

## 附件 7:

# 全国钩端螺旋体病监测方案

(试行)

### 一、背景

钩端螺旋体病是一种全球分布的自然疫源性疾病，我国大部分省区的气候条件适合钩体生长、繁殖，动物宿主的种类繁多，加之我国洪涝灾害频繁发生，存在着钩端螺旋体病暴发或大流行的潜在危险，是受钩体病危害极其严重的国家。从 1958 年以来，全国已经累计报告钩体病人 250 多万人，病死率较高。全国发病率高达 10/10 万以上的特大流行有 10 次，其中 9 次发生在洪涝灾害之年。

钩体病按流行形式一般分为稻田型、洪水型和雨水型，南方以稻田型和雨水型为主，北方以洪水型和雨水型为主。钩体病主要以农村青壮年发病为主，集中在农忙季节，对疫区人民的生产生活和健康造成极大危害。

### 二、监测目的

- (一) 了解我国钩体病的疫情动态、流行规律，及早发现疫情；
- (二) 掌握钩体病主要宿主动物的动态变化情况及其带菌情况；
- (三) 掌握钩体病流行的主要血清群分布及变迁情况；
- (四) 了解健康人群对钩体病的免疫水平；
- (五) 为钩体病流行趋势的预测、预警和制定防治对策、措施提供科学依据。

### 三、钩体病的定义

#### (一) 诊断原则

根据患者的流行病学史、临床表现及实验室检查结果进行综合判断。

#### (二) 诊断标准

##### 1. 流行病学史

在钩体病流行季节，发病前一个月内有疫区旅居史，并接触过可疑疫水或动物及其排泄物。

##### 2. 早期主要症状和体征

2.1 发热：起病急，短期内体温可达 39℃ 左右，常为弛张热，可伴有畏寒等症状。

2.2 肌痛：全身肌痛，特别是腓肠肌痛。

2.3 乏力：全身乏力，特别是腿软明显。

2.4 眼结膜充血：轻者主要在眼球结膜、外眦及上下穹窿部，重者除角膜周围外的全球结膜血管扩张呈网状，无分泌物，不痛，不畏光。

2.5 腓肠肌压痛：双侧腓肠肌压痛，重者拒按。

2.6 淋巴结肿大：主要为表浅淋巴结及股淋巴结，一般为1~2cm，质偏软，有压痛，无化脓。

### 3. 实验室诊断

3.1 从血液或脑脊液或尿液分离到钩端螺旋体。

3.2 从血液或尿液或脑脊液检测到钩端螺旋体核酸。

3.3 病人恢复期血清比早期血清抗钩端螺旋体抗体效价4倍或4倍以上升高。

### 4. 病例分类

#### 4.1 疑似病例

具备1加2.1和2.2、2.3中任何一条。

#### 4.2 临床诊断病例

疑似病例加2.4或2.5或2.6中任何一条。

#### 4.3 实验室确诊病例

疑似病例加3.1或3.2或3.3中的任何一条。

## 四、监测内容

### (一) 全国疫情监测

#### 1. 疫情报告

按照《中华人民共和国传染病防治法》和《传染病疫情报告管理规范》，各级各类医疗机构、疾病预防控制机构、卫生检疫机构执行职务的医务人员发现疑似、临床诊断或实验室确诊病例应在诊断后24小时内填写报告卡进行网络直报。不具备网络直报条件的应在诊断后24小时内向相应单位送(寄)出传染病报告卡，县级疾病预防控制机构和具备条件的乡镇卫生院收到传染病报告卡后立即进行网络直报。

#### 2. 个案调查

##### (1) 流行病学调查

各地在对因钩体病死亡的病例全部做个案调查(钩体病个案调查表见附表

1)。有暴发流行时，参照暴发流行时的方法进行调查。

##### (2) 个案的血清学核实诊断

如病例死亡前采有血标本，则对血清用 MAT 或 ELISA 方法进行血清学核实诊断(见附件 1 和 2)。

### (3) 病原学诊断

如病例死亡前采有血标本，可进行钩体分离培养(见附件 3)，分离的阳性菌株及时送省级疾病预防控制中心进行鉴定。各省疾病预防控制中心将分离到的钩体菌株全部或部分送中国疾病预防控制中心进行 PFGE 检测。

