

ICS 11.020
C59
23220—2008

WS

中华人民共和国卫生行业标准

WS 279—2008

鼠疫诊断标准

Diagnostic criteria for plague

2008-02-28 发布

2008-09-01 实施



中华人民共和国卫生部 发布

目 次

前言	Ⅲ
1 范围	1
2 术语与定义	1
3 诊断依据	1
4 诊断原则	2
5 诊断分型	2
6 排除鼠疫诊断	2
附录 A(规范性附录) 检验材料的采取、保存和运输	3
附录 B(规范性附录) 鼠疫菌检验程序及结果判定	4
附录 C(规范性附录) 聚合酶链式反应(PCR)检测鼠疫菌特异性基因	6
附录 D(规范性附录) 酶联免疫吸附实验(ELISA)检测鼠疫抗体及抗原	8
附录 E(规范性附录) 间接血凝试验和反相血凝试验	10
附录 F(规范性附录) 胶体金纸上色谱方法检测鼠疫抗体及抗原	12

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 15991—1995《鼠疫诊断标准》自本标准实施之日起废止。

本标准的附录 A~附录 F 是规范性附录。

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:中国疾病预防控制中心传染病预防控制所、中国疾病预防控制中心鼠疫布鲁菌病防治基地、中国人民解放军军事医学科学院。

本标准主要起草人:俞东征、海荣、从显斌、刘振才、杨瑞馥、夏连续、魏建春、张志凯、徐冬蕾。

鼠疫诊断标准

1 范围

本标准规定了鼠疫的诊断依据、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鼠疫的诊断、报告。

2 术语与定义

下列术语和定义适用于本标准。

2.1 鼠疫患者 plague patients

人类受到鼠疫菌感染所引起的疾病,称为人类鼠疫;发生人类鼠疫的个体,称为鼠疫患者。鼠疫患者可在鼠疫疫源地内由宿主或媒介感染;或与其他有传染性的鼠疫患者接触感染;或接触染疫动物、动物制品、鼠疫实验室及其实验用品感染。

2.2 急热(急性热病)待查 suspect acute-fever to be determined

急性发热的患者,包括需要将鼠疫作为诊断考虑之一的患者。对这种类型的患者,应当按照本标准采取适当的标本,进行针对鼠疫的各种检验。

2.3 疑似鼠疫 probable plague

怀疑为鼠疫的患者。对疑似鼠疫的患者应予以隔离治疗,并开始对其接触者进行调查。

2.4 确诊鼠疫 confirmed plague

确定为鼠疫的患者。患者确诊为鼠疫时,应当按照鼠疫控制应急预案,采取鼠疫控制措施。

3 诊断依据

3.1 临床表现

3.1.1 突然发病,高热,白细胞剧增,在未用抗菌药物或仅使用青霉素族抗菌药物情况下,病情迅速恶化,在 48h 内进入休克或更严重的状态。

3.1.2 急性淋巴结炎,淋巴结肿胀,剧烈疼痛并出现强迫体位。

3.1.3 出现重度毒血症、休克综合征而无明显淋巴结肿胀。

3.1.4 咳嗽、胸痛、咳痰带血或咯血。

3.1.5 重症结膜炎并有严重的上下眼睑水肿。

3.1.6 血性腹泻并有重症腹痛、高热及休克综合征。

3.1.7 皮肤出现剧痛性红色丘疹,其后逐渐隆起,形成血性水泡,周边呈灰黑色,基底坚硬。水泡破溃后创面也呈灰黑色。

3.1.8 剧烈头痛、昏睡、颈部强直、谵语妄动、脑压高、脑脊液浑浊。

3.2 接触史

3.2.1 患者发病前 10d 内到过动物鼠疫流行区。

3.2.2 在 10d 内接触过来自鼠疫疫区的疫源动物、动物制品、进入过鼠疫实验室或接触过鼠疫实验用品。

3.2.3 患者发病前 10d 内接触过具有 3.1.1 及 3.1.4 特征的患者并发生具有类似表现的疾病。

3.3 实验室检验结果

3.3.1 患者的淋巴结穿刺液、血液、痰液,咽部或眼分泌物,或尸体脏器、管状骨骺端骨髓标本中分离到鼠疫菌。检验材料的采取及分离步骤见附录 A 和附录 B。

3.3.2 上述标本中针对鼠疫苗 *caf1* 及 *pla* 基因的 PCR 扩增阳性,同时各项对照成立。操作步骤见附录 C。

3.3.3 上述标本中使用胶体金抗原检测(操作步骤见附录 F)、酶联免疫吸附试验(操作步骤见附录 D)或反相血凝试验(操作步骤见附录 E)中任何一种方法,检出鼠疫苗 F1 抗原。

