

2000年全球消灭脊髓灰质炎

脊髓灰质炎病毒检验手册



世界卫生组织扩大免疫规划和传染性疾病部编
中华人民共和国卫生部卫生防疫司
中国预防医学科学院计划免疫指导中心

1992年

序

实现世界卫生组织提出的2000年全球消灭脊髓灰质炎的目标，已经成为各国共同努力的统一行动。实验室工作则是消灭脊髓灰质炎活动的重要组成部分。世界卫生组织为了适应各国加强疾病监测、改进和提高实验室检验技术的需要，编写了这本《脊髓灰质炎病毒检验手册》。

《手册》从介绍疾病和致病病毒的性质入手，详细地阐述了脊髓灰质炎病毒的分离、定型和区别野毒株与疫苗株的方法等。它集中了当前这一领域里的最新的宝贵经验，是一本从收集、运送标本开始，直至对分离的病毒进行正确定型和型内鉴别的一系列实验的操作指南，具有较强的实用性。

在我国确定的1995年消灭脊髓灰质炎的活动中，提供实验室服务的任务十分繁重。随着工作的深入发展，迅速建立并不断完善和加强全国实验室网络，使之更好地发挥作用，就愈加显得重要和急迫。为了提高我国各级实验室分离和鉴定脊髓灰质炎病毒的水平，标化操作规程，我们请中国预防医学科学院张礼壁教授等专家翻译，并组织出版了本《手册》。希望各级卫生防疫部门能够以此为教材，认真组织学习培训，使各级实验室工作人员逐步按照《手册》要求，正确操作，实施有效的实验室监测，保证我国消灭脊髓灰质炎的规划顺利实施，目标能如期实现。

王 钊

1992年3月2日

前 言

根据世界卫生大会1988年5月通过的A41.28号决议,世界卫生组织(WHO)正为2000年在全球消灭脊髓灰质炎(简称脊灰)而奋斗。

要实现这一战略计划,需要加强“扩大计划免疫(EPI)”诸多方面的工作,最重要的是提高常规免疫接种的覆盖面和加强疾病监测。

就脊髓灰质炎而言,疾病监测在很大程度上依赖于实验室工作,病例数越少时监测的要求越高。在没有脊灰或接近无脊灰的国家或地区,每一可疑病例均要求做一整套的实验室检查。另外,要求持续地监测由病人和环境分离到的病毒。在目标的最后阶段,在强有力的实验室和有效的实验监测下证明没有野毒株存在,才是全球消灭脊灰的标准。

然而当前尽管有许多有能力的实验室研究人员从事脊髓灰质炎的实验室诊断,但方法和试剂未经标准化,全球性的有效试验方法也尚未建立。我们期望这部手册会在这两方面有所贡献。

由于目前各实验室所用方法不尽一致,要达到本书所推荐的全球统一方法会有一些困难。但是,希望那些尚未采用本手册所推广方法的实验室至少要同时并用本手册提供的方法和该实验室原用的方法,以保证全球报告结果的一致性。也能使其它方法的优越性得以体现,也意味着WHO能改进所推荐的方法。

WHO也将提供一个研究全球系统有效实验方法的基础。消灭脊髓灰质炎工作的可靠性最终将依赖于这样一个系统。但初期的主要职能在于了解那些地区实验室工作的困难,以便提供适当的支持和人员培训。

我们感谢所有为这部手册付出时间和精力同仁们。我们希望读者先生们感到这本书有用。请让我们得到您的评论和建议,以便不断校订和改进这部手册。在消灭脊灰这场伟大探索中,我们期待着与您们的合作。

目 次

序

前言

1 脊髓灰质炎	(1)
1.1 病毒	(1)
1.2 疾病与发病机理	(1)
1.3 感染的传播方式	(2)
1.4 免疫	(2)
1.5 接种疫苗的预防作用	(3)
2 根据本国消灭脊髓灰质炎所处阶段应用本手册; 实验室网络	(5)
2.1 消灭脊髓灰质炎的几个阶段	(5)
2.2 病毒学技术应用指南	(6)
2.3 实验室及其职能	(7)
3 标本的收集、贮存和运输	(9)
3.1 标本的收集	(9)
3.1.1 用于病毒分离的标本	(10)
3.1.2 用于血清学研究的血液标本	(10)
3.1.3 标本的标签	(11)
3.1.4 实验报告表	(11)
3.2 标本的保存和运输	(11)
3.2.1 温度	(11)
3.2.2 运输器材	(15)
3.2.3 航空运输	(17)
4 脊髓灰质炎病毒的分离和鉴定	(19)
4.1 脊髓灰质炎病毒的分离	(19)
4.1.1 标本的准备	(19)
4.1.2 推荐用于分离脊髓灰质炎病毒的传代细胞株	(20)
4.1.3 脊髓灰质炎病毒的分离	(20)
4.1.4 从环境标本中分离脊髓灰质炎病毒	(21)
4.1.5 从混有其它肠道病毒的标本中分离脊髓灰质炎病毒	(22)
4.1.6 脊髓灰质炎病毒的滴定	(23)
4.2 脊髓灰质炎病毒分离株的鉴定	(26)
4.2.1 血清抗体	(26)
4.2.2 用微量板法鉴定	(26)
4.2.3 用试管法鉴定	(28)

