

2017—2018 年湖南省急性弛缓性麻痹病例病原学监测分析

李世康, 张帆, 周帅锋, 陈雨, 黄威, 湛志飞

湖南省疾病预防控制中心, 微生物分子生物学湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410005

摘要: **目的** 分析 2017—2018 年湖南省脊灰实验室所用细胞系的滴度值、急性弛缓性麻痹 (acute flaccid paralysis, AFP) 病例病原学特征、非脊髓灰质炎肠道病毒 (non-polio enterovirus, NPEV) 分离率及分布情况, 为维持无脊灰状态及预防其传播提供依据。 **方法** 依照 WHO《脊髓灰质炎病毒检验手册》(2004 年第四版) 方法, 对 AFP 病例粪便标本采用鼠肺细胞 (mouse L cells expressing the human poliovirus receptor, L20B) 和人横纹肌肉瘤细胞 (rhabdomyosarcoma, RD) 进行肠道病毒 (enterovirus, EV) 分离, L20B 细胞阳性分离物转 RD 细胞阳性者再进行脊髓灰质炎型内鉴定实验, 脊髓灰质炎阳性毒株送中国疾病预防控制中心国家脊髓灰质炎实验室进行型内鉴定。 **结果** 在 506 例 (1 011 份) AFP 病例标本中, 分离出脊髓灰质炎病毒 (poliovirus, PV) 2 株、NPEV 77 株, 分离率分别为 0.20%、7.62%; 2 株 I 型 PV 阳性毒株均有 2 个核苷酸序列变异, 未发现脊髓灰质炎野病毒和疫苗衍生脊灰病毒, 0~1 岁组 AFP 病例 NPEV 分离率最高。 **结论** 2017—2018 年湖南省脊灰实验室所用细胞系对脊灰病毒的敏感性良好, 未发现脊灰野病毒, 继续维持了无脊灰状态。

关键词: 急性弛缓性麻痹; 细胞系敏感性实验; 脊髓灰质炎; 肠道病毒; 监测

中图分类号: R512.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2020)04-0426-04 DOI:10.3969/j.issn.1006-3110.2020.04.012

Virological surveillance of acute flaccid paralysis cases in Hunan province, 2017–2018

LI Shi-kang, ZHAN Fan, ZHOU Shuai-feng, CHEN Yu, HUANG Wei, ZHAN Zhi-fei

Hunan Provincial Key Laboratory of Microbial Molecular Biology, Hunan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Changsha, Hunan 410005, China

Corresponding author: ZHAN Zhi-fei, E-mail: 190776969@qq.com

Abstract: **Objective** To analyze the titer values of cell lines used in Hunan Provincial Polio Laboratory during 2017–2018, etiological characteristics of acute flaccid paralysis (AFP) cases, and isolation rate and distribution of non-polio enterovirus (NPEV), and to provide a basis for maintaining polio-free state and preventing its transmission. **Methods** In accordance with the method of Polio Laboratory Manual (4th edition, 2004) recommended by World Health Organization, mouse L cells expressing the human poliovirus receptor (L20B) and rhabdomyosarcoma (RD) cells were cultured for isolation of enteroviruses (EV) in the stool specimens of AFP cases. L20B-positive isolates were inoculated into RD cells again, and then intratypic differentiation (ITD) of poliovirus isolates and vaccine-derived poliovirus (VDPV) detection were conducted. Polio-positive strains were sent to the National Polio Laboratory in Chinese Center for Disease Control and Prevention for intratypic identification. **Results** Two strains of poliovirus (PV) and 77 strains of non-poliomyelitis enterovirus (NPEV) were isolated from 1,021 specimens of 506 AFP cases, with the isolation rates being 0.20% and 7.62%, respectively. Two site-specific nucleotide sequence variations were found in two strains of PV type I, but no polio wild strain and VDPV were observed. The isolation rate of NPEV was discovered to be the highest in the AFP cases aged 0–1 year. **Conclusions** The cell lines used in Hunan Provincial Polio Laboratory during 2017–2018 showed a good sensitivity to poliovirus. No wild poliovirus was detected, and polio-free status was maintained.

