

ICS 11.020

C59

备案号:25526—2009

WS

中华人民共和国卫生行业标准

WS 214—2008

代替 WS 214—2001

流行性乙型脑炎诊断标准

Diagnostic criteria for Japanese encephalitis

2008-12-11 发布

2009-06-15 实施



中华人民共和国卫生部 发布

前 言

根据《中华人民共和国传染病防治法》制定本标准。

本标准代替并废止 WS 214—2001。

本标准与 WS 214—2001 相比主要变化如下：

- 增加了病原学、流行病学、鉴别诊断；
- 修改了实验室检查部分；
- 删除了处理原则。

本标准的附录 A、附录 B 为规范性附录，附录 C、附录 D 为资料性附录。

本标准由卫生部传染病标准专业委员会提出。

本标准由中华人民共和国卫生部批准。

本标准起草单位：中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所、北京地坛医院、中国疾病预防控制中心免疫规划中心、解放军 302 医院。

本标准主要起草人：梁国栋、李兴旺、陈园生、唐青、赵敏、蔡皓东。

流行性乙型脑炎诊断标准

1 范围

本标准规定了流行性乙型脑炎的诊断依据、诊断原则、诊断和鉴别诊断。

本标准适用于全国各级医疗卫生机构及其工作人员对流行性乙型脑炎的诊断、报告。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

2.1

流行性乙型脑炎 Japanese encephalitis, JE

是由乙型脑炎病毒(Japanese encephalitis virus, JEV, 简称乙脑病毒)引起的, 主要侵犯中枢神经系统的急性传染病, 也称日本脑炎, 简称乙脑, 属自然疫源性疾疾病, 主要经蚊媒传播, 流行于夏秋季。

2.2

脑膜刺激征 meningeal irritation sign

炎症刺激脊髓神经根, 由其支配的相应肌群所出现的一种防御反应性肌痉挛现象。主要表现为颈强直、克尼格征(Kernig's sign)和布鲁辛斯基征(Brudzinski's sign)阳性等。

3 诊断依据

3.1 流行病学史

居住在乙脑流行地区且在蚊虫孳生季节发病, 或发病前 25d 内在蚊虫孳生季节曾去过乙脑流行地区。流行病学特征见附录 D。

3.2 临床表现

3.2.1 潜伏期

一般为 10d~14d, 可短至 4d, 长至 21d。

3.2.2 临床症状

急性起病, 发热、头痛、喷射性呕吐, 发热 2d~3d 后出现不同程度的意识障碍, 重症患者可出现全身抽搐、强直性痉挛或瘫痪等中枢神经症状, 严重病例出现中枢性呼吸衰竭。

3.2.3 体征

浅反射消失、深反射亢进。脑膜刺激征和病理反射阳性、痉挛性瘫痪或去大脑强直。可伴有瞳孔大小改变、血压升高、心率减慢等颅内压升高体征。

3.2.4 临床分型

3.2.4.1 轻型

发热, 体温一般不超过 39℃; 头痛、呕吐、精神萎靡, 神志清楚, 无抽搐, 病程 7d~10d。

3.2.4.2 普通型

发热, 体温 39℃~40℃; 剧烈头痛、喷射性呕吐、烦躁、嗜睡、昏睡或浅昏迷, 局部肌肉小抽搐, 病程约 2 周。

3.2.4.3 重型

发热, 体温 40℃以上; 剧烈头痛、喷射性呕吐, 很快进入昏迷, 反复抽搐, 病程约 3 周, 愈后可留有后遗症。

3.2.4.4 极重型

起病急骤,体温在1d~2d内上升至40℃以上,反复或持续性强烈抽搐,伴深昏迷,迅速出现脑疝及呼吸衰竭,病死率高,幸存者发生后遗症几率较高。

3.3 实验室检查

3.3.1 血象

白细胞总数多在 $(10\sim 20)\times 10^9/L$,中性粒细胞可达80%以上。

3.3.2 脑脊液

压力增高,外观清亮,白细胞计数增高,多在 $(50\sim 500)\times 10^6/L$,早期以多核细胞增高为主,后期以单核细胞增高为主,蛋白轻度增高,糖与氯化物正常。

3.3.3 血清学检查

操作方法按附录B进行,附录C提供的方法可供参考。

3.3.3.1 1个月内未接种乙脑疫苗者,血液或脑脊液中抗乙脑病毒IgM抗体阳性;