5	脊髓灰质炎病毒株的型内鉴别	(30)
5.1	单克隆抗体用于脊髓灰质炎病毒株的型内鉴别	(30)
5.2	核酸探针杂交法用于脊髓灰质炎病毒分离物的型内鉴别	(33)
5.2.1	标本的甲醛处理	(35)
5.2.2	将脊髓灰质炎病毒RNA固定到硝基纤维膜上	(35)
5.2.3	杂交	(36)
5.2.4	清洗硝基纤维膜以除去未结合的探针	(37)
5.2.5	杂交物的检测	(37)
5.2.6	试剂	(38)
6	脊髓灰质炎病毒中和抗体的检测	(40)
6.1	对脊髓灰质炎病毒免疫力的血清学监测	(40)
6.1.1	实验所用材料	(41)
6.1.2	微量中和试验的步骤	(41)
7	细胞培养技术及其在脊髓灰质炎实验室诊断中的应用	(46)
7.1	细胞培养的基本条件	(46)
7.2	细胞培养系统的选择	(46)
7.3	细胞培养	(47)
7.4	细胞的贮存	(50)
7.5	建立细胞库	(54)
8	实验室的生物安全性	(56)
8.1	感染危险的由来	(56)
8.2	带有危险性的操作步骤	(57)
8.3	减少感染危险的方法	(57)
8.4	污染物的处理	(58)
附录		
附录1	快速评价3剂三价口服脊髓灰质炎活疫苗(OPV)剂量与血清学反应关系的操作规程	(59)
附录2	培养病毒和细胞的培养液及有关试剂的成分	(61)
附录3	RD和HEp-2传代细胞的来源	(64)
附录4	病毒母液的制备	(67)
缩略语		(68)

1 脊髓灰质炎：病毒、发病机理、传播、免疫和预防

1.1 病毒

脊髓灰质炎病毒（简称脊灰病毒或Polio病毒）有3个血清型，隶属于小RNA病毒科，肠道病毒属。毒粒直径约27nm，其壳体由60个亚单位组成。每一亚单位含4种壳蛋白（VP₁~VP₄），环绕单股正链RNA的基因排列成20面体立体对称结构。壳蛋白和非壳蛋白均由一个大的蛋白前体割裂而形成。X线衍射研究显示脊灰毒粒呈三维分子结构。3个最大的病毒壳蛋白（VP₁~VP₃）的核心结构相似，蛋白环的肽骨架支承其自身，在氢键作用下使8股肽形成片层结构（ β -片层结构），在 β -片层结构和蛋白的氨基和羧基末端区之间，氨基酸链含有一系列的环状结构。存在于毒粒表面的主要抗原位点位于该环状结构中，与毒粒感染的中和作用有关。最小的壳蛋白VP₄（存在于内表面），与病毒RNA相联。

象其它肠道病毒一样，脊髓灰质炎病毒在酸性环境中可稳定达1~3小时，在氯化铯中浮力密度约为1.34g/cm³，因不具有含脂质的膜，所以毒粒对脂溶剂（乙醚和去氧胆酸钠）有抵抗力。56℃ 30分钟可使其完全失去感染性。克分子浓度的氯化镁对毒粒有一定程度的保护，而且已将此特性用于增加口服脊灰疫苗的稳定性。

脊灰病毒在感染的细胞浆内复制，整个感染周期大约为6小时，成熟的毒粒通过细胞裂解面释放。在实验室可用人或猴组织的原代或传代细胞培养病毒，分离病毒仅使用灵长类细胞，因其表面具有特异性的病毒受体。

3个血清型的任何一型，其型内差异可用近年发展起来的分子生物学方法加以区别，包括用吸收过的株特异性的多克隆或单克隆抗体的试验、寡核苷酸图谱、病毒核酸序列分析等方法。

为保证交流时含义明确和命名统一，所有已鉴定过抗原特性的分离株应标明抗原型别、分离国家（或城市）、分离株编号和分离年份，如P1/Houston/23/62表示脊灰1型毒株，编号23，1962年分离于休斯敦（美国）。

1.2 疾病与发病机理

病毒经口侵入机体，先在口咽部或肠道增殖，数天后入血流造成病毒血症。发病初期可从咽部分离到病毒。潜伏期通常为7~14天，可能范围是3~35天。发病1周后咽部几无病毒，而大量的病毒持续地从粪便排出，时间可达数周（即使此时已有体液抗体产生）。

进入血流的病毒可侵入中枢神经系统（CNS），除非此时已产生足够滴度的中和抗体才能阻断其侵袭。在中枢神经系统内，病毒沿神经纤维播散。病毒在细胞内复制，可使受染神经细胞受损或完全破坏，患者出现弛缓性麻痹。脊髓前角细胞受损最为显著，严重者后角细胞、脊根神经节亦可受损。在脑内，网状质、前庭核、深层小脑核受损亦较常见。除了前中回的运动皮质有可能累及以外，皮质几乎不被涉及。

在机体内脊灰病毒并不在肌肉组织增殖。病毒在神经细胞内的复制，使外周神经及随意肌群发生功能障碍。神经细胞的变化很快，从轻度染色质溶解到噬神经细胞现象，进而细胞

完全破坏。某些由于水肿而失去功能的神经细胞最后可能完全恢复，主要由淋巴细胞组成的炎症是神经细胞受攻击的结局。

当易感者暴露于有毒力的脊灰病毒而受感染时，其结果可能是：（1）呈不显性感染，无症状，（2）轻症疾病，（3）无菌性脑膜炎或（4）麻痹性脊髓灰质炎。大约仅1%的脊灰病毒感染者可为临床识别。神经系统未受侵犯者，仍可通过咽部和粪便排毒而传播感染。

