

WS

中华人民共和国卫生行业标准

WS 278—2026

代替 WS 278—2008

流行性出血热诊断标准

Diagnostic standard for epidemic hemorrhagic fever

2026-07-01 发布

2027-06-01 实施

国家卫生健康委员会 发布
国家疾病预防控制中心

前 言

本标准为强制性标准。

本标准代替WS 278—2008《流行性出血热诊断标准》，与WS 278—2008相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- 更改了流行病学史（见4.1，2008年版的3.1）；
- 更改了临床表现（见4.2，2008年版的3.2）；
- 更改了实验室检测（见4.3，2008年版的3.3）；
- 更改了鉴别诊断（见第7章，2008年版的第6章）。

本标准由中国疾病预防控制中心负责组织技术审查、技术咨询、协调性和格式审查，由国家卫生健康委员会会同国家疾病预防控制中心共同管理。

本标准起草单位：中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所、北京大学第一医院、山东省疾病预防控制中心、陕西省疾病预防控制中心。

本标准主要起草人：王世文、李建东、李德新、梁米芳、王贵强、寇增强、余鹏博、黄晓霞、李阿茜。

本标准及其所代替标准的历次版本发布情况为：

- 1995年首次发布为 GB 15996—1995，2008年第一次修订转化为WS 278—2008；
- 本次为第二次修订。

流行性出血热诊断标准

1 范围

本标准规定了流行性出血热的诊断依据、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医务工作人员对流行性出血热的诊断、报告。

2 规范性引用文件

本标准没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

流行性出血热 epidemic hemorrhagic fever; EHF

由汉坦病毒引起的经啮齿类动物传播的一种自然疫源性疾病。

注：简称出血热。在国际上与流行性肾病（nephropathia epidemica）等统称为肾综合征出血热（hemorrhagic fever with renal syndrome, HFRS）。

4 诊断依据

4.1 流行病学史

- 4.1.1 发病前 2 个月内，有野外旅行、作业史，或流行区旅居史。
- 4.1.2 发病前 2 个月内，多在 2 周内，有与啮齿类动物或其排泄物（粪、尿等）、分泌物等有直接或间接接触史。

4.2 临床表现

- 4.2.1 急性起病，发热，可伴有乏力、寒战、肌痛、头痛、腰痛和眼眶痛，恶心、呕吐、腹泻等消化道症状，部分患者可出现视物模糊、嗜睡、烦躁、抽搐等神经精神症状。
- 4.2.2 充血、渗出表现：可出现面、颈、前胸部潮红，眼结膜、咽部充血潮红，球结膜、眼周和面部水肿。
- 4.2.3 出血表现：可出现皮肤、黏膜出血点，肉眼血尿、皮下血肿、瘀斑以及腔道出血表现。
- 4.2.4 肾脏损害：蛋白尿、镜下或肉眼血尿、尿中膜状物、少尿或多尿。
- 4.2.5 典型病程：可表现为发热期、低血压休克期、少尿期、多尿期和恢复期（五期经过）。

4.3 实验室检测

- 4.3.1 发热期外周血白细胞计数升高（早期可正常或偏低），血小板计数减少，异形淋巴细胞增多，血液浓缩。
- 4.3.2 尿蛋白阳性，可出现镜下血尿、管型尿；可有肉眼血尿、尿中膜状物；尿沉渣中可发现巨大的融合细胞。
- 4.3.3 血肌酐、血尿素氮升高。
- 4.3.4 血清特异性 IgM 抗体阳性（检测方法按本标准附录 A 中第 A.1 和 A.2 条）。
- 4.3.5 恢复期血清特异性 IgG 抗体阳转或滴度较急性期有 4 倍及以上增高（检测方法按本标准附录 A 中第 A.3 和 A.4 条）。
- 4.3.6 从患者标本中检出汉坦病毒 RNA（检测方法按本标准附录 B 中第 B.1 和 B.2 条）。

4.3.7 从患者标本中分离到汉坦病毒（检验方法按本标准附录 B 中第 B.3 条）。

5 诊断原则

根据患者流行病学史、临床表现和实验室检测等进行诊断（相关基本信息见附录 C）。

6 诊断

6.1 疑似病例

符合本标准第 4.1.1 条和（或）第 4.1.2 条，同时符合第 4.2.1 条～4.2.3 条中任一条，不支持其他发热性疾病诊断者。

6.2 临床诊断病例

疑似病例，同时符合本标准第 4.2.4 条、4.2.5 条、4.3.1 条～4.3.3 条中任一条者。

6.3 确诊病例

临床诊断病例或疑似病例，同时符合本标准第 4.3.4 条～4.3.7 条中任一条者。

7 鉴别诊断

本病应与钩端螺旋体病、脑脊髓膜炎、恙虫病、发热伴血小板减少综合征、感染性休克等其他发热感染性疾病，急性肾炎、急性肾盂肾炎等肾脏损害疾病，血小板减少症、过敏性紫癜、急性白血病等血液系统疾病，急性胃肠炎、感染性腹泻等消化道疾病等相鉴别。

附 录 A
(规范性)
流行性出血热血清学诊断方法

A.1 IgM捕获ELISA法(MacELISA)检测流行性出血热IgM抗体

A.1.1 原理

根据抗原抗体特异性结合的原理,利用抗人 μ 链特异性抗体捕获待检测血清中的IgM抗体,加入酶标病毒蛋白抗原,也可加入病毒蛋白抗原或灭活病毒与相应的酶标特异性抗体,反应后加底物显色或发光。显色程度或发光强度与特异性IgM抗体含量呈正相关。

