

ICS 11.020

C59

备案号:25520—2009

WS

中华人民共和国卫生行业标准

WS 297—2008

风疹诊断标准

Diagnostic criteria for rubella

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	2
5 诊断	2
6 鉴别诊断	2
附录 A(资料性附录)流行病学、病原学、临床表现与鉴别诊断	3
附录 B(规范性附录)病原学诊断方法	5
附录 C(规范性附录)血清学诊断方法	8

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),GB 17009—1997《风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 为资料性附录,附录 B、附录 C 为规范性附录。

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:北京市疾病预防控制中心、北京儿童医院。

本标准主要起草人:孙美平、陈丽娟、王亚娟、杨永弘、刘东磊。

风疹诊断标准

1 范围

本标准规定了风疹和先天性风疹综合征的诊断依据、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风疹和先天性风疹综合征的诊断、报告。

2 缩略语

RNA	核糖核酸
CRS	先天性风疹综合征
IgM	免疫球蛋白 M
IgG	免疫球蛋白 G
CPE	细胞病变效应
RT	逆转录
PCR	聚合酶链式反应
ELISA	酶联免疫吸附试验

3 诊断依据

3.1 风疹

3.1.1 流行病学史

既往未患过风疹,在发病前 14d~21d 内与确诊的风疹患者有明确接触史。

3.1.2 临床表现(参见附录 A.3.1)

3.1.2.1 发热,一般为低热或中度发热,1d~2d。

3.1.2.2 全身皮肤在起病 1d~2d 内出现淡红色充血性斑丘疹。

3.1.2.3 耳后、枕后、颈部淋巴结肿大或结膜炎或伴有关节痛(关节炎)。

3.1.3 实验室检查

3.1.3.1 咽拭子或尿液标本分离到风疹病毒,或检测到风疹病毒核酸。

3.1.3.2 血清风疹 IgM 抗体阳性(1 个月内未接种过风疹减毒活疫苗)。

3.1.3.3 恢复期血清风疹 IgG 抗体或风疹血凝抑制抗体滴度较急性期升高 ≥ 4 倍。

3.1.3.4 急性期抗体阴性而恢复期抗体阳转。

3.2 先天性风疹综合征

3.2.1 流行病学史

患儿母亲在妊娠早期有风疹病毒感染史。

3.2.2 临床表现(参见 A.3.2)

3.2.2.1 低出生体重,先天性心脏病,白内障/青光眼,视网膜病,神经性耳聋。

3.2.2.2 血小板减少性紫癜,溶血性贫血,再生障碍性贫血,脾肿大,黄疸,精神发育迟缓,小头畸形,脑膜脑炎,X 线骨质异常。

3.2.3 实验室检查

3.2.3.1 婴儿咽拭子、鼻咽吸出物、血/淋巴细胞、尿液、脑脊液或脏器活检标本分离到风疹病毒或检测到风疹病毒 RNA。

风疹病毒的分离按附录 B 中 B.1 进行,风疹病毒 RNA 检测按 B.2 规定进行。

- 3.2.3.2 婴儿血清风疹 IgM 抗体阳性,检测方法按附录 C 进行。
- 3.2.3.3 婴儿风疹 IgG 抗体水平持续与母体抗体水平持平或更高。

4 诊断原则

根据临床表现结合流行病学做出临床诊断。根据血清风疹抗体的检测或风疹病原学检测结果予以确诊。

5 诊断

5.1 风疹

5.1.1 疑似病例

符合以下任何一项者:

- 5.1.1.1 同时符合 3.1.2.1、3.1.2.2。
- 5.1.1.2 同时符合 3.1.2.2、3.1.2.3。

5.1.2 临床诊断病例

疑似病例并同时符合 3.1.1。

5.1.3 确诊病例

疑似病例并同时符合 3.1.3 中的任何一项。

5.2 先天性风疹综合征

5.2.1 疑似病例

具备 3.2.2.1 和(或)3.2.2.2。

5.2.2 临床诊断病例

疑似病例并同时符合 3.2.1。

5.2.3 确诊病例

疑似病例并同时符合 3.2.3 中的任何一项。

6 鉴别诊断

风疹皮疹易与麻疹、猩红热、登革热和幼儿急疹混淆,应进行鉴别,参见附录 A 中 A.4。

附录 A

(资料性附录)

