d~5d（一般为 2d-10d）的潜伏期。
- 2 临床表现：**急性起病，发热，口腔粘膜出现散在疱疹，手，足和臀部出现斑丘疹、疱疹。可伴有咳嗽、流涕、食欲不振等症状。部分病例表现不典型。少数病例出现病情进展迅速，出现脑膜炎、脑炎、脑脊髓炎、肺水肿、循环障碍等，可致死亡。
- 3. 疑似病例：**任何病因不明的手、足和口腔粘膜等部位出现斑丘疹和疱疹，伴或不伴发热的病例；HFMD 流行季节 3 岁以下不明原因脑干脑炎病例或肺水肿病例。
- 4. HFMD 确诊病例：**典型病例依据手、足、口等部位典型皮疹即可做出 HFMD 临床诊断。但皮疹不典型病例或无皮疹的重症病例依据临床很难做出正确诊断，必须结合流行病学和实验室检

测结果做出最终诊断。**诊断原则：根据流行病学史、临床表现、实验室检测结果等进行综合分析做出诊断。**

怀疑为 HFMD 患者满足下列条件之一既可确诊为 HFMD。

- 1). 从疑为 HFMD 患者疱疹液、鼻或咽拭子、脑脊液、粪便中（肛拭子）或尸检标本中检测 EV-71 或 CAV-16 或其它可以引起 HFMD 的肠道病毒特异性核酸。
- 2). 从疑为 HFMD 患者的血清或脑脊液中检测到抗 EV-71 或 CAV-16 或其它可以引起 HFMD 的肠道病毒 IgM 抗体。
- 3). 从疑为 HFMD 患者的急性期与恢复期血清中检测到 EV-71 或 CAV-16 或其它可以引起 HFMD 的肠道病毒 IgG 抗体阳转或有 4 倍及以上增高（ELISA 法或中和试验）。
- 4). 从疑为 HFMD 患者疱疹液、鼻或咽拭子、脑脊液、粪便标本（肛拭子）、咽拭子标本或尸检标本中分离到病毒，并鉴定为 EV71 或 Cox A16 或其它可以引起 HFMD 的肠道病毒。

四、HFMD 实验室检测

1. HFMD 的实验室检测原则和程序

HFMD 的实验室诊断一般是直接从临床标本中检测肠道病毒的核酸或检测血清中相应肠道病毒 IgM 抗体。也可以通过采集适当的临床标本进行病毒分离和病毒鉴定。

很多血清型的肠道病毒能引起 HFMD，不同细胞系对不同病毒的敏感性是有所不同的，而不同时期肠道病毒的流行株也不同。通常用于肠道病毒分离的细胞系为 RD 细胞（对 CA16 和 EV71 敏感）、HEp-2 细胞（对某些 ECHO 病毒敏感）等，联合使用上述两种或更多细胞（如 Vero 细胞）有助于分离到更多的肠道病毒。

使用血清型特异性的中和抗血清进行的中和实验是肠道病毒鉴定的基本方法，如果使用了适当的抗血清，实验结果是比较可靠的。因为肠道病毒包括若干个血清型，通常使用组合抗血清进行鉴定，有些组合抗血清已经商品化。

2. HFMD 患者标本的采集、运送和保存

用于病毒分离的标本包括 HFMD 患者疱疹液、鼻或咽拭子、脑脊液、粪便标本（肛拭子）、咽拭子标本或尸检标本中，对于血清学 IgM 检测，需采集急性期血清（发病 0-28 天）。临床标本在运输和贮存过程中要避免反复冻融，如果不能确保 -20℃ 的条件，应该在 0~8℃ 运输和保存。标本运输时要附有必要的信息，如标本编号、发病日期和标本采集日期。

- 1). 粪便标本

采集病人发病7日内的粪便标本，用于病原检测。粪便标本采集量5~8g/份，采集后立即放入无菌采便管内，4℃暂存立即（12h内）送达实验室，-20℃以下低温冷冻保藏，需长期保存的标本存于-70℃冰箱。

2). 咽拭子标本

采集病人发病3日内的咽拭子标本，用于病原检测。用专用采样棉签，适度用力拭抹咽后壁和两侧扁桃体部位，应避免触及舌部；迅速将棉签放入装有3~5ml保存液（维持液或生理盐水，推荐使用维持液）的采样管中，在靠近顶端处折断棉签杆，旋紧管盖并密封，以防干燥。4℃暂存立即（12h内）送达实验室，-20℃以下低温冷冻保藏，需长期保存的标本存于-70℃冰箱。

3). 血清标本

采集急性期（发病0~3d）和恢复期（发病14~30d）双份配对血清用于抗体检测。静脉采集3~5ml全血，置于真空无菌采血管中，自凝后，分离血清，将血清置于-20℃以下冰箱中冷冻保存。

4). 疱疹液

在HFMD的实验室诊断中，从疱疹液中分离病毒具有很高的诊断价值，可同时采集多个疱疹作为一份标本。先用75%的酒精对疱疹周围的皮肤进行消毒，然后用消毒针将疱疹挑破用棉签蘸取疱疹液，迅速将棉签放入内装有3~5ml保存液（维持液或生理盐水，推荐使用维持液）的采样管中，在靠近顶端处折断棉签杆，旋紧管盖并密封。所采集标本4℃暂存立即（12h内）送达实验室，-20℃以下低温冷冻保藏，需长期保存的标本存于-70℃冰箱。

5). 脑脊液标本

出现神经系统症状的病例，要采集脑脊液标本，进行病原和抗体检测，从脑脊液中分离病毒也具有很高的诊断价值（但EV71和CA16在脑脊液中很难检测出来）。采集时间为出现神经系统症状后3天内，采集量为1.0~2.0ml。采集后立即装入无菌带垫圈的冻存管中，4℃暂存立即(12h内)送达实验室，-20℃以下低温冷冻保藏，需长期保存的标本存于-70℃冰箱。

6). 病例密切接触者标本的采集

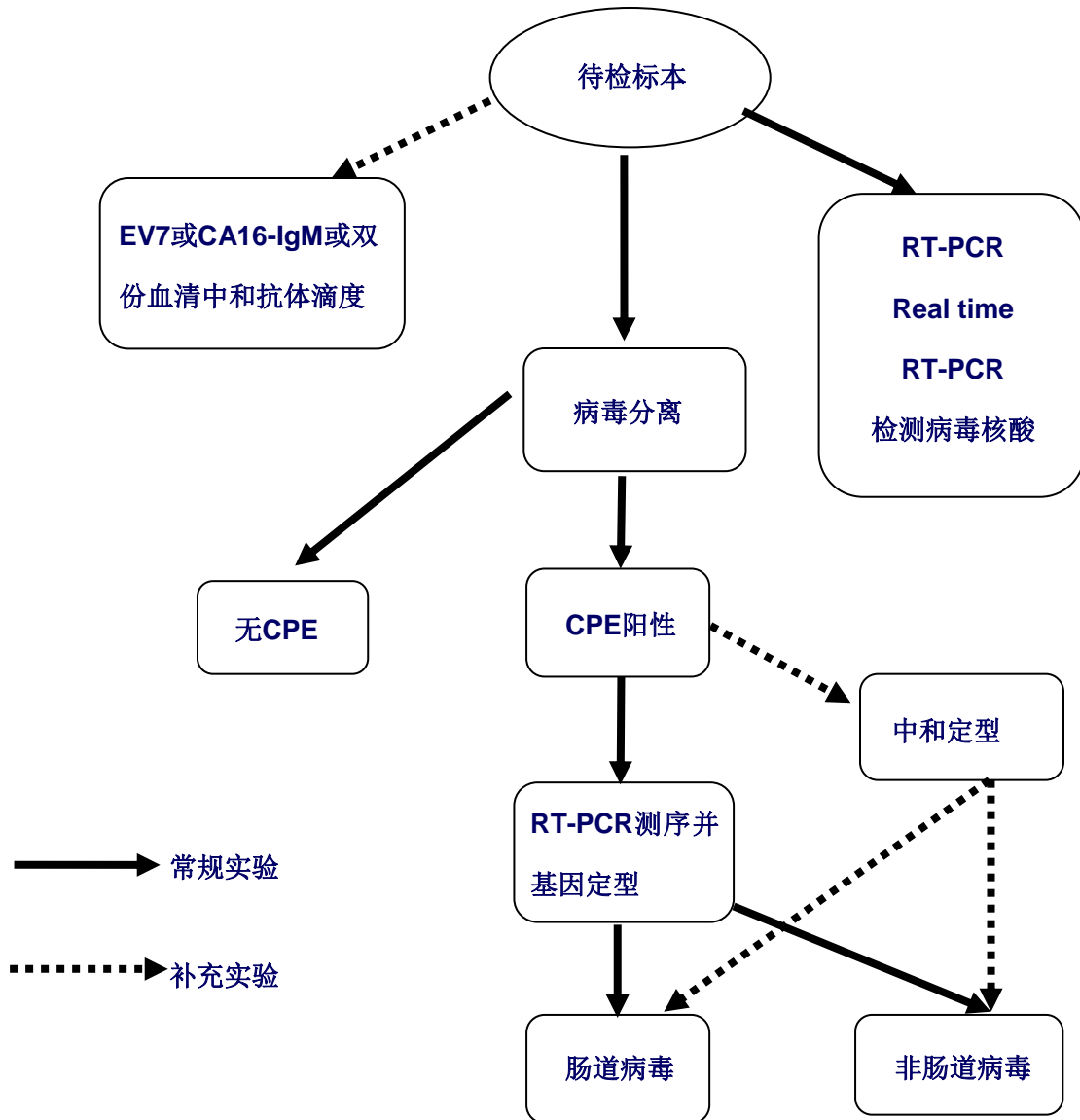
选择典型病例所在的托幼机构、或所在村，以新发病例密切接触者为采样对象，采集单份粪便和血清标本。

7). 健康对照儿童标本的采集

选择患儿发病所在社区（村）的临近无病例的社区（村）或托幼机构。采集7岁以下的儿童单份粪便和血清标本。

3. HFMD的实验室检测策略流程图

手足口病的实验室检测流程见下图：



实验室检测标准操作规程（SOP）

一. 细胞培养技术

保持细胞培养的顺利进行依赖对培养条件和传代过程的认真负责。此外，对于细胞质量的三个最基本特性：纯度、真实性和稳定性，也需严加注意。

1、细胞培养的重要条件

必须满足下列重要条件，以使细胞培养获得成功：

- 孵箱温度为36℃；
- 细胞生长所需pH范围为7.2~7.4。

葡萄糖和L-谷氨酰胺的浓度对细胞生长有较大影响，每种细胞在培养之前需找到这两种物质的最适浓度（葡萄糖和L-谷氨酸盐的标准浓度分别为1~4mM 和2mM）。细胞生存所必需的某些无机离子、氨基酸和维生素来自加到基础液（Eagle's MEM液，基本培养基）中的补充试剂。氧和二氧化碳也是必需的，其来源是向细胞培养中供应二氧化碳和空气的混合气体（即培养于二氧化碳孵箱中），或是细胞培养瓶加盖密封后，由细胞代谢产生二氧化碳。

2、细胞系的选择

许多细胞系可支持人肠道病毒（EV71、CA16）生长。

对于检测HFMD和AHC的病原来讲，建议所有怀疑含EV71、CA16等人肠道病毒的标本均需接种到以下两种细胞系：

- RD细胞，来源于人横纹肌肉瘤细胞。
- HEp-2细胞，来源于人喉癌上皮细胞。

3、细胞传代的原理

当RD细胞和HEp-2细胞生长达到一定密度后，都需做传代处理，传代的频率或间隔与培养液的性质、接种细胞数量和细胞增殖速度等有关。这里所称的细胞传“一代”一词，系仅指从细胞接种到消化再培养时的一段时间，这已成为细胞培养工作中的一种习惯说法，它与细胞世代

（Generation）或细胞倍增（Doubling）一代非同一含义。如某一细胞系为第183代细胞，即指该细胞系已传代183次。在细胞一代中，细胞能倍增3~6次。细胞传一代后，一般要经过以下三个阶段：

1). 潜伏期（Latent Phase）：

细胞接种培养后，先经过一个在培养液中呈悬浮状态的**悬浮期**。此时细胞胞质回缩，胞体呈

圆球形。接着是细胞附着或贴附于底物表面上，称**贴壁**，悬浮期结束。各种细胞贴附速度不同，这与细胞的种类、培养基成分和培养瓶底面的理化性质等密切相关。RD细胞和HEp-2细胞都是连续细胞系，贴附速度较快，约**30~120min**即可完成贴附。

细胞贴附于支持物后，先发生延展过程变成极性细胞，然后还要经过一个潜伏阶段，才进入生长和增殖期。细胞处在潜伏期时，可有运动活动，但基本无增殖，少见分裂相。细胞潜伏期与细胞接种密度、细胞种类和培养基性质等密切相关。RD细胞和HEp-2细胞属于连续细胞系，细胞潜伏期较短，约**24~48h**。

2). 指数增生期 (Logarithmic growth Phase) :

