ICS 11.020
CCS C 01

DB65

新 疆 维 吾 尔 自 治 区 地 方 标 准

DB65/T 4680—2023

健康人群脑膜炎奈瑟菌带菌率调查技术规范

Technical specification for investigation of Neisseria meningitidis carrier rate in healthy population

2023 - XX - XX 发布　　2023 - XX - XX 实施

新疆维吾尔自治区市场监督管理局　　发 布

目　　次

前言 II
1　范围 1
2　规范性引用文件 1
3　术语和定义 1
4　缩略语 1
5　调查人群 2
6　调查技术要求 2
附录 A（规范性）　带菌率调查流程图 4
附录 B（规范性）　带菌率调查登记表 5
附录 C（规范性）　STGG 肉汤管配制方法 6
附录 D（规范性）　Real - time PCR 检测 7
附录 E（规范性）　脑膜炎奈瑟菌培养 10

前　　言

本文件按照 GB/T 1.1—2020 《标准化工作导则　第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心提出。

本文件由新疆维吾尔自治区卫生健康委员会归口并组织实施。

本文件起草单位：新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心、新疆医科大学第一附属医院、新疆喀什地区卫生健康委员会、新疆维吾尔自治区标准化研究院。

本文件主要起草人：谢娜、岳锡宏、符文慧、陈兆云、陈涛、凯赛尔·吾斯曼、彭孝旺、李娟、孙璐、王崇伟、关丽娜。

本文件实施应用中的疑问，请咨询新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心。

对本文件的修改意见，请反馈至新疆维吾尔自治区卫生健康委员会（乌鲁木齐市天山区新疆龙泉街191号）、新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心（乌鲁木齐市天山区东泉路街道碱泉一街380号）、新疆维吾尔自治区市场监督管理局（乌鲁木齐市天山区新华南路167号）。

新疆维吾尔自治区卫生健康委员会　电话：0991-8560651 传真：0991-8567240 邮编：830001

新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心 电话：0991-3824473 传真：0991-3822696 邮编：830011

新疆维吾尔自治区市场监督管理局　电话：0991-2311250 传真：0991-2311250 邮编：830004

健康人群脑膜炎奈瑟菌带菌率调查技术规范

1 范围

本文件规定了脑膜炎奈瑟菌带菌率调查的术语和定义、缩略语、调查人群、调查技术要求。
本文件适用于健康人群脑膜炎奈瑟菌带菌率调查。

2 规范性引用文件

本文件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文件。

3.1

流行性脑脊髓膜炎 meningococcal meningitis
由脑膜炎奈瑟菌通过呼吸道传播引起的化脓性脑膜炎，简称“流脑”。

3.2

脑膜炎奈瑟菌 *Neisseria meningitidis*
引起流脑的病原体。

3.3

带菌率 carriage rate
健康人群中，口咽部携带有脑膜炎奈瑟菌的比例。

3.4

密切接触 contact
指同吃同住人员，包括家庭成员、托儿所、幼儿园、学校里的同班者及处在同一小环境中的人群。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。
MM：流脑（ Meningococcal Meningitis ）
Nm：脑膜炎奈瑟菌（ *Neisseria meningitidis* ）
CFU / mL：每毫升菌落形成单位（ Colony Forming Unit per mL ）
Real - time PCR：实时荧光聚合酶链式反应（ Real - time Polymerase Chain Reaction ）
STGG：脱脂奶粉胰蛋白葡萄糖甘油肉汤（ Skim milk Tryptone Glucose Glycerol broth)
*sodC*基因：铜-锌超氧化物歧化酶基因（superoxide dismutase [Cu – Zn] ）

