

## 登革热实验室检测指南

### 一、目的

- (一) 及时发现、诊断病例。
- (二) 及时了解伊蚊媒介携带登革病毒状况。
- (三) 病毒分型和溯源。
- (四) 为登革热流行趋势的预测、预警和制定防治对策、措施提供科学依据。

### 二、检测对象

- (一) 疑似和临床诊断病例（按照登革热诊断标准 WS216-2008）。
- (二) 伊蚊成蚊和幼虫。

### 三、样本采集、保存和运输

#### (一) 临床标本采集

用无菌真空干燥管，采集患者非抗凝血，及时分离血清，分装 2 份，保存于带螺旋盖、内有垫圈的冻存管内，标记清楚后低温保存，其中 1 份用于现场实验室检测，1 份用于上级预防控制机构复核（附件 1，附表 1）。

1. 登革热临床诊断病例及疑似病例，每次采集血液标本 5mL。

2. 登革热临床诊断和疑似的住院病例（包括初筛阴性），应采集双份血液标本，入院当天和出院前 1 天各一份。

3. 疫点首发病例，必要时采集第二份血标本，距第一份血样采集日期间隔在 7 天以上。

#### (二) 蚊媒标本采集

疫点内采集的伊蚊成蚊及幼虫，分类鉴定后，填写媒介标本采集信息表，按照采集地点分装，每管 10-20 只。

#### (三) 标本保存、运送

标本应-70℃以下保存，血液标本可-20℃以下保存，但不超过 1 周。

标本运送时采用低温冷藏运输，避免冻融，样本运输应遵守国家相关生物安全规定。

## 四、检测内容

### （一）实验室检测

登革热疑似病例发生所在地医院和/或县（市）疾控机构采集病例血清，检测登革病毒抗原、核酸或抗体，检测流程参见图 1。

### （二）复核检测

1.送市或省级疾病预防控制机构的临床标本，抽样 30%进行复核检测，疫点首发病例需采用病原学和/或双份标本血清学方法复核检测，暴发疫情复核检测不少于 5 例，疫情少于 5 例者应全部检测，病毒核酸阳性标本应分型检测。