当细胞分裂相开始出现并逐渐增多时，标志细胞已进入指数增生期。指数增生期是细胞增值最旺盛的阶段，细胞分裂相增多。体外培养细胞分裂指数受细胞种类、培养液成分、pH、培养箱温度等多种因素的影响。pH和培养液中胎牛血清含量对细胞分裂指数有很大影响。**指数增生期是细胞一代中活力最好的时期，因此是进行各种实验最好的和最主要的阶段。**在接种细胞数量适宜情况下，指数增生期持续3~5d后，随细胞数量不断增多、生长空间渐趋减少、最后细胞相互接触汇合成片。细胞相互接触后，如培养的是正常细胞，由于细胞的相互接触能抑制细胞的运动，这种现象称**接触抑制**。

3). 停滞期 (Stagnate Phase) :

细胞数量达饱和密度后，细胞遂停止增殖，进入停滞期。此时细胞数量不再增加，故也称平顶期 (Plateau)。停滞期细胞虽不增殖，但仍有代谢活动，继而培养液中营养渐趋耗尽，代谢产物积累、pH降低。此时需做分离培养即**传代**，否则细胞会中毒，发生形态改变，重则脱落死亡。

4、试剂配置

生长液、维持液的配制见下表：

| | 生长液 (GM) | 维持液 (MM) |
|----------------------------|----------|----------|
| Eagle's液 (MEM) | 84.5ml | 91.5ml |
| L-谷氨酰胺 (200mM) | 1.0ml | 1.0ml |
| 胎牛血清 | 10.0ml | 2.0ml |
| 7.5% NaHCO ₃ 溶液 | 2.5ml | 3.5ml |
| HEPES溶液 (1M) | 1.0ml | 1.0ml |
| P.S溶液 (青霉素及链霉素) | 1.0ml | 1.0ml |

5、细胞传代

1) **RD细胞和HEp-2细胞的维持。**细胞培养中需要下列物品:

- 细胞培养瓶中有长满单层的RD细胞和HEp-2细胞（不可使用已长满超过两周的细胞）；
- 显微镜、洁净工作台、孵箱；
- 不完全PBS（PBS-）、胰蛋白酶/EDTA、生长液；
- 台盼蓝[细胞计数时用，0.1% w/v 溶解于PBS(-)]；
- 细胞计数板、计数器；
- 5 ml小试管；
- 细胞培养管和培养瓶（25cm²）；
- 无菌吸管；
- 200μl吸尖、200μl移液器；
- 记号笔、废液缸。

2) **操作步骤:**

- (1) 首先打开洁净工作台的风扇和光源，将前玻璃窗打开至安全位置，将所需物品放到工作台里；
- (2) **[在实验台上]**检查细胞的质量（如是否为长满单层的健康细胞），并观察一下有无发生污染，同时写上实验者的名字；
- (3) **[在洁净工作台中]**用PBS(-)轻洗细胞2次。轻轻倒掉细胞培养瓶内的生长液，轻轻加入2ml PBS(-)，用PBS(-)轻洗融合成单层的细胞。倒掉PBS(-)，再重复1次；
- (4) **[在洁净工作台中]**用胰酶/EDTA处理细胞。将2ml胰酶/EDTA（0.25%胰蛋白酶和1:5000 EDTA溶液等量混合）加入细胞单层，使消化液均匀地分布在细胞层上（一个25 cm² 培养瓶用2~3 ml 消化液即足够），然后将液体倒入废液缸；
- (5) 36℃孵箱中孵育约5min。把培养瓶放到36℃孵箱，直至细胞从瓶上脱离。轻拍培养瓶几次也有助于细胞的分离，在倒置显微镜下检查细胞是否已全部脱落（全部脱落时细胞变圆）。在等待的时候，将2个5 ml小试管置于试管架上；
- (6) **[在洁净工作台中]**用生长液重悬细胞。用生长液重悬细胞（一个25 cm² 培养瓶加入10 ml生长液即可），生长液中的血清可终止胰蛋白酶的作用。用无菌吸管轻吹细胞悬液数次，直至细胞团被吹散，注意不要产生过多气泡。取0.5ml悬液至5 ml小试管中，用于细胞计数（见下一节）；
- (7) **[在实验台上]**细胞计数（见下一节）；
- (8) 用生长液稀释至所需的细胞浓度，可用细胞计数法决定，**当实验室引入新细胞系或新复苏的**

细胞传代时，务必使用细胞计数法决定，其余情况下可按照已经确定好的分瓶比例，通常可将1瓶细胞分成4瓶（1：4）或更多瓶；

- (9) 向新的细胞瓶中加入适量的生长液，并加入适量的细胞悬液；
- (10) 在细胞培养瓶上标明实验者的姓名、细胞名称、传代日期及细胞代数；
- (11) 盖紧细胞培养瓶或培养管的盖子，置于36℃孵箱培养；
- (12) 将各项物品拿出洁净工作台，放回原位；
- (13) 关闭日光灯，打开紫外灯（不要直视紫外灯），保持风扇运转数分钟后，关闭风扇；
- (14) 当细胞接近长满单层时（2~3d）改换成维持液，经过细胞计数后确定分瓶比例，可以确定为日后传代的分瓶比例，通常每5~7d传代一次。

注意：不同类型培养器皿中RD细胞与HEp-2细胞近似的接种体积及接种细胞量

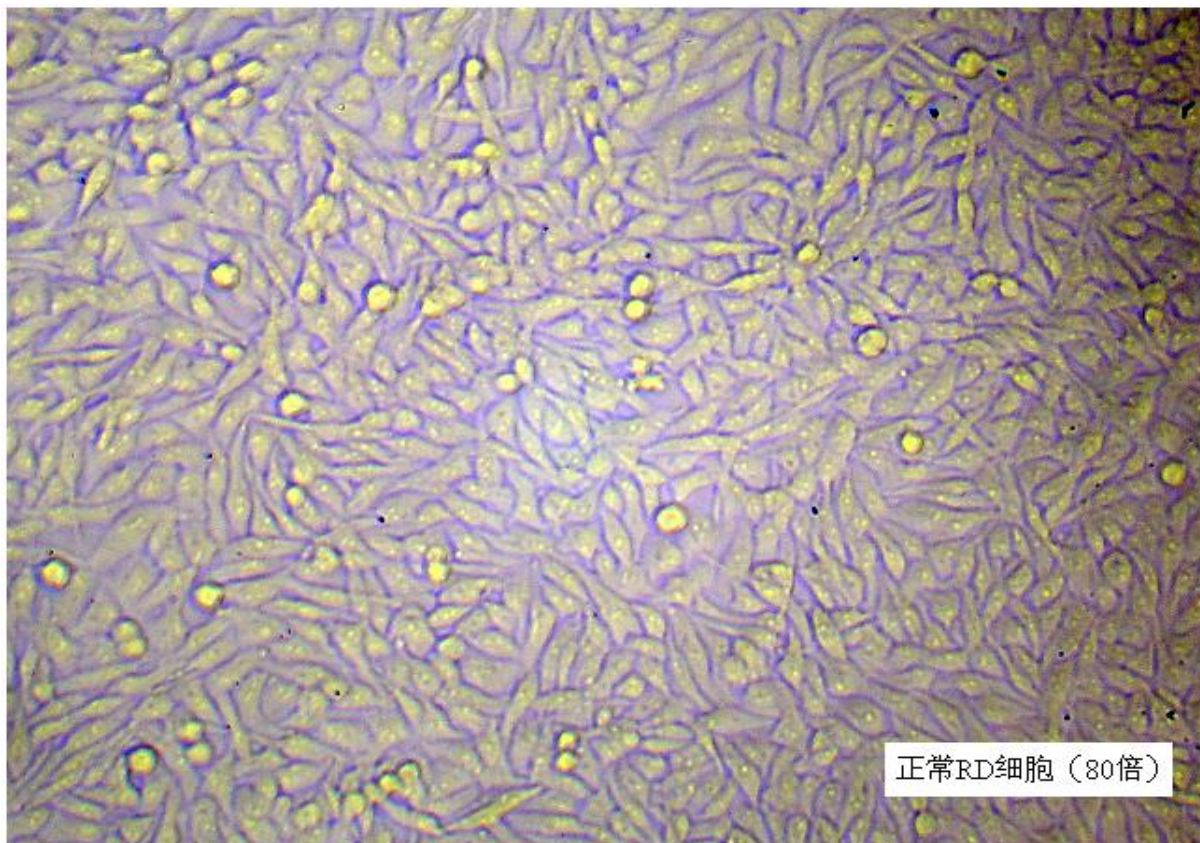
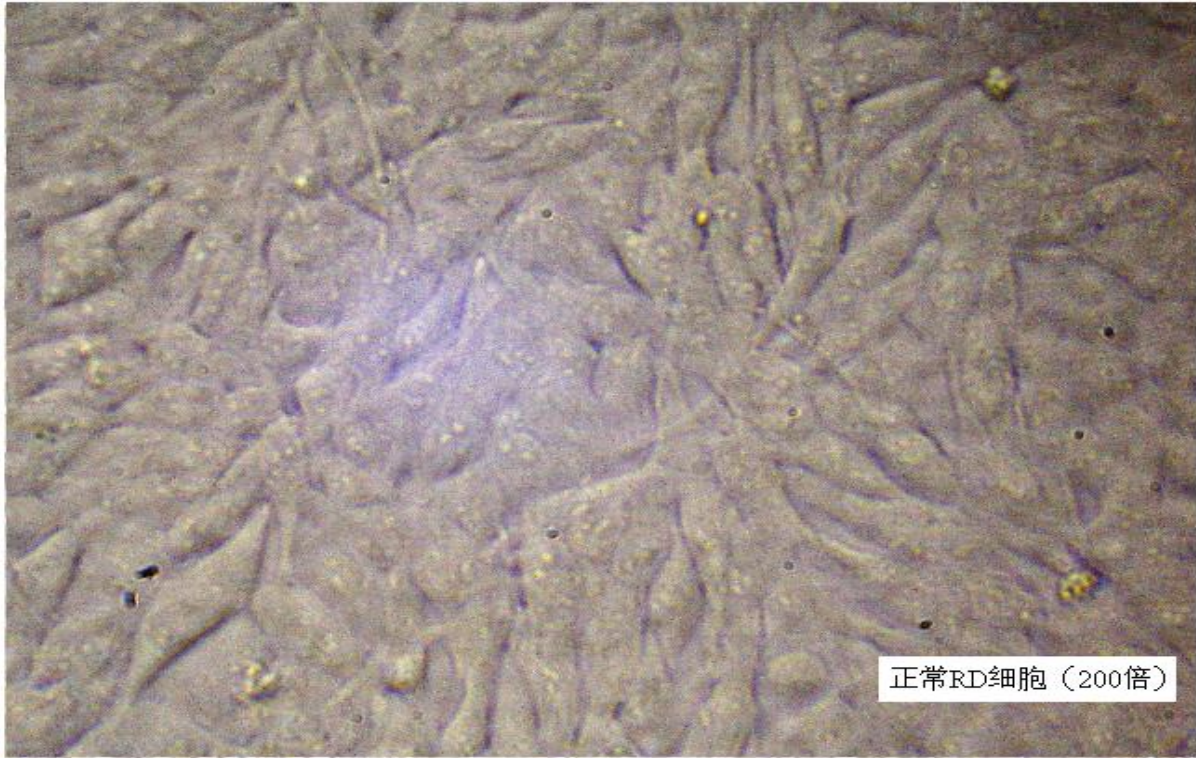
| 细胞培养器皿 | 近似的接种体积 | 近似的接种细胞量（细胞总数） |
|--------------------------|---------|---------------------|
| 125 × 16 mm 细胞培养管 | 1 ml | 1×10^5 个 |
| 25 cm ² 细胞培养瓶 | 10 ml | 1×10^6 个 |
| 75 cm ² 细胞培养瓶 | 25 ml | 2.5×10^6 个 |

上表中给出的不同大小的细胞培养瓶中需接种细胞悬液的体积和细胞总数是一个指导。但不同种类、不同批次细胞或培养液成分改变都可能会导致最适的接种量有所不同，因而当引入新的细胞或培养液的主要成分有任何变化时应使用细胞计数法来决定接种密度或分瓶比例。为病毒分离制备细胞培养管时应该使用细胞计数法，以确保单层细胞可维持5~7d，并且制备的不同批次的细胞性状相似（具有再现性）。

注意：由于实验室中维持着生长迅速的不同传代细胞系（RD细胞和HEp-2细胞），就存在着它们之间交叉污染的可能性，但这个问题的存在经常被忽视。如果交叉污染发生在对不同病毒的敏感性差异很大的细胞系之间（比如RD细胞和HEp-2细胞），将无疑会影响到病毒分离结果的分析 and 解释。为将交叉污染的可能性降至最低限度，必须采用以下的简便的预防措施：

- 同一时间在一个生物安全柜里只能操作一种细胞。在操作结束后，移走柜内的细胞，用适当的消毒剂擦拭后需再运行5min，然后开始处理下一种细胞。
- 瓶装的或分装好的液体在细胞间不可混用。即用于RD细胞和HEp-2细胞操作的所有液体，尤其是生长液和维持液都必须分开使用，尽管它们的成分是一样的。

