

青海省 2017 年脊髓灰质炎病毒学监测结果分析

范丽霞¹ 巴卓玛¹ 赵生仓¹ 李崇亥¹ 祝双利²

¹青海省疾病预防控制中心卫生检验检测中心, 西宁 810007; ²中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, 北京 102206

通信作者: 祝双利, zhushl@ivdc.chinacdc.cn

【摘要】 目的 评价青海省 2017 年脊髓灰质炎(脊灰)病毒学监测情况。方法 按照世界卫生组织(world health organization, WHO)第 4 版《脊灰实验室手册操作规程进行病毒分离, 分离到的 L20B 阳性分离物做型内鉴定(intratypic differentiation, ITD), 由中国疾病预防控制中心(chinese center for disease control and prevention, CDC)病毒病预防控制所国家脊灰实验室对脊灰病毒(poliovirus, PV)衣壳蛋白(capsid protein, VP1)编码区进行核苷酸序列测定和分析, 对青海省 2017 年报告的急性弛缓性麻痹(acute flaccid paralysis, AFP)病例及健康儿童粪便标本进行脊灰病毒学监测和结果分析。结果 2017 年青海 CDC 脊灰实验室共收到 AFP 病例及健康儿童粪便标本 211 份, 分离到 PV2 株, 分离率为 0.95%; 非脊灰肠道病毒(non-polio enterovirus, NPEV)25 株, 分离率为 11.85%; 两株 PV 均为疫苗相关株。结论 2017 年青海 CDC 脊灰实验室在 AFP 病例及健康儿童粪便标本中未发现脊灰野病毒和疫苗衍生脊灰病毒, 青海省继续维持无脊灰状态。

【关键词】 急性弛缓性麻痹; 脊髓灰质炎病毒; 病毒学监测

基金项目: 国家科技重大传染病监测技术平台项目(2012ZX10004-208)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2019.01.013

Virological monitoring and analysis of polioviruses in Qinghai 2017

Fan Lixia¹, Ba Zhuoma¹, Zhao Shengcang¹, Li Chonghai¹, Zhu Shuangli²

¹Qinghai Center for Disease Control and Prevention, Xining 810007, China; ²National Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China
Corresponding author: Zhu Shuangli, Email: zhushl@ivdc.chinacdc.cn

【Abstract】 **Objective** To evaluate 2017 poliovirus surveillance in Qinghai Province. **Methods** According to the World Health Organization (WHO) 4th edition of the polio laboratory manual procedure for virus isolation, the isolated L20B positive strain was identified as intratypic differentiation (ITD) by the China Center for Disease Control and Prevention, CDC). The National Polio Laboratory performed the nucleotide sequence determination of the capsid protein VP1 coding region of poliovirus (PV) and analyzed the poliovirus surveillance and the result of analysis of the cases with acute flaccid paralysis (AFP) reported in Qinghai Province in 2017 and stool samples of healthy children. **Results** In 2017, Qinghai CDC Polio Laboratory received specimens of 211 AFP cases and healthy stool samples. PV2 strains were isolated with a separation rate of 0.95%. Non-polio enterovirus (NPEV) strains were isolated from 25 strains with the isolation rate of 11.85%. Two PVs were used for ITD. All of them were vaccine-associated strains. **Conclusions** In 2017, the Qinghai CDC Polio Laboratory did not find any poliovirus and vaccine-derived poliovirus in the AFP cases and stool samples from healthy persons, maintaining the polio-free status.

【Key words】 Acute flaccid paralysis; Poliovirus; Virological monitoring

Fund programs: National Science and Technology Major Project of the Ministry of Science and Technology of China during “12th Five-Year Plan” (2012ZX10004-208)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-9279.2019.01.013

青海省脊灰实验室 1992 年加入全国脊灰实验室监测网络,负责全省急性弛缓性麻痹(acute flaccid paralysis, AFP)病例及健康人群病原学监测工作,青海省 1994 年以来无本地脊髓灰质炎(脊灰)野毒株病例流行,阻断了野病毒在外环境中的循环^[1-3],自 1999 年发生了由印度输入的脊灰野病毒病例至今再未发现脊灰野病毒(wild poliovirus, WPV),一直处于无脊灰状态^[4-5]。为继续维持无脊灰,进一步做好病原学监测,现将 2017 年脊灰实验室监测情况报告如下。

1 材料与方法

1.1 资料来源 青海省 AFP 监测信息报告管理系统数据库、青海疾病预防控制中心(Chinese center for disease control and prevention, CDC)脊灰实验室监测数据。

