



中华人民共和国卫生行业标准

WS 214—2001

流行性乙型脑炎诊断标准及处理原则

Diagnostic criteria and principles of
management of japanese B encephalitis

2001-11-23 发布

2002-05-01 实施

中华人民共和国卫生部 发布

目 次

前言	I
1 范围	1
2 诊断原则	1
3 诊断标准	1
4 处理原则	1
附录 A(标准的附录) 实验诊断方法	3
附录 B(提示的附录) 间接法 ELISA 查乙脑 IgG 抗体	6

前 言

流行性乙型脑炎是由乙型脑炎病毒经蚊虫媒介而引起的中枢神经系统损伤的急性传染病,是一种人畜共患的自然疫源性疾病。人感染乙型脑炎病毒后大多数表现为亚临床型感染,约1‰(或更少)的感染者有典型的脑炎症状。我国是流行性乙型脑炎的流行区,除西藏、青海、新疆等少数地区外,全国都有发病报告。河南、湖南、湖北、贵州、江西、广东、广西都是较重的流行地区。目前已有疫苗可供预防,但无特异性有效的治疗方法,《中华人民共和国传染病防治法》中将流行性乙型脑炎列为乙类传染病管理。为更好地指导防治工作,特制定本标准。

本标准的附录 A 是标准的附录。

本标准的附录 B 是提示的附录。

本标准由卫生部疾病控制司提出。

本标准起草单位:中国预防医学科学院病毒学研究所、北京地坛医院。

本标准主要起草人:张礼璧、徐道振。

本标准由卫生部委托卫生部传染病监督管理办公室负责解释。

中华人民共和国卫生行业标准

流行性乙型脑炎诊断标准及处理原则

WS 214—2001

Diagnostic criteria and principles of
management of japanese B encephalitis

1 范围

本标准规定了流行性乙型脑炎(以下简称乙脑)的诊断标准和处理原则。

本标准适用于全国各级医疗、保健机构、卫生防疫机构对流行性乙型脑炎的诊断、报告和处理。

2 诊断原则

依流行病学史和症状体征、实验室检查、进行综合分析、作出临床诊断,确诊须依靠血清学或病原学检查。

3 诊断标准

3.1 流行病学

在乙脑流行地区居住,在蚊虫叮咬季节发病或发病前 25 d 内在蚊虫叮咬季节到过乙脑流行地区旅行。

3.2 症状体征

3.2.1 急性起病,发热头痛,喷射性呕吐,嗜睡,可伴有脑膜刺激症状。

3.2.2 急性起病,发热 2 d~3 d 后出现不同程度的意识障碍,如昏迷、惊厥、抽搐、肢体痉挛性麻痹等中枢神经症状,或发展至中枢性呼吸循环衰竭。

3.2.3 脑脊液:压力增高,呈非化脓性炎症改变〔外观清亮,蛋白轻度增高,糖与氯化物正常,白细胞增高,多在 $(50\sim 500)\times 10^6/L$,早期多核细胞为主,后期单核细胞为主〕。

3.2.4 一个月内未接种过乙脑疫苗者,血或脑脊液中抗乙脑 IgM 抗体阳性。

3.2.5 恢复期血清中抗乙脑 IgG 抗体或中和抗体滴度比急性期有 4 倍以上升高者,或急性期抗乙脑 IgG 抗体阴性,恢复期阳性者。

3.2.6 脑脊液、脑组织、血清分离乙脑病毒阳性(详见附录 A)。

3.3 病例分类

3.3.1 疑似病例 3.1 加 3.2.1 或 3.2.2。

3.3.2 临床诊断病例 疑似病例加 3.2.3。

3.3.3 确诊病例 临床诊断病例加 3.2.4 或 3.2.5 或 3.2.6。

4 处理原则

4.1 治疗

目前无特效抗病毒药物,主要以对症、支持、综合治疗为主。

4.1.1 乙脑病人室内防蚊、灭蚊,精心护理和监护病人,密切观察病情变化。

- 4.1.2 对症治疗,用物理和药物控制体温于 38℃左右,抗惊厥、抗抽搐、抗脑水肿,保持呼吸道通畅,有呼吸衰竭时及早气管切开,必要时应用人工呼吸机。
- 4.1.3 昏迷病人以鼻饲高热量多维生素的营养性流食,保持水和电解质平衡。
- 4.1.4 预防继发感染,早期发现感染早期治疗。
- 4.1.5 恢复期有神经肌肉的遗留症状者,加强主动、被动运动或针灸或物理康复治疗。
- 4.1.6 有条件者必要时可应用高压氧舱治疗。
- 4.2 预防
- 4.2.1 防蚊和灭蚊。
- 4.2.2 乙型脑炎疫苗的预防注射。

