

ICS 11.020

C59

备案号:25519—2009

WS

中华人民共和国卫生行业标准

WS 296—2008

麻疹诊断标准

Diagnostic criteria for measles

2008-12-11 发布

2009-06-15 实施



中华人民共和国卫生部 发布

目 次

| | |
|-------------------------------|----|
| 前言 | Ⅲ |
| 1 范围 | 1 |
| 2 缩略语 | 1 |
| 3 诊断依据 | 1 |
| 4 诊断原则 | 1 |
| 5 诊断 | 1 |
| 6 鉴别诊断 | 2 |
| 附录 A(规范性附录)血清学诊断方法 | 3 |
| 附录 B(资料性附录)病原学诊断方法 | 9 |
| 附录 C(资料性附录)麻疹的临床表现及鉴别诊断 | 12 |
| 参考文献 | 15 |

前 言

根据《中华人民共和国传染病防治法》制定本标准。

按照国家质检总局、国家标准委公告(2005 年第 146 号),GB15983—1995《麻疹诊断标准及处理原则》自本标准实施之日起废止。

本标准的附录 A 为规范性附录、附录 B 和附录 C 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。

本标准主要起草人:许文波、谢正德、左树岩。

麻疹诊断标准

1 范围

本标准规定了麻疹的诊断依据、诊断原则、诊断和鉴别诊断。

本标准适用于全国各级各类医疗卫生机构及其工作人员对麻疹的诊断、报告。

2 缩略语

下列缩略语适用于本标准。

ELISA 酶联免疫吸附试验

HAI 血细胞凝集抑制实验

IgM 免疫球蛋白 M

IgG 免疫球蛋白 G

PCR 聚合酶链反应

RT 逆转录

3 诊断依据

3.1 流行病学史

在出疹前 6d~21d 与麻疹患者有接触史。

3.2 临床症状

3.2.1 发热 体温 $\geq 38^{\circ}\text{C}$ 。

3.2.2 全身皮肤出现红色斑丘疹。

3.2.3 咳嗽、流涕、喷嚏等上呼吸道卡他症状,并有畏光、流泪、结膜炎症状。

3.2.4 皮疹自耳后、面部开始,自上而下向全身扩展,3d~5d 内波及全身。

3.2.5 起病早期(一般于病程第 2d~3d)在口腔颊黏膜见到麻疹黏膜斑(Koplik 斑)。

3.3 实验室诊断

3.3.1 8d~6 周内未接种过麻疹减毒活疫苗而在血清中查到麻疹 IgM 抗体(见附录 A)。

3.3.2 恢复期患者血清中麻疹 IgG 抗体滴度比急性期有 4 倍或 4 倍以上升高,或急性期抗体阴性而恢复期抗体阳转(见附录 A)。

3.3.3 从鼻咽标本或尿液中分离到麻疹病毒,或检测到麻疹病毒核酸(参见附录 B)。

4 诊断原则

典型麻疹病例可根据临床表现结合流行病学做出诊断,轻型麻疹病例需根据血清麻疹抗体的检测结果或麻疹病毒分离阳性或麻疹特异性基因检测结果做出诊断。

5 诊断

5.1 疑似病例

具备 3.2.1、3.2.2,同时伴有 3.2.3 者。

5.2 临床诊断病例

符合以下任何一项者:

5.2.1 疑似病例与实验室确诊病例没有流行病学联系者。

5.2.2 疑似病例未进行流行病学调查者。

5.2.3 疑似病例在完成调查前失访/死亡者。

5.2.4 疑似病例无实验室诊断结果且不能明确诊断为其他疾病者。

5.3 流行病学诊断病例

疑似病例无标本或标本检测结果为阴性,并同时具备 3.1 者。

5.4 实验室确诊病例

疑似病例同时具备 3.3.1、3.3.2、3.3.3 中任何一项者。

5.5 排除病例

符合以下任何一项者:

5.5.1 麻疹疑似病例采集了合格血标本,经合格实验室检测麻疹 IgM 阴性,并与实验室确诊病例无流行病学联系。

5.5.2 经实验室检测证实为其他疾病(如风疹等)。

5.5.3 能明确找出是由其他原因引起发热出疹的病例(如药物性过敏性皮疹等)。

6 鉴别诊断

本病应与风疹进行鉴别,参见附录 C。

附录 A
(规范性附录)
血清学诊断方法

A.1 血液标本的采集、储存及运输

A.1.1 IgM 血清学诊断中单份血标本的采集:出疹后 0d~28d 内采集血液标本。

A.1.2 在下列情况下需要第 2 份血标本

出疹 3d 内仅 70% 左右的患者 IgM 阳性,4d~28d 则为 100% 阳性,如第 1 份血标本是在出疹 3d 内采集的,检测 IgM 阴性,需要采集出疹后 4d~28d 内的第 2 份血标本,排除第 1 份标本中可能出现的假阴性。

A.1.3 血标本采集流程

收集 2mL~3mL 静脉血加入到无菌试管中,写明收集日期和患者编号(ID);

全血不能冷冻,应 1 000r/min,离心 10min,用于分离血清;如果没有离心机,血标本应冷藏放置,直到血细胞块从血清中的完全析出;

小心吸取血清,避免吸到红血球,在无菌条件下,移至无菌有外螺旋盖的血清管中;