Key words: acute flaccid paralysis; cell line sensitivity test; polio; enterovirus; surveillance

急性弛缓性麻痹 (acute flaccid paralysis, AFP) 病例监测工作是以消灭脊髓灰质炎为目的建立的, 是保

基金项目: 科技部十三五科技重大专项课题: 病毒性传染病病原谱和病毒基因变异变迁规律研究 (2018ZX10713002)

作者简介: 李世康 (1983–), 女, 湖南醴陵人, 硕士, 主管技师, 主要从事肠道病毒检测与研究工作。李世康、张帆为并列第一作者。

通信作者: 湛志飞, E-mail: 190776969@qq.com。

持无脊髓灰质炎状态的重要手段之一。湖南省于 1991 年开始建立 AFP 病例检测系统^[1], 到 2018 年已连续 25 年未发现脊髓灰质炎野病毒^[2]。WHO 西太平洋区 (regional office for the western pacific, WPRO) 2000 年证实无脊髓灰质炎^[3]。但是, 2017 年全球共报告了 22 例脊髓灰质炎野病毒病例, 2018 年报告了 33 例^[4], 这就说明脊髓灰质炎野病毒输入我国的风险持续存在, 同时还需警惕疫苗衍生脊髓灰质炎病毒

(vaccine derived polio virus, VDPV) 的发生。2008 年, WHO 制定了针对脊灰实验室网络新的现场考核标准^[5], 对分离脊髓灰质炎病毒 (poliovirus, PV) 的细胞系敏感性提出了较高的要求。

为了评估湖南省脊灰实验室所用细胞系对 PV 的敏感性, 及时发现湖南省可能出现的脊髓灰质炎野毒株或 VDPV, 提高 AFP 病例监测质量, 现对湖南省 2017—2018 年脊灰实验室细胞敏感性实验结果和收集的 AFP 病例进行分析。

1 对象与方法

1.1 标本来源及采集 由发现病例的首诊医疗机构报告所属地县市区疾病预防控制中心 (简称疾控中心), 并由该疾控中心采集 AFP 病例合格粪便标本, 及时上送省疾控中心脊灰实验室进行脊灰病毒检测。

1.2 细胞 转人脊灰病毒受体基因的鼠肺细胞 (L20B) 和人横纹肌肉瘤细胞 (RD), 细胞均由中国疾病预防控制中心国家脊髓灰质炎病毒实验室提供。为了保证实验结果的准确性, 本实验室严格按照 WHO《脊髓灰质炎病毒检验手册》(2004 年第四版)^[5]方法

表 1 湖南省 2017—2018 年 AFP 监测系统评价指标完成情况

年份	15 岁以下儿童检测 病例数 (例)/标本数 (份)	报告发病率 (1/10 万)	报告后 48 h 调查率 (%)	14 d 内双份合格便 采集率 (%)	粪便标本 7 d 内送检率 (%)	标本 14 d 内完成病毒分离 鉴定及时率 (%)
2017	260 (519)	2.11	99.62	97.36	99.62	99.23
2018	246 (492)	2.46	99.59	97.97	99.18	100.00

注: 据《全国急性弛缓性麻痹 (AFP) 病例监测方案》的要求, 表内各项指标均要求 ≥80%。

2.2 脊灰实验室细胞敏感性实验结果 2017—2018 年湖南省脊灰实验室共进行 10 次细胞敏感性实验, 实验所得细胞系敏感性病毒滴度值、LQC 株标准滴度参考值及 LQC 株滴度允许范围, 见表 2。不同时期 L20B 细胞或 RD 细胞滴度和预期的参考值波动幅度均在 ±0.3log₁₀ 以内。

2.3 AFP 病例粪便标本病毒分离鉴定情况 2017—2018 年湖南省疾控中心脊髓灰质炎实验室共检测 AFP 病例粪便标本 1 011 份, EV 分离阳性 79 份, 分离率为 7.81%, 其中 PV 分离阳性的 2 份, 非肠道脊髓灰质炎病毒 (non-polio enterovirus, NPEV) 77 份, 分离率分别为 0.20% 和 7.62%, 见表 3。2 份 PV 阳性标本送国家脊髓灰质炎实验室进行型内鉴别, 反馈结果为 2

脊灰病毒分离鉴定规程进行实验, 对新复苏检测无支原体的细胞进行细胞敏感性实验, 并将结果上报国家脊灰实验室。

1.3 病毒分离与鉴定 对采集的粪便标本按照 WHO《脊髓灰质炎病毒检验手册》(2004 年第四版)^[5]进行肠道病毒分离鉴定, L20B 细胞阳性分离物转 RD 细胞阳性者再进行 ITD 和 VDPV 实验。