附录 A

(标准的附录)

实验诊断方法

A1 病原学诊断

从病人的脑组织、脑脊液或血液中查到流行性乙型脑炎病毒或抗原或特异性的核酸,即可作出病原学诊断。

A1.1 病毒分离

A1.1.1 标本的收集

收集病毒血症期的血液或发病早期的脑脊液进行病毒分离,但阳性率不高。如取脑组织活检材料或尸检材料,病毒分离的成功率较高,但前者不易为病人所接受,后期只能用于死后诊断。其他组织如肝、脾、肾、淋巴结等很少被收集用于分离病毒。

A1.1.2 标本的处理

血液标本可无菌法用玻璃珠去纤维蛋白或加肝素等防凝后,直接接种于敏感动物或鸡胚,或进行细胞培养,脑脊液可以直接接种。脑组织可加无菌 10% 脱脂奶或生理盐水,研磨成匀浆,经 1 500 r/min 30 min 离心沉淀,取上清液接种动物或细胞。为防止细菌污染,可于研磨匀浆过程中加入 1 000 U/mL 的青霉素和 1 000 μ g/mL 的链霉素。

A1.1.3 常用的敏感动物和鸡胚

分离流行性乙型脑炎常用的敏感动物为三周龄的小白鼠或乳鼠(1~3 日龄),每鼠脑内接种标 0.03 mL/三周鼠(0.01 mL/乳鼠),3 d~21 d 期间出现毛耸、弓背、肢体麻痹等发病者为可能阳性,再进一步鉴定分离的病毒。如接种标本的小鼠 21 d 内不发病则宜将小鼠脑组织研磨成 10% 悬液,1 500 r/min 离心 30 min 后取上清液再作盲传接种,接种新的小鼠或细胞的培养,盲传三代阴性者作为分离病毒阴性。鸡胚对乙型脑炎病毒敏感,将标本注射于 7~9 日龄鸡胚的脑或(和)绒毛尿囊膜,放 37℃ 孵育,2 d~5 d 后如鸡胚发生死亡,取鸡胚或绒毛尿囊膜即可用于作乙脑病毒的鉴定(鸡胚分离病毒目前已经较少使用)。

A1.1.4 常用的敏感细胞

流行性乙型脑炎病毒对许多种体外培养的细胞敏感,可用于分离病毒,常用的有鸡胚纤维母细胞、人胚肾细胞、人胚肺细胞、猪肾、地鼠肾、猴肾细胞,受感染的细胞能出现明显的细胞病变。蚊传代细胞 C₆/36 株乳地鼠肾 BHK₂₁ 株或猴肾 Vero 传代株细胞对乙型脑炎病毒敏感。

A1.2 病毒鉴定

用中和试验进行鉴定,如病毒的感染力能被抗乙型脑炎免疫血清中和,则可定为乙型脑炎病毒,方法见 A2.1。

A2 血清学诊断方法

A2.1 中和试验

A2.1.1 原理

中和抗体与病毒相结合,能改变病毒表面的构形,使病毒不能与敏感细胞表面的受体相结合,不能使敏感细胞发生病毒感染而产生细胞病变。中和试验以测定病毒的感染力为基础,必须在敏感的动物或细胞中进行,病毒与中和抗体之间,具有质和量的相关性。乙型脑炎病毒只能被抗乙脑中和抗体所中和,抗体量的多少决定病毒被中和的完全程度。因此,中和试验可用于鉴定病毒,亦可用于测定抗体,中和抗体滴度的高低与机体抗病毒的免疫力呈正相关。