填写完整的病例调查表,其中末次麻疹疫苗接种日期、出疹日期、样品采集日期应明确。

A.1.4 血标本的储存

A.1.4.1 全血应冷藏(4℃~8℃)保存,并在 24h 内送达检测实验室;如不能达到上述要求,应按照 A.1.3 方法分离血清。

A.1.4.2 无菌血清应在 48h 内使用冰盒运送到检测实验室,或保存在 4℃~8℃,最多不能超过 7d;血清长期保存应在 -20℃ 冷冻。

注:血清反复冻融会影响 IgM 抗体的效价。

A.1.5 血标本的运输

标本应尽快运送到检测实验室,不要总是等待收集更多的标本再送;

将盛装标本的容器放在有封口的塑料袋中;用冷藏盒或保温瓶;

将标本送检单和调查表放在塑料袋中,再用胶带固定在冷藏盒中的上部;

安排运送日期;运输日期确定后,通知接收实验室标本运送的时间和运输方法。

A.2 实验室检测

根据采集血液标本检测目的不同,实验室选择的检测项目和方法也各异。每次检测最好使用同一种试剂盒,确保检测结果的一致性。检测结果可疑的必须用同一种试剂进行重复实验;当认为重复结果不可靠,应改用另一种试剂盒或方法进行重复实验。每份血液标本必须同时要有一份实验室登记表,内容包括患者的基本信息、疫苗接种信息、临床相关信息、标本采集时间、运送条件、接收日期、储存(地点、条件)、检测(时间、方法、结果)等信息。

A.2.1 抗体捕捉 ELISA 法检测麻疹 IgM 抗体

A.2.1.1 用途

本试剂用于检测麻疹 IgM 抗体,血清只做 1:25 或 1:100 稀释定性检测,用于麻疹患者的早期诊断。

A.2.1.2 试剂组成(48 人份):

A.2.1.2.1 已包被抗人 IgM 抗体的 48 孔板。

A.2.1.2.2 阴性对照:直接可用。

A. 2. 1. 2. 3 阳性对照:直接可用。

A. 2. 1. 2. 4 麻疹抗原:直接可用。

A. 2. 1. 2. 5 酶标麻疹单克隆抗体:直接可用。

A. 2. 1. 2. 6 底物液 A 液:直接可用。

A. 2. 1. 2. 7 底物液 B 液:直接可用。

A. 2. 1. 2. 8 终止液:直接可用。

A. 2. 1. 2. 9 稀释液:直接可用。

A. 2. 1. 2. 10 洗液:直接可用。

A. 2. 1. 3 仪器

A. 2. 1. 3. 1 微量移液器 1 μ L~20 μ L、100 μ L、1 000 μ L。

A. 2. 1. 3. 2 洗板机或类似的清洗装置。

A. 2. 1. 3. 3 酶标仪,波长 450nm(TMB)。

A. 2. 1. 3. 4 便携式计算器。

A. 2. 1. 4 操作步骤

A. 2. 1. 4. 1 开始试验前,将所有试剂置于室温 0. 5h。取出已包被好的聚苯乙烯 48 孔板。

A. 2. 1. 4. 2 稀释待检血清:将待检血清 1 : 25 倍稀释。在微量孔内分别加入 50 μ L 阴性对照,阳性对照和已稀释的待检血清。留一个孔为底物空白使用。37 $^{\circ}$ C 孵育 1h 弃去未结合的血清,洗 4 次,拍干。

A. 2. 1. 4. 3 加抗原:将麻疹抗原加入板中(空白孔除外),每孔加 50 μ L。37 $^{\circ}$ C 孵育 30min,弃掉未吸附的抗原,洗 4 次,拍干。

A. 2. 1. 4. 4 加酶标麻疹单克隆抗体:将酶标麻疹单克隆抗体加入板中(空白孔除外),每孔加 50 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 30min 后弃去未吸附的抗体,洗 4 次,拍干。