2.疫点首发病例，重症病例、输入病例急性期标本应采用 PCR 方法进行分型检测，阳性者分离病毒，从临床标本或所分离病毒中扩增 E 蛋白编码基因，完成序列分析。

3.每次暴发疫情应开展病毒全基因组序列分析。

4.实验室检测阴性临床病例以及重症病例，应对恢复期血清进行 IgM、IgG 抗体和/或中和抗体检测。

### （三）媒介标本检测

#### 1.核酸检测

捕获的伊蚊成蚊或幼虫，进行核酸分型检测，并扩增病毒 E 蛋白编码基因，完成序列分析。

#### 2.病毒分离

病毒核酸阳性的标本由国家、省或有条件的市级疾病预防控制机构进行病毒分离、基因组序列分析。

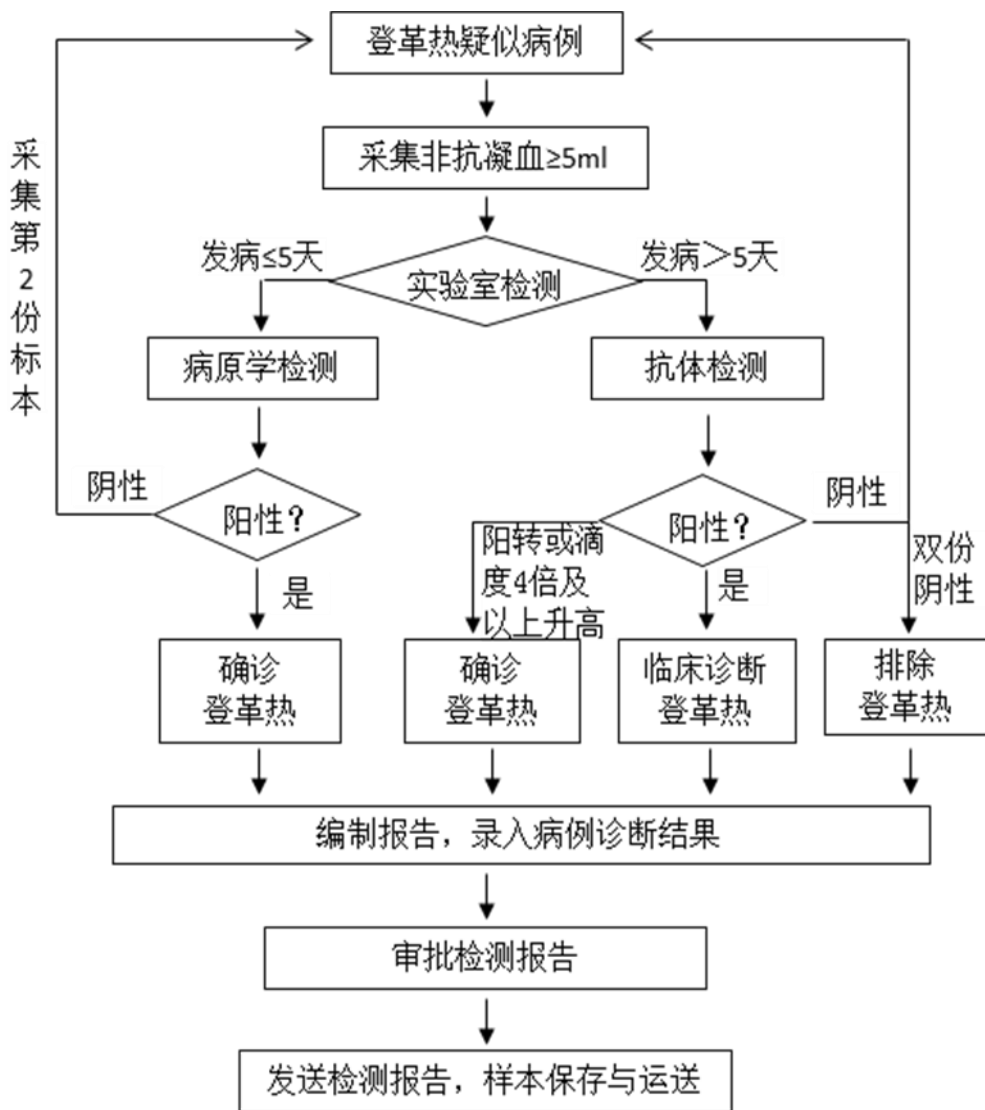


图 1 登革热疑似病例实验室检测流程

## 五、实验室检测方法

### （一）临床标本检测

#### 1、病原学检测

病原学检测主要适用于急性期血液标本。

（1）抗原检测：一般发病后 6 天内血液标本 NS1 抗原检出率高。标本中检出 NS1 抗原可以确诊病毒感染，适用于现场快速检测，可用于早期诊断（附件 2，3）。

(2) 核酸检测：一般发病后 6 天内血液标本病毒核酸检出率高。在病人血清中检出病毒核酸，可确诊而且能够分型，可用于早期诊断，但核酸检测容易因污染而产生假阳性，因此要求严格分区操作（附件 4）。

(3) 病毒分离：一般发病后 5 天内血液标本病毒分离率较高。将标本接种于蚊源细胞（C6/36）或哺乳动物细胞（BHK21、Vero）进行分离培养（附件 5），出现病变以后，用检测抗原或核酸的方法鉴定病毒。分离到登革病毒可以确诊，但其耗时长，不适于快速诊断。

## 2.血清学检测

血清学特异性抗体检测主要适用于发病 5 天以后血液样本，但需注意可能与其他黄病毒感染发生交叉反应。

(1) 血清特异性 IgM 抗体：采用 ELISA、免疫层析等方法检测。IgM 抗体阳性，提示患者可能新近感染登革病毒，适用于登革热早期诊断，但单份标本不能确诊（附件 6）。

(2) 血清特异性 IgG 抗体：采用 ELISA、免疫荧光（IFA）、免疫层析等方法检测。患者恢复期血清 IgG 抗体阳转或滴度较急性期呈 4 倍及以上升高可以确诊（附件 7，8）。

(3) 中和抗体：采用空斑减少中和实验、微量中和实验等方法检测，可用于分型。患者恢复期血清中和抗体阳转或滴度较急性期呈 4 倍及以上升高可以确诊。

## (二) 媒介标本检测

### 1.标本处理

将分类后的伊蚊成蚊或幼虫，按照采集地点，每 10~20 只为一份进行研磨处理（附件 9）。

### 2.病毒核酸检测

用 RT-PCR 的方法进行登革病毒核酸检测（见附件 4）。

### 3.病毒分离

病毒核酸阳性的标本进行病毒分离（见附件 5）。

## 六、实验室质量控制

### （一）标本采集、保存和运送

采集的标本要做好标识，并记录标本的基本信息和流行病学信息，按本指南要求采集、保存和运送。

### （二）实验室检测

- 1.根据发病时间，按本指南要求选择不同的检测方法。
- 2.核酸检测要防止各种污染，按操作规范设立相应对照。
- 3.应对检测试剂开展质控评价。

（三）各级疾病预防控制机构应定期开展督导检查、实验室技术人员培训与考核，及时发现问题。

## 七、结果的报告和反馈

疫点首发病例、重症病例和输入病例实验室检测结果 24 小时内反馈标本送检单位。

省级疾病防控机构应每年 1 月将上一年登革热实验室病原学（包括核酸检测、病毒分离、序列测定）监测结果，报国家疾病预防控制中心（见附表 2），将结果发送至 [denguetest@126.com](mailto:denguetest@126.com)。

## 八、生物安全

登革热实验室检测应按照《病原微生物实验室生物安全管理条例》等相关规定要求，做好生物安全工作。

附件：

- 1.血液标本采集.血清分离.运送.保存标准化操作程序
- 2.酶联免疫法检测登革病毒 NS1 抗原标准操作程序
- 3.免疫层析法检测登革病毒 NS1 抗原标准操作程序
- 4.RT-PCR 法分型检测登革病毒核酸标准操作程序
- 5.细胞培养分离登革病毒
- 6.IgM 捕捉 ELISA 法（MacELISA）检测登革热 IgM 抗体
- 7.酶联免疫法检测登革病毒 IgG 抗体标准操作程序
- 8.免疫荧光法检测登革病毒 IgG 抗体标准操作程序
- 9.蚊媒标本处理标准操作程序