1.4 统计分析 利用 Excel 2010 及 SPSS 21.0 软件对数据进行整理和统计, 性别、各年龄组、不同免疫史之间肠道病毒分离率的比较, 采用 χ^2 检验, 检验水准均为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 监测评价指标完成情况 2017—2018 年全省共报告 AFP 病例 506 例 (采集标本数为 1 011 份), 报告后 48 h 调查率为 99.61%, 14 d 内双份合格便采集率为 97.65%, 粪便标本采集后 7 d 内送达省疾控中心脊髓灰质炎实验室的送检及时率为 99.41%, 14 d 内完成病毒分离鉴定及时率为 99.61%, 各年完成情况见表 1。各项监测指标均超过了 WHO 提出的 80% 的标准。

株 I 型疫苗变异脊髓灰质炎病毒, 均有 2 个核苷酸序列变异。

表 2 2017—2018 年湖南省脊灰实验室细胞敏感性实验结果

实验 次数	L20B 细胞滴度值 (logCCID50/0.1ml)			RD 细胞滴度值 (logCCID50/0.1ml)		
	日期	I 型	III 型	日期	I 型	III 型
1	20170115	8.30	7.90	20170115	8.40	8.35
2	20170327	8.40	8.00	20170327	8.55	8.40
3	20170612	8.20	7.85	20170612	8.50	8.40
4	20170828	8.40	8.00	20170828	8.60	8.65
5	20171113	8.20	8.10	20171113	8.40	8.60
6	20180205	8.35	8.35	20180205	8.55	8.45
7	20180502	8.40	8.25	20180502	8.45	8.35
8	20180716	8.20	8.00	20180716	8.35	8.25
9	20181008	8.30	8.05	20181008	8.50	8.45
10	20181225	8.35	8.25	20181225	8.45	8.55
LQC 株	参考值	8.27	7.97	参考值	8.67	8.52
LQC 株	允许范围	7.77~8.77	7.47~8.47	允许范围	8.17~9.17	8.02~9.02

表 3 湖南省 2017—2018 年 AFP 病例粪便标本 EV 分离鉴定结果 (n, %)

年份	粪便 标本数	病毒 阳性数	EV 分离鉴定结果				合计	
			PV1	PV3	PV 混合	NPEV	PV	NPEV
2017	519	35 (6.74)	2 (0.39)	0 (0.00)	0 (0.00)	33 (6.36)	2 (0.39)	33 (6.36)
2018	492	44 (8.94)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	44 (8.94)	0 (0.00)	44 (8.94)
合计	1 011	79 (7.81)	2 (0.20)	0 (0.00)	0 (0.00)	77 (7.62)	2 (0.20)	77 (7.62)

2.4 NPEV 季节分布 2017 年从 AFP 病例中分离到 NPEV 33 株,全部集中在 5—9 月份,其中 6—8 月份分离数占全年总数的 66.67% (22/33);2018 年从 AFP 病例中分离到 NPEV44 株,其中 4—6 月份和 8—9 月份分离数占全年总数的 88.64% (39/44),见图 1。

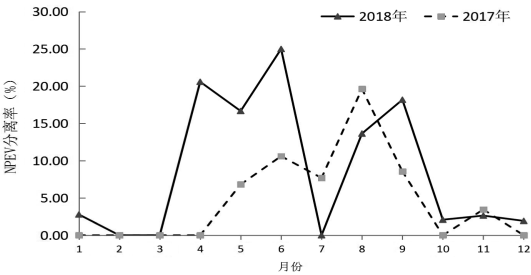


图1 湖南省 2017—2018 年 AFP 病例 NPEV 分离率的月分布

2.5 AFP 病例病毒分离结果与性别分布 男孩与女孩之间 PV 分离率差异无统计学意义($\chi^2=2.232, P>0.05$),NPEV 分离率差异无统计学意义($\chi^2=1.973, P>0.05$),见表 4。

表 4 2017—2018 年湖南省 AFP 病例感染的性别分布(n,%)

性别	检测份数	PV	NPEV	合计
男	603	2(0.33)	51(8.46)	53(8.79)
女	408	0(0.00)	26(6.37)	26(6.37)
合计	1 011	2(0.20)	77(7.62)	79(7.81)

2.6 AFP 病例病毒分离结果与年龄分布 各年龄组之间 NPEV 分离率差异有统计学意义($F=23.330, P<0.05$),0~组 AFP 病例 NPEV 分离率最高,为 22.22%,1~岁和 4~岁组的 NPEV 分离率也较高,分别为 13.24%和 11.40%,其它年龄 NPEV 分离率均低于 7%;两份 PV 阳性标本为 4 岁 AFP 病例,见表 5。