3.3.3.2 恢复期血清中抗乙脑病毒IgG抗体阳转或乙脑病毒中和抗体滴度比急性期有4倍或4倍以上升高;

3.3.3.3 急性期抗乙脑病毒IgG抗体阴性,恢复期阳性。

3.3.4 病原学检查

操作方法按附录A执行,病原学参见附录D。

3.3.4.1 早期感染者脑脊液或血清中分离出乙脑病毒;

3.3.4.2 检测出乙脑病毒的特异性核酸。

4 诊断原则

4.1 根据流行病学资料和临床表现及实验室检查,综合分析后作出疑似诊断、临床诊断。

4.2 确定诊断须依靠血清学或病原学检查。

5 诊断

5.1 疑似病例

符合3.1、3.2.2、3.2.3和3.3.1项者。

5.2 临床诊断病例

疑似病例同时符合3.3.2项者。

5.3 确诊病例

临床诊断病例,同时符合3.3.3中任一项者;或临床诊断病例,同时符合3.3.4中任一项者。

5.4 在临床诊断或确定诊断基础上,根据3.2.4进行临床分型诊断。

6 鉴别诊断

主要与其他病毒性脑炎、细菌性脑膜炎、真菌性脑膜炎、中毒性痢疾等鉴别。

附 录 A
(规范性附录)
乙脑特异性病原学检测

A.1 乙脑病毒分离

A.1.1 原理

感染乙脑病毒后至发病早期,机体会短暂的有病毒血症期,此时采集患者血液和(或)脑脊液标本有可能分离到乙脑病毒,从脑炎患者标本中分离到乙脑病毒是乙脑诊断的金标准,目前常规采用的病毒分离方法有组织细胞培养法和新生乳鼠接种法,如有条件可以两种方法同时进行。

A.1.2 组织细胞培养法

A.1.2.1 试验材料

A.1.2.1.1 组织培养细胞

C6/36、BHK-21、Vero 细胞等乙脑病毒敏感的细胞系。

A.1.2.1.2 C6/36 细胞培养基

a) 生长液:100mL 生长液中包含 Eagle's 液 57mL、1640 培养液 27mL、胎牛血清 10mL、10 000U/mL 青霉素和 10 000μg/mL 链霉素各 1mL、1%谷氨酰胺 1mL、7.5%碳酸氢钠调液体 pH 7.2~7.4。

b) 维持液:100mL 维持液中包含 Eagle's 液 61mL、1640 培养液 31mL、胎牛血清 2mL、10 000U/mL 青霉素和 10 000μg/mL 链霉素各 1mL、1%谷氨酰胺 1mL、7.5%碳酸氢钠调液体 pH 7.2~7.4。

A.1.2.1.3 BHK-21 和(或)Vero 细胞培养基

a) 生长液:100mL Eagle's 生长液中包含 Eagle's 液 84mL、胎牛血清 10mL、10 000U/mL 青霉素和 10 000μg/mL 链霉素各 1mL、1%谷氨酰胺 1mL、7.5%碳酸氢钠调液体 pH 7.2~7.4。

b) 维持液:100mL Eagle's 维持液中包含 Eagle's 液 92mL、胎牛血清 2mL、10 000U/mL 青霉素和 10 000μg/mL 链霉素各 1mL、1%谷氨酰胺 1mL、7.5%的碳酸氢钠调液体的 pH 7.2~7.4。

A.1.2.2 操作步骤(以 C6/36 细胞为例)

A.1.2.2.1 生长至 80%单层细胞培养管,弃去培养液,加入 0.2mL 标本液(脑脊液可用原液直接接种,血清需 1:2~1:5 稀释使用),置于 28℃、5%二氧化碳培养箱中,每隔 15min 轻摇一次,促进吸附;

A.1.2.2.2 1h 后弃去液体,加入 1mL 细胞维持液,同时设立对照细胞管,置于 28℃、5%二氧化碳培养箱中继续培养;

A.1.2.2.3 显微镜下观察细胞病变,乙脑病毒在 C6/36 细胞出现病变时间一般为 3d~4d;

A.1.2.2.4 出现病变的细胞感染上清液进一步鉴定,无病变者盲传三代不出现细胞病变可以停止实验。

A.1.2.3 结果判定

乙型脑炎病毒感染 C6/36 细胞后,细胞病变表现为细胞聚集,融合和脱落等特征。患者标本引起组织培养细胞出现病变并非诊断乙脑病毒感染的特异性指标,还需要对分离物进行乙脑病毒特异性鉴定实验方能确诊。