流行病学、病原学、临床表现与鉴别诊断

风疹为风疹病毒感染引起的急性传染病,临床以发热、全身性皮疹、淋巴结肿大为特点。孕妇在妊娠早期感染风疹病毒,可引起胎儿受感染,造成发育迟滞和胎儿畸形等严重后果。

A.1 流行病学

A.1.1 传染源

风疹患者是传染源。

A.1.2 传播途径

风疹通过呼吸道飞沫传播,母亲在孕期患风疹,可以通过胎盘侵入胎儿。

A.1.3 流行季节

一年四季均可发生,冬春季是风疹发病高峰。

A.1.4 传染性

风疹传染力中等。在患者出现皮疹时传染力最强,皮疹前 7d 到疹后 5d 均具有传染性。先天性风疹综合征的婴儿可以在出生后数周、数月甚至 1 年的时间内排毒。

A.1.5 易感人群

人群普遍易感,感染后可以获得持久的免疫力。免疫力低下者可以发生再感染。

A.2 病原学

A.2.1 形态结构

风疹病毒(Rubella virus)属于披膜病毒科风疹病毒属。其直径 50nm~70nm,呈不规则球型,中心病毒核酸为单股正链 RNA 有感染性,外有核壳体呈对称的二十面体,表面有脂质包膜,包膜表面有短刺突,能凝集多种动物红细胞。

A.2.2 血清与基因分型

风疹病毒只有一个血清型,可分为 Clade1 和 Clade2 两组,各组分别有 6 个(A 至 F)和 3 个(A 至 C)基因型。

A.2.3 主要结构蛋白

风疹病毒有三个重要的结构蛋白,糖蛋白 E₁ 和 E₂ 位于包膜,E₁ 能刺激机体产生血凝抑制抗体和中和抗体,E₂ 也可刺激机体产生中和抗体,C 是一种非糖基化蛋白,位于壳体。

A.2.4 抵抗力与培养特性

风疹病毒对紫外线和脂溶剂敏感。可在许多不同的原代和传代细胞内培养繁殖,但许多细胞系被病毒感染后,并不出现明显的细胞病变。

A.3 临床表现

A.3.1 风疹

A.3.1.1 潜伏期

一般为 14d~21d,平均 18d。

A.3.1.2 前驱期

一般为 1d~2d。前驱期症状轻或无明显症状。有低热或中度发热,也见高热者,持续 1d~2d,3d 以上者少见。此外,尚见有咳嗽、喷嚏、流涕、咽痛、嘶哑、头痛、眶后疼痛、结膜炎、食欲不振等。部分患

者可在软腭及咽部附近见到充血性斑疹,大小如针尖或稍大,但无黏膜斑。

A. 3. 1. 3 发疹期

发热 1d~2d 后出疹,迅速由面部、颈部、躯干波及四肢,仅 1d 内布及全身,但手掌、足跖大多无疹。皮疹呈浅红色,稍稍隆起,大小约 2mm,分布均匀,疹间有正常皮肤,躯干尤其是背部皮疹较密集。皮疹于 1d~4d 消退,不留色素沉着,无脱屑或有细小脱屑,可伴有轻至中度发热及上呼吸道感染症状,随疹退而消退。

A. 3. 1. 4 淋巴结肿大

耳后、枕后及颈部淋巴结肿大,可有轻度压痛,不融合,不化脓。皮疹出现后,淋巴结消退较慢,常持续 2 周~3 周。

A. 3. 2 先天性风疹综合征

妊娠早期感染风疹可造成死胎、流产,自然流产率可达 20%。出生后患先天性风疹的婴儿死亡也较多。多数先天性风疹患儿出生即有临床症状,也可于出生后数月至数年才出现进行性症状。新生儿出生后可表现为低体重,肝、脾肿大,黄疸,紫癜,贫血,前囟饱满,脑炎、脑膜炎,或间质性肺炎等。出生即发现先天性心脏病、白内障、耳聋、小头畸形等预后差。先天性心脏病、白内障及耳聋是先天性风疹综合征存活儿常见的表现。

A. 4 鉴别诊断

A. 4. 1 麻疹

风疹与麻疹流行季节相同,临床症状相似。麻疹前驱期 3d~4d,好发年龄为 1 岁~5 岁。全身症状严重,高热、卡他症状明显。口腔黏膜斑,常见于颊黏膜近白齿处约 0.5mm~1mm 大小散在白色小点,周围有红晕,也可见于下唇内侧面与牙龈之间,软腭及咽弓等处黏膜。发热 3d~4d 出疹,先于耳后、面部出现,自上而下蔓延;皮疹形态为充血性斑丘疹,疹间皮肤正常,密集时可融合成片;出疹持续约 3d~5d,热退疹退,退疹处脱皮屑留有色素沉着。曾经接种过麻疹疫苗的患者症状可不典型,容易和风疹混淆。

