

## 附件 4:

# 全国肾综合征出血热监测方案

(试行)

## 一、概述

肾综合征出血热(以下简称出血热)是由汉坦病毒引起的一种自然疫源性疾病,是《中华人民共和国传染病防治法》规定的乙类传染病。鼠类为其自然宿主和主要传染源。根据我国出血热的主要传染源种类不同,本病可分为姬鼠型和家鼠型两种主要类型,其中黑线姬鼠为姬鼠型出血热的主要宿主动物和传染源;褐家鼠为家鼠型出血热的主要宿主动物和传染源。通过多年研究,已经基本明确了我国存在姬鼠型、家鼠型和家鼠姬鼠混合型 3 种疫区,此外,近年来在我国还发现了以棕背鼠为主要宿主动物的普马拉型汉坦病毒。

世界上已有 30 多个国家发现肾综合征出血热,主要分布在欧亚大陆,其中发病最多的为中国、俄罗斯、朝鲜、芬兰、瑞典、挪威、波兰等。

我国每年肾综合征出血热发病人数占世界报道的汉坦病毒感染病例的 90% 以上,是受汉坦病毒危害最为严重的国家。我国大陆的 31 个省、市、自治区均有病例发生,台湾也有汉坦病毒感染病例报告。我国年发病数最高曾超过 11 万,近十年来我国年报告发病人数一直在 2~5 万左右,新疫区不断出现,并时有暴发流行,老疫区的类型也有所变化。近年来个别省份出血热发病率明显升高,形势不容乐观。出血热病例以农村青壮年人群为主,不仅对人民身体健康和生命安全造成危害,而且对社会经济发展造成严重影响,已经成为一个重要的公共卫生问题。因此,在全国系统地开展出血热的流行病学和病原学监测,了解我国出血热的疫情动态和流行规律,了解宿主动物情况和病原分布,分析其流行因素,对于全国出血热的预防控制工作至关重要。

## 二、监测目的

- (一) 了解我国出血热的疫情动态和流行规律。
- (二) 了解我国出血热的主要宿主动物密度、构成和感染情况。
- (三) 了解我国出血热流行毒株的型别、分布及变异等情况。
- (四) 为分析出血热流行趋势和制定相应的防治对策提供科学依据。

## 三、监测病例定义

### （一）诊断原则

根据患者的流行病学史、临床表现及实验室检查结果进行综合判断。

### （二）诊断标准

#### 1. 流行病学史

在出血热疫区及流行季节，或发病前两个月内有疫区旅居史，或发病前两个月内有与鼠类或其排泄物（尿、粪）/分泌物（唾液）直接或间接接触史。

#### 2. 临床表现

2.1 早期症状和体征：起病急，发冷，发热（38℃以上）；

2.2 全身酸痛，乏力，呈衰竭状；

2.3 头痛，眼眶痛，腰痛（三痛）；

2.4 面、颈、上胸部充血潮红（三红），呈酒醉貌；

2.5 眼睑浮肿、结膜充血，水肿，有点状或片状出血；

2.6 上腭粘膜呈网状充血，点状出血；

2.7 腋下皮肤有线状或簇状排列的出血点；

2.8 束臂试验阳性。

#### 3. 病程经过

典型病例有发热期、低血压期、少尿期、多尿期和恢复期五期经过。前三期可有重叠，并存在有大量五期不全的异型或轻型非典型病例。

#### 4. 实验室检查

##### 4.1 血检查

早期白细胞数低或正常，3~4病日后明显增多，杆状核细胞增多，出现较多的异型淋巴细胞；血小板明显减少。

##### 4.2 尿检查

尿蛋白阳性，并迅速加重，伴显微血尿、管型尿。

4.3 血清特异性 IgM 抗体阳性（见附件 1、2）。

4.4 恢复期血清特异性 IgG 抗体比急性期有 4 倍以上增高（见附件 3、4）。

4.5 从病人血清中分离到汉坦病毒和/或检出汉坦病毒 RNA（见附件 5、6）。

#### 5. 病例分类

5.1 疑似病例：具备 1、2.1、2.2 和 2.3~2.8 之一以上者；或虽无明确流行病学史但临床症状典型者。

5.2 临床诊断病例：疑似病例加 3、4.1、4.2。

5.3 实验室确诊病例：临床诊断病例加 4.3、4.4、4.5 中的任一项。

#### 四、监测内容

##### (一) 全国常规监测

##### 1. 病例的发现和报告

按照《中华人民共和国传染病防治法》和《突发公共卫生事件与传染病疫情监测信息报告管理办法》，各级各类医疗机构、疾病预防控制机构、卫生检疫机构执行职务的医务人员发现疑似、临床诊断或实验室确诊病例，城镇应于 6 小时内、农村应于 12 小时内通过传染病疫情监测系统进行网络直报。不具备网络直报条件的应在诊断后 24 小时内向相应单位送（寄）出传染病报告卡，县级疾病预防控制中心和具备条件的乡镇卫生院收到传染病报告卡后立即进行网络直报。

##### 2. 个案调查

各省对所报告的出血热临床诊断病例和实验室确诊病例抽样进行个案调查（出血热个案调查表见附表 1），年报告病例数在 1000 例以上的省至少抽样 100 例进行调查，病例数少于 1000 例的省至少抽样 50 例进行调查，病例数少于 50 例的省，则对全部病例进行调查。抽样调查的病例应至少分布在三个县。有条件的省可以对所有病例进行个案调查。

县级疾病预防控制中心于每月 10 日前将上一月个案调查表录入数据库，并逐级上报。省级疾病预防控制中心每月 20 日前将上一月出血热个案调查表数据库上报中国疾病预防控制中心。

##### 3. 血清学核实诊断

各省对抽查的临床诊断病例进行个案调查后采集急性期血清，用 MacELISA 或胶体金标记试纸条方法进行血清学核实诊断（见附件 1、2）。以省为单位，核实诊断数不得少于 50 例，如果病例数低于 50 例，则全部进行检测。血清学核实诊断结果及时录入个案调查表数据库。

##### 4. 病原学监测

##### (1) 核酸检测

各省采集 30~50 例发病 7 日内的急性期（发热期）患者血清，由省级疾病预防控制中心应用 RT-PCR 分型方法检测病毒核酸（见附件 6），如果病例数少于 30 例，则全部进行核酸检测。