A.1.2 标记抗原法

A.1.2.1 实验材料

材料与试剂如下,可根据所选用试剂盒的不同有所增减:

- a) 洗板机、酶标仪、恒温孵箱或水浴箱($37^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$);
- b) 10 μL ~200 μL 可调移液器、10 mL吸管;
- c) 稀释血清用的试管、吸水纸;
- d) 蒸馏水或去离子水;
- e) 洗液(PBS-T): 磷酸盐缓冲液(PBS), 含0.05%吐温20, pH 7.2;
- f) 流行性出血热IgM抗体捕获法ELISA诊断试剂盒。

A.1.2.2 实验步骤

应参考所选用试剂盒说明书进行相关检测,实验步骤如下:

- a) 将阴、阳性对照血清,待检血清用稀释液按1:100稀释,加入已包被抗人 μ 链抗体的酶标板中,100 μL /孔,置 37°C 孵育1 h,同时设空白对照;
- b) 弃去上清,用PBS-T漂洗5遍;
- c) 将适当稀释的酶标记的病毒抗原加入反应板相应孔内,100 μL /孔, 37°C 孵育1 h;
- d) 弃酶标抗体,用洗涤液洗涤5遍,吸水纸上扣干;
- e) 加显色液:于各反应孔内加显色液, 37°C ,避光5 min~10 min,至阳性对照孔显现蓝色;
- f) 加终止液(4N H_2SO_4)于每反应孔,50 μL /孔;
- g) 在30 min内于450 nm波长处读取每孔的吸光度。

A.1.2.3 结果判断

应结合所选用试剂盒进行结果判断,规则如下。

- a) 酶标仪读数法:阳性对照孔(P) OD值与阴性对照孔(N) OD值处于预测范围, $P/N \geq 2.1$,对照成立;若待检血清孔OD值与阴性对照孔OD值比值 ≥ 2.1 ,则标本为流行性出血热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,但应小于0.2)。
- b) 目测法:未加终止液前,在阳性对照血清为深蓝色、阴性对照血清为无色的情况下,若样品孔颜色比临界校准血清孔深者为阳性,样品孔颜色比临界校准血清孔浅者为阴性。

A.1.2.4 意义

IgM抗体阳性,表示患者新近汉坦病毒感染,适用于流行性出血热早期诊断。

A.1.3 标记抗体法

A.1.3.1 实验材料

材料与试剂如下,可根据所选用试剂盒的不同有所增减:

- a) 洗板机、酶标仪、恒温孵箱或水浴箱($37^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$);
- b) 10 μL ~200 μL 可调移液器、10 mL吸管;
- c) 稀释血清用的试管、吸水纸;

- d) 蒸馏水或去离子水;
- e) 流行性出血热IgM抗体捕获法ELISA诊断试剂盒。

A. 1.3.2 实验步骤

应参考所选用试剂盒说明书进行相关检测, 实验步骤如下:

- a) 将阴、阳性对照血清, 待检血清用稀释液1:100倍稀释, 分别加入反应板相应孔内, 100 μ L/孔, 置37℃孵育1 h;
- b) 弃去血清, 用洗涤液洗涤5次;
- c) 将汉坦病毒抗原、对照病毒抗原按照试剂盒说明书, 分别用稀释液稀释至工作浓度, 分别加入平行的两反应孔中, 100 μ L/孔, 37℃孵育1 h;
- d) 弃去抗原, 用洗涤液洗涤5次;
- e) 将辣根过氧化物酶标记的抗汉坦病毒特异性抗体按照试剂盒说明书用稀释液稀释至工作浓度, 加入每个反应孔中, 100 μ L/孔, 37℃孵育1 h;
- f) 弃去酶标抗体, 用洗涤液洗涤5次;
- g) 加显色液于每反应孔, 100 μ L/孔, 37℃避光5 min~10 min, 至阳性对照孔显出蓝色, 加终止液(4N H_2SO_4)于每反应孔, 50 μ L/孔;
- h) 在30 min内于450 nm波长处读取每孔的吸光度。

A. 1.3.3 结果判断

结果判断规则如下。

- a) 酶标仪读数法: 阳性对照孔(P) OD值与阴性对照孔(N) OD值处于预测范围, $P/N \geq 2.1$, 对照成立; 若待检血清孔OD值与阴性对照孔OD值比值 ≥ 2.1 , 则标本为流行性出血热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, 但应小于0.2)。
- b) 目测法: 未加终止液前, 在阳性对照血清孔为深蓝色、阴性对照血清孔为无色的情况下, 若样品孔与对照血清孔相比显示明显的蓝色则为阳性, 若比对照血清孔浅或相似者则为阴性。

A. 1.3.4 意义

IgM抗体阳性, 表示患者新近汉坦病毒感染, 适用于流行性出血热早期诊断。

A. 2 IgM捕获法胶体金标记试纸条快速检测IgM抗体

A. 2.1 实验材料

材料与试剂如下, 可根据所选用试剂盒的不同有所增减:

- a) 胶体金标记试纸条快速IgM检测试剂盒;
- b) 滴管或加样器。

A. 2.2 实验步骤

应参考所选用试剂盒说明书进行相关检测, 实验步骤如下:

- a) 如果试剂盒储存于4℃冰箱, 请将所有实验用试剂与器材取出, 平衡至室温;
- b) 打开密封的铝箔袋, 取出试剂盒, 平放于水平桌面上, 做好标记;
- c) 用滴管或加样器从盛有血清或血浆的试管中取2滴~3滴或100 μ L~150 μ L样品滴加于测试盒上的样品孔内, 于15 min内观察测试结果。

A. 2.3 结果判断

结果判断规则如下:

- a) 阳性: 可见质控线与试验线2条紫红色带;
- b) 阴性: 只有一条质控线出现;
- c) 无效: 如果未能观察到质控线出现, 则检测无效, 应重新检测;
- d) 阳性结果可在加样后1 min~2 min显示出来, 但阴性结果判断应在加样15 min后方可判定。

A. 2.4 意义

IgM抗体阳性,表示患者新近汉坦病毒感染,可用于流行性出血热早期诊断。

A.3 间接酶联免疫吸附试验检测抗汉坦病毒IgG抗体

A.3.1 原理

将重组汉坦病毒蛋白抗原包被酶标板,利用汉坦病毒蛋白抗原高免疫原性结合样本中病毒特异性抗体,再加酶标记的抗人IgG抗体进行检测,反应后加底物显色或发光。显色程度或发光强度与特异性IgG抗体含量呈正相关。

A.3.2 实验材料

材料与试剂如下,可根据所选用试剂盒的不同有所增减:

- 洗板机、酶标仪、恒温箱或水浴箱(37℃±2℃);
- 10 μL~200 μL可调移液器、10 mL吸管;
- 稀释血清用的试管、吸水纸;
- 蒸馏水或去离子水;
- 流行性出血热IgG抗体酶联免疫诊断试剂盒。

A.3.3 实验步骤

应参考所选用试剂盒说明书进行相关检测,实验步骤如下:

- 将待检血清用稀释液从1:100开始做2倍连续稀释至1:1600,加入抗原孔,100 μL/孔,同时设阴、阳性对照,37℃孵育1 h;
- 弃去血清,用洗涤液洗涤6次;
- 加酶结合物,根据说明书用稀释液按工作浓度稀释,100 μL/孔,37℃孵育1 h;
- 弃去酶标抗体,用洗涤液洗涤6次;
- 加显色液:于各反应孔内加A/B液各1滴,37℃,避光5 min~10 min,至阳性对照孔出现蓝色;
- 加终止液于每反应孔,50 μL/孔。

A.3.4 结果判断

应结合所选用试剂盒进行结果判断,规则如下。

- 酶标仪读数法:在30 min内于450 nm波长处读取每孔的吸光度,阳性对照孔OD值/阴性对照孔OD值,即P/N≥2.1,对照成立;若待检血清孔OD值与阴性对照孔OD比值≥2.1,则标本为流行性出血热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,但应小于0.2)。
- 目测法:未加终止液前,在阳性对照血清为深蓝色、阴性对照血清为无色的情况下,若样品孔与对照血清孔相比显示明显的蓝色则为阳性,若比对照血清孔颜色浅或相似者则为阴性。

A.3.5 意义

阳性结果,表明曾受到汉坦病毒感染,>1:100有诊断参考意义;恢复期血清抗体滴度比急性期抗体滴度有4倍或以上升高,或阳转,则可确诊。

A.4 免疫荧光试验(IFAT)检测IgG抗体

A.4.1 原理

采用汉坦病毒感染细胞,如Vero或Vero-E6细胞等,制备抗原片,结合血清或血浆样本中病毒特异性IgG抗体,然后使用荧光标记抗人IgG抗体进行检测,可在荧光显微镜下直接观察特异性荧光显色,阳性结果说明患者曾感染汉坦病毒,如果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。

A.4.2 实验材料

材料与试剂如下,可根据所选用试剂盒的不同有所增减:

- 抗原片:家鼠型和姬鼠型汉坦病毒标准毒株感染Vero E6制备,低温干燥保存;

- b) 阳、阴性对照：患者恢复期血清（阳性对照）、阴性血清；
- c) 荧光素标记羊抗人（或兔抗人）IgG抗体；
- d) 常用稀释液：pH 7.2~7.4, 0.02mol/L PBS, 伊文思蓝等；
- e) 荧光显微镜。

A. 4.3 实验步骤

应参考所选用试剂盒说明书进行相关检测，实验步骤略述如下：

- a) 用PBS稀释待检血清，从1:20开始做4倍连续稀释至1:320，或至所需要的稀释度；
- b) 取出抗原片，用PBS漂洗；
- c) 用加样器，按照稀释度从高到低的顺序依次加入待检血清，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），同时设阳性、阴性对照，在37℃湿盒孵育30 min~40 min；
- d) 用PBS洗涤3次，每次5 min；
- e) 用含伊文思蓝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℃湿盒孵育30 min，然后步骤同d）；
- f) 荧光显微镜观察结果。

A. 4.4 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。可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，将免疫荧光反应大致区分为1个~4个“+”。阳性细胞数：<25% 为“+”，25%~50% 为“++”，51%~75% 为“+++”，>75% 为“++++”；出现特异性荧光者为“+”（阳性），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。

A. 4.5 意义

阳性结果，表明曾受到汉坦病毒感染，大于1:20有诊断参考意义。

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，或阳转则可确诊。

附 录 B

（规范性）

流行性出血热病原学诊断方法

可采用逆转录聚合酶链式扩增（Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR）、实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应（quantitative Real-time RT-PCR, qRT-PCR）、基因测序或其他经过评估合格的病毒基因组核酸检测方法进行检测，检出特异性病毒核酸具有确诊意义。