A.1.3 新生乳鼠接种法

A.1.3.1 试验材料

a) 2d~3d 龄乳鼠,每窝乳鼠为一组。

b) 血清或脑脊液标本可以直接用于乳鼠接种。

A.1.3.2 操作步骤

A. 1. 3. 2. 1 在每只乳鼠左(或右)侧眼后角与耳前缘与颅中线构成的三角区中心,刺入 2mm~3mm,注射血清或脑脊液 0.02mL;

A. 1. 3. 2. 2 乳鼠接种后从 24h 起,每 8h 观察一次,出现发病后改为每 4h 观察一次。接种 24h 内死亡的乳鼠视为非特异性死亡;

A. 1. 3. 2. 3 乳鼠濒死时收获鼠脑组织,未发病的乳鼠继续观察至 14d;

A. 1. 3. 2. 4 制备鼠脑研磨液进行下一轮接种实验。按照上述方法在鼠脑内传代 3 次。可以引起乳鼠规律病变的标本进行乙脑病毒特异性鉴定实验。

A. 1. 3. 3 结果判定

一般乳鼠接种乙脑病毒后 60h 左右开始发病,表现为拒乳、离群、蜷曲、抽搐、四肢强直等症状,随着时间的推移症状逐渐加重,多数乳鼠在 72h 死亡。患者标本引起乳鼠发病并非诊断乙脑病毒感染的特异性指标,还需要对分离物进行乙脑病毒特异性鉴定实验方能确诊。

A. 2 乙脑病毒特异性核酸检测

A. 2. 1 原理

基于常规 RT-PCR 原理,设计乙脑病毒特异性引物,对脑炎患者的标本进行乙脑病毒特异性核酸检测。阳性结果可以判定为乙脑病毒感染。该方法比病毒分离更加敏感、快速,可直接作出诊断。

A. 2. 2 试验材料

A. 2. 2. 1 待检患者标本

血清、脑脊液和(或)尸检脑组织均可。标本要求无菌采集,最好是一80℃或液氮保存,冷链运输;

A. 2. 2. 2 PCR 扩增引物

上游引物: PrM_{F(251-275)}: 5'-CgT TCT TCA AGT TTA CAg CAT TA_g C-3', 下游引物: PrM_{R(925-901)}: 5'-CC YRT gTT YCT gCC AAg CAT CCA MCC-3';

A. 2. 2. 3 细胞总 RNA 分离试剂

Trizol(用于组织标本); Trizol SL(用于液体标本),或病毒 RNA 提取试剂盒;

A. 2. 2. 4 逆转录和 PCR 扩增试剂

AMV 逆转录酶、DNA 聚合酶、dNTP Mixture 等。

A. 2. 3 操作步骤

A. 2. 3. 1 病毒 RNA 提取

待检标本用细胞总 RNA 分离试剂提取 RNA,按照细胞总 RNA 分离试剂说明书操作;

A. 2. 3. 2 逆转录合成 cDNA

根据 AMV 逆转录酶反应要求,按照说明书通过逆转录反应合成与目的基因 RNA 序列互补的 cDNA;

A. 2. 3. 3 PCR 扩增

目的基因的扩增条件为 95℃ 预变性 5min, 94℃ 30s, 55℃ 30s, 72℃ 60s, 扩增 30~35 个循环, 72℃ 延伸 10min;

A. 2. 3. 4 结果观察

用 1%~2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。

A. 2. 4 结果判定

该对引物对中国以往分离株及近年新分离的乙脑病毒均特异,应用以上引物扩增产物应为 674 核苷酸片段,如果扩增产物分子量与预期片段相同,而阴性对照无条带,表明标本中含有乙脑病毒核酸,可以判定为乙脑病毒核酸检测阳性。PCR 产物的核苷酸序列还可以进行乙脑病毒基因分型研究,从而进一步揭示病毒株的基因型别特征。

附录 B
(规范性附录)
乙脑血清学检测

B.1 微量中和试验(固定病毒-稀释血清法)

