

ICS 11.020

C59

备案号:25518—2009

WS

中华人民共和国卫生行业标准

WS 295—2008

流行性脑脊髓膜炎诊断标准

Diagnostic criteria for epidemic cerebrospinal meningitis

16

2008-12-11 发布

2009-06-15 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),GB 16884—1997《流行性脑脊髓膜炎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 为规范性附录,附录 B 为资料性附录。

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:北京地坛医院、中国疾病预防控制中心传染病预防控制所。

本标准主要起草人:李兴旺、邵祝军、蒋荣猛、李群、李军宏。

流行性脑脊髓膜炎诊断标准

1 范围

本标准规定了流行性脑脊髓膜炎的诊断依据、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流行性脑脊髓膜炎的诊断、报告。

2 诊断依据

2.1 流行病学史

2.1.1 多在冬春季节发病,1周内流脑患者密切接触史。

2.1.2 当地有本病发生或流行。

2.2 临床表现

2.2.1 潜伏期

数小时至10日,一般为2d~3d。

2.2.2 主要临床症状和体征

2.2.2.1 发热、头痛、呕吐、脑膜刺激征。重症患者可有不同程度的意识障碍和(或)感染中毒性休克。

2.2.2.2 皮肤、黏膜出现瘀点或瘀斑。

2.2.3 临床分型

2.2.3.1 普通型

约占90%。按病情可分为上呼吸道感染期、败血症期和脑膜炎期,但不易严格区分。

a) 上呼吸道感染期:有发热、咽痛、鼻炎和咳嗽等上呼吸道感染症状。部分患者有此期表现。

b) 败血症期:恶寒,高热,头痛,呕吐,乏力,肌肉酸痛,神志淡漠等。约70%患者出现瘀点、瘀斑。

c) 脑膜炎期:多与败血症期症状同时出现。发病后24h,除高热及毒血症外,主要表现为剧烈头痛、呕吐,可呈喷射性,烦躁不安,脑膜刺激征阳性。颅压增高明显者有血压升高、脉搏减慢等。严重者可进入谵妄、昏迷。婴幼儿多不典型,高热、拒食、烦躁、啼哭不安外,惊厥、腹泻及咳嗽较成人多见。前囟未闭者可有隆起,而脑膜刺激征可能不明显。

2.2.3.2 暴发型

病情凶险,进展迅速,如不及时治疗,发病6h~24h内即可危及生命。

可分为休克型、脑膜脑炎型和混合型:

a) 休克型:又称“暴发型脑膜炎奈瑟菌败血症”。起病急骤,寒战、高热或体温不升,严重中毒症状,短时间内(12h内)出现遍及全身的瘀点、瘀斑,迅速扩大,或继以瘀斑中央坏死。休克为重要表现:面色灰白,唇及指(趾)端紫绀,四肢厥冷,皮肤花斑状,脉细速,血压下降;易并发弥散性血管内凝血(DIC)。多无脑膜刺激征,脑脊液检查多无异常。

b) 脑膜脑炎型:除有高热、头痛和呕吐外,可迅速陷入昏迷,频繁抽搐,锥体束征阳性;血压持续升高。球结膜水肿。部分患者出现脑疝(小脑幕切迹疝、枕骨大孔疝),表现为双侧瞳孔不等大,对光反应迟钝或消失,可出现呼吸不规则,快慢深浅不一或骤停,肢体肌张力增强等。

