

中华人民共和国卫生行业标准

WS 216—2018
代替 WS 216—2008

登革热诊断

Diagnosis for dengue fever

2018-03-06 发布

2018-08-01 实施

中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会发布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 术语和定义	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（规范性附录） 登革热血清学检测方法	3
附录 B（规范性附录） 登革热病原学检测方法	10
附录 C（资料性附录） 登革热的鉴别诊断	16
附录 D（资料性附录） 登革热的病原学、流行病学及临床表现	18
参考文献	21

前 言

本标准第5章为强制性条款,其余为推荐性条款。

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准代替WS 216—2008《登革热诊断标准》。

本标准与WS 216—2008相比,主要技术变化如下:

- 修改了适用范围(见第1章,2008年版的第1章);
 - 术语和定义删除了束臂试验,增加了重症登革热和NS1抗原(见第2章,2008年版的第2章);
 - 修改了临床表现(见第3章,2008年版的3.2);
 - 修改了实验室检查(见第3章,2008年版的3.3);
 - 删除了“血液浓缩;低蛋白血症”指标(见2008年版的3.3.3);
 - 增加了“发病5d内的登革病毒NS1抗原检测阳性”指标(见第3章,2008年版的3.3);
 - 修改了疑似病例(见第5章,2008年版的5.1);
 - 修改了临床诊断病例(见第5章,2008年版的5.2);
 - 修改了确诊病例(见第5章,2008年版的5.3);
 - 增加了重症病例(见第5章,2008年版的5.4);
 - 调整了附录A和附录B的顺序;
 - 附录A中增加了“酶联免疫法检测登革病毒NS1抗原”方法,删除了原有的“血凝抑制(HI)试验检测登革病毒血凝抑制抗体”方法(见附录A和附录B,2008年版的附录A和附录B);
 - 修改了附录D中内容,将原有的“登革出血热”和“登革休克综合征”改为“重症登革热”,将重症登革热的高危人群和早期识别重症病例的预警指征纳入(见附录D,第5章,2008年版的附录D)。
- 本标准起草单位:广东省疾病预防控制中心、广州市第八人民医院、中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所、中国疾病预防控制中心、首都医科大学附属北京地坛医院、中国军事医学科学院微生物流行病研究所。
- 本标准主要起草人:何剑峰、张复春、王世文、殷文武、李建东、李兴旺、秦成峰、王建、吴德、邓爱萍。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- WS 216—2001;
- WS 216—2008。

登革热诊断

1 范围

本标准规定了登革热的诊断依据、诊断原则、诊断和鉴别诊断。

本标准适用于各级各类医疗卫生机构及其医务人员对于登革热病例的诊断。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

重症登革热 severe dengue

登革热的一种严重类型，临床表现为严重出血、休克、严重脏器损伤等。

2.2

NS1 抗原 NS1 antigen

登革病毒非结构蛋白中的一种糖蛋白，其大量存在于感染细胞的表面，可作为早期诊断的特异性指标。

3 诊断依据

3.1 流行病学史

发病前 14d 内，曾经到过登革热流行区，或居住场所或工作场所周围 1 个月内曾出现过登革热病例。

3.2 临床表现

3.2.1 急性起病，突发高热，明显疲乏、厌食、恶心等，常伴有较剧烈的头痛、眼眶痛、全身肌肉痛、骨关节痛等症状，可伴面部、颈部、胸部潮红，结膜充血等。

3.2.2 皮疹：于病程第 3 天～第 6 天在颜面四肢出现充血性皮疹或点状出血疹。典型皮疹为见于四肢的针尖样出血点及“皮岛”样表现等。皮疹分布于四肢躯干或头面部，多有痒感，不脱屑。持续 3 d～5 d。

3.2.3 出血倾向：部分病人可出现不同程度的出血表现，如皮下出血、注射部位瘀点、牙龈出血、鼻衄及束臂试验阳性等。

3.2.4 严重出血：皮下血肿，肉眼血尿，消化道、胸腹腔、阴道、颅内等部位出血。

3.2.5 严重脏器损伤：急性心肌炎、急性呼吸窘迫综合征、急性肝损伤、急性肾功能不全、中枢神经系统损伤等表现。

3.2.6 休克：心动过速、肢端湿冷、毛细血管充盈时间延长 $>3s$ 、脉搏细弱或测不到、脉压差减小或血压测不到等。

3.3 实验室检查

3.3.1 白细胞计数减少和/或血小板减少。

3.3.2 登革病毒 IgM 抗体阳性（见附录 A 中 A.1、A.2）。

3.3.3 发病 5d 内的登革病毒 NS1 抗原检测阳性（见 A.3）。

3.3.4 登革病毒恢复期血清特异性 IgG 抗体滴度比急性期有 4 倍及以上增长或阳转（见 A.4、A.5）。

3.3.5 从急性期病人血液、脑脊液或组织等中分离到登革病毒（见附录 B 中 B.1、B.2）。

3.3.6 应用 RT-PCR 或实时荧光定量 RT-PCR 检出登革病毒核酸（见 B.3、B.4）。

4 诊断原则

依据患者的流行病学证据、临床表现及实验室检查结果进行综合判断。

5 诊断

5.1 疑似病例

符合下列一项可诊断为疑似病例：

- a) 符合 3.1，并同时符合 3.2.1。
- b) 同时符合 3.2.1、3.3.1。

5.2 临床诊断病例

符合下列一项可诊断为临床诊断病例：

- a) 符合 5.1a)，并同时符合 3.2.2、3.2.3 中任一项和 3.3.1。
- b) 符合 5.1，并同时符合 3.3.2、3.3.3 中任一项。

5.3 确诊病例

符合 5.1 或 5.2，并同时符合 3.3.4、3.3.5、3.3.6 中任一项可诊断为确诊病例。

5.4 重症登革热

符合 5.2 或 5.3，并同时符合 3.2.4、3.2.5、3.2.6 中任一项可诊断重症登革热。

6 鉴别诊断

登革热应与麻疹、风疹、猩红热、流行性感、基孔肯雅热、寨卡病毒病相鉴别；重症登革热应与钩端螺旋体病、肾综合征出血热、恙虫病等相鉴别。参见附录 C 与附录 D。

附 录 A
(规范性附录)
登革热血清学检测方法

A.1 应用IgM捕捉酶联免疫吸附试验 (Mac-ELISA) 检测登革病毒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 链单克隆抗体捕获待检测血清中的IgM, 再加入特异性抗原和相应酶标单克隆抗体, 加底物显色。显色程度与特异性IgM抗体含量呈正相关。

