

DB32

江苏省地方标准

DB32/T 4972.11—2024

传染病突发公共卫生事件应急处置 技术规范 第11部分：细菌类应急 检测技术

Technical specification for emergency response of public health
emergent event caused by infections disease—Part 11: Emergency
detection methods of pathogenic bacterium

2024-12-27 发布

2025-01-27 实施

江苏省市场监督管理局 发布
中国标准出版社 出版

目 次

前言Ⅲ

引言Ⅳ

1 范围1

2 规范性引用文件1

3 术语和定义1

4 实验室生物安全要求1

5 准备工作和质量控制2

6 常用显微镜检查技术2

7 分离培养2

8 分子生物学应急检测技术3

9 免疫学应急检测技术5

参考文献.....6

地方标准信息服务平台

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。

本文件是 DB32/T 4972《传染病突发公共卫生事件应急处置技术规范》的第 11 部分。DB32/T 4972 已经发布了以下部分：

- 第 1 部分：监测预警；
- 第 2 部分：事件报告和管理；
- 第 3 部分：风险评估；
- 第 4 部分：现场流行病学调查；
- 第 5 部分：恢复评估；
- 第 6 部分：应急消毒处置及应急人员个人防护；
- 第 7 部分：媒介生物应急监测、评估与控制；
- 第 8 部分：标本的采集、保存和运输；
- 第 9 部分：应急检测流程；
- 第 10 部分：病毒类应急检测技术；
- 第 11 部分：细菌类应急检测技术。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由江苏省卫生健康委员会提出并组织实施。

本文件由江苏省卫生健康标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：江苏省疾病预防控制中心、南京鼓楼医院、江苏省人民医院、南京农业大学、中国疾病预防控制中心传染病预防控制所、无锡市疾病预防控制中心。

本文件主要起草人：谈忠鸣、王慎骄、周璐、崔仑标、周万青、刘根焰、张炜、王鑫、管红霞、胡建利、钱慧敏、董晨、洪捷、彭杰夫。

引 言

传染病突发公共卫生事件是江苏省公共卫生安全的主要威胁,对社会、经济和人群健康存在巨大影响。本文件为贯彻落实《中华人民共和国传染病防治法》《中华人民共和国突发事件应对法》《突发公共卫生事件应急条例》等法律法规对传染病突发公共卫生事件的应急处置要求,提升江苏省传染病突发公共卫生事件的应急处置能力,保障人民群众的生命安全和社会稳定的目标而制定。

DB32/T 4972《传染病突发公共卫生事件应急处置技术规范》由以下 11 个部分构成:

- 第 1 部分:监测预警;
- 第 2 部分:事件报告和管理;
- 第 3 部分:风险评估;
- 第 4 部分:现场流行病学调查;
- 第 5 部分:恢复评估;
- 第 6 部分:应急消毒处置及应急人员个人防护;
- 第 7 部分:媒介生物应急监测、评估与控制;
- 第 8 部分:标本的采集、保存和运输;
- 第 9 部分:应急检测流程;
- 第 10 部分:病毒类传染病突发公共卫生事件应急检测技术;
- 第 11 部分:细菌类传染病突发公共卫生事件应急检测技术。

DB32/T 4972 的制定是对传染病突发公共卫生事件处置工作相关国家标准、行业标准的有力补充,为开展传染病突发公共卫生事件的监测预警、报告和管理、风险评估、现场流行病学调查、恢复评估、应急消毒处置和个人防护、媒介生物的应急监测评估与控制、标本的采集和检测等应急处置工作提供有力的科学依据和技术支撑,对保障公众健康和公共卫生安全具有重要意义。

地方标准信息服务平台

传染病突发公共卫生事件应急处置 技术规范 第11部分：细菌类应急 检测技术

1 范围

本文件规定了细菌类应急检测的实验室生物安全要求、准备工作和质量控制、常用显微镜检查技术、分离培养、分子生物学应急检测技术和免疫学应急检测技术等。

本文件适用于传染病突发公共卫生事件应急处置中细菌类传染病病原体的应急检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB 19489 实验室生物安全通用要求