*ctrA*基因：荚膜转运基因（capsule transport A）

5 调查人群

被调查的健康人群应同时符合以下两种情况：

a） 一周内无流脑相关症状，包括发热、头痛、呕吐、脑膜刺激征等。

b） 一周内无流脑病例密切接触史。

6 调查技术要求

6.1 流行病学调查

6.1.1 明确调查流程

带菌率调查流程图见附录A。

6.1.2 带菌率调查登记表

带菌率调查登记表见附录B。

6.1.2.1 基本资料的收集

收集被调查人群的基本情况，包括以下内容：

a） 姓名；

b） 性别；

c） 出生年月；

d） 民族；

e） 职业；

f） 居住方式；

g） 呼吸系统疾病；

h） 抗生素使用情况；

i） 流脑疫苗接种史。

6.1.2.2 流脑疫苗接种信息的收集

收集被调查人群的流脑疫苗接种情况，包括疫苗的种类、接种次数、接种日期等资料。

6.2 口咽拭子标本的采集、运输、处理及保存

6.2.1 标本的采集

6.2.1.1 采集前准备

6.2.1.1.1 试剂及耗材

一次性无菌口咽拭子、压舌板、哥伦比亚血平板、双抗巧克力平板或双抗哥伦比亚血平板、STGG肉汤管等。STGG肉汤管的配制方法见附录C。

6.2.1.1.2　调查采样人员确定

采样人员应为经过培训的专业技术人员。

6.2.1.1.3　调查采样人员防护

调查采样人员应穿工作服（白大褂）、戴一次性使用帽子、穿一次性使用隔离衣、戴一次性乳胶手套、戴一次性使用外科口罩。

6.2.1.2　采集

6.2.1.2.1　每个被采样者应采集 1 支口咽拭子，采样前准备一次性使用采样器（口咽拭子）。

6.2.1.2.2　采样时，被采样者应张大口，发出“啊”的声音，用压舌板下压舌中部，暴露出咽喉部位。

6.2.1.2.3　将一次性使用采样器（口咽拭子）伸进咽喉部位，在咽后壁悬雍垂后上方的位置迅速用力左右擦拭 2 次～3 次。

6.2.1.2.4　采集完成后，将口咽拭子标本头部放入 STGG 肉汤管中，使拭子头部完全浸入液体中，多出的部分折断丢弃，拧紧螺旋管盖。

6.2.2　运输

标本采集完成后，需在 2 ℃～8 ℃ 冷藏状态下 4 h 之内尽快送至实验室。

6.2.3　处理和保存

6.2.3.1　标本采集后，置于漩涡振荡器上连续振荡 1 min ，直接进行 Real - time PCR 检测（见附录 D）和脑膜炎奈瑟菌培养（见附录 E）。