## 3. 结果的报告与反馈

县级疾病预防控制中心每年 12 月底前将当年的个案调查表录入数据库，复核后逐级汇总上报至省级疾控中心。

省级疾病预防控制中心每年 2 月底将上年的钩体病个案调查表数据库和疫情监测结果报中国疾病预防控制中心。

中国疾病预防控制中心根据情况将疫情分析及实验室检测结果(3 个月内)反馈给各省疾控中心。

## (二) 暴发疫情调查与监测

### 1. 暴发疫情的定义

在某个局部地区，钩体病一个最长潜伏期(一个月)内发病数明显增多称为暴发。

### 2. 暴发疫情的报告

按照《中华人民共和国传染病防治法》和《传染病疫情报告管理规范》的规定，各类医疗机构、疾病预防控制中心、卫生检疫机构执行职务的医务人员发现暴发疫情，应在 24 小时内通过传染病疫情监测信息系统或其它规定的系统进行报告。县级疾病预防控制中心接到暴发疫情报告，经初步确认后立即上报。

### 3. 暴发疫情的调查

#### (1) 疫情的核实与判定

①病例核实：县级疾控中心对报告的早期病例进行详细的个案调查，对其他病例根据具体情况全部或抽样进行个案调查，并进行病原学和/或血清学检测。

②疫情判定：根据情况确定是否属于暴发，并进行暴发疫情三间分布的调查分析。

#### (2) 基本情况调查

①详细调查暴发点的人口资料、居民生活环境、自然地理景观、气象资料、生产方式等流行因素。

②了解暴发点所在地的既往疫情和流行强度。

③了解暴发点所在地钩体病主要宿主动物的种类、分布、密度等情况。

### (3) 宿主动物调查

在暴发点和周围进行可疑宿主动物种类、密度调查，并进行病原学分离或血清学检测。

### (4) 人群血清学调查

根据具体情况，采集暴发点和周围部分人群血清标本，进行抗体水平的检测。

## 4. 控制措施

参照《钩端螺旋体病诊断标准及处理原则》，在疫情调查的同时，根据具体情况可采取预防服药、野外灭鼠、管理传染源、健康教育等综合性防制措施。

## 5. 总结

及时对资料进行整理、汇总和统计，分析暴发流行的原因、传播方式、流行特点、流行趋势等，并进行控制措施评价，总结经验教训，写出详细的暴发调查报告，报上级主管部门。

### (三) 哨点监测

在承担哨点监测的四川、湖北、江西、云南、湖南、安徽省，以县为单位确定3-5个国家级监测点，每个监测点包括1-2个乡镇，开展人间疫情、宿主动物以及流行因素的监测。

#### 1. 监测点选择原则

- (1) 近年来钩体病发病率较高的地区；
- (2) 监测点能够代表疫区和疫源地主要类型；
- (3) 监测点具有一定的钩体病工作基础，能够承担并完成监测任务；
- (4) 根据疫情变化和工作完成情况，适时调整监测点。

#### 2. 全国各省钩体病监测哨点

根据以上原则，选择以下县市为全国监测点：

- (1) 四川省：雅安市、江油市、成都市温江区、乐山市、眉山市、名山县
- (2) 湖北省：仙桃市、兴山县、蕲春县、秭归县、竹溪县
- (3) 江西省：上高县、上饶县、龙南县、浮梁县
- (4) 云南省：思茅市孟连县、西双版纳州勐腊县、丽江市华坪县
- (5) 湖南省：长沙市宁乡县、湘潭市湘潭县、娄底市双峰县、益阳市沅江市
- (6) 安徽省：怀远县、凤台县、黄山区、休宁县。