A2.1.2 固定病毒用量——稀释血清法

A2.1.2.1 病毒

先在敏感细胞或动物中测定病毒的 50% 致细胞病变量 (TCID₅₀) 或动物的半数致死量 (LD₅₀), 用于固定病毒-稀释血清中和试验的病毒用量, 为 100TCID₅₀/0.1 mL, 允许范围为 32~320TCID₅₀。

A2.1.2.2 灭活血清

将血清标本加等量 Hank's 液后于 56℃, 30 min 灭活。

A2.1.2.3 准备生长成片, 形态良好的细胞管若干支。

操作步骤:

a) 将已灭活的血清用 Hank's 液作连续 2 倍的稀释, 即 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 每稀释度的量按接种试管数的需要而定, 如每一稀释度接种 0.1 mL, 则需配 0.5 mL, 实际需用 0.4 mL。

b) 取 100TCID₅₀/0.1 mL 浓度的病毒分别与一系列稀释的血清等量相加, 充分摇匀, 放 37℃ 水箱作用 1 h, 其间摇匀 2~3 次。

c) 取出上述病毒与血清混悬液, 每一稀释度接种 4 管, 每管 0.2 mL, 补充维持液至 1 mL。

d) 另设同批病毒毒力滴度对照, 选择 10⁻⁴~10⁻⁸ 的病毒, 每稀释度接种 4 管, 每管 0.1 mL 于同批细胞管并补充维持液至 1 mL。

e) 另取同批细胞管 4 支, 加 1 mL 维持液作为正常细胞对照。

f) 所有上述细胞管明确标签后, 塞紧橡皮塞放 37℃ 培养, 逐日观察并记录结果, 一般需观察 7 d~14 d。

根据细胞病变情况按式 (1)、(2) 计算中和抗体的效价, 见式 (A1)、(A2)。

表 A1 50% 血清中和终点的计算

血清稀释度	细胞病变管/总管数	细胞病变分布		累 计		比数	百分比 %
		(+)管	(-)管	(+) ↓	(-) ↑		
1:4(10 ^{-0.6})	0/4	0	4	0	16	0/16	0
1:8(10 ^{-0.9})	0/4	0	4	0	12	0/12	0
1:16(10 ^{-1.2})	0/4	0	4	0	8	0/8	0
1:32(10 ^{-1.5})	1/4	1	3	1	4	1/5	20
1:64(10 ^{-1.8})	3/4	3	1	4	1	4/5	80
1:128(10 ^{-2.1})	4/4	4	0	8	0	8/8	100

$$A = \frac{50\% - X_1}{X_2 - X_1} \dots\dots\dots (A1)$$

$$\lg Y_1 = \lg K_1 + A \cdot \lg K_2 \dots\dots\dots (A2)$$

式中: A——距离比例;

X₁——低于 50% 的病变率;

X₂——高于 50% 的病变率;

Y₁——血清的中和效价;

K₁——低于 50% 病变率的血清的稀释度;

K₂——稀释系数。

A2.1.3 固定血清——稀释病毒法

A2.1.3.1 病毒、血清和小鼠的准备

A2.1.3.1.1 无菌法取发病濒死的小鼠脑组织, 称重, 加稀释液 (10% 脱脂奶或缓冲液) 配成 2×10⁻¹ 悬液 (即每克脑组织加 4 mL 液), 研磨后 3 000 r/min 离心 20 min, 取上悬液备用。

A2.1.3.1.2 无菌法取血,待凝固后 1 500 r/min 低速离心 15 min,分离血清,56℃ 30 min 灭活处理。

A2.1.3.1.3 三周龄(7~9 g)健康小鼠若干只。

A2.1.3.2 操作步骤

A2.1.3.2.1 无菌法将 2×10^{-1} 病毒悬液连续 10 倍稀释,即 2×10^{-2} , 2×10^{-3} ……,方法基本同上。

A2.1.3.2.2 取若干支无菌试管组成方阵排列,每排由 5~6 管组成。每排加一种待测血清,第二排加另一份待测血清……每管加血清量为 0.1 mL,最后一排加 0.1 mL 稀释液作为病毒对照组。