A.1.2 材料和试剂

所需材料和试剂如下:

- a) 洗板机、酶标仪、恒温温箱或水浴箱 ($37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$);
- b) $10\ \mu\text{L} \sim 100\ \mu\text{L}$ 可调移液器、10mL 吸管;
- c) 稀释血清用的试管、吸水纸;
- d) 蒸馏水或去离子水;
- e) 登革病毒 IgM 抗体捕捉 ELISA 诊断试剂盒。

A.1.3 检测方法

具体步骤如下:

- a) 在一系列试管中, 将阴、阳性对照血清, 临界值较准血清和待检血清稀释成 1:100;
- b) 吸取所需量的纯化登革病毒抗原和等体积辣根过氧化物酶标记单克隆抗体至另一干净的玻璃瓶或试管中, 混匀后置室温作用 1h;
- c) 混合好标记单克隆抗体和抗原后, 在 10min 内各吸取 $100\ \mu\text{L}$ 稀释好的病人标本和对照血清至测试板上相应的微孔中, 37°C 作用 1h;
- d) 弃血清, 用洗涤液重复洗涤 6 次, 吸水纸上扣干, 分别加 $100\ \mu\text{L}$ 上述作用好的登革病毒抗原和酶标单克隆抗体复合物, 37°C 作用 1h;
- e) 弃登革病毒抗原和酶标单克隆抗体复合物, 用洗涤液重复洗涤 6 次, 吸水纸上扣干, 每孔加入 $100\ \mu\text{L}$ 的 TMB (四甲基联苯胺), 室温作用 10min 充分显现蓝色后, 每孔加入 $100\ \mu\text{L}$ 的终止液, 混匀;
- f) 在 30min 内于 450nm 波长处读取每孔的吸光度。

A.1.4 结果判断

A.1.4.1 酶标仪读数结果判断

判断标准为: 在 $\text{NC}/\text{CO} < 1$ 且 $\text{PC}/\text{CO} > 1$ 的情况下, 若 $\text{S}/\text{CO} < 0.9$, 则结果为阴性, 若 $\text{S}/\text{CO} > 1.1$, 则结果为阳性, 若 $\text{S}/\text{CO} = 0.9 \sim 1.1$, 则标本需重做。

注: S 为待检血清的吸光度; NC 为阴性对照血清的吸光度; PC 为阳性对照血清的吸光度; CO 为临界较准血清的吸光度平均值。

A.1.4.2 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，若样品孔的颜色比临界较准血清孔深者为阳性，样品孔的颜色比临界较准血清孔浅者为阴性。

A. 1.5 意义

IgM抗体阳性，表示患者新近感染登革病毒，适用于登革热早期诊断。

A. 2 应用间接酶联免疫吸附试验（ELISA）检测登革病毒IgM抗体

A. 2.1 原理

根据抗原抗体特异性结合的原理，用纯化的登革病毒基因工程表达抗原包被塑料板，与稀释的待检血清中的特异性抗体结合，其中血清IgM部分又与后加入的酶标记的抗人IgM结合，通过酶与底物的作用产生可见的颜色反应，显色程度与特异性IgM抗体含量呈正相关。

A. 2.2 材料和试剂

所需材料和试剂如下：

- a) 洗板机、酶标仪、恒温温箱或水浴箱（ $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ）；
- b) $10\ \mu\text{L} \sim 100\ \mu\text{L}$ 可调移液器、10mL 吸管；
- c) 稀释血清用的试管、吸水纸；
- d) 蒸馏水或去离子水；
- e) 登革病毒 IgM 抗体酶联免疫诊断试剂盒。

A. 2.3 检测步骤

具体步骤如下：

- a) 将检测血清用样品稀释液做 1:50 稀释。（先将 $10\ \mu\text{L}$ 血清加入到 $90\ \mu\text{L}$ 的样品稀释液中混匀，再将 1:10 的稀释血清用样品稀释液做 1:5 稀释充分混匀。标本稀释后应在 2h 内使用。）
- b) 将浓缩洗涤液加入 720mL（96T）蒸馏水中混匀备用。
- c) 取出已包被板，加入已稀释血清 $100\ \mu\text{L}/\text{孔}$ ，同时设阴、阳性对照及空白对照各 2 孔（阴、阳性对照孔分别直接加入相应对照血清 $100\ \mu\text{L}/\text{孔}$ ，空白对照加入洗涤液 $100\ \mu\text{L}/\text{孔}$ ），振荡均匀后，于 37°C 水浴箱温育 40min。
- d) 温育后，甩去板内液体，用洗涤液注满各孔，静置 1min 后甩干，重复洗涤 5 次，扣干。
- e) 加入酶标记物 $50\ \mu\text{L}/\text{孔}$ （空白孔不加），振荡均匀后，于 37°C 水浴箱温育 30min。
- f) 温育后，甩去板内液体，用洗涤液注满各孔，静置 1min 后甩干，重复洗涤 5 次，扣干。
- g) 每孔加入底物 A、B 液各 $50\ \mu\text{L}$ ， 37°C 避光显色 10min，再加入终止液 $50\ \mu\text{L}/\text{孔}$ ，于 450nm 测 OD 值。

A. 2.4 结果判断

临界值（cut-off）= $0.2 + \text{阴性对照均值}$ （ $N < 0.05$ 时，按 0.05 计算）。

样品 OD 值大于临界值为阳性，样品 OD 值小于临界值为阴性。样品 OD 值在临界值正负 10% 范围内为可疑，建议用其他方法复试。

A. 2.5 意义

IgM抗体阳性，表示患者新近感染登革病毒，适用于登革热早期诊断。

A.3 酶联免疫法检测登革病毒NS1 抗原方法

A.3.1 原理

在微孔条上预包被登革病毒的单克隆抗体，该抗体可与登革热病例血清中的登革病毒中的NS1抗原特异性结合，再与辣根过氧化物酶标记抗NS1抗体试剂进行第二次温育，当样品中存在登革病毒NS1抗原时将形成“包被抗体-NS1-酶标抗体”复合物。加入显色剂，复合物上连接的辣根过氧化物酶催化显示剂反应，生成蓝色产物，终止反应后，变为黄色，若样品中无登革病毒NS1抗原则不显示。

A.3.2 材料

10 μL, 100 μL, 200 μL, 1mL移液器各一把；温箱一台，洗板机一台，酶标仪一台。稀释血清用的试管、吸水纸；蒸馏水或去离子水；登革病毒NS1抗原酶联免疫诊断试剂盒。

