

## S1 WHO 脊髓灰质炎实验室手册的补充资料

### 另一种关于脊髓灰质炎病毒分离和鉴定的检测流程

#### S1.1 新检测流程的原理

在早期确定脊髓灰质炎（脊灰）病毒的感染和传播，是采取公共卫生干预措施，限制病毒扩散的重要前提。根据 WHO 全球脊灰实验室网络（GPLN）的经验，下列因素可能会延长从发现麻痹病例到实验室证实脊灰病毒感染的整个过程：

- 三个工作组参与了此过程的调查研究：流行病学监测人员发现 AFP 病例，采集样本，并将样本送至实验室；实验室人员进行病毒分离，并对分离的病毒进行鉴定；商业运输公司将样本和病毒分离物运输到实验室。
- 只有 50% 的国家拥有至少一个属于 GPLN 的实验室。所有网络实验室都有能力进行病毒分离，及对病毒血清型进行鉴定，其中一些实验室还可进行型内鉴定（ITD）。由于 GPLN 中不同级别的实验室和不同国家的实验室具有不同的实验技术能力，所以粪便标本和病毒分离物需要经常在国内和国际间运输，这个过程耗费时间，并且费用昂贵。
- 还未建立起直接的和快速的（数小时之内）从粪便标本中检测出脊灰病毒的高敏感性和特异性的实验室方法。且缺少标准化的、有效的试剂及质量保证手册，限制了用于检测脊灰病毒的新技术被引入到 GPLN 中。

通过对 GPLN 工作数据的分析，发现对一些过程进行调整可以提高效率，并改进报告时限性。本文所描述的另一个可选的脊灰病毒分离和鉴定的检测流程（例如，实验的各个环节），经过对三个不同地区的使用进行现场评估，发现这种检测流程可以更快地得到检测结果，同时与 WHO 脊髓灰质炎实验室手册第四版（WHO/IVB/04.10）第七章和第八章中所描述的传统检测流程相比，达到了其 95% 以上的对脊灰病毒检测的敏感性和特异性。与传统的检测流程相比，该新的检测流程：

- 对于每一份粪便标本，仍然需接种至两种传代细胞系（L20B 和 RD 细胞）上，每种细胞接种两管。

- 接种到细胞上后，观察细胞状态的时间缩短。
- 使用不同的方法对细胞培养物进行传代。
- 对 L20B 细胞上出现致细胞病变效应（CPE）的病毒分离物，需要使用聚合酶链反应（PCR）方法同时鉴定病毒的血清型和进行型内鉴定（ITD），可以尽早发现并立即报告非疫苗类似株（NSL, non-Sabin-like）的结果。
- 对 L20B 阳性的病毒分离物，接种到 RD 细胞上再进行型内鉴定。
- 减少使用微量中和实验（NT）法进行血清型鉴定，仅在细胞培养物中含有混合型病毒的时候（来自于 PCR 法鉴定结果）才使用，以便将混合型病毒分为单血清型脊灰病毒后进行 ELISA 法型内鉴定。
- 对单一血清型的脊灰病毒【PCR 法鉴定为单血清型疫苗类似株（SL, Sabin-like）的病毒或者使用中和实验将混合型病毒分为单血清型的病毒】进行 ELISA 法型内鉴定，以便通过对其抗原特性进行分析，筛查出可能的疫苗衍生脊髓灰质炎病毒（VDPV）。

## S1.2 使用传代细胞系进行病毒分离

需要使用下列物品：

- L20B 和 RD 细胞培养管；
- 维持液；
- 1ml 和 5ml 一次性塑料移液管；
- 粪便标本悬液（见 WHO 脊髓灰质炎实验室手册第六章，第 6.2 节内容中关于标本处理的操作规程）。

按照下列操作规程进行操作：

- 在显微镜下观察新近准备的单层细胞，以确保细胞处于健康状态，且至少 75% 以上融合成单层。合适的单层细胞，通常在传代后 2~3 天内形成。
- 弃生长液，换 1ml 维持液。
- 将每一份标本接种到两管 RD 细胞和两管 L20B 细胞上，并进行标记（包括标本号、日期和传代数）。
- 每一种细胞标记一管作为阴性对照。