轻症可表现为发热、不适、倦怠、头痛、恶心、呕吐、便秘和咽痛等不同症状，病人数天内恢复。非麻痹性脊髓灰质炎（无菌性脑膜炎）除上述症状与体征外，还有颈、背强直和疼痛。病程2~10天，很快完全恢复。有必要强调，脊髓灰质炎病毒仅仅是许多引起无菌性脑膜炎的肠道病毒中的一员。

麻痹性脊髓灰质炎可发生在上述轻微症状之后，亦可无任何前驱症状而突发。突出的主诉是弛缓性麻痹，由下运动神经元受损所引起。在6个月内麻痹程度可能有很大恢复，但残留的麻痹通常持续很久。

1.3 感染的传播方式

人类是脊灰病毒唯一的贮存宿主，密切接触是主要的传播途径。病毒能在口咽部存在数天，而粪便排毒可达1个月或更长的时间。口咽或粪便的排毒污染手指造成传播。幼儿是主要贮存宿主，并将病毒传给其它家庭成员。当家庭中某一成员确诊为脊髓灰质炎时，往往其他易感成员已被感染。

当脊灰病毒在某一社区内流行时，往往在污水中可检出病毒，它可作为传染源通过苍蝇或饮水、洗漱及灌溉此水而传播。

温带地区，肠道病毒（包括脊灰病毒）感染，通常发生于夏、秋季；热带地区，病毒全年循环或与雨季相关。从全世界情况来看，卫生和医疗状况差、人口拥挤的地区往往小年龄时已受感染或存在抗体。

1.4 免疫

母亲传递被动免疫，来自母体的抗体在6个月内逐渐消失，注射的抗体仅能持续3~5周。

病毒中和抗体在感染后数天内于发病之前即可查到，可能持续终生。这是由于病毒在侵入神经系统之前已在肠道和深部淋巴组织增殖之故。抗体仅在血液中才能阻止病毒向脑扩散，如果病毒已经侵入脑内则毫无作用，所以，免疫接种只有在病毒累及神经系统之前才有意义。

血循环中的血清抗体并非是唯一的保护机制，自然感染恢复后或口服活疫苗后，局部或细胞免疫对防止肠道的感染有明显作用。对于脊灰病毒和其它肠道病毒感染，局部分泌性抗体有重要的保护作用。

病毒感染对体液或细胞免疫缺陷者具有极大的危险性，脊灰病毒感染——无论野毒株或疫苗株（于人类传染后毒力回复），均可导致非典型病症，其潜伏期超过28天，呈慢性病程，中枢神经系统出现非寻常的损伤，病死率高。

扁桃体和其淋巴腺的切除会降低对脊灰病毒感染的抵抗力，施行这类手术后，鼻咽内原有的分泌性抗体大大减少，而血清抗体无任何变化，低水平的局部抗体可持续7个月之久。

血清抗体阴性的儿童对脊灰疫苗的反应，切除扁桃体者比未切除者鼻咽分泌性抗体产生得慢，而且滴度较低。

其它促成脊灰病毒感染严重性的宿主因素有年龄（尤其是非常小的婴儿）、怀孕和慢性营养不良。

1.5 接种疫苗的预防作用

尽管改善卫生条件有助于限制脊灰病毒的传播，但预防脊髓灰质炎的唯一特异手段是用活疫苗（OPV）或/和灭活疫苗（IPV）。现用的两种疫苗效果都好，它们均混合有3个型别的脊灰病毒。

福尔马林灭活疫苗（IPV，亦称Salk疫苗）是用猴肾细胞培养的病毒制备而成（以前用原代细胞，现主要用传代绿猴肾细胞）。直到目前，用灭活疫苗需重复接种以维持其有效的免疫水平。新配方的具有高浓度抗原的灭活疫苗（强化灭活疫苗e-IPV）近年已经制成，两剂免疫后，大部份接种者产生满意和持续较久的抗体反应，但临床效果及全面的长期效果尚待现场观察。

口服减毒活疫苗（OPV，亦称Sabin疫苗）的病毒，培养于原代猴肾细胞或人类二倍体细胞。减毒活疫苗可添加氯化镁、蔗糖等以增加其稳定性，加氯化镁应用较普遍。加稳定剂的OPV可于0~8℃贮存6~12个月而滴度不显著下降。活疫苗的分发和管理，不急用时可贮存于-20℃两年。当温度增高时，加稳定剂的OPV保持其有效的极限时间是：26℃，7~14天；31℃，2天；于37℃中疫苗每天损失大约0.15 log₁₀。按这一损失率计算，假设疫苗含病毒总量6.15 log₁₀，放37℃两天将失去其原有效力的一半。所以，进一步努力提高口服活疫苗对热的稳定性是必要的。

IPV和OPV均可诱导产生体液抗体，存在于血液中，保护中枢神经系统免受野毒株的嗣后侵入。但因IPV诱导的免疫对肠道感染和携带病毒很少影响，所以，接种过IPV的人群仍可将野毒传播给与其接触的易感者。

与IPV相反，OPV接种后病毒在机体内增殖，其免疫方式类似于自然途径感染。OPV不仅能诱导产生在血液中持续较久的IgG抗体，亦可诱导产生咽部和肠道的分泌性IgA抗体，后者可抵御野毒株感染。

