

ICS 11.020
C59
备案号:22759—2008

WS

中华人民共和国卫生行业标准

WS 290—2008

钩端螺旋体病诊断标准

Diagnostic criteria for leptospirosis

2008-01-16 发布

2008-08-01 实施



中华人民共和国卫生部 发布

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),GB15995—1995《钩端螺旋体病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 是规范性附录,附录 B 是资料性附录。

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传染病预防控制所、中国药品生物制品检定所、浙江大学医学院、上海交通大学医学院。

本标准主要起草人:蒋秀高、秦进才、严杰、郭晓奎、鲁亮。

钩端螺旋体病诊断标准

1 范围

本标准规定了钩端螺旋体病的诊断依据、诊断原则和鉴别诊断。

本标准适用于全国各级医疗卫生机构及其工作人员对钩端螺旋体病的诊断、报告。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

2.1

赫氏反应 Herxheimer reaction

指钩端螺旋体病患者,在接受青霉素治疗时,由于大量菌体在体内裂解,释放大量的内毒素样物质,这些物质不仅可引起寒战、发抖、发热,而且具有特异的致病作用,使原有的钩端螺旋体病的症状、体征加重。

2.2

菌群更迭 serogroup change

同一地区不同年度,引起钩端螺旋体病流行的菌株血清群发生改变。

2.3

疫水 polluted water

指受到致病性钩端螺旋体污染的江河、湖泊、池塘、水田、沟渠、地表水等水体。

3 诊断依据

3.1 流行病学

发病前 1d~30d 接触疫水,或带菌动物尿液,或带菌动物血液。

3.2 临床表现

钩端螺旋体病根据临床表现主要分为:流感伤寒型、肺出血及肺弥漫性出血型、黄疸出血型、肾型及脑膜脑炎型。其早期典型临床表现为:三症状(即寒热、酸痛、全身乏力)和三体征(即眼红、腿痛、淋巴结肿大)。

3.2.1 发热:起病急,可有畏寒。短期内体温可高达 39℃ 左右,常为弛张热,有时也可稽留热,少数间歇热。

3.2.2 肌痛:全身肌痛,特别是腓肠肌痛明显。

3.2.3 乏力:全身乏力,特别是腿软症状明显。

3.2.4 眼结膜充血:轻者主要在眼球结膜、外眦及上下穹隆部,重者除角膜周围外的全球结膜血管扩张呈网状,无分泌物,无疼痛感,不畏光。

3.2.5 腓肠肌压痛:双侧腓肠肌压痛,重者拒按。

3.2.6 淋巴结肿大:主要为表浅淋巴结及股淋巴结,一般为 1cm~2cm,质偏软,有压痛,无化脓。

3.3 实验室检测

3.3.1 从血液、脑脊液或尿液中分离出钩端螺旋体,见附录 A.1。

3.3.2 从血液、尿液或脑脊液中检测出钩端螺旋体核酸,见附录 A.2。

3.3.3 患者恢复期血清中钩端螺旋体抗体效价较早期血清有 4 倍或 4 倍以上升高,或单份血清抗体效价 $\geq 1:400$,见附录 A.3。

4 诊断原则

根据患者的流行病学、临床表现和实验室检查结果进行综合判断,病例确诊需要实验室证据。

5 诊断

5.1 疑似病例

符合下列情况之一者即可诊断:

5.1.1 具备 3.1 加 3.2.1;

5.1.2 具备 3.1 加 3.2.2;

5.1.3 具备 3.1 加 3.2.3。

5.2 临床诊断病例

符合下列情况之一者即可诊断:

5.2.1 疑似病例加 3.2.4;

5.2.2 疑似病例加 3.2.5;

5.2.3 疑似病例加 3.2.6。

5.3 实验室确诊病例

符合下列情况之一者即可诊断:

5.3.1 疑似病例加 3.3.1;

5.3.2 疑似病例加 3.3.2;