c) 混合型:同时具备休克型和脑膜脑炎型的临床表现,此型最为凶险,预后差,病死率高。

2.2.3.3 轻型

临床表现为低热、轻微头痛、咽痛等上呼吸道感染症状;皮肤黏膜可有少量细小出血点;亦可有脑膜刺激征。脑脊液可有轻度炎症改变。

2.3 实验室检查

2.3.1 末梢血象

白细胞总数、中性粒细胞计数明显升高。

2.3.2 脑脊液

外观呈浑浊米汤样或脓样,压力增高;白细胞数明显增高,并以多核细胞增高为主;糖及氯化物明显减少,蛋白含量升高。

2.3.3 病原学

2.3.3.1 瘀点(斑)组织液、脑脊液涂片检测,可在中性粒细胞内见到革兰阴性肾形双球菌。

2.3.3.2 脑脊液、血液培养脑膜炎奈瑟菌阳性。

2.3.3.3 脑脊液、血液脑膜炎奈瑟菌特异性核酸片段检测阳性。

2.3.4 血清学

2.3.4.1 急性期脑脊液、血液及尿液 Nip 群特异性多糖抗原检测阳性。

2.3.4.2 恢复期血清流脑特异性抗体检测,其效价较急性期呈 4 倍或 4 倍以上升高。

3 诊断原则

3.1 应根据流行病学资料和临床表现及实验室检验结果做出疑似及临床诊断。

3.2 确诊需要脑膜炎奈瑟菌病原学或血清学检测的阳性结果。

4 诊断

4.1 带菌者

无临床症状和体征,咽拭子培养脑膜炎奈瑟菌阳性或脑膜炎奈瑟菌特异性核酸片段检测阳性。

4.2 疑似病例

同时符合 2.1、2.2.2.1、2.3.1 和 2.3.2。

4.3 临床诊断病例

同时符合疑似病例及 2.2.2.2。

4.4 确诊病例

符合下列任何一项可诊断:

4.4.1 疑似病例并同时符合 2.3.3、2.3.4 中任何一项者。

4.4.2 临床诊断病例并同时符合 2.3.3、2.3.4 中任何一项者。

在确定诊断基础上,依据血清群检测的结果做出病原学分群诊断。

4.5 在临床诊断或确定诊断基础上,依据 2.2.3 进行临床分型诊断。

5 鉴别诊断

主要和其他细菌所致的脑膜炎、其他原因所致的败血症、各种原因的紫癜等疾病鉴别。婴幼儿还需要与高热惊厥等疾病鉴别。

附录 A

(规范性附录)

脑膜炎奈瑟菌实验室检测方法

A.1 脑膜炎奈瑟菌分离培养

A.1.1 标本

所采取的标本为脑脊液(CSF)和血液。

标本的采集应在病后就诊最短时间内且在抗生素治疗前,在采集血液标本过程中不应使用抗凝剂。

A.1.2 CSF 标本接种

脑脊液采集应无菌操作,脑脊液至少采集 2mL,CSF 采集后应立即送往微生物学实验室并在采集后 1h 内进行检测。不要把标本暴露于阳光或高温及寒冷的环境下。CSF 送到实验室后,立即放到无菌试管内离心,2 000r/min~3 000r/min,20min,吸出上清液,沉淀必须进行剧烈振荡或充分混合,用灭菌的毛细管吸取沉淀物直接接种到 5% 羊血巧克力色琼脂上,划线接种。5% 二氧化碳环境 37℃ 培养,24h~72h,每日检查细菌生长的情况,及时分离纯培养物供鉴定。CSF 上清液部分供检测 Nm 特异抗原,亦可将其置于-20℃ 待测。如果获得的脑脊液不足 1mL 则不进行离心,直接用它进行革兰染色和涂板培养。

A.1.3 血液标本接种

采取患者急性期静脉血液 3mL,采集后应立即注入 30mL 增菌用的葡萄糖肉汤三角瓶内,并同时取血液 0.1mL~0.3mL 直接涂板培养,5% 二氧化碳环境 37℃ 培养,24h~72h,增菌用的葡萄糖肉汤每日进行观察,如出现菌落再分离培养。

A.1.4 脑膜炎奈瑟菌菌落

本菌在血琼脂、巧克力及卵黄琼脂平板上经 37℃ 24h 培养后可见圆形,隆起,光滑、湿润、微带灰兰色似露珠状半透明菌落,直径 0.5 μ m~2 μ m,不溶血,无色素,菌体含有自溶酶,培养时间过长由于自溶而死亡,此酶在 65℃ 30min 即被破坏。陈旧菌落在边缘易生长出 L 型小菌落,形态如露珠或成丝状,无荚膜及细胞膜,此型亦可在患者标本中遇到,再经培养可恢复其原形。培养基中加入多粘菌素 B 或 E、万古霉素、制霉菌素等加以抑制而有利于脑膜炎菌的生长,提高检出率。