A. 2. 1. 4. 5 加底物液:每孔加底物液 A 液和 B 液各 50 μ L(包括空白孔)。室温避光放置 30min。

A. 2. 1. 4. 6 加终止液:每孔加入终止液 50 μ L(包括空白孔),反应终止。

A. 2. 1. 5 结果判定

A. 2. 1. 5. 1 无酶标仪可目测:标本孔和阴性对照孔有明显差别的判为阳性,无差别的判为阴性。

A. 2. 1. 5. 2 用酶标仪测定:450nm 波长(TMB)。调空白孔值为零后,逐孔测定 OD 值

A. 2. 1. 5. 3 标本 OD 值-阴性对照 OD 值的差值<0. 10,判断结果为 IgM 阴性。

A. 2. 1. 5. 4 标本 OD 值-阴性对照 OD 值的差值在 0. 10~0. 15 之间,判断结果为可疑。

A. 2. 1. 5. 5 标本 OD 值-阴性对照 OD 值的差值>0. 15,判断结果为 IgM 阳性。

A. 2. 1. 6 试剂的保存和使用期限

试剂盒内所有试剂均应保存于 2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C,并在有效期内使用。

A. 2. 2 间接定量 ELISA 法检测麻疹 IgM 抗体(IgM 试剂盒(单孔定量))

A. 2. 2. 1 用途

主要用于定性和(或)定量检测人血清或血浆中抗麻疹病毒的 IgM 抗体。IgM 阳性,表明是急性期感染。

A. 2. 2. 2 操作步骤(或按照试剂使用说明书进行)

A. 2. 2. 2. 1 定量 ELISA 检测麻疹病毒 IgM 抗体的标本稀释法:

A. 2. 2. 2. 1. 1 应使用 50 μ L 稀释缓冲液对 10 μ L 患者待测样品进行稀释,制成患者标本稀释液。

A. 2. 2. 2. 1. 2 将 40 μ L 类风湿因子吸附剂(rheumatoid factor, RF)加入 100 μ L 患者标本稀释液(A. 2. 2. 2. 1. 1)中,并用 60 μ L 稀释缓冲液进行稀释。

A. 2. 2. 2. 2 检测过程

A. 2. 2. 2. 2. 1 将检测所需数目的微孔条放到微孔板框上并准备好一张标签。

A. 2. 2. 2. 2. 2 加入 RF 吸附剂的待测血清标本需在室温吸附 15min 或 4℃ 过夜。

A. 2. 2. 2. 2. 3 在微量孔内分别加入 100 μ L 的已稀释样本或立即可用的对照血清。留一个孔为底物空白使用,例如:

| 定量的 IgM 抗原微量孔 | | 定量的 IgM 抗原微量孔 | |
|------------------|------|------------------|--------|
| 孔 A1 | 底物空白 | 孔 D1 | 标准血清 |
| 孔 B1 | 阴性对照 | 孔 E1 | 标本 1…… |
| 孔 C1 | 标准血清 | | |

A. 2. 2. 2. 2. 4 将样品于湿盒内 37℃(±1℃)孵育 60min(±5min)。

A. 2. 2. 2. 2. 5 孵育后以洗液缓冲液洗涤板孔(使用自动洗板机或手工洗板)。

a) 吸去或甩去洗液。

b) 每孔内加入 300 μ L 洗液。

c) 吸去或甩去洗液。

d) 重复洗涤过程 3 次(共 4 次)。

e) 将微孔板翻转过来在纸巾上拍打,使微孔中不再含有液体。

A. 2. 2. 2. 2. 6 加入酶标记抗体:于相应孔内(底物空白除外)加入 100 μ L IgM 酶标记抗体。

A. 2. 2. 2. 2. 7 湿盒内 37℃(±1℃)孵育 30min(±1min)。孵育后,以洗液清洗板孔(见 A. 2. 2. 2. 2. 5)。

A. 2. 2. 2. 2. 8 加入底物:于每孔内加入 100 μ L 底物溶液(包括底物空白孔)。湿盒内 37℃(±1℃)孵育 30min(±1min)。

A. 2. 2. 2. 2. 9 终止反应:每孔内加入 100 μ L 终止液,轻微振荡微孔板以混合溶液。

A. 2. 2. 2. 2. 10 读取吸光度:以底物空白为空白对照液,60min 内读取 405nm 的 OD 值,建议参考波长范围为 620nm~690nm(例如 650nm)。

A. 2. 2. 3 质控标准

A. 2. 2. 3. 1 底物空白的 OD 值必须 < 0.25。

A. 2. 2. 3. 2 阴性对照必须为阴性。

A. 2. 2. 3. 3 ELISA 定量试验:标准血清的平均 OD 值必须在有效范围内,此范围已在试剂盒专用的质量控制证书中给定(减去底物空白之后)。

A. 2. 2. 3. 4 ELISA 定性试验:阳性对照的平均 OD 值必须在有效范围内,此范围已在试剂盒专用的质量控制证书中给定(减去底物空白之后)。

如果未达到以上标准,则试验无效且必须重做。

A. 2. 2. 4 结果评估

每个试剂盒内均备有一个标准曲线和一个评估表,因而每一个标本 OD 值都可得到一个抗体活性值。标准血清的参考值和有效范围已在评估表格(质量控制证书)中给定。

所有的 OD 值在评估前必须先减去空白(A1)。

A. 2. 3 间接 ELISA 法检测麻疹 IgG 抗体

A. 2. 3. 1 用途

本试剂用于检测麻疹 IgG 抗体,麻疹抗体 $\geq 1:200$ 为阳性。可用于:

A. 2. 3. 1. 1 人群抗体水平测定:1:200、1:800、1:3 200、1:12 800。

A. 2. 3. 1. 2 人群抗体阳性率测定:1:200、1:800。

A. 2. 3. 1. 3 疫苗的初免效果观察:免疫前 1:200,免疫后 1:200~1:12 800,再免抗体测定免前也为 1:200~1:12 800。

A.2.3.1.4 麻疹患者诊断:急性期和恢复期双份血清抗体相差 ≥ 4 倍,或抗体检测结果阴转阳可诊断。

A.2.3.2 试剂组成:100人份试剂盒含有下列试剂。

A.2.3.2.1 麻疹抗原:1:20用,2mL。

A.2.3.2.2 对照抗原,1:20用,2mL。

A.2.3.2.3 抗人-IgG酶标记物,1:100用,0.8mL。

A.2.3.2.4 麻疹IgG(+)血清,0.1mL,(效价1:800)。

A.2.3.2.5 每份血清做4个稀释度,4个病毒孔,4个对照孔。

A.2.3.3 操作步骤

A.2.3.3.1 包被:用包被液分别将病毒抗原和对照抗原稀释至1:20,包被病毒4孔和细胞对照4孔,每孔 $100\mu\text{L}$,留一空白孔不包被,调零用。放 4°C 过夜。次日,弃去抗原液,洗3次,拍干。见图A.1。

| | M | C | M | C | M | C | M | C | M | C | M | C |
|---------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1:200 | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O |
| 1:800 | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O |
| 1:3200 | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O |
| 1:12800 | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O |
| 1:200 | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O |
| 1:800 | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O |
| 1:3200 | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O |
| 1:12800 | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O | O |

