

全国病媒生物监测技术指南

中国疾病预防控制中心

2025 年 4 月

目 录

第一部分 总则	1
一、监测类群与方法	1
二、监测频次、时间	1
三、个人防护和生物安全	1
四、数据收集、上报与分析反馈	2
五、质量控制	3
六、数据上报	5
第二部分 生态学监测	8
第一章 鼠类监测	8
一、常规监测	8
二、应急监测	9
三、统计与计算	11
四、质量控制	12
第二章 蚊虫监测	21
一、常规监测	21
二、应急监测	23
三、统计与计算	25
四、质量控制	26
五、附表及附录	27
第三章 蜚类监测	38
监测生境	38
二、监测时间	38
三、监测方法	38
四、统计与计算	40
五、标本保存	41

六、个人防护及其他注意事项	41
七、质量控制	42
八、附表及附录	45
 第四章 恙螨监测	52
一、监测生境	52
二、监测时间	53
三、监测方法	53
四、数据填报、统计与计算	55
五、质量控制	56
六、附表及附录	57
 第五章 其他病媒生物监测	61
一、蟑螂监测	61
二、臭虫监测	65
三、蝇类监测	72
 第三部分 抗药性监测	82
一、常规监测	82
二、蚊虫化学控制效果应急评估	87
 第四部分 病原学监测	103
 第一章 鼠传病原监测	103
一、监测对象	103
二、监测时间	104
三、监测方法	104
四、数据上报	112
五、质量控制	113
六、附表及附录	119
 第二章 蚊传病原监测	122

一、监测点.....	122
二、监测对象.....	122
三、监测时间.....	123
四、监测方法.....	124
五、数据上报.....	130
六、质量控制.....	131
七、附表及附录.....	136
 第三章 蜱传病原监测	141
一、监测点.....	141
二、监测对象.....	141
三、监测时间及样本数量	142
四、监测方法.....	142
五、数据上报.....	148
六、质量控制.....	149
七、附表.....	150

第一部分 总则

为贯彻落实《全国病媒生物监测方案（2024 版）》，指导各地做好病媒生物监测工作，中国疾病预防控制中心制定了《全国病媒生物监测技术指南》（以下简称《技术指南》）。

一、监测类群与方法

《技术指南》对于国家级监测点病媒生物生态学、抗药性和病原学监测方法要求见表 1-1。

二、监测频次、时间

《技术指南》对国家级监测点病媒生物生态学监测、抗药性监测和病原学监测的频次、时间要求见表 1-2。在本地媒介生物传染病流行季节，应适当加大监测频次，延长监测时间，以便掌握实时的病媒密度数据，指导当地媒介生物传染病的防控。

三、个人防护和生物安全

（一）个人防护

在鼠、蟑和恙螨监测的现场工作过程中，要进行必要的个人防护，防止被体表寄生虫叮咬，或通过与鼠的密切接触感染病原体。在蚊媒传染病流行区进行蚊虫监测时，需要采取必要的防蚊叮咬措施，以免被带毒蚊虫叮咬。做抗药性监测过程中，要避免杀虫剂的吸入和接触。

（二）生物安全

在实验室开展鼠的解剖、蜱的鉴定，以及鼠、蚊和蜱的病原学检测时，需要遵照相关实验室生物安全的规定，在生物安全实验室中开展相关的工作。

四、数据收集、上报与分析反馈

（一）数据收集与上报

承担监测任务的单位负责调查、收集和整理辖区内的病媒生物及病原监测数据，在每次监测工作结束后的 5 个工作日内将监测数据通过全国病媒生物监测系统上报。各省、市级疾控机构对下级机构上报的监测数据完整性和科学性进行逐级审核，如发现问题，通过网络报告系统直接退回，并通过电话逐级通知数据报送单位。数据报送单位在 2 日内对数据核实或解释，并重新上报监测数据。承担监测任务的单位原始监测记录至少保留 5 年。

（二）数据分析与利用

各级疾控机构在病媒生物活跃季节、病媒生物相关传染病流行季节要及时汇总分析本辖区内的监测数据，根据历年同期病媒生物监测结果和本地媒介生物传染病流行情况，定期或适时开展病媒生物及相关传染病的风险评估和预测预警，形成风险评估报告，报送上级疾控机构及同级卫生行政部门，并向下级疾控机构反馈，提出病媒生物防控工作建议，指导当地开展相关防控工作。在当地发现未记录的重要病媒生物种类需及时报上级疾控机构，并保留标本以便复核。

（三）数据和标本的共享

生态学监测获得的病媒生物样品，应与抗药性监测和病原学监测工作共享。病原学监测数据应及时通报传染病防控相关部门，并及时

将可能含有相关病原的标本转运至当地疾控机构病原鉴定实验室核实检测，发现重要的病原时，应送往上级疾控机构病原学鉴定部门核实检测评估，以便进行深入分析和开展流行病学处置。如果监测点所在地市疾控中心属于国家致病菌识别网络实验室，在病媒生物中检出病原细菌阳性后，应纳入国家致病菌识别网进一步开展病原分离和特征分析。

（四）新发现的病媒生物和病原体的复核和处置

在省内第一次监测发现重要病媒生物、新病原体或病原体新亚型时，监测点应妥善保存相关样本和完善相关信息，在 24 小时内向上级疾控中心报告，省级疾控中心核实检测、评估后，应在 24 小时内向国家疾控中心报告，并将相关信息和样本统一报送国家疾控中心复核、评估，明确处置策略和措施。

疑似细菌相关样本送至中国疾病预防控制中心传染病所，疑似病毒相关样本送至中国疾病预防控制中心病毒病所，并电话通知中国疾病预防控制中心传染病处。

五、质量控制

（一）技术培训。

中国疾病预防控制中心、各省级疾病预防控制中心和地市级疾病预防控制中心要做好监测工作的技术指导，定期组织专业技术人员的技术培训，保证基层专业人员掌握监测目的和监测技术，能按监测方案要求完成监测工作。

（二）现场质控。

生态学监测工具须选择较为敏感的产品，长时间内连续使用。针对一类监测对象，建议一个区域内持续采用统一产品，以保证监测数据在时间和空间上的可比性。

各地在组织开展病媒生物监测工作时，应加强监测工作的过程管理，留存必要的工作照，填写工作记录表，并做好工作照及工作记录表的留存归档。

（三）实验室质控。

承担监测任务的单位应具有较完善的质量管理体系，实验室空间布局、生物安全等级、杀虫剂和危险化学品管理设施、仪器设备、技术人员队伍应与所承担任务相适合。

开展生态学监测的单位应具备病媒生物分类鉴定、标本制作和保存的空间和硬件条件，具备鼠类标本解剖和样品短期低温保存的条件。人员经过充分的监测技术和常见种类分类鉴定培训，保证监测数据的准确性。

开展抗药性监测的单位应具备试虫饲养、抗药性测定的空间和硬件条件。应按照规范的操作程序开展试虫采集和检测工作。试虫密度、饲养室温湿度和光照条件应维持在稳定的指标范围，保证试虫正常发育达到个体重量的指标。测试过程中，要监测并控制测试环境的温湿度，保证试虫在正常环境中进行测试，获得准确的数据。

开展病原学监测的单位应具备相关检测必需的相应生物安全等级实验室、必要的仪器设备、合格的技术人员队伍，具备样本采集、处理、运输保藏和规范检测能力。应建立样本采集、处理、运输、保藏和检测的标准操作程序，从事相关检测人员应定期接受实验室检测技术和生物安全培训，实验室应定期开展内部质量控制评价和实验室间质量评价活动，每年至少参加 1 次室间质量评价活动。在新建和修改病原检测实验流程时，应接受上级疾控机构技术培训，通过省级和/或国家疾控中心组织的能力考核。省级和国家疾控中心应做好病媒生物病原学监测的技术培训和指导工作，定期组织开展能力考核，随

机抽取检测阳性样本和阴性样本开展复核检测，抽样复核率应不少于检测样本量的 5%。如果每种病原检出阳性样本数少于 10 份时，应全部开展复核检测。

中国疾病预防控制中心传染病预防控制所和病毒病所共同组织全国监测单位的病原检测能力的室间质量评价。

六、数据上报

病媒生物生态学、抗药性及病原学监测数据，上报至中国疾病预防控制中心全国重要病媒生物监测系统

（<https://121.36.60.127/cas/login>）相应模块。监测总结上报至中国疾控中心。

表 1-1 国家级监测点不同病媒生物监测要点

监测内容	监测类群	常规监测	应急监测
生态学 监测	鼠	夹（笼）夜法或粘鼠板法（室内）	盗食法、路径法
	蚊	媒介伊蚊分布区必选：诱蚊灯法、双层叠帐法、 布雷图指数法、勺捕法 非媒介伊蚊分布区必选：诱蚊灯法、勺捕法	路径法、布雷图指数法 诱蚊灯法、栖息蚊虫捕捉法、双层叠帐法
	蝇	/	粘捕法、目测法
	蜚	体表检蜚法和布旗法	/
	恙螨	鼠体恙螨采集法	/
抗药性 监测	蚊	幼虫采用浸渍法，成虫采用接触筒法	幼虫采用浸渍法，成虫采用挂笼法、圆筒法
	家蝇	点滴法	/
	蟑螂	药膜法	/
病原学 监测	鼠	核酸检测	/
	蚊	核酸检测	/
	蜚	核酸检测	/

表 1-2 不同病媒生物的监测频次、时间及数据上报要求

监测类群	监测频次	监测时间	上半月		下半月		数据报至国家疾控中心时间
			上旬	中旬	下旬		
鼠	1 次/2 个月	单月		鼠		5 个工作日内	
成蚊	2 次/月	活动期每半月	成蚊		成蚊	5 个工作日内	
幼蚊	1 次/月（勺捕法）	活动期每月		幼蚊		5 个工作日内	
	2 次/月（布雷图指数法）	活动期每半月	媒介伊蚊幼虫		媒介伊蚊幼虫	5 个工作日内	
蜚	≥4 次/年	4、5、7、9 月，可微调，长江以南地区 10-12 月增加 1 次	蜚		3 月可在下旬	5 个工作日内	
恙螨	≥3 次/年	北方 9/10/11 月，南方 5/7/9 月、东北 5/9/10 月		恙螨		5 个工作日内	
抗药性	蚊 1 次/1 年 蝇和蟑 1 次/2 年	蚊、蝇活动期 蟑螂全年	（无要求）			蚊：9 月 30 日之前 蝇、蟑螂：10 月 30 日之前	
鼠传病原	1 次/2 个月	全年	每 2 月检测 1 次			5 个工作日内	
蚊传病原	≥4 次/年	各地蚊虫活动月	每月检测 1 次			5 个工作日内	
蜚传病原	≥4 次/年	各地蜚虫监测月	每月检测 1 次			5 个工作日内	

第二部分 生态学监测

第一章 鼠类监测

一、常规监测

（一）监测生境的选择

夹夜法或笼夜法的监测在每个县（区）设城镇居民区、重点行业（餐饮、食品制售、建筑工地、屠宰场、酿造厂等）、农村居民区3个类型的监测生境各1个。各地可根据本地鼠传疾病（如流行性出血热）流行情况和本地条件增加农田、林地等生境，掌握重要鼠种的密度变化情况。城镇居民区生境选择当地居住条件和环境卫生较差的城中村、城乡结合部等有适宜鼠类生存的室外生境。

粘鼠板法作为夹（笼）夜法监测的替代方法，主要用于居民室内的鼠密度监测。

国家级监测点所在地市需至少2个县（区）参加监测工作，原则上须采用夹（笼）夜法，室内环境布放鼠夹有困难时，可以使用粘鼠板法。

由于采用夹（笼）夜法和粘鼠板法也是灭鼠措施，可在一定时间内，降低监测地点鼠密度，影响监测结果，所以各地应结合本地情况，确定监测地点的范围，不同月份应在监测点内的不同区域进行监测，以免连续监测对鼠密度造成影响。因此三个月内不得在同一区域实施监测，不同月份选取的监测区域之间距离应大于250m。

（二）监测时间

夹（笼）夜法和粘鼠板法的监测至少每两月（单月监测）监测一次，每监测月中旬开展监测，两次监测时间间隔不小于30天。路径法

作为夹（笼）夜法替代，监测时间同上。各地也可以根据当地灭鼠工作需求开展工作。

（三）监测方法

夹（笼）夜法：建议统一选用质量可靠稳定的中型钢板夹和鼠笼（见附录 2-1），以各地便于获得的材料为诱饵长期使用，晚放晨收。室内按每 15m² 布夹（笼）1 只，超过 100m² 的房间沿墙根每 5m 布夹（笼）1 只。重点行业以室内环境为主，各种房间（厨房、库房）均应兼顾，农村居民区室内外均匀布放。室外布放在鼠类出没的地方。农田沿直线或田埂、沟渠等自然地形每 5m 布放 1 只，行间距不少于 50m。每一监测生境每月布夹累计不少于 200 有效夹（笼）夜。捕获鼠类后，逐只鼠登记并顺序编号，每个监测县（区）每年监测的序号不得重复。进行鼠种鉴定，并同时记录性别等信息，鼠尸不完整而无法鉴定种类的，填入其它并在记录表中备注中注明。填写记录表（见表 2-1）和汇总表（见表 2-4）。

粘鼠板法：室内环境布放鼠夹有困难时，可以使用粘鼠板法。粘鼠板胶面 15cm×20cm。布放时将粘鼠板展开，靠墙或鼠类经常活动、栖息的场所布放，不需要诱饵。应避免放置在阳光直射、淋水和地面潮湿的场所，并防止尘土等污物对粘鼠板的污染。民房室内每 15m² 放 1 张，每户布放不超过 3 张，监测不少于 35 户。捕获鼠类后，计数捕鼠数量和鉴定鼠种，并尽量记录性别等特征信息，无法鉴别性别的请在备注中注明（见表 2-1，汇总表见表 2-4）。