附表：

- 1.疑似登革热病人检材送检一览表
- 2.病原学检测结果一览表

## 附件 1

### 血液标本采集、血清分离、运送、保存标准化操作程序

#### 1 目的

正确采集血液标本、分离血清、运送和保存。

#### 2 范围

适用于有资质的人采集登革热患者或疑似患者血液标本、分离血清、编号、分装、保存和运送。

#### 3 操作步骤

##### 3.1 采血

3.1.1 用 70%酒精擦拭静脉穿刺部位待 30 秒钟以上。

3.1.2 然后用一根碘酊或碘伏棉签消毒皮肤（1-2%碘酊 30 秒或 10%碘伏消毒 60 秒），从穿刺点向外以 1.5-2cm 直径画圈进行消毒。

3.1.3 用 70%酒精脱碘。

3.1.4 严格执行三步消毒后（注意对碘过敏的患者，只能用 70%酒精消毒，消毒 60 秒钟），待穿刺部位酒精挥发干燥用无菌真空管，采集患者非抗凝血 5mL。

##### 3.2 分离血清

3.2.1 轻缓颠倒采血管数次，使血液与促凝剂混匀后静置，待血块完全凝固（放置时间过长会造成溶血，避免留置过夜）。

3.2.2 3000rpm 离心，5 分钟，然后用无菌吸管小心取上清转入 3 支冻存管，应避免吸取血细胞。

3.2.3 标记。用标签纸或持久性标记笔在冻存管的侧壁标记标本编号，顶端标记序列号，标记清楚后将血清放进标本盒，保存于 2-8℃冰箱待初筛检测或运送保存。在编码规则为“地区拼音首字母（JH）年份（2 位）月（2 位）-序列号（3 位）”，如景洪市 2013 年 8 月份采集的第 12 份血标本的血清编号为 JH1308-012，冻存管顶端分别标记 012-1，012-2 和 012-3。

##### 3.3 运送保存。

3.3.1 如果 24 小时能够完成初筛检测，并将标本运送至上级单位，运送前应将标本保存于 2-8℃冰箱，运送时采用低温冷藏运输。

3.3.2 如果不能及时运送，运送前应将标本保存于-20℃冰箱，运送时采用干冰或低温冷藏运输。

3.3.3 样本长期保存应记录剩余血清量和盒中位置，保存于-70℃以下冰箱。

3.3.4 所有样本运输和保存应遵守国家相关生物安全规定。

#### **4 注意事项**

4.1 使用后的注射器和针头应放置于耐扎的容器中，最后集中高压消毒，在任何情况下均不应试图将针头重新盖帽。

4.2 采血结束后脱掉手套并弃于耐高压的废弃袋中，以备集中高压灭菌，并立即用肥皂和水洗手。

4.3 若发生针刺、皮肤破损或其它损伤，应立即用肥皂和水清洗伤口，不要立即止血。

4.4 当血液污染了身体的任何地方或发生针刺等事故时，均应及时报告上级并按医疗救护规程进行评估和救护。



## 附件 2

### 酶联免疫法检测登革病毒 NS1 抗原标准操作程序

#### 1 目的

酶联免疫法检测患者血清中登革病毒 NS1 抗原。

#### 2 适用范围

适用于患者血清或血浆中登革热病毒 NS1 抗原的快速检测。

#### 3 实验前准备

3.1 核对被检样品（血清或血浆）患者的姓名、编号及检测项目等。

3.2 检测前应将待测样品置于 2-8℃ 冰箱或冰上。

#### 4 检测项目及参数

本方法检测项目为检测血清或血浆中登革热病毒抗原。

#### 5 检测仪器设备和材料

加样器、温箱、洗板机、含波长 450nm 的酶标仪、登革病毒抗原检测试剂盒（酶联免疫法）（万泰公司）

#### 6 检测的环境条件

生物安全二级实验室（BSL-2）中进行,灭活后样本在生物安全一级实验室（BSL-1）内进行。

#### 7 操作步骤

7.1 将试剂盒在冰箱中取出，放置室温平衡 30 分钟，使用前将试剂轻轻震荡混匀。

7.2 配液：将试剂盒中浓缩洗涤液用蒸馏水 20 倍稀释。

7.3 编号：将样品对应微孔板编号，每板设阴性对照 3 孔，阳性对照 2 孔和空白对照 1 孔。

7.4 加稀释液：每孔加稀释液 50 $\mu$ L，空白孔除外。

7.5 加样：分别在相应孔加入待测样品或阴阳性对照各 50 $\mu$ L，空白孔除外。

7.6 温育：用封板膜封板后，置 37℃ 温育 60 分钟。

7.7 每孔加酶标试剂 50 $\mu$ L，空白孔除外，轻轻震荡混匀。

7.8 温育：用封板膜封板后，置 37℃温育 30 分钟。

7.9 洗板：小心揭掉封板膜，用洗板机洗涤 5 遍，最后一次尽量扣干。

7.10 显色：每孔加入显色剂 A、B 液各 50 $\mu$ L，轻轻震荡混匀，37℃避光显色 15 分钟。

7.11 测定：每孔加终止液 50 $\mu$ L，10 分钟内测定结果。设定酶标仪波长于 450nm 处（建议使用双波长 450nm/600-650nm 检测），用空白孔调零后测定各孔 A 值。

