

中华人民共和国卫生行业标准

WS 295—2019
代替 WS 295—2008

流行性脑脊髓膜炎诊断

Diagnosis for meningococcal meningitis

2019 - 01 - 02 发布

2019 - 07 - 01 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会 发布

前 言

本标准的5.1、5.2、5.3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 295—2008《流行性脑脊髓膜炎诊断标准》。

本标准与WS 295—2008相比，主要技术变化如下：

- 增加了缩略语（见第2章）；
- 修改了流行病学史（见3.1，2008年版的2.1）；
- 修改了临床表现（见3.2，2008年版的2.2）；
- 修改了“末梢血象”为“血常规”（见3.3.1，2008年版的2.3.1）；
- 增加了脑脊液检查的结果（见3.3.2）；
- 增加了“瘀点（斑）组织液”（见3.3.3.2和3.3.3.3）；
- 修改了诊断原则（见4，2008年版的3）；
- 修改了“血清学”为“免疫学”（见3.3.4，2008年版的2.3.4）；
- 修改了疑似病例（见5.1，2008年版的4.2）；
- 修改了临床诊断病例（见5.2，2008年版的4.3）；
- 修改了确诊病例（见5.3，2008年版的4.4）；
- 增加了“其他脑膜炎球菌性疾病”（见7.2）；
- 增加了“鉴别诊断”（见附录B的B.4）；
- 修改了脑膜炎奈瑟菌实验室检测方法（见附录A）；
- 根据流行性脑脊髓膜炎流行病学特征的变化，在附录B中，对流行性脑脊髓膜炎的病原学、流行病学和临床表现中的有关描述予以订正（见附录B）。

本标准起草单位：中国疾病预防控制中心、首都医科大学附属北京地坛医院、山东省疾病预防控制中心、甘肃省疾病预防控制中心、山东大学齐鲁儿童医院、首都医科大学附属北京儿童医院、中国医学科学院北京协和医院。

本标准主要起草人：李艺星、崔富强、邵祝军、李军宏、李兴旺、徐爱强、蒋荣猛、朱兵清、李慧、盖中涛、申昆玲、吴丹、范洪伟。

本标准所替代标准的历次版本发布情况为：

- WS 295—2008。

流行性脑脊髓膜炎诊断

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医务人员对流行性脑脊髓膜炎的诊断。

2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CFU/mL：每毫升菌落形成单位 (colony-forming unit/mL)
DIC：弥散性血管内凝血 (disseminated or diffuse intravascular coagulation)
DNA：脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid)
ELISA：酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay)
IgG：免疫球蛋白G (immunoglobulin G)
OD：光密度 (optical density)
PBS：磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline)
Real-time PCR：实时荧光聚合酶链式反应 (real-time polymerase chain reaction)
SBA：血清杀菌力试验 (serum bactericidal assays)
TTC：氯化三苯基四氮唑 (triphenyl tetrazolium chloride)
rpm：每分钟转数 (revolutions per minute)
WHO：世界卫生组织 (world health organization)

3 诊断依据

3.1 流行病学史

当地有本病发生或流行，或发病前10 d内有流行性脑脊髓膜炎流行地区居住或旅行史。

3.2 临床表现

3.2.1 潜伏期

数小时至10 d，一般为2 d~3 d。

3.2.2 主要临床症状和体征

3.2.2.1 发热、头痛、呕吐，和（或）有脑膜刺激征，婴幼儿可见前囟隆起。重症患者可有不同程度的意识障碍和（或）感染中毒性休克。

3.2.2.2 皮肤、黏膜出现瘀点（斑）。瘀斑可迅速扩大融合成片。

3.3 实验室检测

3.3.1 血常规

白细胞总数、中性粒细胞计数明显升高。

3.3.2 脑脊液常规

典型改变为压力增高，外观呈浑浊米汤样或脓样；白细胞数明显增高，并以多形核白细胞增高为主；糖及氯化物明显减少，蛋白含量升高。但在病程初期仅有压力升高，外观清亮，随后出现典型改变，暴发休克型患者脑脊液通常清亮，蛋白、细胞数和糖亦无变化。