A2.1.3.2.3 分别于每管中加入等量不同稀释度的病毒悬液,0.1 mL/管,摇匀后放 37℃ 1 h。稀释度的选择,以最高稀释度要求动物全活,最低稀释度动物全死为适度。

A2.1.3.2.4 用无菌注射器吸取病毒-血清混合液,注射于小鼠脑内,0.03 mL/鼠,每稀释度注射 5 只,养于同一鼠罐内。

A2.1.3.2.5 逐日观察动物死亡情况,观察时间根据病毒和接种途径而定。乙脑病毒脑内接种一般观察 14 d。

A2.1.3.3 中和指数的计算

Reed 和 Muench 方法分别计算对照组动物半数致死量(LD_{50})和加免疫血清中和组的 LD_{50} (LD_{50} 计算见式(A3)、(A4))。

表 A2 LD_{50} 的计算

病毒 稀释度	接种 鼠数	活鼠 数	死鼠 数	积累总计		死亡 比	死亡率 (%)
				活鼠 ↓	死鼠 ↑		
10^{-4}	5	0	5	0	15	15/15	100
10^{-5}	5	0	5	0	10	10/10	100
10^{-6}	5	1	4	1	5	5/6	83
10^{-7}	5	4	1	5	1	1/6	17
10^{-8}	5	5	0	10	0	0/10	0

$$A = \frac{X_3 - 50}{X_3 - X_4} \dots\dots\dots (A3)$$

$$Y_2 = \lg K_3 + A \lg K_2 \dots\dots\dots (A4)$$

式中: A——距离比例;

X_3 ——高于 50% 的死亡百分数;

X_4 ——低于 50% 的死亡百分数;

Y_2 ——病毒的 LD_{50} ;

K_3 ——高于 50% 死亡率的稀释度;

K_2 ——稀释系数。

A2.1.3.4 结果判定:固定血清稀释病毒者,当中和指数大于 50,表示未知血清有中和抗体,10~49 属可疑,小于 10 表示无中和能力。

A2.1.4 微量法中和试验

(1) 微量法中和试验即采用固定病毒-稀释抗体法(见 A2.1.2),所不同之处是在 40 孔或 96 孔塑料板中培养的细胞中进行,以一孔代替一试管。

(2) 病毒和血清的用量改为各加 0.025 mL。

(3) 塑料板上的细胞加盖后放在 5% 的二氧化碳 37℃ 的孵箱中培养,其简明流程如下:

0.025 mL 病毒悬液(含 100 TCID₅₀ 病毒量)+0.025 mL 待测血清 35~37℃ 1 h 结合,其间振荡 2~3 次,在充分结合后,再在每一小孔中加入 0.05 细胞悬液(pH7.2~7.4,细胞量约为 1×10^4 /0.1 mL)加盖后放入 37℃ 含 5% 的 CO₂ 孵箱中静置培养,逐日观察细胞病变并记录结果,观察 7 天或更长,其中和

抗体效价的记算方法同 A2.1.2。

A2.2 捕捉法 ELISA 查乙脑 IgM 抗体

A2.2.1 原理

乙型脑炎病毒感染后机体的最早的免疫应答反应是产生 IgM 抗体,由于乙脑的潜伏期为 4 d~21 d,平均为 10 d~14 d。故一旦出现神经系统的症状,从血中或脑脊液中就可能查到特异性的 IgM 抗体。一般 IgM 抗体持续存在一个月左右,查到 IgM 抗体,尤其是在脑脊液中查到 IgM 抗体,结合症状就可以诊断乙型脑炎。捕捉法 ELISA 试验,即利用包被在聚苯乙烯塑料板上的抗人 IgM 抗体,捕捉感染者标本中的 IgM 抗体,又利用乙脑抗原与 IgM 抗体的特异性结合,再用酶标抗乙脑抗体,检测已结合于 IgM 抗体的乙脑抗原,方法特异敏感出结果快速,适用于早期快速诊断。

A2.2.2 步骤

A2.2.2.1 将 40 孔或 96 孔塑料板的每孔用羊抗人 IgM μ 链抗体包被,每孔 100 μ L,37℃水浴 2 h 后 4℃过夜,次日甩干。

A2.2.2.2 10%的正常牛血清或 1%牛血清白蛋白生理盐水每孔 150 μ L 37℃封闭 1 h 后倒去此液体。

A2.2.2.3 按每孔 100 μ L 量分别加 1:100 稀释的待测血清(或 1:1 的脑脊液)37℃1.5 h,倒去血清后用含吐温-20 的生理盐水洗液洗三次,再甩干。