减毒活疫苗，特别是第3型，在接种疫苗的儿童体内复制过程中会有某种程度的变异，但并不完全恢复其神经毒力。只在极少数服用疫苗者及其密切接触者中发生麻痹病例。服OPV因毒力返祖而产生麻痹的危险性极小。根据几次大规模研究，包括由WHO指导实施的10年研究，估计每200~400万剂三价OPV中会发生1例疫苗相关麻痹病例。

在发展中国家，初次免疫接种时间应提前至婴儿期完成，WHO扩大计划免疫（EPI）部门推荐的常规3次口服活疫苗免疫接种程序，是出生后6周、10周和14周，超过年龄应尽快补种。凡两次接种间隔超过4周者，无需重新开始计算接种程序。

在医院或妇产医院出生的儿童，或者出生后与健康服务机构有联系的儿童，均应利用这一机会实施额外接种OPV，称之为“零次接种”（OPV Zero），不算成3次接种的第1次，也不应取代常规OPV免疫程序。虽然出生1周内婴儿免疫接种后的血清学反应比大婴儿差些，但70%以上的新生儿因产生肠道局部免疫而受益。另外，30%~50%的新生儿也能有1个型或多个型别脊灰病毒血清抗体应答反应，而且能促进婴儿对以后的脊灰免疫接种的应答反

应。对出生在城市或人口密集地区和1岁内脊灰病例发生较多的地区的婴儿，出生时进行免疫接种特别重要。世界上许多大城市40%~50%的脊灰病例为出生1年以内的婴儿，说明有必要尽可能在生命早期完成脊灰疫苗的免疫接种。

在某些发展中国家，儿童对3次或3次以上接种OPV后的血清学反应较预期的差。这可能是由于运输过程中冷链难于保持；疫苗受到体内其它肠道病毒或肠道内非特异性抑制因素的干扰。EPI部门正发起几个大的现场临床试验，以检查三价减毒活疫苗三个型别不同配比是否能提高血清学反应。在某一发展中国家，IPV和OPV的配合使用获得了成功，通过使用IPV可以避免干扰因素，使用OPV又促进了肠道免疫。为检查儿童对IPV和OPV结合使用或同时使用的免疫应答反应，在EPI部门主持下有几个发展中国家正处于开始研究阶段。

涉及本章主题的进一步资料及更多的文选可在其他地方查到。

2. 根据本国消灭脊髓灰质炎所处阶段应用本手册；实验室网络

2.1 消灭脊髓灰质炎的几个阶段

2000年全球消灭脊髓灰质炎的行动计划制定于1988年，并于1989年世界卫生大会正式通过。为达到此目的，计划分为4个阶段：

●处于A阶段的国家或地区，应没有脊灰病例，并具有可靠的报告系统，至少在过去3年中本土没有脊髓灰质炎病例报告，1岁以内儿童的有效脊灰疫苗免疫接种的覆盖率至少达到80%。