##### (2) 病毒分离

有条件的省级疾病预防控制中心可采集急性期病人全血分离病毒（见附件

5), 并将阳性病毒分离物送中国疾病预防控制中心做进一步鉴定。

各省经 RT-PCR 分型方法发现姬鼠型和家鼠型以外型别的汉坦病毒, 将原始标本送中国疾病预防控制中心进行病毒分离和鉴定。

### (3) 序列测定

对分离到的病毒或 PCR 产物, 各省每年测定家鼠型和姬鼠型汉坦病毒的 M 和 S 片段全序列各 1 株, 并将测序结果报中国疾病预防控制中心。不具备序列测定条件的省份, 可将标本送中国疾病预防控制中心进行序列测定。

### (4) 结果的报告和反馈

省级疾病预防控制中心每年 7 月 15 日和次年 1 月 15 日将病原学监测结果表(包括核酸检测、病毒分离、序列测定)报中国疾病预防控制中心(见附表 4)。

中国疾病预防控制中心收到各省所送标本后, 两个月内将检测结果反馈给各省级疾病预防控制中心。

## 5. 暴发疫情调查与监测

### (1) 暴发疫情的报告

按照《中华人民共和国传染病防治法》和《突发公共卫生事件与传染病疫情监测信息报告管理办法》的规定, 各级各类医疗机构、疾病预防控制机构、卫生检疫机构执行职务的医务人员发现疑似、临床诊断或实验室确诊病例, 城镇应于 6 小时内、农村应于 12 小时内通过传染病疫情监测系统进行网络直报。如果暴发疫情达到《全国突发公共卫生事件应急预案》规定的级别, 则按相应要求同时通过《突发公共卫生事件报告管理信息系统》报告。县级疾病预防控制中心接到暴发疫情后, 应立即报告县卫生行政部门和逐级报告上级疾病预防控制机构。

### (2) 暴发疫情的调查

暴发疫情的调查由县级卫生行政部门组织, 县级疾病预防控制机构具体实施。县级疾病预防控制机构接到疫情报告后, 应在 24 小时内到达现场开展调查。

#### 1) 核实诊断

①病例核实: 对报告的病例逐个进行详细的个案调查, 并进行血清学或病原学检测。

②疫情核实: 了解暴发点近期有无类似病例发生, 并对发现的可疑病例进行个案调查, 了解三间分布情况。对所有病人进行血清学或病原学检测。

#### 2) 基本情况调查

①详细调查暴发点的人口资料、患者及居民居住环境、自然地理景观、气象

资料等流行因素。

②了解暴发点所在地的既往疫情情况和流行强度。

③了解暴发点所在地出血热宿主动物的种类、分布、密度及感染情况。

### 3) 宿主动物调查

在暴发点的居民区（患者居住地及周围）和野外进行宿主动物种类、密度调查，捕获数量各不少于 50 只，对捕获的宿主动物进行感染状况调查。

### 4) 人群感染状况调查

采集暴发点内高危人群血标本 50~100 份，用免疫荧光法或 ELISA 法进行抗体水平的检测（见附件 3、4），了解人群感染状况。

## （3）控制措施

在暴发疫情核实后，立即对暴发点采取灭鼠防鼠、预防接种等综合性防控措施。

1) 灭鼠：按照卫生部出血热防治工作的有关要求进行灭鼠。灭鼠 3 周后的鼠密度室内应达到 1% 以下、室外 3% 以下。

2) 应急预防接种：对暴发点内的高危人群实施应急预防接种，接种率应达 80% 以上，防止疫情蔓延。

3) 灭螨：对床铺草垫、地面、室外草丛、柴草堆等处采用药物灭螨。

4) 环境治理：大力开展爱国卫生运动，整治和改善环境卫生。

5) 健康教育：利用各种媒体及途径，在发生暴发的地区，开展出血热防病知识的宣传，增强群众防病和参与防治的意识。

## （4）总结

暴发疫情处理后，及时收集、整理、统计、分析调查资料，在疫情处理结束后 7 日内，写出详细的暴发调查报告，逐级上报至中国疾病预防控制中心。同时，将个案调查表录入数据库，一并上报。

## （二）监测点的监测

以县为单位，建立国家级监测点，开展人间疫情和宿主动物监测。

### 1. 国家级监测点选择原则

（1）近三年出血热发病水平居全国前列的省；

（2）多数监测点近三年的出血热发病率达到高发或中发水平，同时兼顾低发地区；

（3）监测点能够代表我国疫区和疫源地主要类型；

(4) 监测点具有一定的出血热工作基础，能够承担并完成监测任务；

(5) 各省可结合原有国家级监测点进行选择；

(6) 国家根据疫情变化情况，将适时调整监测点。

根据国家级监测点选择原则，将国家级监测点设置如下（共 22 个省 39 个监测点）：

辽宁（5）：沈阳市（于洪区），本溪市（本溪县），丹东市（凤城市），锦州市（凌海市），鞍山市（海城市）；

黑龙江（4）：黑河市（嫩江县），齐齐哈尔市（讷河市），鸡西市（虎林市），牡丹江市（宁安市）；

山东（4）：济南市（章丘县），青岛市（胶南县），潍坊市（青州市），临沂市（莒南县）；

河北（4）：唐山市（滦县），石家庄市（辛集市），保定市（定州市），沧州市（献县）；

吉林（4）：延边州（琿春市），白山市（抚松县），长春市（双阳区），吉林市（磐石县）；

陕西（2）：西安市（户县），宝鸡市（眉县）；

浙江（1）：台州市（天台县）；

河南（1）：驻马店市（确山县）；

湖南（1）：长沙市（宁乡县）；

内蒙古（1）：呼伦贝尔盟（莫力达瓦旗）；

四川（1）：凉山彝族自治州（盐源县）；

江苏（1）：连云港市（赣榆县）；

江西（1）：宜春市（高安）；

湖北（1）：宜昌市（当阳市）；

安徽（1）：阜阳市（颍州区）；

天津（1）：天津市（南开区）；

贵州（1）：遵义市（遵义县）；

山西（1）：太原市（尖草坪区）；

北京（1）：北京市；

甘肃（1）：平凉市（华亭县）；

云南（1）：红河州（泸西县）；

宁夏(1): 固原市(泾源县)。

## 2. 监测内容

(1) 常规疫情和暴发疫情监测同全国常规监测,同时对辖区内医疗机构报告的出血热疑似病例、临床诊断病例和实验室确诊病例全部进行个案调查。

县级(或市级)疾病预防控制机构每月10日前将上月个案调查表录入数据库,并逐级汇总上报。各省级疾病预防控制中心每月20日前上报中国疾病预防控制中心。

### (2) 血清学核实诊断

对监测点报告的出血热临床诊断病例,按照不低于80%的比例采集急性期血清标本,少于50例的全部采集,由各省级疾病预防控制中心或有条件的县级(市级)疾病预防控制机构应用MacELISA或胶体金标记试纸条方法进行血清学核实诊断(见附件1、2)检测,进行核实诊断。并将血清学核实诊断结果立即录入个案调查表数据库。