二、应急监测

（一）应急监测的启动

发生地震、洪灾等自然灾害后，受灾人员需要大规模集中安置时；或当地卫生疾控行政部门要求时，需要开展鼠密度应急监测。

（二）监测生境的选择

安置点和居民区室内、餐食加工场所、库房、垃圾站和主要道路两侧。

（三）监测方法

如果在自然灾害后，缺少常规监测所需的鼠密度监测工具，可根据 GB/T 23798-2009《病媒生物密度监测方法 鼠类》选择合适的监测方法，如盗食法和路径法等进行监测，以获得当地鼠密度数据。其他情况下，采用常规监测的方法开展应急监测，以获得更有可比性的数据。

盗食法：采用当地可获得的便于切块的食物，如火腿肠、红薯、苹果等作为饵料切成规则的饵块。在灾民安置点外环境每 10m 放置 1 个鼠饵盒，盒内放置数量一致的饵块。帐篷内和居民区室内每户放置 1 个鼠饵盒。鼠饵盒总数不少于 100 个。布放过程中做好记录和宣传，避免居民清理或取食饵块。第二天检查饵块被取食情况，并做记录。

路径法：沿选择的线路如公路或铁路两侧、河湖两岸或公共绿地行走，仔细搜索并记录行走距离内发现的鼠洞、活鼠、鼠尸、鼠粪、鼠道、鼠爪印、鼠咬痕等鼠迹的处数，填写记录表（见表 2-2，汇总表见表 2-4）。合计检查单位 20 个以上，总调查路径 2000m 以上。

（四）监测时间和频率

在安置点和居民区安置初期，每周开展 1 次；1 个月以后，2 周开展 1 次，直至转入常规监测状态。

三、统计与计算

（一）夹（笼）夜法鼠密度以每百只鼠夹（笼）捕获鼠数量，即捕获率表示，计算公式如下：

$$\text{捕获率} = \frac{\text{捕鼠总数（只）}}{\text{有效夹（笼）总数（只）}} \times 100\%$$

有效夹（笼）数=布夹（笼）总数-无效夹（笼）数

无效夹（笼）是指丢失或不明原因击发的鼠夹（笼）

捕鼠总数是指鼠夹（笼）捕获鼠类的数量总和，鼠夹上夹有完整鼠或鼠头、鼠皮、鼠毛、鼠尾、鼠爪等部分肢体的定为捕到鼠，计入捕鼠总数。

（二）粘鼠板法鼠密度以每百张粘鼠板捕获鼠数量，即捕鼠率表示，计算公式如下：

$$\text{捕获率} = \frac{\text{捕鼠总数（只）}}{\text{有效粘鼠板数（块）}} \times 100\%$$

捕获鼠数要求同夹（笼）夜法。

有效板数=布放粘鼠板总数-无效粘鼠板数

无效粘鼠板指丢失或水淋及尘土污染导致失效的粘鼠板。

（三）盗食法鼠密度以每百堆有效饵料中被取食的饵料数，即盗食率表示，计算公式如下：

$$\text{盗食率} = \frac{\text{阳性饵料数（处）}}{\text{有效饵料数（处）}} \times 100\%$$

（四）路径指数法鼠密度以每千米发现的鼠迹数量，即路径指数表示，计算公式如下：

$$\text{路径指数} = \frac{\text{鼠迹数（处）}}{\text{检查距离（千米）}}$$

四、质量控制

（一）现场质控

1. 监测工具的选择

监测工具要选择便于使用、相对灵敏、质量稳定、使用安全的鼠夹、鼠笼和粘鼠板。

2. 监测生境及场所的选择

鼠类生态学监测中，监测场所的选择要在符合相应生境的基础上，具有一定的代表性，能体现当地城乡卫生条件的不同层次，体现当地真实的家栖鼠和主要鼠传疾病宿主鼠种密度的时空变化。

（二）实验室质控

1. 标本的包装和运输

捕获的鼠类标本，应当单只置于鼠布袋中（一次性无纺布袋即可），并标注捕获地点信息。并尽快以4℃条件运输至实验室进行下一步工作，减少反复冻融的次数。

2. 鼠种鉴定

根据鼠类标本的外部形态特征，结合当地鼠种的分布情况，进行鼠种的准确鉴定。如果有形态比较特殊的个体，可以通过分子鉴定技术进行准确鉴定（相关引物和方法见附录2-3），也可以拍摄照片后通过网络寻求专家的支持，减少鉴定结果中不确定种类标本的上报数量。

五、附表及附录

表 2-1 鼠密度监测记录表（夹/笼/粘鼠板法）

表 2-2 鼠密度监测记录表（盗食法）

表 2-3 鼠密度监测记录表（路径法）

表 2-4 鼠密度监测汇总表

附录 2-1 鼠夹和鼠笼规格要求

附录 2-2 监测相关器材和耗材

附录 2-3 鼠类分子鉴定方法

表 2-1 鼠密度监测记录表（夹/笼/粘鼠板法）

调查时间：_____年_____月_____日； 诱饵：_____

调查地点：_____省（自治区、直辖市）_____地（市）_____县（区）_____街道
（乡）

调查生境：☐居民区；☐特殊行业；☐农村自然村；☐其他：_____

室内布夹（笼/粘鼠板）总数：_____；室内有效夹（笼/粘鼠板）数：_____

室外布夹（笼）总数：_____；室外有效夹（笼）数：_____

捕鼠数：_____；鼠密度：_____%

序号	捕鼠地点	鼠种	雌	雄	室 内	室 外	捕鼠 方法	备注

注：每个生境填写 1 张表格。

监测单位：_____ 监测人：_____ 审核人：_____

表 2-2

鼠密度监测记录表（盗食法）

调查时间：_____年_____月_____日； 诱饵：_____

调查地点：_____省（自治区、直辖市）_____地（市）_____县（区）_____街道
（乡）调查生境：☐安置点；☐居民区；☐农村自然村；

室内饵料总数：_____；室内有效鼠饵数：_____

室外饵料总数：_____；室外有效饵料数：_____

鼠密度：_____ %

户主	门牌号	鼠饵编号	回收情况

监测单位：_____ 监测人：_____ 审核人：_____

表 2-3 鼠密度监测记录表（路径法）

_____年_____月_____日

_____省（自治区、直辖市） _____地（市） _____县（区）

检查生境	检查单位	检查距离 (千米)	鼠迹数	备注
合计				

监测单位：_____ 监测人：_____ 审核人：_____

表 2-4

_____省/市/县_____年____月鼠密度监测汇总表

□夹/ □笼夜 法	布夹环境	有效夹/ 笼数	捕鼠数	捕获率 (%)	褐家鼠	黄胸鼠	小家鼠	黑线姬鼠	黄毛鼠	其它	
	城镇居民区										
	农村居民区										
	重点行业										
	其他 ()										
	合计										
粘鼠板 法	布夹环境	有效板 数	捕鼠数	捕获率 (%)	褐家鼠	黄胸鼠	小家鼠	/	/	其它	
	城镇居民区										
路径法	单位类型				检查距离		鼠迹数		阳性率		备注
	公共绿地、公园或道路两侧										
	垃圾中转站或公共厕所										
	单位或居民区院内										
	农贸市场、工地、车站										
	合计										

监测单位：_____ 填表人：_____ 审核人：_____

附录2-1

鼠类生态学监测工具规格要求

鼠夹：中号钢板夹（12cm×6.5cm），大号钢板夹（12cm×8cm），触发灵敏，使用产品最好有延续性。

鼠笼：可折叠铁丝鼠笼（24cm×11cm×11cm）。

粘鼠板：胶面 15cm×20cm。

附录 2-2

鼠类生态学监测相关器材和耗材

现场工作

鼠夹（中号、大号）、粘鼠板、鼠笼、鼠布袋或一次性无纺布布袋、诱饵（生花生米、面粉和食用油等、油饼等）、泡沫保温箱。

实验室工作

麻醉剂（乙醚或异氟烷）、麻醉箱（透明整理箱，用于鼠笼捕获鼠麻醉）、黄色垃圾袋（用于鼠夹捕获鼠麻醉）、脱脂棉球。

钢尺、0.1~1000g 电子天平，白瓷盘，眼科镊和眼科剪（多套）、中号手术剪、大号手术剪、1.5ml 冻存管、记号笔。

分子鉴定所用引物

线粒体细胞色素氧化酶亚基 I (COI) 片段引物:

5'-CCTACTCRGCCATTTTACCTATG-3', 5'-ACTTCTGGGTGTCCAAAGAATCA-3'。

该引物对于鼠科的种类扩增效率较高, 对于松鼠科的扩增效果较差。

线粒体细胞色素 b 基因 (cytb) 引物:

5'-GGACTTATGACATGAAAAATCATCGTTG-3', 5'-GATTCCCCATTTCTGGTTTACA AAC-3'。该引物能扩增大部分种类的细胞色素 b 基因完整阅读框, 扩增效率较高。

分子鉴定所需组织

分子鉴定因为是扩增线粒体基因组的基因片段, 所以用肝脏和骨骼肌最好。解剖时取 1 克左右组织样品, 用 3 倍以上体积的无水酒精进行浸泡一周后可以较长时间保存, 也可以去除酒精后快递运输。

DNA 提取、扩增和测序

提取 DNA 时, 按 DNA 提取试剂盒说明书进行操作。提取 DNA 后, 按普通 PCR 流程进行扩增, 并对扩增产物进行常规测序。

序列比对和鼠种鉴定

将获得的序列在 Genbank 中进行检索

(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 常见种一般都能检索到对应的物种信息。

第二章 蚊虫监测

一、常规监测

成蚊监测采用诱蚊灯法，媒介伊蚊分布区增加双层叠帐法；幼蚊监测采用勺捕法，媒介伊蚊分布区须增加布雷图指数法。

（一）监测生境

诱蚊灯法在每个县（区）设城镇居民区、公园（含街心公园）、医院各不少于 2 处，农村选择民房、牲畜棚（牛棚、猪圈、羊圈、养殖场等）各不少于 2 处。

双层叠帐法在每个监测县（区）选择居民区、公园/竹林、旧轮胎堆放地/废品站/工地等三类生境各不少于 1 处，每处不少于 2 个帐次，两帐间隔 50m 以上。

布雷图指数法在每个监测县（区）按不同地理方位选 4 个街道/村的居民区等，不少于 100 户，其它生境[医院、公园（含街心公园）、工地、废品收购站和废旧轮胎厂（废旧物品处）、港口/码头等]视各地实际情况选择。

勺捕法在每个监测县（区）选择户外人居环境周边大中型水体不少于 10 处[如积水农田（稻田）、河流、湖泊、池塘、水坑、水渠等可能有媒介蚊虫孳生的水体]，且监测县（区）当地主要水体类型每种不少于 3 处。

各地根据本地蚊媒传染病流行情况、蚊媒孳生情况和本地环境条件可以适当增加生境。城镇居民区生境选择当地居住条件和环境卫生较差的城中村、城乡结合部等适宜蚊媒孳生，且蚊媒防护条件弱的环境；农村环境选择居住人口数量相对较多的村落。

（二）监测时间

诱蚊灯法、双层叠帐法和布雷图指数法的监测在蚊虫活动季内每月开

展不少于 2 次监测工作，相邻两次的测定时间间隔不少于 10 天，风力五级以上顺延。勺捕法监测在蚊虫活动季节内每月中旬监测一次。

（三）监测方法

诱蚊灯法：选择统一工具为诱蚊灯（见附录 3-1），白天布灯，选择远离干扰光源和避风的场所作为挂灯点，每处监测生境放置诱蚊灯一台，光源离地 1.5m。日落前 1h 接通电源，开启诱蚊灯诱捕蚊虫，直至次日日出后 1h。密闭收集器后，再关闭电源，将集蚊袋取出，乙醚麻醉或冰箱冷冻处死，鉴定蚊虫种类、性别并计数。分别将每台灯每晚的监测结果填入数据记录表（见表 3-1）和汇总表（见表 3-6）。

双层叠帐法：选择伞状双层叠帐或方形双层叠帐（见附录 3-2），在媒介伊蚊活动高峰时段（参考时段 15:00-18:00），选择避风遮荫处放置双帐，双帐放置点避开周围干扰人群，诱集者位于内部封闭蚊帐中暴露两条小腿持续 30min 诱蚊，之后利用电动吸蚊器收集停落于两层蚊帐之间的伊蚊，或者由另一收集者在诱蚊的同时利用电动吸蚊器收集停落于两层蚊帐之间的伊蚊，将捕获蚊虫用乙醚麻醉或冰箱冷冻处死，鉴定种类、性别并计数，填入记录表（见表 3-2）和汇总表（见表 3-6）。

布雷图指数法：按不同地理方位选 4 个街道/村的居民区等调查合计不少于 100 户，其它生境[医院、公园（含街心公园）、工地、废品收购站和废旧轮胎厂（废旧物品处）、港口/码头等]视各地实际情况选择。检查记录户内外所有小型积水容器（积水）及其幼蚊孳生情况，收集蚊虫阳性容器（积水）中的幼蚊进行种类鉴定，或带回实验室饲养至成蚊进行种类鉴定，计算布雷图指数，监测结果填写记录表（见表 3-3）和汇总表（见表 3-6）。户的定义：每个家庭（含有院落家庭）、临街商铺、集体宿舍/单位办公室/酒店的 2 个房间、农贸市场、花房等室内公共场所及外环境等以积水（含容器积水）为

中心每 30 m²为一户。

勺捕法：沿着大中型水体岸边，每隔 10m 选择一个采样点，每个水体共捞 10 勺（水体面积确实不足捞 10 勺时，记录实际捞勺数，但不得少于 5 勺），用水勺迅速沿水体边缘或有水草缓流处舀起一勺水，吸出幼蚊（蛹）并放入已编号的采样管中，对蚊虫进行收集、分类和计数，并填写记录表（见表 3-4，汇总表见表 3-6）。