1.2 粪便及环境标本的采集和运输 青海省 AFP 病例粪便标本,由报告单位采集,在规定时间内 4℃条件下运送至青海疾病预防控制中心脊灰实验室, -20℃保存待检。健康儿童粪便标本由当地县级疾病预防控制中心采集,并在 4℃条件下运送至青海疾病预防控制中心脊灰实验室, -20℃保存待检。

1.3 实验室检测方法

1.3.1 病毒分离与鉴定:所有粪便标本按照 WHO 2004 年第 4 版《脊灰病毒实验室手册》^[3],用人横纹肌肉瘤(human rhabdomyosarcoma, RD)细胞和表达了人类脊灰病毒受体的小鼠肺细胞系(mouse cell line expressing the gene for the Human cellular receptor for poliovirus, L20B)细胞进行病毒分离,病毒分离所用的细胞系由国家脊灰实验室(National Polio Laboratory, NPL)提供。

1.3.2 型别鉴定:L20B 阳性分离物使用中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所脊灰实验室提供的 Poliovirus rRT-PCR ITD 5.0(KT0174)及 Poliovirus rRT-PCR VDPV 5.0(KT0176)试剂盒,按照 WHO 培训规程进行型内鉴定,鉴定为脊灰病毒的毒株送中国疾病预防控制中心进行核苷酸序列测定分析。

1.4 实验室质量控制

1.4.1 细胞系敏感性实验:用 96 孔微量培养板滴定法。病毒滴度的计算通过 Karber 公式计算病毒滴度: $\log_{10}CCID_{50} = L - d(S - 0.5)$,其中:L=实验中使用最低稀释度的 log 值;d=稀释过程中 2 个稀释度之间的差(稀释梯度)的 log 值;S=终判断时实验阳

性部分总和(即出现 CPE 的细胞孔所占的比例之和)。

1.4.2 职能考核:接受 WHO 病毒分离、ITD 盲样考核及对省级实验室的工作情况认证考核。

2 结果

2.1 AFP 病例监测指标完成情况 2017 年青海省 AFP 报告发病率为 1.79/10 万,8 个市、州中有 5 个市、州报告了 AFP 病例,其中病例集中在人口相对密集的西宁市和海东市(16/21)。青海疾病预防控制中心脊灰实验室收到 26 例 AFP 病例的 52 份粪便标本,合格粪便标本采集率为 84.62%(44/52),粪便标本采集后 7 d 内送达青海省疾病预防控制中心脊灰实验室及时率为 96.15%(50/52),收到粪便标本 14 d 内检测结果报告及时率为 100.0%,L20B 阳性分离物 14 d 内上送 NPL 及时率为 100.0%,PV 型别与 NPL 鉴定结果符合率为 100.0%。

2.2 AFP 病例和健康儿童粪便标本病毒分离情况 2017 年,青海疾病预防控制中心脊灰实验室检测 AFP 病例粪便标本 52 份, PV 分离率为 0%, NPEV 分离率为 3.85%;检测健康儿童粪便标本 159 份, PV 分离率为 1.27%, NPEV 分离率为 14.47%(表 1)。

表 1 青海省 2017 年病毒分离情况

Tab.1 Isolation of Polio virus in Qinghai Province in 2017

标本来源	标本数量(份)	PV 分离数	PV 分离率(%)	NPEV 分离数	NPEV 分离率(%)
AFP	52	0	0	2	3.85
健康儿童	159	2	1.27	23	14.47
合计	211	2	0.95	25	11.85

2.3 PV 的 ITD 从 159 份健康儿童粪便标本中分离到 2 株 PV,经 ITD 鉴定 1 株 I 型,1 株 III 型。NPL 对 2 株 PV 进行 VP1 编码区核苷酸序列测定和分析,与 Sabin、昆明株相比,经鉴定均为疫苗相关株(Sabin-like, SL)(表 2)。

表 2 青海省 2017 年 PV VP1 区核苷酸变异情况

Tab.2 Nucleotide mutation of PV VP1 region of Polio virus in Qinghai Province in 2017

国标编码	血清型	服药剂次	核苷酸变异数(与 sabin 株比较)
6326242017016	I	4	4
6326222017044	III	3	1

2.4 实验室质量控制

2.4.1 细胞敏感性评价:2017 年每季度进行 1 次

细胞敏感性试验,每次得出的滴度与质量控制标准毒株的平均滴度相比较波动范围均在 $\pm 0.5 \log_{10}$ 50%细胞培养感染剂量(50% median infective dose of cell culture, CCID₅₀)/0.1 ml 以内,说明细胞具有良好的敏感性。