注：如当天无法开展检测，标本送至实验室后，应立即冻存于—20 ℃及以下冰箱或干冰中。

6.2.3.2　冷冻样品，从冰箱或干冰中取出 STGG 肉汤管，室温放置至完全融化。按以上步骤进行标本的处理。

注：剩余标本应立即冻存于—20 ℃及以下冰箱或干冰中，以备复核检测。

6.3　菌株保存及运输

6.3.1　菌株可保存于脱纤维羊血管或 10%的脱脂牛奶管，—20 ℃长期保存。

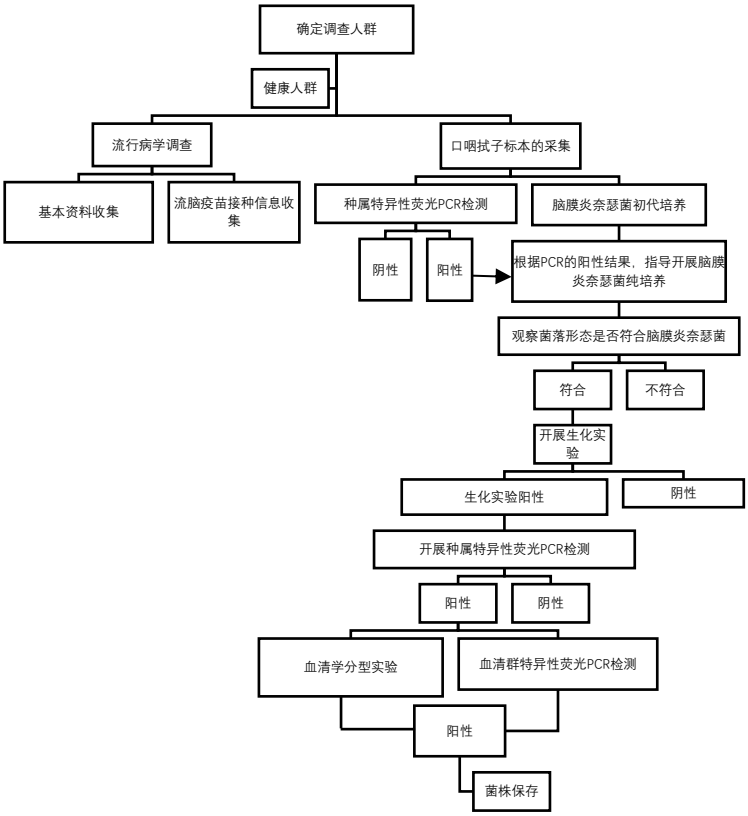
6.3.2　菌株需在冷冻或冻干状态下运输。

附　录　A
（规范性）
带菌率调查流程图

A.1　带菌率调查流程

带菌率调查流程图见图A.1。

注：血清学分型实验与血清群特异性荧光PCR检测实验，两者开展其一即可。



图A.1 带菌率调查流程图

附　录　B
（规范性）
带菌率调查登记表

B.1　健康人群带菌率调查登记

带菌率调查登记表见表B.1。

表B.1 带菌率调查登记表

采样编号	姓名	性别（1.男；2.女）	出生年月(或岁)	民族	职业	居住方式（1聚居；2散居 ）	一周内有无呼吸系统疾病（1有；2无），注明疾病种类	一周内有无服用抗生素（1有；2无 3不详）注明药物种类	流脑疫苗接种史(1.A群；2.A+C群；3.A群与A+C群；4.其他（疫苗名称）；5.不详；6.未种)	采样日期(年/月/日)	培养结果（1.阳性；2.阴性）	备注

注1：采样编号由9位数字组成，前6位是县国标编码，后3位是自然顺序号，从001开始。
示例：阿克苏地区库车市调查的第 21 个适龄儿童，采样编号是 652902021。
注2：聚居：以学校或其他集体为单位，集中住宿。
注3：散居：聚居以外的其他居住形式。

附 录 C
（规范性）
STGG 肉汤管配制方法

C.1 STGG 肉汤管配制

STGG肉汤管配制试剂见表C.1。

表C.1 STGG 肉汤管配制试剂

成分	用量
胰蛋白大豆肉汤基础粉	15 g
葡萄糖粉	2.5 g
脱脂奶粉	10 g
甘油	50 mL
双蒸水	500 mL
注： 按照比例调整每种成分的用量，以配制实际需求量。	

C.2 配制方法

C.2.1 在大小合适的干净容器里依次放入双蒸水、胰蛋白大豆肉汤基础粉、脱脂奶粉和葡萄糖粉；

C.2.2 将容器置于磁力搅拌器上，室温高速（ 1000 rpm～1500 rpm ）搅拌20 min，直到完全溶解；

C.2.3 加入甘油，室温中速（ 500 rpm～1000 rpm ）继续搅拌10 min；

C.2.4 将溶液分装于1.5 mL的冻存管中，每支分装1 mL，拧上螺帽（留少量空隙）；

C.2.5 将装有溶液的冻存管置于121 ℃，103 kPa～137 kPa，高压10 min，取出，置室温冷却，拧紧螺帽。

C.3 质量检测

C.3.1 无菌实验

随机挑取3支冻存管，用无菌枪头从每支中吸取100 μL肉汤，接种于哥伦比亚血平板（倾斜法），待完全吸收后将平板置于37 ℃，5%CO_2条件下培养24 h，观察是否有菌落生长，无任何菌落生长的肉汤继续进行生长实验。