A.1.5 脑脊液的革兰染色

2 000r/min 离心 CSF,20min。洁净干燥的玻璃片上滴加 1~2 滴沉淀物,在可能的情况下,在生物安全柜中风干玻片。将玻片三次快速通过火焰以固定涂片,不应该灼干。结晶紫冲洗玻片 1min,用流水冲洗玻片 1min,并去除多余的水分。用革兰碘液洗玻片 1min,用流动水冲洗玻片并干燥,95% 的乙醇脱色(5s~10s 足够),用番红染液复染 20s~30s 或用酚红复染 10s~15s,用流动水冲洗玻片并抹干。显微镜观察染色的涂片,用亮视野的透镜和油镜。脑膜炎球菌是在多形核白细胞内外出现的、革兰阴性、咖啡豆形双球菌。

A.1.6 脑膜炎奈瑟菌生化特征

绝大多数 Nm 菌株分解葡萄糖和麦芽糖,产酸不产气。不分解蔗糖、果糖和乳糖。过氧化酶和氧化酶阳性。

A.2 脑膜炎奈瑟菌血清学分群

A.2.1 试验方法

采用玻片凝集试验方法。Nm 诊断血清包括多价 I (包含 A、B、C、D 群)、多价 II (包含 Y、H、29E)、多价 III (包含 W135、X、I、K 群)及各群单价血清,共计 13 种。但世界卫生组织(WHO)已不推荐 D

群作为常规检测的血清群。

A. 2. 2 实验操作

用乙醇擦净一块载玻片,用蜡笔或其他记号笔将载玻片分为三个部分,每个部分 10mm×4mm。在每个部分的近底部处加 10 μ L 0.5%的生理盐水,用无菌接种环、针、无菌涂棒或牙签从 BAP 上采取细菌培养物,在生理盐水中,将培养物制成用于测试的略呈乳液状的悬液。在每个部分的上部加上所选的血清各 10 μ L 以及 10 μ L 生理盐水或 PBS(二者都可以)。在亮光下或黑色背景下,将抗血清或生理盐水与各自的培养菌悬液混合,摇动玻片 1min~2min(时间可能会因为血清的制造者不同而有所差异)。

A. 2. 3 实验结果的读取

培养菌应该只与一种抗血清凝集,而与生理盐水或 PBS 不会发生凝集反应。如果在生理盐水中凝集说明培养菌有自凝性;和几种抗血清凝集而无自凝现象,说明培养菌是粗糙的;和任何一种抗血清或生理盐水都不能发生凝集,说明菌株为不能分群菌株。这样的结果在新鲜分离株中很少发生,但确实会偶尔发生。血清和生理盐水/PBS 应在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中储存备用。