B.1 流行性出血热病毒RT-PCR法核酸检测

B.1.1 原理

PCR技术是在特异性引物存在的条件下，利用双链DNA分子碱基配对原则，在体外扩增DNA片段，其特异性取决于寡核苷酸引物的序列。引物与待扩增片段两条链两段DNA序列分别互补结合后，在DNA聚合酶催化下，引导引物的5'端向3'端方向延伸合成新链，是温度控制下可重复进行的热变性、复性延伸的温控循环过程，可使DNA产量呈指数上升。汉坦病毒为负链RNA病毒，PCR扩增检测前需经过逆转录酶作用，合成第一条cDNA链，再进行PCR扩增，即RT-PCR。设计不同特异性引物可扩增不同种汉坦病毒基因。从患者标本中提取病毒基因组RNA，利用适当方法进行核酸检测，可通过扩增片段大小鉴定、基因组序列比对分析、特异性引物探针序列等方式，达到病原体鉴定和基因分型目的。

B.1.2 实验材料

材料与试剂如下，可根据所选用试剂盒的不同有所增减：

- a) 急性期患者血标本或分离的汉坦病毒；
- b) RNA提取试剂盒；
- c) 汉坦病毒核酸扩增引物及分型引物（表B.1）；
- d) 逆转录与PCR扩增试剂盒；
- e) 移液器（10 μL、20 μL、100 μL、200 μL、1000 μL）及配套吸头、PCR反应管、离心管（1.5 mL）及管架、台式高速离心机、普通冰箱、旋涡混合器、PCR扩增仪等。

表B.1 流行性出血热病毒RT-PCR法核酸检测及基因分型参考引物序列

引物名称	引物序列（5'→3'）	片段大小	型别
HantaMF	5' -GGACCTGGTGCCAGTTGTGAAGC-3'	490bp	通用
HantaMR	5' -ACCTCACAACCATTTGAACC-3'		
HTNG1F	5' -TGCAACGGGCAGAGGAAAGT-3'	242bp	汉滩
HTNG1R	5' -GTACTGATTTTAGCCTATCTC-3'		
SEOG1F	5' -TGTAATGGTCAGAAAAAGAC-3'	287bp	首尔
SEOG1R	5' -CGTAGAATGGCTTTGAATCGGTT-3'		

B.1.3 实验步骤

应参照所选用试剂盒说明书进行相关检测，参考步骤如下。

- a) 病毒RNA的提取：按试剂说明书操作，制备模板RNA。
- b) 逆转录合成cDNA：可用随机引物或病毒特异性引物，按商业化逆转录酶说明书进行。
- c) PCR扩增：根据实验室内所使用病毒核酸PCR扩增试剂盒特点，通用型正、反向引物配置第一轮PCR体系，进行第一轮PCR扩增。推荐反应条件为94℃预变性2 min，然后94℃变性30 s，55℃退火30 s，72℃延伸1 min，共35个循环。

s, 72℃延伸1 min, 反应40循环, 最后72℃延伸10 min。第二轮分型PCR扩增体系配置采用分型正向引物与反向引物。推荐反应条件为94℃预变性2 min, 然后94℃变性30 s, 55℃退火30 s, 72℃延伸1 min, 反应30循环, 最后72℃延伸10 min。

d) 电泳分析: 1.5%浓度琼脂糖电泳分析, 根据扩增条带大小确定病毒型别。若条带的分子量与预期片段大小相同, 则表明为特异性扩增产物。

必要时, 可进行:

e) PCR片段的回收和核苷酸序列测定: 切下特异分子量条带, 用凝胶电泳回收试剂盒回收纯化所扩增的DNA片段(按相应试剂盒说明书进行), 测序仪测序。

B.1.4 意义

排除PCR污染后, 扩增到特异性条带可确诊汉坦病毒感染, 根据片段大小和序列测定可对汉坦病毒进行分型, 阴性结果不能排除诊断。

B.2 流行性出血热病毒qRT-PCR法核酸检测

B.2.1 原理

在我国, 流行性出血热主要由姬鼠型(汉滩型)和家鼠型(首尔型)汉坦病毒引起, 根据病毒基因组序列特征, 设计特异性引物和特异性荧光标记核酸探针, 可快速实现病毒分型检测。探针结合部位位于引物结合区域内, 其5'端和3'端可分别标记不同的荧光素, 称为报告荧光基团(用R表示)和淬灭荧光基团(用Q表示, 淬灭荧光基团也可用小沟结合物MGB)。当引物和探针同时与目的基因片段结合时, 探针R基团发出的荧光信号被Q基团所吸收, 仪器检测不到R所发出的荧光信号; 当PCR扩增延伸到探针结合部位时, Taq酶发挥5'→3'外切核酸酶的功能, 将探针水解成单核苷酸, 探针上的R基团游离释放, 所发出的荧光不再为Q基团所淬灭, 可被检测仪接收识别, 随着PCR循环扩增反应的延续, R和Q基团游离于溶液中的量不断增加, 仪器可继续检测到R所发出的荧光信号。qRT-PCR可定性或定量检测标本中的病毒核酸。

B.2.2 实验材料

材料与试剂如下, 可根据所选用试剂盒的不同有所增减:

- 急性期患者血标本或分离的汉坦病毒;
- RNA提取试剂盒;
- 汉坦病毒核酸实时荧光RT-PCR扩增检测引物(表B.2), 或其他流行性出血热实时荧光RT-PCR检测试剂盒;
- 移液器(10 μL、20 μL、100 μL、200 μL、1000 μL)及配套吸头、PCR反应管、离心管(1.5 mL)及管架、台式高速离心机、普通冰箱、旋涡混合器、实时荧光PCR仪等。

表B.2 流行性出血热病毒实时荧光RT-PCR法核酸检测参考引物探针序列

病毒	引物/探针	序列(5'-3')
汉滩	F(771-793)	GCTTCTTCCAGATACAGCAGCAG
	R(862-884)	GCCTTTGACTCCTTTGTCTCCAT
	P(811-839)	FAM-CCTGCAACAAACAGGGAYTACTTACGGCA-BHQ1
首尔	F(217-237)	GATGAACTGAAGCGCCAACTT
	R(272-291)	CCCTGTAGGATCCCGGTCTT
	P(239-263)	HEX-CCGACAGGATTGCAGCAGGGAAGAA-BHQ1