3.3.3 病原学

3.3.3.1 瘀点（斑）组织液、脑脊液涂片检测，可在多形核白细胞内或细胞外见到革兰阴性肾形双球菌。

3.3.3.2 脑脊液、血液、瘀点（斑）组织液培养脑膜炎奈瑟菌阳性。

3.3.3.3 脑脊液、血液、瘀点（斑）组织液脑膜炎奈瑟菌特异性核酸检测阳性。

3.3.4 免疫学

3.3.4.1 急性期脑脊液样品脑膜炎奈瑟菌特异性多糖抗原检测阳性。

3.3.4.2 恢复期血清脑膜炎奈瑟菌特异性 IgG 抗体检测，其效价较急性期呈 4 倍或 4 倍以上升高。

4 诊断原则

根据流行病学史和临床表现及血常规和(或)脑脊液常规检测结果做出疑似病例和(或)临床诊断病例的诊断。

确诊需要脑膜炎奈瑟菌病原学或免疫学检测结果，对病原学检测阳性的病例进一步做出病原学分群诊断（见附录 A 的 A.3）。

5 诊断

5.1 疑似病例

同时符合3.1和3.2.2.1，并同时符合3.3.1、3.3.2任一项。

5.2 临床诊断病例

符合5.1并同时符合3.2.2.2。

5.3 确诊病例

符合5.1或5.2，并同时符合3.3.3、3.3.4中任一项。

5.4 临床分型

在临床诊断或确定诊断基础上，进行临床分型诊断（参见附录B的B.3）。

6 鉴别诊断

主要和其他细菌所致的脑膜炎、其他原因所致的脓毒症、各种原因引起的紫癜等疾病鉴别。婴幼儿还应与高热惊厥等疾病鉴别（参见附录B的B.4）。

7 其他

7.1 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检测阳性。

7.2 其他脑膜炎球菌性疾病

人感染脑膜炎奈瑟菌后，大部分为无症状带菌者。出现症状者，临床疾病谱复杂多样，除可引起脑脊髓膜炎外，还可引起脓毒症、肺炎，偶也可引发关节炎、心肌炎、心包炎和眼内炎等疾病。

附录 A
(规范性附录)
脑膜炎奈瑟菌实验室检测方法

A.1 样品采集、处理和运送

A.1.1 样品采集和处理

A.1.1.1 脑脊液

无菌操作采集脑脊液至少2 mL，采集后立即送往微生物学实验室。如有条件，建议床旁接种，将适量脑脊液（0.1 mL~0.5 mL）接种于5%羊血巧克力平板（以下简称巧克力平板）或血平板，三区划线后送至实验室进行培养。

实验室收到脑脊液样品后，应在1 h内进行检测。首先将样品放入无菌试管，2 000 rpm~3 000 rpm，离心20 min，吸出上清液。上清液可用于脑膜炎奈瑟菌特异抗原检测，亦可将其置于-20℃，进行其他检测。沉淀物部分应进行充分振荡混匀，用于培养及镜检。如脑脊液样品不足1 mL，则不进行离心，直接进行平板接种培养和革兰染色镜检。

A.1.1.2 血液

如需开展核酸检测（如Real-time PCR检测），在离心之前无菌操作留取脑脊液样品200 μL，-20℃以下保存。无菌采集患者急性期静脉血液5 mL~10 mL，立即送往微生物学实验室进行处理和检测。建议床旁接种，将适量的血液（5 mL~10 mL）立即注入血培养瓶内，或将0.5 mL血液直接接种于巧克力平板或血平板。剩余血液样品用于脑膜炎奈瑟菌特异性核酸检测或IgG抗体检测。采集患者发病急性期和恢复期双份血液样品，分离血清，检测脑膜炎奈瑟菌特异性IgG抗体。采集血液样品过程中应不使用抗凝剂。

建议在抗感染治疗之前，同时在不同部位各采集1份，共2份血液样品进行培养。新生儿采集1份血液样品。

A.1.1.3 瘀点或瘀斑

选取患者皮肤上的新鲜瘀点或瘀斑，先用碘伏消毒，再用70%的酒精擦除碘伏，待酒精完全挥发后用无菌针头挑破，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；随后用无菌棉签蘸取组织液接种于巧克力平板或血平板，三区划线后送至实验室进行培养。

A.1.2 样品的运送

脑膜炎奈瑟菌对温度较为敏感，避免样品暴露于阳光、高温或寒冷的环境，温度过低或过高均可导致病原菌死亡。在运送样品或培养物时，应保持样品处于25℃~35℃之间，不能低温运送（用于检测抗体和核酸的样品除外）。

A.2 脑膜炎奈瑟菌培养及镜检

A.2.1 脑脊液样品培养

用灭菌的毛细管或微量移液器吸头吸取沉淀物直接接种于巧克力平板和（或）血平板，三区划线。5% CO₂环境，37℃，培养24 h~72 h，每日检查细菌生长情况，及时对平板上的疑似菌落进行转种和鉴定。