### (3) 病例的病原学监测

采集急性期患者的全血进行PCR、病毒分离、核苷酸序列测定和交叉中和实验,分析流行型别(见附件5、6)。

#### 1) 核酸检测

MacELISA法或胶体金标记试纸条方法核实诊断阳性的病例,由省级疾病预防控制中心采用RT-PCR进行核酸检测。每个监测点的抽样数不少于20例,如果监测点病例数低于20例,全部检测。

#### 2) 病毒分离

各监测点每年采集一定数量的急性期病例全血送省级疾病预防控制中心进行病毒分离。各省每年从血清中分离汉坦病毒2株,混合型疫区分离姬鼠型和家鼠型各1株。阳性病毒分离物送中国疾病预防控制中心进一步鉴定。

#### 3) 序列测定

各省级疾病预防控制中心对分离到的病毒和阳性PCR产物进行M和S片段序列测定,并将测序结果报中国疾病预防控制中心。不具备序列测定条件的省份,可将标本送中国疾病预防控制中心进行序列测定。

#### 4) 血清分型

各监测点每年采集20份实验室确诊病例恢复期血清送省级疾病预防控制中心,进行交叉中和实验(附件7),进行血清学分型。不具备条件的省份,可将标

本送中国疾病预防控制中心进行血清分型。

#### 5) 结果的报告和反馈

各省级疾病预防控制中心每年7月15日和次年1月15日将病原学监测结果(包括核酸检测、病毒分离、序列测定)报中国疾病预防控制中心(见附表4)。

中国疾病预防控制中心收到各省所送标本后,两个月内将检测结果反馈给各省级疾病预防控制中心。

#### (4) 宿主动物监测

以县(区)为单位,逐步查清居民区及野外宿主动物种类、分布、密度、感染率和所带病毒的型别及变异情况(见附表2、3、4)。

未设国家级监测点的地区可参照以下内容进行宿主动物监测。

##### 1) 鼠密度的监测

###### ① 调查点的选择

根据监测点的疫情分布情况和地理景观选择调查地点。农村居民区应选择有代表性的、既往有出血热病人发生的自然村;在调查自然村外500米半径范围内,进行野外鼠密度调查,应选在河流、水渠、道路两旁、田埂、坟地和场院等可能有鼠类栖息活动的地方。

###### ② 监测时间

每年3~4月和9~10月各一次,分别在农村居民区和野外同时进行监测。各省可根据具体情况适当调整监测时间。

###### ③ 捕鼠方法

按出血热鼠密度监测有关规定方法进行。

###### ④ 分类鉴定

记录捕获的宿主动物名称应写学名,其名称和鉴定方法、标准参考《医学动物分类鉴定》、《肾综合征出血热监测及疫苗应用研究》附录部分(陈化新,罗成旺主编,2001年香港医药出版社)。

##### 2) 鼠感染率调查

各监测点,每次分别在居民区和野外各捕鼠50只以上,进行血清学和病原学检测,计算感染率。

###### ① 鼠标本的采集

取分类鉴定的鼠,无菌解剖,取鼠肺,放入编号的冷冻塑料管内,封口,放入液氮罐内保存。在取鼠肺的同时,用滤纸条(5cm×1cm)沾取鼠血,阴干后

用塑料袋包好放入液氮罐。

罐中保存。

上述标本带到实验室后，应及时放到超低温或低温冰箱内保存，或尽快分装检测。

#### ②鼠肺抗原和血清抗体检测

各省级疾病预防控制中心应用免疫荧光法检测鼠肺出血热病毒抗原，或用双抗原夹心 ELISA 检测鼠出血热抗体（见附件 8、9）。

#### ③结果报告

各省级疾病预防控制中心在完成捕鼠任务后，一个月内在将鼠密度和鼠感染情况监测结果（附表 2、3）报中国疾病预防控制中心。

### 3) 宿主动物的病原学监测

#### ①核酸检测

各省级疾病预防控制中心对免疫荧光阳性鼠肺标本，采用 RT-PCR 方法（见附件 6）进行核酸检测。

#### ②病毒分离

各监测点对采集的阳性鼠肺标本，送省级疾病预防控制中心进行病毒分离（见附件 5）。各省每年从鼠肺中分离汉坦病毒 2 株，混合型疫区分离姬鼠型和家鼠型各 1 株，阳性病毒分离物送中国疾病预防控制中心进一步鉴定。

#### ③序列测定

各省级疾病预防控制中心对分离到的病毒和阳性 PCR 产物进行 M 和 S 片段序列测定，并将测序结果报中国疾病预防控制中心。不具备序列测定条件的省份，可将标本送中国疾病预防控制中心进行序列测定。