B.2.3 实验步骤

应参照所选用试剂盒说明书进行相关检测，参考步骤如下。

- a) 病毒RNA的提取：按试剂说明书操作，制备模板RNA。
- b) 实时荧光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 μL ，酶0.5 μL ，缓冲液12.5 μL ，引物各0.5 μL （共2对，4条，浓度为20 μM ），探针各0.25 μL ，加水至总体积25 μL 。推荐反应条件为50 $^{\circ}\text{C}$ 30 min，95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min，95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s，60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s反应40个循环。具体反应体系可根据所使用的试剂和荧光PCR仪器进行优化调整。

B.2.4 结果判断

以荧光PCR反应的前3个~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，可判断为相应的汉坦病毒核酸检测阳性，Ct>38可判断为阴性，Ct值处于35~38之间者，可判断为灰区，需采用另一套引物探针或其他检测方法进行检测判断。

B.2.5 意义

排除污染后，检出病毒核酸可确诊汉坦病毒感染，用于早期诊断，阴性结果不能排除病毒感染。

B.3 病毒分离

B.3.1 原理

病毒不能独立生存，需依赖宿主细胞完成自我复制。Vero-E6 和Vero细胞对汉坦病毒敏感，可用于汉坦病毒的分离、培养，一般不产生显著病变，可通过观察细胞内和培养上清中，病毒蛋白抗原和核酸的变化情况，检验病毒的存在和型别。汉坦病毒的分离培养需在生物安全二级或以上级别实验室内进行。

B.3.2 实验材料

材料与试剂如下，可根据所在实验室的习惯与规程有所增减。

- a) 10 μL ~200 μL 、1 mL移液器、无菌吸头。
- b) 96孔、24孔组织培养板或T25细胞培养瓶或细胞培养管。
- c) Vero E6细胞或其他敏感细胞，Vero E6细胞一般较其他细胞敏感。
- d) CO₂培养箱、生物安全柜、倒置显微镜。
- e) 细胞生长液、维持液与Hank's液。
- f) 患者血标本或宿主动物标本。无菌采集发病后5 d内静脉血3 mL，置冰壶中，于实验室中分离血清，接种细胞培养；不能及时接种细胞者可置-70 $^{\circ}\text{C}$ 保存。污染的血清要先用双抗（青霉素、链霉素，最终浓度各500 000 U/mL），4 $^{\circ}\text{C}$ 2 h处理后接种细胞。

B.3.3 实验步骤

可根据所在实验室的规程有所调整，具体步骤参考如下。

- a) 样本处理和稀释：患者急性期血清标本适当稀释后（如1:10、1:20等）可直接用于病毒分离，在病毒细胞培养分离设置一个正常人血清同样比例稀释作为阴性对照。
- b) 细胞接种：将培养好的Vero-E6或Vero单层细胞上清弃掉，用Hank's液洗涤2遍，用Hank's液1:10稀释的早期血清标本0.5 mL~1 mL接种T25细胞培养瓶中长成单层的细胞。在37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱吸附2 h后用无菌Hank's液洗涤细胞层1次~2次，每次5 mL，最后加入维持液5 mL，37 $^{\circ}\text{C}$ 培养。每隔3 d~4 d换培养液。
- c) 培养至第10 d~14 d刮取少量细胞点抗原片进行免疫荧光检测，如果荧光检测阳性，则收集上清接种新鲜细胞进行病毒培养，确定病毒型别；如果检测结果仍为阴性，则收集培养液，冻存于-70 $^{\circ}\text{C}$ 或液氮中以备重新检测，细胞需继续传代。
- d) 连续传代：用胰酶消化以上步骤中检测为阴性的细胞，用3 mL~4 mL新鲜培养液悬浮细胞，取1/2（1.5 mL~2 mL）细胞悬液与大约同等数量的新鲜制备的正常细胞联合培养，重复步骤c），检测至第3代。取剩余1/2（1.5 mL~2 mL）细胞悬液离心后保存于-70 $^{\circ}\text{C}$ 待查。

e) 病毒抗原和核酸检测：刮取少量细胞制备抗原片，利用汉坦病毒特异性抗体进行免疫荧光检测，如果荧光检测阳性，说明存在病毒复制，应参照汉坦病毒核酸检测方法，提取核酸，进行序列分析，并妥善保存。连续传代至第3代，检测仍为阴性者，可判断为阴性，相应培养物可按废弃物处理。

f) 废弃物处理：所有实验用品都应严格按照有关实验室安全管理条例处理方法高压处理。

B.3.4 结果判断

结果判断规则如下：

a) 免疫荧光法检测用于分离汉坦病毒细胞，若荧光呈阳性，提示在细胞中有汉坦病毒复制，若阴性，提示细胞中未发生病毒显著复制。

b) 用于分离汉坦病毒的传代细胞中，病毒基因组核酸检测阳性，提示在细胞中有汉坦病毒复制，若阴性，提示细胞中未发生病毒显著复制。

B.3.5 意义

阳性结果，表明患者汉坦病毒感染；阴性结果，不能排除诊断。

附 录 C

(资料性)

