

新疆维吾尔自治区地方标准

DB 65/T 4679—2023

脊髓灰质炎病毒型内鉴定规程

Code of practice for intratypic differentiation of poliovirus

2023 – XX – XX 发布

2023 – XX – XX 实施

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心提出。

本文件由新疆维吾尔自治区卫生健康委员会归口。

本文件起草单位：新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心、新疆维吾尔自治区标准化研究院。

本文件主要起草人：唐海淑、凯赛尔·吾斯曼、王琪、宁静、朱帕尔古丽·哈那西、周洁、艾克达·阿不都热依木、翟啸虎、沙吾拉西·热加甫、朱芸、王唯佳。

本文件实施应用中的疑问，请咨询新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心。

对本文件的修改意见建议，请反馈至新疆维吾尔自治区卫生健康委员会（乌鲁木齐市天山区龙泉街191号）、新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心（新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市天山区碱泉一街380号）、新疆维吾尔自治区市场监督管理局（乌鲁木齐市新华南路167号）。

新疆维吾尔自治区卫生健康委员会 联系电话：0991-8561122； 传真：0991-8561122； 邮编：830000

新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心 联系电话：0991-2625962； 传真：0991-2625962； 邮编：830000

新疆维吾尔自治区市场监督管理局 联系电话：0991-2817197； 传真：0991-2311250； 邮编：830000

脊髓灰质炎病毒型内鉴定规程

1 范围

本文件规定了脊髓灰质炎病毒（*PolioVirus*, PV）型内鉴定（*Intratypic Differentiation*, ITD）的规程，包括鉴定对象、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。

本文件适用于对脊髓灰质炎病毒进行型内鉴定时开展的实验活动。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

WS/T 294 脊髓灰质炎诊断

3 术语和定义

WS/T 294界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

脊髓灰质炎病毒 **poliovirus**

该病毒为小核糖核酸病毒科（*Picornaviridae*），肠道病毒属（*Enterovirus*），可分为 I 型、II 型、III 型共 3 个血清型，各型间无交叉免疫。以下简称脊灰病毒。

[来源：WS/T 294—2016，附录 A.1]

3.2

型内鉴定 **intratypic differentiation, ITD**

对同一血清型的脊灰病毒，鉴定其为疫苗类似株、疫苗衍生脊灰病毒还是脊灰野病毒的方法。

3.3

疫苗类似株 **sabin Like, SL**

与原始疫苗病毒 Sabin 株相比，I 型和 III 型脊灰病毒 VP1 编码区核苷酸变异 < 9 个，II 型脊灰病毒 VP1 编码区核苷酸变异 < 5 个，则称为疫苗类似株。

3.4

疫苗衍生脊灰病毒 **vaccine derived poliovirus, VDPV**

与原始疫苗病毒 Sabin 株相比，I 型和 III 型脊灰病毒 VP1 编码区核苷酸变异 ≥ 10 个，且 < 135 个（变异率 $\geq 1\%$ ，且 < 15%）；II 型脊灰病毒 VP1 编码区核苷酸变异 ≥ 6 个，且 < 135 个（变异率 $> 0.6\%$ ，且 < 15%），则称为疫苗衍生脊灰病毒。

[来源：WS/T 294—2016，附录 A.2]