#### ④结果的报告和反馈

各省级疾病预防控制中心每年 7 月 15 日和次年 1 月 15 日将病原学监测结果（包括核酸检测、病毒分离、序列测定）报中国疾病预防控制中心（见附表 4）。

中国疾病预防控制中心收到各省所送标本后，两个月内将检测结果（不包括病毒分离）反馈给各省级疾病预防控制中心。

## 五、监测系统组成和职责

监测系统由卫生部、各级卫生行政部门、中国疾病预防控制中心及各级疾病预防控制中心组成。其职责分别为：

### （一）卫生部和各级卫生行政部门

卫生部领导全国出血热监测工作，各级卫生行政部门负责组织开展本辖区内出血热监测工作，并提供所需监测经费，保证监测工作的顺利开展。

## （二）中国疾病预防控制中心

1. 组织全国监测方案的起草、论证、修改和完善，为全国出血热监测提供技术指导。

2. 组织考察、确定全国监测点的布局，与国家级监测点所在省级疾病预防控制中心签订协议，明确具体任务和目标，为国家级监测点提供一定监测经费补助。

3. 组织对全国省级疾病预防控制中心和国家级监测点专业技术人员的培训。

4. 负责全国监测数据的收集、整理，定期对监测系统的全部数据进行分析、反馈。

5. 为各省级疾病预防控制中心和国家级监测点提供相应的血清学诊断、检测试剂。

6. 负责完成本方案中规定的实验室工作。

7. 组织专家定期对全国出血热监测系统进行检查、考核。

8. 每年对全国出血热监测系统进行年度工作总结，组织召开全国年度工作总结研讨会。

## （三）省级疾病预防控制中心

1. 根据国家监测方案，结合本省实际情况制定本省监测实施方案；协组国家疾病预防控制中心确定本省国家级监测点，建立和完善本省的监测网络；

2. 负责本省监测专业技术人员培训工作；

3. 承担本省国家级监测点的管理、业务指导，参与国家 CDC 对国家级监测点的监测工作检查、考核。

4. 与本省国家级及省级监测点疾病预防控制机构签订协议，明确具体任务和目标，按其完成情况确定监测经费补助数额。

5. 完成国家监测方案中要求的病例抽查、血清学和病原学等监测任务。

6. 对全省监测资料进行收集、汇总和分析，按方案要求的时限上报中国疾病预防控制中心，并进行反馈。

7. 对监测点的监测工作进行质量控制。

## （四）市级疾病预防控制中心

根据国家监测方案的要求，协助省中心完成本地区监测点的监测任务和管理、业务指导；参与本地区监测点的监测工作。

#### （五）县级疾病预防控制中心

1. 按监测方案要求，及时、准确的对临床诊断病例进行个案调查，数据录入，按规定的时限上报省（市）疾病预防控制中心。负责病例标本的采集、检测、上送。

2. 承担宿主动物种群、密度的监测工作和宿主动物标本的采集，并及时将采集的标本送省级疾病预防控制中心进行检测。宿主动物监测完成后，在 15 内上报省疾病预防控制中心。

3. 负责暴发疫情的调查处理。

#### （六）监测点所在地医疗机构

在当地卫生行政部门的统一领导下，配合疾病预防控制中心的各项监测工作，负责完成门（就）诊和住院病例的标本采集，协助疾病预防控制中心开展病例个案调查。

### 六、数据收集、分析、反馈

#### （一）数据收集内容

1. 疫情报告卡
2. 个案调查表（见附表 1）
3. 暴发疫情调查处理报告
4. 宿主动物调查统计报表、宿主动物感染情况报表（见附表 2、3）
5. 实验室检测记录

#### （二）统计分析指标

1. 发病情况及趋势：发病数（例）、死亡数（例）、发病率（/10 万）、病死率（%）和死亡率（/10 万）。

2. 病例分布情况：病人年龄、性别、职业、时间、地理分布等。

3. 宿主动物种类、分布、密度、带毒情况。

4. 病毒分离及基因变异情况。

5. 疫源地分型：通过 RT-PCR 分型、对病毒基因的核苷酸序列测定以及血清学分型结果，进行疫源地分型和疫区类型演变过程分析。

#### （三）定期报告、反馈资料

1. 按照《中华人民共和国传染病防治法》，出血热为乙类法定管理传染病，发现出血热或疑似出血热疫情后，必须按照规定及时进行网上直报。疫情证实后，应通报相邻有关市县（区）乡镇。

2. 县级疾病预防控制机构每月 10 日前将前一月出血热个案调查表录入数据库，并逐级汇总上报。各省级疾病预防控制中心每月 20 日前上报中国疾病预防控制中心。

3. 血清学试验应随时进行，并将血清诊断结果立即录入个案调查表数据库。

4. 省级疾病预防控制中心每年 7 月 15 日和次年 1 月 15 日将病原学监测结果（包括核酸检测、病毒分离、序列测定）报中国疾病预防控制中心。

中国疾病预防控制中心收到各省所送标本后，两个月内将检测结果反馈给省级疾病预防控制中心。

5. 省级疾病预防控制中心在完成捕鼠任务后一个月内，将鼠密度和鼠感染情况监测结果（附表 2、3）报中国疾病预防控制中心。

6. 中国疾病预防控制中心每个月做监测简报反馈给各省。

## 七、监测系统质量控制指标

### （一）人员培训

每年对国家级监测点所在县有关业务人员进行 1 次培训，由中国疾病预防控制中心负责指导、各国家级监测点所在省疾病预防控制中心具体实施。

### （二）血清学试验的核实工作

省级疾病预防控制中心应对监测点所在县进行的血清学试验复核，至少抽样 30% 进行检查，若病例数低于 30，则需要全部核实，符合率不低于 90%。

### （三）病原学试验的核实工作

中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所对省级疾病预防控制中心所分离的汉坦病毒进行鉴定。至少抽样 30% 对分型工作进行核实，符合率不低于 90%。

### （四）技术资料档案管理，原始记录，总结等。

## 八、附件

附表 1 出血热个案调查表

附表 2 宿主动物调查统计报表

附表 3 宿主动物感染情况报表

附表 4 病原学检测结果一览表

附件 1 IgM 捕捉 ELISA 法（MacELISA）检测出血热 IgM 抗体

附件 2 IgM 捕获法胶体金标记试纸条快速检测 IgM 抗体

附件 3 免疫荧光法（IFA）检测人血清 IgG 抗体

- 附件 4 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测血清 IgG 抗体
- 附件 5 Vero E6 或 Vero 细胞分离汉坦病毒
- 附件 6 RT-PCR 检测汉坦病毒基因及分型
- 附件 7 交叉保护中和实验
- 附件 8 免疫荧光法检测鼠肺抗原
- 附件 9 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 双抗原夹心法检测血清总抗体

附表 1

## 出血热个案调查表

县(市)名称: \_\_\_\_\_ 国标码: □□□□□□ 病例编号: □□□□□□

## 一、基本情况

1. 患者姓名: \_\_\_\_\_ (如患者年龄<14岁, 则家长姓名: \_\_\_\_\_)
2. 性别: 1 男, 2 女
3. 年龄: \_\_\_\_\_ 岁
4. 民族: 1 汉族, 2 壮族, 3 维吾尔族, 4 其他少数民族 \_\_\_\_\_
5. 职业:
- (1) 幼托儿童 (2) 散居儿童 (3) 学生 (4) 教师 (5) 保育保姆 (6) 饮食从业人员  
(7) 商业服务 (8) 医务人员 (9) 工人 (10) 民工 (11) 农民 (12) 牧民  
(13) 渔(船)民 (14) 干部职员 (15) 离退人员 (16) 家务待业 (17) 其他
6. 所在单位: \_\_\_\_\_; 联系电话: \_\_\_\_\_
7. 家庭住址: \_\_\_\_\_省(自治区/直辖市) \_\_\_\_\_县(市区) \_\_\_\_\_乡(镇/居委会) \_\_\_\_\_村(街道)