A. 4. 2 猩红热

前驱期 1d,好发年龄为 5 岁~15 岁。临床表现为高热,头痛,咽部和扁桃体炎症明显,局部可见黄白色脓性渗出物,咽喉痛。皮肤普遍充血,上有鲜红斑点疹,先见于颈、胸,发展较快,1d 内迅速发展至全身,皮疹 48h 达高峰,一般 2d~3d 消退,重者可持续 1 周,面部无疹,但可见口周苍白圈,有杨梅舌。咽培养可有 A 组 β 型溶血性链球菌生长。

A. 4. 3 登革热

流行于南方地区蚊虫叮咬季节,潜伏期为 3d~14d,平均 6d 左右,为急性发热性疾病,其特征为头痛、高热、全身乏力、严重的关节和肌肉痛、淋巴结肿大和皮疹,皮疹多在双峰热的第二次体温升高时出现。

A. 4. 4 幼儿急疹

无前驱期,好发年龄为 6~18 个月。临床表现为高热,持续 3d~5d,一般状况好,热退同时出疹,皮疹为不规则充血性斑点或斑丘疹,压之褪色,1d~3d 内全部褪尽,无脱屑和色素沉着。

附 录 B
(规范性附录)
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**

风疹患者宜在出疹前 4d~5d 至疹后 1d~2d 取咽拭子和尿液标本。先天性风疹综合征患儿除取咽拭子、尿液标本外,亦可根据情况于出生后尽快取鼻咽吸出物、血/淋巴细胞、脑脊液或脏器活检标本。

B. 1. 1. 2 咽拭子标本

将灭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 标本运输液(HEPES 缓冲液配制的 Hanks' 基础盐溶液 pH7.4)中,并反复挤压后,弃棉拭子。

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,当天尽快冷链送至实验室,2000r/min,离心 30min,弃上清,沉淀用 1mL 标本维持液重悬,不能及时上样时,标本液于-70℃条件冻存。

B. 1. 2 标本接种

取 0.3mL~0.5mL 标本液接种于规格为 25cm² 培养瓶中生长良好的单层传代细胞系如 Vero、BHK21、RK13 上,置 37℃ 吸附 1h~2h 后弃液,再加入 7mL 维持液,置 35℃ 培养,次日观察有无细胞毒性存在,必要时换液。

B. 1. 3 观察细胞病变

以后每隔 1d~2d 观察细胞病变效应(CPE),连续观察 7d~8d,若无 CPE,应取细胞培养上清液,盲传 3 代。

风疹病毒 CPE 进展缓慢且较难分辨。经常需盲传 1~2 代后出现细胞圆化,稍胀大,细胞内颗粒增加,常在圆化细胞下仍是一层形态较正常的细胞。若不出现或出现可疑 CPE,可在接种标本 7d~8d 后用 100TCID₅₀ 的 ECH011 病毒或脊髓灰质炎 I 型疫苗病毒攻击,并设正常细胞对照。若对照出现病变,接种标本管无病变,表示有病毒感染的存在。

B. 1. 4 毒株鉴定

用已知风疹病毒免疫血清,观察能否与新分离的毒株反应。传统用中和试验、血凝抑制试验或采用免疫荧光法作病毒鉴定。较为简便的方法是采用血凝抑制试验,即用两支试管盛装二份阳性分离物,分别加入等量风疹阳性血清和正常动物对照血清,37℃ 作用 1h 后,分别测定血凝效价,若试管中加风疹阳性血清的血凝效价低于加正常对照血清者 4 倍或 4 倍以上,可判定阳性分离物为风疹病毒。目前普遍采用检测风疹病毒核酸的方法来鉴定风疹分离病毒株。检测方法参见 A. 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(按照供应商提供的最新说明进行操作)

B. 2. 2. 1 利用核酸提取试剂盒,进行病毒 RNA 提取;

B. 2. 2. 2 吸取样品 140μL,加入 560μL 裂解液,混匀,室温孵育 10min;

- B.2.2.3 加入 560 μ L 的冰冷无水乙醇,混匀;
- B.2.2.4 取 630 μ L 混合液于吸附柱中,8 000r/min 离心 1min;
- B.2.2.5 重复 B.1.2.2.4;
- B.2.2.6 取出吸附柱于另外一个 1.5mL 的离心管;
- B.2.2.7 吸取 500 μ L Buffer AW1,8 000r/min 离心 1min;
- B.2.2.8 取出吸附柱于另外一个 1.5mL 的离心管;
- B.2.2.9 吸取 500 μ L Buffer AW2,13 000r/min 离心 4min;
- B.2.2.10 取出吸附柱于另外一个 1.5mL 的收集管;
- B.2.2.11 在吸附柱上加 30 μ L Buffer AVE,静置 1min,8 000r/min 离心 1min,滤出液保存于一80 $^{\circ}$ C 冰箱。