A. 2. 2 脑脊液样品镜检

吸取脑脊液样品离心后的沉淀物10 μL~20 μL，滴于载玻片上并涂开，在生物安全柜中风干玻片并快速通过火焰3次以固定涂片，注意避免灼干。结晶紫染色1 min，用流动水冲洗玻片1 min，去除多余水分；革兰碘液媒染1 min，用流动水冲洗玻片并干燥；95%乙醇脱色5 s~10 s；用番红染液复染20 s~30 s，或用酚红复染10 s~15 s，流动水冲洗玻片并晾干或蘸干。显微镜观察染色的涂片，在亮视野的透镜和油镜下，脑膜炎奈瑟菌位于多形核白细胞内或细胞外，为革兰阴性、肾形双球菌。

A. 2. 3 血液样品分离培养

实验室接收到已接种血液样品的平板或血培养瓶后应立即置于37℃、5% CO₂的环境中，培养24 h~72 h。如使用血培养瓶，每日观察细菌生长情况，如发现细菌生长，无菌操作取0.5 mL接种于巧克力平板和（或）血平板。

A. 2. 4 脑膜炎奈瑟菌菌落形态

脑膜炎奈瑟菌可在血平板或巧克力平板上生长。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，菌落直径达1 mm。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。

A. 2. 5 脑膜炎奈瑟菌生化特征

采用氧化酶试验和糖代谢试验进行脑膜炎奈瑟菌的鉴定。如果氧化酶试验阳性，再进行糖代谢试验。脑膜炎奈瑟菌能氧化葡萄糖和麦芽糖，但不氧化乳糖和蔗糖。

A. 3 脑膜炎奈瑟菌血清学分群

A. 3. 1 试验方法

通过血清玻片凝集法可对脑膜炎奈瑟菌进行血清群鉴定，目前脑膜炎奈瑟菌已经确定了12个不同的血清群，其中，A、B、C、W、X和Y是最常见的引起流行性脑脊髓膜炎的6种血清群。

A. 3. 2 实验操作

用乙醇擦净一块载玻片，用蜡笔或其它记号笔将载玻片分为多个部分，在每个部分的近底部处加10 μL灭菌生理盐水，用无菌接种环或针、涂棒或牙签从巧克力平板或血平板上挑取适量细菌培养物，在生理盐水中将培养物制成略呈乳液状的悬液用于测试。在每个部分的上部加上所选的血清10 μL或10 μL生理盐水或PBS。在亮光下或黑色背景下，将血清或生理盐水与各自的菌悬液混合，摇动玻片1 min~2 min（时间可能因血清生产商不同而有所差异）。

鉴于生物安全，WHO推荐使用福尔马林灭活的脑膜炎奈瑟菌悬液，而不是活菌的生理盐水悬液。福尔马林是一种致癌物，在储存和使用时应高度小心，操作应在生物安全柜中进行。

A. 3. 3 实验结果的读取

血清可分群的脑膜炎奈瑟菌应只与一种分群血清凝集，与生理盐水或PBS不发生凝集。如果在生理盐水或PBS中凝集，说明脑膜炎奈瑟菌有自凝性，判为自凝菌；若无自凝现象，但与两种或两种以上血清发生凝集，判为多凝菌；与任何一种血清或生理盐水或PBS都不能发生凝集，判为不凝菌；以上三种情况均可报告为“血清不可分群脑膜炎奈瑟菌”。

A.4 流行性脑脊髓膜炎Real-time PCR诊断

A.4.1 种特异性 Real-time PCR检测

A.4.1.1 *ctrA*基因检测

绝大部分脑膜炎奈瑟菌含有*ctrA*基因（荚膜转运基因），少数菌株会缺失*ctrA*基因成不可分群菌株。脑膜炎奈瑟菌侵袭性病例多由有荚膜的菌株感染引起，检测脑脊液、血液等无菌部位样品时，可采用*ctrA*基因作为靶基因进行Real-time PCR检测。*ctrA*基因Real-time PCR引物和探针序列如下：

ctrA-F: 5' -TGTGTTCCGCTATACGCCATT-3'

ctrA-R: 5' -GCCATATTCACACGATATAACC-3'

ctrA-Pb: 5' -(FAM)AACCTTGAGCAA" T"CCATTTATCCTGACGTTCT (SpC6) -3'