B.1.1 原理

人或动物感染乙脑病毒后,血清中可产生具有高度特异性的中和抗体。中和试验是利用观察病毒感染力而检测标本中乙脑病毒中和抗体水平的实验方法。其基本原理是先将病毒与标本进行中和反应,然后接种组织培养细胞或实验动物来测定病毒感染力。观察病毒感染力的方法有细胞病变法、蚀斑形成法以及计算动物死亡数等。这里主要介绍用于检测患者血清标本中和抗体滴度的固定病毒稀释血清的微量中和试验。

B.1.2 试验材料

B.1.2.1 待检血清标本:无菌采集, -20℃以下保存;

B.1.2.2 细胞及相应培养液:按 A.1.2 分离乙脑病毒;

B.1.2.3 无菌 Hanks 洗液,调至 pH 7.4;

B.1.2.4 仪器设备:倒置生物显微镜、37℃,5% CO₂ 恒温培养箱、37℃水浴锅、组织培养板及加样器、吸管等。

B.1.3 操作步骤

B.1.3.1 TCID₅₀ 滴定

首先在敏感的细胞测定病毒 50% 致细胞病变量(TCID₅₀)以确定进行中和试验的病毒用量,一般使用 100TCID₅₀/50μL。允许范围为 32~320TCID₅₀。

B.1.3.1.1 将生长状态良好的组织培养细胞接种至无菌 96 孔板(100μL/孔),在 37℃,5% CO₂ 孵箱培养 24h 左右,观察细胞生长状态以进行 TCID₅₀ 试验;

B.1.3.1.2 取新鲜病毒悬液,用维持液连续 10 倍系列稀释,每一个稀释度换用一个新的吸管或吸头;

B.1.3.1.3 稀释的病毒分别接种于组织培养细胞,96 孔板接种量为 50μL/孔;病毒每稀释度接种 4 孔,平行设立正常细胞对照 4 孔,37℃,5% CO₂ 培养箱中吸附 1h;

B.1.3.1.4 取出细胞培养板,吸去病毒液,以 Hanks 液洗 3 次,补加 100μL 细胞维持液将细胞管置于 5% 二氧化碳恒温培养箱中培养数日;

B.1.3.1.5 逐日在显微镜下观察并记录细胞病变情况,一般连续观察 3d~7d;

B.1.3.1.6 按 Reed 和 Muench 法计算该病毒液的 TCID₅₀。具体计算方法见式(B.1)和式(B.2):

$$\text{距离比例} = \frac{\text{高于 } 50\% \text{ 细胞病变百分数} - 50}{\text{高于 } 50\% \text{ 细胞病变百分数} - \text{低于 } 50\% \text{ 细胞病变百分数}} \dots\dots\dots (\text{B.1})$$

$$\text{TCID}_{50} = \text{高于 } 50\% \text{ 病变的病毒最高稀释度的对数} + \text{距离比例} \dots\dots\dots (\text{B.2})$$

得到的计算结果可以表述为:在所计算得到的稀释度下,病毒的感染性剂量为 1TCID₅₀/50μL。

B.1.3.2 中和试验

B.1.3.2.1 细胞培养:将生长状态良好的组织培养细胞接种至无菌 96 孔板,5% CO₂ 孵箱培养 24h 左右,观察细胞生长状态以进行微量中和试验;

B.1.3.2.2 血清标本的稀释:首先将待检血清在 56℃ 灭活 30min;用维持液进行系列倍比稀释成 1:10、1:20、1:40 等。具体操作步骤:取 6~10 个无菌处理的离心管分别标记不同的稀释度;向第 1 管加入 450μL 维持液,其余各管中加入 100μL 维持液;取 50μL 血清原液加入到第 1 管中,充分混匀,换用新吸头吸取 100μL 加入第 2 管,充分混匀并依次进行稀释;

B. 1. 3. 2. 3 对照的设立:已知阳性对照血清 8 孔,设立 1:40,1:80 两个滴度的阳性对照孔;以维持液为阴性对照,设立正常细胞对照 4 孔;血清对照 4 孔(待检血清+等体积维持液),病毒感染对照 4 孔(病毒稀释液+等体积维持液),病毒工作液滴度检查,(每孔中加入 50 μ L 2 倍系列稀释病毒液,最终第一孔为 100TCID₅₀、50TCID₅₀、25TCID₅₀……0.7TCID₅₀)。