B.2.3 病毒核酸的 RT-PCR 检测

B.2.3.1 病毒 RNA 逆转录

- a) 吸取 16 μ L RNA 和 1 μ L 随机引物于离心管中,70 $^{\circ}$ C 孵育 5min;
- b) 取出离心管,立即冰浴;
- c) 分别加入 5 μ L 5 \times 逆转录缓冲液、1 μ L 10mM 的 dNTPs、1 μ L MMLV 和 1 μ L RNasin;
- d) 瞬时离心后,放入 PCR 仪,先升至 42 $^{\circ}$ C 孵育 45min;
- e) 然后 95 $^{\circ}$ C 孵育 5min,置冰上 3min,冻存于一20 $^{\circ}$ C 冰箱备用;

B.2.3.2 PCR 扩增

- a) 按照下面的流程,配液:

1. ddH ₂ O	19.5 μ L \times
2. 25mM Mg ⁺⁺	3 μ L \times
3. 10 \times buffer	5 μ L \times
4. dNTP(2.5mM)(每种)	8 μ L \times
5. Primer-R2(25 μ mol/L)	2 μ L \times
6. Primer-R7(25 μ mol/L)	2 μ L \times
7. TaqE(5U)	0.5 μ L \times

- b) 离心混匀后,每管分装 40 μ L,再分别加入 10 μ L 逆转录产物;

- c) 按照如下条件,PCR 扩增目的片段:

95 $^{\circ}$ C	3min	} \times 30~35 个循环
95 $^{\circ}$ C	30s	
45 $^{\circ}$ C~50 $^{\circ}$ C	30s	
72 $^{\circ}$ C	1min	
72 $^{\circ}$ C	10min	

B.2.3.3 电泳检测

分别取 PCR 产物上样,电泳检测 PCR 结果。

B.2.4 病毒核酸序列分析

B.2.4.1 回收风疹 PCR 产物(按照最新试剂盒操作说明书进行 PCR 产物回收)

- a) 加入 5 倍体积的 PB 缓冲液,混匀,加入柱子中;
- b) 13 000r/min 离心 1min;
- c) 取柱子于另外一个离心管中,加入 0.75mL 的 PE 缓冲液;
- d) 13 000r/min 离心 1min;
- e) 在柱子中加入 50 μ L EB 缓冲液,室温静置 3min;
- f) 13 000r/min 离心 1min,收集 DNA 流出液备用。

B. 2. 4. 2 标记回收的 PCR 产物

a) 取 1 μ L PCR 回收产物,再分别加入 3.33pmol 的引物、8 μ L Bigdye,加入 ddH₂O 至终体积 20 μ L;

b) 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	2min	
4 $^{\circ}$ C		

B. 2. 4. 3 标记产物的回收

a) 取 2.7g G50 至 50mL 的 ddH₂O 中,混匀后冷藏,用前室温平衡;

b) 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;

c) 2500r/min 离心 2min,弃废液;

d) 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;

e) 将柱子放入新的离心管,2500r/min 离心 2min;

f) 产物在 PCR 仪上 70 $^{\circ}$ C 烘干;

g) 加入 20 μ L 甲酰胺溶解,95 $^{\circ}$ C 变性 5min;

h) 取出离心管,立即冰浴;

B. 2. 4. 4 上样、测序分析

附 录 C
(规范性附录)
血清学诊断方法

C.1 标本的采集、运送及储存

C.1.1 血液样本采集、处理和运送

- a) 采集和处理血液标本要严格遵循无菌原则,在静脉或毛细血管取血。
- b) 使用注射器或真空采血针头静脉采血,将血液标本注入无菌平口离心管、无菌试管或真空管中。立刻标明患者姓名、采血日期和标本号,确保标记的信息与病例调查表和实验室结果登记表中的信息相符。
- c) 血液标本于室温静置 30min~60min 后,置普通或冷冻离心机 1 500r/min~2 000r/min、离心 15min~20min。若没有配备离心机,血液标本需在 4℃冰箱放置过夜。
- d) 无菌移液器将血清转移至两支无菌试管或离心管(最好是带螺盖的塑料制品)中,一份备用,一份用于检测。
- e) 用非水溶性的标记笔在两支试管或离心管上标记有关信息,在可粘贴的标签上也写明有关信息,确认所标记的信息与病例调查表中的信息相符。
- f) 检查试管或离心管盖是否拧紧,建议用封口膜或胶带封好管口,以备安全运送。
- g) 根据国际认可的标准程序,将血清标本连同它的实验室登记表一起送至风疹参考实验室。运送时间间隔大于 48h,最好将血清冷冻并用装有冰块(有干冰更好)的冷藏包运送至参考实验室。