●处于B阶段的国家或地区，每年报告的脊灰病例少于10例，免疫接种覆盖率超过50%。

●处于C阶段的国家或地区，每年报告的脊灰病例10例或10例以上，免疫接种覆盖率超过50%。

●处于D阶段的国家或地区，每年报告的脊灰病例10例或10例以上，或病例数不详，免疫接种覆盖率为50%或低于50%，或免疫覆盖率不详。

截至1989年末，世界人口大多数（62%）处于C类地区；26%人口处于A类或B类地区，而12%处于D类地区（图1）。

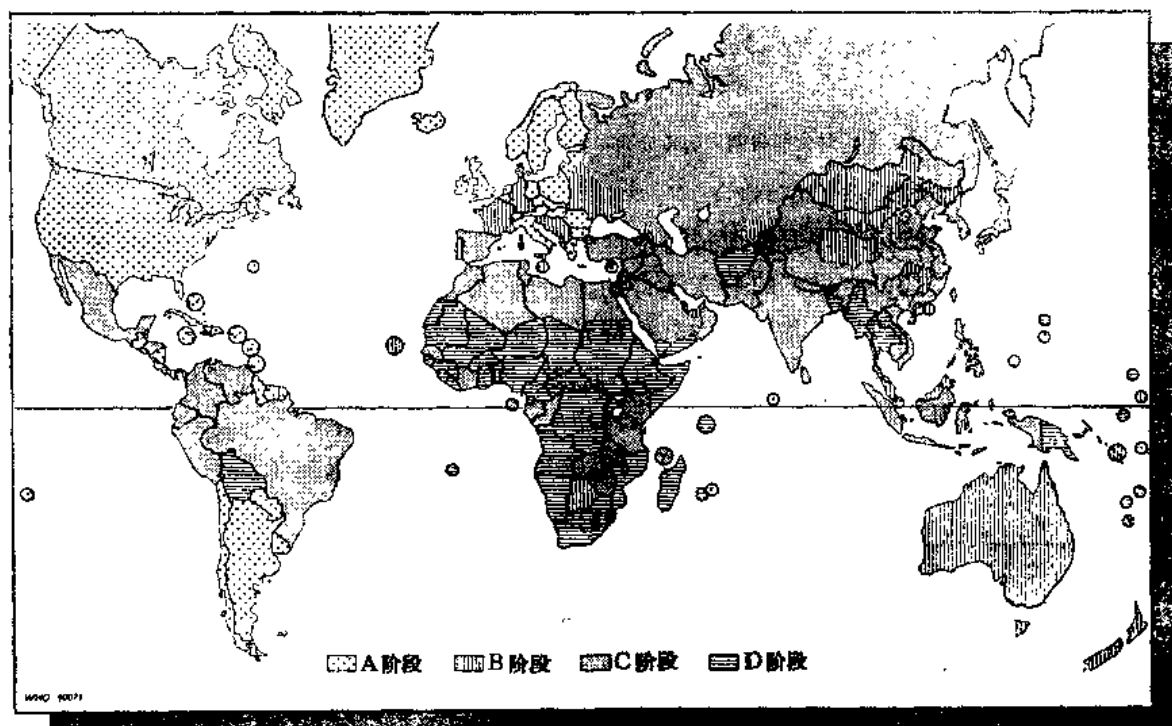


图1 全球按消灭脊灰四个阶段划分的区域分布图（1989年12月）

全球行动计划的有效实现涉及各个方面，诸如免疫覆盖面，监测，爆发流行调查/控制，实验室服务机构，疫苗质量控制（包括维持运输过程中有效冷链环节），培训人员，社会动

员, 病例康复, 研究和发展, 等等。根据各地区所处消灭脊灰阶段的不同, 对上述各方面的要求应有所侧重。

行动计划 (Plan of action) 已作为编写“有关消灭脊髓灰质炎免疫管理实施手册”的依据, 已于1989年出版。目的是提供各国计免规划部门采用, 再从各国获得经验。

2.2 病毒学技术应用指南

本手册所述及的病毒学技术, 应结合各国消灭脊髓灰质炎工作的具体阶段来应用。对不同阶段地区推荐相应技术与方法的指导意见如下面的简述和表1。

表1 消灭脊髓灰质炎各阶段推荐应用的实验室方法

检 测 内 容	消灭脊髓灰质炎所处阶段			
	A阶段	B阶段	C阶段	D阶段
脊灰病毒的分离	全部病例	全部病例	少数病例	少数病例
脊灰病毒的鉴定	要 求	要 求	要 求	要 求
脊灰病毒的特性	要 求	要 求	不要求	不要求
其它肠道病毒的分离	要 求	要 求	不要求	不要求
其它肠道病毒的鉴定	要 求	要 求	不要求	不要求
OPV接种后快速血清学评估	要 求	要 求	要 求	不要求
环境标本检测:				
污水	要 求	不要求	不要求	不要求
健康人的粪便	不强求	不要求	不要求	不要求
血清学调查	不强求	不强求	不要求	不要求

- 每年病例少于50例时, 要求对全部病例做病毒分离和鉴定

脊灰病毒的分离和鉴定 (第4章)

在脊髓灰质炎呈流行或地方性流行的地区, 即处于C阶段和D阶段的国家, 实验室应集中全力于脊灰病毒。要确定循环的脊灰病毒的血清型别, 只需对少数代表性病例的粪便标本做病毒学检测, 分离到的病毒均应用脊灰型特异抗血清鉴定。

在免疫接种覆盖率高的国家或地区, 即A阶段、B阶段地区, 脊髓灰质炎病例数大大减少, 应对每一个可疑病例进行病毒分离工作。分离到的病毒不仅要用脊灰病毒抗血清鉴定, 还应用其它肠道病毒的抗血清鉴定 (表2)。在这类地区鉴别由脊灰病毒所致的麻痹抑或由

表2 肠道病毒的血清型别

组 别	命名的变更
脊灰病毒1~3型 (Polioviruses)	
科萨奇病毒A组1~22, 24型 (Coxsackieviruses A)	科萨奇A23更名为埃可9
科萨奇病毒B组1~6 (Coxsackieviruses B)	
埃可病毒 (Echoviruses) 1~9, 11~27, 29~34	埃可10更名为呼肠孤病毒1 埃可28更名鼻病毒1A 埃可34为柯萨奇A24变种
肠道病毒 (Enteroviruses) 68~72	肠道病毒72为甲肝病毒

其它肠道病毒引起的脊髓灰质炎样病症很有意义。如果病例因非脊灰肠道病毒感染所致，必须做血清型别鉴定，以免将这部分病例错误地归结为疫苗接种没有效果。

型内差别（第5章）

处于A阶段和B阶段的国家，不应满足于脊灰病毒的分离与定型。必须对已分离到的病毒做型别内差异的研究，并搞清其由来。从流行病学角度看，脊灰病毒地方株、输入株或疫苗相关株具有完全不同的含意，涉及到具体措施的选择。

环境取材（第4章，第4.1.4节）

在那些消灭脊灰工作进展卓有成效，而且连续数年没有本地野毒株所致病例的地区，要求持续进行疾病监测工作。检测脊灰病毒所需的环境标本可采集健康人的粪便或社区的污水。用OPV的地区疫苗株病毒广泛地存在，对分离的病毒区别其型内差别，对评价流行情况是必需的。

如果在一个多年没有脊髓灰质炎病例的国家或地区，突然发现由野毒株感染的病例，要加强环境标本的脊灰病毒检测工作。在这种情况下，应采取相应措施控制病毒传播。

血清学查中和抗体（第6章）

此方法不再作为常规推荐用于脊灰诊断，理由是：在疫苗广泛使用的现在，凭抗体滴度很难判断是否为病毒感染；其次，中和试验不能区分野毒株或疫苗株的抗体。

中和试验是评估存在保护性抗体水平的有用方法。EPI部门将已改进的方法用于婴儿按4次OPV接种后的免疫应答反应的快速血清学评估，详细的操作指导见附录1。在某些热带国家有报道服用OPV后效果欠佳，所以，在90年代用标准方法汇集全球资料是重要的。处于A、B和C阶段的国家推荐用此法评估。