B. 1. 3. 2. 4 血清标本与病毒悬液的孵育:按照 TCID₅₀ 试验测定的病毒原液进行适当稀释,得到 100TCID₅₀/25 μ L 病毒稀释液,取病毒稀释液分别与稀释的待检血清、病毒对照、阳性血清对照等量混匀;37 $^{\circ}$ C 水浴作用 1h;

B. 1. 3. 2. 5 病毒接种:从细胞培养箱中取出 96 孔板,弃去细胞培养液,用 Hanks 液洗涤细胞孔板 3 次,动作应轻柔,弃去孔板内的液体,取 50 μ L 孵育后的混合液至相应细胞培养孔中,每个滴度样品平行加 4 孔;放置于 37 $^{\circ}$ C 二氧化碳细胞培养箱孵育 1h 后补加 50 μ L 维持液放置于 37 $^{\circ}$ C 二氧化碳细胞培养箱继续培养;

B. 1. 3. 2. 6 细胞病变的观察与中和滴度的计算:病毒接种 48h 以后,开始观察并记录细胞病变情况。完成细胞病变观察后按照式(B. 3)进行中和抗体的计算与判定:

$$\text{距离比例} = \frac{50 - \text{低于 } 50\% \text{ 细胞病变百分数}}{\text{高于 } 50\% \text{ 细胞病变百分数} - \text{低于 } 50\% \text{ 细胞病变百分数}} \dots\dots\dots (\text{B. 3})$$

中和抗体滴度的反对数为:低于 50% 病变率血清稀释度对数+距离比例 \times 稀释系数的对数。

B. 1. 4 结果判定

B. 1. 4. 1 TCID₅₀ 具体计算方法举例如下:

由表 B. 1 看出,能使 50% 细胞孔出现病变的病毒稀释度在 10⁻⁴~10⁻⁵ 之间,其中间距离比例按 Reed 和 Muench 公式计算,见式(B. 4):

$$\begin{aligned} \text{距离比例} &= \frac{\text{高于 } 50\% \text{ 细胞病变百分数} - 50}{\text{高于 } 50\% \text{ 细胞病变百分数} - \text{低于 } 50\% \text{ 细胞病变百分数}} \dots\dots\dots (\text{B. 4}) \\ &= (80 - 50) / (80 - 20) = 0.5 \end{aligned}$$

高于 50% 病变的病毒最高稀释度的对数+距离比例=4+0.5=4.5

表 B. 1 滴定病毒 TCID₅₀ 计算表(示意)

病毒稀释度	总接种孔数	无病变细胞孔数	病变细胞孔数	累计总数		病变细胞孔数比例	出现细胞病变率/%
				无病变孔数 \downarrow	有病变孔数 \uparrow		
10 ⁻¹	4	0	4	0	16	16/16	100
10 ⁻²	4	0	4	0	12	12/12	100
10 ⁻³	4	0	4	0	8	8/8	100
10 ⁻⁴	4	1	3	1	4	4/5	80
10 ⁻⁵	4	3	1	4	1	1/5	20
10 ⁻⁶	4	4	0	8	0	0/8	0
正常对照	4	4	0				

注: \downarrow \uparrow 所指方向为累加的方向。

能使 50% 细胞管发生病变的病毒稀释度为 10^{-4.5}, 即 TCID₅₀ 为 10^{-4.5}, 当病毒悬液做 10^{4.5} 倍稀释时,50 μ L 中含 1 个 TCID₅₀。

B. 1. 4. 2 中和试验结果计算方法举例如下:

由表 B. 2 可以看出 50% 细胞病变出现在血清稀释度的 1:320~1:640 之间,其中间比例可以按式(B. 5):

表 B.2 中和抗体滴定计算表(示意)

血清稀释度 lg	病变观察 CPE 孔数/总孔数	CPE 分布		CPE 累计		CPE 比数	CPE 百分比/%
		阳性	阴性	阳性 ↓	阴性 ↑		
1 : 10(10 ⁻¹)	0/4	0	4	0	24	0/24	0
1 : 20(10 ^{-1.3})	0/4	0	4	0	20	0/20	0
1 : 40(10 ^{-1.6})	0/4	0	4	0	16	0/16	0
1 : 80(10 ^{-1.9})	0/4	0	4	0	12	0/12	0
1 : 160(10 ^{-2.2})	0/4	0	4	0	8	0/8	0
1 : 320(10 ^{-2.5})	1/4	1	3	1	4	1/5	20
1 : 640(10 ^{-2.8})	3/4	3	1	4	1	4/5	80
1 : 1 280(10 ^{-3.1})	4/4	4	0	8	0	8/8	100