C.1.2 血清标本的储存

- a) 血清储存条件有两种:一种是 2℃~8℃冷藏温度,另一种是 ≤-20℃ 冷冻温度。
- b) 最好避免反复冻化。若接收的血清标本能在 7d 内检测,宜在 2℃~8℃ 条件下储存;否则宜在 ≤-20℃ 条件冷冻保存。

C.2 实验室检测

根据采集血液标本检测的目的不同,实验室选择的检测项目和方法也各异。每一次检测最好使用同一种试剂盒,确保数据报告的一致性。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。每一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。

C.2.1 IgM 检测诊断风疹和先天性风疹综合征

用于诊断风疹的血液标本要在出疹后 28d 内采集。用于诊断婴幼儿的先天性风疹感染或证实先天性风疹综合征的血液标本应尽早收集,若第 1 份标本的风疹 IgM 检测阴性,而对于确实存在临床或流行病学意义的先天性风疹综合征可疑病例,需采集第 2 份血液标本。

C.2.1.1 ELISA 捕捉法检测风疹 IgM 抗体

C.2.1.1.1 原理

利用包被在固相载体上的抗人 IgM μ 链抗体,捕捉待检血清中的 IgM,再用风疹病毒抗原和已知的酶标风疹病毒抗体去检测血清中 IgM 是否为抗风疹抗体。利用底物使酶显色而测知。

C.2.1.1.2 材料

- a) 聚苯乙烯 40 孔或 96 孔板。
- b) 抗人 IgM μ 链抗体。

- c) 风疹病毒抗原和正常对照抗原。
- d) 抗风疹病毒抗体(单克隆或多克隆)。
- e) 酶标抗抗体:抗风疹病毒抗体和酶标抗抗体也可用酶标抗风疹病毒抗体代替。
- f) 酶底物—邻苯二胺及双氧水。
- g) 已知的风疹 IgM 抗体阳性和阴性血清。
- h) 包被液:0.05mol/L 碳酸盐缓冲液(pH9.6)
- | | |
|-------|---------------|
| 无水碳酸钠 | 159mg |
| 碳酸氢钠 | 293mg,使用不超过2周 |
| 蒸馏水 | 加至100mL |
- i) 洗涤液(NS-T):0.85%盐水的吐温液
- | | |
|-----|----------|
| 氯化钠 | 17g |
| 吐温 | 201.0mL |
| 蒸馏水 | 加至2000mL |
- j) 稀释液为5%牛血清的 NS-T 液。
- k) 邻苯二胺—过氧化氢底物液
- 先配柠檬酸磷酸缓冲液(pH5.0);
- | | |
|-------|------------------|
| 磷酸氢二钠 | 18.41g |
| 柠檬酸 | 5.1g |
| 蒸馏水 | 加至1000mL,分小瓶冰冻保存 |
- 临用时配底物液:
- | | |
|-----------|------|
| 邻苯二胺(OPD) | 4mg |
| 柠檬酸磷酸缓冲液 | 10mL |
| 30%双氧水 | 5mL |

C.2.1.1.3 检验步骤

- a) 包被抗人 IgM μ 链抗体,每孔 100 μ L。
- b) 4 $^{\circ}$ C 过夜,倒掉液体,用 10%牛血清 NS-T 液 120 μ L 封闭。
- c) 37 $^{\circ}$ C 1h 后倒去封闭液,洗三次。
- d) 加待测血清(1:100 稀释,即 1 μ L 待测血清加 100 μ L 稀释液),每孔 100 μ L。每份血清加 2 孔(或 4 孔),37 $^{\circ}$ C 2h 后洗三次。
- e) 加风疹抗原于 1 孔(或 2 孔)中,每孔 100 μ L;另 1 孔(或 2 孔)中加正常对照抗原,4 $^{\circ}$ C 过夜后,洗三次。
- f) 加风疹单克隆抗体每孔 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 1.5h 后倒去抗体,洗三次。
- g) 加酶标记的抗鼠抗体,每孔 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 1.5h 后倒去抗鼠抗体,洗 4 次,拍干。
- h) 前两步,亦可用加酶标抗风疹单克隆(或多克隆)抗体一步所取代,每孔加 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 水浴 2h,洗 3 次,拍干。
- i) 加 TMB(四甲基对二氨基联苯)-双氧水底物液,每孔 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 10min~20min。
- j) 加终止酶的反应液即 2mol/L 硫酸,50 μ L/孔,判定结果。

C.2.1.1.4 结果的判定

- a) 肉眼判定法:待检血清与风疹抗原孔呈明显的棕色反应,正常对照抗原孔不(或微)显色,两者能用肉眼明显察觉者即为阳性。
- b) 用酶标仪的 492nm 光源测 OD 值,血清的 P/N \geq 2.1 时为阳性(P 为待测血清与风疹抗原作用的 OD 值,N 为待测血清与正常对照抗原作用的 OD 值)。在用待测血清与已知风疹阴性血清对比时,则 P 为待测血清与风疹抗原作用后的 OD 值,N 为标本阴性血清与风疹抗原作用后 OD 值。