处于A和B阶段的国家希望广泛实施不同年龄组的血清学调查。以年龄和地域分组，对整个健康人群抽样取血测定中和抗体，可反映人群的免疫状况。此类研究对没有脊灰临床病例的地区及时发现潜在的免疫人群的空白区很重要。

2.3 实验室及其职能

脊灰病例的病毒学调查和脊灰病毒监测工作依赖于实验室的设施和专门技术，现将不同水平实验室的职能说明如下。

国家实验室

这类实验室的主要任务是通过病毒的分离和鉴定确诊脊灰临床病例。这类实验室也负责病毒分离和鉴定，以及与流行病学调查有关的抗体检测。在那些具有一定设备的国家实验室，对分离到的脊灰病毒，应用集中供应的组合单克隆抗体做出野毒株和疫苗相关株的鉴定。

参考实验室

并非所有国家都有完善的国家脊灰诊断实验室，可邀请其它国家合适的实验室提供必要的支持，这些实验室即称“参考实验室”。这类实验室要负责做某一国家要求的全部工作，以及某些较复杂的实验，包括病毒分离株的型别鉴定等。参考实验室也进行人员培训。虽然大多数参考实验室希望其服务的国家在同一大洲，但欧洲国家的实验室亦可做亚洲和非洲国家的参考实验室。

具有专门职能的参考实验室

少数参考实验室被指定从事上述其中一项或几项或其它专门的职能。其中有病毒分离鉴定，用组合单克隆抗体或cDNA探针技术区别野毒株和疫苗株以及确定野毒株的来源。其它负责的项目包括：（1）筹集和分发优质标准试剂和参考材料；（2）充实培训材料；（3）派遣工作小组到其它指定的实验室；（4）参加合作研究以评估提出的标准及参考材料，回答特殊研究中的问题。