A2.2.2.4 在加血清(或脑脊液)的孔内分别加 100 μ L 乙型脑炎抗原于二个孔,加正常对照抗原于另二孔,37℃作用 3 h(或 4℃过夜),用洗液洗三次,再甩干。

A2.2.2.5 每孔中加入 100 μ L 标本的兔抗乙脑血清,37℃1 h 后,洗三次甩干。

A2.2.2.6 加羊抗兔 IgG 血清——辣根过氧化酶结合物 100 μ L/孔,37℃1 h 后用洗液洗三次,甩干。

A2.2.2.7 每孔加邻苯二胺 过氧化氢底物 100 μ L/孔 37℃作用待对照抗原孔开始显色的瞬间(一般 2~10 min)立即加 2M H_2SO_4 液 50 μ L 终止反应。

A2.2.2.8 测每一孔的 OD 值。

A2.2.2.9 按式(A5)判断结果

$$M_1 = \frac{N_1 - N_0}{N_2 - N_0} \geq 2.1 \quad \dots\dots\dots (A5)$$

式中: M_1 —— M_1 大于 2.1 者判为阳性;

N_1 ——标本+乙脑抗原孔的 OD 值;

N_0 ——空白孔 OD 值;

N_2 ——标本+正常抗原对照孔的 OD 值。

附 录 B

(提示的附录)

间接法 ELISA 查乙脑 IgG 抗体

B1 原理

利用包被在塑料孔中的乙型脑炎抗原去吸附人的抗乙型脑炎抗体,再用兔抗人 IgG 的酶标记物和酶的显色剂去检出有无人 IgG 被抗原吸附,从而测得抗乙脑 IgG 抗体的存在。所用的包被抗原成份不同,所检测的都是与之相对应的抗体,一般用乙脑的全病毒抗原作检测,故它测出的不但有中和抗体,而且还有乙脑的非中和抗体。

B1.1 操作步骤

B1.1.1 将乙脑抗原和正常对照抗原定量后分别包被于 40 孔(或 96 孔)塑料板的单数和双数孔中,每孔用量为 100 μ L 37℃包被 2 h 或 4℃过夜。

B1.1.2 倒去抗原(或正常抗原)用洗液洗三次,甩干后,每孔中加 10%牛血清或 1%牛血清白蛋白生理盐水液 150 μL , 37℃封闭 1~2 h,甩干后再加入已作倍比稀释的血清,(一般为 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1 600, 1:6 400, 1:12 800……,为节省试剂也可用 4 倍系列稀释)于不同孔中,每孔 100 μL ,同一稀释度的血清分别加到一个包被抗原孔和一个包被正常对照抗原孔,37℃作用 2 h。

B1.1.3 倒去血清标本后,用洗液洗三次,甩干。再加入抗人 IgG——辣根过氧化物酶标抗体,每孔 100 μL , 37℃反应 1 h。

B1.1.4 倒去标酶的抗人 IgG,洗三次,甩干后加入磷苯二胺,每孔 100 μL , 37℃反应 2~10 min,待对照抗原开始将要显色时(一般 10 min 或更短)立即在所有各孔加入 50 μL 2 mol/L H_2SO_4 液终止反应。

B1.1.5 测各孔的 OD 值,见式(B1)。

$$M_2 = \frac{N_3 - N_0}{N_4 - N_0} \geq 2.1 \quad \dots\dots\dots (\text{B1})$$

式中: M_2 —— M_2 大于 2.1 者为 2.1;

N_3 ——病毒抗原孔 OD 值;

N_0 ——空白孔 OD 值;

N_4 ——正常对照抗原孔 OD 值。

最大稀释度的孔的比值出现 ≥ 2.1 时则其血清稀释度的倒数即为这一血清的抗体滴度,如 1:400 稀释者 ≥ 2.1 , 1:800 < 2.0,则此血清的抗体效价为 400。