5.3.3 疑似病例加 3.3.3。

6 鉴别诊断

钩端螺旋体病临床表现复杂多样,非典型病例较多,特别是散发时容易误诊。本病应注意与流行性感冒、流行性出血热、登革热、急性黄疸型病毒性肝炎、流行性乙型脑炎等鉴别诊断,参见附录 B。

附录 A (规范性附录)

钩端螺旋体病的病原学和血清学诊断方法

A.1 钩端螺旋体直接镜检、分离培养及分群、分型

A.1.1 患者血液的直接镜检

A.1.1.1 取早期患者血液一滴,加蒸馏水一滴,使血细胞溶解,在暗视野显微镜下检查有无活动的钩端螺旋体。

A.1.1.2 取早期患者静脉血 1mL~2mL 于无菌试管中待凝固,离心沉淀,吸取血清与血细胞交界处略显白色的悬液,置于载玻片上,在暗视野显微镜下检查有无活动的钩端螺旋体。

A.1.1.3 差速离心暗视野检查法:采集早期患者静脉血 1mL,加于含 2mL 枸橼酸钠盐水管中。1 000r/min 离心 10min,吸上层血浆置另一清洁管中,3 000r/min~3 500r/min 离心 30min~60min。弃上清,取沉淀物一滴于玻片上,用暗视野显微镜检查有无活动的钩端螺旋体。

A.1.2 病原体分离培养

A.1.2.1 患者血液培养:采集早期患者血液,无菌操作接种于 2~3 管 Korthof 或 EMJH 等适宜培养基中,每管按培养基体积的 1%接种。血液培养管置 28℃ 培养。每隔 5d~7d 取培养物在暗视野显微镜下观察有无钩端螺旋体生长,若有生长,即为分离阳性。若未见生长,需继续培养 60d,仍不见钩端螺旋体生长方作阴性处理。

A.1.2.2 患者尿液培养:接取病后两周以上的患者中段尿 30mL~50mL 于无菌离心管中,以 3 500r/min~4 000r/min 离心 1h。取沉渣 0.3mL~0.5mL 接种于第一管培养基中,混匀后吸 0.3mL~0.5mL 接种于第二管,混匀后吸 0.3mL~0.5mL 接种于第三管,28℃ 孵育。每隔 5d~7d 取培养物镜检。检查要求同血液培养。为提高检出率和减少污染,可在采集尿标本的前一天晚上给患者口服碳酸氢钠 2g~4g,同时在培养基中加入 100μg/mL~400μg/mL 氟尿嘧啶或 1/2 000 的磺胺嘧啶。

A.1.2.3 动物接种:取患者血液 1mL 或尿液 2mL 接种金黄地鼠或幼龄豚鼠(体重 120g~140g 之间),进行发病观察和钩端螺旋体分离。

A.1.3 病原体分群、分型

应用分群血清与新分离的钩端螺旋体作显微镜凝集试验,确定菌群。应用凝集素交叉吸收试验确定菌型。

A.2 钩端螺旋体核酸的检测方法——聚合酶链反应(PCR)技术

A.2.1 引物

引物 1(G1):5'-CTGAATCGCTGTATAAAAGT-3';

引物 2(G2):5'-GGAAAA CAAATGGTCGGAAG-3'。

扩增产物分子大小:285bp。

A.2.2 血液标本和动物组织标本的预处理

A.2.2.1 试剂配制

A.2.2.1.1 血液消化液:10mmol/L Tris-HCl、10mmol/L EDTA、50mmol/L NaCl、2% SDS,临用前每毫升加 0.3mg 蛋白酶 K。

A.2.2.1.2 组织裂解液:10mmol/L Tris-HCl、25mmol/L EDTA、100mmol/L NaCl、0.05% SDS,临用前每毫升加 0.1mg 蛋白酶 K。