## 8 结果判定

8.1 临界值计算：临界值=0.10+阴性对照孔 A 值均值（阴性对照孔 A 值低于 0.05 者以 0.05 计算）。

8.2 阴性对照的正常值范围：阴性对照孔  $A \leq 0.1$ （若 1 孔 A 大于 0.1 应舍弃，若两孔或两孔以上阴性对照大于 0.1，应重复实验）。

8.3 阳性对照正常值范围： $A \geq 0.8$ 。

8.4 阳性判定：样品 A 值  $\geq$  临界值者为登革病毒抗原阳性。

8.5 阴性判定：样品 A 值  $<$  临界值者为登革病毒抗原阴性。

## 9 意义

结合临床信息，阳性结果可以诊断为登革病毒感染，但阴性结果并不排除登革病毒感染的可能。

## 附件 3

### 胶体金免疫层析法检测登革病毒 NS1 抗原标准操作程序

#### 1 目的

检测患者血液中登革病毒抗原。

#### 2 适用范围

检测患者血清、血浆、全血中登革热病毒抗原水平，主要用于登革病毒感染的辅助诊断。

#### 3 实验前准备

3.1 核对被检样品（血清或血浆）患者的姓名、编号及检测项目等。

3.2 检测前应将待测样品置于 2-8℃ 冰箱或冰上。

#### 4 检测项目及参数

本方法检测项目为检测血清或血浆中登革热病毒抗原。

#### 5 检测仪器设备和材料

加样器、登革热病毒抗原检测试剂盒（胶体金法）

#### 6 检测的环境条件

生物安全二级实验室（BSL-2）中进行,灭活后样本在生物安全一级实验室（BSL-1）内进行。

#### 7 检测步骤

7.1 将试剂盒和待检样本自冰箱中取出平衡至室温。

7.2 当准备好测试时，打开密封的铝箔袋，取出检测卡，平放于水平桌面上。

7.3 在检测卡上标记病人的样本号。

7.4 加样：用滴管从样本中取 1 滴（约 30-45 μL）血清或血浆标本，加于检测卡/条上的加样区内，另外加 1 滴（约 30-45 μL）稀释液，保证操作过程中没有气泡产生。（如果加样后 30 秒钟，没有看到样本移动，可能是由于样本太黏稠，可在样本加样孔内再加 1 滴样本稀释液。

7.5 加入样本后 20-25 分钟内判读结果，并将结果拍照。

#### 8 结果解释

8.1 阴性结果：仅质控线 C 出现肉眼可见条带。

8.2 阳性结果：质控线 C 和检测线 T 均出现肉眼可见条带。

8.3 无效结果：未肉眼可见的质控线 C

8.4 质量控制：如遇下列情况，请按上述操作步骤使用实验室备用的阳性和阴性样本对该批产品进行质量控制：

8.4.1 新检验员使用本产品。

8.4.2 使用新批号产品。

8.4.3 试剂卡储存温度在 2-30℃ 以外。

8.4.4 测试区温度在 2-30℃ 以外。

## 9 意义

阳性结果说明检测到登革病毒抗原，结合临床可以诊断为登革病毒感染；阴性结果说明没有检测到登革病毒抗原，但不能排除登革病毒感染。

## 附件 4

### RT-PCR 法分型检测登革病毒核酸标准操作程序

#### 1 目的

登革热患者和/或媒介伊蚊标本中病毒核酸的提取及 PCR 分型检测。

#### 2 适用范围

适用于患者血标本及其传播媒介标本的检测。

#### 3 检测的环境条件

在标本中提取登革病毒 RNA 的实验要求在 BSL-2 实验室操作，PCR 分型检测在专门 PCR 室或区域操作。

#### 4 实验步骤

##### 4.1 实验准备

4.1.1 在标本中提取登革病毒 RNA 要求在 BSL-2 实验室，PCR 分型在综合实验室独立区域或专门 PCR 室操作。

4.1.2 进入实验场所之前，要事先准备好所需试剂，样品。预约实验场所，并看前一位实验者是否已经清场。

##### 4.2 RNA的提取

4.2.1 使用QIAampViral RNA Mini 试剂盒提取血清标本中病毒RNA

4.2.1.1 吸取560 $\mu$ l包含载体RNA的AVL 缓冲液至1.5ml的离心管中。

4.2.1.2 向上述的液体中加入140 $\mu$ l样品，脉冲涡旋式混匀15秒，室温孵育10分钟，简单离心使离心管顶端液体落到底部。

4.2.1.3 在样品中加入560 $\mu$ l 96—100%的乙醇，混匀15秒，再简单离心。

4.2.1.4 小心将630 $\mu$ l液体加入未浸湿的QIAamp小柱中，盖好盖，离心8000rpm/min 1min,弃去收集管，将柱子置于一新的2ml收集管上。