流行性出血热病原学、临床及流行病学资料

C.1 病原学

可引起流行性出血热的汉坦病毒分类属于汉坦病毒科 (Hantaviridae) 哺乳动物汉坦病毒亚科 (Mammantavirinae) 正汉坦病毒属 (Orthohantavirus), 为有包膜的分节段单股负链RNA病毒, 成熟的病毒颗粒具有多形性, 多呈圆形或卵圆形, 直径在75 nm~210 nm, 平均直径约为120 nm, 基因组由L、M和S三个片段组成。目前已分类的正汉坦病毒有38种, 在我国流行的汉坦病毒主要为首尔正汉坦病毒 (Seoul Orthohantavirus) 和汉滩正汉坦病毒 (Hantaan Orthohantavirus), 宿主动物分别为褐家鼠和黑线姬鼠。在棕背䟽等啮齿类宿主动物中还发现普马拉正汉坦病毒 (Puumala Orthohantavirus) 等其他种类汉坦病毒, 但人间感染情况及致病特征尚不明确。

汉坦病毒对一般有机溶剂和消毒剂敏感, 氯仿、丙酮、 β -丙内酯、酸 (pH小于3)、苯酚、甲醛等均可灭活, 对温度、放射线、紫外线等敏感, 60℃ 30 min、钴-60及紫外线照射可灭活。

C.2 临床表现

人感染汉坦病毒后, 潜伏期一般为4 d~45 d, 多为7 d~14 d, 表现为急起发热, 早期症状包括发热、头痛、寒战、肌痛、恶心、呕吐、腹痛、腹泻等, 程度不同的面部和结膜等充血表现, 以及球结膜、腋下皮肤出血点等出血表现, 累及肾脏。疾病的严重程度多取决于所感染病毒的种类, 汉滩正汉坦病毒感染引发疾病一般较重, 首尔正汉坦病毒感染病例大部分临床症状较轻, 临床分期不明显, 但也可引起严重疾病; 普马拉正汉坦病毒感染一般引起轻微疾病 (病死率<1%), 主要在欧洲流行, 称为流行性肾病。

该病的典型病程表现为5个临床阶段: 发热期、低血压休克期、少尿期、多尿期和恢复期, 轻症病例可存在越期现象, 不出现低血压休克期、少尿期, 重症病例可有病期重叠现象, 即发热期、低血压休克期和少尿期相互重叠。发热期特征是高热、头痛、腰痛、眼眶痛 (三痛), 全身不适和食欲减退, 可出现严重的腹痛, 经常伴随恶心、呕吐, 面部、颈部和胸部潮红 (三红), 皮肤瘀点和结膜充血, 可持续3 d~7 d。低血压休克期可持续几小时到3 d, 特征是退热时发生低血压, 可导致休克和更明显的出血表现。少尿期可在病后3 d~10 d出现, 持续2 d~5 d, 血压恢复正常或偏高, 纳差、恶心、呕吐可继续存在, 会发生严重出血和尿量急剧减少, 大多数死亡病例发生在低血压休克期和少尿期。出现多尿预示着开始恢复, 尿量可达到每天3 L~6 L。恢复期可持续数周至数月。

C.2.1 发热期

发热期可出现发热、全身中毒症状、毛细血管损害表现、肾脏损害表现以及肝脏损害等临床表现。

a) 发热: 起病急骤, 体温一般波动在38℃~40℃, 可超过40℃, 可伴有畏寒、寒战。也有体温缓慢上升者, 发病2 d~3 d后升至40℃。热型以稽留热和弛张热多见, 少数为不规则热型。热程可为2 d~13 d, 多持续3 d~6 d, 平均5 d。一般患者体温升高程度和持续时间与病情轻重密切相关。轻型病例及家鼠型患者, 常于热退后, 病情减轻, 中、重型病例热退后病情反而加剧。

b) 全身中毒症状: 表现为困倦无力, 全身肌肉关节酸痛; 食欲减退、恶心、呕吐、腹痛及腹泻等消化道症状, 可因剧烈腹痛、腹部压痛及反跳痛而误诊为急腹症, 亦可因腹泻或黏液血便诊断为中毒型细菌性痢疾。重症患者可出现嗜睡、烦躁、谵妄及抽搐等神经精神症状。

c) 毛细血管损害表现: 充血、渗出和出血现象。“三红”表现为颜面、颈部、上胸部皮肤显著充血, 潮红, 似酒醉貌; 也可见眼结膜、舌尖及舌乳头充血、潮红。水肿为本病的特点, 可出现下水肿、球结膜水肿或胸腔积液、腹水。出血表现为软腭、口腔黏膜、眼结膜以及皮肤出血点, 典型出血点分布在软腭、腋下、前胸及后背部皮肤, 呈条索样、挠抓样或串珠样瘀点或瘀斑, 亦可有鼻出血、咯血、血尿及消化道出血。

d) 肾脏损害表现: 发病后第2 d~4 d即可出现, 主要表现为蛋白尿、镜下或肉眼血尿, 尿中膜状物、管型尿和少尿。

e) 肝脏损害表现：尤其在姬鼠型汉滩正汉坦病毒感染患者中，可出现黄疸，转氨酶增高，甚至表现为暴发型肝炎。

C.2.2 低血压休克期

多发生在发病后第4 d~6 d，一般出现在退热前1 d~2 d，或热退同时血压下降，轻者持续数小时，呈一过性血压下降，重者可持续数天，一般为1 d~3 d。低血压休克发生率差异较大，轻型病例可不出现，家鼠型患者发生率低且程度轻。

此期发热渐退，但其他症状反而加重。开始血压下降时四肢尚温暖，随着病情发展可出现面色苍白、四肢厥冷、发绀、脉搏细弱甚至触不到，尿量减少，并可因脑供血不全而出现谵妄、烦躁，甚至神志不清。