“T”标记淬灭基团BHQ1。

A.4.1.2 *sodC*基因检测

脑膜炎奈瑟菌均含有*sodC*基因（铜-锌超氧化物歧化酶基因），其他种属细菌，如嗜血杆菌等也含有*sodC*基因。如果考虑不可分群脑膜炎奈瑟菌也可偶然引起疾病，可检测*sodC*基因，其引物和探针序列如下：

sodC-F: 5' -GCACACTTAGGTGATTTACCTGCAT-3'

sodC-R: 5' -CCACCCGTGGGATCATAATAGA-3'

sodC-Pb: 5' -(FAM)CATGATGGCACAGCAACAAATCCTGTTT (BHQ1) -3'

A.4.2 血清群特异性Real-time PCR检测

*ctrA*或*sodC*基因阳性的样品，可判断为脑膜炎奈瑟菌感染，需进行血清群特异性基因检测，以确定脑膜炎奈瑟菌血清群。相应引物和探针序列见表A.1：

表 A.1 脑膜炎奈瑟菌血清群鉴定 Real-time PCR 引物和探针序列

血清群	检测基因	引物/探针序列 (5' -3')
A	<i>sacB</i>	F: AAAATTCAATGGGTATATCACGAAGA
		R: ATATGGTGCAAGCTGGTTTCAATAG
		Pb: FAM-CTAAAAG" T"AGGAAGGGCACTTTGTGGCATAAT-SpC6
B	<i>synD</i>	F: GCTACCCCATTTTCAGATGATTTGT
		R: ACCAGCCGAGGGTTTATTTCTAC
		Pb: FAM-AAGAGATGGGYAACAAC" T"ATGTAATGTCTTTATTT-SpC6

C	<i>synE</i>	F: CCCTGAGTATGCGAAAAAATT
		R: TGCTAATCCCGCTGAATG
		Pb: FAM-TTCAATGC“T”AATGAATACCACCGTTTTTTTGC-SpC6
W	<i>synG</i>	F: TATTTATGGAAGGCATGGTGTATG
		R: TTGCCATTCCAGAAATATCACC
		Pb: FAM-AAATA“T”GGAGCGAATGATTACAGTAACTATAATGAA-SpC6
X	<i>xcbB</i>	F: TGCCCCAACCGTTTATTGG
		R: TGCTGCTATCATAGCCGCC
		Pb: FAM-TGTTTGCCACATGAATGGCGG-BHQ1
Y	<i>synF</i>	F: TCCGAGCAGAAATTATGAGAATAC
		R: TTGCTAAAATCATTGCTCCATAT
		Pb: FAM-TATGGTG“T”ACGATATCCCTATCCTTGCTATAAT-SpC6
注：“T”标记淬灭基团BHQ1。		

A. 4.3 临床样品DNA处理

采用市售的DNA提取试剂盒，提取脑脊液、血液、瘀点（斑）组织液等临床样品中脑膜炎奈瑟菌的DNA，不推荐采用直接煮沸方法。根据临床样品的类型、数量，以及其他革兰阳性菌感染的可能性，在提取临床样品DNA前期处理时，建议加入溶菌酶和变溶菌素。

A. 4.4 Real-time PCR反应体系和反应条件

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。反应条件：退火温度60℃，共50个循环；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。

A. 4.5 Real-time PCR 检测结果的判断

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。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。

“阳性”：Ct 值≤36；“阴性”：Ct 值≥40；“可疑”：Ct 值介于36~40

Ct 值介于36~40，结果为可疑，应重新检测。重新检测时可采取以下两种方法：

- 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。
- 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。

A.5 采用PCR辅助鉴定疑似菌株

A.5.1 种特异性鉴定

*crgA*基因存在于所有脑膜炎奈瑟菌中，曾作为靶基因用于脑膜炎奈瑟菌种特异性鉴定。但由于部分乳糖奈瑟菌也存在与脑膜炎奈瑟菌高度同源的*crgA*基因，建议结合*crgA*基因和*sodC*基因的检测结果进行判定，两个基因检测结果同时阳性时可判定为脑膜炎奈瑟菌。*crgA*和*sodC*引物序列见表A.2：

表 A.2 脑膜炎奈瑟菌种属鉴定普通 PCR 引物序列

检测基因	引物序列 (5' -3')
<i>crgA</i>	F: GCTGGCGCCGCTGGCAACAAAATTC
	R: CTTCTGCAGATTGCGGCGTGCCGT
<i>sodC</i>	F: AGCACACGAGCATAATACGAT
	R: TAACCATGTTGTTTTGCACCT