A.2.2.2 操作步骤

A.2.2.2.1 血液标本预处理:0.2mL全血加0.5mL血液消化液,置56℃水浴作用1h,12 000r/min离心15min,取上清备用。

A.2.2.2.2 动物组织标本预处理:动物组织标本用匀浆器研磨成组织匀浆,加1mL组织裂解液置37℃水浴过夜,以12 000r/min离心20min,取上清液备用。

A.2.3 钩端螺旋体DNA提取(Boom法)

A.2.3.1 试剂配制

裂解液(L6):GuSCN(异硫氰酸胍)120g、0.1mol/L Tris-HCl pH6.4 100mL、0.2mol/L EDTA 22mL,混合后用NaOH调pH至8.0,加Triton X-100 2.6g;

Diatom(硅藻):三蒸水50mL、32%(W/V)HCl 500 μ L、Celite 10g,分装小玻璃瓶、高压灭菌;

缓冲液(L2):GuSCN 120g、0.1mol/L Tris-HCl pH6.4 100mL,置连续振荡的60℃~65℃水浴促使GuSCN溶解。

A.2.3.2 操作步骤

取样品液(菌液/血清/血液预处理液/组织预处理液)0.1mL;加裂解液(L6)0.9mL;加硅藻(Diatom)40 μ L;充分混悬,立即以12 000r/min离心5min,沉淀二氧化硅-DNA复合物;用0.5mL缓冲液洗涤复合物,以12 000r/min离心5min,洗涤2次;用0.5mL 70%乙醇洗涤复合物,以12 000r/min沉淀离心5min,洗涤2次;用0.5mL丙酮洗涤复合物,以12 000r/min离心5min,洗涤1次;置65℃水浴中干燥10min;加70 μ L三蒸水,充分混合10min;以12 000r/min离心5min;吸取上清50 μ L于另一小离心管中;加10mg/mL蛋白酶K 2.5 μ L,置56℃水浴作用10min;置100℃ 10min灭活蛋白酶K,-20℃保存或直接用作PCR模板。

A.2.4 反应体系

25 μ L体积PCR反应体系包括10 $\times$ PCR缓冲液2.5 μ L、2.5mmol/L dNTP 2 μ L、25 μ mol/L引物1和引物2各1 μ L、25mmol/L MgCl₂ 1.5 μ L、模板DNA 5 μ L、Taq DNA聚合酶0.5 μ L(2个活性单位)、三蒸水11.5 μ L。依次加入以上试剂后加30 μ L灭菌石蜡油,若PCR仪有顶盖加热功能则免加石蜡油。

A.2.5 热循环程序

95℃预变性5min;94℃ 60s,55℃ 60s,72℃ 90s,35个循环;72℃延伸10min。

A.2.6 扩增产物电泳检测

用0.5 $\times$ TBE电泳缓冲液配制1%琼脂糖凝胶,加热溶解后加入溴化乙锭(EB),也可在电泳结束后,将凝胶放入溴化乙锭溶液中染色。由于溴化乙锭是强诱变剂,接触被溴化乙锭污染的物品应戴一次性手套。也可采用溴化乙锭替代品,如GoldView™ DNA染料。在PCR产物中加入适量溴酚蓝溶液,混匀后取5 μ L~10 μ L上样,电泳采用0.5 $\times$ TBE缓冲液,于40V恒流电泳2h。

A.2.7 结果判定

在紫外透射仪上观察,或照相记录结果。可见阳性扩增产物分子大小为285bp的DNA条带。实验中设阴性对照(不加DNA模板)和阳性对照(加入已知阳性DNA模板),若阴性对照出现阳性或阳性对照出现阴性结果,则本次实验无效。

A.3 血清学诊断方法

A.3.1 显微镜凝集试验(MAT)

A.3.1.1 抗原的选择和制备

将我国15群15型钩端螺旋体代表株接种于Korthof或EMJH等适宜培养基中,28℃培养5d~7d,暗视野显微镜检查,每400倍视野下不少于100~200条,运动活泼并无自凝者可作为显凝抗原。