A. 3 标本及疑似菌株采用聚合酶链式反应(PCR)辅助鉴定

对于不能用血清学分群的脑膜炎奈瑟菌疑似菌株或无法进行脑膜炎奈瑟菌分离培养的脑脊液、血液、血清标本可采用 PCR 方法进行 DNA 扩增辅助检测鉴定。

A. 3. 1 目的基因

唾液酸转移酶基因(*siaD* 基因):可以作为 PCR 扩增的目的片段来区分 A、B、C、W135、Y 等五个常见流脑血清群。

CrgA 及 *orf-2* 基因 可作为流脑奈瑟菌属的特异性基因。

A. 3. 2 寡聚核苷酸引物序列

- 1) *crgA* F:5'-gctggcgccgctggcaacaaaattc-3', R:5'-cttctgcagattgcgcgctgccgt-3'
- 2) *Orf-2*(A)F:5'-cgcaataggtgtatatattcttcc-3, R:5'-cgtaatagtttcgtatgccttctt-3'
- 3) *SiaD*(B)F:5-ggatcatttcagtgtttccacca-3', R:5'-gcatgctggaggaataagcattaa-3'
- 4) *SiaD*(C)F:5-tcaaatgagtttgcgaatagaaggt-3', R:5'-caatcacgatttgcccaattgac-3'
- 5) *SiaD*(Y)F:5-ctcaagcgaaggctttgggta-3', R:5'-ctgaagcgttttcattataattgctaa-3'
- 6) *SiaD*(W₁₃₅)F:5-cagaaagtgagggatttcata-3', R:5'-cacaaccattttcattatagttactgt-3'

A. 3. 3 样品处理

可采用目前市售的 DNA 提取试剂盒提取样品 DNA。也可采取直接煮沸方法,将样品煮沸 30min,离心,取上清液作为扩增样品。

A. 3. 4 扩增及检测条件

92 $^{\circ}$ C 30s,55 $^{\circ}$ C 40s,72 $^{\circ}$ C 30s。37 个循环,反应产物用 1.5%~2%琼脂糖凝胶检测,电压 6V/cm。

A. 4 胶乳凝集检测

已有市售的试剂盒,严格遵照制造商的操作说明进行操作。为了获得最佳的结果,CSF 样本的上清应尽快检测;如果不能立即检测,样本应冷藏(2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C)几个小时,或在 -20 $^{\circ}$ C 冻存更长的时间。备用试剂应该 2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C 保存,不应冻存。

A. 4. 1 患者标本的处理方法

A. 4. 1. 1 CSF 离心(3 000r/min,20min),取上清,沉淀部分作细菌培养;

A. 4. 1. 2 急性期血液(2mL),分离血清,置 56 $^{\circ}$ C 将其灭活 30min;

A. 4. 2 结果判断

A. 4. 2. 1 按照说明书操作进行,在亮光下不需要扩大倍数读取。

A. 4. 2. 2 阴性反应:悬液仍均质并出现轻微的浑浊。

A. 4. 2. 3 阳性反应:乳胶颗粒 2min 内凝集(或可见团块)。

A. 5 酶联免疫吸附试验(ELISA)

应用 ELISA 间接法测患者急性期和恢复期血清中的抗体水平,也可以应用于健康者血清抗体的测定。严格遵照制造商的操作说明进行操作。

A. 6 杀菌力试验

应用微量杀菌力试验(TTC法)测定患者急性期和恢复期血清中对 Nm 的杀菌抗体水平。此方法也可用于健康人群的血清抗体测定。为检测患者血清抗体血清的标准实验。

A. 6. 1 目标靶菌

应选择对补体的自然杀菌作用具有耐受性,但对杀菌抗体反应敏感的脑膜炎奈瑟菌菌株。

A. 6. 2 稀释液

灭菌磷酸盐缓冲盐水,pH7.1。使用时每 100mL 稀释液加灭活小兔血清 1mL,万古霉素 500 μ g,多粘菌素 B 2 500 单位。配就的稀释液盛于小瓶中,置 4 $^{\circ}$ C 备用 2 周。

A. 6. 3 滴定板、补体及琼脂

底部呈“U”形的 96 孔带盖有机玻璃微滴板。一般采用幼龄兔或成龄兔血清中筛选的兔补体,预测试测定要求它们不能具有自然杀靶菌的活性,但加有已知阳性参考血清时应产生较高杀菌抗体滴度。使用氯化三苯基四氮唑琼脂培养基(TTC 琼脂)。

A. 6. 4 阳性参考血清

用 Nm 免疫兔制备的诊断血清,未加防腐剂,经预测试测定其杀菌抗体滴度较高(1:3 200 以上)。

A. 6. 5 杀菌抗体测定步骤

A. 6. 5. 1 靶菌液的制备

将 A、B 或 C 群 Nm 菌纯培养物制成轻度混浊的均匀菌悬液,其光密度值相当于 0.1。以菌液的最最终浓度为 4 000cfu/mL。稀释好的靶菌悬液在 1h 内用完。若室温较高,可将菌液管置冰浴中,以防靶菌迅速死亡。