C. 2. 1. 2 ELISA 间接法检测风疹 IgM 抗体(按照供应商最新的操作说明进行检测)

C. 2. 1. 2. 1 原理

利用包被在固相载体上纯化风疹病毒抗原,结合待检血清中的 IgM 抗体,形成抗原-抗体复合物,再加入酶标抗人 IgM 抗体,结合的酶使后加入的底物显色,颜色强度与样品中抗体的量成正比。

C. 2. 1. 2. 2 材料与设备

- a) 刻度吸管 10mL。
- b) 微量加样器 5 μ L~20 μ L、100 μ L、10 000 μ L。
- c) 洗板机或类似的清洗装置。
- d) 酶标仪(波长 450nm)。
- e) 诊断试剂盒。

[试剂组成]

抗原包被微孔板:	12 条(8 孔)
吸收液	1 瓶(22mL)
浓缩洗涤液(40 \times)	1 瓶(100mL)
TMB 底物液	1 瓶(15mL)
酶标记物	1 瓶(12mL)
校正品(Index=1)	1 瓶(150 μ L)
阴性对照	1 瓶(150 μ L)
阳性对照	1 瓶(150 μ L)
终止液(2mol/L HCl)	1 瓶(12mL)

[贮存条件] 2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C

C. 2. 1. 2. 3 检验前准备

- a) 将试剂盒恢复至室温(20 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C),约需 30min,并轻轻摇动。
- b) 用蒸馏水将浓缩洗涤液做 1:10 稀释。

C. 2. 1. 2. 4 检验步骤

- a) 用吸收液将待检样品、阴性对照、阳性对照及校正品做 1:40 稀释,即加入 5 μ L 样品到 200 μ L 吸收液中。
- b) 向各孔加入 100 μ L 经稀释吸收处理过的样品、对照和校正品(校正品应做复孔)。空白孔加入 100 μ L 吸收液,混匀,室温(20 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C)放置 30min。
- c) 洗板 3~5 次(每次每孔加 250 μ L 洗涤液),并彻底拍干。
- d) 向各孔加入 100 μ L 酶标记物,室温放置 30min。
- e) 洗板 3~5 次(每次每孔加 250 μ L 洗涤液),并彻底拍干。
- f) 向各孔加入 100 μ L 底物液,室温避光放置 30min。
- g) 向各孔加入 100 μ L 终止液,混匀,5min 后在 450nm 处读数(30min 内读数有效)。

C. 2. 1. 2. 5 结果计算

- a) 计算校正品平均 OD 值。
- b) Index 值=样品 OD 值/校正品平均 OD 值。

C. 2. 1. 2. 6 结果判断

- 阴性:风疹病毒指数 Ab Index \leq 0.90
- 可疑:风疹病毒指数 Ab Index=0.91~0.99,样品应重新检验
- 阳性:风疹病毒指数 Ab Index \geq 1.00,表示当时或近期可能感染

C. 2. 1. 2. 7 质控

空白孔 OD 值 $<$ 0.15,否则应重新检测。

校正品 OD 值 ≥ 0.25 (以空白孔作对照)

阳性对照 Index ≥ 1.10

阴性对照 Index ≤ 0.90

C. 2. 2 IgG 检测诊断风疹和先天性风疹综合征

用于检测 IgG 抗体诊断风疹的第一份血液标本宜在急性期尽早采集,并间隔 2 周~4 周以上采集恢复期血液标本。用于检测 IgG 抗体诊断婴幼儿的先天性风疹感染或证实先天性风疹综合征的血液标本宜在婴儿出生 6 个月以后风疹疫苗接种之前采集,同时须采集婴儿母亲血液标本。

C. 2. 2. 1 ELISA 间接法检测 IgG 抗体原理

将纯化的风疹抗原包被于固相载体上,加上待检血清后其中的特异性风疹 IgG 抗体与之结合形成复合物,再加入酶标抗人 IgG 抗体,结合的酶使后加入的底物显色,颜色强度与样品中特异性风疹 IgG 抗体的量成正比。