WS 233 病原微生物实验室生物安全通用准则

WS 288 肺结核诊断

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

致病菌 **pathogenic bacterium**

能引起人类疾病的细菌,统称为致病菌或病原菌。

3.2

高通量测序 **high-throughput sequencing**

可在较短时间内确定目标区域中核苷酸的顺序,用于细菌全基因组或病原宏基因组的大规模并行测序技术。

注:又称“下一代”测序技术("Next-generation" sequencing technology)。

4 实验室生物安全要求

4.1 实验人员应根据 GB 19489 和风险评估的要求,配备不同类型传染病感染的个人防护装备,包括但不限于防护服、手套、外科口罩或医用防护口罩、防护面屏、防护帽。防护服宜每隔 4 h 更换一次。在发生意外暴露时,根据应急处置预案采取必要措施。

4.2 实验人员、实验场所、感染性标本处置及消毒灭菌等应符合 WS 233 中的实验室生物安全管理要求。

4.3 医疗废物处置应按照《医疗废物管理条例》规定执行。

5 准备工作和质量控制

5.1 准备工作

根据实验需要,选择相应的生物安全柜、移液器、漩涡震荡仪、离心机等仪器和检测试剂耗材。

5.2 质量控制

每一批次反应过程中应至少设置一个阴性和阳性对照,必要时增加空白对照。

6 常用显微镜检查技术

6.1 生理盐水湿片镜下检测

在玻片上滴加适量生理盐水,将适量样本与生理盐水混合并涂抹均匀后,观察中性粒细胞、红细胞及其数量;观察标本中细菌动力特征(用暗视野显微镜观察)等。

6.2 革兰氏染色显微镜检查

6.2.1 直接在玻片上涂抹标本,涂片应薄且均匀。自然干燥或恒温干燥器上干燥后,经甲醇固定或火焰快速固定 3 次,革兰染色,晾干后读片。

6.2.2 革兰染色脱色时间因选用不同的脱色剂而异。使用革兰氏染色仪染色,应按照厂家操作说明书进行。

6.3 抗酸染色显微镜检查

抗酸染色镜检操作流程应按照 WS 288 执行。

6.4 荧光染色显微镜检查

荧光染色显微镜检查步骤如下:

- a) 染色:涂片经火焰固定后,滴加金胺“O”染色剂盖满玻片,染色 30 min,流水自玻片一端轻缓冲洗,洗去染色液,沥去玻片上剩余的水;
- b) 脱色:涂膜上端外缘滴加脱色剂,盖满玻片,脱色 3 min 或至无色,流水自玻片一端轻洗,洗去脱色剂;
- c) 复染:加复染剂复染 1 min,沥去复染液,流水自玻片一端轻洗,自然干燥后镜检;
- d) 镜检:玻片涂膜面向上置于荧光或 LED 显微镜载物台,并以卡尺固定后,以低倍镜搜索发现疑为致病菌的荧光物质,使用 40×物镜确认。在暗背景下,目标菌发出荧光,呈特征形态。

6.5 其他特殊染色显微镜检查

细菌特殊结构如芽孢、鞭毛、荚膜或其他细菌结构如细胞壁、核质、胞质颗粒等,采用相应的特殊染色法进行显微镜检查。包括且不限于细胞壁染色、鞭毛染色、荚膜染色、芽孢染色、异染颗粒染色。

7 分离培养

7.1 无菌部位标本

一般应在患者使用抗生素之前采集无菌部位标本如血液标本直接接种血培养瓶中培养,阳性血培养

物进行固体培养基分离纯化,并进行后续进一步鉴定,对血培养阴性的标本盲传一代。

7.2 非无菌部位标本

非无菌部位标本,通过直接培养或选择性增菌培养的方式,针对不同细菌采用不同培养基和分离程序,得到细菌纯培养物。

8 分子生物学应急检测技术

8.1 核酸提取

8.1.1 试剂盒法提取核酸

根据标本类型选择相应商品化离心柱法或磁珠法基因组核酸提取试剂盒。选择非人源性内参时,待提取标本中宜加入相应的内参模板。

8.1.2 常温一步法提取核酸

根据标本类型选择相应商品化的裂解试剂,将试剂加入标本中,常温裂解。

8.1.3 煮沸法提取核酸

8.1.3.1 标本离心、重悬后使用煮沸法进行简易模板制备:

- 取1接种环(约2 μL ~5 μL)扩大培养物放入装有500 μL 纯水或TE的1.5 mL离心管内,混匀;
- 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热10 min;
- 12 000 r/min离心10 min;
- 吸取上清即为PCR模板。