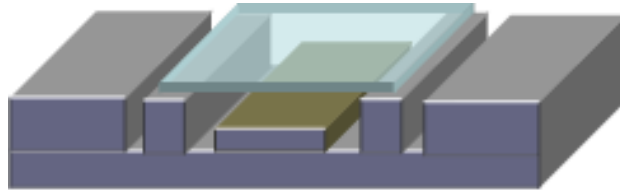
- 定期复苏细胞。不要使用连续培养超过3个月的细胞，或复苏后传代超过15代的细胞（不论培养时间有多短）。
- 所有细胞培养器皿上必须标明细胞系名称、代数和传代日期，长期保存需置在液氮罐内。



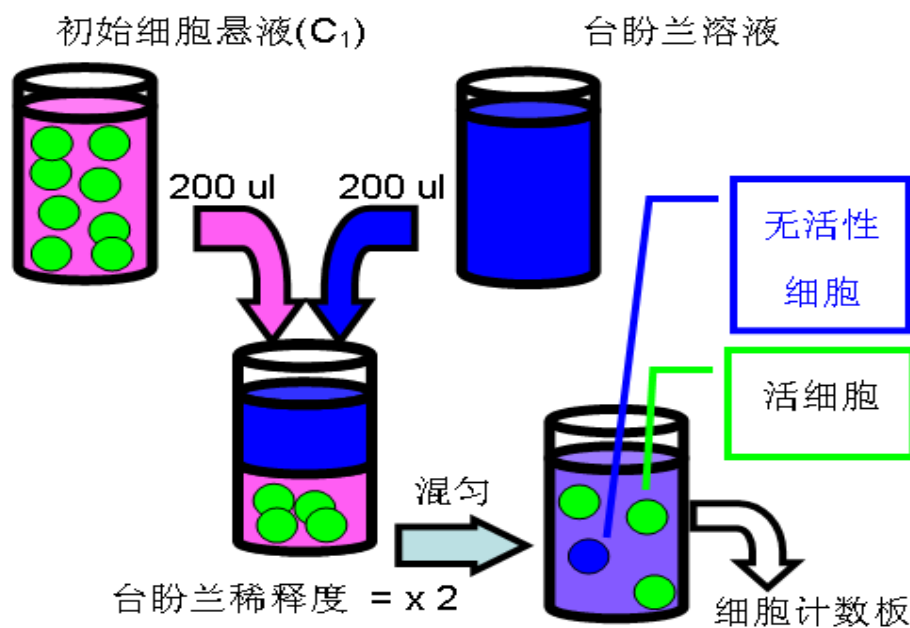
6、细胞计数

可用细胞计数板来精确计算细胞悬液中的细胞数，最重要的是用吸管多次吹打以分散细胞。

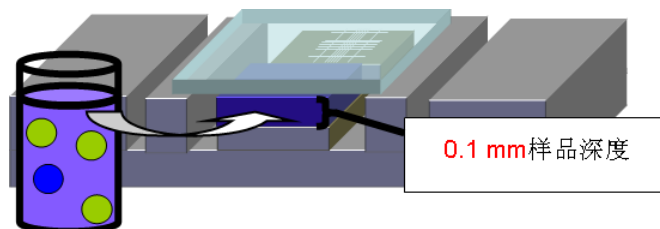
(1)在细胞计数板上放一块载玻片；



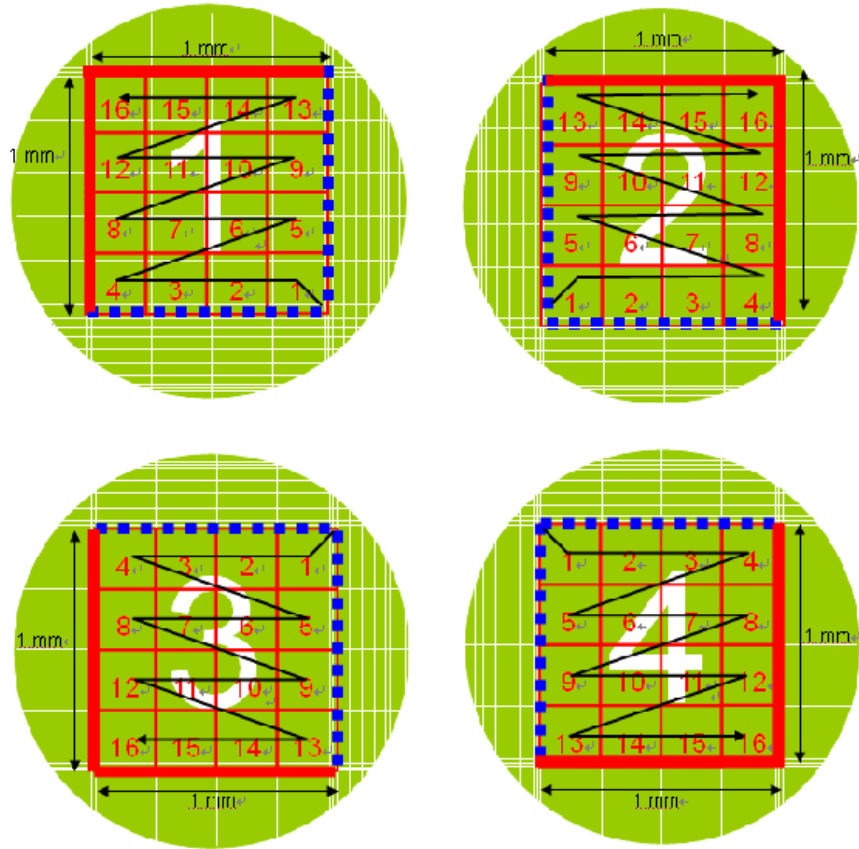
(2)在5ml的试管中，取200 μ l 细胞悬液溶于200 μ l的台盼蓝溶液（含0.1%Trypan blue 的PBS）中，没有活性细胞被染成蓝色；



(3)使用P-200的吸头立即混匀，然后吸取足够的容积的细胞悬液（大约10 μ l）加入到细胞计数板与盖玻片的空隙中；



(4)计数在细胞计数板的四个角区域的活细胞数量（包括实线的边缘），区域内的死细胞不计在内。



(5)注意：若细胞计数少于50则是不可靠的；

如观察到明显的成团细胞，应重新悬浮细胞原液，重新计数；

计算计数室4个角上正方形内活细胞的总数（注意：活细胞不会被台盼蓝染成蓝色）；

(6)用下列公式计算每毫升细胞悬液中活细胞的数量：

$$C_1 = t / 4 \times TB \times 10^4$$

C_1 = 每毫升内细胞原始浓度

t = 4个区域内的所有活细胞的数量

$/4$ = 每个区域内细胞数量的平均值校正值

$\times TB$ = 台盼蓝的稀释度校正值 (=2)

$\times 10^4$ = 细胞计数板的转换常数

(7)计算稀释系数 d ，得出每毫升内细胞工作浓度 (C_2)：

$$d = \frac{C_2(\text{工作细胞浓度})}{C_1(\text{原始细胞浓度})}$$

注意：要使得结果有效，使用另一块细胞计数板进行计数，并计算两次计数的平均值，这两次计数的结果应该在20%的差异范围内。

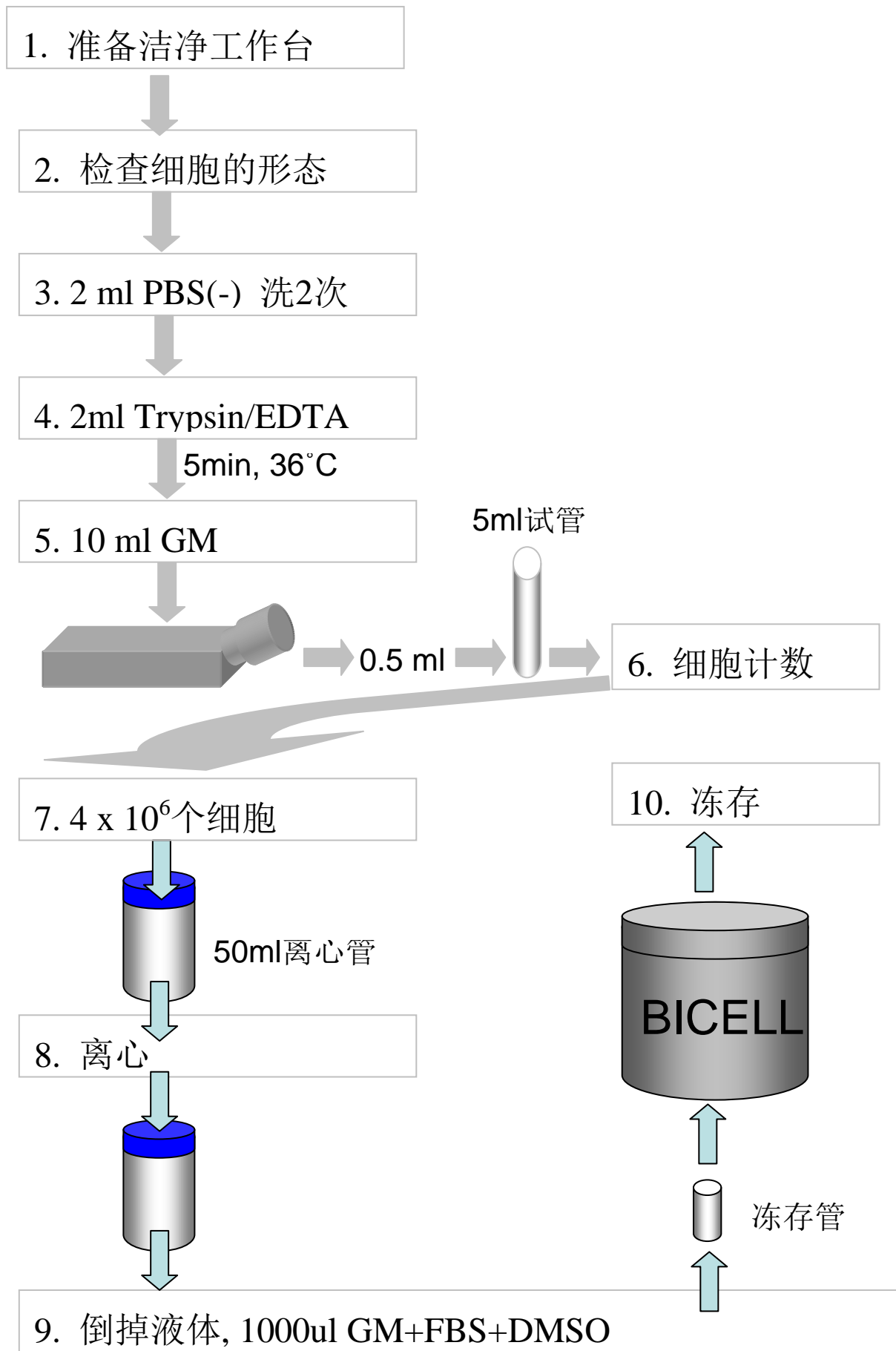
7、细胞冻存

1) 所需仪器和其他物品:

- 长满单层的L20B细胞或RD细胞（不可使用已长满超过两周的细胞）；
- 显微镜、洁净工作台；
- 生长液(GM)、PBS(-)、胰酶/EDTA、台盼蓝[0.1% w/v溶解于PBS(-)];
- 含20% v/v胎牛血清和含10% (v/v) 二甲基亚砷的生长液；
- 细胞计数板、计数器；
- 5ml试管2个、50ml离心管1个、管架；
- 10ml移液管、1000 μ l和200 μ l吸头、移液器；
- 冻存管、BICELL、25m²细胞培养瓶；
- 记号笔、废液缸。

2) 操作步骤:

- (1) 将所需物品移入洁净工作台中，并运转洁净工作台；
- (2) 取一瓶生长良好的细胞（生长迅速但未完全长满），通过肉眼和显微镜检查细胞的形态，然后写上实验者的姓名；
- (3) 用胰蛋白酶/EDTA溶液消化细胞（见细胞传代部分），然后倒掉消化液；
- (4) 将细胞重悬于10ml生长液；
- (5) 取1ml细胞悬液至5ml的试管中，在另一个5ml的试管中加入200 μ l的细胞悬液和200 μ l的台盼蓝溶液，混匀。用细胞计数板计算细胞的数量，计算密度达到**4 \times 10⁶个/ml**；
- (6) 取**4 \times 10⁶个**细胞至50ml的离心管中，然后1000 rpm 离心10min；
- (7) 尽量弃去上清液，用1000 μ l预冷的含20%胎牛血清和10% (v/v) 二甲基亚砷（DMSO）的细胞生长液重悬沉淀细胞；
- (8) 分装细胞可用1或2毫升的有外螺旋盖的冻存管（标明实验者姓名、细胞种类、实验室、来源、传代数 and 冻存时间），并且拧紧盖子，适于在液氮内保存；
- (9) 缓慢地使细胞降温，以每分钟降1 $^{\circ}$ C最为理想。将冻存管放入BICELL中，冷冻至-80 $^{\circ}$ C，然后可以置入液氮中。