二、应急监测

（一）应急监测的启动

发生蚊媒传染病暴发流行；自然灾害，如地震、洪涝灾害等；经研判可构成重要影响的其他情况，包括我国尚未发现的输入性蚊媒传染病发生、我国尚未发现的重要蚊虫传入、重要蚊虫密度达到相应的暴发阈值，以及其他政府指定的紧急状态等情况。

（二）监测生境

蚊媒传染病（登革热）流行期间，依据风险区域确定核心区、警戒区和监控区；自然灾害后的安置点帐篷内、居民区室内、公共卫生间等；其他应急情况依据实际进行确定。

（三）监测方法

按照 GB/T 23797 选择适当方法进行蚊虫密度调查。蚊媒病流行期间使用双层叠帐法和布雷图指数法；自然灾害后成蚊可选用栖息蚊虫捕捉法，蚊幼可选用路径法；其他应急情况依据实际选择方法。

（1）双层叠帐法：技术方法参照常规监测。

（2）栖息蚊虫捕捉法：依据不同蚊种的生态习性，选择蚊虫栖息时间

及蚊虫栖息场所，在手电筒的照明下，使用电动吸蚊器捕获栖息的蚊虫，每次 15 min。然后对蚊虫进行收集、分类和计数，并填写记录表（见表 3-5）。

（3）布雷图指数法：技术方法参经常规监测。

（4）路径法：以人居环境为核心，根据当地实际情况，选择居民区、单位（有独立院落）、建筑工地、道路等，总调查路径 4000 延长米以上。调查时，依据监测人的步幅设定好计步参数，随身携带计步器等，沿监测路径，以均匀步伐前进，检查沿途存在的积水容器及小型水体（如水生植物、废弃容器、功能性积水容器、管井及下水道口、竹筒/树洞、轮胎、绿化带垃圾、喷泉、叶鞘积水等），及时记录发现的幼蚊（蛹）阳性容器数和小型积水处数，收集阳性容器及积水中的幼蚊进行种类鉴定并填写记录表（见表 3-4）和汇总表（见表 3-6），结束后记录路径长度。

（四）监测时间和频率

蚊媒传染病流行期间，核心区第一周每天监测。此后，每周开展 2 次监测。警戒区每周开展 1 次、监控区每两周开展 1 次蚊媒监测。直至蚊媒密度达到安全水平。成蚊每次至少监测 3 个帐次。成蚊监测、幼虫布雷图指数法、路径法每次工作量应反映当地蚊媒发生情况。监测工作至蚊媒传染病暴发疫情终止后结束。

自然灾害后，在安置点和居民区安置初期，第一周开展 2 次，随后每周开展 1 次。成蚊监测（双层叠帐法、栖息蚊虫捕捉法）、幼虫监测（布雷图指数法、路径法）时，每次工作量应反映当地蚊媒发生情况。监测工作持续至自然灾害恢复正常。

其他应急监测，根据蚊虫密度、疫情动态，经过蚊虫应急控制协调机构或相应组织综合评估，确定监测时间和频次，确认对人群健康不再构成威胁，报请相应的政府决策机构终止应急监测。

三、统计与计算

（一）诱蚊灯法蚊密度以每盏灯每夜捕获雌蚊数表示，单位：只/（灯·夜），计算公式如下：

$$\text{蚊密度} = \frac{\text{捕获雌蚊数}}{\text{布放灯数} \times \text{诱蚊夜数}}$$

（二）双层叠帐法蚊的密度指标为帐诱指数，以每帐每小时捕获雌蚊数表示，单位：只/（顶·小时），计算公式如下：

$$\text{帐诱指数} = \frac{\text{捕获雌蚊数}}{\text{蚊帐数} \times 30 \text{ 分钟}} \times 60 \text{ 分钟/小时}$$

（三）栖息蚊虫捕捉法的密度指标为手持式蚊虫采样器密度，以每人每小时捕获的蚊虫数量表示，单位：只/（人·小时），计算公式如下：

$$\text{手持式蚊虫采样器密度} = \frac{\text{蚊虫数量}}{\text{蚊虫采样次数} \times 15 \text{ 分钟}} \times 60 \text{ 分钟/小时}$$

（四）布雷图指数法的密度指标为布雷图指数（BI）或百户指数，以每调查 100 户居民检查获得的阳性容器（积水）数表示，单位：处/100 户，计算公式如下：

$$\text{布雷图指数 (BI)} = \frac{\text{媒介伊蚊阳性容器 (积水) 数}}{\text{调查户数}} \times 100$$

（五）勺捕法的密度指标为采样勺指数和勺舀指数，采样勺指数以每采集 100 捞勺数所获得的蚊幼虫（蛹）阳性勺数表示，单位：阳性数/100 勺；勺舀指数以阳性勺中平均每勺可捕获的蚊幼虫（蛹）数表示，单位：条/勺；

计算公式分别如下：

$$\text{采样勺指数} = \frac{\text{阳性勺数}}{\text{采集总勺数}} \times 100$$

$$\text{勺舀指数} = \frac{\text{蚊幼虫（蛹）总数}}{\text{阳性勺数}}$$

（六）路径法的密度指标为路径指数，以每 1000 米路径发现的阳性蚊虫幼虫（蛹）积水处数表示，单位：处/千米；计算公式如下：

$$\text{路径指数} = \frac{\text{阳性容器数或阳性积水处数}}{\text{监测行走距离（千米）}}$$

四、质量控制

（一）现场质控

1. 监测工具的选择

成蚊监测：监测工具要选择符合对应参数要求的诱蚊灯和双层叠帐，一旦选定，原则上保持稳定使用。

2. 监测生境及场所的选择

成蚊监测：生境需满足《技术指南》中规定的全部生境，具有一定的代表性，能代表当地城乡不同层次环境条件下的蚊虫发生情况，反映当地真实的蚊虫密度的时空变化。

幼蚊监测：布雷图指数法应确保调查户的空间代表性，在外环境中监测时，应以有积水场所为核心开展，以发现媒介伊蚊（白纹伊蚊、埃及伊蚊）的幼虫或蛹记为阳性。参与幼蚊监测的人员应相对固定。

监测工作完成后，需及时通过网络直报平台上报监测数据。

国家和省级疾控机构应定期开展蚊虫监测实施的调研、监测结果复核和技术培训等工作，提高监测数据的质量。

3. 个人防护及其他注意事项

在登革热等蚊媒传染病风险地区开展成蚊、蚊幼监测时，监测人员需穿长衣长袖，蚊幼监测时可涂驱避剂，以减少被蚊虫叮咬感染疾病的风险。

（二）实验室质控

1. 标本的包装和运输

捕获的蚊虫标本，挑选形态相对完整的制作双针法针插标本，做好标签（含采样时间、地点、采集方法、采集人、鉴定蚊种等信息）。其他标本可以置入冻存管对应做好标签并尽快以4℃条件运输至实验室进行下一步工作，减少反复冻融的次数。

2. 蚊种鉴定

根据蚊类标本的形态特征，结合当地蚊种的分布情况，进行蚊种鉴定，必要时，可以结合分子鉴定技术进行准确鉴定（相关引物和方法见附录3-4）。此外，也可通过将标本寄送给相关分类学专家以提高蚊种鉴定准确性，最大限度地减少鉴定结果中不确定种类标本的上报数量。

五、附表及附录

表 3-1 成蚊诱蚊灯法监测记录表

表 3-2 双层叠帐法监测记录表

表 3-3 布雷图指数法监测记录表

表 3-4 幼蚊（蛹）路径法和勺捕法监测记录表

表 3-5 栖息蚊虫捕捉法监测记录表

表 3-6 蚊密度监测汇总表

附录 3-1 诱蚊灯规格

附录 3-2 双层叠帐规格

附录 3-3 监测相关器材和耗材

附录 3-4 蚊类分子鉴定方法

表 3-1

成蚊诱蚊灯法监测记录表

调查时间：_____年_____月_____日

调查地点：_____省（自治区、直辖市）_____地（市）_____县（区）_____乡镇（街道）

气温：_____℃，最高：_____℃，最低：_____℃； 风速：_____m/s，

天气：晴□ 多云□ 阴□

环境类型：居民区□；公园□；医院□；农户□；牛棚□；猪圈□；养殖场□

诱蚊灯号：		监测地点：		
蚊种	捕获蚊虫数量（只）			合计
	雌	雄	无法鉴别	
淡色（致倦）库蚊				
三带喙库蚊				
白纹伊蚊				
埃及伊蚊				
中华按蚊				
骚扰阿蚊				
合计				
备注：依实际捕获蚊虫种类填写记录				

监测单位：_____ 监测人：_____ 审核人：_____

表 3-2

双层叠帐法监测记录表

调查时间：_____年_____月_____日

调查地点：_____省（自治区、直辖市）_____地（市）_____县（区）

_____乡镇（街道）_____村（居委会）

气温：_____℃，最高_____℃，最低_____℃，相对湿度：_____%，风速：_____m/s

天气：晴☐ 阴☐ 雨☐

地点	环境类型*	起始时间	结束时间	白纹伊蚊数		埃及伊蚊数		帐诱指数 (只/(顶·h))
				雌	雄	雌	雄	

*请填环境类型序号：1.居民区；2.公园/竹林；3.旧轮胎堆放地/废品站/工地；4.其他。

监测单位：_____ 监测人：_____ 审核人：_____

表 3-3

布雷图指数法监测记录表

调查时间：_____年_____月_____日														
调查地点：_____省（自治区、直辖市）_____地（市）_____县（区）_____乡镇（街道）_____村（居委会）														
环境类型：居民区 ☐ ；医院 ☐ ；公园 ☐ ；工地 ☐ ；废品收购站 ☐ ；废旧轮胎厂 ☐ ；港口/码头 ☐ ；其他 ☐														
编号	地址、门牌	调查地（户内/户外）	水体类型 ^a									幼蚊种类存在情况 ^b		
			盆景、水生植物	贮水池、缸、盆、桶、坛、槽	闲置容器（碗、瓶、缸、罐）	明渠、假山水池	竹头、树洞、石穴	轮胎、废旧轮胎	绿化带垃圾、可存水废弃物	地下室及停车场	其他水体	伊蚊 ^c	按蚊	库蚊
布雷图指数（BI）：														

监测单位：_____ 监测人：_____ 审核人：_____

注：^a水体类型：每种水体类型填写一条记录；^b幼蚊种类存在情况：对应的部分请打“√”，伊蚊请按^c要求填写；^c请填写伊蚊种类序号：1.白纹伊蚊；2.埃及伊蚊。 _

表 3-4 幼蚊（蛹）路径法和勺捕法监测记录表

调查时间：_____年_____月_____日

调查地点：_____省（自治区、直辖市）_____地（市）_____县（区）
 _____乡镇（街道）_____村（居委会）

环境类型：居民区□；单位（有独立院落）□；建筑工地□；道路□；其他□

编号	监测地点	路径法 ^a					勺捕法 ^a					
		行走距离 ^b	水体类型 ^c	幼蚊（蛹）存在情况 ^d			水体类型 ^c	第几勺	是否阳性	幼蚊（蛹）数 ^e		
				库蚊	按蚊	伊蚊				库蚊	按蚊	伊蚊
路径指数（I）：_____；阳性勺指数：_____；勺舀指数（条/勺）：_____												

监测单位：_____ 监测人：_____ 审核人：_____

注：

a 路径法、勺捕法：请在对应表格相应位置填写；路径法每一水体记录一条；勺捕法每勺填写一行。

b 行走距离：请填写每一监测场所总的行走距离。

c 水体类型：请在以下水体类型内选择填写。**路径法**小型积水及容器类型：水生植物、废弃容器、功能性积水容器、管井及下水道口、竹筒/树洞、轮胎、绿化带垃圾、喷泉、叶鞘积水等。**勺捕法**大中型水体类型：农田积水、河流、池塘或水坑、水渠、湖泊等。

d 幼蚊（蛹）存在情况：对应的部分请打“√”，其中，伊蚊需注明埃及伊蚊、白纹伊蚊、其他伊蚊。

e 幼蚊（蛹）数：请计数每勺幼蚊（蛹）数，其中，伊蚊需注明埃及伊蚊、白纹伊蚊、其他伊蚊。

表 3-5

栖息蚊虫捕捉法监测记录表

调查时间：_____年_____月_____日

调查地点：_____省（自治区、直辖市）_____地（市）_____县（区）
_____乡镇（街道）_____村（居委会）

气温：_____℃，最高_____℃，最低_____℃，相对湿度：_____%，风速：_____m/s

天气：晴 ☐ 阴 ☐ 雨 ☐

地点	环境类型 *	起始 时间	结束 时间	蚊种 1		蚊种 2		手持式蚊虫采样器密度 (只/(人·h))
				雌	雄	雌	雄	

监测单位：_____ 监测人：_____ 审核人：_____

*请填环境类型序号：1.居民区；2.安置房；3.公共卫生间；4.其他。

表3-6 _____省/市/县_____年_____月蚊密度监测汇总表

诱蚊灯法	环境类型	布灯数	捕获雌蚊数	密度 〔只/ (灯·夜)〕	捕获雌蚊数量（只）					
					淡色/ 致倦库蚊	三带 喙库蚊	白纹 伊蚊	埃及 伊蚊	中华 按蚊	其他 （实际 种类）
	居民区									
	公园									
	医院									
	民房									
	牲畜棚									
	其他									
	合计									
双层 叠帐 法	环境类型	帐次	捕获雌蚊数			帐诱指数 [只/（顶·h）]				
			白纹伊蚊	埃及伊蚊	合计					
	居民区									
	公园/竹林									
	废旧物品处/ 工地									
合计										
栖息 蚊虫 捕捉 法	环境类型	捕蚊次数	捕获雌蚊数			手持式蚊虫 采样器密度 [只/（人·小 时）]				
			蚊种 1	蚊种 2	合计					
	居民区									
	安置房									
	公共卫生间									
	其他									
	合计									
布雷 图指 数法	环境类型	调查户数	调查容器数		阳性容器数		布雷图指数			
	居民区									
	医院									
	公园									
	工地									
	废旧物品处									
	港口/码头									
	其他									
	合计									
路径 法	环境类型	行走距离 （千米）	调查水体数		阳性水体数		路径指数 （阳性水体数/ 千米）			
	居民区									