C.3.2 生长实验

取少许新鲜培养的脑膜炎奈瑟菌菌苔，置于无菌生理盐水中配制 0.5 麦氏单位的菌悬液（菌落计数约为 2×10^8 CFU/mL），稀释 1×10^5 倍，取 100 μL 接种于哥伦比亚血平板（用接种环涂抹至整个平板），待完全吸收后将平板置于 37 ℃，5%CO_2 条件下培养 24 h，计数平板上的菌落；同时，取 10 μL 1×10^3 倍稀释的菌悬液，放入一支无菌肉汤管中，并将肉汤管置于—20 ℃以下冻存 1 天，取出置室温融化，漩涡振荡使其完全混匀，取 100 μL 接种于哥伦比亚血平板，同上进行菌落计数；两次计数结果差距在20%以内，则肉汤质量合格。

C.4 保存

将合格的肉汤管置于4 ℃～6 ℃（最长可保存6个月）或冷冻条件下保存（最长1年）。

附 录 D
（规范性）
Real - time PCR 检测

D.1 种特异性 Real - time PCR 检测

D.1.1 用于Real - time PCR检测，脑膜炎奈瑟菌的目的基因为*ctrA*。*ctrA*阳性者可认为相应的调查人群携带或曾经携带脑膜炎奈瑟菌，但阴性者不能排除其携带脑膜炎奈瑟菌的可能。

注：部分脑膜炎奈瑟菌缺乏*ctrA*基因或*ctrA*基因发生变异，可导致Real - time PCR出现假阴性结果。

D.1.2 检测脑膜炎奈瑟菌的另一个常用靶基因是*sodC*，该基因几乎存在于所有脑膜炎奈瑟菌，许多嗜血杆菌也含有该基因，而健康人鼻咽部嗜血杆菌携带率较高。

注：如果以*sodC*为靶基因检测咽拭子标本中的脑膜炎奈瑟菌，将出现较多的假阳性结果。

D.1.3 *ctrA*基因检测

*ctrA*基因Real - time PCR引物和探针序列见表D.1。

表D.1 *ctrA* 基因 Real - time PCR 引物和探针序列

种属名称	目的基因	引物/探针名称	引物和探针序列（5’-3’）
Nm	*ctrA*	*ctrA-f*	TGTGTTCCGCTATACGCCATT
		ctrA-r	GCCATATTCACACGATATACC
		ctrA-Pb	（FAM)AACCTTGAGCAA"T"CCATTTATCCTGACGTTCT (SpC6)
注：“T”标记淬灭基团BHQ1。			

D.1.4 *sodC*基因检测

*sodC*基因Real - time PCR引物和探针序列见表D.2。

表D.2 *sodC* 基因 Real - time PCR 引物和探针序列

种属名称	目的基因	引物/探针名称	引物和探针序列（5’-3’）
Nm	*sodC*	*sodC-f*	GCACACTTAGGTGATTTACCTGCAT
		sodC-r	CCACCCGTGTGGATCATAATAGA
		sodC-Pb	(FAM)CATGATGGCACAGCAACAAATCCTGTTT(BHQ1)