## 二、发病情况

1. 发病日期: \_\_\_\_\_年\_\_\_\_\_月\_\_\_\_\_日 /□□/□□
2. 就诊日期: \_\_\_\_\_年\_\_\_\_\_月\_\_\_\_\_日 /□□/□□
3. 发病地点: \_\_\_\_\_
4. 住院医院: \_\_\_\_\_
5. 住院号: \_\_\_\_\_
6. 住院日期: \_\_\_\_\_年\_\_\_\_\_月\_\_\_\_\_日 /□□/□□
7. 出院日期: \_\_\_\_\_年\_\_\_\_\_月\_\_\_\_\_日 /□□/□□
8. 入院诊断:
- 1 出血热疑似病例, 2 临床诊断病例, 3 实验室确诊病例, 4 其他 \_\_\_\_\_
9. 临床诊断日期: \_\_\_\_\_年\_\_\_\_\_月\_\_\_\_\_日 /□□/□□
10. 出院诊断:
- 1 出血热疑似病例, 2 临床诊断病例, 3 实验室确诊病例, 4 其他 \_\_\_\_\_
11. 临床分型: 1 轻型, 2 中型, 3 重型, 4 危重型
12. 转归: 1 痊愈, 2 好转, 3 死亡(日期: \_\_\_\_\_年\_\_\_\_\_月\_\_\_\_\_日)

## 三、症状和体征及一般实验室检查

1. 起病急: 1 是, 0 否
2. 乏力: 1 有, 0 无
3. 发热: 1 有, 0 无

4. 头痛： 1 有， 0 无
5. 腰痛： 1 有， 0 无
6. 眼眶痛： 1 有， 0 无
7. 脸红： 1 有， 0 无
8. 颈红： 1 有， 0 无
9. 胸红： 1 有， 0 无
10. 关节痛： 1 有， 2 无
11. 全身痛： 1 有， 2 无
12. 腹痛： 1 有， 2 无
13. 腹泻： 1 有， 2 无
14. 便秘： 1 有， 2 无
15. 恶心： 1 有， 2 无
16. 呕吐： 1 有， 2 无
17. 结膜充血： 1 有， 2 无
18. 眼睑浮肿： 1 有， 2 无
19. 黄疸： 1 有， 2 无
20. 腋下/上臂/胸部或其它部位有无皮肤出血点： 1 有， 2 无   
如有，则出血点为： 1 散在， 2 条/线状， 3 簇状， 4 其它\_\_\_\_\_
21. 口腔、鼻腔等处粘膜有无出血点： 1 有， 2 无
22. 少尿或无尿： 1 有， 2 无
23. 低血压： 1 有， 2 无
24. 休克： 1 有， 2 无
25. 白细胞计数： 1 正常， 2 增多， 3 减少， 4 未做此项检查
26. 血小板减少： 1 有， 2 无， 3 未做此项检查
27. 尿蛋白： 1 阳性， 2 阴性， 3 未做此项检查， 4 不详
28. 有无尿膜状物/管型尿/血尿： 1 有， 2 无
29. 束臂试验： 1 阳性， 2 阴性， 3 未做此项检查， 4 不详
30. 出血时间： 1 正常， 2 延长， 3 缩短， 4 未做此项检查， 5 不详
31. 凝血时间： 1 正常， 2 延长， 3 缩短， 4 未做此项检查， 5 不详

#### 四、血清学及病原学检测结果（未做者请注明为“未做”）

项目		标本采集时间	检测方法	检测结果
出血热抗体	IgG			
	IgM			
汉坦病毒分离				

## 五、既往史及家庭情况

1. 既往是否患过此病： 1 是，0 否，9 不详   
如是，诊断单位：\_\_\_\_\_，时间：\_\_\_\_\_年\_\_\_月\_\_\_日     /
2. 食物、粮食有无防鼠设备： 1 有，0 无，9 不详
3. 流行性出血热疫苗预防接种史： 1 有，0 无，9 不详   
如有，最近一次接种时间：\_\_\_\_\_年\_\_\_月\_\_\_日     /
4. 有无家庭其他成员出现过类似症状： 1 有，0 无，9 不详   
如有，最近一例发病时间（患者除外）：\_\_\_年\_\_\_月\_\_\_日     /
5. 房内有鼠： 1 有，0 无
6. 院内有杂物、草堆等： 1 有，0 无

## 六、接触史及有关因素调查

1. 发病前 2 个月内是否有外出（或旅游）史： 1 是，2 否   
如是，到何地：\_\_\_\_\_；外出时间：\_\_\_天    
返回时间：\_\_\_年\_\_\_月\_\_\_日     /
2. 发病前 1 月内是否接触鼠类： 1 是，2 否，9 不详   
如为 1，接触方式：1 挖鼠洞，2 拿鼠，3 鼠咬，4 鼠尿，5 鼠粪，  
6 鼠血污染手 7 手被鼠夹打伤 8 其他\_\_\_\_\_
3. 发病前 1 月内是否有昆虫叮咬史： 1 是，2 否，9 不详
4. 发病前 1 月内是否吃过被鼠排泄物污染的食物： 1 是，2 否，9 不详
5. 发病前 1 月内是否在野外喝过沟（塘）水： 1 是，2 否，9 不详
6. 发病前 1 月内是否在鼠洞附近坐卧： 1 是，2 否，9 不详
7. 发病前 1 月内是否在场院禾草上坐卧： 1 是，2 否，9 不详
8. 发病前 1 月内是否在野外住宿： 1 是，2 否，9 不详   
如是，具体地点：\_\_\_\_\_；  
其附近有无鼠、鼠洞或鼠排泄物： 1 是，2 否，9 不详   
铺的类型： 1 床，2 土炕，3 地铺，4 其他\_\_\_\_\_
9. 工作场所有无鼠或鼠排泄物： 1 有，2 无，9 不详
10. 发病前 1 月内是否接触过出血热病人血/尿： 1 有，2 无，9 不详

（病例编号填写说明：年号（两位数）、流水号（后边三位））

调查日期：\_\_\_\_\_年\_\_\_月\_\_\_日

调查地点：\_\_\_\_\_

调查者：\_\_\_\_\_

附表 2

### 肾综合征出血热监测宿主动物调查统计报表

监测点名称: \_\_\_\_\_

监测点编号: □□□□□□

捕鼠时间: \_\_\_\_年\_\_\_\_月\_\_\_\_日

□□□□/□□/□□

捕鼠地点: 1 居民区, 2 野外 (A 田野, B 山林, C 草原, D 河堤, E 其他\_\_\_\_) □

收夹数: \_\_\_\_\_夹次

□□□

捕鼠总数: \_\_\_\_\_只

□□□

总鼠密度: \_\_\_\_\_%

□□

#### 主要鼠种及构成情况

鼠种	鼠数	构成 (%)	鼠种	鼠数	构成 (%)
黑线姬鼠					
褐家鼠					
大林姬鼠					
小家鼠					
黑线仓鼠					
大仓鼠					
黄毛鼠					
黄胸鼠					

填表时间: \_\_\_\_年\_\_\_\_月\_\_\_\_日

单位 (盖章): \_\_\_\_\_;