8、细胞复苏

1) 所需仪器和物品

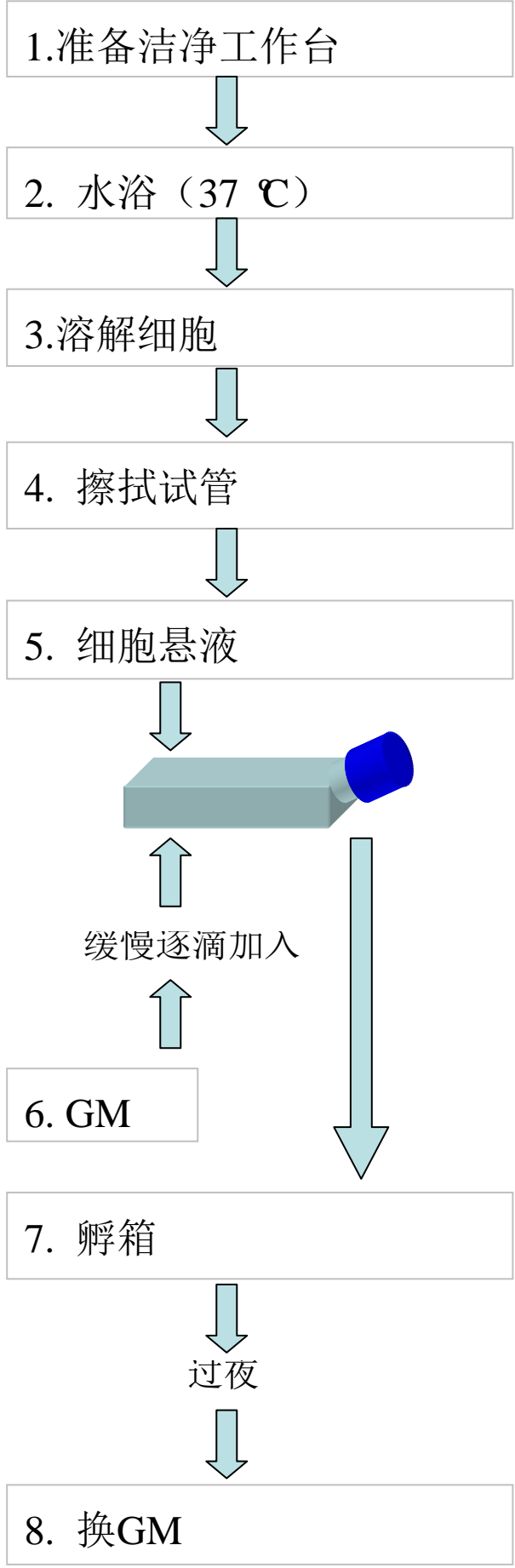
- 1) 洁净工作台、孵箱、水浴箱（37℃）、温度计
- 2) 生长液
- 3) 冻存的细胞（ $4\sim 8\times 10^6$ 个/ml）
- 4) 25 cm²细胞培养瓶、10ml移液管、1000μl吸头、1000μl移液器
- 5) 记号笔、废液缸

2) 操作步骤

- 1) 将所需物品放入洁净工作台中，打开水浴箱至37℃；
- 2) 从液氮或气态氮中取出小瓶/安瓶后，立即放入37℃水浴，或最好放到盛有37℃无菌水的烧杯中；
- 3) 当完全化冻后，用70%酒精擦拭小瓶/安瓶的表面，以减少细菌污染。将细胞悬液转入细胞培养瓶中，缓慢地逐滴加入10ml生长液供形成细胞单层（如果冻存的细胞浓度为 4×10^6 个/ml，则1毫升悬液中所含的细胞量就足以在一个或两个75cm²的细胞培养瓶中培养），若生长液加得太快将严重影响化冻细胞的生存能力；
- 4) 孵育至细胞贴壁（6~8h），或36℃过夜；
- 5) 小心地倾去培养液（以除去剩余的二甲基亚砷）并加入新鲜的生长液；
- 6) 写上实验者的姓名，细胞名称，复苏日期，传代历史；
（也可将化冻的细胞悬液缓慢地加入生长液至10ml，80g离心10min。倾去上清，加入足量生长液供形成细胞单层，放入36℃孵箱培养。）

注意：如从主细胞库开始复苏，复苏后计P₁；

如从工作细胞库开始复苏，则复苏后计P_{next}。



实验室检测标准操作规程（SOP）

二. 肠道病毒分离技术

1、标本的处理

1) 粪便标本的处理

在生物安全柜中，取约2g粪便标本、10ml含有抗生素的完全PBS、1ml氯仿加入50ml耐氯仿的离心管中。使用机械振荡器剧烈混匀20min，制成粪便悬液。然后3000 rpm离心20min。在生物安全柜中吸上清至一新冻存管中，以备接种。

A) 所需试剂和耗材：

- 15ml 或 50ml 耐氯仿离心管；
- 1ml 或 5ml 吸氯仿用的玻璃吸管；
- 5ml 和 10ml 吸管；
- 木制便签；
- 外螺旋盖的冻存管（5ml）；
- 直径大约 2~3mm 的玻璃珠；
- 混有抗生素的 PBS（P.S 溶液的终浓度为青霉素 100 单位/ml，链霉素为 100 μ g/ml）；
- 氯仿（以乙醇作为稳定剂）。

B) 操作步骤

- (1) 在离心管上标记标本号；
- (2) 每管中加入 10ml PBS、1g 玻璃珠、1ml 氯仿；
- (3) 在生物安全柜中将每一份粪便标本取大约 2g 加入标记好的离心管中（确保离心管上的标号与原始标本的标号一致）；
- (4) 剩余的原始标本最好留在原容器中，冻存于-20 $^{\circ}$ C；
- (5) 确保拧紧离心管，用机械振荡器剧烈震荡 20min；
- (6) 在确保离心机的盖子盖好和离心桶密封的情况下，用冷冻离心机在 1500g 条件下离心 20min；
- (7) 在生物安全柜中将每一份标本的上清液分别吸入 2 个有外螺旋盖的冻存管中（如果上清液不清澈，应再用氯仿处理一次）；
- (8) 一管粪便悬液冻存于-20 $^{\circ}$ C作为备份，另一管存于 4~8 $^{\circ}$ C以备接种。

2) 脑脊液标本的处理

脑脊液标本通常直接用于病毒分离。

3) 疱疹液标本的处理

疱疹液标本通常直接用于病毒分离。

4) 咽拭子标本的处理

咽拭子要在标本运输（保存）液中充分搅动（至少40下），以洗下拭子上粘附的病毒及含有病毒的细胞等，然后在4℃条件下，10000 rpm离心20min，用上清接种到细胞上，如果发现有细菌污染，须用滤器过滤除菌。

2、标本接种和观察（病毒分离）

A) 所需试剂和耗材：

- 细胞培养管培养的 RD 细胞和 HEp-2 细胞；
- 维持液（MM）；
- 1ml 和 5ml 的一次性塑料移液管。

B) 操作步骤：

- (1)显微镜下观察单层细胞，以确保细胞是健康的。一个健康的单层细胞会在传代后 3d 左右形成；
- (2)倒掉生长液（GM），换上 1~1.2ml 的维持液（MM）；
- (3)每一份标本需要同时接种 2 支 RD 细胞和 2 支 HEp-2 细胞，正确标记每支细胞培养管（包括标本的编号、日期、传代数）；
- (4)每一种细胞至少标记一管作为阴性对照；
- (5)每支试管接种 0.2ml 的标本悬液，培养温度要求 36℃（对于 AHC 标本的病毒分离，尤其是 EV70 的分离培养，强烈建议降低培养温度，一般可为 34~35℃）；
- (6)使用倒置显微镜每天观察细胞培养管，以观察有特征性的肠道病毒致细胞病变效应（CPE）的出现（如细胞变圆，折光增强并脱离管壁等）；
- (7)记录接种管和对照管细胞所发生的变化至少一周，记录 CPE（1+~4+）、提示细胞受毒性反应、老化或污染的影响而发生的变化（1+，<25%；2+，25%~50%；3+，50%~75%；4+，75%~100%）；
- (8)如果有特征性的肠道病毒 CPE 出现，要如实记录，并观察直到 75% 的细胞发生变化（3+ CPE），然后储藏在 -20℃ 以备二次传代。同一病例的二次传代的病毒分离物可以放到一起用于进一步的鉴定；

- (9)第 1 代培养见可疑细胞病变时继续传代，待细胞病变稳定出现后 -20°C 或 -70°C 冻存；
- (10)一代阳性分离物再传二代，如果又有明显的 CPE 出现，将病毒保存在 -20°C 冰箱(二代病毒)。因二代病毒滴度高于用一代病毒，所以选用二代病毒进行鉴定。
- (11)如果 7d 之后没有 CPE 出现，那么盲传 1 代继续观察 7d。(注意：同一病例标本的细胞培养物不能混在一起再传代，例如：不同细胞的培养物应单独传代)；
- (12)盲传 2 代后，仍然没有出现 CPE 的，则判定为阴性；
- (13)注意：如果接种后 24h 内出现 CPE，很可能是标本中的非特异性成分导致的毒性反应。取 100 μl 阳性分离物传二代，继续观察；或者在接种标本吸附 1h 后用维持液清洗细胞层，可能会降低毒性反应。
- (14)几个概念：

A：毒性反应：如果在接种后 1~2d 内细胞快速地调亡，这可能是由于标本中含有毒性物质而导致的非特异性毒性反应。这些已接种标本的试管应在 -20°C 冻存，融化后取 0.2ml 接种到同一类型细胞中(此时是第二代)。如果又出现了毒性反应，那么应该取原始标本用 PBS 稀释 10 倍，再次接种到同种细胞中。这时应被认为是第一代。

B：微生物污染：由于细菌污染而造成培养液混浊或细胞死亡经常使病毒造成的 CPE 无法确定或根本无法出现。重新取原始标本，用氯仿处理，按上述步骤重新接种到新鲜细胞上。

C：盲传：有时一周之后传代细胞会老化，甚至细胞对照也出现了病变。这时已接种标本的试管应在 -20°C 冻存，融化后取 0.2ml 接种到同一类型的新鲜单层细胞中，再观察 7~10d。如果盲传两代后仍然没有产生 CPE，那么认为这个标本是阴性的。

3. 实验室操作技术规范

尽量小心以避免在接种细胞或传代时发生病毒交叉污染。不要将已接种病毒的细胞培养管中的液体倾倒在掉；应该用移液管来移走液体，每一步都要换新的移液管。不要用微量移液器，除非使用带滤膜的可阻止气溶胶产生的吸头(ARTs)。避免剧烈震荡而产生气溶胶，如有液滴溅出，要立即用消毒剂清理干净。

4. 需要注意的两个问题

A. 额外的传代：在进行 HFMD/AHC 标本病毒分离的过程中，有时可能要考虑到从病例中分离出的标本中有人肠道病毒漏检情况。此时接种过病毒的细胞悬液要经过冻化后，重新接种到新的单层细胞上以释放存在的病毒。标本培养没有产生 CPE 的情况下，特别是如果发生毒性反应或