	单位								
	建筑工地								
	道路								
	其他								
	合计								
勺捕法	调查水体数	捞勺数	阳性勺数	阳性勺指数 (%)	蚊虫数量 (只)				勺舀指数 (条/勺)
					库蚊	按蚊	伊蚊	合计	

监测单位：_____ 填表人：_____ 审核人：_____

附录3-1 诱蚊灯规格

性能要求：

波长：2537Å。

功率：8~15W。

操作方便，性能稳定，对虫体无损伤。

使用产品要有延续性。

附录3-2 双层叠帐规格

伞状双层叠帐

内帐直径1.35m，外帐直径2.2m，高度1.8~1.9m 任意搭配，伞外包装总长1.2m。

方形双层叠帐

外帐：1.8×1.8×1.5m；内帐：1.2×1.2×2.0m。

附录3-3 监测相关器材和耗材

现场工作

诱蚊灯（附录3-1）、双层叠帐（附录3-2）、电动吸蚊器、手电筒、计数器、自封袋、口罩、手套、线绳、剪刀、500 ml采样勺、采集吸管、300目滤网、样本瓶、样本试管、标签纸、记号笔、驱避剂等。

实验室工作

体视显微镜、显微镜、口罩、手套、眼科镊子和眼科剪（多套）、计数器、标本盒、可调式昆虫针、标本柜、1.5ml冻存管、无水乙醇、冰箱、麻醉剂（乙醚）、麻醉箱（透明整理箱/自封袋）、棉球、泡沫保温箱、白瓷盘、记号笔、标签纸、标签记录笔（细）等。

附录 3-4

蚊类分子鉴定方法

分子鉴定 DNA 的提取

分子鉴定一般可以取整只蚊虫，或蚊虫的某个部位（如一条足等）用于DNA提取，取好样品后，按DNA提取试剂盒说明书进行操作。

分子鉴定所用引物

线粒体细胞色素氧化酶亚基I（COI）片段引物序列（5'-3'）：

LCO1490:GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG

HCO2198:TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA

该引物为蚊科物种的广谱性引物，对于蚊虫一般均可以具有比较好的扩增效果。

PCR反应体系

使用提取的DNA和该引物，配置PCR反应体系（50u1体系）：

10umol/L上下游引物各2μ1，5U/u1Taq酶0.3μ1，10xPCR buffer 5μ1，2mmol/L dNTP 5μ1，模板基因组DNA 6 μ 1，加水至50μ1。

扩增反应条件进行PCR

94℃ 1min, 5x(94℃ 40s, 45℃ 40s, 72℃ 1min), 30x(94℃ 40s, 51℃ 40s, 72℃ 1min), 72℃ 5min。

经电泳检验后，反应产物可直接用于测序。

将获得的序列在 Genbank 中进行检索（<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>），常见种一般都能检索到对应的物种信息。

第三章 蜱类监测

一、监测生境

每个监测县（区）设农村居民区、农村外环境（农田、荒坡、林地）、景区、城镇居民区四个类型的监测生境（对象）。

农村居民区：选择农村自然村开展寄生蜱监测，自然村农户户数少于 20 户时，可将监测范围扩大至生境相似的临近村庄。

城镇居民区：选择居民区或宠物医院。

农村外环境：每监测县（区）选择 1 个自然村，在自然村周边任选农田（包括茶园等经济作物田地）、荒坡草地或林地（小片的人工种植或自然生长的林地、苗圃等）生境至少 1 处。

景区：包括城市公园、郊野公园、森林公园、荒漠、草原、林区等人造或自然景观等，每县（区）至少选择其中 2 处。

二、监测时间

每年 4 月上旬、5 月上旬、7 月上旬、9 月上旬各开展一次。各地可根据当地气候条件、蜱类活动高峰和实际工作情况，对监测时间进行微调。建议长江以南地区在 10-12 月增加 1 次监测。

监测月份每月上旬监测一次，或根据当地蜱类活动情况适当推迟或提前开展监测。

三、监测方法

国家级监测点必须在选定县（区）同时开展寄生蜱和游离蜱监测。其余县（区）可根据实际情况至少选择一种方法进行监测。

1. 寄生蜱：

采用体表检蜱法开展监测。

城镇居民区、农村居民区生境必须开展寄生蜱监测。农村居民区每村庄调查至少 10 头放养的家养动物（牛、羊、狗），城镇居民区每监测县（区）至少调查 20 只宠物，宠物种类以狗为主。

景区和农村外环境可根据当地蜱传疾病流行情况选择性开展，捕捉啮齿类或其他小型哺乳类（如刺猬、黄鼬等）、鸟类开展监测。

重点检查动物的耳朵、眼睛周围、口鼻周围、脖子、腋窝、胸脯、乳房、大腿根、阴囊、肛周、会阴、尾根等部位，毛较长的动物需用手触摸，收集和记录蜱的种类和数量（见记录表 4-1 和汇总表 4-3）。鼠类以外的野生动物可麻醉后适当固定后进行检蜱等操作，苏醒后原环境释放。

如需收集蜱，由于正在吸血的蜱类假头容易折断，应用小镊子夹紧假头先轻轻拉拽和左右晃动，使之能上下摇动，然后再果断拔除，必要时可连带部分动物皮毛。

2. 游离蜱：

在农村外环境、景区生境，采用布旗法开展监测。居民区外环境也可开展游离蜱监测。

采用布旗法在选择样地均匀的拖或挥旗，以每人每 500m 所捕获蜱数进行密度指数统计（单位：只/布旗（100m）。一般每一样地拖旗不能少于 500m，时间不能少于 30min，记录捕获蜱的种类和数量，填写记录表（见表 6-2）和汇总表（见表 6-3）。

拖（挥）蜱方法：用 90cm×60cm 的白色或浅色布旗，窄的一边两端用绳子固定，将旗子平铺地面，拖拉绳子前进，每步行 10m 左右停下检视附着的蜱数，根据调查地段内植被情况选择不同的方法进行定距离拖蜱。如是较平整的草地，可拖拉布旗在草地上行走；如是灌木丛则手持木杆在灌木丛和杂草上来回挥动布旗。将附着在布旗上及拖蜱者身上的蜱用镊子捡起装

入管内，立即旋紧管盖或塞紧塞子。每一样地的蜱放入同一管内或做一致编号，带回实验室进行相关的分类鉴定、计数和检测。

农田：在选定自然村周边选择一种主要的农田形式，在农田周边用布旗拖蜱。

荒坡草地：较大面积的无耕种荒地、草地，在荒坡草地内拖蜱。

林地：包括各种种植、野生的、面积较大的可能有动物包括鸟类出现的林地，在林地内、林中小路两侧进行调查。

景区：在游人活动的小路两边草地调查。

监测时做好环境数据采集：对调查点的经纬度、农田农作物、荒地、林地的植被类型、林地的类型（针叶、阔叶、混交林）和地形进行描述性记录（见各调查表）。

四、统计与计算

（一）动物（家养动物）体表蜱

采用染蜱率、蜱指数和蜱密度指数统计，单位：无。

$$\text{染蜱率} = \frac{\text{有蜱（阳性）动物数}}{\text{调查动物总数}} \times 100\%$$

$$\text{蜱指数} = \frac{\text{每种动物体表检获或记录的蜱总数}}{\text{调查动物总数}}$$

$$\text{蜱密度指数} = \frac{\text{每种动物体表检获或记录的蜱总数}}{\text{有蜱（阳性）动物数}}$$

（二）游离蜱

以每旗每 100m 所捕获蜱数进行密度统计，单位：只/（布旗（100m））。

$$\text{蜱密度} = \frac{(x_1 + x_2 + \cdots x_n) \times 100}{s_1 + s_2 + \cdots + s_n}$$

式中， x 为每布旗捕获的蜱数量，单位为只， s 为每布旗拖蜱的距离，单位

为 m。

五、标本保存

分类用标本可用 70~80℃ 的热水将蜱烫死，然后放入 70% 的酒精保存，注意保存容器的密封，定期检查添加酒精。

其他用途标本可根据实际需求自行确定保存方式。短期内（6~10 天）可将采到的标本装入 50ml 离心管内，塞入采集点附近的树叶或草叶保持湿度，旋紧管盖，每隔 1 天更换一次草叶或树叶，以活蜱形式带回实验室进行鉴定、计数及其他检测；如需长期保存，可将活蜱装入冻存管，置于液氮内或超低温冰箱保存，如暂时无液氮，可先置于 -20℃ 保存，有条件时（不超过 3 个月）转入液氮内或超低温冰箱保存，但应避免反复冻融。

监测点在鉴定和计数后应将捕获的蜱标本保存，以备省级疾病预防控制中心或国家疾病预防控制中心根据情况进行种类复核和其他相关工作。

六、个人防护及其他注意事项

（一）如有可能，提前接种相关蜱传疾病的疫苗；

（二）最好穿白色连体防护服，特别是进入林区，如是不连体防护服，需加穿防蚤袜，套于裤腿外，并扎紧收口。进入林区采蜱时务必戴好防护帽。操作时戴上橡胶手套；

（三）裸露的皮肤涂抹驱避剂，如含有避蚊胺（DEET，N，N-二乙基间甲基苯甲酰胺）的市售驱避剂或花露水，注意保护时间；

（四）每天的调查活动结束后，调查人员应仔细自己检查或相互检查身体和衣物，看是否有蜱攀爬附着或叮入，发现蜱后立即清除；

（五）一旦发现有蜱已咬钻入皮肤，不要生拉硬拽，以免拽伤皮肤，还易将蜱的假头留在皮肤内，应尽快找专业医疗机构取出，然后做局部消毒处

理，并随时观察身体状况，如出现发热、叮咬部位发炎破溃及红斑等症状，及时到相关部门诊断是否患上蜚传疾病，避免错过最佳治疗时机。

（六）尽量不要接触蜚的体液，如不小心接触，及时做消毒处理。

七、质量控制

（一）现场质量控制

1. 监测时间

应尽量按照方案中规定的4、5、7、9月上旬开展，各地可根据当地蜚活动情况和蜚媒疾病流行情况进行微调，但不能超过方案中规定时间的1个月。

2. 监测区县和生境的选择

监测区县和生境的选择应紧密结合蜚媒传染病的防控。每个监测区县农村自然村周边、景区、农村居民区和城镇居民区4类生境（大生境）均必须开展，不能缺项、漏项。一些城市化程度比较高的监测点，如农村自然村周边和农村居民区生境无法与其他生境在同一区县选择，可根据实际情况选择其他区县的该类生境开展工作，但监测生境总数不能少于方案中要求的该监测点应监测生境总数。

各生境的定义：

（1）农村自然村周边：主要针对农村生活和工作环境，包括农田、林地、农村荒坡草地等小生境类型。

农田：在选定自然村周边选择一种主要的粮食或其他经济作物种植区，在农田周边用布旗拖蜚。

荒坡草地：指较大面积的无耕种荒地、草地，在荒坡草地内拖蜚。

林地：主要指农区的各种种植、野生的、面积较大的可能有动物包括鸟类出现的林地、苗圃、村庄周边的绿化带等，在林地内、林中小路两侧进行

调查。

(2) 景区：主要针对休闲人群活动环境，包括城市公园、郊野公园、森林公园、荒漠、草原、林区等人造或自然景观小生境类型。在人群经常活动的小路两边调查。

城市公园：指位于城区内的公园、绿地、比较大型的绿化带。

郊野公园：指距离聚居人群相对较远的、较大型的用于休闲娱乐的公园、湿地公园等。

森林公园：指由相关部门认定的该类型公园。

荒漠：指降雨稀少、植被稀疏、人类活动较少的生境。

草原：特指传统牧区的大面积的用于放牧的草地，非农区的小范围放牧草地。

林区：特指以生长、培育、保护和经营林业生产为主的成片原始林、次生林和人工林覆盖的传统林业地区的山林，以及农区的非经营性的自然生长有大面积林木的山林。

3. 拖蜱距离和时间

每生境每次作业应保证拖蜱时间不少于 30 分钟、拖蜱距离不少于 500 米。

4. 宿主动物编号

可以全年连续编号，也可每月单独编号。每生境每次作业的每只动物应有不同的编号；同一只动物体表检获多种蜱，记录时每种蜱对应的动物编号应相同。

5. 捕获蜱的现场保存

可麻醉处死也可活体带回实验室进行下一步操作，处死的蜱带回实验室时应注意保证标本不要腐败，可冷冻保存或放入无水乙醇浸泡。下一步如需进行病原学操作，应根据后续操作的要求对标本进行保存和运输。建议活体带回。

（二）实验室质量控制

1. 标本的处理

用于分类研究的活体标本建议用 80℃ 的热水处死，不要冷冻处死，以保证用于形态学鉴定标本的舒展性；乙醇浸泡标本较脆，取放时注意保证标本的完整性。用于病原学监测的标本按照病原学监测相关要求处理。

2. 标本的保存

玻片标本和浸泡标本均可，建议采用浸泡标本形式，如后续要开展分子生物学相关实验建议无水乙醇浸泡并冷冻保存。注意经常检查浸泡液是否能够浸没标本，及时补充浸泡液。用于病原学监测的标本按照病原学监测相关要求保存。

3. 标本的鉴定

每生境每次监测捕获的蜚应留存一定数量的标本，用于种类复核；留存的标本应尽量保证各发育阶段、性别完全；形态学鉴定难以区分时，建议采用分子生物学鉴定方法，推荐使用扩增昆虫 COI 的通用引物，如 LCO1490 和 HCO2198，使用条件见 Folmer et al, 1994:

LCO1490 (5' -GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3')

HCO2198 (5' -TGATTTGGTCACCCTGAAGTTTA-3')

注意应和形态学鉴定结果结合确定种类；COI 基因有着严格的母系遗传，鉴定近缘种和复合种有一定的局限性。

（三）数据上报

所有监测采获标本应至少鉴定到属，尽量鉴定到种，如种的鉴定当时有困难，可先按未鉴定种填报系统，确定种类后进行修订；同一属内应根据形态归类，确定具体的种类数，填报数据时应按某属未鉴定种 1、某属未鉴定种 2 填报系统，不能笼统的都按某属未鉴定种 1 上报；种类鉴定的修订应在 2 个月内完成。

八、附表及附录

表 4-1 动物体表寄生蜚监测记录表

表 4-2 室外游离蜚调查记录表

表 4-3 蜚密度监测汇总表

附录 4-1 监测工具

表 4-1 动物体表寄生蜱监测记录表

调查日期：____年____月____日 调查地点：____省（自治区、直辖市）____市____县（区）____乡镇（街道）____村（小区）
海拔：____ 经度：____ 纬度：____

动物 编号 a	动物 种类 b	活动 区域 c	蜱种类 d	蜱数量（只）					备注 e
				幼	若	雌	雄	合计	

监测单位：____ 监测人：____ 审核人：____

- 注：a.动物编号：阴性动物也请编号，并填入动物种类、活动区域等。
b.种类：指动物的一般分类，如马、水牛、黄牛、牦牛、山羊、绵羊、猫、狗等。
c.活动区域：请填入序号，1.农田；2.林地；3.农村荒坡草地；4.城市公园；5.郊野公园；6.森林公园；7.荒漠；8.草原；9.圈养。
d.蜱种类：如在一只动物上捕获几种蜱，请将各种类分行填写；鉴定不出种类的请写未鉴定种，如有多种，请编号，（属名）未鉴定种 1、（属名）未鉴定种 2 等。
e.备注：可填写家养动物主人姓名。

表 4-1

动物体表寄生蜱监测记录表

调查日期：____年____月____日

调查地点：____省（自治区、直辖市）____市____县（区）____乡镇（街道）____村（小区）

海拔：____经度：____纬度：____

动物 编号 a	动物 种类 b	活 动 区 域 c	蜱种类 ^d	蜱数量（只）					备注 ^e
				幼	若	雌	雄	合 计	

监测单位：____监测人：____审核人：____

注：a.动物编号：阴性动物也须编号，并填入动物种类、活动区域等。

b.种类：指动物的一般分类，如马、水牛、黄牛、牦牛、山羊、绵羊、猫、狗等。

c.填入序号：1.农田；2.林地；3.农村荒坡草地；4.城市公园；5.郊野公园；6.森林公园；7.荒漠；8.草原；9.林区；10.圈养；11.其他。

d.蜱种类：如在一只动物上捕获几种蜱，请将各种类分行填写；鉴定不出种类的请写未鉴定种，如有多种，请编号，（属名）未鉴定种1、（属名）未鉴定种2等。

e.备注：可填写家养动物主人姓名。

游离蟬調查記錄表

海拔: _____ 经度: _____ 纬度: _____

[illegible]

监测单位: _____ 监测人: _____ 审核人: _____

注：a. 请选择或填写：1.农村自然村周边；2.农田；3.荒坡草地；4.林地；5.城市公园；6.郊野公园；7.森林公园；8.荒漠；9.草原；10.林区；11.其他（请填写具体名称）

b. 地点：农村自然村内和周边可填写距离其最近的住户姓名。

- c. 蜚种类：如在一只动物上捕获几种蜚，请将各种类分行填写；鉴定不出种类的请写未鉴定种，如有多种，请编号，未鉴定种 1、未鉴定种 2 等。

表 4-3 _____省/市/县_____年_____月蜱密度监测汇总表

寄生蜱	动物种类	动物数量 (只)	蜱数量 (只)	染蜱率 (%)	蜱指数	蜱密度指数	备注
	牛 (黄牛、水牛)						
	羊 (山羊、绵羊)						
	狗 (农村)						
	狗 (城镇)						
	其他						
	合计						
游离蜱	生境类型	拖蜱距离 (m)	拖蜱时间 (min)	蜱数量 (只)	蜱密度[只/ (布旗 • 100m)]		
	农村外环境						
	景区						
	合计						

监测单位: _____ 填表人: _____ 审核人: _____

附录4-1

监测工具

采集工具：白布旗（推荐用白色摇粒绒）、眼科镊（弯头、直头）、离心管、防水记号笔。可根据实际监测内容选择啮齿类、小型兽类、鸟网等捕捉工具。

防护用品：驱避剂、白色光面连体防护服、防蚤袜、一次性手套、一次性口罩。

标本储存工具：冰箱、超低温冰箱、冻存管。

第四章 恙螨监测

一、监测生境

选择监测点所在地市辖区内恙虫病高发或高流行风险地区的典型生境开展监测。每个监测点选择不少于 3 种生境。媒介恙螨仅能在有土壤的环境中生存，故应以野外生境为主。常见野外生境包括以下 5 类。

（一）农田：连片分布的旱田、水田、菜地等农业用地，包括田边、田埂以及田间的小型荒地、灌丛、坟场和防护林带等，距离居民区应在 100 米以上；

（二）果园：连片分布的水果、坚果、茶树种植区，包括其间的小片荒地、农田和防护林带；

（三）森林：面积较大的次生林地、山区林地、人工林、市外森林公园和自然保护区等，不含生境（1）和（2）中的防护林带、小片灌丛以及城市人工绿化林地、苗圃等；

（四）荒地（或灌丛）：较大面积的没有种植农作物和树木，且杂草丛生的荒地、低矮灌丛、农村弃耕地、城镇待建土地，不包括（1）—（3）中的小片荒地。

（五）公园：城市中含有草地、树林等植被的公园、河岸、小山等人工景区或公共活动空间，不含远郊的森林公园、自然保护区等天然景区；

农村居民区、城镇居民区、重点行业见第二部分第一章“鼠类监测”的生境，后两种生境大多不适宜恙螨生存，一般不适宜恙螨监测，但农村居民区或城市以外的重点行业的室外庭院和村边树林、沟渠旁

也可作为监测生境。除上述生境以外的草原、湿地、荒漠等，填报时应“其他”后面注明具体生境名称。

二、监测时间

监测点每年至少应开展 3 次监测，具备条件的监测点，应自本地恙虫病流行期开始之前 1 个月至流行期结束，每月 1 次。监测应在每月中旬开展。根据我国恙虫病流行区特点，将监测点分为三类地区。南方夏季型监测区包括秦岭—大别山—长江下游以南监测点，监测月份为 5 月、7 月、9 月；北方秋季型监测区包括秦岭—大别山—长江下游以北至燕山以南监测点，监测月份为 9 月、10 月、11 月；东北春秋型监测区包括东北三省及内蒙古东部监测点，监测月份为 5 月、9 月、10 月。位于上述区域分界线附近监测点，应根据本地疫情发生季节确定监测月份。

三、监测方法

采用鼠体恙螨采集法。本方案中的鼠是指以啮齿目为主，包括兔形目、食虫目、树鼯目等小型哺乳动物。

（一）捕鼠 采用的夹夜法或笼夜法，使用中型或大型钢板夹或鼠笼，以生花生米或其他适宜食物作为诱饵，晚放晨收，如连续布放应早晚各收鼠一次。居民区室外沿墙根，野外沿直线或沿田埂、沟渠等自然地形每 5m 布放 1 只。每个监测点每月捕获鼠总数应不少于 30 只。每只鼠单独装入鼠布袋，系紧袋口，袋上写上捕获生境，带回实验室。将捕获时间、地点、生境和有效夹数等现场监测信息填入附表 5-1，将各生境有效夹数汇总后填入采集记录表（见表 5-1）。

（二）鼠体恙螨采集 将死鼠放在白瓷方盘中，每只鼠编号、鉴定鼠种。捕获的活鼠应用乙醚、氯仿或异氟烷熏蒸处死。仔细检查鼠的耳廓、耳窝、眼缘、会阴等部位，将有恙螨的部位剪下，放入离心管、自封袋或培养皿中，盖上盖子或封上自封袋封口，培养皿需在底部边缘加少量水，并在边缘涂石蜡，盖上盖子，防止恙螨逃逸。应一鼠一管（袋、皿），管上记录宿主编号。将离心管、自封袋或培养皿在4℃冰箱中或25℃室温放置3天左右。在解剖镜下用细毛笔、解剖针等捡取或刮下鼠耳上的恙螨，将其放入含75%酒精的冻存管中，旋紧盖子，放冰箱中冷藏或冷冻保存。同时记录每只宿主的恙螨总数，将鼠、恙螨信息填入鉴定记录表（见表5-2）。

（三）恙螨标本制作 每月可根据生境、地点、鼠种分层抽取一定比例的恙螨制作玻片标本，如恙螨较少应全部制作玻片标本，鉴定恙螨种类。在载玻片上滴一滴霍氏封片液（Hoyer's medium），取1只恙螨放入封片液中。在解剖镜下，用昆虫解剖针拨动使恙螨沉入封片液底部，背部朝上，盖上盖玻片，轻压以排除多余封片液。建议1张玻片放一只恙螨，如1张玻片放多只恙螨，要求是来源于同一只鼠体的标本。在玻片上应暂时写上鼠编号和标本编号。用酒精灯烘烤玻片，排出封片液中气泡并使恙螨足伸展。将标本置于晾片架上放入50-55℃左右烤箱中烘烤2周以上使封片液干燥。完全烘干的玻片标本放标本盒中保存，以备标本复核。剩余浸泡恙螨标本可置4℃或-18℃冰箱中保存用于标本复核。

（四）恙螨标本鉴定 在显微镜下根据恙螨形态特征和工具书鉴定种类。标本透明即可鉴定种类，不必等到标本完全烘干（未完全烘干的标本不能使用油镜）。在已鉴定玻片上贴上标签，标签应包含鉴

定信息：恙螨物种学名、中文种名、鉴定人，生态学信息：宿主种类、宿主编号+标本号、采集时间、地点、生境、采集人。将鉴定恙螨种类、数量等填入鉴定记录表（见表 5-2）。

恙螨采集、制作、鉴定所需设备、工具和耗材详见附录 5-3。

四、数据填报、统计与计算

（一）监测数据填报 捕鼠之后应及时采集鼠体恙螨、制作标本，标本制作完成后即可鉴定种类，在“全国重要病媒生物监测系统”中的恙螨监测板块，按附表 5-2 中的数据填报监测结果。注意填报的是实际鉴定恙螨的数量，不是估算的数量。

（二）指标计算

通过计算不同月份、生境宿主鼠类的捕获率，用以反映当地的相对鼠密度。公式见本技术指南“鼠类监测”中捕获率计算。

恙螨密度指标 按照以下公式计算鼠带恙螨率、恙螨指数：

$$\text{带恙螨率 (\%)} = \frac{\text{带恙螨鼠数 (只)}}{\text{捕获鼠总数 (只)}} \times 100$$

$$\text{恙螨指数} = \frac{\text{恙螨数 (只)}}{\text{捕获鼠总数 (只)}}$$

不同螨种、不同生境可分别计算带恙螨率和恙螨指数。如果只鉴定了部分恙螨，计算某种恙螨指数，应首先计算其“估算数量”。公式如下：

$$\begin{aligned} & \text{某种恙螨估算数量 (只)} \\ &= \frac{\text{已鉴定的该种恙螨数(只)}}{\text{鉴定恙螨总数(只)}} \times \text{恙螨总数 (只)} \\ \text{某种恙螨的恙螨指数} &= \frac{\text{某种恙螨估算数量 (只)}}{\text{捕获鼠数 (只)}} \end{aligned}$$

五、质量控制

(一) 质量控制

设恙螨监测点的省、市级疾控中心应指派至少 1 名在职人员作为恙螨监测技术负责人，技术负责人应了解本地常见鼠、恙螨种类、鉴定特征和季节、生境分布规律，定期参加上级组织的技术培训或到上级疾控机构进修学习，具备恙螨采集、标本制作和种类鉴定的技术能力。技术负责人应相对保持稳定，不应经常轮换岗位。

监测点应保存好原始监测数据记录表格备查。每年应保存不少于 20 片包含当地主要恙螨种类的玻片标本，供上级疾控中心标本复核用。国家和省级疾控中心应定期开展监测方案实施的检查、指导、标本复核和技术培训等工作，提高监测数据的质量。

(二) 生物安全

在恙虫病疫区现场捕鼠时应穿戴防护服、一次性塑胶手套和防蚤袜、鞋套或雨靴。可在袖口、裤脚、领口等开口处喷洒含避蚊胺的驱避剂。每次脱下的一次性防护用品应放入生物垃圾袋中密封并高压或焚烧处理。捕获鼠的鼠夹应该单独收集，经消毒后再使用。用过的解剖器械用 75%酒精浸泡或高压消毒才能再次使用。捕获鼠应立即放入

鼠布袋,系紧袋口,再放入更大的保温箱或袋子中封闭运输。鼠尸体、鼠耳等存在污染的垃圾应喷洒消毒液、密封、高压后按医疗废弃物处理。流行性出血热、森林脑炎风险区域监测人员应提前接种相应疫苗。在其他鼠传疾病疫区现场和实验室的操作过程中,除上述要求外,还须遵循相关疾病防护标准,如戴医用 N95 口罩等。