图 A.1 间接 ELISA 法检测 IgG 的 96 孔板设计

A.2.3.3.2 加待检血清:用2%牛NS-T稀释液稀释待检血清。每份血清分别按不同的稀释度加入对应孔中,每孔 $100\mu\text{L}$, 37°C 放置1h~1.5h。

A.2.3.3.3 加入抗人IgG酶标记物:用稀释液按标签所示工作浓度将酶稀释,加入板中,每孔 $100\mu\text{L}$, 37°C 孵育1h~1.5h。弃去未结合的酶标记物,洗3次,拍干。

A.2.3.3.4 加底物液:每孔加底物液 $100\mu\text{L}$,包括空白孔。 37°C 或室温避光放置5min~20min,当阳性对照血清达1:800,病毒孔明显显色,对照孔未显色时,加入 $2\text{mol/L H}_2\text{SO}_4$,每孔 $50\mu\text{L}$ (包括空白孔),反应终止。

A.2.3.4 结果判定

A.2.3.4.1 逐孔测定OD值或目测。

A.2.3.4.2 用酶标仪测定:调空白孔值为零后,逐孔测定待检血清及阳性对照的OD值。

$$P/N = \frac{\text{病毒孔 OD 值} - \text{空白孔 OD 值}}{\text{细胞孔 OD 值} - \text{空白孔 OD 值}} \geq 2.1 \text{ 为阳性}$$

每份血清每个稀释度的病毒孔OD值与相应细胞孔OD值之比 ≥ 2.1 即为阳性。(细胞孔OD值 < 0.05 时按0.05计算)。

IgG不做阴性血清对照,只做一份阳性血清对照,做多块板时,其中一块做阳性对照即可。

血清抗体滴度为阳性孔最高血清稀释度的倒数。

A.2.3.5 试剂的保存和使用期限

试剂可分多次使用,使用前包被。取样时室温放置时间应尽量短。 -20°C 可保存一年。运输时需冷藏。

A. 2. 4 血凝抑制试验

A. 2. 4. 1 原理

猴红细胞上有麻疹病毒受体,遇麻疹病毒可产生凝集现象。若将抗体与病毒(血凝素)预先温育后再加入红细胞则不产生凝集,称为血凝抑制。定量血凝素与不同稀释度抗体(血清)作用后能完全抑制血凝的最高血清稀释度,即为抗体效价。

A. 2. 4. 2 主要材料

A. 2. 4. 2. 1 血凝板

6×12 或 8×12 个圆形孔,孔底光滑的 U 形板。

A. 2. 4. 2. 2 稀释棒或定量移液器

稀释棒为优质不锈钢制成,尖端分瓣,瓣间容量应精确为 0.025mL,稀释棒应标化后使用。定量移液器选用 25 μ L。

A. 2. 4. 2. 3 定量滴管或定量移液器

滴管用玻璃制成或磨口玻璃管上安一个注射器针头制成定量滴头,垂直控制滴下每滴量为 0.025mL。

A. 2. 4. 2. 4 尖底小试管

形如离心管,便于血清的吸取。

A. 2. 4. 3 麻疹血凝素的制备

A. 2. 4. 3. 1 粗血凝素的制备

选择血凝性状良好的麻疹毒株接种到生长旺盛,形态良好的原代细胞(人羊膜、猴肾等)、人二倍体细胞或传代细胞(KB、MERN、FL、BHK、Vero 等)。接种病毒剂量根据病毒滴度而定。

原代人羊膜细胞接种病毒后培育于 37 $^{\circ}$ C,约在 2~3 周出现血凝素后每隔 3d~5d 收获上清液,换以新鲜的维持液培养。如此反复培养数次收获上清液,最后一次将细胞连同培养液置-30 $^{\circ}$ C 以下冻化后,沉淀去细胞残渣,数次收获的上清液即为血凝素。

原代猴肾细胞、二倍体细胞及传代细胞接种麻疹病毒后,病变发展较快,待病变达“++++”并有 50% 病变细胞脱落时,将细胞连同培养液置-30 $^{\circ}$ C 以下反复冻融三次,低速沉淀后取上清液即为血凝素。血凝素效价应在 1:32 以上,置-30 $^{\circ}$ C 保存备用。

A. 2. 4. 3. 2 血凝素的处理

取一定量粗血凝素放入三角瓶或试管中,加入 5% 吐温-80(Tween-80)并使其最终浓度为 0.125%,室温振荡 5min,再加入与粗血凝素等量的乙醚(分析纯),用力充分振荡 12min,然后,移入沉淀管内以 2 000r/min 离心 10min,小心吸出下部水层,将乙醚排尽至无乙醚味时为止,即为本试验用之血凝素。加青霉素 100U、链霉素 100 μ g,置 4 $^{\circ}$ C 保存。

A. 2. 4. 4 猴红细胞悬液的配制

选择与麻疹血凝素凝集效价高的猴子,静脉采血置阿氏(Alsever)液中(阿氏液量为猴红细胞的 4 倍),4 $^{\circ}$ C 保存,一般可用二周。用前以生理盐水洗三次,最后一次经 2 000r/min 离心 10min,弃上清,压积的猴红细胞用生理盐水配成 1% 浓度用于试验。