注: ↓ ↑ 所指方向为累加的方向

$$\text{距离比例} = \frac{50 - \text{低于 } 50\% \text{ 细胞病变百分数}}{\text{高于 } 50\% \text{ 细胞病变百分数} - \text{低于 } 50\% \text{ 细胞病变百分数}} \dots\dots\dots (\text{B.5})$$

低于 50% 病变率血清稀释度对数 + 距离比例 × 稀释系数的对数

则上述结果可以分析 距离比例 = (50 - 20) / (80 - 20) = 0.5

中和抗体滴度计算为 $-2.5 + 0.5 \times \lg(1/2) = -2.5 - 0.15 = -2.65$

-2.65 的反对数 = 1 : 447, 即该份血清标本 1 : 447 稀释可以保护 50% 细胞不产生病变, 中和抗体滴度判定为 1 : 447。

如果患者急性期和恢复期血清的中和抗体出现 4 倍或 4 倍以上升高可以诊断为乙脑病毒感染。

B.2 IgM 捕获 ELISA 法检测抗乙脑病毒 IgM 抗体

B.2.1 原理

乙型脑炎病毒感染后机体首先产生 IgM 抗体, 一般 IgM 抗体持续存在一个月左右。由于乙脑的潜伏期为 4d~21d, 平均为 10d~14d。因此出现临床症状的患者, 其血液或脑脊液中即可查到乙脑特异性 IgM 抗体。查到抗乙脑病毒 IgM 抗体, 尤其是在脑脊液中查到抗乙脑病毒 IgM 抗体, 结合症状可以诊断为乙型脑炎。IgM 捕获 ELISA 实验是利用包被在聚苯乙烯板上抗人 IgM μ 链抗体, 捕获感染者标本中抗乙脑病毒 IgM 抗体, 感染者体内抗乙脑病毒 IgM 抗体与乙脑抗原可以特异性结合, 再通过标记有过氧化物酶的抗乙脑抗原抗体与底物结合并显色而达到检测目的。该方法的特点是特异、敏感、快速, 适于早期快速诊断。

B.2.2 试验材料

- B.2.2.1 抗人 IgM μ 链抗体;
- B.2.2.2 灭活乙脑病毒抗原;
- B.2.2.3 乙脑单克隆抗体;
- B.2.2.4 过氧化物酶标记的抗鼠 IgG 抗体;
- B.2.2.5 包被液: 0.05mol/L, pH 9.6 碳酸盐缓冲液;
- B.2.2.6 封闭液: 含 1% 牛血清白蛋白(或 5% 脱脂奶)和 0.05% Tween-20 的 PBS 液体;
- B.2.2.7 稀释液: 含有 0.5% 牛血清白蛋白(或 3% 脱脂奶)和 0.05% Tween-20 的 PBS 液体;
- B.2.2.8 洗液: 含有 0.05% Tween-20 的 PBS 液体;
- B.2.2.9 底物液: OPD 或 TMB;
- B.2.2.10 终止液: 4NH₂SO₄;
- B.2.2.11 酶标仪、洗板机、ELISA 用 96 孔板、移液枪、多通道移液枪、37℃ 水浴、湿盒。

B.2.3 操作步骤

- B.2.3.1 抗人 IgM μ 链抗体用 pH 9.6 碳酸盐缓冲液稀释后包被,100 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C 过夜,洗板 3 次,甩干;
- B.2.3.2 每孔加 200 μ L 封闭液,37 $^{\circ}$ C 温浴 2h,洗板 3 次;
- B.2.3.3 加待测标本(血清或脑脊液),并设立阳性对照、阴性对照和空白对照,100 μ L/孔;
- B.2.3.4 37 $^{\circ}$ C 温浴 1h,洗板 4 次,甩干;
- B.2.3.5 每孔加 100 μ L 灭活抗原,37 $^{\circ}$ C 温浴 1h,洗板 4 次,甩干;
- B.2.3.6 加适当稀释后的乙脑单克隆抗体,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 温浴 1h,洗板 4 次,甩干;
- B.2.3.7 加酶标抗鼠 IgG 抗体,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 温浴 1h,洗板 4 次,甩干;
- B.2.3.8 加底物液 OPD 或 TMB,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 温箱避光孵育 15min;
- B.2.3.9 每孔加 50 μ L 终止液,终止反应;
- B.2.3.10 酶标仪在 490nm 或 450nm 处测 OD 值;
- B.2.3.11 阳性对照:乙脑阳性血清或脑脊液代替待检标本,至少设立两孔,取平均值;
- B.2.3.12 阴性对照:阴性血清或脑脊液代替待检标本,至少设立两孔,取平均值;
- B.2.3.13 空白对照:稀释液代替待检标本。