C. 2. 2. 2 方法一

C. 2. 2. 2. 1 材料

40 孔聚苯乙烯酶标板。

风疹阴性和阳性血清。

风疹抗原。

抗人 IgG 辣根过氧化物酶结合物。

酶底物邻苯二胺-双氧水。

C. 2. 2. 2. 2 操作程序

- 用 pH9.6 碳酸盐缓冲液稀释风疹抗原与未感染风疹病毒的细胞抗原(对照抗原)。
- 于 40 孔聚苯乙烯板的单排孔与双排孔分别加入 0.1mL/孔的风疹抗原与对照抗原。右下最后一孔不加任何抗原作为空白对照,4℃过夜。
- 以 0.05%吐温-20 生理盐水(NS-T)洗板三次,倒去洗液。
- 在血凝板中以 2%牛血清 NS-T 将待测血清稀释成 1:20~1:1280 四个稀释度,每个稀释度加风疹抗原与对照抗原各 1 孔(0.1mL,下同),轻轻振荡后置 37℃ 1h~2h。
- 以 NS-T 洗三次,倒去洗液后每孔加入以 2%牛血清 NS-T 稀释的抗人 IgG 辣根过氧化物酶结合物 0.1mL(空白对照不加),置 37℃ 1h~2h。
- 以 NS-T 洗三次,倒去洗液后加 TMB(四甲基对二氨基联苯)-双氧水底物液,每孔 0.1mL(包括空白对照孔),避光在 37℃ 放置 10min~20min,随时观察,待对照孔开始显淡黄色时即用 2mol/L 硫酸终止,每孔加 50μL。
- 用空白对照孔调零点,以酶标仪(492nm)测定各孔 OD 值。OD 值不足 0.05 者按 0.05 计。凡同一稀释度下风疹抗原孔 OD 值/对照抗原孔 OD 值 > 2.1 即 P/N 为阳性。阳性之最高稀释度的倒数即为该血清的抗体效价。小于 1:20 者视为阴性。
- 每次实验应作已知效价的阳性及阴性血清对照。

C. 2. 2. 2. 3 注意事项

- 包被液应冷藏避光保存,使用不超过两周。
- 洗涤液使用不超过一周。

C. 2. 2. 3 方法二(按照供应商最新的操作说明进行检测)

C. 2. 2. 3. 1 材料与设备

刻度吸管 10mL

微量加样器 5μL~20μL、100μL、10 000μL

洗板机或类似的清洗装置

酶标仪(波长 450nm)

便携式计算器

诊断试剂盒(Diagnostic Automation Inc. 提供)

[试剂组成]

包被有风疹抗原的微孔条:	12 条(8 孔)
样品稀释液	1 瓶(22mL)
浓缩洗涤液(10×)	1 瓶(100mL)
酶标记物	1 瓶(12mL)
0IU/mL 阴性校正品	1 瓶(150 μ L)
15IU/mL Cut-off 校正品	1 瓶(150 μ L)
30IU/mL 阳性校正品	1 瓶(150 μ L)
100IU/mL 阳性校正品	1 瓶(150 μ L)
阴性对照	1 瓶(150 μ L)
阳性对照	1 瓶(150 μ L)
TMB 底物	1 瓶(15mL)
2mol/L 盐酸终止液	1 瓶(12mL)

[贮存条件] 2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C

C. 2. 2. 3. 2 检验前准备

- a) 将试剂盒恢复至室温(20 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C), 约需 30min, 并轻轻摇动。
- b) 用蒸馏水将浓缩洗涤液做 1 : 10 稀释。

C. 2. 2. 3. 3 检验步骤

- a) 用样品稀释液将待检样品、阴性对照、阳性对照以及 0IU/mL、15IU/mL、30IU/mL、100IU/mL 校正品做 1 : 40 稀释, 即加入 5 μ L 样品到 200 μ L 样品稀释液中。
- b) 加入 100 μ L 稀释样品、对照和校正品至适当的孔。空白孔加入 100 μ L 样品稀释液, 混匀, 室温(20 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C)放置 30min。
- c) 去掉液体, 用洗涤缓冲液洗板 3 次(每孔加 250 μ L), 并彻底拍干。
- d) 向各孔加入 100 μ L 酶标记物, 室温放置 30min。
- e) 去掉酶标记物, 洗板 3 次(每孔加 250 μ L 洗涤液), 并彻底拍干。
- f) 向各孔加入 100 μ L TMB 底物液, 室温避光放置 30min。
- g) 向各孔加入 100 μ L 2mol/L 盐酸终止液, 混匀, 5min 后在 450nm 处读数(读数时确保各孔没有气泡, 30min 内读数有效)。

C. 2. 2. 3. 4 定性结果计算方法

- a) 计算 15IU/mL CUT-OFF 校正品平均 OD 值。
- b) Index 值 = 样品 OD 值 / 15IU/mL CUT-OFF 校正品平均 OD 值。

C. 2. 2. 3. 5 定量结果计算方法

根据 0IU/mL、15IU/mL、30IU/mL、100IU/mL 四个质控标准的 OD 值制作标准曲线(曲线型式参见说明书), 样本检测结果(IU/mL)由 OD 值在标准曲线上查出。