填表人: \_\_\_\_\_

附表3 肾综合征出血热监测宿主动物感染情况报表

监测点名称: \_\_\_\_\_ 监测点编号: □□□□□□  
 捕鼠时间: \_\_\_\_年\_\_月\_\_日 □□□□/□□/□□  
 捕鼠地点: 1 居民区, 2 野外(A 田野, B 山林, C 草原, D 河堤, E 其他\_\_\_\_\_ □  
 捕鼠总数: \_\_\_\_\_只 □□□  
 感染率: \_\_\_\_\_ % □□

主要鼠种及感染情况

鼠种	鼠数	抗原阳性数	抗原阳性率 (%)	抗体阳性数	抗体阳性率 (%)
黑线姬鼠					
褐家鼠					
大林姬鼠					
小家鼠					
大仓鼠					
黑线仓鼠					
黄毛鼠					
黄胸鼠					

填表时间: \_\_\_\_年\_\_月\_\_日  
 单位 (盖章): \_\_\_\_\_;  
 填表人: \_\_\_\_\_

附表 4

## 肾综合征出血热监测病原学检测结果一览表

监测点名称：\_\_\_\_\_

国标码：□□□□□□

病例编号	标本类型	采集日期	采集人	检测结果			型别	检测日期	检测人
				核酸检测	病毒分离	序列测定			

注：对于核酸检测中的序列测定，报送结果中应包括原始测序彩图文件和序列文件的电子版拷贝。

填表时间：\_\_\_\_\_年\_\_月\_\_日      单位（盖章）：\_\_\_\_\_；      填表人：\_\_\_\_\_

## 附件 1 IgM 捕捉 ELISA 法 (MacELISA) 检测出血热 IgM 抗体

本试剂盒系采用抗人  $\mu$  链捕获人血清 IgM 抗体, 加辣根过氧化物酶-病毒抗原标记物, 用以检测出血热特异性 IgM 抗体。具有较高的敏感性、特异性和重复性。特别适用于出血热的早期特异性诊断及其它实验性研究。本试剂盒为 96 人份/包装。

### 试验材料:

- (1) 抗人 IgM 抗体 ( $\mu$  链): 用 pH9.5 的包被液包被酶标板
- (2) 冻干阳性血清/冻干阴性血清 1 支, 0.2ml/支, 工作浓度为 1: 10;
- (3) 冻干辣根过氧化物酶-病毒抗原标记物 1 支, 0.5ml/支, 工作浓度为 1: 20;
- (4) 冻干小牛血清 1 支, 1ml/支;
- (5) 浓缩洗液 (10 倍浓缩) 1 瓶, 50ml; (标本稀释液为含 5%小牛血清原倍洗液);
- (6) A/B 显色液和终止液各 1 瓶。  
(冻干试剂先用相应量的去离子水溶解, 然后临用前根据所需按工作浓度稀释使用, 余下的放-20℃保存)
- (7) 终止液: 4N  $H_2SO_4$
- (8) 酶标仪。

### 检测步骤:

- (1) 将待检血清用稀释液 100 倍稀释, 加入已包被抗人  $\mu$  链抗体的酶标板一孔中, 100  $\mu$  l/孔, 同时加入已 1: 10 稀释的阳性血清/阴性血清对照各一孔, 100  $\mu$  l/孔, 置 37℃水浴孵育 1 小时。
- (2) 弃去血清, 用 PBS-T 漂洗 5 遍, 甩干。
- (3) 将冻干辣根过氧化物酶-病毒抗原标记物 1: 10 稀释后, 加入反应板相应孔内, 100  $\mu$  l/孔, 37℃水浴孵育 1 小时。
- (4) 弃去酶标抗体, 用洗涤液洗涤 6 次, 甩干。
- (5) 加显色液: 于各反应孔内加 A/B 液各一滴, 37℃, 避光 3~5 分钟。
- (6) 加终止液 (4NH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 于每反应孔, 一滴/孔。

### 结果判断:

(1) 目测方法:

阳性对照孔呈明显蓝色, 阴性对照孔呈无色, 对照成立; 若待检血清孔呈明显淡蓝色或深蓝色 (TMB), 则标本为出血热 IgM 抗体阳性, 反之阴性。

(2) 酶联免疫检测仪检测:

于 450nm (TMB) 阳性对照孔 OD 值/阴性对照孔 OD 值, 即  $P/N \geq 2.1$ , 对照成立; 若待检血清孔 OD 值与阴性对照孔 OD 比值  $\geq 2.1$ , 则标本为流行性出血热 IgM 抗体阳性, 反之阴性。

(阴性对照孔 OD 值小于 0.05 按 0.05 记, 若大于 0.05 按实际数值计算)

**意义:**

阳性结果, 表明患者新近汉坦病毒感染, 用于出血热早期诊断。

## 附件2 IgM 捕获法胶体金标记试纸条快速检测 IgM 抗体

### 适用对象:

本产品适用于人血清或血浆中出血热病毒 IgM 抗体的快速检测。

### 检测意义:

检测出血热病毒 IgM 抗体对于早期诊断出血热急性感染有重要指导意义。

### 储存条件和有效期:

室温或冰箱（4-30℃）密封保存，有效期 18 个月。

### 注意事项:

1. 仅供专业人士使用
2. 严格按照说明书操作
3. 有效期内使用，密封保存
4. 样品中的脂质、溶血及污染的样品有可能导致错误的结果

### 样品收集和保存:

采取静脉血于干净未加抗凝剂（若收集血浆则加入抗凝剂）的容器内，静置使血凝固，分离血清备检测，可于 4℃ 冰箱内保存 2 周；如不能及时检测可将血清置于冰箱内冷冻或冷藏。检测前复温并混匀。避免反复冻融标本。

### 操作步骤:

1. 如果试剂盒储存于 4℃ 冰箱，请将所有实验用试剂与器材取出并平衡至室温
2. 打开密封的铝箔袋，取出试剂盒，平放于水平桌面上，做好标记
3. 用滴管或加样器从盛有血清或血浆的试管中取 2-3 滴或 100 $\mu$ l-150 $\mu$ l 样品滴加于测试盒上的样品孔内，于 15 分钟内观察测试结果

### 结果判断:

阳性：可见质控线与实验线 2 条紫红色带

阴性：只有一条质控线出现

无效：如果未能观察到质控线出现，则无论是否有实验线显示，均为无效，应重新检测

注意：阳性结果最早 1~2 分钟即可显示出来，但阴性结果必须等到 15 分钟才可判定。

## 附件 3 免疫荧光法 (IFA) 检测人血清 IgG 抗体

### 试验材料:

- (1) 抗原片: 家鼠型和姬鼠型汉坦病毒标准毒株感染 Vero E6 或 Vero 细胞制备, 低温干燥保存;
- (2) 阳、阴性对照: 单克隆抗体或确诊阳性患者恢复期血清 (阳性对照)、阴性血清;
- (3) 羊抗人 (或兔抗人) IgG 荧光抗体;
- (4) 常用稀释液: pH7.2~7.4PBS、伊文思兰等;
- (5) 荧光显微镜。