A.5.2 脑膜炎奈瑟菌分群鉴定

对明确鉴定为脑膜炎奈瑟菌的菌株可采用普通PCR方法进行分群鉴定，相应引物序列见表A.3：

表 A.3 常见脑膜炎奈瑟菌分群鉴定普通 PCR 引物序列

血清群	检测基因	引物序列 (5' -3')
A	<i>orf-2</i>	F: CGCAATAGGTGTATATATTCTTCC
		R: CGTAATAGTTTCGTATGCCTTCTT
B	<i>siaD</i>	F: GGATCATTTTCAGTGTTCACCA
		R: GCATGCTGGAGGAATAAGCATTAA
C	<i>siaD</i>	F: TCAAATGAGTTTGCGAATAGAAGGT
		R: CAATCACGATTTGCCAATTGAC
Y	<i>siaD</i>	F: CTCAAAGCGAAGGCTTTGGTTA
		R: CTGAAGCGTTTCATTATAATTGCTAA
W	<i>siaD</i>	F: CAGAAAGTGAGGGATTTCCATA
		R: CACAACCATTTTCATTATAGTTACTGT
X	<i>ctrA</i>	F: GTCTTTGTATAAGGCCAAG
		R: TTGTCGCGGATTTGCAACTA
E	<i>ctrA</i>	F: ATTACGCTGACGGCATGTGGA

		R: TTGTCGCGGATTTGCAACTA
Z	<i>ctrA</i>	F: TATGCGGTGCTGTTTCGCTATG
		R: TTGTCGCGGATTTGCAACTA

A. 5.3 样品处理

可采用目前市售的DNA提取试剂盒提取菌株DNA。也可采取直接煮沸方法，用适量灭菌蒸馏水制备菌悬液，沸水浴10 min，12 000 rpm 离心5 min，取上清液作为PCR扩增模板。

A. 5.4 PCR扩增及产物检测

94℃预变性5 min；94℃ 30 s，55℃~60℃ 30 s，72℃ 40 s，30个循环；72℃终末延伸5 min。反应产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测，电压5 V/cm。

A. 6 胶乳凝集试验

A. 6.1 样品的处理和检测

应严格按照试剂盒说明书操作。为了获得最佳的结果，脑脊液样品的上清液应尽快检测；如果样品不能立即检测，应于2℃~8℃短期（4 h~6 h）冷藏，或-20℃以下长期冻存。乳胶试剂置于2℃~8℃保存，不能冻存。

乳胶凝集试验检测脑脊液样品的步骤应遵循试剂盒推荐方法。一般步骤如下：

- a) 1 000 ×g 离心脑脊液样品 10 min~15 min，收集上清液，沉淀用于革兰染色和培养。
- b) 上清液 100℃，加热 3 min。
- c) 混匀乳胶凝集试剂。
- d) 滴 1 滴乳胶试剂在卡片上或者玻片上。
- e) 在乳胶液中加入 30 μL~50 μL 上清液。
- f) 最好在震荡器上慢速（100 rpm）摇动；如无条件，手动摇晃 2 min~10 min。
注：混匀时尽量避免交叉污染。
- g) 在明亮处观察凝集试验的结果。

A. 6.2 结果判断

阳性结果：在2 min~10 min内乳胶颗粒凝集（或可见团块）。

阴性结果：悬液仍均质，出现轻微的浑浊（似牛奶）。

A. 7 酶联免疫吸附试验（ELISA）

ELISA法可检测患者急性期和恢复期血清特异性IgG抗体水平。严格遵照试剂盒的操作说明进行检测。

A. 8 血清杀菌力试验（SBA）

A. 8.1 靶菌

作为靶菌的脑膜炎奈瑟菌对补体的自然杀菌作用应具有耐受性，但对杀菌抗体反应敏感。

A. 8.2 稀释液制备

灭菌磷酸盐缓冲液 (DPBS)：含0.5 mmol/L MgCl₂，0.9 mmol/L CaCl₂；pH 7.4。配制的稀释液分装于小瓶中，置于4℃，备用2周。使用前每100 mL稀释液加灭菌10%葡萄糖1 mL。

A. 8.3 滴定板、补体及琼脂选择

滴定板选择96孔“U”型底或“平”底细胞培养板。补体一般采用3周~4周幼龄兔血清，要求无自然杀伤靶菌活性，但加入已知阳性参考血清时应产生较高杀菌抗体滴度。琼脂使用氯化三苯基四氮唑琼脂培养基 (TTC琼脂)。