A. 6. 5. 2 杀菌抗体的测定

先在微滴板每孔内加 25 μ L 的稀释液。用移液器从每排第一孔内加 25 μ L 经 56 $^{\circ}$ C 30min 灭活的待检血清,吹吸 5 次~10 次后吸出 25 μ L 至下一孔,如此作连续倍比稀释至最后一孔。从低温冰箱内取出补体,于 37 $^{\circ}$ C 温水中摇动将其速溶,每孔加 25 μ L。每孔加一滴稀释成合适浓度的靶菌液,微滴板置微型振荡器上中速振荡 5min,再在 37 $^{\circ}$ C 培养 25min,取出后重复上述振荡。每孔加 2 滴已溶化并冷至 45 $^{\circ}$ C 左右的 TTC 琼脂后,微滴板置 5%二氧化碳环境 37 $^{\circ}$ C 培养 15h~20h 后观察结果。

A. 6. 5. 3 实验对照

阳性参考血清对照;4 孔补体对照(稀释液、补体、菌液各一滴,检查补体自然杀菌活性);4 孔细菌生长对照(稀释液、灭活补体和靶菌菌液各 1 滴)。每次检测时至少每 5 块微滴板中应有一组上述三种对照试验。往各孔滴完靶菌菌液之后,应将该菌液两滴分别滴加到一个巧克力色琼脂平皿的一端,沿着划好的两条线倾斜下流,于 37 $^{\circ}$ C,5%二氧化碳环境内同时培养,次日检查每滴靶菌的菌落数及其纯度。

A. 6. 5. 4 结果判断

先检查上述三种对照试验的结果,补体的和细菌生长对照的各孔应出现众多的红色点状小菌落;阳性参考血清应达到原来确定的杀菌滴度。若所试各孔中红色点状菌落数目明显地少于补体对照孔或不出现红色点状菌落时,则判断为杀菌阳性;如果所试孔中的菌落数目接近补体对照孔的一半或更多时,

则判断为杀菌阴性。根据红色点状菌落数目的多少,以符号“+”记录试验结果。若补体及靶菌生长对照各孔的细菌正常生长时,应出现众多红色点状菌落,可记为“++++”。当所试各孔与其比较,菌落数减少30%以下,记为“+++”;减少50%左右记为“++”;减少70%左右记为“+”;每孔少于10个菌落则记为“±”。以细菌生长呈“+”及以下者判断为杀菌阳性;以“++”及以上者判为杀菌阴性。以出现杀菌阳性的血清最高稀释度为杀菌抗体的最高滴度。

附录 B

(资料性附录)

病原学、流行病学、样品采集和运送

B.1 病原学

B.1.1 流行性脑脊髓膜炎的病原菌为脑膜炎奈瑟菌,俗称脑膜炎双球菌,为肾型或豆型革兰阴性双球菌。在患者脑脊液中,多位于中性粒细胞内,形态典型。新分离的菌株大多带有荚膜和菌毛,人工培养后可成卵圆形或球形,排列不规则。

B.1.2 脑膜炎奈瑟菌的主要致病成分为内毒素,内毒素作用于小血管和毛细血管,引起坏死、出血,出现皮肤瘀点或瘀斑和微循环障碍,严重败血症时,大量内毒素释放可造成 DIC 及中毒性休克。

B.1.3 荚膜多糖为脑膜炎奈瑟菌特异性抗原,国内外已经分为 A、B、C、D、X、Y、Z、29E、W135、L 等 10 个血清群,我国建立了 H、J、K 三个新的血清群,总共有 13 个血清群。

B.1.4 本菌对环境的抵抗力低,对寒冷、干燥、高温、日光及紫外线都很敏感。化学药剂如 1% 酚、0.1% 升汞、0.1% 新洁尔灭、0.01% 杜灭芬、75% 酒精等处理很快死亡,脑膜炎奈瑟菌能产生自溶酶,在保护剂中(卵黄盐水和脱脂奶),特别是传代菌株放置冷暗处自溶酶活力受到抑制,可延长保存时间,在培养基或保护剂中置 4℃~6℃,最长可存活 2 个月。