六、附表及附录

表 5-1 恙螨宿主采集现场记录表

表 5-2 恙螨采集鉴定记录表

附录 5-1 恙螨监测设备、工具、耗材和试剂

表 5-1 恙螨宿主采集现场记录表

省_____市_____年_____月

县/区	监测地点 (乡镇/村)	生境	收夹 日期	布放夹 数 (只)	有效夹 数 (只)	捕获鼠 数 (只)	备注

填表人：_____；

审核人：_____

表 5-2

恙螨采集鉴定记录表

监测点：_____省_____市_____县

监测时间：_____年_____月

有效夹数（只）：农田____；果园____；林地____；荒地____；农村居民区____；城镇居民区____；重点行业____；公园____；其他____

（____）^a

鼠编号	收夹日期	生境	地点	鼠种	恙螨总数（只）	恙螨鉴定结果（只）				
						____恙螨 ^b	____恙螨 ^b	____恙螨 ^b	____恙螨 ^b	____恙螨 ^b

注：a 填写其他生境名称；b 根据鉴定种类填写恙螨名称，可以使用电子表格，打印存档；填写根据玻片实际鉴定出的某种恙螨数量。

填表人：_____

审核人：_____

附录 5-1

恙螨监测设备、工具、耗材和试剂

一、设备

体视显微镜

生物显微镜（正置、相差显微镜，带
摄像装备）

恒温鼓风干燥箱

标本柜

电子计算机

电冰箱

二、工具耗材

鼠夹（中号/大号钢板鼠夹）

保温盒（含冰袋）

碳素笔、记号笔、2B 铅笔

解剖剪

镊子（普通手术镊子、眼科镊子）

昆虫解剖针

雨靴

标本盒

记录表格

塑料自封袋

一次性防护服

防蚤袜

一次性手套（丁腈或乳胶）

KN95 医用防护口罩

外科口罩

鼠笼（可选）

细毛笔

培养皿

吸管

烤片托盘

酒精灯

白瓷方盘

鼠布袋或无纺布袋（30 袋或无
纺布）

5mL 离心管

2mL 冻存管

载玻片

盖玻片（直径 12mm 圆形）

医用纱布

脱脂棉球

三、试剂

75%酒精

乙醚或异氟烷

霍氏封固液（阿拉伯胶、甘油、水合
氯醛、水配制）

95%医用酒精

显微镜镜油

驱避剂（含 5%以上避蚊胺）

第五章 其他病媒生物监测

一、蟑螂监测

（一）监测生境

每监测县（区）可选择农贸市场、超市、宾馆、餐饮环境、医院、居民区各不少于 2 处，按照粘捕法和目测法开展监测。每个监测市选择不少于 2 个县（区）开展监测。

（二）监测时间

粘捕法全年监测，每季度监测一次，监测时间为季度第一个月。

目测法一年至少进行两次，每半年完成 50% 监测抽样数量。

（三）监测方法

1. 粘捕法

统一用粘蟑纸（规格：170mm×100mm）调查，粘蟑纸中央放 2 克新鲜面包屑等作为诱饵，每处布放不少于 10 张粘蟑纸，晚放晨收，记录看到是否有蟑螂、是否有蟑迹，记录粘捕到的蟑螂种类，以及雌、雄成虫和若虫数，并记录有效粘蟑纸数（见表 6-1）。市场和超市布放在食品加工销售柜台，餐饮环境和宾馆布放在操作间及餐厅，医院布放在病房，居民区布放在厨房。每个标准间（房间数按 15m²/间折算）放置 1 张，若监测点面积不足，须另加相同环境类型场所。不得选择一周内药物处理过的场所作监测点，每次监测时，粘蟑纸必须更新。

2. 目测法

在监测房间内选择蟑螂栖息活动的场所，用手电筒照明，检查并记录每个场所 3min 内观察到的蟑螂种类、数量、活卵鞘数和蟑迹（空卵鞘壳、死尸、残尸等）数（见表 6-2）。

（四）统计与计算

1. 粘捕法

$$\text{粘捕率} = \frac{\text{阳性粘蟑纸数}}{\text{有效粘蟑纸数}} \times 100\%$$

$$\text{侵害率} = \frac{\text{阳性房间数}}{\text{监测房间数}} \times 100\%$$

$$\text{蟑螂密度 (只/张)} = \frac{\text{捕获蟑螂数}}{\text{有效粘蟑纸数}}$$

$$\text{蟑螂密度指数 (只/张)} = \frac{\text{捕获蟑螂数}}{\text{阳性粘蟑纸数}}$$

2. 目测法

$$\text{侵害率} = \frac{\text{蟑迹阳性房间数}}{\text{监测房间数}} \times 100$$

$$\text{密度指数 (只/间)} = \frac{\text{监测到活蟑螂/活卵鞘总数 (只)}}{\text{有活蟑螂/活卵鞘房间数 (间)}}$$

(五) 质量控制

对于监测捕获的蟑螂，选择体态完整者分类鉴定，并做成针插标本备查，以便于标本复核和质量控制。

(六) 附表及附录

表 6-1 蟑螂密度监测记录表（粘捕法）

表 6-2 蟑螂密度监测记录表（目测法）

表 6-1

蟑螂密度监测记录表（粘捕法）

调查时间：_____年____月____日 调查地点：_____省（自治区、直辖市）_____市_____县（区）_____乡镇（街道）

监测地点：_____

环境类型：农贸市场 ☐ 超市 ☐ 餐饮 ☐ 医院 ☐ 宾馆 ☐ 居民区 ☐ 投放张数：_____

监测 场所	房 间 总 数	阳 性 房 间 数	有 效 粘 捕 张 数	是 否 有 蟑 螂	是 否 有 蟑 螂 迹	德国小蠊			美洲大蠊			澳洲大蠊			黑胸大蠊			褐斑大蠊			日本大蠊			其它			合计			
						若	雌	雄	若	雌	雄	若	雌	雄	若	雌	雄	若	雌	雄	若	雌	雄	若	雌	雄	若	雌	雄	若
合计																														

监测单位：_____ 监测人：_____ 审核人：_____

表 6-2

蟑螂密度监测记录表（目测法）

调查时间：_____年____月____日 调查地点：_____省（自治区、直辖市）_____市_____县（区）_____乡镇（街道）

监测地点：_____

环境类型：农贸市场 ☐ 超市 ☐ 餐饮 ☐ 医院 ☐ 宾馆 ☐ 居民区 ☐ 其他 ☐_____

监测场所	监测间数	成若虫								卵鞘				蟑迹（粪、虫尸、残尸、空鞘等）	
		大 蠊				小 蠊									
		阳性间数	查获只数	侵害率（%）	密度指数	阳性间数	查获只数	侵害率（%）	密度指数	阳性间数	查获只数	侵害率（%）	密度指数	阳性间数	侵害率（%）
合计															

监测单位：_____ 监测人：_____ 审核人：_____

二、臭虫监测

（一）监测生境

1. 臭虫抽样监测，监测环境有两种，包括工地宿舍、居民区。工地宿舍调查，每个区县每年调查不少于 10 处工地宿舍，每处不少于 10 个标准间（房间按 15m²/间折算），如工地宿舍数量不足，可以工厂宿舍、学校宿舍代替；居民区调查，每个区县每年调查不少于 10 个居委会，每个居委会不少于 10 个家庭。

2. 臭虫重点监测，根据对有害生物防治公司开展调查的结果，确定臭虫监测的重点场所，开展现场监测，采集臭虫标本。重点监测的环境类型包括（但不限于）：集体宿舍（工地、工厂、学校等）、宾馆/酒店、交通工具、居民区等。

（二）监测时间

1. 臭虫抽样监测，工地宿舍和居民区监测每年 1—12 月期间完成，可以分月监测，也可以一次性完成全年监测任务。

2. 臭虫重点监测，根据有害生物防治公司调查结果随时监测，有害生物防治公司的调查每年 1 次，范围包括在本辖区内的有害生物防治公司。

（三）监测方法

1. 粘捕法

粘捕法采用的粘虫（蟑）纸规格：胶面规格为 170mm×100mm。

监测时间段，监测房间内宜有人员正常居住。将臭虫粘纸放置于臭虫经常栖息活动的场所，如床、沙发、家具周围等处，床和沙发应在与地面接触的四个角均放置粘虫纸，每个房间粘虫纸的放置根据房间内的家具摆放具体选择，一个家庭至少选择一个房间的一个床或沙发，与地面接触的

四个角放 4 张粘虫纸。粘虫纸放置 7 天，记录捕获臭虫种类及数量，填写调查表（见表 7-1）。

2. 目测法

调查有害生物防治公司是否发现过臭虫，如有发现，记录发生地点和场所。建议尽量调查监测城市所有开展有害生物防制工作的有害生物防治公司，填写调查表（见表 7-2）。根据调查结果，找出哪些地点和场所可以进行臭虫现场调查。

确定现场调查的地点，派人到现场做臭虫调查，可以用目测法或粘捕法。若用目测法，发现有臭虫痕迹或活的臭虫，则每个建筑所有房间需要检查。如人力有限，至少已知臭虫发生房间的左、右、上、下房间需检查。如现场不能找到活体臭虫，也可使用粘捕法监测臭虫，可在粘虫纸上放置臭虫引诱剂提高臭虫监测的灵敏度。

目测法：在监测房间内选择臭虫栖息活动的场所，如床板、床垫（包括其上的孔、洞、缝）、床架、床头、抽屉等缝隙和家具连接处、沙发以及沙发和床周围的家具、孔隙。用手电筒照明，借助放大镜、镊子、解剖针等工具，采取直接目测、敲击等检查方式，检查并记录每个场所捕获到的臭虫数量和查到的臭虫迹。检查区域不足 15m² 的单独房间按 1 间计算，大于 15m² 的房间按 15m² 按为 1 间折算。填写调查表（见表 7-3）。

（四）统计与计算

（1）粘捕法臭虫的密度计算

$$\text{臭虫粘捕率} = \frac{\text{粘捕到臭虫的粘虫纸数}}{\text{有效粘臭虫纸数}} \times 100\%$$

$$\text{臭虫侵害率} = \frac{\text{监测到臭虫的房间数}}{\text{监测总房间数}} \times 100\%$$

$$\text{臭虫密度 (只/张)} = \frac{\text{粘捕到臭虫成若虫数 (只)}}{\text{有效粘臭虫纸数 (张)}}$$

(2) 目测法臭虫的密度计算

$$\text{臭虫侵害率} = \frac{\text{监测到臭虫的房间数}}{\text{监测总房间数}} \times 100\%$$

$$\text{臭虫密度 (只/间)} = \frac{\text{监测到的臭虫总数 (只)}}{\text{监测总房间数 (间)}}$$

$$\text{臭虫迹阳性率} = \frac{\text{有臭虫迹的房间总数}}{\text{监测总房间数}} \times 100\%$$

(3) 有害生物防治公司调查臭虫的密度计算

$$\text{处理过臭虫的有害生物防治公司比率} = \frac{\text{处理过臭虫的 PCO 公司数}}{\text{调查的 PCO 公司总数}} \times 100\%$$

(五) 质量控制

1. 标本的包装和运输

捕获的臭虫标本，挑选形态相对完整的制作针插标本，做好标签（含采样时间、地点、采集方法、采集人等信息）。其他标本可以置入95%乙醇浸泡保存，做好标签。

2. 臭虫种类鉴定

根据臭虫标本的形态特征，结合当地臭虫的分布情况，进行臭虫种类的准确鉴定。前胸背板宽高比被认为是区分温带臭虫和热带臭虫的主要依据。前胸背板宽高比大于2.5定为温带臭虫，小于2.5则定为热带臭虫。采集的标本应进行种类鉴定，并提交标本给中国疾病预防控制中心鉴定复核。

（六）附表及附录

表 7-1 臭虫密度监测记录表（粘捕法）

表 7-2 臭虫有害生物防治公司调查记录表

表 7-3 臭虫密度监测记录表（目测法）

表 7-1

臭虫密度监测记录表（粘捕法）

监测时间：_____年____月____日 监测地点：_____环境类型：_____ 监测类型： ☐ 抽样监测 ☐ 重点监测											
序号	房间位置/ 房间号	查房 间数	有臭虫 房间数	投放粘 纸张数	有效 张数	粘捕臭 虫张数	捕获臭 虫数量	粘捕率	侵害率	密度	种类鉴定
合计											

监测单位：_____ 监测人：_____ 审核人：_____

备注：监测地点为监测地的通讯地址；环境类型包括：1.工地宿舍；2.居民区；3.学校宿舍；4.工厂宿舍；5.宾馆/酒店；6.交通工具；7.其他等。

表 7-2

臭虫有害生物防治公司调查记录表

调查日期: _____年__月__日

调查地点: _____省(自治区、直辖市) _____市 _____县(区)

公司名称: _____ 最近一年是否处理过臭虫: ☐是 ☐否

公司联系人: _____ 公司联系电话: _____

编号	臭虫发生时间	臭虫发生地点	环境类型*	联系人	联系电话

监测单位: _____ 监测人: _____ 审核人: _____

备注: 环境类型包括: 1.工地宿舍; 2.居民区; 3.学校宿舍; 4.工厂宿舍; 5.宾馆/酒店; 6.交通工具; 7.其他等。

表 7-3

臭虫密度监测记录表（目测法）

调查日期 _____ 年 ____ 月 ____ 日

调查地点 _____ 省（自治区、直辖市） _____ 市 _____ 县（区）

调查单位名称 _____ 联系人 _____

环境类型 _____ 联系电话 _____

臭虫种类鉴定 ☐ 温带臭虫 ☐ 热带臭虫

序号	房间位置 /房间号	监测 间数 *	臭虫成若虫		臭虫迹	
			阳性间数	成若虫数	阳性间数	臭虫迹数
合 计						

监测单位：_____ 监测人：_____ 审核人：_____

*备注：环境类型包括：1.工地宿舍；2.居民区；3.学校宿舍；4.工厂宿舍；5.宾馆/酒店；6.交通工具；7.其他等。

三、蝇类监测

（一）监测生境

笼诱法每个监测区县随机选择农贸市场、餐饮外环境、绿化带和居民区各不少于2处，各个监测地点相对固定。每个市选择至少2个区县。

目测法监测生境数量参照GB/T27772-2011国家标准《病媒生物控制水平 蝇类》按照城市人口规模抽取室内蝇类控制水平的抽查数量和室外蝇类孳生地控制水平的抽查数量。