A.3.1.2 操作方法

患者血清56℃水浴灭活30min后,用生理盐水以1:50(早期患者血清)或1:100(恢复期患者血

清)和1:400两个稀释度作定性试验。两个稀释度血清以及作为对照用的生理盐水各取50 μ L,分别加入反应板每列的3个孔中。分别取15个代表株钩端螺旋体的培养液50 μ L加入上述两个稀释度血清及对照生理盐水中。摇匀后37 $^{\circ}$ C孵育1h。用接种环挑取反应液及对照,放置载玻片上暗视野显微镜下观察凝集情况。若1:100和1:400稀释血清与某一群钩端螺旋体抗原发生凝集,需进一步稀释该血清再与该群钩端螺旋体抗原进行显凝试验,以测定其凝集滴度。凝集滴度按原血清稀释倍数 $\times 2$ 计算。

A.3.1.3 终点凝集滴度的判定

以出现++凝集(即视野中50%钩端螺旋体被凝集)的血清最高稀释度作为终点凝集滴度。

A.3.2 间接酶联免疫吸附试验(间接ELISA)

A.3.2.1 试剂配制

A.3.2.1.1 **PBS缓冲液(10 $\times$)**:NaCl 80g,Na₂HPO₄·12H₂O 11.33g,KH₂PO₄ 2g,加蒸馏水至1000mL,120 $^{\circ}$ C高压20min。

A.3.2.1.2 **PBS牛奶溶液**:临用前加5%脱脂奶粉到1 $\times$ PBS缓冲液中,可加硫柳汞(终浓度为0.2%)防止污染。

A.3.2.1.3 **底物贮存液**:将0.219g ABTS[2,2'-bisazine(3-ethyl-benzyl-thiazoline 6-sulphonic acid)]溶解到10mL蒸馏水中。(注:ABTS有强致癌作用,应小心操作。)

A.3.2.1.4 **底物缓冲液**:醋酸钠 13.6g、NaH₂PO₄ 6.9g,加蒸馏水至终体积1000mL,110 $^{\circ}$ C高压20min。

A.3.2.1.5 **过氧化氢(H₂O₂)稀释液(必须临用前准备)**:加200 μ L的30% H₂O₂到7mL蒸馏水中。

A.3.2.2 抗原制备

用培养7d的双曲钩端螺旋体培养物(*L. biflexa* serovar patoc),每毫升培养物中含10⁸~10⁹条钩端螺旋体(暗视野显微镜检查),加福尔马林至终浓度为0.2%,室温作用3h~4h,水浴煮沸30min,调pH至9.6,以10000 $\times$ g离心30min,上清即为抗原。

A.3.2.3 抗原包被

在酶标板每孔加入150 μ L抗原,置37 $^{\circ}$ C 3d~5d,直至完全蒸发。

抗原板避光放于室温不透气的盒子,或用塑料袋封口保存,抗原可稳定1年。

A.3.2.4 酶标板封闭

临用前用PBS-milk洗板3次,并在加入PBS-milk后置4 $^{\circ}$ C过夜或37 $^{\circ}$ C 1h,封闭非特异性结合位点。倒掉孔中液体,在滤纸上拍干。

A.3.2.5 操作步骤

A.3.2.5.1 加稀释血清

每份患者血清用PBS-milk按1/400稀释两份进行检测。酶标板预留8孔加入从1/400到1/51200稀释的阳性血清,2孔加入1/400稀释的“阳性界值”血清,1孔加入抗原对照,1孔加入酶结合物对照。加入稀释血清后,酶标板放37 $^{\circ}$ C 1h。

A.3.2.5.2 **加酶结合物**:倾出孔中液体,用1 $\times$ PBS-milk洗板3次。按工作浓度稀释酶结合物,每孔加入酶结合物150 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育1h。