### 3. 监测内容

#### (1) 一般资料的收集:

近两年自然地理资料(包括地形、地貌、河流、植被、海拔、气温、降雨量、土壤等)和社会经济资料(人口数、人口构成和居民人均收入)及其它相关资料。

#### (2) 疫情监测

① 疫情报告同全国疫情监测。

#### ② 个案调查

##### A、流行病学调查

监测哨点所在地的县级疾病预防控制机构对乡镇监测哨点报告的钩体病病例和疑似病例进行个案调查。散发时要求全部、暴发时可视情况进行全部或部分的个案调查。

个案调查表的录入和上报同全国疫情监测。

##### B、血清学检测

对监测哨点进行个案调查的病例,采集急性期和/或恢复期血清标本,由省级疾病预防控制中心或有条件的县、市疾病预防控制机构应用 MAT 或 ELISA 方法(见附件 1、2)检测,进行核实诊断,血清学核实诊断结果随时补录入个案调查表数据库。

##### C、病原学检测

监测哨点对未使用抗菌素治疗的钩体病例,采集全血进行病原分离;已使用抗菌素治疗的早期病例,则采集尿液进行病原分离。分离到的菌株送到省级疾控中心鉴定群型。

#### (3) 宿主动物监测

以监测哨点(乡、镇)为单位,调查主要宿主动物种类、分布、密度、感染率(见附表 2、3)。

#### ① 鼠情监测

##### A、调查点的选择

根据地理景观选择河流、水渠、道路两旁,农田等有鼠类栖息活动的地方。

##### B、监测时间

每年 4~6 月和 8~10 月分两次进行。

##### C、捕鼠方法

采取夹夜法进行鼠密度的监测,推荐用江西贵溪中号钢板鼠夹,每个监测

哨点每次有效放夹数不少于 300 夹(或笼)。行距 30m 以上, 夹(或笼)距 5m, 天黑前将夹(或笼)放完, 次日晨收回;

将捕获的鼠类进行种类、性别、成幼等鉴定, 参考《医学动物分类鉴定》确定宿主动物名称。

#### ②鼠带菌率调查

各监测点每次调查野鼠 50 只以上, 进行病原学分离和培养(方法见附件 3), 计算带菌率。

#### ③其它宿主动物的监测

监测哨点根据具体情况至少选择 2 种其它动物的样本(如猪肾、牛尿、青蛙、犬肾等)进行病原学分离和培养(方法见附件 3), 样本量应不低于 50, 并计算带菌率。

#### (4)健康人群的血清学监测

每个监测哨点在钩体病的流行前期, 随机采集 10 岁~、20 岁~、30 岁~、40 岁~、50 岁~共 5 个年龄组的血清标本 100 份(每年龄组采集 20 份), 进行抗体检测(方法见附件 1)。

各监测哨点应及时将监测情况和分析结果上报省疾控中心, 各省级疾病预防控制中心次年 2 月底前将监测结果汇总后报中国疾病预防控制中心。

中国疾病预防控制中心于 5 月 1 日前将上一年全国的监测总结反馈给各省疾控中心。

### 五、监测系统组成和职责

监测系统由卫生部、各级卫生行政部门、中国疾病预防控制中心及各级疾病预防控制中心组成。其职责分别是:

#### (一)卫生部和各级卫生行政部门

卫生部领导全国钩体病监测工作, 各级卫生行政部门负责组织开展本辖区内钩体病监测工作, 并提供所需监测经费, 保证监测工作的顺利开展; 有国家监测点的省(自治区、直辖市)、市、县卫生行政部门按国家下拨经费 1: 1: 1 比例提供配套经费。

#### (二)中国疾病预防控制中心

1. 组织全国监测方案的起草、论证、修改、调整和完善, 为全国钩体病监测提供技术指导。

2. 组织考察、确定全国监测点的布局, 与国家级监测点所在省级疾病预防

控制中心签订协议，明确具体任务和目标，为国家级监测点提供一定监测经费补助。

3. 组织对全国省级疾病预防控制中心和国家级监测点的专业技术人员的培训。

4. 设计监测数据的收集流程、方式，负责全国监测数据的收集、整理，定期对监测系统的全部数据进行分析、反馈。每年对全国钩体病监测系统年度工作总结，并组织召开全国钩体病监测年度工作总结研讨会。