3 标本的收集、贮存和运送

有效的病毒学诊断依赖于临床标本的正确、适时收集及在满意条件下妥善地运送到实验室。收集标本，再将标本由一个实验室送到另一个实验室的典型过程列于图2。

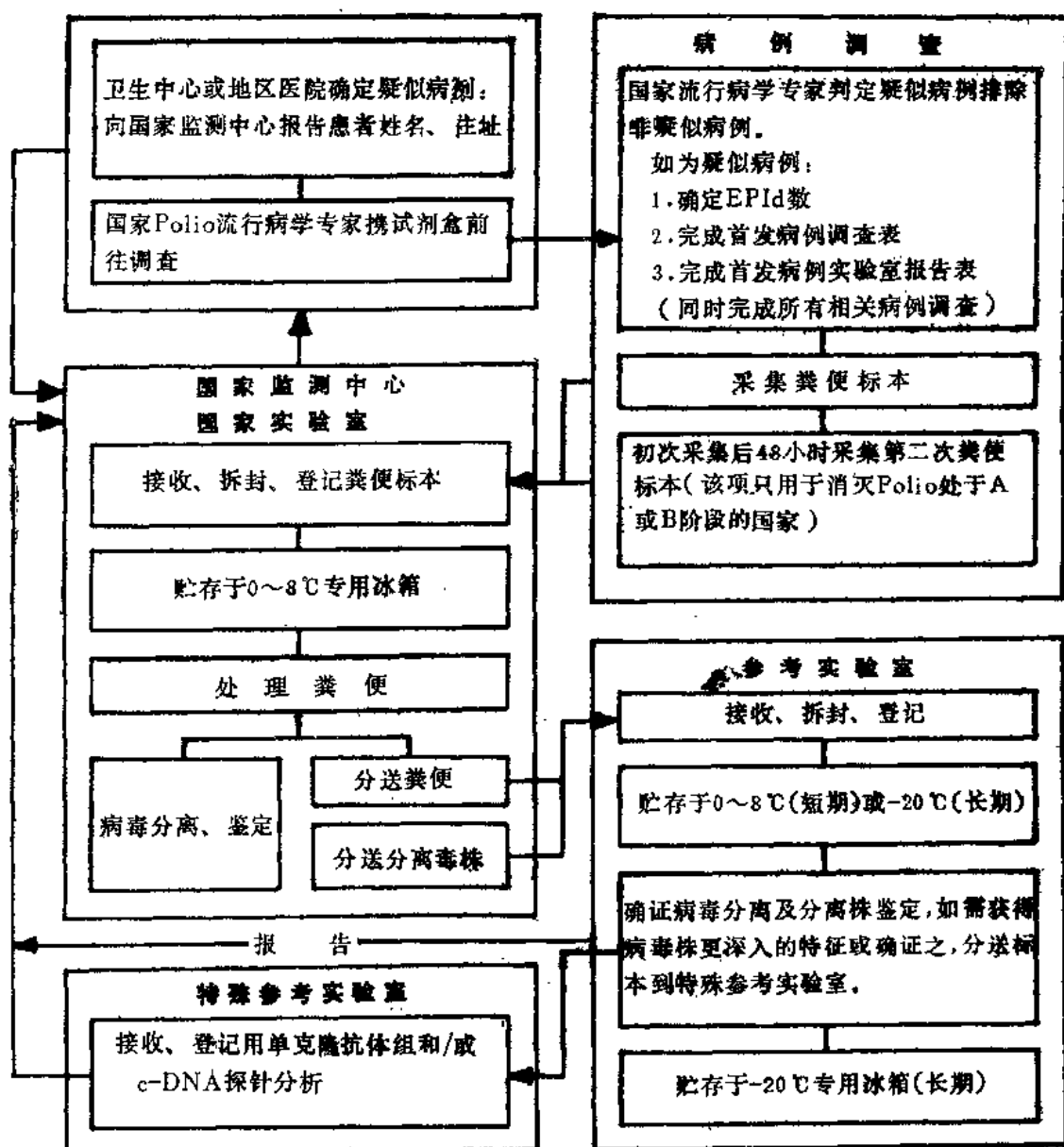


图2 标准标本冷链系统

3.1 标本的收集

对非住院病人，收集粪便。

对住院病人应收集如下标本：

- 弛缓性麻痹者：粪便、咽拭子，
- 脑膜脑炎者：粪便、咽拭子和脑脊液，

●死亡者：尸检标本（脑干组织、脊髓、降结肠）和血清。

3.1.1 用于病毒分离的标本

Polio病毒感染后几周内病毒能在肠道增殖，因此粪便标本最适合做病毒分离。发病后Polio病毒仅在咽部出现7~10天，因此咽拭子标本较少用于病毒分离。尽管Polio病毒有嗜神经性，但脑脊液（CSF）中很少能分离到病毒；而从相关病人中分离其他肠道病毒，相对地容易从脑脊液中分离到。所有用于病毒分离的标本应于发病后尽早收集，死亡病人的尸检标本应在死后几小时内获取。

所有用于病毒分离的标本必须仔细收集，避免来自其他病人材料中不同型别病毒的污染。

粪便

粪便标本在发病后越早收集越好（最好在7天内）。考虑到排出病毒可能呈间隙性，如间隔24~48小时收集2份标本，会增加分离率。消灭Polio处于C和D阶段的地区（图1），病毒诊断可集中在1份粪便标本。粪便标本收集量约为成人大拇指甲大小（约4~8g）。粪便标本应放在干净、干燥、不漏的容器内，最好放在带盖的标准塑料盒内。如没有这样的塑料盒，也可用干净、干燥的油膏盒或药盒。如不易采集到粪便标本，像门诊病人或在野外诊断，可采用另一种办法，即直肠吸管取样。

直肠吸管取样

直肠吸管（Rectal straw）是一种塑料管，按照WHO EPI部的规定制作和包装，产品可从日内瓦WHO EPI部得到。将吸管轻轻插入直肠，稍微移动几下，常常可获得适量的粪便，取出后将吸管放在有安全封口的瓶或管中。

咽拭子

用无菌木杆咽拭子轻擦扁桃腺和咽后壁，然后折断木杆，将咽拭子放入含有VTW（见附录2）的螺旋盖小瓶里。

注意：Polio病毒出现在咽部的时间是发病后7~10天，只有这段时间取样才有意义。

脑脊液（CSF）

2~3ml CSF直接装入无菌螺旋盖小瓶里（不加VTW）。

尸检标本

取死亡病人中枢神经系统（尤其颈髓、腰髓、延髓和桥脑）和降结肠标本，应尽可能在病人死亡后即刻取样。割取尸检标本应分开使用无菌器械，分别放在无菌塑料或玻璃容器内。容器内要有足够的VTW，以保持标本潮湿。中枢神经系统标本需要1cm大小，结肠要取3~5cm长的一段，包括肠内粪便。

3.1.2 用于血清学研究的血液标本

对脊髓灰质炎病人不再建议常规做Polio病毒感染的血清学诊断，特别是在Polio疫苗高覆盖率的地区，因为在解释试验时有困难。

做血清学调查时，对选择的个体只要求1份标本，以5~10ml血为合适。如静脉抽血不易做到，可用刺手指取血，但取量必须满足最重要的血清学试验。用吸管吸取0.3~0.4ml血，装入带塞的或带螺旋盖的小管或小瓶里。婴儿可用刺脚后跟的办法取血。

所有血标本应放在无菌容器内，不加抗凝剂或防腐剂。血标本可放室温先凝固2小时，如果做不到，则可及早放到0~8℃的冰箱里，24小时吸出血清。用低速离心（500×g 5分钟）分

离血清，并用一次性无菌吸管将血清移到无菌小管内。如果离心不方便或标本太多，可不用离心，待血凝固收缩后，小心吸出血清。要避免血清内混有红血球，以免冰存时发生溶血，影响以后的血清学试验。〔 g =相对离心力。用下面公式将RPM转换为 g ， $g = (11.7 \times 10^{-7}) RN^2$ ，这里 R =半径(mm)， N =RPM〕。

滤纸片

用浸渍滤纸片的方法能采集少于0.3ml的血标本。先校正每张纸片的吸血量为0.025ml，用前须10磅(PSI)高压灭菌15分钟。因为Polio病毒中和抗体研究是在细胞培养中进行，故在以后的操作过程中必须使用无菌技术、器材和容器。采集到的总血量为0.1ml(4×0.025 ml)。将纸片(a)立即放入一个有明确标记的瓶或管里，内含0.7ml维持液(见附录2)。在送往实验室之前，保持0~8℃，或保存在-20℃待测；或(b)放在一个有明确标记的干净容器内，干燥过夜，保存在-20℃，检测时加0.7ml无菌PBS(见附录2)洗脱，放0~8℃过夜。这两种处理方法所得的血标本都是1:8稀释，微量中和试验从这一稀释度做起。