A.3.2.5.3 **显色反应**:倾出孔中液体,用1 $\times$ PBS milk洗板3次。临用前配制底物液:1mL ABTS贮存液、20mL底物缓冲液、200 μ L双氧水稀释液。每孔加入150 μ L底物,轻轻振荡酶标板,室温显色10min(注意观察颜色变化),每孔加50 μ L10% SDS终止反应。

A.3.2.6 结果分析

用酶标仪在405nm波长测定各孔OD值,加入底物液后溶液显绿色表明样本中有钩端螺旋体抗体。用系列稀释的阳性血清的OD值制作标准曲线,根据标准曲线计算出每个患者血清的抗体滴度。将1/400稀释的“阳性界值”血清的OD值在曲线作一标记,作为待检血清的阳性判定界值。

A.4 培养基制备方法

A.4.1 Korthof 培养基制备方法

蛋白胨(可用胰蛋白胨代替)400mg、NaCl 700mg、KCl 20mg、NaHCO₃ 10mg、KH₂PO₄ 120mg、Na₂HPO₄·12H₂O 1.109g,加蒸馏水至500mL。煮沸20min,用滤纸过滤,校正pH值为7.2,分装于烧瓶内,每瓶100mL,15磅高压30min灭菌。临用前每瓶无菌操作加入8mL~10mL经56℃30min灭活的无菌正常兔血清。然后将其置于37℃孵箱中48h,作无菌试验,如有杂菌生长,弃去。

A.4.2 EMJH 培养基的制备

A.4.2.1 贮存液

A.4.2.1.1 氯化钙/氯化镁贮存液:将CaCl₂·2H₂O和MgCl₂·6H₂O各1g溶解到30mL蒸馏水中,贮存于-20℃冰箱。

A.4.2.1.2 硫酸锌贮存液:将0.4g ZnSO₄·7H₂O溶解到20mL蒸馏水中,贮存于-20℃冰箱。

A.4.2.1.3 硫酸铜贮存液:将0.3g CuSO₄·5H₂O溶解到2mL蒸馏水中,贮存于4℃冰箱。

A.4.2.1.4 维生素B₁₂贮存液:将0.02g维生素B₁₂溶解到20mL蒸馏水中,贮存于-20℃冰箱。

A.4.2.1.5 吐温-80贮存液:将10g吐温-80溶解到250mL蒸馏水中,贮存于-20℃冰箱。

A.4.2.1.6 甘油贮存液:将10g甘油溶解到20mL蒸馏水中,贮存于-20℃冰箱。

A.4.2.1.7 氯化铵贮存液:将25g NH₄Cl溶解到20mL蒸馏水中,贮存于-20℃冰箱。

A.4.2.1.8 维生素B₁贮存液:将0.5g维生素B₁溶解到20mL蒸馏水中,贮存于-20℃冰箱。

A.4.2.2 BSA 营养液

溶解20g牛血清白蛋白V(BSA-V)到120mL蒸馏水,磁力搅拌(避免产生气泡)。从冰箱中取出贮存液,分别加入3mL氯化钙/氯化镁贮存液、2mL硫酸锌贮存液、2mL维生素B₁₂贮存液、25mL吐温-80贮存液、2mL甘油贮存液以及0.1g硫酸亚铁、0.08g丙酮酸钠,加蒸馏水至200mL,用1mol/L NaOH调pH至7.4~7.6。注意:配液中使用无菌蒸馏水,以避免水生性腐生钩体污染。

A.4.2.3 缓冲盐溶液

取200mL蒸馏水,加入5.039g Na₂HPO₄·12H₂O、0.6g KH₂PO₄、2.0g NaCl、2.0mL氯化铵贮存液、2.0mL维生素B₁₂贮存液,加蒸馏水至2000mL,调pH至7.4,分装后于121℃高压30min灭菌。

A.4.2.4 完整 EMJH 培养基

缓冲盐溶液1800mL+BSA营养液200mL。

A.4.2.5 EMJH 培养基过滤除菌

将不锈钢滤器清洗干净,取0.45μm和0.22μm两张滤膜叠在一起,孔径较大的滤膜在上,安放在滤器上,拧紧螺母将其固定。滤器经高压灭菌后,在无菌间进行EMJH培养基的除菌过滤。