D.2 血清群特异性 Real - time PCR 检测

血清群特异性 Real - time PCR 引物和探针序列见表 D.3。

表D.3 血清群特异性 Real - time PCR 引物和探针序列

血清群/基因群	目的基因	引物/探针名称	引物和探针序列（5’-3’）
A	*sacB*	*sacB-f*	AAAATTCAATGGGTATATCACGAAGA
		sacB-r	ATATGGTGCAAGCTGGTTTCAATAG
		sacB–Pb	FAM-CTAAAAG"T"AGGAAGGGCACTTTGTGGCATAAT-SpC6
B	*synD*	*synD–f*	GCTACCCCATTTCAGATGATTTGT
		synD–r	ACCAGCCGAGGGTTTATTTCTAC
		synD-Pb	FAM-AAGAGATGGGYAACAAC"T"ATGTAATGTCTTTATTT-SpC6
C	*synE*	*synE-f*	CCCTGAGTATGCGAAAAAAATT
		synE-r	TGCTAATCCCGCCTGAATG
		synE-Pb	FAM-TTTCAATGC"T"AATGAATACCACCGTTTTTTTGC-SpC6
X	*xcbB*	*xcbB-f*	TGTCCCCAACCGTTTATTGG
		xcbB-r	TGCTGCTATCATAGCCGCC
		xcbB-Pb	FAM-TGTTTGCCCACATGAATGGCGG-BHQ1
Y	*synF*	*synF-f*	TCCGAGCAGGAAATTTATGAGAATAC
		synF-r	TTGCTAAAATCATTCGCTCCATAT
		synF-Pb	FAM-TATGGTG"T"ACGATATCCCTATCCTTGCCTATAAT-SpC6
W	*synG*	*synG-f*	TATTTATGGAAGGCATGGTGTATG
		synG-r	TTGCCATTCCAGAAATATCACC
		synG-Pb	FAM-AAATA"T"GGAGCGAATGATTACAGTAACTATAATGAA-SpC6
注：“T”标记淬灭基团BHQ1。			

D.3 样本 DNA 提取

采用市售合格的DNA提取试剂盒进行提取，具体操作步骤按照说明书。提取的DNA，可于—20 ℃以下长期保存。

D.4 Real - time PCR 反应条件

D.4.1 PCR反应体系以20 μL为例，2×PCR反应混合物10 μL，上下游引物、探针各2 μL（*ctrA*上下游引物和探针终浓度分别为0.9 μmol/L、0.9 μmol/L、0.1 μmol/L，*sodC*上下游引物和探针终浓度分别为0.3 μmol/L、0.6 μmol/L、0.1 μmol/L，分群引物和探针终浓度分别为0.6 μmol/L、0.6 μmol/L、0.1 μmol/L)，根据荧光PCR仪的要求确定是否加入参比荧光Rox及加入量，DNA模板2 μL，超纯水补齐至20 μL。

D.4.2 反应条件：

a) 退火温度 60 ℃，共 50 个循环；

b) 其他反应条件根据所使用的 2×PCR 反应混合物的说明书进行调整。

注：如购买Real - time PCR扩增反应试剂盒，设置反应条件以具体使用的试剂盒说明书为主。

D.5 结果分析

D.5.1 扩增图应呈光滑的S型曲线，如果曲线的形状改变，应判断为阴性或者重新检测。

D.5.2 手动拖拽阈值线至基线上方后读取Ct值，根据以下标准判断检测结果：

a) Ct 值小于等于 36 为阳性；

b) Ct 值大于等于 40 为阴性；

c) Ct 值介于 36～40，结果为可疑，应重新检测。

D.5.3 重新检测时可采取以下两种方法：

a) 将模板稀释 4～10 倍和用 4 μL 模板代替 2 μL 两种方法重复检测。如果 Ct 值≤36，该样品判断为阳性，否则为阴性。

b) 同时设置三个平行孔检测，如果两个或三个孔出现良好的扩增曲线，判断为阳性，否则为阴性。

注：如购买 Real - time PCR扩增反应试剂盒，判读结果以具体使用的试剂盒说明书为主。

附　录　E
（规范性）
脑膜炎奈瑟菌培养

E.1　培养基的准备

E.1.1　双抗哥伦比亚血平板的配制

E.1.1.1　所需试剂

哥伦比亚粉、万古霉素、多粘菌素B、脱纤维羊血。

E.1.1.2　配制方法

E.1.1.2.1　量取 500 ml 纯水，倒入锥形瓶中，再称取 19.5 g 的哥伦比亚干粉，放入锥形瓶中，充分溶解，用一层纱布裹住瓶口，再用牛皮纸或者锡箔纸裹住瓶口，置于 121 ℃，103 kPa～137 kPa，高压 15 min。