A. 8.4 阳性参考血清制备

用脑膜炎奈瑟菌免疫兔制备的诊断血清，不加防腐剂，经预试验测定其杀菌抗体滴度较高 (1:3200以上)；或用人抗脑膜炎奈瑟菌参考品血清CDC1992。

A. 8.5 杀菌抗体测定步骤

A. 8.5.1 靶菌液的制备

将A、B、C、W和Y群等脑膜炎奈瑟菌纯培养物制成轻度混浊的均匀菌悬液，600 nm波长下测量OD值为0.35左右，菌液的最终浓度为4 000 CFU/mL。稀释的靶菌悬液在1 h内用完。若室温较高，可将菌液管置冰中，以防靶菌迅速死亡。

A. 8.5.2 杀菌抗体的测定

待检血清样品置于56℃，30 min灭活补体，滴定板每孔内加25 μL稀释液，每排第一孔内加25 μL灭活的待检血清，用移液器从第一孔吹吸5次~10次，吸出25 μL至下一孔，如此做连续倍比稀释至最后一孔。从低温冰箱内取出补体，于低于10℃的水中摇动将其速溶，每孔加25 μL等体积混合的补体靶菌混合液 (补体和菌悬液各12.5 μL)。滴定板置微型振荡器上中速振荡5 min，37℃，无CO₂环境，培养60 min~90 min，取出后每孔加50 μL已融化并冷却至45℃左右的TTC琼脂，边振荡边加TTC琼脂。将滴定板置5% CO₂环境，37℃培养15 h~20 h后观察结果。

A. 5.8.3 实验对照

阳性质控血清对照 (稀释液12.5 μL、阳性质控血清12.5 μL、活补体12.5 μL和菌液12.5 μL)；补体对照 (稀释液25 μL、活补体12.5 μL和菌液12.5 μL，检查补体自然杀菌活性)；细菌生长对照 (稀释液25 μL、灭活补体12.5 μL和菌液12.5 μL)；被检血清对照 (被检血清25 μL、灭活补体12.5 μL和菌液12.5 μL，检查被检血清自然杀菌活性)。每批次检测中应有一组上述四种对照试验。菌落计数：取菌液12.5 μL，滴加到一个巧克力琼脂平皿的一端，沿着划好的两条线倾斜往下流，在37℃，5% CO₂环境，与滴定板同时培养，次日检查每滴靶菌的纯度并记录菌落数，平板上生长的菌落数每12.5 μL应为50 CFU~60 CFU。

A. 5.8.4 结果判断

检查上述四种对照试验的结果，补体对照、抗体对照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。以补体对照为参照计算杀菌率，杀菌率为50%的血清稀释度即为特异性体外杀菌滴度，即若所试各孔中红色点状菌落数目明显少于补体对照孔50%

以下或不出现红色点状菌落时，则判断为杀菌阳性；如果所测试孔中的菌落数目接近补体对照孔的一半以上或更多时，则判断为杀菌阴性。出现杀菌阳性的血清最高稀释度为杀菌抗体的最高滴度。

SBA可用于测定患者急性期和恢复期血清中杀菌抗体水平，也可用于健康人群血清杀菌抗体检测。

附录 B
(资料性附录)
病原学、流行病学、临床分型和鉴别诊断

B.1 病原学

B.1.1 脑膜炎奈瑟菌

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，为肾形或豆形革兰阴性双球菌。在患者脑脊液中，多位于多形核白细胞内或细胞外，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。

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（斑）和微循环障碍，严重脓毒症时，大量内毒素释放可造成弥散性血管内凝血（DIC）及中毒性休克。

B.1.2 血清分群

根据荚膜多糖的结构，脑膜炎奈瑟菌可分为A、B、C、X、Y、Z、E、W、L、H、I、K等12个血清群。

B.1.3 生物特性

脑膜炎奈瑟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（如卵黄盐水和脱脂奶），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

病原菌主要通过咳嗽、喷嚏、说话等由飞沫传播，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。发病年龄多从2月龄~3月龄开始，6月龄至2岁时发病率最高，以后随着年龄的增长而逐渐降低。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