B.2.4 结果判定

首先根据式(B.6) P/N 值,

$$P/N = (N_1 - N_0) / (N_2 - N_0) \dots\dots\dots (B.6)$$

式中:

- N_1 ——标本的 OD 值;
- N_0 ——空白对照的 OD 值;
- N_2 ——阴性对照的 OD 值。

首先计算阳性对照孔,阳性对照 $P/N \geq 2.1$ 情况下说明实验成立。其他检测标本的结果判定如下:

- 检测标本 $P/N \geq 2.1$ 时,可以判定为阳性,表明患者新近感染乙脑病毒;
- 当 $1.5 \leq P/N < 2.1$ 时,检测结果判为可疑阳性,需结合其他诊断方法的结果进行综合分析;
- 当 $P/N < 1.5$ 时,结果判为阴性,提示标本中无抗乙脑病毒 IgM 抗体。

B.3 间接 ELISA 法检测抗乙脑病毒 IgG 抗体

B.3.1 原理

利用包被在塑料板孔中乙脑病毒抗原可以特异性结合患者标本中抗乙脑病毒抗体,再通过酶标记的抗人 IgG 抗体结合人源 IgG 的特性,达到检测目的。一般用乙脑全病毒作抗原,故检测到的不仅有乙脑中和抗体,还有乙脑非中和抗体。抗乙脑病毒 IgG 抗体阳性提示感染过乙脑病毒或接种过乙脑疫苗。

B.3.2 试验材料

- B.3.2.1 包被液、封闭液、洗液、底物液与终止液同 B.2.2。
- B.3.2.2 灭活抗原、过氧化物酶标记的抗人 IgG 抗体。

B.3.3 操作步骤

- B.3.3.1 乙脑病毒抗原用 pH 9.6 碳酸盐缓冲液稀释后包被,100 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C 过夜,洗板 3 次,甩干;
- B.3.3.2 加封闭液,200 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 温浴 2h,洗板 3 次;
- B.3.3.3 加待检的血清,并设立阳性对照、阴性对照和空白对照,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 温浴 1h,洗板 4 次;
- B.3.3.4 加酶标记抗人 IgG 抗体,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 温浴 1h,洗板 4 次;
- B.3.3.5 加底物液 OPD 或 TMB,100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 温箱避光孵育 15min;
- B.3.3.6 加终止液终止反应,50 μ L/孔;

B. 3. 3. 7 在 490nm 或 450nm 处检测 OD 值；

B. 3. 4 结果判定

按式(B. 6)计算 P/N 值。

首先计算阳性对照孔, 阳性对照 $P/N \geq 2.1$ 情况下说明实验成立。其他检测标本的结果判定如下:

检测标本 $P/N \geq 2.1$ 时, 可以判定为阳性;

当 $1.5 \leq P/N < 2.1$ 时, 检测结果判为可疑阳性, 需结合其他诊断方法的结果进行综合分析;

当 $P/N < 1.5$ 时, 结果判为阴性。只有当双份血清中抗乙脑病毒 IgG 抗体 4 倍或 4 倍以上升高才具有诊断意义。

附录 C

(资料性附录)

免疫荧光法检测抗乙脑病毒抗体

C.1 间接免疫荧光试验(IFA)检测抗乙脑病毒 IgM、IgG 抗体

C.1.1 原理

检测原理和 ELISA 法基本相同,不同之处在于反应在玻片上进行,首先制备细胞培养的病毒抗原片,使用荧光标记的抗体直接在荧光显微镜下观察结果。本方法的特点是快速、简便、结果直观、敏感性和特异性较高等优点,它同样可以检测抗乙脑病毒 IgM 和(或)IgG 抗体。

C.1.2 试验材料

C.1.2.1 抗原片:用乙脑病毒感染组织培养细胞制备,低温干燥保存;

C.1.2.2 对照:乙脑病毒小鼠免疫血清或阳性病例血清(阳性对照)、阴性血清;