E.1.1.2.2　将水浴锅的温度提前调至 48 ℃，高压完后，将锥形瓶放入水浴锅中。

E.1.1.2.3　待冷却至 48 ℃，无菌操作往锥形瓶中加入万古霉素（终浓度为 6.6 mg/L）、多粘菌素 B（终浓度为 8.4 万 unit/L）。

注：万古霉素和多粘菌素B用纯水溶解，具体培养基中加入万古霉素和多粘菌素B的量，根据购买的试剂浓度计算，使得最终培养基中所含的万古霉素终浓度为6.6 mg/L，多粘菌素B终浓度为8.4万unit/L即可。

E.1.1.2.4　按照每 500 ml 加 25 ml 的标准，加入脱纤维羊血。

E.1.1.2.5　轻轻摇晃至均匀，将锥形瓶和培养皿（90 mm）放在安全柜或超净工作台内（使用前需紫外消毒半小时，才可使用），右手托起锥形瓶瓶底，左手打开培养皿盖，右手迅速将培养基倒入培养皿中，每皿约倒入 20 ml，以铺满皿底为度。铺放培养基后放置 2 h 左右，待培养基凝固后，倒置过来，4 ℃保存。

E.1.1.3　质量控制

E.1.1.3.1　无菌实验

随机选取两块制成的培养基，37 ℃，5%CO_2 条件下培养 24 h。24 h 后检查，是否有菌落生长，如无菌生长，即可继续开展生长实验。

E.1.1.3.2　生长实验

将质控菌株接种于制备的培养基上，37 ℃，5%CO_2条件下培养24 h。判定结果见表E.1。

表E.1 生长实验判定标准

指标	质控菌株	标准值	特征性反应
生长率	脑膜炎奈瑟菌	G≥5	呈现大菌落、无色或灰色、不透明
选择性	大肠埃希氏菌	G≤1	—
	金黄色葡萄球菌		—

表E.1　生长实验判定标准（续）

指标	质控菌株	标准值	特征性反应
注：G的计算：用1 μL接种环选取质控菌株1环，在待测培养基上划6条平行的直线，按标准规定培养条件培养。如每条有比较稠密菌落生长的划线，则G为1，每个平皿上最多为6分；如果仅有一半的线有菌落生长，则G为0.5；如划线上没有菌落生长或生长量少于划线的一半，则G为0。			

E.1.2　双抗巧克力平板

可使用一次性成品培养基。

E.2　口咽拭子样本培养

E.2.1　取100 μL已经振荡混匀的肉汤，分4次～5次分散滴于双抗巧克力平板或双抗哥伦比亚血平板上一区的边缘（约占1/5平板面积），待液滴吸收后，立即进行三区划线，将平板置于37 ℃ ，5%CO_2 条件下培养。

E.2.2　24 h后，挑取疑似菌落，转种于哥伦比亚血平板（含5%脱纤维羊血），37 ℃，5%CO_2 条件下培养18 h～20 h，初代培养的平板再次放回二氧化碳培养箱继续培养。

注1：在血平板上培养18 h～20 h后，可见圆形、光滑、湿润、中央凸起、边界清晰、灰色的菌落，不溶血，菌落直径1 mm。

注2：在巧克力平板上生长的菌落呈现大菌落、无色或灰色、不透明。

E.2.3　对转种培养后的疑似菌落进行革兰染色镜检和生化检测，可辅以荧光PCR检测（*sodC*基因和*ctrA*基因）。镜下为G^-双球菌且生化检测为脑膜炎奈瑟菌可判定为脑膜炎奈瑟菌。镜下为G^-双球菌，生化检测为奈瑟菌，且荧光PCR阳性者（包括*sodC*基因和*ctrA*基因均阳性、仅*sodC*基因阳性）为脑膜炎奈瑟菌。

E.2.4　48 h后，再次从原始平板挑取疑似菌落，如上进行菌株的鉴定。

E.3　脑膜炎奈瑟菌血清学分群

通过血清玻片凝集法或Real - time PCR方法对脑膜炎奈瑟菌进行血清群鉴定。