**注意：两种细胞系必须同时接种。**

- 每管细胞接种 0.2ml 的标本悬液，随后在 36℃ 孵箱中以 5 度的坡度静置。如果旋转培养，L20B 细胞不能生长，且对于用于脊灰病毒分离的 L20B 细胞和 RD 细胞来说不是必须的。
- 每天使用标准显微镜或倒置显微镜观察细胞状态，观察有无 CPE 出现。
- 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；2+代表 25~50%；3+代表 50~75%；4+代表 75~100%）、毒性反应<sup>1</sup>、老化或者污染<sup>2</sup>。
- 如果观察至少 5 天后仍未出现 CPE，在同一细胞系上进行盲传<sup>3</sup>，随后再观察 5 天。（每一份原始标本接种两管细胞后，即使两管结果都为阴性，也不能合并后进行再传代，举例，每一份阴性细胞培养物应单独传代）。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 天（例如，标本接种后观察至少 5 天，传代后再观察至少 5 天）。
- 在标本接种后任何阶段出现特征性的肠道病毒 CPE，例如，细胞变圆，折光性增强，从细胞培养管壁脱离，记录观察到的结果，直至 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<sup>4</sup>（见图 S1.1）。同一份标本接种到两管相同细胞系的细胞培养管，如果都出现 $\geq 3+$ CPE 时，此时可以合并<sup>5</sup>，再传至另一种细胞系的细胞培养管中，细胞培养管内含新换的 1ml 维持液：

○ **L20B 细胞上出现 CPE 的阳性细胞培养物**，需传到 RD 细胞上，并且在 36℃ 孵育，并每天观察。

■ 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，直至将其送至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<sup>6</sup>。RD 细胞培养物应在接种后连续观察 5 天后报告阴性结果。

○ **RD 细胞上出现 CPE 的阳性细胞分离物**，需接种到 L20B 细胞上，

然后在在 36℃ 孵育，并每天观察。这次传代的目的是将脊灰病毒从混合有其它肠道病毒的混合物中分离出来，并且扩增脊灰病毒的滴度。

- 如果观察至少 5 天后，L20B 细胞仍然没有出现 CPE，那么这份细胞培养物可以认为不含有脊灰病毒，并以 NPEV 报告（见图 S1.1）。
- 但是，特征性的肠道病毒 CPE 会在一些 L20B 细胞上出现，观察直至出现  $\geq 3+$ CPE。然后将该细胞培养物再次传代至 RD 细胞上<sup>4</sup>，继续观察至 CPE 的出现。此过程的目的是扩增病毒滴度。任何出现  $\geq 3+$ CPE 的阳性 RD 细胞培养物需保存在 -20℃ 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 天后仍然为阴性结果<sup>6</sup>，这时应报告为阴性结果。

<sup>1</sup>**毒性反应：**如果细胞培养物在接种后 24 小时之内出现快速的老化现象，这可能是由于标本接种引起的非特异性的毒性反应。这些细胞培养管应在 -20℃ 冷冻，随后融化，取 0.2ml 再转种到同种类型的细胞培养管中（例如：这个过程与传代类似，但不应计算传代次数）。如果毒性反应再次出现，那么需要重新取原始标本悬液，然后用 PBS 将其稀释 10 倍，并重新按照上述步骤接种（这个过程应被认为是标本的接种，并且当日计为第 0 天观察）。

<sup>2</sup>**微生物污染：**由于细菌或真菌的污染导致的细胞培养液的污染和细胞的死亡，使得病毒 CPE 的出现变得不确定或不可能。此时需重新取原始标本悬液，再次采用氯仿处理（见 WHO 脊髓灰质炎实验室手册第六章第 6.2 节），然后按上述步骤接种到新鲜的细胞上。

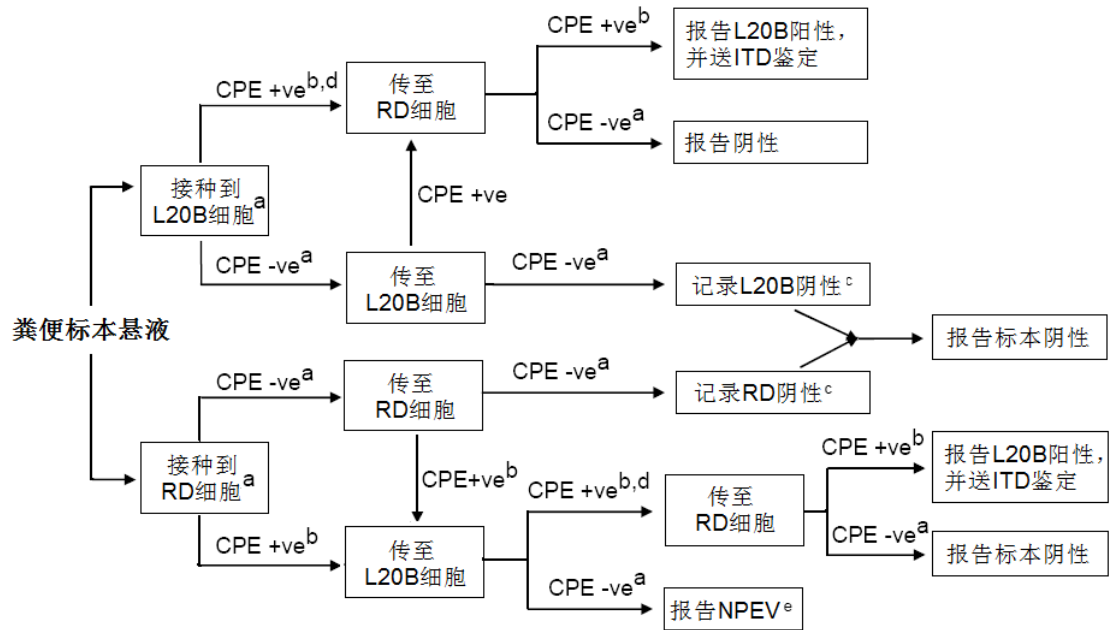
<sup>3</sup>**盲传：**在 -20℃ 将细胞培养管冷冻，融化后，取 0.2ml 细胞培养物接种到同种类型的单层细胞上，随后每天观察，至少 5 天。如果此时无 CPE 出现，可认为该标本为阴性结果。