3.1.3 标本的标签

从Polio可疑病人收集的标本，采用国内和国际标准的病例调查号，称作EPId号。这种统一的调查号为所有实验室通用。

任何国家从收集标本开始就能够即刻建立病例EPId号，供主管这次调查的高级流行病学专家分析，调查并登记到国家注册号本。EPId号由流行病学家(或经训练的专职人员)签发(见表3)。

表3 EPId号：一种对脊髓灰质炎可疑病人全球性通用的编号

国家的3个字母代号*	有麻痹病例发生的年份	全年Polio可疑病人编号
COL	90	008

*见表4。

标本标签举例见表5，EPId号应用非水溶性墨水写在标签顶部突出的方位。

实验室只在标签下半部适当的空白处记录各自实验室的编号、日期等，不要遮盖上半部的登记内容。

3.1.4 实验报告表

对每一例所要调查的Polio可疑病人都要立病案调查表，由与消灭Polio活动有关的国家流行病专家主管。把调查病人得到的情况填到实验报告表上(表6)。实验室报告要填写所有与这一病人有关的标本或分离物情况，包括从标本收集时间到病毒学分析的整个阶段，直到最后完成。

3.2 标本的保存和运输

3.2.1 温度

原始临床标本中病毒或抗体的滴度在保存和运输过程中可能会降低，这会严重影响病毒学诊断的结果，因此在材料运送到实验室之前和运送期间必须特别小心防止标本受热和干固。

标本不能反复冻融，只有确保标本在整个运送和保存期间的温度都能达到-20℃时才能冷冻，一般在国内的冷链运送中这点不易做到。因此建议标本的运送和冷藏温度为0℃~8℃。

表4 国家的3个字母代号

Africa			The Americas			Eastern Mediterranean			Europe			South-East Asia			Western Pacific		
Country	Code	Country	Code	Country	Code	Country	Code	Country	Code	Country	Code	Country	Code	Country	Code	Country	Code
Algeria	ALG	Anguilla	ANU	Afghanistan	AFG	Albania	ALB	Bangladesh	BAN	American							
Angola	ANG	Antigua and Barbuda	ANB	Bahrain	BAA	Austria	AUT	Bhutan	BHU	Samoa	MAS						
Benin	BEN	Argentina	ARG	Cyprus	CYP	Belgium	BEL	Myanmar	MMR	Australia	AUS						
Botswana	BOT	Bahamas	BAH	Djibouti	DJI	Bulgaria	BUL	Democratic People's		Belau	BLA						
Burkina Faso	BEA	Barbados	BAR	Egypt	EGY	Byelorussian				Brunei							
Burundi	BUU	Belize	BLZ	Iran, Islamic Republic of	IRA	Soviet Socialist Republic				Darussalam	BRU						
Cameroon	CAE	Bermuda	BER	Republic of Iraq	IRQ	Republic	BYE	Korea	KRD	China 中国	CHN						
Cape Verde	CAV	Bolivia	BOL	Jordan	JOR	Czechoslovakia	CZE	India	IND	Cook Islands	COK						
Central African Republic	CAF	Brazil	BRA	Kuwait	KUW	Denmark	DEN	Indonesia	INO	Democratic							
Chad	CHA	British Virgin Islands	VIB	Lebanon	LEB	Finland	FIN	Maldives	MAV	Kampuchea	KAM						
Comoros	COM	Canada	CAN	Libyan Arab Jamahiriya	LIY	France	FRA	Mongolia	MOG	Fiji	FJI						
Congo	CNG	Cayman Islands	CAY	Morocco	MOR	German		Nepal	NEP	French Polynesia	FRP						
Equatorial Guinea	EQG	Chile	CHI	Oman	OMA	Democratic Republic		Sri Lanka	SRL	Guam	GUM						
Guinea	ETH	Colombia	COL	Pakistan	PAK	Republ	DDR	Thailand	THA	Hong Kong	HOK						
Ethiopia	ETH	Costa Rica	COR	Qatar	QAT	Germany, Federal				Japan	JPN						
Gabon	GAB	Cuba	CUB	Republic of Yemen		Republ	DEU			Kiribati	KIR						
Gambia	GAM	Dominica	DOM	Saudi Arabia	SAA	Greece	GRE			Lao People's							
Ghana	GHA	Dominican Republic	DOR	Somalia	SOM	Hungary	HUN			Democratic Republic	LAO						
Guinea	GUI	Ecuador	ECU	Sudan	SUD	Iceland	ICE			Macao	MAC						
Guinea-Bissau	GUB	El Salvador	ELS	Syrian Arab Republic	SAR	Ireland	IRE			Malaysia	MAA						
Ivory Coast	IVC	French Guiana	FRG	Tunisia	TUN	Israel	ISR			Marshall Islands	MSI						
Kenya	KEN	Grenada	GRA	United Arab	UAE	Italy	ITA			Micronesia	MIC						
Lesotho	LES	Guadeloupe	GUA			Luxembourg	LUX			New Caledonia	NEC						
Liberia	LIB	Guatemala	GUT			Malta	MAT			New Zealand	NEZ						
Madagascar	MAD	Guyana	GUY			Monaco	MON			Niue	NIU						