污染时，使用新的、健康的细胞可能会产生可识别的 CPE。但**病毒传代不要超过 3 次，因为每一次操作都会增加病毒交叉污染的机会，从而产生假阳性结果。**

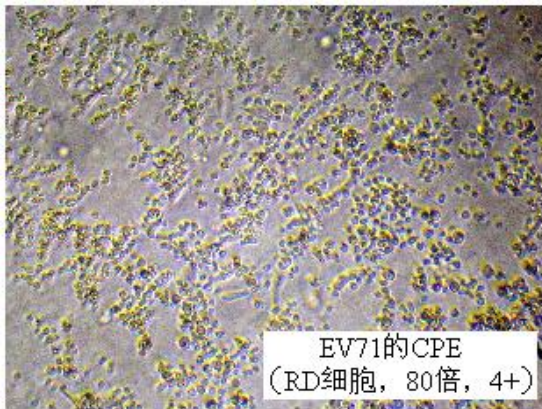
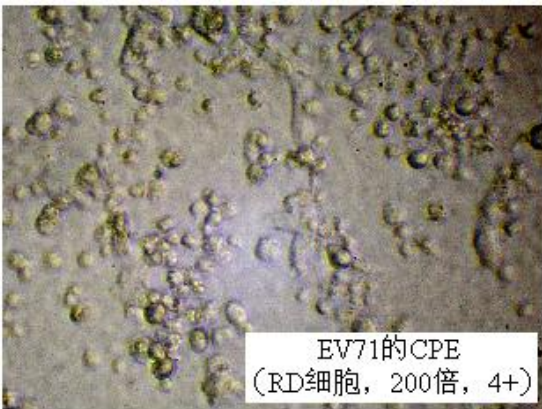
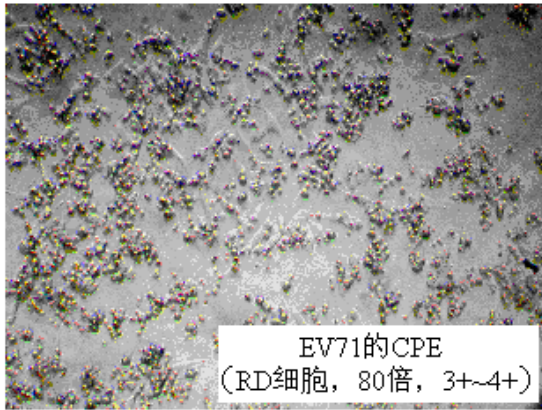
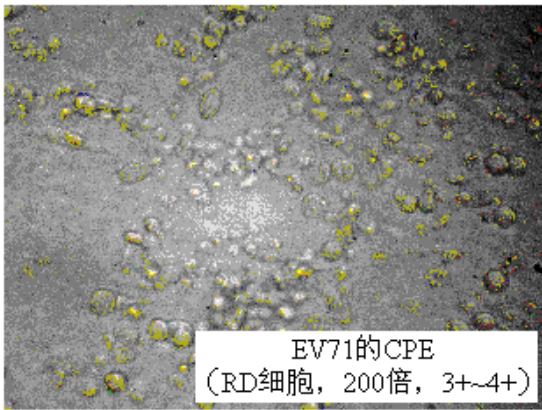
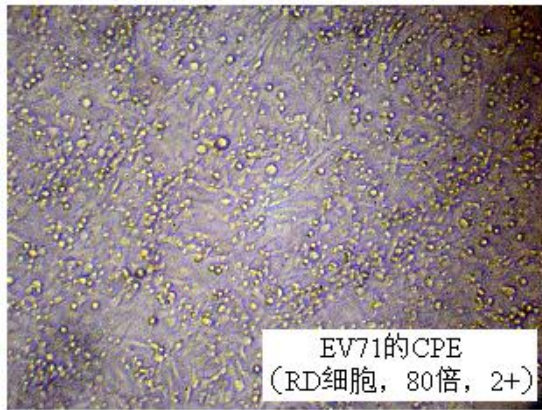
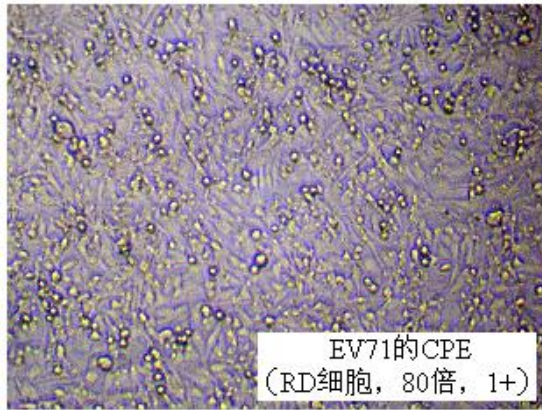
B. 标本吸附到单层细胞上：有时考虑到标本中含有的病毒量较低的原因，可以在接种病毒前，将细胞生长液先倒掉，用无菌 PBS 清洗单层细胞，在室温条件下，接种 0.2ml 标本悬液使其先吸附到单层细胞上，吸附过程中轻轻摇动，偶尔旋转使接种液分布均匀，并可以防止周围层细胞干燥。然后再加入 1ml 的维持液。使用这种方法可以检测得到稍低浓度的病毒，减小标本的毒性反应，而且至少可以使 CPE 提前一天产生。但缺点就是必须考虑到它会增加病毒（和可能的细菌）交叉污染的问题，因为在这个步骤中增加了开盖/关盖的次数。**因为当使用含有很高滴度病毒标本的时候交叉污染的可能性很大，所以不许用这种方法接种病毒分离物。**

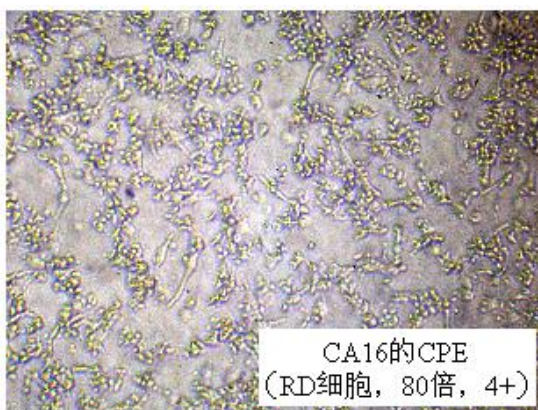
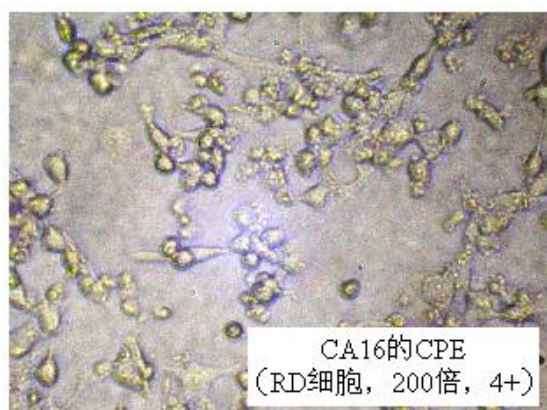
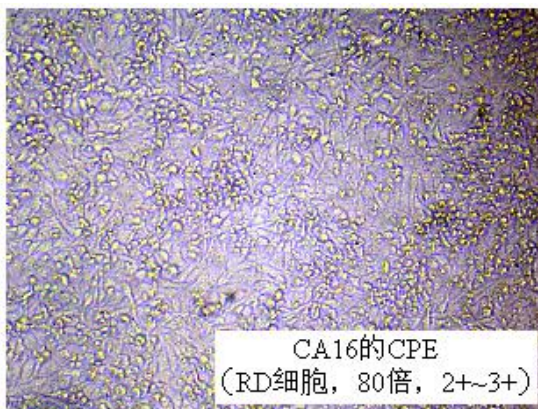
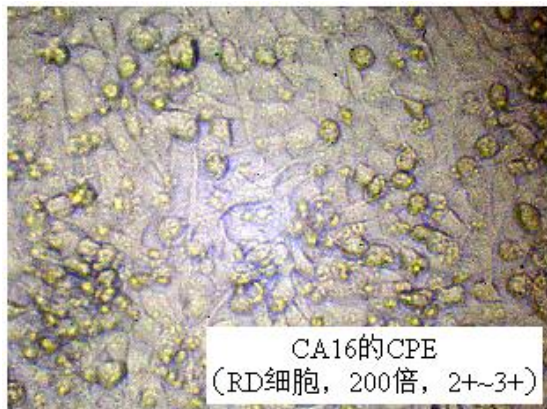
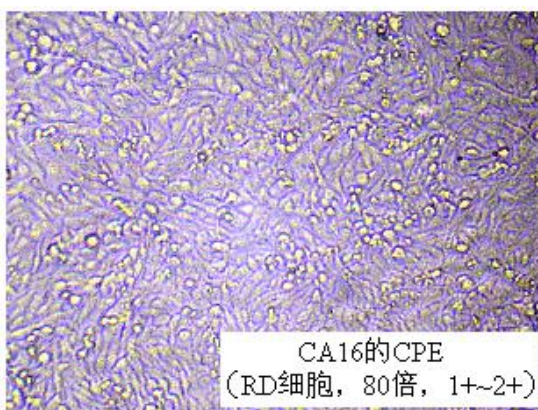
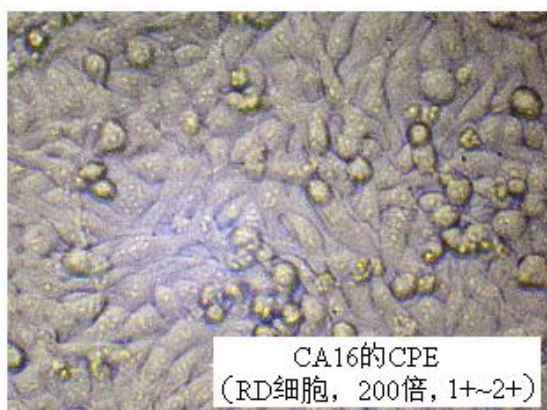
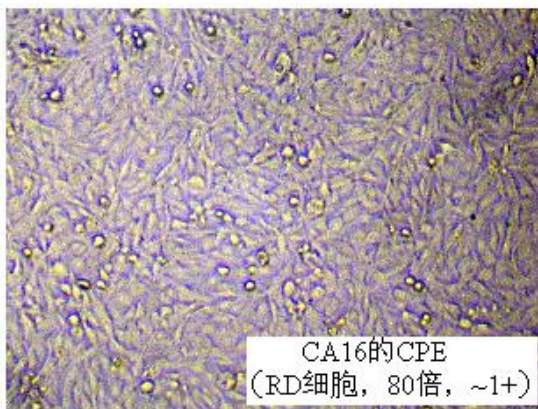
5. 病毒分离结果解释：

RD 细胞支持 HFMD 的主要病原体——CA16 和 EV71 的复制，CA16 和 EV71 均能在 RD 细胞培养中引起特殊的肠道病毒致细胞病变效应（CPE），表现为细胞圆缩、分散、胞浆内颗粒增加，最后细胞自管壁脱落。但相同滴度的 CA16 和 EV71 在 RD 细胞中生长的速度不同，EV71 的生长速度要快于 CA16，表现为 EV71 感染 RD 细胞后出现 CPE 的时间比 CA16 早，EV71 接种细胞后出现 CPE 很快，但 CA16 一般要经过 2 次以上传代才出现明显的 CPE。

若在使用 RD 细胞分离的同时再增加 HEp-2 细胞，可提高肠道病毒的分离率（分离出其它可能致 HFMD 的病原体，如一些柯萨奇 B 组病毒）。但 CA16 和 EV71 在 HEp-2 细胞中均不繁殖。

从 HFMD 患儿的脑脊液、血液、疱疹液等分离出病毒有诊断价值，但单从咽拭子或粪便中分离到病毒不能确诊。从有上述临床症状群患者的咽拭子或粪便中重复分离到同一型病毒，且从周围患同样疾病者中也检出相同的病毒，且病毒分离率远高于正常人群，则有诊断的参考价值。





实验室检测标准操作规程（SOP）

三. 测定人双份血清标本的中和抗体滴度

比较患者急性期血清与恢复期血清中和抗体滴度，可作为肠道病毒感染的血清学诊断方法，最常用的是中和实验，即用微量板法测定抗体滴度，是目前人肠道病毒抗体检测的最常用方法，该方法精确且具有型特异性。

作为肠道病毒感染的诊断方法之一，可以测定血清（或脑脊液）中肠道病毒中和抗体的滴度，通常用急性期血清与恢复期血清滴度进行比较，抗体滴度 4 倍以上增高证明病毒感染。但是，不明显的肠道病毒感染（隐性感染）也很常见，所以在评估检测结果时就要小心一些。在中和实验中，要用人肠道病毒参考毒株（即原型株，EV71 原型株为 BrCr 株，CA16 原型株为 G-10 株），有时同时（或单独）使用临床分离株会有助于得到更准确的检测结果。

使用对肠道病毒敏感的细胞，如 RD 和 HEp-2 细胞。用病毒（血清）稀释液（下面液体配制中的 C 液，可用维持液代替）稀释血清和制备病毒悬液，因为是用病毒来确定血清（CSF）中抗体的滴度，所以要使用参考病毒（原型株），但有时使用所分离到的毒株（临床分离株）有助于得到更准确的检测结果，当然，分离株的滴度（100 CCID₅₀/0.05ml）要事先测定。

中和实验的检测原理：病毒感染敏感靶细胞后，引起细胞形态学变化，出现致细胞病变效应（CPE），特异性中和抗体与病毒结合后，可使病毒颗粒失去感染性，抑制CPE的出现。

1. 液体配制

A 液：血清处理液：（100ml 中含下列液体）

| | |
|-------------------|------|
| MEM | 85ml |
| 3% L-谷氨酰胺 | 1ml |
| 7.5%碳酸氢钠 | 2ml |
| 胎牛血清 | 2ml |
| 青、链霉素（各10000U/ml） | 10ml |

B 液：细胞营养液：（按生长液配方配制，100ml 中含下列液体）

| | |
|-----------|------|
| MEM | 85ml |
| 3% L-谷氨酰胺 | 1ml |

| | |
|-------------------|------|
| 7.5%碳酸氢钠 | 2ml |
| HEPES | 1ml |
| 胎牛血清 | 10ml |
| 青、链霉素（各10000U/ml） | 1ml |

C液：病毒（血清）稀释液：（按维持液配方配制，100ml 中含下列液体）

| | |
|-------------------|------|
| MEM | 93ml |
| 3% L-谷氨酰胺 | 1ml |
| 7.5%碳酸氢钠 | 2ml |
| HEPES | 1ml |
| 胎牛血清 | 2ml |
| 青、链霉素（各10000U/ml） | 1ml |

2. 攻击病毒 CCID₅₀ 滴定和滴度梯度制备

1) 将增殖后的病毒悬液冻融3次，然后在4℃、12000rpm条件下离心10min，取上清液分装于2支冻存管中，每管1.5ml，一般每管应在一次试验中用完，有剩余者应废弃；