3.5

脊灰野病毒 **wild poliovirus, WPV**

与原始疫苗病毒 Sabin株相比，当脊灰病毒VP1编码区核苷酸变异 ≥ 135 个（变异率 $\geq 15\%$ ），则称为脊灰野病毒。

3.6

疫苗衍生脊灰病毒筛查 VDPV screening

对鉴定为疫苗类似株的脊灰病毒进行疫苗衍生脊灰病毒的筛查。

4 鉴定规程

4.1 鉴定对象

脊灰病毒。

4.2 鉴定对象来源

急性弛缓性麻痹病例监测系统病例和接触者粪便标本、特定条件下采集的健康儿童粪便标本或环境污水标本。

4.3 鉴定程序

脊灰病毒型内鉴定程序见图1。

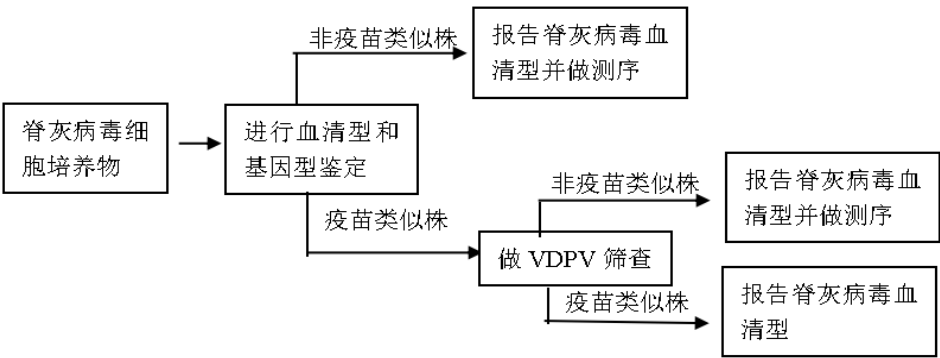


图1 脊灰病毒型内鉴定程序

4.4 鉴定方法

4.4.1 脊髓灰质炎实验室网络进行脊灰病毒的型内鉴定多采用的是 rRT-PCR 方法。包括 ITD rRT-PCR 和 VDPV rRT-PCR，可对脊髓灰质炎病毒进行血清型和基因型的鉴定。

4.4.2 根据两者检测的目的不同，设计了多套不同的引物（见附录 A）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，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。

4.4.3 ITD rRT-PCR 结果为疫苗类似株时，需要进行下一步的 VDPV 筛查。

5 96 孔板的合理使用及布局简介

ITD rRT-PCR时，在96孔板上，第1、7列、2、8列、3、9列、4、10列、5、11列、6、12列分别做 Quadruplex（包含PanEV、SabinI、SabinII、SabinIII）、PanPV、Duplex WPV1（含AFR WPV1和SOAS WPV1）、PV2、WPV3-1、WPV3-2引物和探针的鉴定，A1~A6为试剂盒阴性对照，B2~B6为试剂盒阳性对照，C1~