C.2.3 少尿期

多发生在发病后第5 d~8 d，可早在第3 d，迟至第10 d出现，一般持续2 d~5 d。轻型可越过此期，亦可与低血压休克期同时存在。有的患者从发热期直接进入少尿期，或表现为发热、低血压、少尿三期重叠。此期临床表现为急性肾衰竭，出现尿毒症、代谢性酸中毒、电解质紊乱等，并可有严重的高血容量综合征，表现为表浅静脉充盈、血压增高、脉压差增大、脉搏洪大及血液稀释的表现等，可出现心力衰竭，肺水肿和脑水肿等。

少尿期是本病的极期，易出现一些并发症，如严重的细菌或真菌感染、呼吸衰竭、呼吸窘迫综合征及大出血等。

C.2.4 多尿期

多于病程第9 d~14 d出现，少尿期末，尿量逐渐增多，持续8 d~12 d（个别可达数月）。可分为三个阶段，即移行期、多尿早期和多尿后期。

a) 移行期及多尿早期：此二期尿量可增加至每天2 L，但肾小管功能尚未恢复，血尿素及血肌酐仍异常或继续升高，症状及病情仍严重，仍可发生少尿期的各种并发症而死亡。

b) 多尿后期：尿量不断增加，至每天3 L以上，多为4 L~6 L，可达10 L以上。此时氮质血症及临床症状均逐渐好转，但亦存在因多尿造成的水、电解质紊乱，如脱水、低血钾、低血钠等，亦可发生继发感染及多器官衰竭等并发症，约40%~95%患者出现多尿，有些患者在发热期后，不发生低血压休克期、少尿期而直接进入多尿期，也有患者无多尿期。

C.2.5 恢复期

多在病后3周~4周开始恢复，尿量逐渐减少并接近正常，每天尿量2 L左右。食欲增强，甚至出现食欲亢进，体力也逐渐恢复，各种实验室常规检查指标基本正常。部分重症病例的恢复期可长达半年以上。

C.3 流行性出血热临床检查

C.3.1 血常规

血常规检测常见白细胞计数、血红蛋白和红细胞以及血小板计数异常。

a) 白细胞计数：早期白细胞数低或正常，在第2 d~3 d逐渐升高，可升高至 $15 \times 10^9/L$ ~ $30 \times 10^9/L$ 或更高，早期中性粒细胞增高，核左移，有中毒颗粒，4 d~5 d以后淋巴细胞增高，并可出现异型淋巴细胞，重症患者可见幼稚细胞呈类白血病反应。

b) 血红蛋白和红细胞：由于血浆外渗，导致血液浓缩，血红蛋白和红细胞数可升高达150g/L以上。在少尿期，高血容量综合征时可表现为血液稀释。

c) 血小板计数：从发病后第2 d起开始减少，一般在 $50 \times 10^9/L$ ~ $80 \times 10^9/L$ 范围，并可见异型血小板，重症患者可 $<10 \times 10^9/L$ 。

C.3.2 尿常规

常见尿常规检测异常表现如下：

a) 可有肉眼血尿和尿中膜状物，尿中小片状膜样物系由尿蛋白及脱落的上皮细胞组成。

b) 尿常规镜检可见尿蛋白、红细胞、白细胞和管型。尿蛋白常于病程第2 d出现,发病第4 d~6 d尿蛋白常达“+++”~“++++”。

c) 尿沉渣中可发现巨大的融合细胞,可能是病毒感染引起泌尿系统细胞融合脱落而形成,在融合细胞中可检出汉坦病毒抗原。

C.3.3 血液生物化学检查

常见血液生物化学检查异常表现如下。

a) 血浆尿素氮多于病后3 d~4 d升高,重症病人升高明显;血肌酐含量增高,与血中尿素氮变化一致,较尿素氮敏感。

b) 二氧化碳结合力普遍下降,肾功能损害越严重,下降越明显。

c) 多数患者出现肝功能异常,可有ALT升高、血总胆红素升高。可见心肌酶学指标异常。

C.4 流行病学

C.4.1 传染源

汉坦病毒宿主动物主要包括啮齿目、食虫目、兔形目、食肉目及偶蹄目等,病毒分布具有一定地区特异性。带病毒啮齿类动物是流行性出血热的主要传染源。我国已发现60余种脊椎动物可感染汉坦病毒,以黑线姬鼠、褐家鼠为主。其次,是以家栖为主的小家鼠、黄胸鼠,野栖的黄毛鼠、大仓鼠和黑线仓鼠以及林区的大林姬鼠、小林姬鼠等带毒率也较高,可在病毒传播中发挥作用。实验用大白鼠被感染后可成为传染源。其他啮齿类动物多属于次要宿主动物或偶然感染者,流行病学意义有待进一步评估。猫、犬、猪等家养动物在特定条件下也能感染病毒,但作为传染源的意义小。