2) 加Eagle液10倍系列稀释为10⁻¹至10⁻⁸病毒液，各加入细胞板内，每孔50μl，每稀释度4孔细胞；

3) 每孔加细胞悬液50μl，同时设细胞对照（50μl稀释液+50μl细胞悬液），36℃培养7d，观察细胞病变；

4) 按Behrens-Kärber公式计算出分离病毒株的CCID₅₀；

$\log \text{CCID}_{50} = L - d(S - 0.5)$ ，其中：

L = 实验中使用的最低稀释度的log值；

d = 稀释梯度的log值；

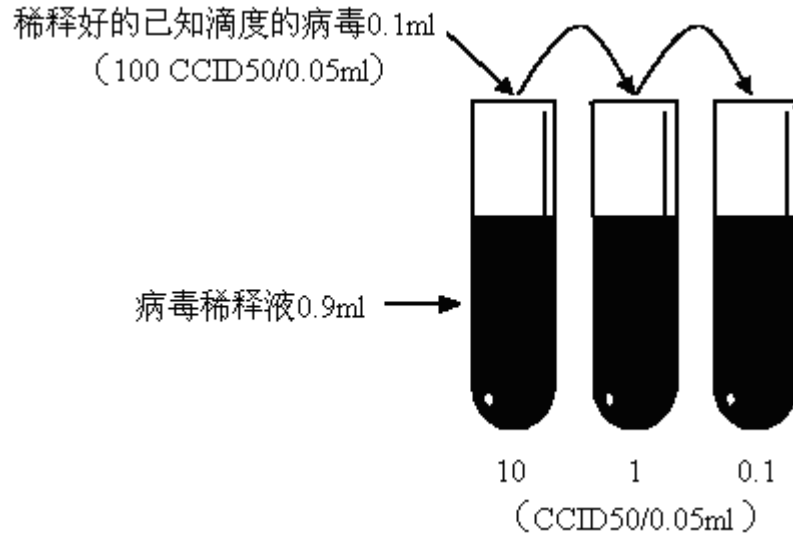
S = 终判时阳性部分的总和（即出现CPE的细胞孔所占的比例之和）。

5) 正式试验前应先滴定攻击病毒2~3次，取其平均值，求出每0.05ml中含100 CCID₅₀的病毒载量；

6) 按照计算好的稀释比例配制攻击病毒，求出试验所需的病毒总量（即100 CCID₅₀/0.05ml）；

7) 取3支小试管，每只加病毒稀释液（液体配制中的C液）0.9ml；

8) 用带滤芯的吸尖（ART吸尖）吸0.1ml已经稀释好的攻击病毒液（即10 CCID₅₀/0.05ml）到第一支小试管中，换另一支ART吸尖，轻轻并彻底地混匀，避免产生大量气溶胶，按照此方法依次稀释至1 CCID₅₀/0.05ml和0.1 CCID₅₀/0.05ml。



3. 稀释血清

- 1) 发病 1~3d 内采取患者急性期血清，发病后 2~4 周采取恢复期血清，分别 -20℃ 冻存储备。
- 2) 取无菌小试管若干支（每份血清使用一支）置试管架上，每管加血清处理液（上面液体配制中的 A 液）0.3ml，加待测血清 0.1ml，盖紧塞子，震荡混匀，放 4℃ 冰箱过夜，即为 1: 4 稀释血清。次日 56℃、30min 灭活。
- 3) 打开独立无菌包装 48 孔组织培养板，纵向使用，每孔加血清稀释液（上面液体配制中的 C 液）0.3ml，每份血清使用一排，每排 4 孔。使用移液器取处理过的血清 0.1ml 加入第一孔（即为 1: 16），吹吸 8~10 次，吸 0.1ml 加入第二孔（即为 1: 64），依次至 1: 1024，血清稀释的过程中不必换吸尖。即每份血清标本进行 4 倍倍比稀释，即 1: 4、1: 16、1: 64、1: 256、1: 1024。
- 4) 每份血清标本的每个稀释度都要平行做两孔。

4. 病毒中和抗体测定的操作步骤:

- 1) 取一块 96 孔板横向使用，每块板可以做 8 份（4 对）待测血清，版面设计如下图所示。A1-A2 孔（B1-B2、C1-C2、D1-D2、E1-E2、F1-F2、G1-G2、H1-H2）中每孔加入 1:1024 稀释度的待测血清 0.05ml，不必换吸尖，在 A3-A4 孔（B3-B4、C3-C4、D3-D4、E3-E4、F3-F4、G3-G4、H3-H4）中每孔加入 1:256 稀释度的待测血清 0.05ml，A5-A6 孔（B5-B6、C5-C6、D5-D6、E5-E6、F5-F6、G5-G6、H5-H6）中每孔加入 1:64 稀释度的待测血清 0.05ml，A7-A8 孔（B7-B8、C7-C8、D7-D8、E7-E8、F7-F8、G7-G8、H7-H8）中每孔加入 1:16 稀释度的待测血清 0.05ml，A9-A10 孔（B9-B10、C9-C10、D9-D10、E9-E10、F9-F10、G9-G10、H9-H10）中每孔加入 1:4 稀释度的待测血清 0.05ml，A11-A12 孔（B11-B12、C11-C12、D11-D12、E11-E12、F11-F12、G11-G12、H11-H12）为每份待

测血清对照孔，每孔中补加稀释液0.05ml；

2) 上述孔中分别加入病毒 0.05ml (病毒滴度事先已经稀释为 100 CCID₅₀/0.05ml)；

3) 盖好盖子后用微量板混匀器混匀，放入 36℃ CO₂ 孵箱中孵育 2h；

| 标本检测 | | 1:1024 | | 1:256 | | 1:64 | | 1:16 | | 1:4 | | 1:4血清对照 | |
|------|---|--------|---|-------|---|------|---|------|---|-----|----|---------|----|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| 1号标本 | A | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ○ | ○ |
| 2号标本 | B | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ○ | ○ |
| 3号标本 | C | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ○ | ○ |
| 4号标本 | D | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ○ | ○ |
| 5号标本 | E | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ○ | ○ |
| 6号标本 | F | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ○ | ○ |
| 7号标本 | G | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ○ | ○ |
| 8号标本 | H | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ○ | ○ |

4) 另取一块96孔板纵向使用，做100 CCID₅₀/0.05ml病毒滴度的核实（每次实验都必须做）。每孔先加病毒稀释液（试剂配制中的C液）0.05ml，然后从0.1 CCID₅₀/0.05ml加起，每孔0.05ml，每个稀释度8孔，不必更换吸尖，一直加至100 CCID₅₀/0.05ml；同时留出4孔做为细胞对照孔，每孔加入0.1ml病毒稀释液，然后放入4℃冰箱中暂存；

| 病毒回滴 | H | G | F | E | D | C | B | A | |
|--------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0.1 CCID ₅₀ /0.05ml | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | 1 |
| 1 CCID ₅₀ /0.05ml | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | 2 |
| 10 CCID ₅₀ /0.05ml | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | 3 |
| 100 CCID ₅₀ /0.05ml | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | ● | 4 |
| 细胞对照 | 细 | 胞 | 对 | 照 | ○ | ○ | ○ | ○ | 5 |
| | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | 6 |
| | | | | | | | | | 7 |

5) 在孵育期间,用消化液消化细胞,准备细胞悬液,细胞悬液的浓度为 2×10^5 个/ml,每块 96 孔板至少需要准备 10ml;

6) 孵育结束后每个待测血清孔、血清对照孔(待检标本板)和病毒回滴孔和细胞对照孔(病毒回滴板)分别加入 0.1ml 细胞悬液,然后用微量板混匀器混匀,放入 36°C CO_2 孵箱中孵育培养;

7); 使用倒置显微镜每天观察 CPE,并记录病毒滴定结果,以不产生细胞病变的血清最高稀释度的倒数为终点效价。当 100 $\text{CCID}_{50}/0.05\text{ml}$ 的病毒对照孔出现完全病变时,判定最终结果(约 5~7d);

8) 注意:如果病毒对照结果(病毒回滴)不在 32~320 $\text{CCID}_{50}/0.05\text{ml}$ 的范围内,实验无效,就要重复实验。

5. 结果判定:

当最高稀释度血清的2孔中有1孔出现细胞病变,另一孔不出现细胞病变,该稀释度的倒数计即为该血清标本的中和抗体效价;当高稀释度2孔完全病变,相邻低稀释度2孔完全不病变,则两者平均稀释度的倒数即为该血清标本的中和抗体效价;当两个相邻稀释度血清均出现1孔细胞病变,另1孔不出现细胞病变,则两者平均稀释度的倒数即为该血清标本的中和抗体效价。

对于 HFMD 的双份血清中和实验结果来说,如果恢复期血清较急性期血清 EV71 或 CA16 中和抗体滴度出现 4 倍或 4 倍以上增高即可确诊;如果恢复期血清较急性期血清其它肠道病毒中和抗体滴度出现 4 倍或 4 倍以上增高可证实该肠道病毒感染,是否为病因需要其它相关实验证实;如果单份血清中和抗体滴度大于 1:256 也有诊断意义,血清中和抗体滴度为 1:128 判定为可疑阳性。

实验室检测标准操作规程（SOP）

四. RT-PCR 法检测肠道病毒核酸

1. RNA 提取

可以选择使用市售 RNA 提取试剂盒，为了说明方便，以 AXYGEN 公司的“体液及组织与细胞病毒 DNA/RNA 小量试剂盒”从临床标本或病毒分离培养物中提取病毒 RNA；

- 1, 收集 200 μ l 样品，转入 1.5ml 离心管。
- 2, 加入 300 μ l Buffer V-L，旋涡振荡混合均匀，静置 5min。
- 3, 加入 100 μ l Buffer V-N，旋涡振荡混合均匀，12,000 \times g 离心 5min。
- 4, 将上清转移到新的 1.5ml 离心管中，加 300 μ l 异丙醇（1%冰醋酸），上下倒置 6-8 次，混合均匀。
- 5, 将制备管置于 2ml 离心管中，取步骤 4 中的混合液移入制备管中，12,000 \times g 离心 1min。
- 6, 弃滤液，将制备管置回到 2ml 离心管中，加 700 μ l Buffer W1，12,000 \times g 离心 1min。
- 7, 弃滤液，将制备管置回到 2ml 离心管中，加 700 μ l 已加入无水乙醇的 Buffer W2，12,000 \times g 离心 1min，以同样的方法再用 700 μ l Buffer W2 洗涤一次。
- 8, 将制备管置回到 2ml 离心管中，12,000 \times g 离心 1min。
- 9, 将制备管置于另一洁净的 1.5ml 离心管中，在膜中央加 30-50 μ l Buffer TE(DNase&RNase-free)，室温静置 1min。12,000 \times g 离心 1min 洗脱 RNA。

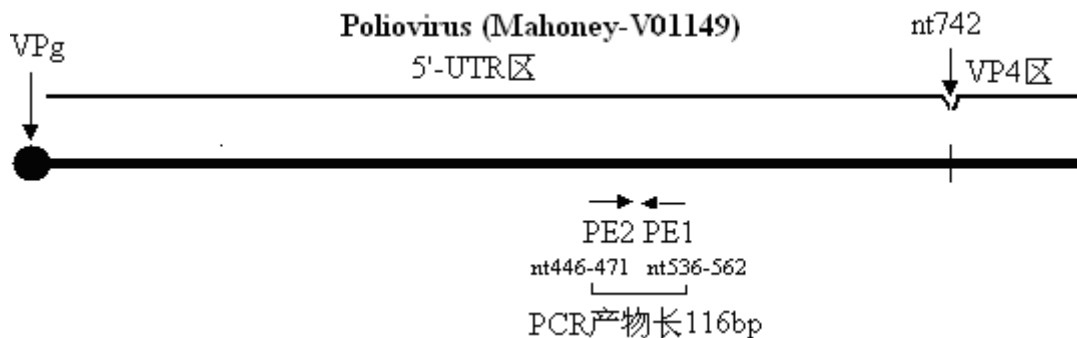
2. RT-PCR 扩增

(1) 引物序列合成

1) 人肠道病毒（包括 EV71、CA16）核酸检测通用引物序列：

PE2（上游）：5'- TCC GGC CCC TGA ATG CGG CTA ATC C -3'

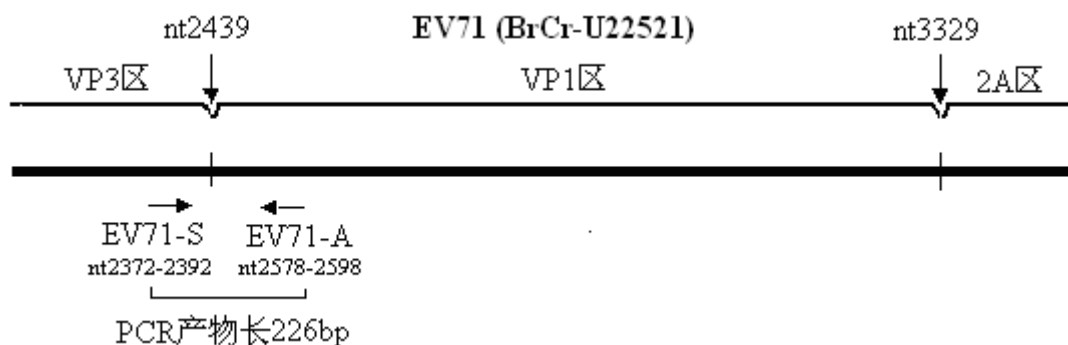
PE1（下游）：5'- ACA CGG ACA CCC AAA GTA GTC GGT CC -3'