C6为标本1，D1~D6为标本2……依次类推，即每份标本要同时做6组（含10对）引物的鉴定，每块96孔板可鉴定14份标本，96孔板的布局示意图见图2。

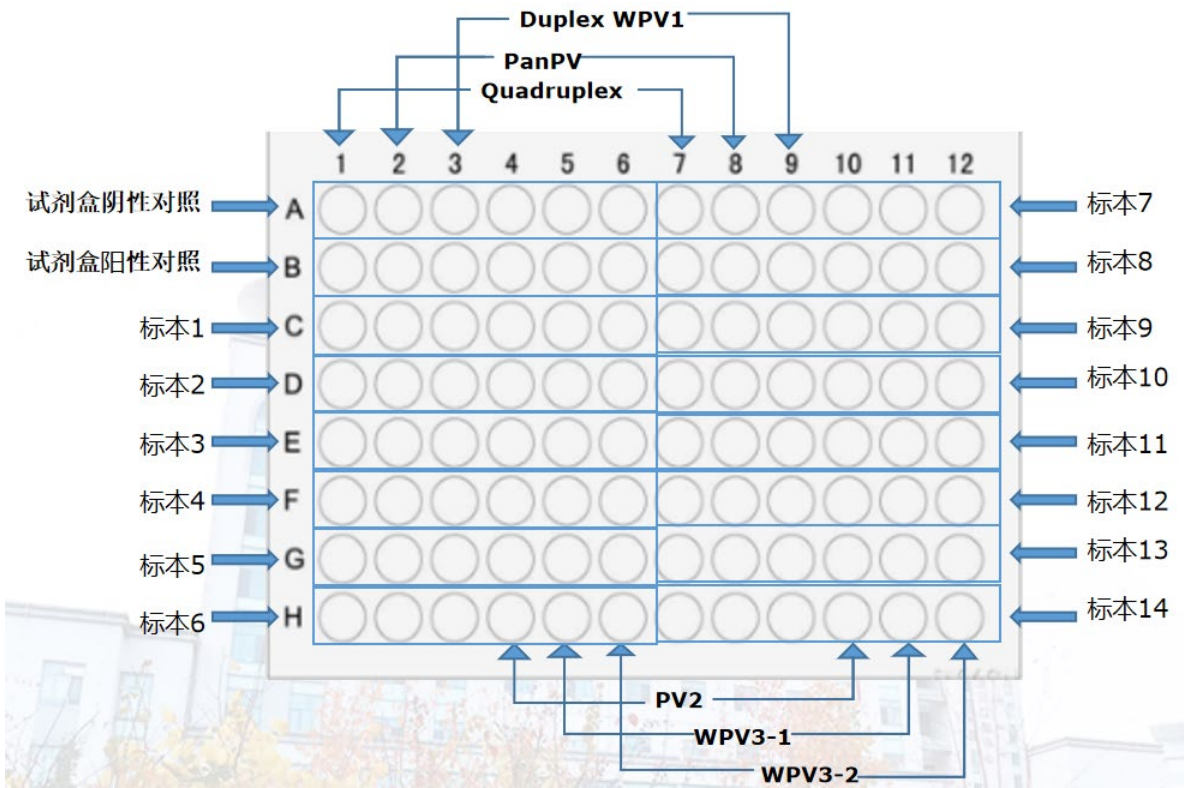


图2 96 孔板的布局示意图

6 96 孔板的阴、阳性判定

6.1 脊髓灰质炎病毒型内鉴定在荧光定量 PCR 系统上鉴定（仪器使用方法参照仪器使用说明书），试剂配置方法和扩增条件按试剂盒说明书进行。待测反应孔检测结果若循环阈值(Cycle threshold, Ct) ≤28，曲线呈 S 型且有明显指数增长期，则判断该孔为阳性（+）（阳性扩增曲线示意图见图 3）。

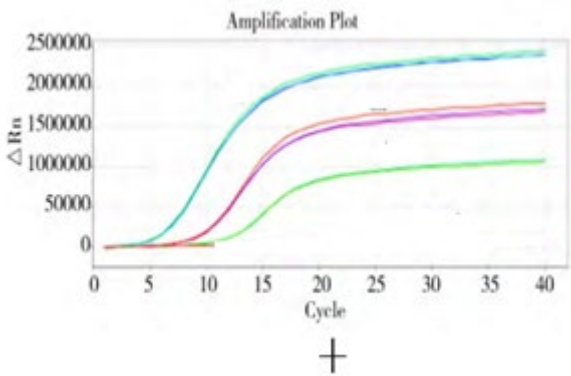


图3 阳性（+）扩增曲线示意图

6.2 若 $28 < C_t < 32$ ，就需要提取样本核酸，进行重新检测。如重读结果 C_t 值仍然在 $28 \sim 32$ 范围，曲线呈 S 型且有明显指数增长期，则判断该孔为阳性（+），否则判断为阴性（-）（阴性扩增曲线示意图见图 4）；若 $C_t > 38$ 或未检出，则该孔判断为阴性（-）。

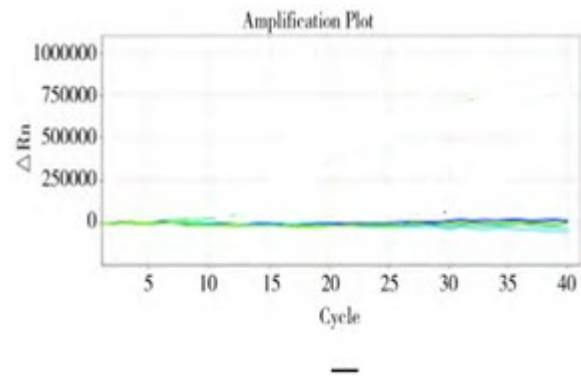


图4 阴性（-）扩增曲线示意图

7 最终结果的判定规则

- 7.1 同一个标本不同引物鉴定出的阴性或阳性结果有标准的表述规则，脊灰病毒型内鉴定结果表述规则见附录 B。
- 7.2 结合 ITD rRT-PCR 和 VDPV rRT-PCR 的结果形成最终的结果判定，脊灰病毒型内鉴定结果判定规则见附录 C。