A.3.3 检测步骤

具体步骤如下：

- a) 将试剂盒在冰箱中取出，放置室温平衡 30min，使用前将试剂轻轻振荡混匀；
- b) 配液：将试剂盒中浓缩洗涤液用蒸馏水 20 倍稀释；
- c) 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；
- d) 加稀释液：每孔加稀释液 50 μL，空白孔除外；
- e) 加样：分别在相应孔加入待测样品或阴阳性对照各 50 μL，空白孔除外；
- f) 温育：用封板膜封板后，置 37℃温育 60min；
- g) 每孔加酶标试剂 50 μL，空白孔除外，轻轻振荡混匀；
- h) 温育：用封板膜封板后，置 37℃温育 30min；
- i) 洗板：小心揭掉封板膜，用洗板机洗涤 5 遍，最后 1 次尽量扣干；
- j) 显色：每孔加入显色剂 A、B 液各 50 μL，轻轻振荡混匀，37℃避光显色 15min；
- k) 测定：每孔加终止液 50 μL，10min 内测定结果。设定酶标仪波长于 450nm 处 [建议使用双波长 450nm/（600~650）nm 检测]，用空白孔调零后测定各孔 A 值。

A.3.4 结果判定

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）。

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

阳性对照正常值范围： $A \geq 0.8$ 。

阳性判定：样品A值 \geq 临界值者为登革病毒抗原阳性。

阴性判定：样品A值 $<$ 临界值者为登革病毒抗原阴性。

A.3.5 意义

阳性结果表示患者新近存在登革病毒感染，适用于登革热早期诊断。

A.4 用免疫荧光法（FA/IFA）检测登革病毒IgG抗体

A.4.1 原理

某些荧光素（常用异硫氰酸荧光素）能与抗体蛋白分子结合，而不丧失抗体活力，仍能和相应的抗原发生特异免疫反应，产生免疫复合物，这种复合物由于有荧光色素的参与，在荧光显微镜下显示荧光，表明有特异性抗原存在。直接免疫荧光法可用于检测感染细胞内的特异性抗原，间接免疫荧光法可查待检血清中的特异性抗体。

A. 4.2 仪器与试剂

所需仪器与试剂如下：

- a) 10 μ L~100 μ L, 100 μ L~1000 μ L 可调移液器各 1 支；
- b) 登革病毒 1~4 型抗原片（登革标准毒株感染 BHK、Vero 或 C6/36 细胞制备，低温干燥保存）及相应单克隆抗体（阳性对照）、阴性血清；
- c) 羊抗人（兔抗人）IgG 荧光抗体；
- d) 待检患者血清（急性期和恢复期）；
- e) 常用稀释液：pH7.2~7.4PBS、伊文斯兰、封片胶等；
- f) 荧光显微镜。

A. 4.3 检测步骤

具体步骤如下：

- a) 取出抗原片，冷风吹干；
- b) 用 pH7.2~7.4PBS 稀释待检血清，从 1:20 开始，对倍稀释至所需稀释度；
- c) 用移液器依次从高稀释度向低稀释度逐个加入稀释的待检血清于四个型的登革病毒抗原片孔中，每型各加 2 孔待检系列稀释血清，血清量以完全覆盖抗原面而不溢出孔外为准，置湿盒内，在 37℃ 水浴孵育 30min（每次试验同时作阴、阳性对照）；
- d) 用 pH7.2~7.4PBS 漂洗 3 次，每次约 30s~1min，再用蒸馏水洗 1 次，冷风吹干；
- e) 用 pH7.2~7.4PBS 稀释荧光抗体，使其内含 2 个工作单位和 1:8000 伊文斯兰的荧光抗体，加入各孔中，使完全覆盖抗原面，置湿盒中，37℃ 水浴作用 30min，取出，同上漂洗及吹干；
- f) 用封片胶（或甘油缓冲液）封片，荧光显微镜观察结果。

A. 4.4 结果判断

特异性荧光呈黄绿色颗粒，分布在感染细胞浆中。根据荧光亮度和阳性细胞在细胞总数中所占的比例可将荧光反应大致区分为“+~++++”，无荧光者为“-”。检测抗体滴度时，以特异荧光达“++”最高血清稀释度的倒数表示。

A. 4.5 意义

阳性结果只能说明受检者可能曾存在登革病毒感染，但血清抗体效价达 1:80 或以上者有诊断参考意义，若恢复期血清抗体效价比急性期血清抗体效价有 4 倍或以上增长可确诊最近存在登革病毒感染。

A. 5 中和试验（NT）

A. 5.1 原理

当人体感染登革病毒后，血清中可产生保护性的中和抗体，登革病毒与这种特异性抗体作用后，能被特异性地“中和”，抑制登革病毒的复制与繁殖，使其失去感染能力。中和试验包括动物中和试验、

组织培养中和试验和空斑减少中和试验三种,每种中和试验又分为固定病毒稀释血清法和固定血清稀释病毒法两种。

动物中和试验由于需要特殊的感染动物房,一般的实验室很难做到,所以更多的实验室采用的是组织培养中和试验和空斑减少中和试验,其中空斑减少中和试验比组织培养中和试验更敏感、特异,但由于前者对操作技术的要求更高,而且病毒噬斑小,出斑时间长,对细胞覆盖培养基的要求也高,故一般实验室多用的是组织培养中和试验。

A.5.2 仪器与试剂

所需仪器与试剂如下:

- a) 50 μ L~200 μ L、1mL 可调移液器, 200 μ L、1mL 无菌吸头;
- b) 无菌细胞吹打管、吸管;
- c) 无菌平底微量 96 孔组织培养板;
- d) 无菌 1.5mL 塑料离心管、冰盒;
- e) 登革病毒 1~4 型标准毒株、C6/36 细胞、阳性和阴性对照血清;
- f) CO₂ 培养箱、生物安全柜、倒置显微镜;
- g) 生长液 (200mL): Eagle's MEM 溶液 174mL, 3% 谷氨酰胺 2mL, 1 万单位青链霉素 2mL, 7.5% 碳酸氢钠 2mL, 新生小牛血清 20mL, 临用前配制混匀;
- h) 维持液的配制 (200mL): Eagle's MEM 溶液 190mL, 3% 谷氨酰胺 2mL, 1 万单位青链霉素 2mL, 7.5% 碳酸氢钠 2mL, 新生小牛血清 4mL, 临用前配制混匀。

A.5.3 检测步骤

A.5.3.1 病毒滴度测定

具体步骤如下:

- a) 病毒悬液制备与保存: 将新鲜传代收获的登革病毒 1~4 型标准毒株的组织培养病毒悬液或乳小白鼠脑组织制备的病毒悬液, 经离心沉淀后吸出上清液, 加入 20% 无抗体小牛血清后分装于细胞冻存管, 迅速放入 -70℃ 以下冰箱保存。
- b) 病毒接种: 每型登革病毒各取出 1 小管冰冻的病毒, 在冷水中迅速溶化, 用维持液将各型病毒分别做 10 倍稀释, 从 10⁻² 到 10⁻⁷, 用无菌 1.5mL 塑料离心管在冰盒上进行。每个稀释度病毒加 4 孔, 每孔加 50 μ L, 然后每孔加入 C6/36 细胞 (浓度为 1×10⁶/mL) 50 μ L, 置 CO₂ 培养箱内培养, 温度 33℃, 湿度 80%。每天观察细胞病变, 共观察 7d, 记录观察结果。
- c) TCID₅₀ 的计算: 根据细胞病变计算 TCID₅₀, 见表 A.1。

表A.1 TCID₅₀ 的计算

病毒稀释度	细胞病变孔数/ 接种数	细胞病变分布		累计		比数	细胞病变百分比 %
		(+) 孔	(-) 孔	(+) 孔	(-) 孔		
10 ⁻³	4/4	4	0	9	0	9/9	100
10 ⁻⁴	3/4	3	1	5	1	5/6	83
10 ⁻⁵	2/4	2	2	2	3	2/5	40
10 ⁻⁶	0/4	0	4	0	7	0/7	0

在这个例子中，能引起50%的组织培养板出现细胞病变的病毒稀释度在 10^{-5} 和 10^{-6} 之间，计算如下：
 距离比例=（高于50%的细胞病变百分数-50）÷（高于50%的细胞病变百分数-低于50%的细胞病变百分数）=（83-50）÷（83-40）=0.7

距离比例与高于50%细胞病变稀释度的对数相加即为TCID₅₀（ $10^{-4.7}$ ）。由此得出100TCID₅₀为 $10^{-2.7}$ 。

A. 5. 3. 2 组织培养中和试验（固定病毒稀释血清法）

具体步骤如下：

- 将待测血清做系列倍比稀释，1：2，1：4，1：8，1：16，1：32……根据估计的血清效价决定稀释倍数，用无菌 1.5mL 塑料离心管在冰盒上进行。
- 将上述测定好的病毒稀释成 100TCID₅₀/0.2mL，用无菌 1.5mL 塑料离心管在冰盒上进行。
- 将稀释好的血清与稀释好的病毒悬液各取等量混匀，用无菌 1.5mL 塑料离心管在冰盒上进行，置 37℃水浴中作用 1h。
- 在平底微量 96 孔组织培养板上，每个稀释度病毒加 4 孔，每孔加 50 μL，然后每孔加入 C6/36 细胞（浓度为 1×10^6 /mL）50 μL，置 CO₂ 培养箱内培养，温度 33℃，湿度 80%。每天观察细胞病变，共观察 7d，记录观察结果。
- 50%血清中和终点的计算。根据细胞病变计算 50%血清中和终点，即能保护 50%组织培养管不产生病变的血清稀释度，计算方法见表 A. 2。

表A. 2 50%血清中和终点的计算

血清稀释度	细胞病变 孔数/接 种数	细胞病变分布		累计		比数	百分 比%
		(+) 孔	(-) 孔	(+) 孔	(-) 孔		
1 : 4 ($10^{-0.6}$)	0/4	0	4	0	16	0/16	0
1 : 8 ($10^{-0.9}$)	0/4	0	4	0	12	0/12	0
1 : 16 ($10^{-1.2}$)	0/4	0	4	0	8	0/8	0
1 : 32 ($10^{-1.5}$)	1/4	1	3	1	4	1/5	20
1 : 64 ($10^{-1.8}$)	3/4	3	1	4	1	4/5	80
1 : 128 ($10^{-2.1}$)	4/4	4	0	8	0	8/8	100

上述例子能保护50%的组织培养细胞孔不致细胞病变的血清稀释度在1：32~1：64之间，具体计算如下：

距离比例=（50%—低于50%的病变率）÷（高于50%的病变率—低于50%的病变率）=（50-20）÷（80-20）=30÷60=0.5

低于50%病变率血清稀释度的对数+距离比例乘稀释系数的对数= $-1.5+0.5 \times (-0.3) = -1.5 + (-0.15) = -1.65$ ，-1.65的反对数=1/45

即1：45的血清可保护50%细胞不产生病变。

A. 5. 4 意义

中和试验是登革病毒血清学诊断上最特异、最敏感的方法。既往感染过登革病毒的人在检测不到HI抗体时也可检出中和抗体。初次感染登革病毒可用中和试验进行登革病毒四种血清型别区分鉴定。恢复期血清中可见到相应的单一型别反应。第二或第三次感染，不能用中和试验进行血清型别鉴定。

A.6 应用间接酶联免疫吸附试验（ELISA）检测登革病毒IgG抗体

A.6.1 原理

根据抗原抗体特异性结合的原理，用纯化的登革病毒基因工程表达抗原包被塑料板，与稀释的待检血清中的特异性抗体结合，其中血清IgG部分又与后加入的酶标记的抗人IgG结合，通过酶与底物的作用产生可见的颜色反应，显色程度与特异性IgG抗体含量呈正相关。

A.6.2 材料与试剂

所需材料与试剂如下：

- a) 洗板机、酶标仪、恒温温箱或水浴箱（ $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ）；
- b) $10\ \mu\text{L} \sim 100\ \mu\text{L}$ 可调移液器、10mL吸管；
- c) 稀释血清用的试管、吸水纸；
- d) 蒸馏水或去离子水；
- e) 登革病毒 IgG 抗体酶联免疫诊断试剂盒。