（二）监测时间

笼诱法根据当地主要蝇类发生规律，确定常年的监测时间。当地月平均气温达到15℃时开始实施监测，低于15℃后停止监测，每月中旬监测一次，遇雨天顺延。

目测法在每年蝇类活动的高峰季节开展，在上半年和下半年各检查一次。

（三）监测方法

采用笼诱法（附录8-1）进行监测，应急监测可以采用粘捕法和目测法。

1. 笼诱法

每处放1个诱蝇笼，捕蝇笼着地放置。农贸市场监测环境内的捕蝇笼为避免农副产品对蝇类的引诱干扰，可将捕蝇笼设置在距离农贸市场50m～100m的绿地内。基本诱饵为红糖、食醋（陈醋）饵（50g+50g）+50ml水。每次监测一个白天，可于第一天9:00前（各地可根据当地作息情况适当调整）布放，第二天9:00左右收回，也可晨放晚收，但挂笼时间不得少于9小时。收笼后，用乙醚或氯仿杀死后分类，统计各蝇种的数量（见表8-1，汇总表见表8-3）。

2. 目测法

检查餐饮店、商场、超市、机关、企事业单位、饭店宾馆、农贸市场、医院、建筑拆迁工地、机场或车站室内成蝇、防蝇设施，检查室内外蝇类孳生物；检查室外垃圾容器、垃圾中转站、外环境散在孳生地、公共厕所的蝇类孳生物。

记录检查间数、阳性间数、蝇数、防蝇设施合格数、孳生物和阳性孳生物数（见表8-2，汇总表见表8-3）。

3. 粘捕法

适用于室内成蝇密度和种类监测。监测时将粘蝇带（400mm×35mm）挂置在离地面2.5m处，粘蝇带之间需相距3m以上，每标准间（判定方法与“2、目测法”相同）放置1条。监测时间为上午9点至下午3点（或者按照监测目的设定监测时间），记录粘捕到的蝇数（见表8-4，汇总表见表8-5）。

（四）统计与计算

1. 捕蝇笼蝇密度

$$\text{成蝇密度} = \frac{\text{捕蝇总数}}{\text{捕蝇笼数}}$$

2. 室内成蝇侵害率、成蝇密度、防蝇设施合格率和蝇类孳生率

$$\text{室内成蝇侵害率} = \frac{\text{阳性标准间数}}{\text{检查标准间数}} \times 100$$

$$\text{检查标准间数} = \frac{\text{实际检查面积}}{15}$$

$$\text{阳性标准间数} = \frac{\text{查见蝇数}}{3}$$

$$\text{室内蝇密度} = \frac{\text{蝇数}}{\text{阳性间数}}$$

$$\text{防蝇设施合格率} = \frac{\text{合格防蝇间数}}{\text{应防蝇间数}} \times 100$$

$$\text{蝇类孳生率} = \frac{\text{阳性孳生物数}}{\text{检查孳生物数}} \times 100$$

3. 粘蝇带蝇密度

$$\text{成蝇密度} = \text{捕蝇总数} / \text{粘蝇带数}$$

（五）质量控制

1. 监测工具的选择

诱蝇笼、粘蝇带等监测工具，一经选定后，尽可能稳定使用。

2. 监测生境及场所的选择

笼诱法选择的监测地点，应尽可能稳定，便于长期比较。应急监测中，粘捕法和目测法选择的监测生境和场所，应尽可能覆盖全部生境或场所，能代表当地城乡不同层次环境条件下的蝇类发生情况。

3. 标准间的判定

以15m²为一个标准间，其中小于15m²的独立房间视为1个标准间，大于15m²的房间按15m²每间折算标准间数。

4. 个人防护其他注意事项

在蝇传疾病、蝇蛆病风险地区开展监测时，接触蝇类的监测人员，应佩戴手套，工作结束后注意手部清洁，降低感染疾病的风险。

5. 种类鉴定

首先根据标本的外部形态，进行种类鉴定。若从形态上无法鉴定，则计入“其他”蝇种。有条件的地区可进行分子鉴定，或咨询专家支持，以增加种类鉴定的准确率。

（六）附表及附录

表8-1 蝇类监测记录表（笼诱法）

表8-2 蝇类监测记录表（目测法）

表8-3 蝇密度监测汇总表

表8-4 蝇类监测记录表（粘捕法）

表8-5 蝇类应急监测汇总表

附录8-1 蝇类监测工具及耗材

表 8-1

蝇类监测记录表（笼诱法）

调查时间：_____年____月____日 调查地点：_____省（自治区、直辖市）_____市_____区（县）_____街道（乡）

气温：_____℃ 风速：_____m/s 天气：晴☐；多云☐；阴☐； 诱饵种类：监测方案规定诱饵☐；其他：_____

环境类型	地点	家蝇	市蝇	丝光绿蝇	铜绿蝇	亮绿蝇	大头金蝇	伏蝇	新陆原伏蝇	巨尾阿丽蝇	红头丽蝇	厩腐蝇	夏厕蝇	元厕蝇	麻蝇科	其它	合计	备注
农贸市场																		
餐饮外环境																		
绿化带																		
居民区																		
合计																		

监测人：_____审核人：_____

表 8-2

蝇类监测记录表（目测法）

调查时间：_____年_____月_____日

调查地点：_____省（自治区、直辖市）_____市_____区（县）_____街道
（乡）

序 号	单位名称	成 蝇			不得有蝇 场所		防蝇设 施		蝇类孳 生地		备 注
		检 查 间 数	有 蝇 间 数	查 获 只 数	检 查 间 数	有 蝇 只 数	检 查 间 数	不 合 格 间 数	检 查 处 数	阳 性 处 数	
合 计											

监测人：_____审核人：_____

表 8-3 _____省/市/县_____年_____月蝇密度监测汇总表

笼诱法	环境		布笼数			捕蝇数				蝇密度（只/笼）		
	农贸市场											
	餐饮外环境											
	绿化带											
	居民区											
	合计											
目测法	检查类型	检查单位数	折合标准间数	阳性标准间数	室内成蝇阳性率（%）	阳性间密度（只/间）	应设防蝇设施间数	合格防蝇设施间数	防蝇设施合格率（%）	检查孳生物数	阳性孳生物数	孳生物阳性率（%）
	室内											
	室外	/	/	/	/	/	/	/	/			
	合计											

监测人：_____ 审核人：_____

表 8-4

蝇类监测记录表（粘捕法）

调查时间：_____年____月____日 调查地点：_____省（自治区、直辖市）_____市_____区（县）_____街道（乡）

气温：____℃ 湿度：____% 风速：____m/s 天气：晴□；多云□；阴□ 粘蝇带尺寸：_____

环境类型	地点	家蝇	市蝇	丝光绿蝇	铜绿蝇	亮绿蝇	大头金蝇	伏蝇	新陆原伏蝇	巨尾阿丽蝇	红头丽蝇	厩腐蝇	夏厕蝇	元厕蝇	麻蝇科	其它	合计	备注
合计																		

监测人：_____审核人：_____

表 8-5 蝇密度应急监测汇总表_____省/市/县_____年____月

粘捕法	环境		粘蝇带数			捕蝇数				蝇密度（只/条）		
	合计											
目测法	检查类型	检查单位数	折合标准间数	阳性标准间数	室内成蝇阳性率（%）	阳性间密度（只/间）	应设防蝇设施间数	合格防蝇设施间数	防蝇设施合格率（%）	检查孳生物数	阳性孳生物数	孳生物阳性率（%）
	室内											
	室外	/	/	/	/	/	/	/	/			
	合计											

监测人：_____ 审核人：_____

附录 8-1

监测工具及耗材

锥形芯圆形诱蝇笼，规格：笼高40cm，直径25cm，圆锥形芯高35cm，顶口直径2cm。

诱饵：红糖、食醋（陈醋）饵（50g+50g）+50ml水。

粘蝇带规格：400mm×35mm。

标本盒：规格自定，用于存放干制针插蝇类标本。

镊子（含眼科镊子）。

昆虫针：00#、0#、1#~5#，其中3#、4#应最多。

三级台：用于蝇类标本整姿。

白瓷盘：用于挑拣蝇类标本。

标本麻醉剂：乙酸乙酯或乙醚；也可选择在-20℃冰箱冷冻30分钟左右。

第三部分 抗药性监测

一、常规监测

（一）监测生境

每个监测县（区），选择辖区内不同方位的城市居民区、公园、医院、城乡结合部、农村等生境采集蚊虫、家蝇和德国小蠊，移入实验室饲养，进行抗药性测定。不同年度间抗药性监测试虫采集点应相对固定。

（二）监测病媒生物种类

蚊虫（当地优势蚊种或重要媒介蚊种至少一种，一旦选定，应持续监测）、家蝇和德国小蠊。

（三）监测频率和时间

蚊每年一次，蝇和蟑螂至少每两年开展一次抗药性监测。各类试虫应在其活动高峰期采集。

（四）待测卫生杀虫剂

选择当地防控蚊虫、家蝇和德国小蠊的常用卫生杀虫剂不少于 3 类。

（五）监测方法

1. 蚊虫抗药性测定

用 WHO 推荐使用的幼虫浸渍法和成蚊接触筒法（参考 GB/T26347-2010）分别测定幼虫和成蚊的抗药性。幼虫测定 3 龄末至 4 龄初幼虫对常用卫生杀虫剂的 LC_{50} （或 3 龄幼虫对吡丙醚的 IE_{50} ）。成蚊用诊断剂量测定其 24h 死亡率。

（1）蚊虫的采集和饲养

在当地有代表性的区域（如东、西、南、北、中不同方位，或者某一个特定区域），根据蚊虫的吸血活动、栖息和孳生环境采集蚊虫。按表 9-1

中列出的项目，记录采集时间、地点、经纬度、采集数量和虫态等信息。试虫采集后，根据蚊虫的孳生习性、成蚊或 4 龄幼虫形态学特征，鉴定种类，常规饲养至 F1 代。饲养室温湿度控制范围为温度（ 25 ± 1 ）℃和相对湿度（ 70 ± 10 ）%。

（2）成蚊抗药性测定

抗药性测定的实验室条件温度（ 25 ± 1 ）℃，相对湿度（ 70 ± 10 ）%。把恢复筒与隔板连接，用吸蚊管或静音吸气泵取 20~30 只羽化后 3~5 天的健康雌蚊放入恢复筒中，平行放置 15min，剔除不健康蚊虫。在隔板另一面装上已衬贴药纸（由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所提供或推荐）的接触筒，使恢复筒在下面，竖直放置，轻轻拍打使蚊虫聚集于恢复筒底部，然后瞬间把隔板抽开，颠倒接触筒与恢复筒位置，将恢复筒内蚊虫轻吹入接触筒，迅速关上隔板。将筒平放，即开始计算接触时间。

试虫死亡的判断标准：试虫完全不动，或仅躯体、足、翅或触角等震颤而无存活的可能性，视为死亡。若对照死亡率超过 20%，试验视为无效，重新测定。测试结果记入表 9-5。

结果用死亡率表述：

死亡率=（死亡虫数/试虫总数）×虫总数）

对照组死亡率小于 5%无需校正，对照组死亡率在 5%~20%之间，用 Abbott 公式进行校正。

校正死亡率=（处理组死亡率-对照组死亡率）/（1-对照组死亡率）×100%

抗性水平判断标准：在诊断剂量下蚊虫的死亡率在 98%~100%表明其为敏感种群；死亡率在 80%~98%（不含）表明其为可能抗性种群；死亡率<80%表明其为抗性种群（参考 GB/T 26347-2010）。

（3）幼虫浸渍法测定

用丙酮（Bti 溶剂为水）配制杀虫剂的 5~7 个系列浓度（倍比稀释）；取相应数量的烧杯，各加入 200mL 脱氯水，并用微量移液器吸去 100 μ L；首先在对照组烧杯加入 100 μ L 丙酮（Bti 加入 100 μ L 水），再依次向试验组中加入 100 μ L 各浓度药液，用玻璃棒或磁力搅拌器，按照对照、低浓度、高浓度的次序搅拌均匀。每个浓度设置至少 3 个重复。

用幼虫吸管，吸取 3 龄末至 4 龄初幼虫（吡丙醚、烯虫酯取用 3 龄幼虫），用小滤网将水滤掉，按照对照组、低浓度组到高浓度组依次分别加入 20~30 只幼虫。放入设定好的温度（25 $\pm$ 1） $^{\circ}$ C 和相对湿度（70 $\pm$ 10）% 的培养箱或房间中，24h 后查看蚊虫的死亡情况（吡丙醚观察至对照组试虫均羽化，具体做法及计算参照“师灿南等. 景洪市登革热媒介伊蚊对吡丙醚的敏感性及其作用特点[J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2017, 02: 108-112.”）。测定信息和结果记录见表 9-4，获得毒力回归线、致死中浓度 LC₅₀（吡丙醚计算羽化抑制中浓度 IE₅₀）、斜率值、卡方值等数据，计算抗性倍数（RR）。

RR=待测种群 LC₅₀ 值/敏感种群 LC₅₀ 值（或待测种群 IE₅₀ 值/敏感种群 IE₅₀ 值）

可参考如下标准判断抗药性水平：RR<3 为敏感，3 $\leq$ RR<10 为低抗，10 $\leq$ RR<40 为中抗，RR $\geq$ 40 为高抗。

2. 家蝇抗药性测定

家蝇的抗药性测定采用 WHO 推荐的点滴法（参考 GB/T26350-2010）。

（1）采集和饲养

用网捕或笼诱等方法，在代表性区域采集成蝇，也可以在养殖场挖取采集幼虫（蛆）。从采集到的蝇类中挑选家蝇，按表 9-2 中列出的项目，记录采集时间、地点、经纬度、采集数量和虫态等信息，在室内按照常规方