A. 2. 4. 5 血清处理

血清分离后取 0.1mL,加等量生理盐水于 56 $^{\circ}$ C 水浴 30min 灭活,每管加入 0.1mL 经 2 000r/min 离心 10min 处理的压积猴红细胞 1 滴,充分摇匀后,4 $^{\circ}$ C 过夜,次日吸取上清液测定(此时血清稀释度为 1:2)。

A. 2. 4. 6 血凝素滴定

A. 2. 4. 6. 1 效价滴定

血凝板 1~10 孔各加生理盐水 0.025mL,于第 1 孔加血凝素 0.025mL,混匀后从第 1 孔移 1 滴(0.025mL)至第 2 孔,如此倍比稀释至第 9 孔(1:2~512),第 10 孔不加血凝素作为红细胞对照。每孔

各加 1 滴(0.025mL)1%猴红细胞,振匀后静置 37℃1h 读结果,血凝达++时的血凝素最高稀释度为其效价,即 1 个血凝单位。正式试验时采用 2 个单位血凝素。

A. 2. 4. 6. 2 单位滴定

按上述效价将血凝素稀释成 2U(如血凝素效价为 1:128,稀释成 1:64)、1U、1/2U、1/4U,各孔中用生理盐水倍比稀释,再加 1 滴等量的 1%猴红细胞,振匀后,置 37℃1h 判定结果,应出现“++++、+++、++、+、-”之凝集方能用于试验。

A. 2. 4. 7 血凝抑制试验

在微孔 U 形底血凝板中进行。

第 2~9 孔每孔加生理盐水 0.025mL,第 9 孔为血清对照。

第 1、2 及 9 孔各加 1:2 处理好的血清 0.025mL,从第 2 孔开始稀释使血清充分混匀后,再放入下一孔倍比稀释至第 8 孔。

第 1~8 孔各加 2U 血凝素 1 滴,第 9 孔加生理盐水 1 滴。振匀后置 37℃ 30min。然后每孔加 1%猴红细胞 1 滴,振匀后置 37℃1h 判定结果。

判定结果时应先将血凝板倾斜待血清对照孔内的红细胞自由下滑呈泪滴状时即读结果。红细胞下滑与对照相同者为完全抑制。完全抑制的血清最高稀释度即抗体的效价。血清对照不应出现凝集,否则判断时应慎重或再吸收。

附录 B
(资料性附录)
病原学诊断方法

B.1 病毒分离**B.1.1 标本收集与处理**

B.1.1.1 用于病毒分离的标本类型:麻疹患者宜在出疹前 3d 至疹后 3d 内取咽拭子,尿液标本,不要超过出疹前后 5d。

B.1.1.2 咽拭子标本:将无菌棉拭子稍蘸生理盐水,反复涂抹患者咽部数次,然后将棉拭子浸于 1mL~2mL 标本维持液(含 500U/mL~1 000U/mL 青霉素、500 μ g/mL~1 000 μ g/mL 链霉素和 2%牛血清 DMEM 液)中,并反复挤压后,弃棉拭子。标本维持液中最好加无细胞毒性的制霉菌素 50 μ g/mL 或两性霉素 5 μ g/mL。

B.1.1.3 尿液标本:无菌收集 30mL~50mL 中段尿液于 50mL 带螺旋盖的无菌塑料离心管中,当日尽快冷链送至实验室,2 000r/min,离心 5min,弃上清,沉淀用 1mL 标本维持液重悬,即用于病毒分离,如不能及时进行病毒分离,标本液于-70 $^{\circ}$ C 冻存。

B.1.2 标本接种

上述处理后的标本-70 $^{\circ}$ C 冻化一次后,取 0.3mL~0.5mL 标本液接种于生长良好的单层传代细胞系如 Vero-SLAM 上,置 37 $^{\circ}$ C 吸附 1h~2h 后弃液,再加入维持液,置 37 $^{\circ}$ C 培养,次日观察有无细胞毒性,必要时换液。

B.1.3 观察细胞病变

接种后每天观察细胞病变(CPE)的进展情况,连续观察 7d,如果有特征性的麻疹病毒 CPE 出现,观察直到 75%以上的细胞发生病变(CPE+++),-70 $^{\circ}$ C 冻存;若无 CPE,即置-70 $^{\circ}$ C 冻化 3 次,再盲传 2 代。

B.1.4 毒株鉴定

可以采用 RT-PCR 和序列测定等方法进行麻疹病毒的鉴定。参见附录 B 中 B.2。

B.2 病毒核酸检测**B.2.1 标本收集与处理**

参考 B.1.1,进行标本的收集与处理。在标本的运送过程中,注意低温条件运输,在标本进入实验室后,不要反复冻融标本,以免核酸发生降解。

B.2.2 病毒核酸提取:使用 TRIZOL 法提取

B.2.2.1 取 250 μ L 病毒悬液加到 1.5mL 离心管中,然后加入 750 μ L TRIZOL 溶液,混匀 5s 后离心。

B.2.2.2 加入 200 μ L 氯仿溶液,充分混匀 5s。

B.2.2.3 室温放置 10min,然后在室温,10 000r/min 离心 20min。

B.2.2.4 将上清液转移到一支新的 1.5mL 离心管中。

B.2.2.5 再加入 500 μ L 异丙醇溶液,摇匀 10s。

B.2.2.6 室温静置至少 15min。

B.2.2.7 4 $^{\circ}$ C,13 000r/min 离心 25min。

B.2.2.8 倒掉上清液,加入 950 μ L 冰冷的 70%乙醇。

B.2.2.9 4 $^{\circ}$ C,13 000r/min 离心 20min。

B. 2. 2. 10 用吸尖小心吸出上清液。

B. 2. 2. 11 室温干燥后加入 15 μ L DEPC 处理后的 H₂O, 并加入 20U 的 RNasin(RNA 酶抑制剂), -20 $^{\circ}$ C 保存。

注意: 整个操作过程要戴口罩和一次性手套。

B. 2. 3 病毒核酸的 RT-PCR 检测

B. 2. 3. 1 逆转录(RT)——(设阴性对照)

B. 2. 3. 1. 1 配液

| | |
|--|---------------------|
| Primer60(100 μ g/mL) | 1 μ L \times |
| Primer63(100 μ g/mL) | 1 μ L \times |
| 5 \times Rtbuffer(contain Mg ²⁺) | 2 μ L \times |
| dNTP(2.5mmol/L) | 10 μ L \times |