A.6.3 检测步骤

具体步骤如下：

- a) 将检测血清用样品稀释液做1：50稀释。（先将 $10\ \mu\text{L}$ 血清加入到 $90\ \mu\text{L}$ 的样品稀释液中混匀，再将1：10的稀释血清用样品稀释液做1：5稀释充分混匀，标本稀释后应在2h内使用）。
- b) 将浓缩洗涤液加入720mL（96T）蒸馏水中混匀备用。
- c) 取出已包被板，加入已稀释血清 $100\ \mu\text{L}$ /孔，同时设阴、阳性对照及空白对照各2孔（阴、阳性对照孔分别直接加入相应对照血清 $100\ \mu\text{L}$ /孔，空白对照加入洗涤液 $100\ \mu\text{L}$ /孔），振荡均匀后，于 37°C 水浴箱温育40min。
- d) 温育后，甩去板内液体，用洗涤液注满各孔，静置1min后甩干，重复洗涤5次，扣干。
- e) 加入酶标记物 $50\ \mu\text{L}$ /孔（空白孔不加），振荡均匀后，于 37°C 水浴箱温育30min。
- f) 温育后，甩去板内液体，用洗涤液注满各孔，静置1min后甩干，重复洗涤5次，扣干。
- g) 每孔加入底物A、B液各 $50\ \mu\text{L}$ ， 37°C 避光显色10min，再加入终止液 $50\ \mu\text{L}$ /孔，于450nm测OD值。

A.6.4 结果判断

临界值（cut-off）= $0.150 + \text{阴性对照均值}$ （ $N < 0.05$ 时，按0.05计算）。

样品OD值大于临界值为阳性，样品OD值小于临界值为阴性。样品OD值在临界值正负10%范围内为可疑，建议用其他方法复试。

A.6.5 意义

病人恢复期血清比急性期血清IgG抗体滴度有4倍及以上升高，可确诊感染，单份血清检测一般表明其曾存在登革病毒感染，但抗体滴度大于等于1：320时，结合临床表现及流行病学史，亦可确定为新近存在病毒感染。

附 录 B
(规范性附录)
登革热病原学检测方法

B.1 C6/36 白纹伊蚊细胞分离登革病毒

B.1.1 原理

登革病毒是一种具有严格的细胞内存活的生物，必须生活在活的细胞组织内，C6/36白纹伊蚊细胞对登革病毒十分敏感，根据观察病毒对其产生的变化（病变等现象）和应用特异、敏感的检测技术，检出病毒的存在和型别。

B.1.2 仪器与试剂

所需仪器与试剂如下：

- a) 50 μL ~200 μL 、1mL 可调移液器，200 μL 、1mL 无菌吸头；
- b) 无菌细胞吹打管、吸管；
- c) 无菌平底微量 96 孔/24 孔组织培养板或细胞管；
- d) C6/36 细胞；
- e) CO₂培养箱、生物安全柜、倒置显微镜；
- f) 生长液（200mL）：Eagle's MEM 溶液 174mL，3%谷氨酰胺 2mL，1 万单位青链霉素 2mL，7.5%碳酸氢钠 2mL，新生小牛血清 20mL，用前混匀；
- g) 维持液的配制（200mL）：Eagle's MEM 溶液 190mL，3%谷氨酰胺 2mL，1 万单位青链霉素 2mL，7.5%碳酸氢钠 2mL，新生小牛血清 4mL，用前混匀；
- h) 标本处理液（100mL）：Eagle's MEM 溶液 90mL，50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 庆大霉素 100 μL ，1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 两性霉素 B 1mL 和 1000U/mL 青链霉素 1mL，小牛血清 2mL，用 7.5%碳酸氢钠溶液调至 pH7.2，用前混匀。

B.1.3 标本的采集及处理

具体步骤如下：

- a) 患者：无菌采集发病后 5d 内静脉血 3mL，放冰壶送实验室分离血清，接种组织细胞培养，不能及时接种的，将血清置-20℃保存；
- b) 尸体标本：可取血、脑脊液、脑组织、肝等；
- c) 蚊：采集吸过血的埃及伊蚊，白纹伊蚊或其他可疑蚊种，用 0.50mol/L（10%）葡萄糖液喂养，至胃血完全消化后置-20℃，待死后按蚊种及捕获地点分组，以 10 只~20 只一组为宜，经生理盐水冲洗数次后，转入研磨器，加 1mL 标本处理液，研碎均匀，置预冷 4℃的离心机上，10000r/min 离心 10min，取上清液于 4℃作用 2h 处理后接种 C6/36 细胞。

B.1.4 病毒分离

C6/36（白纹伊蚊纯系细胞株）传代细胞长成单层后（在25cm²细胞瓶、细胞管、24孔细胞培养板等），倒去细胞生长液换成细胞维持液，如果传代后立即接种，可用细胞生长液，在25cm²细胞瓶接种患者血清20 μL ，细胞管和24孔细胞培养板各接种3 μL ，蚊悬液或组织悬液根据浓度取接种量，加样后适度混

匀，置35℃、CO₂培养箱静止培养，观察7d，若细胞出现膨大至融合，折光度增强、颗粒增多等现象，取细胞悬液用荧光PCR检测登革病毒核酸（不需提取病毒RNA），若7d后细胞不出现病变，需盲传1代~2代，仍不出现病变者经核酸检测，阴性者作阴性报告。

B. 1.5 间接免疫荧光试验（FA/IFA）鉴定登革病毒

B. 1.5.1 试验方法

具体步骤如下：

- a) 细胞片的制备：把出现“++”病变的C6/36细胞管倒去维持液（若不出现病变，则需培养7d再制片），用pH7.2PBS洗2次后加PBS3mL，用滴管把细胞从管壁上吹下，吹散，2000r/min离心5min，弃去PBS，加0.2mL PBS把沉渣吹散，滴加在10孔的载玻片各孔中，冷风吹干，加冷丙酮固定10min，用PBS冲洗2次，蒸馏水漂洗1次，冷风吹干，-20℃保存。正常C6/36细胞对照按同法制片；
- b) 试验方法：取出保存的待鉴定细胞片或脑组织片，冷风吹干，于各孔中按顺序滴加4个型登革病毒使用单位的单克隆抗体，各型2孔，对照2孔滴加PBS，置湿盒内37℃水浴30min，取出用PBS冲洗3次，蒸馏水漂洗1次，冷风吹干，滴加含130 μmol/L（1：8000）伊文思蓝的2单位抗鼠IgG荧光抗体，置湿盒内37℃水浴30min，用PBS冲洗3次，蒸馏水漂洗1次，冷风吹干，用甘油缓冲液封片，镜检，记录结果。