5. 为各省级疾病预防控制中心和国家级监测点提供相应的试剂和器材。

6. 对各省级疾病预防控制中心送检菌株进行鉴定和 PFGE 分析。

7. 组织专家定期对全国钩体病监测系统进行检查、考核。

### (三) 省级疾病预防控制中心

1. 根据国家监测方案，结合本省实际情况制定本省监测实施方案；协助国家疾病预防控制中心确定本省国家级监测点，建立和完善本省的监测网络；

2. 负责本省监测专业技术人员培训工作；

3. 承担本省国家级监测点的管理、业务指导，参与国家 CDC 对国家级监测点的监测工作检查、考核。

4. 与监测点疾控中心签订协议，明确具体任务和目标，按其完成情况确定监测经费补助数额。

5. 完成国家监测方案中要求的病例抽查、血清学和病原学等监测任务。

6. 对全省监测资料进行收集、汇总和分析，并对下级进行反馈。按方案要求的时限上报中国疾病预防控制中心。

7. 对监测点的监测工作进行质量控制和考核。

### (四) 市级疾病预防控制中心

根据国家监测方案的要求，协助省疾控中心完成本地区监测点的监测任务和管理、业务指导；参与本地区监测点的监测工作。

### (五) 县级疾病预防控制中心

1. 按监测方案要求，及时、准确的对钩体病病例进行个案调查、数据录入，按规定的时限上报省(市)疾病预防控制中心。负责病例标本的采集、检测或上送。

2. 按监测方案的要求，承担宿主动物种群、密度的监测工作和宿主动物标本的采集和/或检测工作，并及时将采集的标本或分离的菌株送省级疾病预防控制中心进行检测。

3. 负责暴发疫情的调查处理。

#### (六) 监测点所在地医疗机构

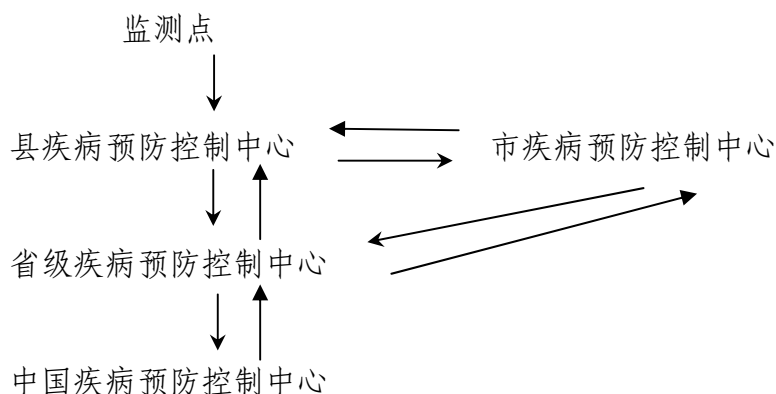
配合疾病预防控制部门的各项监测工作，负责完成门诊和住院病例的标本采集，协助疾病预防控制机构开展病例个案调查。

### 六、数据收集、分析

#### (一) 数据收集内容：

1. 个案调查表(见附表 1)
2. 鼠情统计调查表(见附表 2)
3. 宿主动物带菌率调查表(见附表 3)
4. 实验室检测记录(见附表 4、5)

#### (二) 数据收集流程



#### (三) 统计分析内容

1. 发病数(例)、死亡数(例)、发病率(/10万)、病死率(%)和死亡率(/10万)
2. 病人年龄、性别、职业构成及各组发病率
3. 人群抗体阳性率、平均几何滴度
4. 菌群构成
5. 宿主动物种类、分布、密度、带菌率

### 七、监测系统质量控制

#### (一) 指导、培训与考核

各监测点所在省疾控中心根据工作需要，组织专业技术人员进行技术培训，并对各监测哨点的监测工作进行指导与考核。

#### (二) 个案调查表的核实工作



省级疾病预防控制中心负责对所报个案调查表至少抽样 30%进行核实，若病例数低于 30 例，则需要全部核实，抽样合格率不低于 90%；

### (三) 血清学试验的核实工作

省级疾病预防控制中心应对下级疾控中心的血清学试验结果进行复核，至少抽样 30% 进行检查，若病例数低于 30 例，则需要全部核实，抽样合格率不低于 90%。

### (四) 病原学试验的核实工作

中国疾病预防控制中心应对省级疾病预防控制中心所分离的钩体菌株进行鉴定。至少抽样 30% 对分型工作进行核实，抽样合格率不低于 90%。

### (五) 检查相关技术资料档案管理，原始记录，总结等

## 八. 附表及附件（钩体病）

附表 1 钩体病个案调查表

附表 2 钩体病监测——鼠情调查统计表

附表 3 钩体病监测——宿主动物带菌率调查表

附表 4 钩体病监测——病原学检测结果统计表

附表 5 钩体病监测——血清学检测结果统计表

附件 1 显微镜凝集试验 (MAT)