附 录 A
(资料性)
引物名称及中文释义

引物名称及中文释义见表A. 1。

表A. 1 引物名称及中文释义

引物名称/中文释义	包含的引物/中文释义
Quadruplex/四重引物	PanEV/肠道病毒通用引物
	Sabin I/I 型原始毒株引物
	Sabin II/II 型原始毒株引物
	Sabin III/III型原始毒株引物
PanPV/脊灰病毒通用引物	PanPV/脊灰病毒通用引物
Duplex WPV1/I 型脊灰野病毒双重引物	AFR WPV1/非洲分支 I 型野病毒引物
	SOAS WPV1/非洲分支 I 型野病毒引物
PV2/ II 型脊灰病毒引物	PV2/ II 型脊灰病毒引物
WPV3-1/III型脊灰野病毒分支 1 引物	WPV3-1/III型脊灰野病毒分支 1 引物
WPV3-2/III型脊灰野病毒分支 2 引物	WPV3-2/III型脊灰野病毒分支 2 引物

附 录 B
(资料性)

脊灰病毒型内鉴定结果表述规则

脊灰病毒型内鉴定结果表述规则见表B. 1。

表B. 1 脊灰病毒型内鉴定结果表述规则

出现结果的情形	结果表述
Sabin I 和（或）Sabin III为阳性	I 型疫苗类似株和（或）III型疫苗类似株
WPV1 和（或）WPV3 阳性	I 型非疫苗类似株和（或）III型非疫苗类似株
Sabin II 和（或）PV 2 阳性	II 型脊灰病毒
PanPV 为阳性且 Sabin I、Sabin II、Sabin III均为阴性	不确定的
PanEV 为阳性且 PanPV 为阴性	非脊灰肠道病毒
PanEV 为阴性且 PanPV 为阳性	无效的
PanEV 为阴性	非肠道病毒
VDPV1 或（和）VDPV3 为阳性	1 型疫苗类似株或（和）III型疫苗类似株
VDPV1 或（和）VDPV3 为阴性	1 型非疫苗类似株或（和）III型非疫苗类似株
注：脊灰病毒型内鉴定的结果表述规则会根据消灭脊灰进展的实际情况而改变。	

附 录 C
(资料性)

脊灰病毒型内鉴定结果判定规则

脊灰病毒型内鉴定结果判定规则见表C. 1。

表C. 1 脊灰病毒型内鉴定结果判定规则

ITD 结果表述	ITD 结果判定	VDPV 结果表述	VDPV 结果判定	最终结果表述	最终结果判定
疫苗类似株	做疫苗衍生脊灰病毒筛查	疫苗类似株	直接报告	疫苗类似株	直接报告
疫苗类似株	做疫苗衍生脊灰病毒筛查	非疫苗类似株	不一致的疫苗衍生脊髓灰质炎病毒	不一致的脊髓灰质炎病毒	做测序
非疫苗类似株	做测序	不做疫苗衍生脊灰病毒筛查	—	非疫苗类似株	做测序
非脊灰肠道病毒	直接报告	不做疫苗衍生脊灰病毒筛查	—	非脊灰肠道病毒	直接报告
无效的	重复实验	不做疫苗衍生脊灰病毒筛查	—	无效的	做测序
II 型脊灰病毒	做测序	不做疫苗衍生脊灰病毒筛查	—	II 型脊灰病毒	做测序
不确定的	做测序	不做疫苗衍生脊灰病毒筛查	—	不确定的	做测序
非肠道病毒	直接报告	不做疫苗衍生脊灰病毒筛查	—	非肠道病毒	直接报告
注：脊灰病毒型内鉴定的结果判定规则会根据消灭脊灰进展的实际情况而改变。					