3.3.4 患者的急性期与恢复期血清使用酶联免疫吸附试验或被动血凝试验检测,针对鼠疫 F1 抗原的抗体滴度呈 4 倍以上增长。

4 诊断原则

4.1 具有 3.1.1 项临床表现;或具有 3.2.1 项接触史,同时出现 3.1.2 至 3.1.8 中任何一项临床表现为急热待查。

4.2 发现急热待查患者具有 3.2.2 或 3.2.3 项接触史,或获得 3.3.3 项实验室检验结果,应作出疑似鼠疫诊断。

4.3 急热待查或疑似鼠疫患者,获得 3.3.1 项、或 3.3.2+3.3.3 项、或者 3.3.4 项检验结果,应作出确诊鼠疫诊断。

5 诊断分型

5.1 按临床表现 3.1.2 诊断的鼠疫病例,为腺型鼠疫。

5.2 按临床表现 3.1.3 诊断的鼠疫病例,为败血型鼠疫。

5.3 按临床表现 3.1.4 诊断的鼠疫病例,为肺型鼠疫。

5.4 按临床表现 3.1.5 诊断的鼠疫病例,为眼型鼠疫。

5.5 按临床表现 3.1.6 诊断的鼠疫病例,为肠型鼠疫。

5.6 按临床表现 3.1.7 诊断的鼠疫病例,为皮肤型鼠疫。

5.7 按临床表现 3.1.8 诊断的鼠疫病例,为脑膜炎型鼠疫。

6 排除鼠疫诊断

6.1 在疾病过程中,确诊为其他疾病,可以解释所有的临床表现,且针对鼠疫进行的所有实验室检测结果均为阴性。

6.2 在疾病过程中未确诊鼠疫,发病 30d 后,针对鼠疫 F1 抗原的抗体检验结果仍为阴性,或达不到滴度升高 4 倍的标准。

附录 A (规范性附录)

检验材料的采取、保存和运输

A.1 具有标准 3.1.1~3.1.8 描述临床特征的患者,应在开始抗菌治疗前,依其症状和体征,按以下规定部位采取检材。

A.1.1 所有具有上述临床特征的患者,除采取相应部位材料外,均应采取静脉血 3mL~5mL,供检菌和血清学诊断用。发病后 7d 内采取的为急性期标本,由于就诊等原因最迟不应超过发病后 14d。发病后第 15 至第 30 日期间还应采取第二份恢复期静脉血标本,专供血清学诊断用。两份血液标本采取的间隔不应少于 7d。

A.1.2 符合 3.1.2 特征的患者按下列要求取材:

A.1.2.1 选取肿大之淋巴结,用碘酒、酒精局部消毒,以左手拇指、食指固定,用灭菌注射器(12 号~16 号针头)刺入淋巴结,抽取组织液适量,保存于灭菌试管内或直接接种于血琼脂平板。

A.1.2.2 淋巴结肿大不明显者,可先向淋巴结内注射 0.3mL~0.5mL 灭菌生理盐水,稍停后再行抽取。

A.1.2.3 感染后期,可在肿大的淋巴结周围穿刺抽取组织液。

A.1.3 符合 3.1.3 特征的患者可只取静脉血。

A.1.4 符合 3.1.4 特征的患者按下列要求取材:

A.1.4.1 请患者对溶血(0.1%)赫氏琼脂平板咳嗽,或将带血痰液标本收集于灭菌容器内。

A.1.4.2 用灭菌棉拭子涂擦咽部分泌物,将拭子保存于灭菌容器内。

A.1.5 符合 3.1.5 特征的患者用棉拭子或无菌毛细吸管,采取眼的分泌物。

A.1.6 符合 3.1.6 特征的患者取患者粪便材料备检,应特别注意大便中带血的部分。

A.1.7 符合 3.1.7 特征的患者按下列要求取材:

A.1.7.1 水泡、脓疱期,可将脓疱表面用酒精消毒,以灭菌注射器由泡的侧面刺入泡内,抽取内容物。

A.1.7.2 溃疡、结痂期以灭菌镊子持灭菌棉球涂擦溃疡面和痂皮下的创面,将棉球保存于灭菌容器内。

A.1.8 符合 3.1.7 特征的患者用腰椎穿刺法抽取脑脊液。

A.1.9 对于鼠疫患者的密切接触者,鼠疫污染材料的接触者,以及早期未出现典型可疑症状的疑似鼠疫患者,均应按 A.1.1 和 A.1.4 的规定取材备检。

A.2 疑似鼠疫尸体的取材

A.2.1 首例疑似鼠疫尸体应作解剖取材。

A.2.1.1 取材前应作好解剖器材、场所选择和尸体处理的准备。

A.2.1.2 以无菌手续采取肝、脾、肺、心血及有可疑病理改变的淋巴结等组织,分别置于灭菌容器内。尸体有腐败迹象时,必须取管状骨骺端骨髓。

A.2.2 如不能解剖,可行局部取材。用腰椎穿刺器按淋巴结、心、肝、脾及肺的顺序穿刺采取组织,分别保存于灭菌试管内,尸体腐败时可穿刺取骨髓。

A.3 所取血液标本应分离血清;血块及所取其他材料均应保存于灭菌器皿内;组织块可保存于灭菌生理盐水中。

A.4 所取标本按照卫生部《人间传染的病原微生物名录》的规定进行包装。

A.5 运输按照卫生部《可感染人类的高致病性病原微生物菌(毒)种或样本运输管理规定》执行。

附 录 B
(规范性附录)
鼠疫菌检验程序及结果判定

B.1 鼠疫菌检验基本要求

- B.1.1 鼠疫菌检验必须在卫生部《人间传染的病原微生物名录》规定的相应等级的生物安全实验室内进行。
- B.1.2 检验人员必须事前熟悉实验室管理制度,自身防护制度,技术操作规程等。
- B.1.3 应两人以上同时进入实验室工作。
- B.1.4 及时准确做好各项记录。

B.2 鼠疫菌特异抗原及基因检测

- B.2.1 来自待检患者和疑似鼠疫尸体的标本,应在分离鼠疫菌的同时进行鼠疫特异抗原及基因检测,以便做出早期诊断。
- B.2.2 抗原及基因检测的操作步骤与结果判定见附录。
- B.2.3 如抗原及基因检测为阳性结果,负责检验的单位在收到标本后,应在规定时间内做出传染病报告。
- B.2.4 抗原与基因检测的标本及所用过的各种器材,应视为污染物品,须经灭菌处理。

B.3 鼠疫菌培养

- B.3.1 新鲜材料可直接涂布溶血(0.1%)赫氏琼脂平板,按三段法划线。
- B.3.2 腐败材料可划线于龙胆紫(1:10万~1:20万)溶血平板。
- B.3.3 液体材料及骨髓,用灭菌接种环取标本划线。脏器材料先在平板表面压印,再划线,棉拭子可直接涂布于培养基表面。
- B.3.4 同一患者或尸体的不同材料可以分格涂于同一平板表面。每份标本接种一式两个平板,一个作分离培养,另一个做鼠疫噬菌体裂解试验。
- B.3.5 置28℃温箱培养,于14h~96h内每日观察以发现具有鼠疫菌典型形态的菌落。没有严重污染的平板,必须持续培养7d,无疑似鼠疫菌落出现时,方可弃去。

B.4 鼠疫噬菌体裂解试验

- B.4.1 在B.3.4中用于噬菌体裂解试验的平板上,于划线一侧滴噬菌体一滴,倾斜平板使其垂直流过划线。
- B.4.2 分离培养中发现可疑鼠疫菌落时,用接种环取可疑菌落重新划线于溶血(0.1%)赫氏琼脂平板,再滴加鼠疫噬菌体。
- B.4.3 置28℃温箱,24h观察有无噬菌现象,噬菌带宽于噬菌体流过的痕迹时,方可判定为鼠疫噬菌体试验阳性。

B.5 动物接种

- B.5.1 患者、尸体标本,特别是腐败标本应在进行细菌培养的同时接种小白鼠(18g~20g)或豚鼠(250g~300g)。
- B.5.2 脏器组织置于消毒乳钵内,加入适量生理盐水,制成悬液。

B. 5.3 新鲜标本可采用腹腔或皮下接种,豚鼠接种 0.5mL~1.0mL,小白鼠接种 0.2mL~0.4mL。

B. 5.4 腐败标本可采用经皮接种,剃去动物腹毛,并造成轻微划痕,将材料以棉拭子涂布于剃毛之皮肤上并擦之。

B. 5.5 接种实验动物后,做好标记,放入饲养笼内,挂牌记载编号、接种日期、途径等。每日饲喂 1 次~2 次,直至动物死亡或经 7d 后杀死剖检。

B. 5.6 动物死亡后,按 B. 3 和 B. 4 进行检验。

B. 5.7 如 7d 动物没有死亡,应处死动物,取动物的脾脏及有可疑病变组织制成匀浆,接种第 2 组动物,动物死亡或观察 7d 后处死,按 B. 5.6 或 C 加 D. 2 或 E. 2 或 F. 2 检验。同时采集血清,做 D. 1 或 E. 1 或 F. 1 试验。无阳性发现方可做出阴性报告。