附件 2 间接酶联免疫吸附试验 (间接 ELISA)

附件 3 分离培养钩体方法

附表 1

### 钩体病个案调查表

编号: \_\_\_\_\_

□□□□□□

#### 一、基本情况

1. 患者姓名: \_\_\_\_\_ (如患者年龄<14岁, 则家长姓名: \_\_\_\_\_)
2. 性别: 1 男 2 女
3. 年龄: \_\_\_\_\_岁
4. 民族: 1 汉族, 2 壮族, 3 维吾尔族, 4 其他少数民族\_\_\_\_\_
5. 职业:
  - (1)幼托儿童(2)散居儿童(3)学生(4)教师(5)保育保姆(6)饮食从业人员
  - (7)商业服务(8)医务人员(9)工人(10)民工(11)农民(12)牧民
  - (13)渔(船)民(14)干部职员(15)离退人员(16)家务待业(17)其他
6. 所在单位: \_\_\_\_\_; 联系电话: \_\_\_\_\_
7. 家庭住址: \_\_\_\_\_省(自治区/直辖市)\_\_\_\_\_县(市区)\_\_\_\_\_乡(镇/居委会)\_\_\_\_\_村(街道)

#### 二、发病情况

1. 发病日期: \_\_\_\_\_年\_\_\_\_\_月\_\_\_\_\_日 2. 就诊日期: \_\_\_\_\_年\_\_\_\_\_月\_\_\_\_\_日
3. 发病地点: \_\_\_\_\_ 4. 住院医院: \_\_\_\_\_
5. 住院号: \_\_\_\_\_
6. 住院日期: \_\_\_\_\_年\_\_\_\_\_月\_\_\_\_\_日 7. 出院日期: \_\_\_\_\_年\_\_\_\_\_月\_\_\_\_\_日
8. 入院诊断:
  - 1 疑似钩体病, 2 钩体病, 3 其他\_\_\_\_\_
9. 入院诊断日期: \_\_\_\_\_年\_\_\_\_\_月\_\_\_\_\_日
10. 临床分型:
  - 1 流感伤寒型, 2 肺出血及肺弥漫性出血型, 3 黄疸出血型, 4 脑膜脑炎型, 5 肾型,
  - 6 胃肠型
11. 出院诊断:
  - 1 疑似钩体病, 2 钩体病(临床诊断), 3 钩体病(实验室确诊), 4 其他\_\_\_\_\_
12. 治疗情况:
  - 抗菌药物名称: \_\_\_\_\_首次使用时间: \_\_\_\_\_剂量: \_\_\_\_\_疗程 \_\_\_\_\_
  - 赫氏反应: 有\_\_\_,无\_\_\_ 是否用激素治疗: 是\_\_\_,否\_\_\_
13. 转归: 1 痊愈, 2 好转, 3 死亡(日期: \_\_\_\_\_年\_\_\_\_\_月\_\_\_\_\_日)

#### 三、症状和体征

发 热: 有\_\_\_ 无\_\_\_,最高体温: \_\_\_\_\_ 发热持续时间 \_\_\_\_\_

畏 寒: 有\_\_\_ 无\_\_\_, 全身肌痛: 有\_\_\_ 无\_\_\_

腓肠肌痛: 有\_\_\_ 无\_\_\_, 疲乏无力: 有\_\_\_ 无\_\_\_, 眼结膜充血: 有\_\_\_ 无\_\_\_

腓肠肌压痛: 有\_\_\_ 无\_\_\_, 浅表淋巴结肿大:有\_\_\_ 无\_\_\_,呕吐: 有\_\_\_ 无\_\_\_

腹痛: 有\_\_\_ 无\_\_\_,腹泻: 有\_\_\_ 无\_\_\_, 咳嗽: 有\_\_\_ 无\_\_\_, 咯血: 有\_\_\_ 无\_\_\_