2.4.2 现场认证及职能考核:2010,2011,2014 年,青海疾病预防控制中心脊灰实验室高分通过 WHO 及 NPL 对青海疾病预防控制中心脊灰实验室的现场认证;2010 年以来,青海实验室连续 8 年满分通过了 WHO 的病毒分离职能考核;2017 年满分通过了 WHO 的 ITD 职能考核。

3 讨论

2000 年,包括中国在内的世界卫生组织(World Health Organization, WHO)西太平洋区(Western Pacific Region, WPR)实现了无脊灰,但与我国接壤的部分国家还存在脊灰野病毒的流行^[6],阿富汗、尼日利亚和巴基斯坦的地方性传播仍在继续,这对我国也构成了输入性威胁。由于青海省是多民族地区,与上述国家贸易来往,人员交流较多,发生脊灰输入性病例的风险较高,这就要求脊灰监测系统具备高度的敏感性和高质量的病毒学监测能力。

2017 年青海省 AFP 合格粪便标本采集、上送、结果报告、上送率、符合率等监测指标都达到了质控要求。由于青海省人口基数小,为了保证监测数据科学性,我们开展了健康人群监测;实验室按照国家要求每季度开展细胞支原体检测和细胞敏感性实验,结果显示细胞系无支原体污染,对脊灰病毒的敏感性结果均处于 $\pm 0.5 \log_{10}$ CCID₅₀/0.1 ml 正常范围内,说明了细胞敏感、有效,从而保证了病毒分离的质量^[7]。2017 年满分通过了 WHO 和 NPL 对青海省脊灰实验室的能力验证考核,通过了美国 CDC 的 ITD 盲样考核。以上结果显示,青海疾病预防控制中心脊灰实验室监测质量保持在较高水平。

2017 年青海疾病预防控制中心脊灰实验室从 AFP 和健康儿童的粪便标本中均未检测到 WPV,实验室监测系统敏感,监测能力保持在较高水平,这为维持无脊灰提供了重要的实验室数据。为了得到更可靠和科学的监测数据,目前许多国家都在开展脊灰病毒的环境监测^[8-9],在保证 AFP 病例和健康人群监测的基础上,建议开展脊灰病毒的环境监测,更能真实反映环境中脊灰病毒的存在状况,为维持青海省无脊灰提供技术支撑。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 范丽霞、巴卓玛、李崇亥:实验操作、论文撰写、数据整理分析;赵生仓、祝双利:论文指导、修改。

参考文献

- [1] 赵生仓,巴卓玛.青海省急性弛缓性麻痹病例实验室监测结果分析[J].中华流行病学杂志,1996,17(1-B):227-228.
- [2] 赵生仓.急性弛缓性麻痹病例与健康人群病原学监测[J].中国公共卫生,2002,12(6):721-721. DOI: 10.3321/j.issn:1001-0580.2002.06.036.
- [3] 赵生仓.青海省 2000—2009 年急性弛缓性麻痹病例与健康人群病原学监测[J].现代预防医学,2011,38(3):552-553.
- [4] 范丽霞,巴卓玛,赵生仓.青海省 2008—2012 年急性弛缓性麻痹病例与健康人群病原学监测[J].医学动物防制,2013,29:490-492.
- [5] 范丽霞,巴卓玛,赵生仓.青海省 2008—2010 年 AFP 病例和健康儿童 NPEV 监测分析[J].医学动物防制,2012,28:709-710.
- [6] 甄晓荣,王小玲,李晓波,等.甘肃省 2000—2009 年急性弛缓性麻痹病例中脊髓灰质炎病毒阳性病例分析[J].卫生职业教育,2011,29(23):133-134.
- [7] 王东艳,赵蓉,安洪秋,等.脊髓灰质炎病毒细胞系敏感性实验方法的建立[J].中国计划免疫,2005,11(6):431-433.
- [8] Mas Lp, Gary HE, Jr Perez LS, et al. Poliovirus detection in wastewater and stools following an immunization campaign in Havana, Cuba[J]. Int J Epidemiol, 2003, 32(5):772-777.
- [9] Yoshida H, Horie H, Matsuura K, et al. Prevalence of vaccine derived polioviruses in the environment[J]. J Gen Virol, 2002, 83(Pt5): 1107-1111.

(收稿日期:2018-03-07)

(本文编辑:陈培莉)