B. 6 鼠疫菌判定依据

B. 6.1 分离获得鼠疫菌,并按 B. 4.3 的标准判定鼠疫噬菌体裂解试验阳性时,方可做出鼠疫细菌学判定。负责检验的单位应在噬菌体裂解试验结果产生后,在规定时间内做出鼠疫菌鉴定报告。

B. 6.2 实验动物死亡,从死亡实验动物体内重新分离到鼠疫菌,并经噬菌体裂解试验证实,负责检验的单位应做出鼠疫强毒菌的鉴定报告。

附录 C

(规范性附录)

聚合酶链式反应(PCR)检测鼠疫菌特异性基因

C.1 目标基因

C.1.1 从疑似鼠疫的标本中检测鼠疫菌时,以鼠疫菌的 *fra* 及 *pla* 二基因的片段作为 PCR 扩增的目标基因。

C.1.2 针对上述目标基因采用的引物序列和扩增产物的长度如下:

目标基因	引物序列	产物长度
<i>fra</i>	1F 5'-GGAACCACTAGCACATCTGTT-3'	249bp
	1R 5'-ACCTGCTGCAAGTTTACCGCC-3'	
<i>pla</i>	2F 5'-ACTACGACTGGATGAATGAAAATC-3'	456bp
	2R 5'-GTGACATAATATCCAGCGTTAATT-3'	

C.1.3 上述引物合成后如为冻干状态,短暂离心后打开,加入适量灭菌三蒸水混合均匀配制成浓度为 $100\mu\text{mol/L}$ 的储存液, -20°C 保存。使用前配制成 $10\mu\text{mol/L}$ 浓度的工作液。

C.2 内部对照

C.2.1 内部对照以鼠疫菌 EV 株 DNA 为模板,采用上述 1F 和 1R 引物首先扩增出 *fra* 基因 249bp 片段,再以 16SrRNA 基因引物:

F 5'-AGCGGCAGCGGGAAGTAGTT-3'

R 5'-TCAACCCCTTCCTCCTCGCT-3'

扩增出 16SrRNA 基因 396bp 片段。采用 TOPO TA Cloning Kit 克隆 *fra* 基因片段,鉴定为阳性的克隆子质粒采用 HpaI 酶切,再以 T₄ DNA 连接酶将 16S rRNA 基因片段连接在上述质粒的缺口中。连接后的质粒再次克隆。成功插入 *fra* 和 16S rRNA 基因片段的质粒作为内部对照模板。

C.2.2 按上述方法建成的内部对照模板,根据测定的质粒含量配制成浓度为 $0.56\mu\text{g/mL}$ 的工作溶液。该对照模板以上述的 1F 和 1R 引物扩增的产物长度为 645bp。

C.3 试剂保存:引物、dNTP、Taq DNA 聚合酶、Goldview 染料、分子量标准(marker)保存于 -20°C , 均应尽量减少冻融次数。

C.4 标本处理

C.4.1 与鼠疫菌分离采取同样的标本,如需长距离运送标本时,标本中可加入 3 倍量的 95%乙醇进行浸泡。

C.4.2 组织标本置适当容器中,加等体积蒸馏水,捣碎制成匀浆。体液标本与组织标本匀浆置微型离心管中,封闭管口,置沸水浴中加热 10min,取上清作为 PCR 反应中的待检标本。

C.5 PCR 反应体系(总量 $25\mu\text{L}$),采用其他总量时,下列配方按比例改变。

无菌去离子水	13.5 μL
10 $\times$ 反应缓冲液	2.5 μL
4 $\times$ dNTP 混合物(每种 2.5mmol/L)	2 μL
引物(1F、1R、2F、2R)	各 1 μL
内部对照模板(IC)	1 μL
待测标本	1 μL

Taq DNA 聚合酶

1 μ L

Taq DNA 聚合酶应在临用前取出,使用前置于冰上,最后加入反应体系,加入完毕后尽快将酶收回冷冻保存,并立即短暂离心反应体系后开始扩增。

C.6 扩增:预变性 95 $^{\circ}$ C 5min;然后 95 $^{\circ}$ C 1min,55 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 1min,30 个循环;最后保持 72 $^{\circ}$ C 5min。共 1 小时 40 分。