8.1.3.2 选择非人源性内参时,在待提取标本中宜加入相应的内参模板。

8.2 等温扩增技术

8.2.1 反应体系配制(引物、链置换型核酸合成酶、基质、模板)后置于指定温度下(60 $^{\circ}\text{C}$ ~65 $^{\circ}\text{C}$),经一个步骤即可完成。具体参照相应细菌核酸检测试剂盒说明书。

8.2.2 阴性对照、阳性对照结果成立时,可使用以下方法进行结果判定:

- 浊度检测:肉眼观察反应管内出现白色浑浊判定为阳性,未浑浊判为阴性;
- 指示剂检测:加入荧光等指示剂后,根据试剂盒说明书判定结果。

8.3 实时荧光PCR技术

8.3.1 反应体系配制(PCR反应液、酶、引物、探针及模板)及反应程序设置(反应温度、循环数及荧光通道)应参照相应细菌核酸检测试剂盒说明书。

8.3.2 阴性对照、阳性对照、内参(如有)结果成立时,进行结果判断:

- 阴性显示无Ct值、无S形扩增曲线;
- 阳性显示Ct值小于或等于细菌核酸检测试剂盒说明书规定值,且有S形扩增曲线。

8.4 数字PCR技术

8.4.1 根据PCR仪器和试剂的要求制备反应体系,将体系分配到微小分区或微滴中并封盖,进行PCR反应。使用荧光染料或探针监测目标核酸的扩增,配套软件统计分析各反应中的阳性液滴数。

8.4.2 当阴性对照、阳性对照、内参(如有)结果成立时,进行结果判断,确定目标核酸及其定量信息,包括

标本中每个荧光通道的浓度、精度、误差,依据试剂盒说明书进行结果判读。

8.5 微流体芯片检测技术

8.5.1 参照相应的多病原检测试剂盒(微流体芯片法)说明书。

8.5.2 当阴性对照、阳性对照、内参(如有)结果成立时,进行结果判断,查看各标本扩增曲线的形态及对应的 Ct 值,对照试剂盒说明书规定值进行判读。

8.5.3 确定各个病原体靶点阳性扩增所对应的标本编号,报告该标本为对应病原体检测项目阳性。

8.6 高通量宏基因组测序

8.6.1 测序时机

传染病突发公共卫生事件应急检测中,出现且不限于多病原核酸检测阴性、分离培养阴性、免疫学检测阴性等情况时,宜使用宏基因组测序。

8.6.2 实验过程

对符合要求的核酸进行文库构建、上机测序、数据分析等。具体反应体系及反应程序参照相应测序平台及试剂盒说明书,根据应急检测实际选择是否执行去宿主操作。

8.6.3 数据处理

8.6.3.1 数据质量控制

数据质量控制要求如下:

- 标本经过高通量测序得到的原始数据,应该在去除接头、低质量数据和宿主基因组序列后再进行下一步分析;
- 测序完成后,对 Q20 和 Q30 进行统计,标本测序的碱基质量应同时符合: $Q20^{(1)} \geq 90\%$ 、 $Q30^{(2)} \geq 85\%$;
- 每个标本的高质量序列(Q20)数目应大于 2×10^7 条,对于宿主含量较多而又未在核酸提取步骤进行去宿主操作的标本,数据量适当增加到 $4 \times 10^7 \sim 8 \times 10^7$ 条。

注 1: 测序数据中,碱基识别质量值为 20 的碱基识别准确率为 99%,或错误率为 1%。

注 2: 测序数据中,碱基识别质量值为 30 的碱基识别准确率为 99.9%,或错误率为 0.1%。

8.6.3.2 物种注释

数据质控后对标本数据进行物种注释,宜选用得到广泛认可的数据库进行物种注释,包括但不限于 Food and Drug Administration dAtabase for Reference Grade micrObial Sequences(FDA-ARGOS), World Data Centre for Microorganisms(WDCM), Genome Taxonomy DataBase(GTDB)等。除特殊方法外,对于已知物种,数据库中序列相似度 95% 以上,覆盖度 90% 以上。