以上配液混匀离心分装, 每管 14 μ L+4 μ L 模板 RNA; 瞬时离心后, 先升至 96 $^{\circ}$ C, 放入 PCR 仪, 96 $^{\circ}$ C, 90s; 室温 5min 后, 冰浴加入 B. 2. 3. 1. 2 中所示物质。

B. 2. 3. 1. 2

| | |
|--------|--------------------|
| MULV | 1 μ L \times |
| Rnasin | 1 μ L \times |

以上液体瞬时离心后每管 2 μ L; 37 $^{\circ}$ C, 45min; 95 $^{\circ}$ C, 5min

B. 2. 3. 2 PCR

B. 2. 3. 2. 1 配液

| | |
|--------------------------|---------------------|
| H ₂ O | 23 μ L \times |
| Primer60(100 μ g/mL) | 2 μ L \times |
| Primer63(100 μ g/mL) | 2 μ L \times |
| dNTP(2.5mmol/L) | 8 μ L \times |
| 10 \times buffer | 4 μ L \times |
| TaqE | 1 μ L \times |

以上液体离心混匀分装, 每管 40 μ L+10 μ L 模板 cDNA

B. 2. 3. 2. 2 条件

| | | |
|-----------------|-------|-------------------|
| 95 $^{\circ}$ C | 1min | } \times 30 个循环 |
| 95 $^{\circ}$ C | 45s | |
| 50 $^{\circ}$ C | 45s | |
| 72 $^{\circ}$ C | 1min | |
| 72 $^{\circ}$ C | 10min | |

B. 2. 3. 3 取约 5 μ L 的 PCR 产物在 2% 的琼脂糖凝胶上电泳, 约 30min(100V)。

B. 2. 3. 4 将此琼脂糖凝胶收入溴化乙锭溶液(0.1%)中染色 10min。

B. 2. 3. 5 在凝胶成像仪中观察并记录结果。

B. 2. 4 病毒核酸序列分析

B. 2. 4. 1 PCR 产物的纯化

B. 2. 4. 1. 1 按照 PCR 纯化试剂盒说明书操作。

B. 2. 4. 1. 2 加入 5 倍体积的 PB 缓冲液, 混匀, 加入柱子中。

B. 2. 4. 1. 3 13 000r/min 离心 1min。

B. 2. 4. 1. 4 取柱子于另外一个离心管中, 加入 0.75mL 的 PE 缓冲液。

B. 2. 4. 1. 5 13 000r/min 离心 1min。

B. 2. 4. 1. 6 在柱子中加入 50 μ L EB 缓冲液, 室温静置 3min。

B. 2. 4. 1. 7 13 000r/min 离心 1min, 收集 DNA 流出液备用。

B. 2. 4. 2 标记纯化的 PCR 产物。

B. 2. 4. 2. 1 取 1 μ L PCR 纯化产物, 再分别加入 3. 33pmol 的引物、8 μ L Bigdye, 加入去离子水至终体积 20 μ L。

B. 2. 4. 2. 2 按照下列条件, 进行标记反应:

| | | |
|-----------------|------|-------------------|
| 94 $^{\circ}$ C | 1min | } \times 25 个循环 |
| 94 $^{\circ}$ C | 10s | |
| 50 $^{\circ}$ C | 15s | |
| 60 $^{\circ}$ C | 4min | |
| 4 $^{\circ}$ C | | |

B. 2. 4. 3 标记产物的纯化

B. 2. 4. 3. 1 取 2. 7g G50 至 50mL 的去离子水中, 混匀后冷藏, 用前室温平衡。

B. 2. 4. 3. 2 取上述配液 0. 9mL 于小柱中, 室温放置 2min 后, 将柱子在架上控干。

B. 2. 4. 3. 3 3 000r/min 离心 2min, 弃废液。

B. 2. 4. 3. 4 将标记的 PCR 产物上柱, 注意不要接触胶面以及离心管的四壁, 以免影响回收效率。

B. 2. 4. 3. 5 将柱子放入新的离心管, 3 000r/min 离心 2min。

B. 2. 4. 3. 6 将 20 μ L 回收后的标记产物加入测序板。

B. 2. 4. 3. 7 将测序板放入测序仪进行测序。

附录 C

(资料性附录)

麻疹的临床表现及鉴别诊断

C.1 麻疹临床表现的类型

C.1.1 典型麻疹

即普通型,临床最为常见。潜伏期为 6d~21d,平均为 8d~12d,典型麻疹的临床经过可分以下几期。

C.1.1.1 前驱期:发热 3d~4d,体温达 39℃~40℃。上呼吸道卡他症状,患儿流涕、喷嚏、咳嗽、流泪、畏光,结膜炎等。发热 2d~3d 后,口腔颊黏膜粗糙,上有数量不等周围可见红晕的 0.5mm~1mm 灰白色小点,称柯氏斑(Koplik 斑),上下唇黏膜也可见到,是早期诊断麻疹的标志。黏膜斑 2d~3d 内消失。