4.2.1.5 打开QIAamp小柱的盖子，重复步骤6，直至样品全部离心。

4.2.1.6 打开盖子，向柱中加入500 $\mu$ l AW1 缓冲液，盖好盖，离心8000rpm/min 1min，弃去收集管，将柱子置于一新的2ml收集管上。

4.2.1.7 打开盖子，加入500 $\mu$ lAW2 缓冲液，盖好盖，离心 14, 000rpm/min 3min。

4.2.1.将柱子置于一新的2ml收集管上，空离1min。

h.将柱子置于一新的 1.5ml 离心管上，加入 50 $\mu$ l AVE 洗脱缓冲液，室温孵育 1min,离心 8000rpm/min 1min。

4.2.2 RNeasy Mini Kit 提取媒介组织标本或血液标本病毒 RNA

4.2.2.1 从 Kit 中取出 RLT 液，根据标本数量分装适量 RLT 液按照 1: 100 体积比分别加入  $\beta$ -巯基乙醇，分装至相应的预先标记好的微量离心管中，每管 600 $\mu$ L。

4.2.2.2 将 150  $\mu$ l 组织研磨混悬液分别加入相应的 RLT 液管中，充分混匀。

4.2.2.3 混匀后依次加入 750 $\mu$ l 70%的乙醇，充分混匀。

4.2.2.4 从 Kit 中取出带收集管的滤柱，打开包装将其做好标记。取步骤 2 中的混合液 750 $\mu$ l 加入滤柱中，12000rpm，离心 15s，弃收集管中的离心液。

4.2.2.5 滤柱仍放回收集管上，将步骤 2 剩余的混合液全部转入滤柱中，12000rpm，离心 15s，弃离心液；

4.2.2.6 于滤柱中加入 700 $\mu$ l Wash Buffer RW1 液，12000rpm，离心 15s。

4.2.2.7 从 QIAGEN RNeasy Mini Kit 中取一支干净的 2mL 收集管，将离心后的滤柱移到新的收集管上，加入 500 $\mu$ l Wash Buffer RPE 液，12000rpm，离心 15s。

4.2.2.8 弃收集管中的离心液，再于滤柱中加入 500 $\mu$ l Wash Buffer RPE 液，13000~14000rpm，离心 2min。

4.2.2.9 将滤柱移到一个无 RNA 酶的干净的 1.5mL eppendorf 管上，向滤柱中加入 30~50 $\mu$ l 的 RNase-free Water,室温静置 1~3min。

4.2.2.10 12000rpm，离心 1min，离心液即为病毒 RNA，立即检测或-70 $^{\circ}$ C 以下保存。

4.3 常规半套式 RT-PCR 方法检测登革病毒核酸

4.3.1 引物：引物序列见下表

引物	序列	片段大小
D1	5'-TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAAC	511

	CG-3'	
D2	5'-TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGT	511
	TC-3'	
TS1	5'-CGTCTCAGTGATCCGGGGG-3'	482 (D1+TS1)
TS2	5'-CGCCACAAGGGCCATGAACAG-3'	119 (D1+TS2)
TS3	5'-TAACATCATCATGAGACAGAGC-3'	290 (D1+TS3)
TS4	5'-CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA-3'	392 (D1+TS4)

#### 4.3.2 PCR 扩增

根据实验室内所使用病毒核酸 PCR 扩增试剂盒特点，正向引物 D1 和反向引物 D2 配置第一轮 PCR 体系，进行第一轮 PCR 扩增。推荐反应条件为

94℃预变性 2min，然后 94℃变性 30 秒，55℃退火 30 秒，72℃延伸 1 分钟，反应 40 循环，最后 72℃延伸 10 分钟。

第二轮分型 PCR 扩增体系配置采用正向引物 D1 与反向引物 TS1、TS2、TS3 和 TS4。推荐反应条件为 94℃预变性 2min，然后 94℃变性 30 秒，55℃退火 30 秒，72℃延伸 1 分钟，反应 30 循环，最后 72℃延伸 10 分钟。