2) EV71 核酸检测引物序列:

EV71-S (上游): 5'- GCA GCC CAAAAG AAC TTC AC -3'

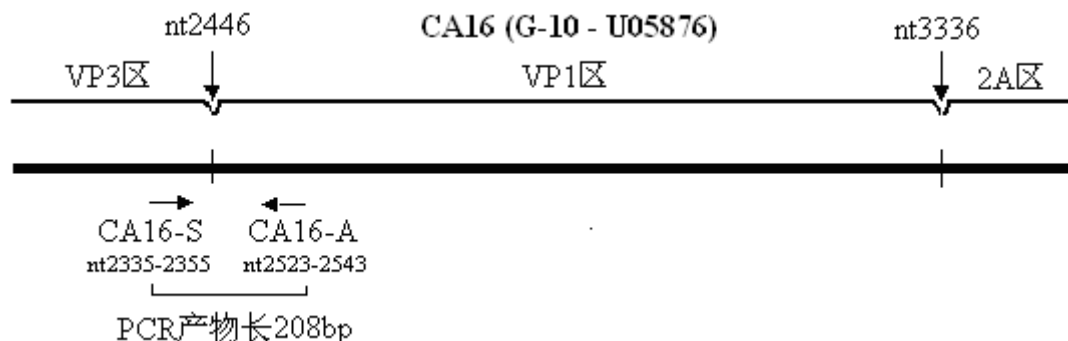
EV71-A (下游): 5'- ATT TCA GCA GCT TGG AGT GC -3'



3) CA16 核酸检测引物序列:

Cox A16-S (上游): 5'-ATT GGT GCT CCC ACT ACA GC-3'

Cox A16-A (下游): 5'-TCA GTG TTG GCA GCT GTA GG-3'



(2) 引物的稀释和制备成PCR工作浓度

1) 合成的引物质量数为1 OD=33μg;

2) 在打开装有引物的1.5ml离心管之前, 12000 rpm离心10min, 以避免打开管盖时干膜状的Oligo DNA散失;

- 3) 慢慢打开管盖, 向管中加入330 μ l的去离子水;
- 4) 盖上管盖, 充分震荡混匀10min;
- 5) 此时得到的引物浓度为33 μ g/330 μ l=0.1 μ g/ μ l (PCR工作浓度);
- 6) 引物如果长期储存, 需要在-20 $^{\circ}$ C以下条件下保存。

(3) 实验设计

1) 在 PCR 记录纸 (实验记录纸) 上记录本次实验操作者姓名, 实验日期, 所鉴定标本的名称以及标本的顺序, 与 PCR 仪排列的顺序一致。

2) 标记好加标本和对照的 PCR 管 (阳性对照, 阴性对照和试剂对照):

A: 阳性对照: 无感染性的对照 RNA。

B: 细胞对照: 使用未接种病毒的细胞悬液, 最好使用与扩增病毒所用的细胞类型与代数相同的细胞。每一次实验设 2 个细胞对照。

C: 试剂对照: 用去离子水代替标本。

(4) RT-PCR 扩增

1) 在冰面上融化病毒标本和各种PCR试剂;

2) 配下列试剂主溶液:

| | |
|--|--------------|
| 10 \times PCR Buffer (含 Mg ²⁺) | 5.0 μ l |
| dNTPs (2.5mM each) | 2.0 μ l |
| 上游引物 (0.1 μ g/ μ l) | 1.0 μ l |
| 下游引物 (0.1 μ g/ μ l) | 1.0 μ l |
| RNA 酶抑制剂 (RNasin, 40U/ μ l) | 0.5 μ l |
| Taq DNA 聚合酶 (5U/ μ l) | 0.5 μ l |
| AMV 逆转录酶 (10U/ μ l) | 1.0 μ l |
| 模板 RNA | 3.0 μ l |
| RNase Free dH ₂ O | 36.0 μ l |

50.0 μ l

3) 在PCR仪上进行RT-PCR反应，反应步骤如下：

42°C45min
95°C3min
95°C30s
50°C30s ×32个循环
72°C40s
72°C10min
4°CSoak

3. 电泳分析

- (1) 将已经聚合的 3%的琼脂糖凝胶放在电泳装置上；
- (2) 在帕拉膜 (Parafilm) 上加上 6 × 电泳载样缓冲液 (每个反应需 1μl)。再加上 5μl 的 PCR 反应产物与之混合；
- (3) 将电泳缓冲液倒在电泳装置中，用吸尖将样品与载样缓冲液的混合溶液加到孔中；
- (4) 盖上盖子，接通电源，以 10V/cm 电压 (恒定电压) 电泳，大约 35~40min，直到溴酚蓝跑到凝胶的底部的时候，停止电泳；将胶取出，并注意保持凝胶的方向；
- (5) 在 1μg/ml 的溴化乙锭溶液中染色 15min，——注意：溴化乙锭溶液是有毒、致畸、并且致肿瘤的物质，操作时要加小心，并戴双层手套。如果储存在避光的容器中，溴化乙锭溶液可以重复使用；
- (6) 在蒸馏水中涮一下凝胶；在紫外透射仪下观察 PCR 产物电泳结果，并照相作记录。

4. 实验室操作规范

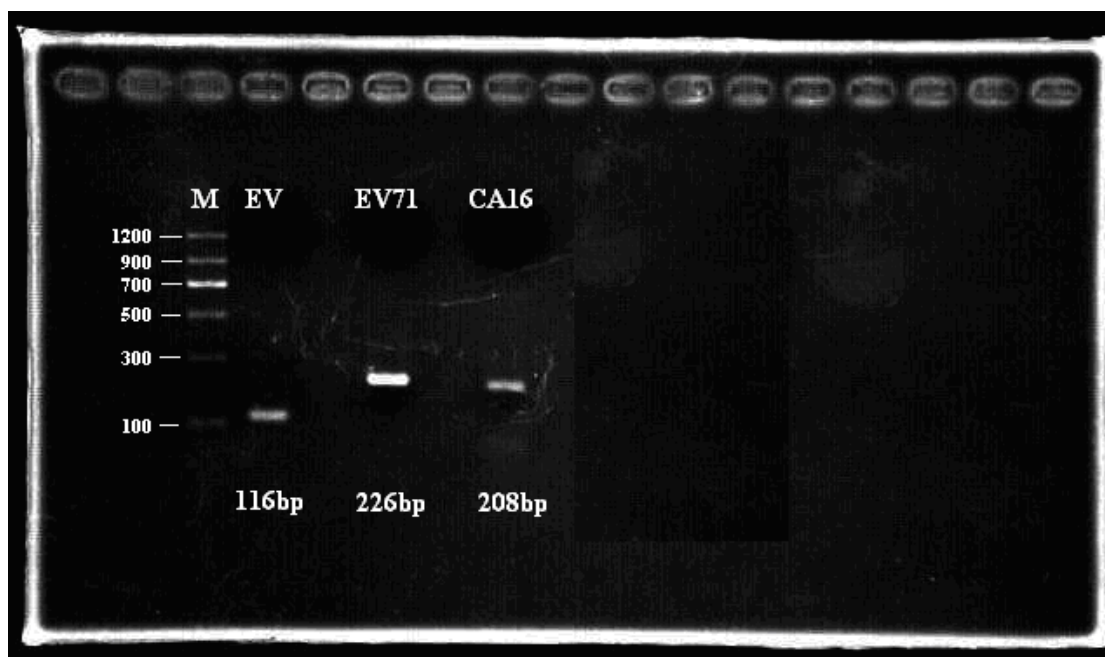
因为PCR技术是一个扩增的过程，得到PCR产物的同时伴随着一个很大的问题——交叉污染。按下列好的实验室操作规程操作，可以减少交叉污染的发生：

- PCR 之前的准备工作和之后的处理分别在不同的房间内操作；
- PCR 之前的准备工作和之后的处理分别使用两套移液器以及其他设备；
- 将试剂分装保存，尽量减少重复使用的频率；
- 准备和分装试剂应该在无 PCR 扩增产物的区域内进行；
- 准备寡聚核苷酸引物应该在无 PCR 扩增产物的环境中进行；
- 只使用能阻止气溶胶产生的吸尖；
- 戴手套 (无滑石粉)，并经常更换；
- 打开各种管子要小心，避免气溶胶的产生；。

- 减少每次处理样品的数量；
- 将除了核酸之外的其他试剂先加到反应管中，最后再加入核酸；
- 加入一个核酸后要盖上盖子，然后再加入其它核酸；
- 使用阳性对照：选取一个稳定的每次都能扩增出结果的样品作阳性对照；
- 使用一个已知性质的样品作阴性对照；
- 每次实验都要用试剂混合物作为空白对照。它包含除了标本 RNA 以外的 PCR 反应所需的所有其它成分。

5. 结果解释

通过比较标本的PCR产物与阳性对照的PCR产物在凝胶上的位置以及大小来解释结果。下图示出了一个阳性对照扩增产物电泳结果的例子：M为MW分子量对照；EV为肠道病毒组引物；EV71为EV71特异性引物；CA16为CA16特异性引物。



RT-PCR 实验结果解释表

| 待检标本RT-PCR结果 | 鉴定结果 |
|----------------------------|-------------------|
| 所有引物 (-) | 非肠道病毒 (NEV) |
| EV (+), EV71 (-), CA16 (-) | 非EV71、CA16的其它肠道病毒 |
| EV (+), EV71 (+), CA16 (-) | EV71 |
| EV (+), EV71 (-), CA16 (+) | CA16 |

实验室检测标准操作规程（SOP）

五. Real-time RT-PCR法检测肠道病毒核酸

1 病毒核酸提取

该步骤与RT-PCR法的核酸提取步骤相同。

以下操作步骤是从200 μ l血清/脱落细胞悬浮液中提取病毒DNA/RNA为例而设计的，从其他体积的样品中提取病毒核酸可按比例加Buffer V-N和异丙醇（1%冰醋酸），以后步骤中的Buffer用量不变。

1.1 收集 200 μ l 样品，转入 1.5ml 离心管。

1.2 加入 300 μ l Buffer V-L，旋涡振荡混合均匀，静置 5min。

1.3 加入 100 μ l Buffer V-N，旋涡振荡混合均匀，12,000 \times g 离心 5min。

1.4 将上清转移到新的 1.5ml 离心管中，加 300 μ l 异丙醇（1%冰醋酸），上下倒置 6-8 次，混合均匀。

1.5 将制备管置于 2ml 离心管中，取步骤 4 中的混合液移入制备管中，12,000 \times g 离心 1min。

1.6 弃滤液，将制备管置回到 2ml 离心管中，加 700 μ l Buffer W1，12,000 \times g 离心 1min。

1.7 弃滤液，将制备管置回到 2ml 离心管中，加 700 μ l 已加入无水乙醇的 Buffer W2，12,000 \times g 离心 1min，以同样的方法再用 700 μ l Buffer W2 洗涤一次。

1.8 将制备管置回到 2ml 离心管中，12,000 \times g 离心 1min。

1.9 将制备管置于另一洁净的 1.5ml 离心管中，在膜中央加 30-50 μ l Buffer TE（DNase&RNase-free），室温静置 1min。12,000 \times g 离心 1min 洗脱 DNA。

2. One Step Real-time PCR法检测HEV71核酸（单通道检测）

2.1 反应体系配置

反应体系共25 μ l，模板量可根据样本情况自行决定（临床标本通常使用4 μ l模板量），不够部分以水补足。如选用另外试剂盒，反应体系及条件随之变化。

从试剂盒中取出相应的试剂，反应液在室温融化后，瞬时离心，按n+1配置反应体系（n=样本数+1管阳性对照+1管阴性对照），每个测量反应体系配置如下表：

| | |
|---------------------------------|--------|
| 内容 | 1份样品的量 |
| 2×one step RT-PCR buffer | 12.5μl |
| Ex Taq HS | 0.5μl |
| RT-Enzyme Mix II | 0.5μl |
| EV71 F1: (20μM) | 0.8μl |
| EV71 R1: (20μM) | 0.8μl |
| 探针EV71 PB1 (20μM) (FAM荧光素标记) | 0.4μl |
| H ₂ O | 5.5μl |
| RNA模板 | 4μl |

2.2 荧光RT-PCR循环条件设置

| 程序 | 循环数 | 温度 (摄氏度) | 反应时间 |
|----|-----|----------|-------|
| 1 | 1 | 42 | 30min |
| 2 | 1 | 95 | 2min |
| 3 | 40 | 95 | 5s |
| | | 55 | 35s |
| | | 读荧光 | |

2.3 对照设置

- (1) 阴性对照：核酸提取时以灭菌双蒸水代替标本。
- (2) 阳性对照：提取好的阳性核酸作为模板RNA

2.4 结果分析条件设定和结果判断

阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照扩增曲线的最高点，结果显示阴性为准，或可根据仪器噪音情况进行调整。