C. 2. 2. 3. 6 结果判断

- 阴性: 风疹 G 指数 Index \leq 0. 90 或浓度 $<$ 13IU/mL
 可疑: 风疹 G 指数 Index = 0. 91~0. 99 或浓度 13IU/mL~15IU/mL 样品应重新检验
 阳性: 风疹 G 指数 Index \geq 1. 00 或 $>$ 15IU/mL, 表示当时或近期可能感染

C. 2. 2. 3. 7 质控

- 空白孔 OD 值 $<$ 0. 15。
 CUT-OFF 校正品 OD 值 \geq 0. 25, 否则应重新检测。

阴性、阳性对照的浓度应在标签标示的范围内。

C. 2. 3 血凝抑制抗体检测诊断风疹和先天性风疹综合征

用于检测血凝抑制抗体诊断风疹的血液标本宜在急性期尽早采集,并间隔 2 周~4 周以上采集恢复期血液标本。用于检测血凝抑制抗体诊断婴幼儿的先天性风疹感染或证实先天性风疹综合征的血液标本宜在婴儿出生 6 个月以后风疹疫苗接种之前采集,同时须采集婴儿母亲血液标本检测。

C. 2. 3. 1 原理

鹅红细胞(或鸽红细胞)上有风疹病毒受体,遇风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,即为血凝抑制抗体效价。

C. 2. 3. 2 主要材料

- 血凝板:6×12 或 8×12 个圆形孔(孔底光滑)的 U 形板。
- 定量移液器:定量移液器选用 25 μ L(即 0.025mL)。
- 尖底小试管:形如离心管,便于血清的吸取。

C. 2. 3. 3 风疹血凝素的制备

取毒种感染 BHK21 细胞或 Vero 细胞,常规换液培养。末次换入 2% 牛血清 199 综合培养基,置 33 $^{\circ}$ C 培养 6d~7d 以上,待细胞病变“+++”时收获,冻化,取上清液用吐温-80 乙醚处理即为血凝素;如用白陶土处理的 2% 牛血清配制感染细胞的培养基来制备血凝素,则不用吐温-80 乙醚处理。

C. 2. 3. 4 血凝滴度

所用溶液一律置 4 $^{\circ}$ C 预冷,微量塑料板法。血凝素用葡萄糖-明胶-巴比妥缓冲液以 1:2 倍比递增稀释,再加 0.2% 新鲜鹅红细胞(或鸽红细胞)悬液,混匀,置 4 $^{\circ}$ C 至少 1h,观察结果,以“++++”(4 单位)的最高稀释度为血凝滴度。

C. 2. 3. 5 血凝抑制试验

原血清 0.1mL+0.7mL 氯化锰肝素液,4 $^{\circ}$ C 作用 20min 后在 1:8 稀释的血清中加 1 滴积压鹅红细胞(或鸽红细胞),1h 内摇 2~3 次,置 4 $^{\circ}$ C 过夜,再以 2000r/min 的速度离心 10min,取上清液待检。待检血清用 pH6.2 的葡萄糖-明胶-巴比妥缓冲液倍比稀释后,每孔加 0.025mL 血凝素(含 4 单位;如系 pH9 的血凝素,事先应用 0.1mol/L 盐酸调至 pH6.2 左右再用)。抗原抗体在 4 $^{\circ}$ C 作用 1h 后加入 0.25% 鹅红细胞 1 滴(0.025mL),在 4 $^{\circ}$ C 下作用 2h 后判定结果,以完全抑制血凝为终点。每次试验预设以下对照:

阳性血清对照:应出现一定已知效价

阴性血清对照:应出现阴性结果

待检血清对照:应无非特异性凝集

抗原对照:应出现++++(4 单位)、+++ (2 单位)、++~+(1 单位)、±(1/2 单位)的凝集现象

血细胞对照:应为阳性

HI 抗体阳性标准判定以 1:16 作为阳性标准。

葡萄糖-明胶-巴比妥缓冲剂(DGV)配制:

巴比妥	0.58g
巴比妥钠	0.38g
明胶	0.6g
无水 CaCl ₂	0.02g
MgSO ₄ ·4H ₂ O	0.12g
NaCl	8.5g
葡萄糖	10g

巴比妥与明胶可分别先各在 250mL 蒸馏水中加温溶解,然后依次加入其他药品,溶解后加双蒸水至 1000mL,分装 10 瓶消毒。用前以 0.1mol/L 盐酸将 pH 调至 6.2,用于稀释待测血清、配制血凝素及红细胞。

氯化锰—肝素液配制

MnCl ₂	3.96g
肝素	16 万单位

加双蒸水至 100mL,使用时以双蒸水稀释 4 倍(1 : 3)。