<sup>4</sup>**CPE 阳性的细胞培养物的传代：**在 -20℃ 将细胞培养物进行冷冻，融化后取 0.2ml 细胞培养物接种到不同类型的单层细胞上，随后每天观察，至少 5 天。

<sup>5</sup>**合并 CPE 阳性的细胞培养物：**只有当两管同种类型的细胞在同一天出现  $\geq 3+$ CPE 时，这时才能将其合并。除此之外，每一个细胞培养物需要单独传代至新的细胞上。

<sup>6</sup>**不可重现的 CPE：**某些病毒例如呼肠孤病毒，腺病毒或某些非肠道病毒可以在鼠 L-细胞上生长。但其中一些这样的病毒产生的 CPE 与肠道病毒产生的特异性 CPE 明显不同。

图 S1.1 脊灰病毒分离新检测流程



a: 观察至少 5 天;

b: 观察至出现  $\geq 3$ +CPE (通常 1~2 天, 最多 5 天; 如果出现毒性反应或污染, 需重新接种);

c: 最少观察时间是 10 天 (2×5 天);

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: 对 NPEV 诊断感兴趣或者想证明自己能力的实验室可以对该病毒血清型进行鉴定。

### S1.3 病毒分离结果的报告和接下来需采取的措施

- 不进行型内鉴定的实验室需要在此阶段向国家机构和 WHO 报告初步的病毒分离结果。
- 需要结合 RD 和 L20B 两种细胞系的结果, 综合判断每份标本的检测结果。
- 需要结合从一个病例采集的所有标本的检测结果, 综合判断该病例的诊断结果。
- 病毒分离的可能结果和报告的建议用词见表 S1.1。
- 未鉴定的病毒分离物应立即送往型内鉴定实验室 (理想状态下为检测后 7 天内), 在型内鉴定实验室进行病毒血清型别鉴定和型内鉴定。随样品附送的送检单应包括病例和病毒分离物鉴定的信息 (例如: EPID 号和实验室编号), 病毒分离物必须标明实验室编号和传代信息 (例如: 标记为

L+R+或 R+L+R+)。

- 期望病毒分离实验室可以在其实验室继续使用微量中和实验对备份的病毒分离物进行型别鉴定。但是需要强调的是，病毒分离实验室不应等到血清定型结果出来或从混合型病毒中分离到单血清型病毒才将病毒分离物送至型内鉴定实验室。

表 S1.1: 每份标本病毒分离的可能结果和结果报告

病毒分离的结果	评论	需采取的措施
阴性	接种标本后无病毒 CPE 出现，或者病例的任何一份细胞培养物或原始标本在 L20B 和 RD 细胞上传代后，无病毒 CPE 出现。	报告“阴性”或者“未分离到病毒”。不用采取任何其他措施。
L20B 细胞阳性分离物	在 L20B 细胞上接种标本后出现病毒 CPE，或者病例的至少一份细胞培养物或原始标本传代至 L20B 细胞上后，出现病毒 CPE。当 L20B 细胞分离物传代至 RD 细胞上时，CPE 可重现。	报告“L20B 细胞阳性分离物。可能是脊灰病毒。需要对该病毒分离物进行型内鉴定”。将该 L20B 细胞分离物传代至 RD 细胞上，并在 7 天之内将 RD 细胞分离物送至型内鉴定实验室。
检测到非脊灰肠道病毒	在接种或传代后，RD 细胞出现病毒 CPE，并且将 RD 细胞分离物传代至 L20B 细胞上后，无 CPE 出现。	报告“NPEV”。不用采取任何其他措施。
同时检测到 L20B 阳性分离物和非脊灰肠道病毒	同一份标本的一份或多份细胞培养物被鉴定为“L20B 阳性分离物”， <u>并且</u> 同一份标本的一份或多份其它细胞培养物被鉴定为“NPEV”。	报告“L20B 细胞阳性分离物和 NPEV”。