C.7 电泳

C.7.1 反应完毕后,向反应管中加入溴酚蓝指示剂 5 μ L,混合均匀,短暂离心。

C.7.2 向电泳胶体的每一孔中加入上述处理的反应产物 8 μ L,每一板胶体至少在边缘的 2 孔中加分子量标准。

C.7.3 使用 20cm 胶体时,80V~100V(不超过 5V/cm)电压下在 TBE 缓冲液中电泳约 1h。

C.7.4 用凝胶成像仪读取结果并照相。无凝胶成像仪时可在紫外透射灯下观察结果并用相机照相。

C.8 判读结果

C.8.1 电泳后显示符合 249bp、456bp 及 645bp 长度的 3 条带型者为阳性;显示一条目标条带与对照条带者为鼠疫弱毒菌;只显示 645bp 一条带者为阴性;无扩增条带者应改变对标本的处理方法后再行测试。

C.8.2 显示多数、不规则条带,并与上述预计长度均不相符者为阴性。

C.8.3 在疫源地内首次检出阳性结果时扩增产物应测序以核实真伪;获得正确对照结果但目标带长度不符,或在出现目标长度的条带同时出现额外条带时,应以克隆测序的方法核实。

C.9 溶液及电泳胶体制备

C.9.1 0.5mol/L EDTA(pH8.0):在 800mL 蒸馏水中加入 186.1gEDTA,在磁力搅拌器上搅拌,用 NaOH(约 20g)调 pH 至 8.0。然后定容至 1L,分装后高压灭菌备用。

C.9.2 5 $\times$ TBE 储存液

Tris	54g
0.5mol/L EDTA(pH8.0)	20mL
硼酸	27.5g
蒸馏水	补足至 1 000mL

C.9.3 琼脂糖凝胶

1%琼脂糖,冷却至 50 $^{\circ}$ C~60 $^{\circ}$ C 每 100mL 加入 5 μ L Goldview 染料,倾注胶体。

附录 D

(规范性附录)

酶联免疫吸附试验(ELISA)检测鼠疫抗体及抗原

D.1 酶联免疫吸附试验测定抗鼠疫 IgG 抗体

D.1.1 包被

酶联免疫吸附试验使用酶标通用微量滴定板(平孔底)作为吸附介质,测定抗体时,使用经 33%饱和度硫酸铵两次盐析提纯的 F1 抗原包被,F1 抗原以包被缓冲液配制成 $10\mu\text{g/mL}$ 溶液,每孔加 $100\mu\text{L}$, 4°C 过夜,倾去,加封闭液 $300\mu\text{L}$ (满孔),封闭 24h。

D.1.2 标本准备

以患者的血清作为标本,标本应经 56°C 30min 灭活,保存在 4°C 。

D.1.3 标本稀释

标本稀释应在未包被的微量板上或其他容器中进行。每份标本的首孔加 $180\mu\text{L}$ 稀释缓冲液,而后各孔加 $100\mu\text{L}$ 。先在首孔中加入血清 $20\mu\text{L}$,混匀后吸出 $100\mu\text{L}$ 加入下一孔中,依次倍比稀释,最后的 $100\mu\text{L}$ 弃去。

D.1.4 加样

D.1.4.1 加样前,新包被的酶标板应倾去孔中的液体,置洗板机上以洗涤缓冲液洗 3 次;如使用手工洗板,应每孔加洗涤缓冲液 $300\mu\text{L}$,置 3min,倾去,在吸水材料上轻拍除去残留的液体,如此重复 3 次。

D.1.4.2 将按 D.1.3 稀释的标本加入至清洗过的酶标板相应孔中,每次实验还需加入:以缓冲液代替血清的空白对照、1:10 稀释的已知阴性血清对照以及适当稀释的阳性血清对照。 37°C 静置 60min,温育时可将酶标板叠放,最上方的酶标板加盖。

D.1.5 加入酶标记第二抗体

D.1.5.1 完成 D.1.4.2 步骤后,倾去孔中的液体,按 D.1.4.1 洗板 3 次。

D.1.5.2 向各孔中加入 1:1 000(或按说明书)稀释的酶标记第二抗体(通常使用辣根过氧化物酶标记羊抗人 IgG) $100\mu\text{L}$, 37°C 静置 60min。

D.1.6 显色

D.1.6.1 完成 D.1.5.2 步骤后,倾去孔中的液体,按 D.1.4.1 洗板 3 次。

D.1.6.2 在使用辣根过氧化物酶的情况下,加入 TMB 反应液 $100\mu\text{L}$,室温中反应 30min,然后加入终止液(0.5mol/L H_2SO_4) $50\mu\text{L}$ 。

D.1.7 完成 D.1.6.2 步骤后,使用酶标仪判读结果,酶标仪以空白对照孔调零,阳性及阴性血清对照孔的读数应符合事先的标定,被检孔 OD 值达阴性对照孔的 2.1 倍时始判为阳性,达到该阳性标准的最高稀释度为抗体的滴度。