### 检测步骤:

- (1) 用 pH7.4, 0.02mol/L PBS 稀释待检血清, 从 1:20 开始做 2 倍或 4 倍连续稀释至需要的稀释度。
- (2) 取出抗原片, 用蒸馏水漂洗后, 冷风吹干。
- (3) 用加样器依次从高稀释度到低稀释度逐个加入已稀释的待检血清, 加入量以覆盖细胞抗原面为准 (若为双份血清, 最好上排为急性期血清, 下排为恢复期血清), 在 37℃ 水浴箱湿盒孵育 30~40 分钟 (每次试验同时设阳、阴性对照)。
- (4) 用 PBS 震荡洗涤 3 次, 每次 5 分钟, 再用蒸馏水洗涤 1 次脱盐, 冷风吹干。
- (5) 用含 1:3 万的伊文思兰 PBS 按工作浓度稀释荧光结合物, 滴加各孔 (以覆盖细胞抗原面为准), 在 37℃ 水浴箱湿盒孵育 30 分钟, 然后同 (4) 洗涤、漂洗、吹干。
- (6) 荧光显微镜观察结果。

### 结果判断:

细胞内病毒特异性荧光为黄绿色颗粒, 分布在感染细胞的胞浆内。根据特异性荧光颗粒多少、荧光亮度、阳性细胞在细胞总数中所占比例, 可将免疫荧光反应大致区分为 1~4 个 “+”。

可参考阳性细胞数: <25% 为 “+”, 25%~50% 为 “++”, 51%~75% 为 “+++”, >75% 为 “++++”; 无特异性荧光者为 “—” (阴性)。

检测抗体滴度时, 以能观察到明显特异性荧光反应 (> “+”) 最高血清稀释度的倒数表示。

**意义:**

阳性结果, 表明曾受到汉坦病毒感染, >1: 20 有诊断参考意义;

恢复期血清抗体滴度比急性期抗体滴度有 4 倍或 4 倍以上升高则可确诊。

## 附件 4 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测血清 IgG 抗体

### 试验材料:

(1) 纯化的重组汉坦病毒核蛋白抗原预包被酶标板:

(2) 辣根过氧化物酶标记的抗人 IgG 抗体;

(3) 缓冲液:

包被液: pH9.6 碳酸缓冲液;

稀释液: pH7.4 PBS (含 5%脱脂奶)

洗涤液: pH7.4 PBS-T (0.05%吐温-20);

(4) 显色液: A/B 液

(5) 终止液: 4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

(6) 酶标板、酶标仪。

### 检测步骤:

(1) 将待检血清用稀释液从 1:100 开始作 2 倍连续稀释, 加入抗原孔, 100 μl/孔, 同时设阴、阳性对照, 37℃水浴 1 小时;

(5) 弃去血清, 用洗涤液洗涤 5~6 次;

(6) 加酶结合物, 用稀释液按工作浓度稀释, 100 μl/孔, 37℃水浴 1 小时;

(7) 弃去酶标抗体, 用洗涤液洗涤 6 次, 甩干;

(8) 加显色液: 于各反应孔内加 A/B 液各一滴, 37℃, 避光 3~5 分钟;

(9) 加终止液于每反应孔, 一滴/孔。

### 结果判断:

于 450nm (TMB) 阳性对照孔 OD 值/阴性对照孔 OD 值, 即 P/N $\geq$ 2.1, 对照成立; 若待检血清孔 OD 值与阴性对照孔 OD 比值 $\geq$ 2.1, 则标本为出血热 IgG 抗体阳性, 反之阴性。(阴性对照孔 OD 值小于 0.05 按 0.05 记, 若大于 0.05 按实际数值计算)

### 意义:

阳性结果, 表明曾受到汉坦病毒感染, >1:100 有诊断参考意义;

恢复期血清抗体滴度比急性期抗体滴度有 4 倍或 4 倍以上升高则可确诊。

**标本:**

(1) 患者血清: 无菌采集发病后 5 日内静脉血 3ml, 置冰壶中, 于实验室中分离血清, 接种细胞培养; 不能及时接种细胞者可置-70℃保存。污染的血清要先用双抗(青霉素、链霉素, 最终浓度各 500000U/mL), 4℃2 小时处理后接种细胞。

(2) 鼠肺: 生理盐水冲洗数次后, 用研磨器研碎, 每份加 0.5ml Hank' s 液, 2000 转/分钟离心 15 分钟, 取上清加双抗(青霉素、链霉素, 最终浓度各 1000U/ml), 4℃过夜, 备用。

**病毒分离:**

将培养好的单层细胞上清弃掉, 用 Hank' s 液洗涤 2 遍, 接种用 Hank' s 液稀释成  $10^{-1}$  的患者血清 0.1ml 或组织悬液 0.2ml。37℃孵箱吸附 1 小时, 补加维持液。37℃培养, 培养至第 7~10 天刮取细胞点抗原片, 按附件 5 方法进行鉴定。阴性者需盲传 3 代。

**材料:**

- (1) 急性期病人血清、鼠肺、鼠血或分离的汉坦病毒
- (2) 引物:

引物	序列 (5'~3')	位置	片段(bp)
逆转录引物	TAGTAGTAGACTCC	1~14	LMS
通用外引物	AAAGTAGGTGITAYATCYTIACAATGTGG	1910~1939	M(+)
	GTACAICCTGTRCCIAACCC	2373~2354	M(-)
型特异性引物			
汉滩病毒	GAATCGATACTGTGGGCTGCAAGTGC	1958~1984	M(+)
	GGATTAGAACCCAGCTCGTCTC	2318~2340	M(-)
汉城病毒	GTGGACTCTTCTTCTCATTATT	1936~1957	M(+)
	TGGGCAATCTGGGGGGTTGCATG	2331~2353	M(-)
S 片段引物	ATGTTGCCTGGGGIAAAGAGG	1200~1220	S(+)
	GCGCACTAGTAGTAGTAGACTCCCTAAAGA	1670~1696	S(-)