C.1.2.3 FITC 标记的抗人 IgG 抗体、FITC 标记的抗人 IgM μ 链抗体;

C.1.2.4 常用稀释液,pH 7.2~7.4 PBS 液体、1:60 000 伊文思兰(PBS 稀释)、90%甘油(PBS 配制)等;

C.1.2.5 荧光显微镜;

C.1.2.6 移液枪、37℃水浴、湿盒、染色缸、微量搅拌器、稀释板、盖玻片。

C.1.3 操作步骤

C.1.3.1 从冰箱中取出制备好的抗原片,散掉雾气,PBS 液振洗 2 遍,蒸馏水振洗 1 遍,每次 2min,晾干;

C.1.3.2 滴加 PBS 液稀释好的待测标本,并设立阳性对照、阴性对照和空白对照,每孔 6 μ L;

C.1.3.3 湿盒 37℃孵育 30min;

C.1.3.4 用缓流冲洗抗原片 3s~5s,再用 PBS 液振洗 3 遍,蒸馏水振洗 1 遍,每次 2min,晾干;

C.1.3.5 用 1:60 000 伊文思兰液稀释 FITC 标记的抗人 IgM 或抗人 IgG 抗体,每孔 6 μ L(包括所有对照孔);

C.1.3.6 湿盒 37℃孵育 30min;

C.1.3.7 用缓流冲洗抗原片 3s~5s,再用 PBS 液振洗 3 遍,蒸馏水振洗 1 遍,每次 2min;

C.1.3.8 晾干;用 90%甘油封片,加盖玻片,荧光显微镜观察;

C.1.3.9 阳性对照:阳性血清代替待测标本加到固定有抗原的孔中;

C.1.3.10 阴性对照:阴性血清代替待测标本加到固定有抗原的孔中;

C.1.3.11 空白对照:PBS 液代替待测标本加到固定有抗原的孔中。

C.1.4 结果判定

只有在阳性对照存在特异性荧光,阴性对照无特异性荧光,空白对照无荧光时,检测结果才是可靠的。急性期血清标本稀释度 $\geq 1:10$ 荧光阳性(脑脊液为 $\geq 1:5$)可以判定为抗乙脑病毒 IgM 抗体阳性;或双份血抗乙脑病毒 IgG 抗体 4 倍或 4 倍以上升高可以判定为阳性。

附 录 D
(资料性附录)
乙脑的病原学与流行病学

D.1 病原学

D.1.1 分类

乙脑病毒(Japanese encephalitis virus,JEV)属黄病毒科(Flaviviridae),黄病毒属(Flavivirus)。

D.1.2 形态结构

球形,直径约40nm,分子量 4.2×10^6 ,为单股正链RNA病毒,有明显的嗜神经特性,该病毒基因组全长10976个核苷酸,编码3个结构蛋白与7个非结构蛋白。

D.1.3 分型

乙脑病毒只有一个血清型。基于乙脑病毒C/PrM基因序列可以将乙脑病毒分为五种基因型,我国目前有I、III两种基因型乙脑病毒的流行。

D.1.4 理化特性

乙脑病毒对常用的消毒剂(如碘酊、乙醇、酚)和有机溶剂敏感。

D.1.5 诊断意义

检测到乙脑病毒特异性核酸或抗原、分离到乙脑病毒均可作为病原学诊断依据。

D.2 流行病学

D.2.1 传播媒介

蚊虫是乙脑的主要传播媒介,我国主要是三带喙库蚊。

D.2.2 宿主及传染源

主要传染源是家畜,其中猪是导致人感染最重要的传染源。猪感染乙脑病毒后3d~5d内有病毒血症,此时蚊虫吸血后可带毒,人被携带乙脑病毒的蚊子叮咬而感染。

蚊虫既是本病的传播媒介,也是病毒的贮存宿主;野生动物和野鸟是自然疫源地的贮存宿主。

D.2.3 人群易感性

人群对乙脑病毒普遍易感,人被感染后,绝大部分呈隐性或亚临床感染,仅有少数出现典型乙脑症状;感染后获得持久性免疫力。

D.2.4 流行病学特征

乙脑发病以儿童为主,由于儿童预防接种的普及,近年来,发病年龄有上升趋势。我国绝大多数省、自治区、直辖市均有乙脑的流行;流行主要集中在蚊虫叮咬季节。