D.2 酶联免疫吸附试验测定鼠疫菌 F1 抗原

D.2.1 包被

鼠疫菌免疫血清血凝滴度在 1:40 000 以上,以包被缓冲液 1:2 000 稀释用于包被,每孔 $50\mu\text{L}$ 。 4°C 过夜,倾去,加封闭液 $300\mu\text{L}$ (满孔),封闭 24h。

D.2.2 标本准备

测定抗原时,待查患者可采取血清、淋巴穿刺液、咽拭子浸出液、脑脊液等液体标本,也可采取血块等组织标本。尸检则采取各有关的组织标本。将组织标本在灭菌容器中制成悬液,加 9 倍组体积的稀释液(加 5%甲醛)混悬,静置,取上清液作为 1:10 标本。

D.2.3 标本稀释与处理

D.2.3.1 血清、脑脊液等体液标本以稀释缓冲液稀释 10 倍,而淋巴穿刺液、咽拭子浸液和各种组织上清液直接进行稀释。

D.2.3.2 分两列在未包被的微量板上或其他容器中进行稀释。第一列为试验列,每孔加稀释缓冲液 50 μ L;第二列为抑制列,首孔加 180 μ L 稀释缓冲液,而后各孔加 100 μ L。先在第二列首孔中加入标本 20 μ L,混匀后吸出 50 μ L 加入第一列首孔,另 100 μ L 加入本列下一孔中,依次倍比稀释,最后的 100 μ L 弃去。

D.2.3.3 第二列每孔中加入以稀释缓冲液 1:20 稀释的鼠疫菌免疫兔血清 50 μ L。

D.2.3.4 稀释好的试验列及抑制列 37 $^{\circ}$ C 静置 60min,温育时可將酶标板叠放,最上方的酶标板加盖。

D.2.4 加样

D.2.4.1 加样前,按 D.1.4.1 规定洗板。

D.2.4.2 将按 D.2.3 稀释并处理的标本加入至清洗过的酶标板相应孔中,每次实验还需加入:以缓冲液代替标本的空白对照、1:100 稀释的已知阴性血清对照以及 1:100 稀释的同一阴性血清加 F1 抗原至 1mg/mL 作为阳性对照。37 $^{\circ}$ C 静置 60min,温育时可將酶标板叠放,最上方的酶标板加盖。

D.2.5 结合单克隆抗体

D.2.5.1 加入抗体前,按 D.1.4.1 规定洗板。

D.2.5.2 小鼠抗鼠疫菌 F1 抗原 IgG 单克隆抗体杂交瘤腹水,首先加硫酸铵至 25%饱和度,弃去沉淀,再加硫酸铵至 33%饱和度,收集沉淀,以稀释缓冲液溶解配制成 1.8mg/mL 溶液,4 $^{\circ}$ C 保存。使用前 1:4 000 稀释,每孔中加入 50 μ L,室温或 37 $^{\circ}$ C 静置 60min。

D.2.6 加入酶标记第二抗体。

D.2.6.1 加第二抗体前,按 D.1.4.1 规定洗板。

D.2.6.2 向各孔中加入 1:1 000(或按说明书)稀释的酶标记(通常使用辣根过氧化物酶标记)羊抗鼠 IgG 200 μ L,室温或 37 $^{\circ}$ C 静置 60min。

D.2.7 按 E1.6 中的规定进行显色操作。

D.2.8 判读结果

首孔稀释度以 1:200 计,阳性及阴性血清对照孔的读数应符合事先的标定,被检孔 OD 值达阴性对照孔的 2.1 倍时始判为阳性,达到该阳性标准的最高稀释度为抗体的滴度,抑制列至少低于试验列 4 倍时判断为特异性结果。

D.3 液体配制

D.3.1 包被液配方为:Na₂CO₃ 1.59g,NaHCO₃ 2.93g,加蒸馏水至 1 000mL。

D.3.2 封闭液:5% BSA。

D.3.3 洗涤缓冲液(pH 7.4)配方为:NaCl 8.2g, KH₂PO₄ 0.2g, Na₂HPO₄ 2.9g, KCl 0.2g, 吐温 0.5mL,加蒸馏水至 1 000mL。

D.3.4 稀释缓冲液配方为:NaCl 8.2g, KH₂PO₄ 0.2g, Na₂HPO₄ 2.9g, KCl 0.2g, 加蒸馏水至 1 000mL。

D.3.5 终止液:0.5mol/L H₂SO₄。

附录 E

(规范性附录)