A.4.2.6 EMJH 培养基质量控制

A.4.2.6.1 无菌试验:培养基接种血琼脂平板,37℃培养2d,如有杂菌生长,弃去。

A.4.2.6.2 检查有无腐生性钩端螺旋体或其他杂菌污染:培养基分别置30℃培养1周,37℃培养1周,室温培养2周,观察有无混浊,显微镜检查,如有微生物生长,弃去。

A.4.2.6.3 生长试验:接种1/10体积钩端螺旋体培养物,观察生长情况。

A.4.2.6.4 营养添加剂:如加入兔血清、胎牛血清增加营养,必须先进行MAT试验,MAT检测阴性的血清才能使用。

附录 B

(资料性附录)

钩端螺旋体病的鉴别诊断

B. 1.1 流行性感冒

主要在冬春季流行,呈呼吸道传染病的流行特征,与疫水接触无关。临床表现以呼吸道症状明显,全身症状一般较轻,白细胞计数常偏低。病原学和血清学检查对于鉴别诊断具有重要意义。

B. 1.2 流行性出血热

早期症状常有高热、头痛、全身酸痛、乏力、明显的结膜充血。在中后期有低血压、出血、肾衰竭,两病在同一地区流行时容易误诊。但流行性出血热多见于冬春季,发病与疫水接触无关;结膜充血伴有水肿,无腹股沟淋巴结肿痛;腋下、肩等处皮肤常有针尖大小出血点,往往呈线状分布;早期白细胞计数较低,以后增高;尿液有大量蛋白;青霉素治疗无效。

B. 1.3 登革热和登革出血热

本病常在钩端螺旋体病流行的地区和流行季节散发或流行。其特征为起病急,畏寒发热,多数患者有肌肉和关节痛,眼结膜充血及淋巴结肿大,有不同程度的皮肤、黏膜或腔道出血,少数病例可出现黄疸,肝脾肿大,尿中可出现蛋白、红、白细胞和管型等,与钩端螺旋体病临床表现相似。本病常见颜面、颈、上胸皮肤潮红,易见各型皮疹,白细胞计数常偏低,青霉素及其他抗生素治疗无效。临床上常用血清补体结合试验及红细胞凝集抑制试验辅助诊断。

B. 1.4 急性黄疸型病毒性肝炎

部分病毒性肝炎病例初期有畏寒,发热,头昏及全身酸痛等病毒血症症状,继而出现黄疸,类似黄疸出血型钩端螺旋体病。肝炎起病缓,大多数病例为低热,感染中毒症状轻,而消化道症状显著,罕有眼结膜充血,淋巴结肿大和腓肠肌压痛。钩端螺旋体病肝功能受损多较轻,血清转氨酶及碱性磷酸酶中度升高。检测血清中甲型肝炎和乙型肝炎的早期抗体(IgM),有助于肝炎的诊断。

B. 1.5 流行性乙型脑炎

钩端螺旋体病在我国许多地区与流行性乙型脑炎同时流行,而脑膜脑炎型钩端螺旋体病与乙型脑炎在临床上需要鉴别。钩端螺旋体病全身疼痛、四肢痛、关节痛、腓肠肌疼痛、眼结膜充血、浅表淋巴结肿痛和咯血较多见;脑膜脑炎型钩端螺旋体病以昏迷、抽搐为多。而流行性乙型脑炎以儿童多见,往往有持续高热、剧烈头疼等表现,结合流行病学资料、病原学和血清学检查有助于诊断。

中 华 人 民 共 和 国
卫 生 行 业 标 准
钩端螺旋体病诊断标准
WS 290—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：0.75

字 数：22 千字

版 次：2008 年 5 月第 1 版 2008 年 5 月第 1 版第 1 次印刷

书 号：14117·192

定 价：7.00 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 290—2008