皮肤巩膜黄染:有\_\_\_ 无\_\_\_, 鼻衄: 有\_\_\_ 无\_\_\_,皮肤出血点: 有\_\_\_ 无\_\_\_,

肝肿大: 有\_\_ 无\_\_, 脾肿大: 有\_\_ 无\_\_, 少尿: 有\_\_ 无\_\_,  
 血尿: 有\_\_ 无\_\_, 肾区疼痛: 有\_\_ 无\_\_, 头痛: 有\_\_ 无\_\_,  
 颈项强直: 有\_\_ 无\_\_, 抽搐: 有\_\_ 无\_\_, 瘫痪: 有\_\_ 无\_\_,  
 克布氏征阳性: 有\_\_ 无\_\_, 意识障碍: 嗜睡\_\_\_\_, 谵妄\_\_\_\_, 昏睡\_\_\_\_, 昏迷\_\_\_\_

#### 四、实验室检查

采集标本	检查项目	首次采样时间	首次检查结果	第二次采样时间	第二次检查结果
全血	白细胞计数				
	血培养				
血清	抗体测定				
尿	尿常规				
	尿培养				
脑脊液	脑脊液常规				

#### 五、接触史及有关因素调查

发病前1月内接触可疑疫水: 有\_\_, 无\_\_, 时间: \_\_年\_\_月\_\_日,  
 接触方式: 1. 田间劳动 2. 抗洪排涝 3. 游泳玩水 4. 捕鱼 5. 洗涤 6. 其它

发病前1月内是否接触鼠类: 1 是, 2 否, 9 不详

如是, 接触方式: 1 挖鼠洞, 2 拿鼠, 3 鼠咬, 4 鼠尿, 5 鼠粪,  
 6 鼠血污染手 7 手被鼠夹打伤 8 其他\_\_\_\_\_

发病前1月内是否接触其它动物及其排泄物: 1 是, 2 否, 9 不详

动物种类: 牛 猪 狗 鱼 青蛙 蛇 鸭

钩体病疫苗预防接种史: 1 有, 0 无, 9 不详

如有, 最近一次接种时间: \_\_\_\_\_年\_\_月\_\_日

接种剂量: \_\_毫升, 接种次数: \_\_次, 接种部位: \_\_\_\_\_

既往是否患过此病: 1 是, 0 否, 9 不详

如是, 诊断单位: \_\_\_\_\_, 时间: \_\_\_\_\_年\_\_月\_\_日

#### 六. 治疗情况:

是否用激素治疗: 是\_\_, 否\_\_, 所用抗菌药物: \_\_\_\_\_

治疗剂量: \_\_\_\_\_, 治疗天数\_\_\_\_\_, 治疗开始时间: \_\_\_\_\_年\_\_月\_\_日

调查单位: \_\_\_\_\_ 调查者: \_\_\_\_\_

调查日期: \_\_\_\_\_年\_\_月\_\_日

附表 2

## 钩体病监测——鼠情调查统计表

监测点名称：\_\_\_\_省\_\_\_\_市\_\_\_\_县

监测点编号：□□□□□□

捕鼠 时间	有效 布夹数	捕鼠 数	鼠密度(%)	鼠种构成(数量)						
				黑线姬鼠	褐家鼠	黄胸鼠	小家鼠			

填表时间：\_\_\_\_年\_\_\_\_月\_\_\_\_日

填表人：\_\_\_\_\_

单位(盖章)：\_\_\_\_\_

附表 3

## 钩体病监测——宿主动物带菌率调查表

监测点名称：\_\_\_\_省\_\_\_\_市\_\_\_\_县

监测点编号：□□□□□□

动物名称	有效培养数	阳性数	阳性率(%)
黑线姬鼠			
褐家鼠			
黄胸鼠			
小家鼠			
牛			
猪			
犬			
青蛙			
合计			

填表时间：\_\_\_\_年\_\_月\_\_日

填表人：\_\_\_\_\_

单位(盖章)：\_\_\_\_\_

附表 4

钩体病监测——病原学检测结果统计表

监测点名称：\_\_\_\_\_省\_\_\_\_\_市\_\_\_\_\_县

监测点编号：□□□□□□

标本名称	标本数量	检查方法	检测结果		菌群及数量	备注
			阳性数	阳性率(%)		
病人血液						
病人尿液						
黑线姬鼠						
褐家鼠						
黄胸鼠						
小家鼠						
牛						
猪						
犬						
青蛙						