Ct值无数值的标本为阴性样本

Ct值≤35.0的样本为阳性

Ct值≥35.0的样本建议重做。重做结果无数值者为阴性，否则为阳性。

3. One Step Real-time PCR法检测肠道病毒核酸（单通道检测）

3.1反应体系配置

反应体系共25 μ l，模板量可根据样本情况自行决定（临床标本通常使用4 μ l模板量），不够部分以水补足。如选用另外试剂盒，反应体系及条件随之变化。

从试剂盒中取出相应的试剂，反应液在室温融化后，瞬时离心，按n+1配置反应体系（n=样本数+1管阳性对照+1管阴性对照），每个测量反应体系配置如下表：

| 内容 | 1份样品的量 |
|------------------------------------|--------------|
| 2 \times one step RT-PCR buffer | 12.5 μ l |
| Ex Taq HS | 0.5 μ l |
| RT-Enzyme Mix II | 0.5 μ l |
| EV F12: (20 μ M) | 0.8 μ l |
| EV R13: (20 μ M) | 0.8 μ l |
| 探针EV PB (20 μ M) (FAM荧光素标记) | 0.4 μ l |
| H ₂ O | 5.5 μ l |
| RNA模板 | 4 μ l |

3.2荧光RT-PCR循环条件设置

| 程序 | 循环数 | 温度（摄氏度） | 反应时间 |
|----|-----|---------|-------|
| 1 | 1 | 42 | 30min |
| 2 | 1 | 95 | 2min |
| 3 | 40 | 95 | 5s |
| | | 55 | 35s |
| | | 读荧光 | |

3.3对照设置

- （1）阴性对照：核酸提取时以灭菌双蒸水代替标本。
- （2）阳性对照：提取好的阳性核酸作为模板RNA

3.4结果分析条件设定和结果判断

阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照扩增曲线的最高点，结果显示阴性为准，或可根据仪器噪音情况进行调整。

Ct值无数值的标本为阴性样本

Ct值≤35.0的样本为阳性

Ct值≥35.0的样本建议重做。重做结果无数值者为阴性，否则为阳性。

4. One Step Real-time PCR法检测肠道病毒和HEV71核酸（双通道检测）

4.1 反应体系配置

反应体系共25μl，模板量可根据样本情况自行决定（临床标本通常使用4μl模板量），不够部分以水补足。如选用另外试剂盒，反应体系及条件随之变化。

从试剂盒中取出相应的试剂，反应液在室温融化后，瞬时离心，按n+1配置反应体系（n=样本数+1管阳性对照+1管阴性对照），每个测量反应体系配置如下表：

（1）肠道通用荧光引物探针：

上游引物：EVF12

下游引物：EVR13

探针（FAM荧光素标记）：EVPB

（2）EV71荧光引物探针：

上游引物：EV71YGF

下游引物：EV71YGR

探针（HEX荧光素标记）：EV71YGPB

| 内容 | 1份反应体系的量 |
|---------------------|----------|
| RT-PCR 反应液 | 12.5μl |
| Mn ²⁺ | 1.25μl |
| EVF12（20μM） | 0.6μl |
| EVR13（20μM） | 0.6μl |
| EVPB(FAM)（20μM） | 0.3μl |
| EV71YGF（20μM） | 0.6μl |
| EV71YGR（20μM） | 0.6μl |
| EV71YGPB(HEX)（20μM） | 0.3μl |
| H ₂ O | 4.25μl |
| RNA模板 | 4μl |

4.2 荧光RT-PCR循环条件设置

| 程序 | 循环数 | 温度（摄氏度） | 反应时间 |
|----|-----|---------|-------|
| 1 | 1 | 90 | 30s |
| 2 | 1 | 61 | 20min |
| 3 | 1 | 95 | 1min |
| 3 | 40 | 95 | 15s |
| | | 60 | 1min |
| | | 读荧光 | |

4.3 对照设置

(1) 阴性对照：核酸提取时以灭菌双蒸水代替标本。

(2) 阳性对照：提取好的阳性核酸作为模板RNA

4.4 结果分析条件设定和结果判断

阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照扩增曲线的最高点，结果显示阴性为准，或可根据仪器噪音情况进行调整。

Ct值无数值的标本为阴性样本

Ct值 ≤ 35.0 的样本为阳性

Ct值 ≥ 35.0 的样本建议重做。重做结果无数值者为阴性，否则为阳性。

注：荧光PCR读板时同时选择FAM和HEX进行双通道检测。

5. One Step Real-time PCR法检测HEV71和CVA16核酸（双通道检测）

5.1 反应体系配置

反应体系共25 μ l，模板量可根据样本情况自行决定（临床标本通常使用4 μ l模板量），不够部分以水补足。如选用另外试剂盒，反应体系及条件随之变化。

从试剂盒中取出相应的试剂，反应液在室温融化后，瞬时离心，按n+1配置反应体系（n=样本数+1管阳性对照+1管阴性对照），每个测量反应体系配置如下表：

(1) CVA16荧光引物探针：

上游引物：CAV16YGF

下游引物：CAV16YGR

探针（FAM荧光素标记）：CAV16YGPB

(2) HEV71荧光引物探针

上游引物：EV71YGF

下游引物：EV71YGR

探针（HEX荧光素标记）：EV71YGPB

| 内容 | 1份样品的量 |
|-----------------------------|--------------|
| RT-PCR 反应液 | 12.5 μ l |
| Mn ²⁺ | 1.25 μ l |
| CAV16YGF (20 μ M) | 0.6 μ l |
| CAV16YGR (20 μ M) | 0.6 μ l |
| CAV16YGPB(FAM) (20 μ M) | 0.3 μ l |
| EV71YGF (20 μ M) | 0.6 μ l |
| EV71YGR (20 μ M) | 0.6 μ l |
| EV71YGPB(HEX) (20 μ M) | 0.3 μ l |
| H ₂ O | 4.25 μ l |
| RNA模板 | 4 μ l |

5.2 荧光RT-PCR循环条件设置

| 程序 | 循环数 | 温度（摄氏度） | 反应时间 |
|----|-----|---------|-------|
| 1 | 1 | 90 | 30s |
| 2 | 1 | 61 | 20min |
| 3 | 1 | 95 | 1min |
| 3 | 40 | 95 | 15s |
| | | 60 | 1min |
| | | 读荧光 | |

5.3 对照设置

(1) 阴性对照：核酸提取时以灭菌双蒸水代替标本。

(2) 阳性对照：提取好的阳性核酸作为模板RNA

5.4 结果分析条件设定和结果判断

阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照扩增曲线的最高点，结果显示阴性为准，或可根据仪器噪音情况进行调整。

Ct值无数值的标本为阴性样本

Ct值 \leq 35.0的样本为阳性

Ct值 \geq 35.0的样本建议重做。重做结果无数值者为阴性，否则为阳性。

注：荧光PCR读板时同时选择FAM和HEX进行双通道检测。

实验室检测标准操作规程（SOP）

六. HEV71（或CVA16）IgM抗体检测

1 原理

捕获法酶联免疫吸附试验（Capture ELISA），在微孔条上包被抗人IgM抗体可与标本中IgM抗体结合，洗板后加入抗原与酶标二抗进行二次孵育，当标本中存在抗HEV71（或CVA16）的IgM抗体时，形成“抗 μ 链-IgM抗体- HEV71（或CA16）抗原-酶标抗体”复合物，加入底物后显色。

2 试验材料

- 2.1 微孔板：包被抗人IgM。
- 2.2 抗原试剂：含HEV71（或CVA16）病毒抗原。
- 2.3 酶标试剂：辣根过氧化物酶标记的HEV71抗体。
- 2.4 阳性对照：含抗HEV71（或CVA16）的IgM抗体阳性血清。
- 2.5 阴性对照：不含抗HEV71（或CVA16）的IgM抗体血清。
- 2.6 标本稀释液：含蛋白缓冲液。
- 2.7 浓缩洗涤液：含不低于2.5%的表面活性剂。
- 2.8 底物：TMB或OPD。
- 2.9 终止液：含硫酸，浓度不高于2mol/L。

3 标本

- 3.1 血清或血浆：含EDTA、柠檬酸钠或肝素等抗凝剂的标本。无悬浮纤维蛋白或聚合物、重度溶血、细菌污染。
- 3.2 脑脊液。

4 操作步骤

- 4.1 试剂放置在室温平衡30min以上。
- 4.2 配液：将浓缩洗涤液用蒸馏水或去离子水20倍稀释。
- 4.3 编号：将标本对应微孔板按序编号，每板应设阴性对照3孔，阳性对照2孔和空白对照1孔。
- 4.4 加稀释液：每孔加入标本稀释液100 μ l，空白孔除外。
- 4.5 加样：分别在相应孔中加入待测标本或阴性、阳性对照10 μ l，轻轻振荡混匀。
- 4.6 孵育：用封板膜封板后，37 $^{\circ}$ C孵育30min。
- 4.7 洗板：小心揭掉封板膜，用洗板机洗涤5遍，最后一次扣干。
- 4.8 加抗原：每孔加入抗原试剂50 μ l，空白孔除外。

- 4.9 加酶：每孔加入酶标试剂50 μ l，空白孔除外，轻轻振荡混匀。
- 4.10 孵育：操作同步骤4.6。
- 4.11 洗板：操作同步骤4.7。
- 4.12 显色：每孔加入显色剂A、B液各50 μ l，轻轻振荡混匀，37 $^{\circ}$ C避光显色15min。
- 4.13 测定：每孔加入终止液50 μ l，轻轻振荡混匀，10min内测定结果。设定酶标仪波长于450nm，用空白孔调零后测定各孔A值。

5 试剂对照范围

- 5.1 阴性对照A值 \leq 0.1。若1孔阴性对照A值 $>$ 0.1应舍弃，若2孔或3孔阴性对照A值 $>$ 0.1，应重复试验。
- 5.2 阳性对照A值 \geq 0.8。

6 结果判断

- 6.1 临界值(Cutoff)计算：临界值=0.1+阴性对照A均值。(阴性对照孔A值低于0.05按0.05计算)。
- 6.2 阴性判定：标本A值 $<$ 临界值，为HEV71(或CVA16)病毒IgM抗体阴性。
- 6.3 阳性判定：标本A值 \geq 临界值，为HEV71(或CVA16)病毒IgM抗体阳性。

实验室检测标准操作规程（SOP）

七. 实验室生物安全

根据2006年1月11日卫生部制订的《人间传染的病原微生物名录》，急性出血性结膜炎病毒、柯萨奇病毒、埃可病毒、肠道病毒 71型和目前分类未定的其它肠道病毒均属于危害程度第三类的病原微生物。因此在保证安全的前提下，对临床和现场的未知样本检测操作可在生物安全II级或以上防护级别的实验室进行，涉及病毒分离培养的操作，应加强个体防护和环境保护。

| 序号 | 病毒名称 | | | 危害程度分类 | 实验活动所需生物安全实验室级别 | | | | | 运输包装分类 | | 备注 |
|----|---|------------|---------|--------|-----------------|--------|--------------|---------|-----------|--------|--------|---------------|
| | 英文名 | 中文名 | 分类学地位 | | 病毒培养 | 动物感染实验 | 未经培养的感染材料的操作 | 灭活材料的操作 | 无感染性材料的操作 | A/B | UN编号 | |
| 1 | <i>Acute hemorrhagic conjunctivitis virus</i> | 急性出血性结膜炎病毒 | 小RNA病毒科 | 第三类 | BSL-2 | ABSL-2 | BSL-2 | BSL-1 | BSL-1 | B | UN3373 | |
| 2 | <i>Coxsackie virus</i> | 柯萨奇病毒 | 小RNA病毒科 | 第三类 | BSL-2 | ABSL-2 | BSL-2 | BSL-1 | BSL-1 | B | UN3373 | |
| 3 | <i>ECHO virus</i> | 埃可病毒 | 小RNA病毒科 | 第三类 | BSL-2 | ABSL-2 | BSL-2 | BSL-1 | BSL-1 | B | UN3373 | |
| 4 | <i>Enterovirus</i> | 肠道病毒 | 小RNA病毒科 | 第三类 | BSL-2 | ABSL-2 | BSL-2 | BSL-1 | BSL-1 | B | UN3373 | 系指目前分类未定的肠道病毒 |
| 5 | <i>Enterovirus 71</i> | 肠道病毒 71型 | 小RNA病毒科 | 第三类 | BSL-2 | ABSL-2 | BSL-2 | BSL-1 | BSL-1 | B | UN3373 | |

操作疑为HFMD患者疱疹液、鼻或咽拭子、脑脊液、粪便中（肛拭子）或尸检标本和血液等临床标本时要特别注意生物安全，要在II级生物安全柜中进行标本处理、病毒分离和病毒鉴定，无脊灰疫苗免疫史的人员要进行脊灰疫苗免疫。

灭活后的血清抗体检测与PCR检测可在生物安全I级实验室进行。

所有操作应遵守国家相关法律法规。