4.3.3 1.5%浓度琼脂糖电泳分析，确定病毒型别。

#### 4.3.4 结果判读

##### 4.3.4.1 阳性：

1 型：电泳显示略小于 500 bp 的 DNA 片段。

2 型：电泳显示略大于 100bp 的 DNA 片段。

3 型：电泳显示略小于 300bp 的 DNA 片段。

4 型：电泳显示略小于 400bp 的 DNA 片段。

4.3.4.2 阴性：无特异性核酸片段扩增。

#### 4.3.5 意义

阳性结果可以确诊登革病毒感染，可用于登革热早期诊断。

### 4.4 实时定量 RT-PCR 法分型检测登革病毒核酸

#### 4.4.1 引物与探针

引物/探针	序列	荧光标记
DEN-1 8973F	CAAAAGGAAGTCGTGCAATA	
DEN-1 9084C	CTGAGTGAATTCTCTCTACTG AACC	

DEN-1 8998probe	CATGTGGTTGGGAGCACGC	FAM/BHQ-1
DEN-2 1443F	CAGGTTATGGCACTGTCACGA	
DEN-2 1518C	T CCATCTGCAGCAACACCATCT	
DEN-2 1469probe	C CTCTCCGAGAACAGGCCTCGA	HEX/BHQ-1
DEN-3 740F	CTTCAA	
DEN-3 813C	GGACTGGACACACGCACTCA	
DEN-3 762probe	CATGTCTCTACCTTCTCGACTT	
DEN-4 904F	GTCT	
DEN-4 992C	ACCTGGATGTCGGCTGAAGG	TexasRed/BHQ-2
DEN-4 960probe	AGCTTG	
	TTGTCCTAATGATGCTGGTCG	
	TCCACCTGAGACTCCTTCCA	
	TTCCTACTCCTACGCATCGCA	Cy5/BHQ-3
	TTCCG	

#### 4.4.2 实时荧光定量 RT-PCR 扩增

实时荧光定量 RT-PCR 扩增反应配置体系，参考如下：

RNA 模板 5  $\mu$ l，酶 0.5  $\mu$ l，缓冲液 12.5  $\mu$ l，引物各 0.5  $\mu$ l(共 4 对,8 条)，探针各 0.25  $\mu$ l，加水至总体积 25  $\mu$ l。

推荐反应条件为 50 $^{\circ}$ C 30min，95 $^{\circ}$ C 2min，95 $^{\circ}$ C 15s、60 $^{\circ}$ C 30s 反应 40 个循环。

#### 4.4.3 结果判断

以荧光 PCR 反应的前 3~15 个循环的荧光信号作为本底信号，以本底信号标准差的 10 倍作为荧光阈值，标本扩增产生的荧光信号达到荧光阈值时所对应的循环数为循环阈值（Ct 值），以 Ct<35 荧光信号数据线性化处理对应循环数生成的曲线图成“S”形的标本，可判断为相应的登革病毒核酸检测阳性。

#### 4.4.4 意义

是一种灵敏、特异、低污染的登革病毒 RNA 检测方法，可以定性或定量检测登革热患者血清或蚊媒标本中的登革病毒。



## 附件 5

### 细胞培养分离登革病毒

#### 1 目的

分离登革病毒。

#### 2 适用范围

2.1 无菌采集发病后 5 日内的登革患者血标本。

2.2 经研磨处理的媒介蚊标本（详见附件 11）。

#### 4 实验前准备

4.1 核对被检样品：患者标本应核对患者的姓名、性别、年龄、编号及检测项目等。蚊媒标本应核对标本种类、编号、性状等。

4.2 生长状态良好的单层登革病毒敏感细胞 C6/36，BHK21，VERO 等

4.3 待测样品在检测前应放置于 2-8℃冰箱或置于冰上。

#### 5、操作步骤

5.1 取 10 $\mu$ L 患者血清或蚊悬液 20 $\mu$ L 用 Hank's 液稀按 1: 10 稀释至 0.1mL 或 0.2mL 备用。

5.2 将在 24 孔细胞培养板上培养好的单层细胞上清弃掉，用 Hank' s 液洗涤 2 遍。

5.3 将稀释好的标本接种细胞，接种 C6/36 细胞在 28℃吸附 1 小时，BHK21 细胞在 37℃吸附 1 小时，补加维持液至 1mL，C6/36 细胞在 28℃培养，BHK21 细胞在 37℃培养。

5.4 第二天开始观察细胞病变情况。如果没有细胞病变，则盲传 3 代（每次取细胞悬液 0.1ml）接种细胞传代。

#### 5.4 免疫荧光法鉴定登革病毒

##### 5.4.1 细胞抗原片的制备：

出现“++”细胞病变的细胞倒去维持液（若盲传无细胞病变出现，仍然按此方法制备），用 pH7.2 PBS 洗涤 2 次，加 PBS 用滴管把细胞从管壁上吹下，吹散，1000 转/分钟离心 5 分钟，弃去 PBS，细胞沉淀用 0.2mlPBS 吹散，滴加在抗原片上，吹干，冷丙酮固定 10 分钟，PBS 冲洗 2 次，蒸馏水漂洗 1 次，吹