C.1.1.2 出疹期:多在发热 3d~4d 后出现,自耳后、发际、前额、面、颈部开始自上而下波及躯干和四肢手掌足底,疹间皮肤正常。皮疹初为淡红色斑丘疹,以后部分融合成暗红色。出疹时体温达到高峰,全身症状加重。出疹持续 3d~5d。

C.1.1.3 恢复期:若无并发症,皮疹出齐后体温开始下降,进入恢复期。皮疹出齐后,依出疹顺序逐渐隐退,色变暗,有色素沉着及糠皮样脱屑,1周~2周消退。疹退同时体温也下降到正常,病情自愈。

C.1.2 重型麻疹

持续高热在 40℃以上,皮疹融合成片,深红色,可见出血性皮疹,病情重且病程长,常伴肺炎、喉炎或有惊厥、昏迷等脑炎表现。

C.1.3 轻型麻疹

临床表现为发热相对轻,多低于 39℃,热程短于 7d,轻度上呼吸道卡他症状,及少量皮疹,不留色素沉着或脱屑,口腔麻疹黏膜斑仅见 1~2 个或无,全身状况良好。无并发症,病程约 1 周。多见于 6 个月前婴儿或 4 周内经过被动免疫的患儿,偶见于接种麻疹疫苗后。机理为机体内的抗体不能完全抵御麻疹病毒的侵袭,但仍有一定的抗病能力,因此病毒在体内只能有限繁殖。

C.1.4 异型麻疹

多为年长儿,典型症状是急起高热,伴头痛和全身肌肉疼痛;无麻疹黏膜斑;发热 2d~3d 后出疹,出疹顺序为先四肢渐自下向上发展,波及全身,皮疹为多形性,有斑疹、丘疹、紫癜和荨麻疹。常伴有手、足背水肿和肺炎。见于接种灭活麻疹疫苗后 6 个月至 6 年,再接种麻疹疫苗或再次感染麻疹野病毒后。不易分离到病毒,但恢复期麻疹特异性抗体强阳性。其主要发病机理为接种灭活疫苗后,不产生呼吸道局部免疫和抗 F 蛋白抗体,当再遇到野病毒时,HA 为再次免疫反应,HI 抗体产生早、滴度高,导致麻疹病毒经细胞到细胞扩散,与体内 HI 抗体形成抗原抗体复合物,这种复合物在血管壁沉积后激活补体系统,生成过敏毒素,造成一系列组织病理损害。

C.2 麻疹的并发症

C.2.1 肺炎

是麻疹最常见的并发症,发病率约 10%左右,多见于出疹期;也是引起麻疹死亡的主要原因。常见于 5 岁以下,原有佝偻病和营养不良的小儿。由麻疹病毒引起的肺炎多不严重;继发性肺炎较为严重,常见的肺炎病原体为葡萄球菌、流感杆菌、肺炎链球菌;或病毒,如腺病毒。另外,麻疹病毒本身可以在有免疫功能缺陷患者(如白血病、先天性无球蛋白血症等)发生严重和致死性的巨

细胞性肺炎,其临床特征为缺乏皮疹和血清中不能形成麻疹病毒特异性抗体,其病理变化为间质性肺炎。

C.2.2 喉炎

发生率为1%~4%,可以是麻疹病毒本身感染所致,多见于2岁~3岁以下幼儿,程度轻者预后较好,若继发细菌感染则病情加重,常呈声音嘶哑,犬吠样咳嗽,容易气道梗阻,吸气性呼吸困难,胸部三凹征明显,若不及时处理可窒息。

C.2.3 中耳炎

多见于婴幼儿,是继发细菌感染所致,与麻疹病毒无关。

C.2.4 脑炎

在免疫功能正常的患者,麻疹脑炎的发病率约为麻疹病人的千分之一。多见于2岁以上儿童,病死率约为15%,病程1周~2周,脑脊液和血中可查到麻疹IgM抗体。30%的存活者有轻重不等的后遗症。在细胞免疫功能缺陷的患者,可发生麻疹病毒包涵体脑炎,疾病呈急性或亚急性的过程。

C.2.5 亚急性硬化性全脑炎

发病率一般在十万至百万分之一。是一种大脑慢性进行性病变的疾病。大多在患麻疹2年~17年后发病,患者多为少年儿童。临床表现进行性脑功能障碍,智力低下,痴呆,肌阵挛,癫痫,晚期昏迷,患者于发病后1年~3年内死亡。

C.3 麻疹的临床鉴别诊断

C.3.1 临床鉴别诊断要点见表C.1。

表 C.1 麻疹与风疹的鉴别诊断

| 比较指标 | 麻 疹 | 风 疹 |
|----------|--|--|
| 潜伏期 | 6d~21d | 14d~21d |
| 前驱期及常见症状 | 通常3d 卡他症状严重,高热、上呼吸道症状明显,咳嗽较重,眼畏光及流泪 | 1d以内,或无前驱期 卡他症状轻微、发热甚轻或不发热 |
| 麻疹黏膜斑 | 有 | 无 |
| 皮疹 | 暗红色斑丘疹,形态不整齐,先于面部,自上而下逐步出现,于第3天或第5天出透,通常于第4天开始隐退 | 淡红色斑丘疹,较麻疹小,分散或融合,先见于面部,发展迅速,24h内遍布全身,第3天到第4天或更早隐退 |
| 淋巴结 | 全身淋巴结肿胀 | 耳后部、颈部、枕部淋巴结肿胀 |
| 色素沉着 | 有 | 无 |
| 脱屑 | 糠屑 | 少数有细糠脱屑或无 |
| 杨梅舌 | 无 | 无 |
| 血象 | 白细胞减少,出疹期内淋巴细胞相对增多 | 白细胞大多减少,出疹期内淋巴细胞较多,可出现异型淋巴细胞 |