8.6.3.3 微生物丰度计算

数据质控后进行物种相对丰度计算,并记录计算方法或软件。除特殊方法外,应将高质量测序数据比对到组装好的参考基因集或合适的数据库上,按相似度 95% 以上,覆盖度 90% 以上进行统计,得到基因水平上的相对丰度分布情况,再将注释到同一物种和同一属的分类水平的基因序列相对丰度进行叠加,得到种水平和属水平的相对丰度结果。

8.6.4 结果判定

结果判定规则如下。

- a) 结合《人间传染的病原微生物目录》或其他相关的病原微生物目录筛选出物种注释中的致病菌和条件致病菌的信息,针对不同标本类型并结合检出病原微生物的种类进行解读,确认致病微生物时,应区分无菌部位(血、无菌体液、组织、骨髓等)与正常有菌部位(如呼吸道、尿液、开放性伤口)。正常有菌部位应综合分析检出细菌是否为导致感染的致病病原。
- b) 对于条件致病菌³⁾,应综合考虑临床表现和物种丰度等信息谨慎进行判断。
- c) 对于致病菌,当种特异性序列数较低时(小于3条)一般不考虑为致病病原,但检出菌为敏感度较低的菌株,如结核分枝杆菌和非结核分枝杆菌,布鲁氏菌,诺卡菌等以及烈性传染病的时候(包括鼠疫,炭疽等),应结合临床症状考虑感染可能,并使用分离培养、涂片染色或抗体检测等手段予以确认或排除。如果疑似暴发疫情标本大部分都报告相应序列且能够排除标本之间或环境污染时即可认定其为此次疫情的致病菌。
- d) 对于无菌部位检出病原菌时,在排除标本污染的情况下,高度怀疑其为致病菌。
- e) 对于鉴定出可分离培养的病原菌,应按相应操作指南对原始标本进行分离培养。

注:在一定条件下,原来不致病的细菌成为致病菌,称为条件致病菌或机会致病菌。

9 免疫学应急检测技术

9.1 胶体金检测技术

9.1.1 检测标本的类型、上样体积及操作步骤参照相应的试剂盒说明书。

9.1.2 实验完成后按照试剂盒要求的时间观察结果,当检测线和质控线均为阳性结果时,判定对应的检测项目阳性结果;当质控线为阳性结果,检测线为阴性结果时,判定对应的检测项目为阴性结果;当质控线为阴性结果时,判定结果为无效结果,需重复实验。

9.2 酶联免疫吸附实验(ELISA)

9.2.1 参照说明依次加入抗原包被(如需要)、待检标本及对照、酶标记物、底物、终止液,具体流程参照相应细菌 ELISA 检测试剂盒说明书。

9.2.2 以空白对照调零,读取酶标仪器上各孔 450 nm 和(或)492 nm 等波长的 OD 值,参照说明书要求设置参比波长并计算阳性值,判定结果。

9.3 化学发光技术

9.3.1 参照说明依次加入磁性颗粒抗原包被、待检及对照血清、碱性磷酸酶标记的蛋白、底物、碱性磷酸酶催化底物液发光,具体流程参照相应细菌化学发光检测试剂盒说明书。

9.3.2 根据化学发光试剂盒的生物参考区间判定实验结果。每一批次化学发光实验过程中应做质控品,质控品结果成立时,进行结果判定。

9.4 凝集试验

包括玻片凝集试验、试管凝集试验、乳环凝集试验等,通过已知抗体或抗原成分,与相应的菌体抗原或抗体结合产生肉眼可见凝集反应。按照试剂盒要求的时间观察结果,出现肉眼可见的凝集反应判为阳性;液体均匀混浊、未见到凝集反应判为阴性⁴⁾。

注:布鲁氏菌病试管凝集试验抗体滴度为 1:100++ 及以上,或者患者病程持续一年以上且仍有临床症状者抗体滴度为 1:50++ 及以上判为阳性。

参 考 文 献

- [1] GB/T 40226—2021 环境微生物宏基因组检测高通量测序法
 - [2] WS 271—2007 感染性腹泻诊断标准
 - [3] WS/T 498—2017 细菌性腹泻临床实验室诊断操作指南
 - [4] WS/T 499—2017 下呼吸道感染细菌培养操作指南
 - [5] WS/T 503—2017 临床微生物实验室血培养操作规范
 - [6] WS/T 805—2022 临床微生物检验基本技术标准
 - [7] 人间传染的病原微生物目录(2023版)(国家卫生健康委员会)
-

地方标准信息服务平台