B.2 流行病学

B.2.1 传染源

带菌者和患者。

B.2.2 传播途径

病原菌主要借咳嗽、喷嚏、说话等由飞沫直接从空气传播,进入呼吸道引起感染。密切接触对 2 岁以下婴幼儿的传播有重要意义。

B.2.3 人群易感性

人群普遍易感。发病年龄从 2 个月~3 个月开始,6 个月至 2 岁时发病率最高,以后随着年龄的增高而逐渐降低。易感人群受脑膜炎奈瑟菌感染后,60%~70% 成为无症状带菌者,25% 表现为皮肤出现瘀点,7% 表现为上呼吸道感染,仅 1% 表现为化脓性脑膜炎。

B.2.4 流行特征

B.2.4.1 地区分布

全球均有流脑发病。A 群曾是引起世界各地大流行的主要菌群,近十余年来欧美地区流行的主要为 B 群或 C 群,近年在非洲发生了 W135 群的流行。我国流行菌群以 A 群为主,近年个别地区有 C 群病例发生。

B.2.4.2 周期性

在流脑菌苗广泛应用以前曾大约 3 年~5 年出现一次小流行,8 年~10 年出现一次较大流行,流脑菌苗的接种可改变流行的周期性。

B.2.4.3 季节分布

全年皆可发生,以冬春季节发病较多。

B.3 流行性脑脊髓膜炎的样品采集和运送

实验检出脑膜炎奈瑟菌是流脑的确诊依据,适宜的检测样品为脑脊液、血液、皮肤黏膜瘀点或瘀斑组织液、血清及鼻、咽拭子等,脑脊液、血液、皮肤黏膜瘀点或瘀斑组织液中检出脑膜炎奈瑟菌可直接作

为确诊依据。

B. 3. 1 样品采集

B. 3. 1. 1 咽拭子

用长柄棉拭子采咽后壁两侧分泌物,立即接种于卵黄双抗培养基(EPV)或巧克力羊血平板,也可将咽拭子放入液体双抗增菌管内,增菌 8h~12h 以后分离培养。

B. 3. 1. 2 脑脊液

采集脑脊液 1mL~3mL。可用 0.1mL~0.5mL 直接接种于巧克力或 EPV 平板,也可先增菌再进行分离培养。

B. 3. 1. 3 血液

无菌操作抽取发热期患者全血 5mL~10mL,0.1mL~0.5mL 直接接种 EPV 平板,余血立即加于 50mL 的葡萄糖肉汤中增菌后再分离培养。采集患者发病早期和恢复期双份血清,检测血清中特异性抗体呈 4 倍或 4 倍以上升高。

B. 3. 1. 4 瘀点或瘀斑

选患者皮肤上的新鲜瘀点或瘀斑,生理盐水消毒后用针头挑破,挤出组织液,用消毒后的玻片直接蘸取组织液涂片,革兰染色镜检。也可用无菌棉签蘸取组织液先接种于含双抗的葡萄糖增菌肉汤管中,增菌 8h~12h 后分离培养或直接接种 EPV 平板,再涂片染色直接镜检。

B. 3. 2 样品的处理和运送

B. 3. 2. 1 样品处理

脑膜炎奈瑟菌比较脆弱,采集样品后,应尽可能地做到床边接种,若无可能则应在最短的时间内送至实验室进行接种培养。

B. 3. 2. 2 早期采集样品

应尽可能采集患者使用抗生素前的早期样品,以提高病原的检出率。

B. 3. 2. 3 保温运送

脑膜炎奈瑟菌对温度较为敏感,温度过低或过高均可导致菌株死亡。在运送样品或培养物时,应保持样品处于 25℃~35℃之间,切记不能低温运送(检测抗体的血清标本除外)。