干备用；

5.4.2 按顺序滴加荧光标记单克隆抗体 2 孔，对照 2 孔（加 PBS），置湿盒内 37℃ 水浴 30 分钟；

5.4.3 取出，用 PBS 冲洗 3 次，蒸馏水漂洗 1 次，吹干；

5.4.4 荧光显微镜观察结果。

5.5 其他检测病毒抗原或核酸鉴定登革病毒详见附件 2、4、5。

5.6 结果判断：

免疫检测有特异性黄绿色颗粒状荧光，检测出病毒 NS1 抗原或病毒核酸可确定病毒分离成功。

5.7 意义：从病人血清或蚊媒中分离出登革病毒，可确诊登革感染。

6 废弃物处理

所有实验用品都应严格按照有关传染病处理方法高压处理。

## 附件 6

### IgM 捕捉 ELISA 法 (MacELISA) 检测登革热 IgM 抗体

#### 1 目的

检测出登革病毒特异性 IgM 抗体。

#### 2 适用范围

适用于人血清或血浆中登革病毒特异性 IgM 抗体的快速检测。

#### 3 样品接收和准备

3.1 核对被检样品 (血清或血浆) 患者的姓名、编号及检测项目等。

3.2 待测样品在检测前应放置于 2-8℃ 冰箱或置于冰上。

#### 4 检测项目及参数

本方法检测项目为检测血清或血浆中病毒特异性 IgM 抗体

#### 5 检测仪器设备和材料

加样器、温箱、洗板机、含波长 450nm 的酶标仪、登革病毒 IgM 抗体检测试剂盒, 或实验室自备材料:

##### 5.1 抗原:

阳性抗原: 采用 C6/36 细胞感染登革病毒培养物为阳性抗原。

阴性抗原: 未接种病毒的正常 C6/36 细胞为阴性抗原对照。

##### 5.2 抗人 IgM (μ 链) 单克隆抗体或多克隆抗体;

##### 5.3 登革病毒 IgM 阳性、阴性对照血清;

##### 5.4 辣根过氧化物酶标记登革病毒单克隆抗体;

##### 5.5 缓冲液:

洗涤液: pH7.4 PBS-T (0.05% 吐温-20);

稀释液: pH7.4 PBS (5% 牛血清);

封闭液: pH9.6 碳酸缓冲液 (1% 牛血清白蛋白);

##### 5.6 显色液: A/B 液

##### 5.7 终止液: 4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

## 6 检测的环境条件

生物安全二级实验室（BSL-2）中进行,灭活后样本在生物安全一级实验室（BSL-1）内进行。

## 7 检测原理

本方法采用抗人  $\mu$  链捕获人血清 IgM 抗体，加辣根过氧化物酶标记的病毒抗原物，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。适用于出血热的早期特异性诊断及其它实验性研究。

## 8 检测步骤

8.1 用稀释液按效价稀释抗人  $\mu$  链单克隆抗体，100  $\mu$  l/孔，加盖，4℃过夜；

8.2 弃去抗人  $\mu$  链，用洗涤液重复洗 3 次，甩干，加封闭液，100  $\mu$  l/孔，置 37℃水浴孵育 2 小时；

8.3 弃封闭液，用洗涤液重复洗 3 次，甩干。

8.4 将待检血清用稀释液从 1: 10 开始作 2 或 4 倍连续稀释，加入酶标板孔中，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 4 孔，100  $\mu$  l/孔，置 37℃水浴孵育 2 小时；

8.5 弃去血清，用洗涤液重复洗 3 次，甩干，分别加 4 个型 DV 抗原及阴性抗原对照，100  $\mu$  l/孔，4℃过夜；

8.6 弃抗原，用洗涤液重复洗 3 次，甩干，加用稀释液稀释至工作浓度的相应的登革热酶标单克隆抗体，正常抗原加 4 个型混合的酶标单克隆抗体，100  $\mu$  l/孔，37℃水浴 2 小时；

8.7 弃去标记物，用洗涤液重复洗 3 次，甩干，于各反应孔内加 A/B 液各一滴，37℃，避光 3~5 分钟；

8.8 加终止液于每反应孔，一滴/孔。

## 9 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），则标本为登革热 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  $\geq 2.1$ , 则标本为登革热 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)