**方法:**

- (1) 病毒 RNA 的提取: 采用 TRIzol 按说明提取, 制备模板 RNA;
- (2) 逆转录、合成 cDNA: 采用 SuperScrip™II 或 AMV 逆转录酶, 按说明书进行;
- (3) PCR 扩增: 反应条件为 95℃ 预变性 10 分钟, 94℃ 60 秒、55℃ 60 秒、72℃ 45 秒、扩增 30~35 个循环, 72℃ 延伸 12 分钟。
- (4) 扩增产物用 1~2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。若条带的分子量与预期片段大小相同, 则表明为特异性扩增产物。

必要时, 可进行:

- (5) PCR 片段的回收和核苷酸序列测定: 切下特异分子量条带, 用 QIAquick 凝胶回收试剂盒回收 (按其说明书进行), 自动测序仪测序。

**意义:** 扩增到特异性条带可确诊汉坦病毒并明确其型别, 序列测定还可以对汉坦病毒的变异情况进行研究。

## 交叉保护中和实验

**试验目的：**血清分型

**标本：**出血热恢复期病人血清

**材料：**

1. 毒株：汉滩病毒标准株 76-118，汉城病毒标准株 Seoul。
2. 标准血清：兔抗汉滩病毒、汉城病毒血清。
3. 空斑减少中和试验常用试剂。

**步骤：**

1. 将待检血清用牛血清 Hanks 氏液稀释成 1: 10，56℃ 灭活 30 分钟，
2. 进一步 2 倍稀释血清成 1: 20、1: 40、1: 80……，对照血清 1: 10 稀释。
3. 稀释两种病毒（在冰浴中进行）至含 200pfu/ml。
4. 各连续稀释度血清分别与 200pfu/ml 的两种病毒液等量混合（各 0.3ml），置 37℃ 中作用 1 小时（每 15 分钟振荡一次）。
5. 吸出各细胞培养孔中维持液。
6. 接种长满单层的 Vero-E6 细胞（24 孔板），每孔接种血清病毒混合液、标准血清对照及两种病毒对照，每稀释度两孔，100ul/孔。37℃ 吸附 1 小时，每隔 15 分钟摇动一次。
7. 加第一层琼脂糖覆盖液（需冷置 42℃ 左右），每孔 1ml，室温下待凝固，细胞面朝上，置 37℃ 5%CO<sub>2</sub> 孵箱培养 7—9 天。
8. 加第二层含中性红琼脂糖覆盖液，1ml/孔，室温下待凝固，细胞面朝上，置 37℃ 5%CO<sub>2</sub> 孵箱培养 2—5 天，从第二天开始观察空斑数。
9. 抗体滴度的判定，以比病毒对照的空斑数中和或减少 50% 的血清最高稀释度倒数判为待检血清中和抗体滴度。
10. 型别判定：根据同一份血清与两种病毒的反应滴度不同来区分，如果一份血清与汉滩病毒（或汉城病毒）反应的抗体滴度高于与汉城病毒（汉滩病毒）的抗体滴度 4 倍或以上，即判为汉滩病毒型，反之则为汉城病毒型。两者滴度相差无几时，则不好分型。不足 4 倍时亦不能定型。

**配方：**

**第一层琼脂糖覆盖液:**

2×Eagle MEM 液	50ml (Gibco-BRL)
灭活胎牛血清	10ml
L-谷氨酰胺	4ml (200mmol/L, 100X)
MEM 非必需氨基酸	1ml (Gibco, 100x)
1mol/L HEPES 缓冲液	2ml
青链霉素	1ml (青霉素 10000u/ml, 链霉素 10000ug/ml)
制霉菌素 (一般可以不加)	0.1ml

**临用前配制, 放入 42℃水浴中, 另取**

琼脂糖	0.6g (Sigma, Type II medium EE0)
超纯水	34ml (适用于细胞培养的纯化水)

8 磅高压灭菌 15min, 置 42 °C 水浴 15min, 加入上述配制的组分中, 即可使用;

**第二层琼脂糖覆盖液:** 基本上同第一层琼脂糖覆盖液, 仅将灭活胎牛血清改为 5ml, 另加中性红溶液 1ml (333.0ug/L 中性红钠盐 Gibco) 。

## 免疫荧光法检测鼠肺抗原

### 材料:

- (1) 鼠肺;
- (2) 荧光素标记抗汉坦病毒单克隆抗体
- (3) 荧光显微镜。

### 方法:

- (1) 组织片制备: 冷冻切片机切片, 吹干, 冷丙酮固定 10 分钟, PBS 冲洗 2 次, 蒸馏水漂洗 1 次, 吹干,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用;
- (2) 组织片吹干, 滴加荧光素标记单克隆抗体, 设两孔对照, 分别加荧光素标记的非汉坦病毒单克隆抗体和 PBS, 置湿盒内  $37^{\circ}\text{C}$  水浴 30 分钟;
- (3) 取出, 用 PBS 冲洗 3 次, 蒸馏水漂洗 1 次, 吹干;
- (4) 荧光显微镜观察结果。

### 结果判断:

特异性免疫荧光呈黄绿色颗粒, 分布在鼠肺上皮细胞胞浆中, 正常组织细胞呈橙红色或暗红。

**意义:** 阳性结果, 说明宿主动物带毒。

附件 9      **酶联免疫吸附试验（ELISA）双抗原夹心法**  
**检测血清总抗体**

**试验材料：**

- (1) 纯化的重组汉坦病毒核蛋白抗原预包被酶标板；
- (2) 辣根过氧化物酶标记的纯化的重组汉坦病毒核蛋白抗原；
- (3) 缓冲液：
  - 包被液：pH9.6 碳酸缓冲液；
  - 稀释液：pH7.4 PBS（含 5%脱脂奶）
  - 洗涤液：pH7.4 PBS-T（0.05%吐温-20）；
- (4) 显色液：A/B 液
- (5) 终止液：4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- (6) 酶标板、酶标仪。

**检测步骤：**

- (1) 将待检血清加入抗原孔，25 μl/孔，同时用稀释液按工作浓度稀释酶标抗原，加入样品孔，25 μl/孔，需设阴、阳性对照各 3 孔，37℃水浴 1 小时；
- (2) 用洗涤液洗涤 6 次，甩干；
- (3) 加显色液：于各反应孔内加 A/B 液各一滴，37℃，避光 3~5 分钟；
- (4) 加终止液于每反应孔，一滴/孔。

**结果判断：**

于 450nm（TMB）阳性对照孔 OD 值/阴性对照孔 OD 均值，即  $P/N \geq 2.1$ ，对照成立；若待检血清孔 OD 值与阴性对照孔 OD 比值  $\geq 2.1$ ，则标本为出血热抗体阳性，反之阴性。（阴性对照孔 OD 值小于 0.05 按 0.05 记，若大于 0.05 按实际数值计算）

**意义：**阳性结果，表明曾受到汉坦病毒感染。