填表时间：\_\_\_\_\_年\_\_月\_\_日

填表人：\_\_\_\_\_

单位(盖章)：\_\_\_\_\_

附表 5

## 钩体病监测——血清学检测结果统计表

监测点名称：\_\_\_\_省\_\_\_\_市\_\_\_\_县

监测点编号：□□□□□□

年龄组		检测数量	检测结果														
			56601	56602	56603	56604	56605	56606	56607	56608	56609	56610	56612	56613	56615	56635	56655
10~	阳性数																
	GMT																
20~	阳性数																
	GMT																
30~	阳性数																
	GMT																
40~	阳性数																
	GMT																
50~	阳性数																
	GMT																
合计	阳性数																
	GMT																

填表时间：\_\_\_\_年\_\_月\_\_日

填表人：\_\_\_\_\_

单位（盖章）：\_\_\_\_\_

## 显微镜凝集试验(MAT)

### 1. 抗原的选择和制备

将我国 15 群 15 型钩端螺旋体代表株于 Korthof 培养基中,28℃培养 5~7 天,暗视野显微镜检查,每 400 倍暗视野下不少于 50 条,运动活泼并无自凝者可作显凝抗原。

### 2. 操作方法

血清 56℃水浴灭活 30 分后,用生理盐水稀释,健康人以 1:10、早期病人以 1:50、恢复期病人以 1:100 开始,做倍比稀释。取 15 个代表株的培养液依次加入倍比的稀释血清孔。摇匀后 37℃孵育 1.5~2h。用接种环挑取反应液及对照,放置载物玻片上暗视野显微镜下观察凝集情况,测定其凝集滴度。凝集滴度按原血清稀释倍数 $\times 2$  计算。

### 3. 终点凝集滴度的判定

以出现 ++ 凝集(即视野中 50%钩体凝集)的血清最高稀释度作为终点凝集滴度。



## 间接酶联免疫吸附试验(间接 ELISA)

## 1. 操作步骤:

1.1 血清用 PBS 稀释液按 1:400、1:800、1:1600、1:3200 稀释。

1.2 取包被钩体抗原的酶标板，将稀释好的阳性血清、阴性血清及样本血清分别加入酶标板孔中，每孔 100 $\mu$ l，同时加入 2 孔空白对照(PBS)。37 $^{\circ}$ C 60 分钟，弃去孔中液体。

1.3 洗板，于酶标板每孔加入洗涤液 250 $\mu$ l，洗板 3 次。

1.4 每支酶标羊抗人 IgG 用 0.5ml 三蒸水充分溶解均匀后，再用 PBS 按 1:50 稀释，每孔加稀释好的酶结合物 100 $\mu$ l。放置 37 $^{\circ}$ C 40 分钟。

1.5 洗板：洗板 4 次(方法同 1.3)。

1.6 显色与终止：加底物液 A、底物液 B 各 1 滴。室温避光显色，10 分钟后，每孔加终止液 1 滴，终止反应。

1.7 采用波长 405nm 的酶标仪测定 OD 值，阴性 OD 值 $\times$ 2.1 作为判定界值。检测样本的 OD 值 $\geq$ 此判定界值则为阳性。

## 2. 试剂配制:

## 2. 1 洗涤液(PBST, pH7.4):

NaCl	8.0g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	2.9g
KCl	0.2g
Tween 20	0.5ml
硫柳汞	0.1g
D <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O 至	1000ml

## 2. 2 稀释液(PBS, pH7.4):

NaCl	8.0g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	2.9g
KCl	0.2g
硫柳汞	0.1g
D <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O 至	1000ml

2. 3 底物液 A(0.1M 柠檬酸-0.2M 磷酸氢二钠缓冲液, 0.06%过氧化氢脲, pH 5.0-5.4)