## **10 意义**

阳性结果, 提示患者新近登革病毒感染, 用于登革热早期临床诊断。

## 附件 7

### 酶联免疫法检测登革病毒 IgG 抗体标准操作程序

#### 1 目的

检测出登革病毒特异性 IgG 抗体。

#### 2 适用范围

适用于人血清或血浆中登革病毒特异性 IgG 抗体的快速检测。

#### 3 实验前准备

- (1) 核对被检样品（血清或血浆）患者的姓名、编号及检测项目等。
- (2) 待测样品在检测前应放置于 2-8℃ 冰箱或置于冰上。

#### 4 检测项目及参数

本方法检测项目为检测血清或血浆中病毒特异性 IgG 抗体

#### 5 检测仪器设备和材料

加样器、温箱、洗板机、含波长 450nm 的酶标仪、登革病毒 IgG 抗体检测试剂盒，或实验室自备材料：

##### 5.1 抗原：

阳性抗原：采用 C6/36 细胞感染登革病毒培养物为阳性抗原。

阴性抗原：未接种病毒的正常 C6/36 细胞为阴性抗原对照。

##### 5.2 辣根过氧化物酶标记的抗人 IgG 抗体；

##### 5.3 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）；

##### 5.4 显色液：A/B 液

##### 5.5 终止液：4NH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

##### 5.6 酶标板、酶标仪。

#### 6 检测的环境条件

生物安全二级实验室（BSL-2）中进行，灭活后样本在生物安全一级实验室

(BSL-1) 内进行。

## 7 检测步骤

- 7.1 用包被液按工作浓度稀释抗原，100 $\mu$ l/孔，4 $^{\circ}$ C过夜；
- 7.2 弃去包被液，用 PBS-T 重复洗涤 3~5 次，甩干；
- 7.3 将待检血清用稀释液从 1: 100 开始作 2 或 4 倍连续稀释，加入抗原孔，100 $\mu$ l/孔，同时设阴、阳性对照，37 $^{\circ}$ C 水浴 1 小时；
- 7.4 弃去血清，用洗涤液洗涤 5~6 次；
- 7.5 加酶结合物，用稀释液按工作浓度稀释，100 $\mu$ l/孔，37 $^{\circ}$ C 水浴 1 小时；
- 7.6 弃去酶标抗体，用洗涤液洗涤 6 次，甩干；
- 7.7 加显色液：于各反应孔内加 A/B 液各一滴，37 $^{\circ}$ C，避光 3~5 分钟；
- 7.8 加终止液于每反应孔，100 $\mu$ l /孔。

## 8 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  $\geq 2.1$ ，则标本为登革热 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)

## 9 意义

阳性结果，表明曾受到 DV 感染；恢复期血清抗体阳转，或抗体滴度比急性期抗体滴度有 4 倍及以上升高则可确诊。

## 附件 8

### 免疫荧光法检测登革病毒 IgG 抗体标准操作程序

#### 1 目的

免疫荧光法（IFA）检测抗登革病毒 IgG 抗体。

#### 2 适用范围

适用于人血清或血浆中登革热病毒特异性 IgG 抗体的快速检测。

#### 3 实验前准备

- （1）核对被检样品（血清或血浆）患者的姓名、编号及检测项目等。
- （2）待测样品在检测前应放置于 2-8℃ 冰箱或置于冰上。

#### 5 检测项目及参数

本方法检测项目为检测血清或血浆中抗登革热病毒 IgG 抗体

#### 6 检测仪器设备和材料

6.1 DV1~4 型抗原片：DV 标准毒株感染 VERO 或 BHK21 细胞制备，低温干燥保存；

6.2 对照：登革热患者恢复期血清（阳性对照），非登革热患者血清（阴性对照）；

6.3 羊抗人（或兔抗人）IgG 荧光素标记抗体；

6.4 常用稀释液：pH7.2~7.4PBS、伊文思兰等；

6.5 荧光显微镜。

#### 7 检测的环境条件

生物安全二级实验室（BSL-2）中进行，样本灭活后可在生物安全一级实验室（BSL-1）内进行。

#### 8 检验步骤：

8.1 用 pH7.4, 0.02mol/L PBS 稀释待检血清，从 1:20 开始做 2 倍连续稀释至需要的稀释度。

8.2 取出抗原片，用蒸馏水漂洗后，风干。

8.3 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 分钟（每次试验同时设阳、阴性对照）。

8.4 用 PBS 震荡洗涤 3 次，每次 5 分钟，再用蒸馏水洗涤 1 次脱盐，风干。

8.5 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。

8.6 荧光显微镜观察结果。

## 9 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。

## 10 意义：

阳性结果，表明曾受到登革病毒感染，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 9

### 伊蚊标本采集与处理操作程序

#### 1 目的

采集登革病毒媒介伊蚊标本，编号、分装和检测前处理。

#### 2 操作步骤

2.1 伊蚊成蚊捕获时间应定在 8:30~10:00 或 18:00~20:00。埃及伊蚊分布区采用入户搜捕的方法，在监测点按东、南、西、北、中方位各选 1 户，在住户厨房和住房寻找伊蚊，采用电动捕蚊器捕捉，每户 12 分钟。白纹伊蚊可在房前屋后周围选择东、南、西、北、中 5 个捕蚊点，每点 12 分钟。

2.2 吸过血的可疑媒介蚊，用 0.5mol/L (10%) 葡萄糖液喂养，至胃血完全消化

2.3 按蚊种及捕获地点分组，每 10~20 只/组，按捕获蚊种类-地点-序列号的规则编号，并填写调查表。

2.4 用含双抗（青霉素、链霉素，终浓度各 1000U/ml）的 Hank's 液冲洗 3 次后，用研磨器研碎，每组加含双抗（青霉素、链霉素，终浓度各 1000U/ml）的 Hank's 液 0.5ml，2000 转/分钟离心 15 分钟，取上清用于登革病毒核酸检测和/或病毒分离。

2.5 3 如不能及时检测，应将标本保存于-70℃以下冰箱，并记录标本量和盒中位置。



附表 1 疑似登革热病人检材送检一览表

编号	患者姓名	性别	年龄	职业	住址	联系电话	临床诊断	发病日期	取材日期	检材种类	检验项目	备注

送检单位： \_\_\_\_\_

送检人： \_\_\_\_\_ 送检日期： \_\_\_\_\_

接收单位： \_\_\_\_\_

接收人： \_\_\_\_\_

附表 2 病原学检测结果一览表

地区：

标本编号	标本类型	采集日期	病例的传染病 报告卡 ID	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：\_\_\_\_\_