C.3.2 实验室和流行病学鉴别诊断:

因为有时风疹和麻疹的临床鉴别诊断比较困难,所以需要通过实验室血清学方法和流行病学来证实(参见图C.1)。

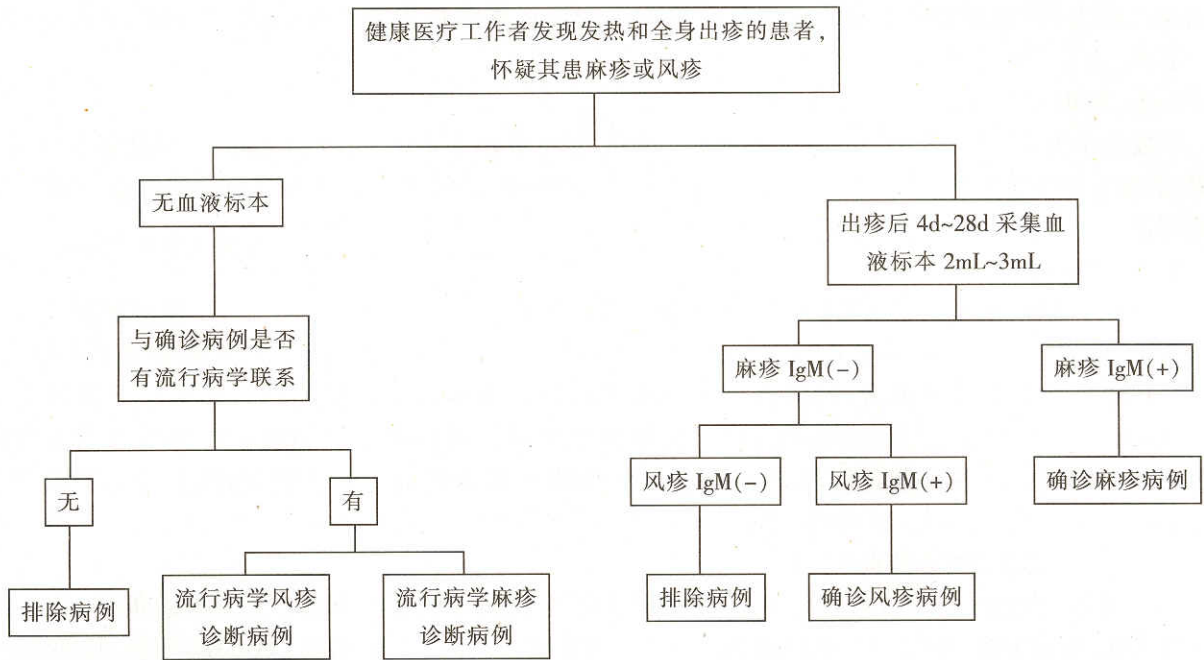


图 C.1 实验室和流行病学鉴别诊断流程图

参 考 文 献

1. 郭可骞等. 应用抗体捕捉 ELISA 法测定病毒特异性 IgM 抗体. 病毒学报. 1987,3(1):86-91.
2. 许文波等. 麻疹野病毒的分离及血清学的初步分析. 中国计划免疫. 1996,2(1)4-7.
3. 中华人民共和国卫生部. 全国麻疹监测方案,2009.
4. Advances in Global Measles Control and Elimination. Morbidity and Mortality Weekly Report, 1998,47/No. RR-11.
5. Diane E. Griffin, et al. (1996) *Fields Virology*, third edition 1267-1295, Lippincott-Raven Publishers.
6. Bellini WJ, et al. (1994). Virology of measles virus. *J. of Infect. Dis.* 170(Suppl 1), S15-23.
7. Xu WenBo, et al. (1998). New genetic group of measles virus isolated in People's Republic of China. *Virus Research* 54, 147-156.
8. Measles, mumps and rubella vaccine use and strategies for elimination of measles rubella and Congenital Rubella Syndrome. (1998) *MMWR* 47(RR-8), 1-57.
9. Deutsche Gesellschaft für pädiatrische Infektiologie. *Handbuch* 1997, 2. Auflage, Futuramed Verlag München, 1997.
10. Galazka, A. M., Robertson, S. E., and Kraiger, A., Mumps and Mumps vaccine: a global review. *Bull. World Health Organ.* 1999, 77, 3-14.
11. Andrews, N. et al., The European Sero-Epidemiology Network: standardizing the enzyme immunoassay results for measles, mumps and rubella. *Epidemiol. Infect.* 2000, 125, 127-141.
12. Edmunds, W. J., Gay, N. J., Kretzschmar, M., Pebody, R. G., Wachmann, H. ESEN Project. The pre-vaccination epidemiology of measles, mumps and rubella in Europe: implications for modelling studies. *Epidemiol. Infect.* 2000, 125, 635-650. 4.