表 5 2017—2018 年湖南省 AFP 病例感染的年龄分布(n,%)

年龄组(岁)	检测份数	PV	NPEV	合计
0~	36	0(0.00)	8(22.22)	8(22.22)
1~	136	0(0.00)	18(13.24)	18(13.24)
2~	148	0(0.00)	8(5.41)	8(5.41)
3~	98	0(0.00)	6(6.12)	6(6.12)
4~	114	2(1.75)	11(9.65)	13(11.40)
≥5~	479	0(0.00)	26(7.62)	26(5.43)

2.7 AFP 病例病毒分离与免疫史的关系 不同免疫史之间肠道病毒分离率差异无统计学意义($F=3.413, P>0.05$),两份 PV 阳性标本均来自完成了全程免疫的 AFP 病例,见表 6。

表 6 湖南省 AFP 病例感染与免疫情况的关系(n,%)

免疫史	检测标本数	PV	NPEV	合计
0	8	0(0.00)	2(25.00)	2(25.00)
1~2	28	0(0.00)	2(7.14)	2(7.14)
≥3	943	2(0.21)	71(7.53)	73(7.74)
不详	32	0(0.00)	2(6.25)	2(6.25)

3 讨 论

在全球人民的共同努力下,脊髓灰质炎疫苗使用已经避免了超过 1 600 万人因 PV 所致的瘫痪^[6],但为实现全球消灭脊髓灰质炎这一目标仍面临诸多困难与挑战。2018 年,WHO 并未实现全球脊灰野病毒为零的目标,维持无脊灰国家脊灰野病毒输入风险持续存在。2017 年 1 月—2018 年 6 月,刚果、索马里、尼日利亚、叙利亚等国家共发生 8 起Ⅱ型 cVDPV^[7]。由此可见,中国所面临的压力和挑战是非常大的。

湖南省 2017—2018 年 AFP 病例病毒学监测指标均保持在较高水平,14 d 内双份合格便采集率、粪便标本 7 d 内送检率、14 d 内完成病毒分离鉴定及时率均达到 80%的要求。2017 年全国 31 个省的 14 d 病毒分离完成率平均为 99% (40%~100%)^[8],2018 年为 99% (85%~100%)^[9]。湖南省两年平均值为 99.61%,高于全国平均水平,为保持无脊髓灰质炎状态,及时发现输入性脊髓灰质炎野病毒提供了实验室质量保证。

分离 PV 需要使用敏感性高的细胞系,敏感性降低会直接导致假阴性的病毒分离结果^[10]。2017—2018 年湖南省脊灰实验室共进行 10 次细胞敏感性实验,实验所得 RD 细胞或 L20B 细胞滴度和预期的参考值波动幅度均在±0.3 log₁₀以内,提示湖南省脊灰实验室细胞系的敏感性没有下降,为实验病毒分离的质量提供了保障。

2017—2018 年湖南省 PV 的分离率分别为 0.39%和 0.00%,仅检出 2 株疫苗变异脊髓灰质炎病毒,且均为 I 型疫苗变异脊髓灰质炎病毒,NPEV 分离率分别为 6.41%和 8.70%,较往年^[1-2]下降明显。这与湖南省自 2016 年 5 月 1 日开始实施新的脊髓灰质炎疫苗免疫策略有关,停用三价 OPV(trivalent OPV,tOPV),用二价 OPV(bivalent OPV,bOPV)替代 tOPV,并将脊髓灰质炎灭活疫苗(inactivated poliovirus vaccine,IPV)纳入国家免疫规划。bOPV 仅含有 I 型和Ⅲ型病毒组分,不含有Ⅱ型病毒组分,而往年Ⅱ型病毒的分离率是最高的,如 2006—2010 年湖南省 AFP 病例粪便标本 PV 分离中,Ⅱ型病毒占总分离率的 54.55% (48/88)^[2]。免疫程序的改变,减少了对外排病毒的种类,外环境中脊髓灰质炎病毒循环的可能性变小,从而导致 PV 分离率的下降。季节分布显示,2017 年 NPEV 分离率以 6—8 月份最高,占全年总数的 66.67% (22/33);2018 年以 4—6 月份和 8—9 月份,占全年总数的 88.64% (39/44),主要为夏季感染高峰。肠道病毒分离率与性别和免疫史无关,与年龄有明显相关关系。1 岁以下 AFP 病例 NPEV 分离率最