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	36.82g	9.2g
柠檬酸·H <sub>2</sub> O	10.21g	2.55g
过氧化氢脲	0.6g	0.15g
D <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O 至	1000ml	250ml

2. 4 底物液 B(3、3`、5、5`-四甲基联苯胺, TMB, 作用时终浓度 0.1mg/ml)

2. 4. 1 TMB 贮存液

TMB 贮存液(50mg/ml)

TMB 150mg

二甲基亚砷 3ml

注意事项: TMB 不易溶解, 缓慢加入二甲基亚砷中并不断摇晃或搅拌, 水浴适当加热可加速溶解。

2. 4. 2 底物液 B

柠檬酸·H <sub>2</sub> O	1.05g	0.263
EDTA-Na <sub>2</sub> (EDTA)	0.146g	0.0365g
D <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O 至	1000ml	250ml
TMB 贮存液(50mg/ml)	4ml	1ml

2. 5 终止液: 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

## 1 培养基制备方法

### 1.1 Korthof 培养基成分和制备方法

#### 1.1.1 成分

蛋白胨(可用胰蛋白胨代替) 400mg

氯化钠(NaCl) 700mg

氯化钾(KCl) 20mg

碳酸氢钠(NaHCO<sub>3</sub>) 10mg

磷酸二氢钾(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 120mg

碳酸氢二钠(12 个结晶水)(Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub> · 12H<sub>2</sub>O) 440mg

氯化钙(CaCl<sub>2</sub>) 20mg(如高压灭菌或煮沸后出现沉淀, 可省去此成分)

蒸馏水 500ml

#### 1.1.2 制法

1.1.2.1 将以上成分溶于蒸馏水中煮沸 20min 过滤, 校正 pH 为 7.2, 分装于烧瓶内, 每瓶 100ml, 15 磅 30min 高压灭菌。

1.1.2.2 兔血清 56℃ 30min 灭活。

1.1.2.3 将 1.1.2.1 液以无菌操作加入灭活兔血清最后浓度为 8~10%。

### 1.2 Терск или 培养基(磷酸盐缓冲溶液)成分和制备方法

母液 1/15mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 12g/500ml 蒸馏水

磷酸缓冲液 1/15mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4.5g/500ml 蒸馏水

取 1/15mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 80ml、1/15mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20ml, 混匀, 调整 pH7.2~7.4, 加入蒸馏水 900ml 混匀, 分装试管, 并用 15 磅 30min 高压灭菌, 再以无菌操作加入灭活兔血清最后浓度为 8~10%。

## 2 培养分离病原体

### 2.1 病人血液培养:

采集早期病人血液, 无菌操作接种于 2~3 管 Korthof 培养管中, 每管接种 1~3 滴。血培养管置 28℃ 培养。每隔 5~7d 取培养物暗视野显微镜下观察有无钩端螺旋体生长, 若有生长, 即为分离阳性。若未见生长, 需继续培养 60d, 仍不见钩端螺旋体方作阴性处理。

### 2.2 病人尿液培养:

接取病后两周以上的病人中段尿 30~50ml 于无菌离心管中 3500~4000r/min 离心 1h。取沉渣 0.3~0.5ml 接种于 2~4 管上述培养基中，28℃ 孵育。每隔 5~7d 取材镜检。为提高检出率和减少污染，可在采集尿标本的前一天晚上给病人服碳酸氢钠(NaHCO<sub>3</sub>)2~4g，同时，在培养基中加入 100~400μg/ml 5-氟脲嘧啶或 1/2000 的磺胺嘧啶。

### 2.3 动物肾脏培养：

无菌操作，采集新鲜动物肾脏(包膜完整)，剪取米粒大小接种于 2~3 管 Korthof 培养管中。置 28℃ 培养。每隔 5~7d 取培养物暗视野显微镜下观察有无钩端螺旋体生长，若有生长，即为分离阳性。若未见生长，需继续培养 60d，仍不见钩端螺旋体方作阴性处理。

### 3. 菌株分群、分型：

应用分群血清与新分离的钩端螺旋体作凝集试验，确定菌群。应用交叉凝集素吸收试验或分型因子血清来确定菌型。