间接血凝试验和反相血凝试验

E.1 间接血凝试验(IHA)测定鼠疫 F1 抗体

E.1.1 试剂

E.1.1.1 鼠疫 F1 抗原致敏血球

抗原致敏血球为戊二醛固化并经单宁酸处理的羊血球,再以 33% 饱和度硫酸铵两次盐析提纯的 F1 抗原致敏。用于间接血凝试验的抗原致敏血球应定期进行试剂质量检测,并符合以下标准:

- a) 用细菌凝集效价为 1:320 的鼠疫全菌免疫血清,血凝滴度应不低于 1:40 000;
- b) 与假结核耶尔森菌免疫血清交叉滴度应不高于 1:5。

E.1.1.2 单宁酸血球:与鼠疫 F1 抗原致敏血球同一批次的单宁酸血球。

E.1.1.3 稀释液:含 1% 正常兔血清的生理盐水。

E.1.1.4 抑制剂:含 50 $\mu\text{g/mL}$ ~100 $\mu\text{g/mL}$ 鼠疫 F1 抗原的稀释液。

E.1.1.5 阳性参考血清。

E.1.2 按照 D.1.2 准备标本。

E.1.3 操作步骤

E.1.3.1 初筛试验操作步骤

E.1.3.1.1 每份被检血清在 V 型孔微量血凝板稀释 5 孔。

E.1.3.1.2 用移液器向每孔分别加入 25 μL 稀释液。

E.1.3.1.3 在第 1 孔中加入被检血清 25 μL ,吸排 4 次~6 次,充分混匀后,取 25 μL 移至第 2 孔,充分混匀,依次稀释至最后一孔,弃掉 25 μL 。

E.1.3.1.4 分别在各孔内加入 1% 鼠疫 F1 抗原致敏血球 25 μL ,振荡混匀。置 37℃ 温箱或室温 2h 后观察结果。

E.1.3.1.5 结果判定

- a) “#”:凝集血球铺满孔底,有明显折边,抗体过量时,凝集呈疏松花圈状;
- b) “+++”:凝集血球铺满孔底,无折边;
- c) “++”:血球不完全凝集,在孔底呈整齐的圆圈,但圈内外有非常明显的血球凝集;
- d) “+”:在孔底形成较小的圆圈,在圈内外只有很少的血球凝集;
- e) “-”:血球全部沉积在 V 型孔的底部,呈整齐的小珠状。

呈现“++”以上的凝集现象时,进行复判操作。

E.1.3.2 复判操作步骤

E.1.3.2.1 每份初筛阳性的血清在 V 型孔微量血凝板稀释两列,第一列为血凝抑制试验列,第二列为血凝试验列。

E.1.3.2.2 用移液器向第一列每孔内加抑制剂 25 μL ,向第二列每孔内加稀释剂 25 μL 。

E.1.3.2.3 用移液器分别取被检血清 25 μL 加入各列的第一孔内,吸排混匀 4~6 次,,再吸取 25 μL 加入相应列的第二孔内,混匀。依此类推稀释至最后一孔,吸出 25 μL 弃入消毒液中。置 37℃ 温箱 10min~15min。

E.1.3.2.4 在第一、二列各孔中,用移液器加入稀释至 1% 的鼠疫 F1 抗原致敏血球悬液 25 μL 。震荡混匀,置 37℃ 2h 后观察结果。至此,每列第 1 孔的稀释度为 1:4。

E.1.3.2.5 每组同时设下列对照:

E. 1.3.2.5.1 空白对照:稀释液 25 μ L + 1%鼠疫 F1 抗原致敏血球 25 μ L。

E. 1.3.2.5.2 阴性对照:1 : 20 被检血清 25 μ L + 1%单宁酸血球 25 μ L。

E. 1.3.2.5.3 阳性对照:稀释的阳性参考血清 + 1%鼠疫 F1 抗原致敏血球 25 μ L。

E. 1.3.2.6 结果判定

E. 1.3.2.6.1 方法同 E. 1.3.1.5。

E. 1.3.2.6.2 空白对照、阴性对照孔不应呈现凝集,阳性对照成立。最终结果,当血凝抑制列呈“++”凝集的孔比血凝试验列少 2 孔以上,判定为特异性凝集。阳性血清最终效价为凝集排呈现“++”的最高稀释度。

E. 2 反相血凝试验(RIHA)测定鼠疫 F1 抗原

E. 2.1 试剂

E. 2.1.1 1%鼠疫 F1 抗体致敏血球。

E. 2.1.2 抑制剂为 1 : 100 稀释的鼠疫免疫血清。

E. 2.1.3 阳性对照血清:阴性混合血清加 F1 抗原至 1mg/mL,1 : 100 稀释后作为阳性对照。

E. 2.2 按照 D. 2.2 准备标本。

E. 2.3 操作步骤

E. 2.3.1 初筛试验操作步骤

E. 2.3.1.1 每份被检液在 V 型孔微量血凝板稀释 5 孔。

E. 2.3.1.2 用移液器向每孔分别加入 25 μ L 稀释液。

E. 2.3.1.3 在第 1 孔中加入被检液 25 μ L,吸排 4 次~6 次,充分混匀后,取 25 μ L 移至第 2 孔,充分混匀,依次稀释至最后一孔,弃掉 25 μ L。

E. 2.3.1.4 分别在各孔内加入 1%鼠疫 F1 抗体致敏血球 25 μ L,振荡混匀。置 37 $^{\circ}$ C 温箱或室温 2h 后观察结果。

E. 2.3.1.5 结果判定:方法同间接血凝初筛试验(E. 1.3.1.5)。

E. 2.3.2 反相血凝的确证试验(复判)

E. 2.3.2.1 每份初筛阳性的被检材料在 V 型孔微量血凝板做二列复判试验,第一列为抑制列,第二列为凝集列。

E. 2.3.2.2 用移液器向抑制列每孔加入 25 μ L 抑制剂,向凝集列每孔加 25 μ L 稀释液。

E. 2.3.2.3 分别向每列第 1 孔中加入被检液 25 μ L,两列分别进行倍比稀释,方法同 E. 2.3.1.3,至每列最后一孔弃 25 μ L,室温作用 15min。

E. 2.3.2.4 各孔内加入 1%鼠疫 F1 抗体致敏血球 25 μ L,振荡混匀,置 37 $^{\circ}$ C 温箱或室温 2h 后观察结果。

E. 2.3.2.5 设置对照

E. 2.3.2.5.1 空白对照:稀释液 25 μ L + 1%鼠疫 F1 抗体致敏血球 25 μ L。

E. 2.3.2.5.2 阴性对照:被检液 25 μ L + 1%单宁酸血球 25 μ L。

E. 2.3.2.5.3 阳性对照:阳性对照血清 + 1%鼠疫 F1 抗体致敏血球 25 μ L。

E. 2.3.2.6 结果判定:方法同间接血凝(E. 1.3.1.5)。最终结果,空白对照、阴性对照孔不出现凝集现象,阳性对照成立。当抑制列呈“++”凝集的孔比试验列少 2 孔以上,判定为特异性凝集。阳性最终效价为凝集排呈现“++”的最高稀释度。

附 录 F
(规范性附录)

胶体金纸上色谱方法检测鼠疫抗体及抗原

F.1 胶体金纸上色谱方法检测鼠疫抗体

F.1.1 标本准备

以患者的血清作为标本。

F.1.2 检测

拆开鼠疫 F1 抗体胶体金检测试剂的包装,将以生理盐水 1:10 稀释的血清 200 μ L 滴入加样孔内,从滴加样品开始计时,15min 后观察结果。

F.1.3 判读结果

出现两条紫红色条带,即质控线和检测线皆显色为阳性结果;仅质控线显色为阴性结果;无条带出现或仅有检测线出现,说明试剂失效,应重新检测。

F.2 胶体金纸上色谱方法检测鼠疫菌抗原

F.2.1 标本准备

与附录 D 中 D.2.2 相同的方式获取并处理标本。

F.2.2 检测

拆开鼠疫 F1 抗原胶体金检测试剂的包装,将待测标本 200 μ L 滴入加样孔内,从滴加样品开始计时,15min 后观察结果。

F.2.3 判读结果

出现两条紫红色条带,即质控线和检测线皆显色为阳性结果;仅质控线显色为阴性结果;无条带出现或仅有检测线出现,说明试剂失效,应重新检测。

中 华 人 民 共 和 国
卫 生 行 业 标 准
鼠 疫 诊 断 标 准
WS 279—2008

*

出版发行：人民卫生出版社（中继线 010-67616688）

地 址：北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼

邮 编：100078

网 址：<http://www.pmph.com>

E - mail: pmph@pmph.com

购书热线：010-67605754 010-65264830

印 刷：北京新丰印刷厂

经 销：新华书店

开 本：880×1230 1/16 印张：1.25

字 数：36 千字

版 次：2008 年 8 月第 1 版 2008 年 8 月第 1 版第 1 次印刷

书 号：14117·208

定 价：12.00 元

版权所有，侵权必究，打击盗版举报电话：010-87613394

（凡属印装质量问题请与本社销售部联系退换）



WS 279—2008