全球均有流行性脑脊髓膜炎病例发生。A群脑膜炎奈瑟菌曾引起全球大流行。目前欧美地区流行的血清群主要为B群、C群或Y群，W群则为非洲流行性脑脊髓膜炎主要流行血清群。历史上我国流行性脑脊髓膜炎的流行血清群以A群为主，自2003年以来C群流行性脑脊髓膜炎逐渐流行。自2010年以来A群流行性脑脊髓膜炎病例明显减少，而出现B群及W群流行性脑脊髓膜炎病例的地区呈增多的趋势，个别省份出现X群和Y群流行性脑脊髓膜炎病例。

B. 2. 4. 2 周期性

在脑膜炎球菌疫苗广泛应用以前，约3年~5年出现一次小流行，8年~10年出现一次较大流行。广泛接种脑膜炎球菌疫苗，可持续保持较低的流行性脑脊髓膜炎发病水平，流行高峰不再明显。

B. 2. 4. 3 季节分布

流行性脑脊髓膜炎全年皆可发生，以冬春季节发病较多。

B. 3 临床分型

B. 3. 1 普通型

B. 3. 1. 1 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。部分病人有此期表现。

B. 3. 1. 2 脓毒症期

有恶寒、高热、头痛、呕吐、乏力、肌肉酸痛、神志淡漠等症状。约70%患者皮肤及黏膜出现瘀点（斑）。

B. 3. 1. 3 脑膜炎期

多与脓毒症期症状同时出现。发病后24 h，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。婴幼儿的症状多不典型，表现为高热、拒食、烦躁、啼哭不安，惊厥、腹泻及咳嗽较成人多见。前囟未闭者凶门可有隆起，而脑膜刺激征可能不明显。

B. 3. 1. 4 恢复期

经治疗体温逐渐下降至正常，意识及精神状态改善，皮肤瘀点（斑）吸收或结痂愈合。神经系统检查均恢复正常。约有10%的患者出现口周疱疹。患者一般在1周~3周痊愈。

普通型约占90%。各期不易严格区分。

B. 3. 2 暴发型

B. 3. 2. 1 休克型

又称“暴发型脑膜炎奈瑟菌脓毒症”。起病急骤，寒战、高热或体温不升，严重中毒症状，短时间（12 h内）出现遍及全身的瘀点（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DIC。多无脑膜刺激征，脑脊液检查多无异常。

B. 3.2.2 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。部分病人出现脑疝(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，肢体肌张力增强等症状。

B. 3.2.3 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。

暴发病情凶险，进展迅速，如不及时治疗，发病6 h~24 h内即可危及生命。婴幼儿病死率可高达50%。

B. 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。

B. 4 鉴别诊断

B. 4.1 肺炎链球菌脑膜炎

无明显季节性，散发。多数病人有肺炎、中耳炎、乳突炎、鼻窦炎等感染灶，部分病人继发于颅脑外伤骨折之后或脑外科术后。皮肤、黏膜出现瘀点(斑)较为少见。依据脑脊液和血液病原学检查可确诊。

B. 4.2 流感嗜血杆菌脑膜炎

无明显季节性，散发。起病较为缓慢，病初多有明显的上呼吸道感染、肺炎或中耳炎症状。脑膜炎症状与其他化脓性脑膜炎相似，偶有皮肤、黏膜瘀点。依据脑脊液和血液病原学检查可确诊。

B. 4.3 金黄色葡萄球菌脑膜炎

多继发于皮肤感染或金黄色葡萄球菌脓毒症，常于化脓性感染数日或数周后发病，感染中毒症状重，可见猩红热样皮疹、化脓性皮炎、肺炎、肺脓肿等表现。依据脑脊液和血液病原学检查可确诊。

B. 4.4 大肠埃希菌脑膜炎

多见于新生儿，常由于早产、损伤性分娩和母亲感染所致。亦可发生于颅脑外伤或颅脑手术及鼻窦、乳突等灶性感染或手术后。本病易并发脑室脑炎。皮肤、黏膜出现瘀点(斑)少见。依据脑脊液和血液病原学检查可确诊。

B. 4.5 新型隐球菌脑膜炎

多数起病缓慢，可呈亚急性。初期症状不明显，常有头痛，可位于前额、双侧颞部、枕后或眼眶后，多为胀痛或钝痛，呈间歇性。伴低热或不发热。脑脊液细胞数轻、中度增加，以淋巴细胞为主，早期也可呈现中性粒细胞为主；蛋白质水平轻、中度增高，葡萄糖和氯化物降低。依据涂片、培养分离、组织病理标本发现有荚膜的酵母菌可确诊新型隐球菌感染。