B. 1.5.2 结果判断

特异性免疫荧光呈黄绿色颗粒，分布在感染细胞的胞浆内，正常组织细胞被染成橙红色或暗红。

B. 1.5.3 意义

从病人血液、组织或蚊媒中分离出登革病毒，可确诊存在登革病毒感染，经鉴定，可确定病毒型别。

B. 2 应用乳小白鼠分离登革病毒

B. 2.1 原理

新生小白鼠对登革病毒十分敏感，根据观察病毒对其产生的致病等现象和应用特异、敏感的检测技术，检出病毒的存在和型别。

B. 2.2 仪器和试剂

参考B. 1.2。C6/36白纹伊蚊细胞改用1日龄~3日龄乳小白鼠。

B. 2.3 标本采集及处理

见B. 1.3。

B. 2.4 病毒分离

每一标本接种一窝1日龄~3日龄小白鼠，每只脑内接种全血或1：10血清或蚊悬液、组织悬液10 μL~20 μL，接种后48h内死亡者作非特异性死亡，弃去。存活者观察至10d左右仍未发病时，剖取其中2只，取脑，用pH8.0肉汤制成10%悬液，盲传1日龄~3日龄小白鼠一窝，其余的及盲传的均观察至第四周，未发病作阴性结果。在观察期内若发病（松毛、蜷缩、活动力降低、站立不稳、抽搐、离群、不进食、瘫痪等症状）则剖取半边脑，按盲传法制成10%鼠脑悬液，转种1日龄~3日龄小白鼠，并作无菌试

验, 另一半脑置5.43mol/L (50%) 甘油缓冲液中低温保存。无菌试验阴性而仍出现以上症状的乳鼠作为可疑毒株传代、保种, 并进行鉴定。

B.2.5 病毒鉴定

具体步骤和方法如下:

- a) 脑组织片的制备: 取发病濒死的小鼠脑组织以冰冻切片制成10孔组织片, 经冷风吹干, 冷丙酮固定10min, 冲洗、吹干后放-20℃保存。正常脑组织同法制作。
- b) 试验方法、结果和意义: 参考B.1.5。

B.3 RT-PCR技术检测登革病毒RNA及型别鉴定

B.3.1 原理

PCR技术(聚合酶链反应)是利用双链DNA分子碱基配对原则, 在一定条件下扩增DNA片段的体外扩增方法。它的特异性取决于两个人工合成的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, 待扩增DNA在变性温度下分解为二条单链模板, 在复性温度引物与模板两端的DNA序列分别复性(杂交-碱基配对), 在延伸温度和单核苷酸存在的条件下, 由TaqDNA聚合酶催化, 引导引物的5'端向3'端方向延伸合成新链, 是一个重复进行的热变性复性延伸的温控循环过程, 随着循环次数的增加, DNA产量呈指数上升, 经过20个循环以后, 从微量基因材料, 特异性地扩增可达数百万倍。登革病毒含RNA基因组, 因此PCR前需经过逆转录酶作用, 合成第一条cDNA链(RT), 再进行扩增(PCR), 即RT-PCR。设计一对通用引物可扩增登革病毒组基因。设计不同型登革病毒的引物对, 可扩增出不同的血清型病毒的基因产物。根据基因扩增产物的片段大小可判断是否登革病毒或某一型登革病毒。

B.3.2 设备和试剂

B.3.2.1 设备

移液器(10 μL、20 μL、100 μL、200 μL、1000 μL)及配套吸头、离心管(1.5mL、0.2mL)及管架、台式高速离心机、普通冰箱、旋涡混合器、电泳仪及电泳槽、微波炉、PCR仪、紫外分析仪等。

B.3.2.2 试剂

随机引物、登革病毒特异性引物、RNA提取试剂、AMV逆转录试剂盒、PCR试剂盒、10×Tris-硼酸(TBE)缓冲液(108gTris粉, 9.3g依地酸二钠EDTA-Na₂, 55g硼酸, 完全溶解后用HCl调pH至8.0, 加水至1000mL, 用前稀释成0.5倍或1倍)、加样缓冲液(0.5%溴酚蓝和体积比为40%的蔗糖溶于水后, 分装于4℃保存)、溴化乙锭(10mg/mL, 使用浓度为0.5 μg/mL)、琼脂糖等。见表B.1。

表B.1 登革病毒通用和血清分型引物

引物	序列(5' → 3')	使用浓度	扩增片段大小bp	型特异性
D1	TCAATATGCTGAAACGCGCAGAAACCG	0.5 μmol/L		通用
D2	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC	0.5 μmol/L	511 (D1和D2)	通用
TS1	CGTCTCAGTGATCCGGGG	0.5 μmol/L	482 (D1和TS1)	I型
TS2	CGCCACAAGGGCCATGAACAG	0.5 μmol/L	119 (D1和TS2)	II型
TS3	TAACATCATCATGAGACAGAGC	0.5 μmol/L	290 (D1和TS3)	III型
TS4	CTCTGTGTCTTAAACAAGAGA	0.5 μmol/L	392 (D1和TS4)	IV型

B. 3.3 检测步骤

B. 3.3.1 病毒RNA的提取

待检标本用RNA提取试剂提取病毒RNA，按照试剂说明进行操作，制备模板RNA。

B. 3.3.2 逆转录合成cDNA

以随机引物作为逆转录引物，根据AMV逆转录酶反应要求，按试剂说明书操作，以病毒RNA为模板合成cDNA。

B. 3.3.3 登革病毒4种血清型通用引物的PCR扩增

以D1和D2为引物，以随机引物合成的cDNA为模板，PCR扩增目的基因，反应条件为94℃预变性2min，94℃30s、55℃30s、68℃30s，扩增9个循环后，94℃30s、55℃30s、68℃30s（每个循环增加10s），扩增25个循环，68℃延伸10min。

B. 3.3.4 登革病毒型特异性引物的多重PCR扩增

以TS1、TS2、TS3、TS4和D1为引物，以通用引物PCR扩增产物为模板，多重PCR扩增目的基因，反应条件为94℃预变性2min，94℃15s、55℃15s、68℃30s，扩增10个循环后，94℃15s、55℃15s、68℃30s（每个循环增加5s），扩增10个循环，68℃延伸10min。

B. 3.4 结果判断

扩增产物用1%~2%琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物，如果条带的分子量与预期片段大小相同，表明为相应的登革病毒核酸扩增阳性。