C.4.2 传播途径

流行性出血热可通过多种途径传播,以动物源性传播为主。

a) 呼吸道传播:吸入携带病毒的啮齿类动物排泄物和分泌物(尿、粪便、唾液)的气溶胶被认为是主要的传播方式。

b) 接触传播:直接接触携带病毒的啮齿类动物排泄物、分泌物,或被带病毒的啮齿类动物咬伤,病毒经由破损的皮肤或黏膜侵入人体。

c) 经消化道传播:食入被携带病毒的啮齿类动物排泄物、分泌物污染的水和食物,可能造成汉坦病毒经口腔或消化道黏膜侵入人体。

d) 媒介传播:带病毒的革螨、恙螨叮咬人体也可传播流行性出血热。革螨主要包括格氏血厉螨、厩其厉螨、耶氏厉螨、鼠腭毛厉螨、柏氏禽刺螨等;恙螨主要为小盾纤恙螨。

e) 有研究提示,孕妇感染汉坦病毒,存在通过胎盘将病毒传给胎儿的风险,未见其他人与人之间直接传播的报道。

C.4.3 人群易感性和免疫力

未免疫人群普遍易感,感染后可获得持久的免疫力,鲜有再次感染发病者。人群免疫接种资料证明,灭活疫苗接种是个人预防流行性出血热的有效手段。

C.4.4 流行病学特征

血清流行病学调查证实,汉坦病毒呈全球分布,尤其是首尔正汉坦病毒。世界上有30多个国家发现肾综合征出血热,主要分布在欧亚大陆,其中发病最多的国家为中国、俄罗斯、朝鲜、芬兰、瑞典、挪威、波兰等。亚洲发病率最高,病例数占全世界的90%以上,其次为欧洲约占7%,非洲和美洲不足1%。

C.4.4.1 地区分布

病例分布高度分散,在我国呈全国性分布,又相对集中,近年来,陕西省、黑龙江省、山东省、辽宁省报告病例数较高,其次为湖南、湖北、江西和吉林等省份。宿主动物地区分布的不均衡,决定了每个省、市(地)、县(区)、乡镇,甚至每个村寨的人群发病的分布不均衡,而宿主动物地区分布可因食物和温度等条件的改变而改变,但疫源地分布又有相对稳定性。

C.4.4.2 年龄、性别、职业分布

各年龄组均可发病，青壮年居多，男性多于女性，职业以农民为主。年龄、性别、职业上的分布差异主要与接触传染源的机会有关。

C. 4. 4. 3 季节性

全年均有病例报告，具有季节性，呈现春夏季和秋冬季两个发病高峰，春夏峰多在5月或6月达到顶峰，秋冬峰多在11月达到顶峰，一般秋冬峰高于春夏峰。不同地区，发病季节性分布特征有所差异，季节性分布特点与鼠类繁殖和人群活动有关。

C. 4. 4. 4 流行类型

我国根据引发病毒感染的宿主动物不同，将流行区分为三型：

- a) 姬鼠型：主要分布在农作物区和林区，传染源以黑线姬鼠为主，临床病情较重，病程较为典型；
- b) 家鼠型：主要分布于城市、市郊，以褐家鼠为优势鼠种，可呈暴发流行，流行强度多大于姬鼠型，病例性别、年龄差别小，临床病情一般较轻；
- c) 混合型：同一地区同一时间可有上述两型出血热的流行。

参 考 文 献

- [1] 中国卫生部疾病控制司. 流行性出血热防治手册[M]. 2版. 北京:人民卫生出版社, 1998.
- [2] 陈化新, 罗成旺. 肾综合征出血热监测及疫苗应用研究[M]. 香港:香港医药出版社, 2001.
- [3] 宋干, 杭长寿, 裘学昭, 等. 用非疫区黑线姬鼠分离到流行性出血热病原因子(简报)[J]. 中国医学科学院学报, 1982, 1:66.
- [4] 杭长寿, 宋干, 裘学昭, 等. 一种轻型出血热的病原学研究[J]. 中华流行病学杂志, 1982, 3(4):204-205.
- [5] 中华预防医学会感染性疾病防控分会, 中华医学会感染病学分会. 肾综合征出血热防治专家共识[J]. 中华传染病杂志, 2021, 39(5):257-265.
- [6] 流行性出血热诊断标准:WS 278-2008[S]. 2008.
- [7] 邓雪飞, 杜珊珊, 黄晓霞, 等. 2004—2021年中国肾综合征出血热报告病例流行病学特征分析[J]. 疾病监测, 2023, 38(1):70-74.
- [8] Schmaljohn C, Hjelle B. Hantaviruses: a global disease problem[J]. Emerg Infect Dis, 1997, 3(2):95-104.
- [9] Lee H W, Lee P W, Johnson K M. Isolation of the etiologic agent of Korean Hemorrhagic fever[J]. J Infect Dis, 1978, 137(3):298-308.
- [10] Brummer-Korvenkontio M, Vaheri A, Hovi T, et al. Nephropathia epidemica: detection of antigen in bank voles and serologic diagnosis of human infection[J]. J Infect Dis, 1980, 141(2):131-134.
- [11] Avsic-Zupanc T, Xiao S Y, Tstojanovic R, et al. Characterization of Dobrava virus: a Hantavirus from Slovenia Yugoslavia[J]. J Med Virol, 1992, 38:132-137.
- [12] Plyusnin A, Vapalahti O, Lankinen H, et al. Tula virus: a newly detected hantavirus carried by European common voles[J]. J Virol, 1994, 68(12):7833-7839.
- [13] Bowen M D, Gelbmann W, Ksiazek T G, et al. Puumala virus and two genetic variants of Tula virus are present in Austrian rodents[J]. J Med Virol, 1997, 53:174-181.
- [14] Jonsson C B, Schmaljohn C S. Replication of hantaviruses[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2001, 256:15-32.
- [15] Kraus A A, Raftery M J, Giese T, et al. Differential Antiviral Response of Endothelial Cells after Infection with Pathogenic and Nonpathogenic Hantaviruses[J]. J Virol, 2004, 78(12):6143-6150.
- [16] Plyusnin A, Morzunov S P. Virus evaluation and genetic diversity of hantaviruses and their rodent hosts[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2001, 256:47-75.
- [17] Nuzum E, Rossi C A, Stephenson E H, et al. Aerosol transmission of Hantaan and related viruses to laboratory rats[J]. Am J Trop Med Hyg, 1988, 38(3):636-640.