B. 4.6 结核性脑膜炎

无季节性。多有结核病史或密切接触史。起病较缓慢，也有急性起病，病程较长，脑膜刺激征较明显，脑实质通常无明显病变，晚期可有脑实质病变表现。有发热、盗汗、消瘦等症状，神经系统症状出现较晚。皮肤、黏膜不出现瘀点（斑）。脑脊液以单核细胞为主，蛋白增高，糖和氯化物降低。脑脊液抗酸杆菌涂片及分枝杆菌培养阳性，菌种鉴定为结核分枝杆菌复合群可确诊，但阳性率较低。脑脊液分枝杆菌核酸检测阳性有助于快速确定病原学诊断。脑脊液和血液的 γ -干扰素释放试验阳性，可辅助诊断。必要时可X线胸片和眼底检查，协助鉴别。

B. 4. 7 流行性乙型脑炎

主要经蚊媒传播。蚊虫孳生季节发病。有发热、头痛、喷射性呕吐，发热2 d~3 d后出现不同程度意识障碍。皮肤、黏膜不出现瘀点（斑）。脑脊液清亮，脑脊液细胞数中度增加，蛋白质轻度增高，糖和氯化物基本正常。依据血清学检查和病原学检查可确诊。

B. 4. 8 中毒型细菌性痢疾

高热，全身中毒症状严重，可有嗜睡、昏迷及抽搐，迅速发生循环和呼吸衰竭。临床主要表现为严重毒血症、休克和（或）中毒性脑病。发病初期腹痛及腹泻症状很轻或无，发病24 h内可出现腹泻及痢疾样便。作肛拭或生理盐水灌肠镜检便标本，可见大量脓、白细胞。

B. 4. 9 肾综合征出血热

多有鼠类接触史，以发热、出血、肾功能损伤为主要表现。初期出血现象较轻，表现为酒醉貌、结膜充血水肿，皮肤上有条索状出血点，主要见于腋下。血常规出现异常淋巴细胞。尿常规有大量蛋白尿和红细胞、白细胞。脑膜刺激征不明显，脑脊液检查阴性。汉坦病毒抗体阳性。

B. 4. 10 婴幼儿高热惊厥

是婴幼儿期（主要发生在出生后6个月至3岁）最常见的惊厥原因（约占30%）。多发生于急骤高热开始后12 h内，发作时间短暂，发作停止后神志即可恢复正常。在一次疾病过程中很少发作2次以上。皮肤无瘀点（斑），脑脊液检查正常。

参 考 文 献

- [1] 流行性脑脊髓膜炎诊疗要点(卫医发[2005]66号)[S]. 2005-02-24.
- [2] 杨绍基. 传染病学[M]. 第8版. 北京:人民卫生出版社, 2013:208.
- [3] CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Meningococcal Disease//Manual for the Surveillance of Vaccine-Preventable Disease, 6th Edition[EB/OL]. [2013-01-29].
<http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/surv-manual/chpt08-mening.html>.
- [4] WHO. Recommended Surveillance Standards, Second edition[EB/OL]. [1999].
<http://www.who.int/csr/resources/publications/surveillance/whocdscsr992.pdf>.
- [5] MA Sáfadi, LE de, EL López, *et al.* The current situation of meningococcal disease in Latin America and recommendations for a new case definition from the Global Meningococcal Initiative[J]. *Vaccine*, 2013, 12(8):903-915.
- [6] WHO. Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*[S]. WHO manual, 2nd edition. 2011, 57-72.
- [7] 徐丽, 罗隆泽, 朱兵清, 等. C群脑膜炎奈瑟菌血清杀菌力试验的优化及其应用[J]. *中华流行病学杂志*, 2009, 30(6):619-621.
- [8] 李军宏, 李艺星, 吴丹, 等. 中国2006~2014年流行性脑脊髓膜炎病例菌群分布特征及变迁趋势[J]. *中国疫苗和免疫*, 2015, 21(5):481-485.
- [9] AUBrouwer MC, van de Beek D, Heckenberg SGB, *et al.* Hyponatraemia in adults with community-acquired bacterial meningitis[J]. *QJM*, 2007, 100(1):37.
- [10] AUTamune H, Takeya H, Suzuki W, *et al.* Absence of jolt accentuation of headache cannot accurately rule out meningitis in adults[J]. *Am J Emerg Med*, 2013, 31(11):1601-1604.
- [11] 中华医学会检验医学分会. 临床微生物室血培养操作规范[J]. *中华检验医学杂志*, 2004, 27(2):124-126.
-