B. 3.5 意义

此法可对早期病例登革病毒的检测及分型鉴定，基因扩增产物可进一步进行序列测定和分析。

B. 4 TaqMan探针实时荧光PCR检测登革病毒RNA

B. 4.1 原理

登革病毒有四个血清型，根据四型登革病毒共有基因特定的序列，合成一对特异性引物和一条特异性的荧光双标记探针。该探针与登革病毒特有的共同基因特异性结合，结合部位位于引物结合区域内。探针的5'端和3'端分别标记不同的荧光素，如5'端标记FAM荧光素，它发出的荧光能够被检测仪器接收，称为报告荧光基团（用R表示），3'端一般标记TAMRA荧光素，它在近距离内能吸收5'端报告荧光基团发出的荧光信号，称为淬灭荧光基团（用Q表示，淬灭荧光基团也可用一种基本无荧光本底的小沟结合物——MGB，取代了常规可发光的TAMRA荧光标记，使得新探针技术的荧光本底大大降低，从而提高分辨率）。当PCR反应在退火阶段时，一对引物和一条探针同时与目的基因片段结合，此时探针上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反应进行到延伸阶段时，Taq酶在引物的引导下，以四种核苷酸为底物，根据碱基配对的原则，沿着模板链合成新链；当链的延伸进行到探针结合部位时，受到探针的阻碍而无法继续，此时的Taq酶发挥它的5'→3'外切核酸酶的功能，将探针水解成单核苷酸，消除阻碍，与此同时标记在探针上的R基团游离出来，R所发出的荧光不再为Q所吸收而被检测仪所接收；在Taq酶的作用下继续延伸过程合成完整的新链，R和Q基团均游离于溶液中，仪器可继续检测到R所发出的荧光信号。

B. 4. 2 材料及方法

B. 4. 2. 1 设备

移液器（10 μL、20 μL、100 μL、200 μL、1000 μL）及配套吸头、离心管（1.5mL、0.2mL）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。

B. 4. 2. 2 试剂

引物及探针（见表B.2）、RNA提取试剂、荧光RT-PCR试剂盒等。

表B.2 引物及探针类型

引物	序列（5' →3'）	基因组位置	荧光标记	型特异性
Den-FP	GCATATTGACGCTGGGAGAGA	10611		通用
Den-RP	GGCGTTCTGTGCCTGGAAT	10683		
Den-PP	CAGAGATCCTGCTGTCTC	10642	FAM/MGB	
Den-1F	CAA AAG GAA GTC GTG CAA TA	8973		I 型
Den-1C	CTG AGT GAA TTC TCT CTA CTG AAC C	9084		
Den-1P	CAT GTG GTT GGG AGC ACG C	8998	FAM/BHQ-1	
Den-2F	CAG GTT ATG GCA CTG TCA CGA T	1443		II 型
Den-2C	CCA TCT GCA GCA ACA CCA TCT C	1518		
Den-2P	CTC TCC GAG AAC AGG CCT CGA CTT CAA	1469	HEX/BHQ-1	
Den-3F	GGA CTG GAC ACA CGC ACT CA	740		III型
Den-3C	CAT GTC TCT ACC TTC TCG ACT TGT CT	813		
Den-3P	ACC TGG ATG TCG GCT GAA GGA GCT TG	762	TexasRed/BHQ-2	
Den-4F	TTG TCC TAA TGA TGC TGG TCG	904		IV型
Den-4C	TCC ACC TGA GAC TCC TTC CA	992		
Den-4P	TTC CTA CTC CTA CGC ATC GCA TTC CG	960	Cy5/BHQ-3	

B. 4. 3 检测步骤

B. 4. 3. 1 病毒RNA的提取

待检标本用RNA提取试剂提取病毒RNA，按照试剂说明进行操作，制备模板RNA。

B. 4. 3. 2 登革病毒4种血清型通用荧光PCR扩增

用登革病毒通用引物和探针进行荧光PCR扩增。以ABI 7500荧光PCR仪为例，反应条件可根据使用的试剂说明进行调整，如：42℃ 30min，95℃ 10min后，进行45个循环的二步法PCR：95℃ 15s→62℃ 40s，荧光信号的收集设置在每次循环的退火延伸时进行。

B. 4. 3. 3 登革病毒4种血清型分型荧光PCR扩增

分别以登革病毒4种血清型特异的引物和探针进行荧光PCR扩增。以ABI 7500荧光PCR仪为例，反应条件可根据使用的试剂说明进行调整，如：42℃ 30min，95℃ 10min后，进行45个循环的二步法PCR：95℃ 15s→60℃ 60s，荧光信号的收集设置在每次循环的退火延伸时进行。

B. 4. 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荧光本底信号,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 $Ct < 40$ 、荧光信号数据线性化处理对应循环数生成的曲线图呈“S”形的标本可判断为相应的登革病毒核酸检测阳性。

B.4.5 意义

此法为一种灵敏、特异、快速、低污染的登革病毒RNA检测方法,可定性或定量检测登革热病人早期血清中的登革病毒。

附 录 C
(资料性附录)
登革热的鉴别诊断

C.1 麻疹

发热、咳嗽、流涕、结膜充血、畏光，口腔内有Koplik斑，发热第3天~第4天出现麻疹性皮疹。

C.2 风疹

低热、皮疹和耳后枕部淋巴结肿大，全身症状轻。

C.3 猩红热

发热、咽峡炎、全身弥漫性鲜红色皮疹和疹后脱屑，白细胞增多。

C.4 流行性感冒

发热、咳嗽，无皮疹，全身中毒症状较重，特别是短时间内出现数量较多的相似患者。

C.5 基孔肯雅热

发热、皮疹、关节痛、白细胞减少等表现，但病情一般较轻，常发生对称性小关节炎。鉴别主要有赖于核酸检测、病毒分离和血清学试验。

C.6 寨卡病毒病

发热、皮疹、结膜炎、神经系统损害等表现，可导致新生儿小头畸形。鉴别主要有赖于核酸检测、病毒分离和血清学试验。

C.7 钩端螺旋体病

有疫水接触史，发热、腓肠肌痛压痛，淋巴结肿大，肝肾损害明显，白细胞增多，钩体血清学反应阳性。

C.8 肾综合征出血热

有鼠类接触史，发热、充血出血、休克和急性肾功能损害等表现，白细胞增多，尿蛋白阳性，特异性IgM阳性。

C.9 恙虫病

有草地接触史，高热、典型焦痂或特异性溃疡，淋巴结肿大，抗生素治疗有特效。

附 录 D

(资料性附录)

登革热的病原学、流行病学及临床表现

D.1 病原学

登革病毒归属于黄病毒科黄病毒属。成熟病毒颗粒由核衣壳蛋白和脂质膜蛋白形成一个立体结构，直径约为50nm。登革病毒为RNA病毒，基因组由单股正链RNA组成，全长大约11000个核苷酸，包括编码3个结构蛋白和7个非结构蛋白的基因，3个结构蛋白为核衣壳蛋白C、膜相关蛋白M和包膜蛋白E，包膜蛋白E与病毒的血凝活性及中和活性有关。登革病毒可分为4种血清型：DEN-1，DEN-2，DEN-3和DEN-4，4种血清型登革病毒均可引起登革热的发生和流行。

登革病毒对热敏感。50℃30min或54℃ 10min、超声波、紫外线、0.05%甲醛溶液、乳酸、高锰酸钾、龙胆紫等均可灭活病毒。病毒在pH7~9环境中最为稳定，在-70℃或冷冻干燥状态下可长期存活。在4℃条件下，患者急性期血清的感染性可保持数周之久。

D.2 流行病学

D.2.1 传染源

登革热患者、隐性感染者、带病毒的非人灵长类动物是登革热的主要传染源。

D.2.2 传播途径

主要是经媒介伊蚊叮咬吸血传播。在我国传播媒介主要为白纹伊蚊和埃及伊蚊。

D.2.3 人群易感性

人群普遍易感，但感染后仅有部分人发病。感染登革病毒后，人体会对同型病毒产生持久的免疫，但对不同型病毒感染不能形成有效保护。再次感染不同型别登革病毒会引发非中和性交叉反应抗体增加，引起抗体依赖性增强感染(antibody-dependent enhancement, ADE)，这是引起重症登革热机制的一个重要假设。

D.2.4 流行特征

登革热流行于全球热带及亚热带地区，尤其是在东南亚、太平洋岛屿和加勒比海等100多个国家和地区。我国各省均有输入病例报告，广东、云南、海南、福建、广西、浙江等南方省份可发生本地登革热暴发或流行，登革热在热带、亚热带地域可常年发病，在我国输入病例常年存在，本地感染病例一般于夏秋季高发。

D.3 临床表现

D.3.1 临床分型

登革热是一种全身性疾病，临床表现复杂多样。根据病情严重程度，临床可分为普通登革热和重症登革热两种类型。

D.3.2 临床分期

D.3.2.1 急性发热期

登革热的临床表现复杂多样，潜伏期1 d~14 d，一般5 d~9 d。其特征为突起发病，发热是最常见的症状，24h体温可达39℃以上，一般持续3 d~7d。部分病例于发热3 d~5d后，体温降至正常1 d~3d后再次升高，表现为“双峰热”。发热时多伴头痛，全身肌肉、骨骼和关节痛，明显乏力，可出现恶心、呕吐、腹泻、食欲不振等消化道症状。病程第3天~第6天全身出现充血性皮疹或点状出血疹等，典型皮疹多见于四肢的针尖样出血点及“皮岛”样表现。部分病例皮疹伴有皮肤瘙痒。部分病人可出现不同程度的出血表现，如皮下出血、注射部位瘀点瘀斑、牙龈出血、鼻衄及束臂试验阳性等。

D.3.2.2 极期

部分患者高热持续不缓解，或退热后病情加重，可因毛细血管通透性增加导致明显的血浆渗漏。严重者可发生休克及其他重要脏器损伤等。

极期通常出现在病程的第3天~第8天。

部分患者持续高热，或热退后病情加重，出现腹部剧痛、持续呕吐等重症预警指征往往提示极期的开始。极期可因全身毛细血管通透性增加导致球结膜水肿，四肢非凹陷型水肿，胸水、腹水、心包积液、胆囊壁增厚、低蛋白血症等血浆渗漏表现，严重者可发生休克及重要脏器损伤等表现。

少数患者无明显的血浆渗漏表现，但仍可出现严重出血包括皮肤瘀斑、呕血、黑便、阴道流血、肉眼血尿、颅内出血等。

D.3.2.3 恢复期

极期后的2 d~3d，患者病情好转，胃肠道症状减轻，进入恢复期。部分患者可见针尖样出血点，下肢多见，可有皮肤瘙痒。白细胞计数开始上升，血小板计数逐渐恢复。

多数患者表现为普通登革热，可仅有发热期和恢复期。少数患者发展为重症登革热。

D.4 重症登革热

D.4.1 重症登革热的高危人群

具体人群如下：

- a) 老人、婴幼儿和孕妇；
- b) 伴有糖尿病、高血压、冠心病、消化性溃疡、哮喘、慢性肾病等基础疾病者；
- c) 伴有免疫缺陷病者。

D.4.2 早期识别重症登革热的预警指征

具体指征如下：

- a) 退热后病情恶化；
- b) 严重腹部疼痛；
- c) 持续呕吐；
- d) 昏睡或烦躁不安；
- e) 明显出血倾向（黏膜出血或皮肤瘀斑等）；
- f) 血小板计数 $<50 \times 10^9/L$ ；
- g) 白蛋白 $<35g/L$ 。

D.5 束臂试验

又称为毛细血管脆性试验。在前臂屈侧肘弯下4 cm处画一直径5 cm的圆圈，用血压计袖带束于该侧上臂，先测定血压，然后使血压保持在收缩压和舒张压之间，持续8 min后解除压力。待皮肤颜色恢复正常时，计数圆圈内皮肤新的出血点数目。出血点超过10个为束臂试验阳性。

参 考 文 献

- [1] Dengue Guidelines for Diagnosis, treatment, prevention and control. WHO, 2009, 1-160.
- [2] Handbook for clinical management of dengue. WHO, 2012, 1-20.
- [3] 登革热诊疗指南(2014年第2版). 国家卫生计生委, 2014.
- [4] WS 216—2008登革热诊断标准.
- [5] 罗会明. 登革热防治手册[M]. 北京:中国标准出版社, 2002.
- [6] Goldman, Bennett总主编, 王贤才总主译, 西氏内科学—传染病[M], 第21版, 世界图书出版公司, 2000, 9:543-550.
- [7] Simmons CP, Ffarrar JJ, Chan NV, et al. Dengue[J]. N Engl J Med, 2012, 366:1423-1432.
- [8] 张复春, 杨智聪. 登革热[M]. 北京:北京科技出版社, 2008.
- [9] 应若素等. 广东省2014年登革热暴发流行的临床和实验室特点[J]. 中华传染病杂志, 2014(第12期).
- [10] 广东省重症登革热诊疗指引(2014年第1版). 广东省卫生计生委, 2014.
- [11] 方美玉, 林立辉, 刘建伟. 虫媒传染病[M]. 北京:军事医学科学出版社, 2005.
- [12] Andrew Rhodes, Laura E. Evans, Waleed Alhazzani, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016[J]. Intensive Care Medicine, 2017, 43:304-377.
-