法饲养。养虫室温度： $(25\pm 1)^{\circ}\text{C}$ ，光周期：14L:10D，相对湿度： $(70\pm 10)\%$ 。

(2) 杀虫剂配制：用丙酮将杀虫药剂母液稀释到一系列的浓度（通过预试验确定药剂的浓度范围，最低浓度时死亡率小于 20%，最高浓度时大于 80%）。

(3) 测定和恢复环境：温度： $(25\pm 1)^{\circ}\text{C}$ ，光周期：14L:10D，相对湿度： $(70\pm 10)\%$ 。

(4) 测定方法

用乙醚或 CO_2 等麻醉羽化后 3~5 天的家蝇成虫至昏迷，挑出 30 只雌性家蝇，每 10 只一组进行称重，得到单只雌性家蝇的平均体重并做好记录。用点滴器将 $0.3\mu\text{L}$ 杀虫药剂溶液点滴在雌性家蝇的前胸背板上。每个处理组点滴 25 只雌性家蝇，以相应体积的溶剂点滴为空白对照，试验重复 3 次。将受药后的试虫转入清洁容器内，供给水和食物，正常饲养，24h 后统计死亡情况，填入表 9-4。凡腹部上翻、用锐器触之不能翻身爬行者判为死亡。根据每一浓度对应的死亡率求出回归方程，根据毒力回归方程求出 LD_{50} 值。

(5) 抗药性水平判定标准：敏感品系和测定样本 95%置信区间不重叠，且抗性倍数 (RR) ≥ 5 为抗性种群。或者根据如下标准判定： $\text{RR} < 2$ 为敏感， $2 \leq \text{RR} < 10$ 为低抗， $10 \leq \text{RR} < 20$ 为中抗， $\text{RR} \geq 20$ 为高抗。

3. 德国小蠊抗药性测定

采用药膜法，参见 GB/T26352-2010。

(1) 采集和饲养

用诱捕器（内部放置诱饵）、捕蟑器或粘蟑板等在所选生境采集试虫，数量不少于 50 只，按表 9-3 中列出的项目，记录采集时间、地点、经纬

度、采集数量和虫态等信息常规饲养。养虫室温湿度条件：温度：(25±1)℃，光周期：14L:10D，相对湿度：(70±10)%。

(2) 抗药性测定

药膜法

用丙酮或其他的有机溶剂将杀虫剂原液逐级稀释到所需浓度，取 2mL 药液加入 500mL 广口瓶中，加盖封口膜，用笔或镊子在封口膜上戳 3 个洞，在通风橱内滚动广口瓶（瓶壁、底部和肩部都要浸渍上药液，多次重复，大概 5~8min 即可），使药液均匀分布于瓶内壁，置于通风橱中过夜，使有机溶剂全部挥发。

每瓶放入试虫 10 只，用纱网或纱布封口。试验重复 5 次，以相应溶剂处理作为对照组。24h 后记录每次以及对照组的死亡数。试虫不能正常爬行或者完全不动视为死亡，可用器具碰触试虫查看其反应。测试结果记录见表 9-5。

(3) 结果计算

死亡率=（死亡虫数/试虫总数）×100%

对照死亡率小于 5%无需校正；对照死亡率在 5%~20%之间，用 Abbott 公式校正。对照死亡率大于 20%为无效测定，需重新进行测定。

校正死亡率=(处理组死亡率-对照组死亡率)/(1-对照组死亡率)×100%

(4) 抗药性水平判定标准：（校正）死亡率小于80%为抗性种群。

4. 分子生物学监测法（选做）

(1) 监测位点：

白纹伊蚊：检测神经轴突钠离子通道（VGSC）基因的 1016、1532、1534 位点；

埃及伊蚊：检测神经轴突钠离子通道（VGSC）基因的 1016、1534 位

点；

淡色库蚊/致倦库蚊：检测神经轴突钠离子通道（VGSC）基因的 1014 位点；

中华按蚊：检测乙酰胆碱酯酶基因 **ace119** 位点或神经轴突钠离子通道（VGSC）基因的 1014 位点；

家蝇：检测钠离子通道的 1014 位点或乙酰胆碱酯酶基因 **ace342** 位点；

（2）监测时间：每监测点两种监测对象每年各完成 1 次监测。

（3）监测方法：PCR 直接测序法、AS-PCR 法、PCR-RFLP 等，根据文献进行检测。

5. 抗药性监测数据上报

生物学测定方法的监测结果通过全国病媒生物监测系统（<https://121.36.60.127/cas/>）上报，每次监测工作完成后 5 个工作日内完成数据上报；分子生物学监测方法的监测结果通过 E-mail 上报。每月以省为单位上报本月抗药性工作完成进展以及遇到的困难和挑战等。上报邮箱：resistance@icdc.cn。

蚊类抗药性监测结果：不晚于 9 月 30 日上报监测结果；

蝇类抗药性监测结果：不晚于 10 月 30 日上报监测结果；

蟑螂抗药性监测结果：不晚于 10 月 30 日上报监测结果。

二、蚊虫化学控制效果应急评估

本方案推荐三种蚊虫杀虫剂产品抗药性应急监测方法，成蚊现场挂笼法（针对超低容量喷雾的灭蚊产品）和圆筒法（针对喷雾类灭蚊产品），幼虫采用浸渍法。各监测点可根据实际情况进行调整。

（一）试虫来源

需要施用药物的环境东、南、西、北、中各选一个点采集蚊虫成蚊或

幼虫。

（二）监测方法

1. 现场挂笼法

根据杀虫剂产品的剂型选择超低容量喷雾机或热烟雾机等器械使用空间喷洒的方式对待使用产品进行测试。

（1）操作说明

测试面积为 $200\text{m} \times 100\text{m}$ 的空地,无明显遮挡,设置四个检查点挂笼,分别离起点为 25m、50m、75m、100m,起点设置在试验场地的 200m 处的中点。蚊笼为直径 10cm,高度 15cm 的圆柱形,带有金属支撑框架,网眼大小不超过 1.2mm。蚊笼被放置在每个检查点的地面上方约 1.5 米处。每个点设置 3 个重复,对照挂在离现场不远处的上风口,确保不会接触到药剂。

（2）操作步骤

1) 在每个蚊笼中抓取 20~30 只雌蚊,并在干净环境中恢复 15min,保证试虫的活跃度;

2) 在每个检查点挂 3 个蚊笼,并确保蚊笼都暴露在外能接触到药;

3) 根据杀虫剂产品的说明的推荐剂量配制药液,并沿着 200m 的长边喷药,根据药量和距离测算喷药速度,确保 200m 的距离能将所配药液用完;

4) 15min 查看每个蚊笼的试虫击倒数,并将蚊虫转移到干净的一次性纸杯中,盖上纱布,放置 10%的糖水棉球;

5) 60min 再次查看每个纸杯中的试虫击倒数;

6) 将所有纸杯放置在温度为 26-28℃和湿度为 65%~85%的干净环境中,24h 后观察死亡率;击倒的判别标准为:腹部朝上不动,或足朝上能

运动但不能自主翻转。死亡的判别标准为：身体不动。

（3）结果判定

结果用 24h 死亡率表述：死亡率=（死亡虫数/试虫总数）×100%

对照组死亡率小于 5%无需校正，对照组死亡率在 5%~20%之间，用 Abbott 公式进行校正。校正死亡率=（处理组死亡率-对照组死亡率）/（1-对照组死亡率）×100%

杀虫剂效果判断标准：每个检查点的死亡率>90%表明该产品可用在现场蚊虫防控中。

2. 圆筒法

根据杀虫剂产品的剂型选择喷射剂或油稀释后的卫生杀虫剂产品使用喷雾的方式对待使用灭蚊产品进行测试。

（1）操作说明

参照国标 GB/T 13917.1-2009 中的圆筒装置，无色透明圆筒内径 200mm，高 450mm，配套喷头、托架、底盘、胶塞、喷头固定架、空气压缩机（压力可稳定达到 $9.8 \times 10^4 \text{Pa}$ ）。本方法仅作为推荐使用，各地可根据实际情况选择灭成蚊产品的评价方式。

（2）操作步骤

1) 采用圆筒装置。将 30 只羽化后 3~5 天未吸血的雌蚊（根据现场可得到的试虫适当调整）释放于装置内；

2) 待试虫恢复正常活动后，将待测药剂根据推荐使用药量用微量移液器或移液管移至小玻璃导管内，将喷头颈部固定于托架下面喷头固定架的喷头夹上，调节喷头固定架使喷头垂直嵌入喷雾筒装置底盘的中央圆孔内并固定好，关闭喷头的气阀，并使其与空气压缩机相连接。启动空气压缩机，通过减压阀调整压力至 $9.8 \times 10^4 \text{Pa}$ ，将喷头下面的平头 12 号注射针插

入装有待测喷射剂的小玻璃导管底部，开启气阀喷药。

3) 喷完药，立即计时，每隔一段时间记录被击倒的试虫数。20min 后，将被击倒试虫收集到清洁的养虫笼中，恢复标准饲养，用 5%糖水棉球饲喂，24h 检查死虫数。20min 后未被击倒的试虫不回收，计入活虫数。测试应设三次及以上重复。每次实验结束后，应清洗实验装置。

(3) 结果判定

判定标准：24h 死亡率 $\geq 90\%$ 且 $KT_{50} \leq 10\text{min}$ 可推荐本杀虫剂产品在本地用于蚊虫控制。

3. 幼虫浸渍法

检测杀蚊幼剂产品的推荐剂量下试虫的死亡率，从而评价该产品在当地蚊虫控制过程中的可用性。

(1) 操作说明

幼蚊抗药性应急监测参考常规监测方法中的幼虫浸渍法，参照国标 GB/T 26347-2010 中诊断剂量法，使用杀蚊幼剂产品的推荐剂量代替诊断剂量。

(2) 操作步骤

1) 使用脱氯水（或相应溶剂）配制杀蚊幼剂产品的推荐剂量，每个烧杯 200mL，每种杀虫剂设置 5 个重复；以脱氯水（或相应溶剂）设置同样数量的对照；

2) 用幼虫吸管，吸取 3 龄末至 4 龄初幼虫，用小滤网将水滤掉，按照对照组、实验组依次分别加入 20~30 只幼虫；

3) 放入设定好的温度〔 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 〕和湿度〔 $(70 \pm 10)\%$ 〕的培养箱或房间中，24h 后查看蚊虫的死亡情况（对作用慢的制剂，如昆虫生长调节剂，应在施药 7d 后或更长时间之后记录幼虫、蛹的存活数目）。

（3）结果判定

可参考如下标准判断抗药性水平：在推荐剂量下蚊虫的死亡率/羽化抑制率在 98%~100%表明其为敏感种群，说明该产品在本地可用；死亡率/羽化抑制率在 80%~97%表明其为可能抗性种群，说明该产品在本地使用须加大用药量；死亡率/羽化抑制率 <80%表明其为抗性种群，说明该产品在本地不可用。

（三）质量控制

本规范针对抗药性监测过程中的所有相关流程的质量控制规范进行了要求，包括试虫采集、试虫饲养、抗药性监测实验及抗药性监测数据上报。

1.试虫采集位置：为保证抗药性监测所用试虫的代表性，在试虫采集时应选择监测点的东、南、西、北、中五个方位点进行试虫采集，每个点的距离不少于 1km。

（1）采集数量：应尽可能地多采集一定的数量，可保证试虫的传代及抗药性监测实验的顺利进行。

（2）采集点的信息记录：使用标签纸、记录表格、卫星定位仪、温湿度计等工具，准确记录采样点的位置信息，为后续数据分析提供依据。

（3）种类鉴定：抗药性监测所用的试虫必须是单一虫种，试虫采集时应充分考虑所监测试虫的生境特点，如白纹伊蚊孳生于小型水体。如果采集当时无法鉴别种类，应饲养一代后通过成虫特征进行鉴别。

2.试虫饲养

（1）饲养空间：每个饲养间面积不宜过大，5m²-10m² 即可，不同品系的试虫应分开饲养，以防在饲养的过程中混合。

(2) 饲养饲料：同一种试虫的饲料不宜经常更换，根据实验室情况进行购买；

(3) 饲养密度：蚊幼虫（不超过 400 条/盆），蚊成虫（不超过 300 只/笼），家蝇幼虫（150 只/缸），家蝇成虫（300 只/笼）；

(4) 家蝇试虫体重：平均 18~20mg/雌；

(5) 德国小蠊传代饲养：应及时进行德国小蠊饲养缸的更换，及时取出卵夹，代际分明，从而获得特定龄期的标准试虫；

(6) 试虫性别：学会正确识别试虫的性别，抗药性监测中使用雌成蚊、雌成蝇、雄性蟑螂成虫进行试验；

(7) 试虫龄期：饲养时应正确记录试虫的龄期，蚊幼虫（大多数杀虫剂使用 3 龄末 4 龄初幼虫，部分昆虫生长调节剂使用 3 龄幼虫），成蚊（羽化后未吸血 3~5 日龄的雌蚊），蝇（羽化后 3~5 日龄的雌蝇），德国小蠊（羽化后 10~15 的雄性蟑螂成虫）；

(8) 饲养信息记录：每日进行试虫的饲养情况的记录，如分蛹、泡卵、喂食等操作都应做好详细记录；

(9) 饲养环境记录：应设置 24 小时温湿度记录及报警装置，环境条件有问题时及时进行调整，并做好纸质记录作为备份和留档；应设置灯光自动开关装置（14L:10D）；

(10) 饲养室防逃逸装置：每个饲养间应安置挡鼠板、纱门、风幕，饲养室外门应有缓冲间，缓冲间内门上方应安装灭蚊灯、风幕，每个房间放置粘蟑纸。

3. 抗药性监测实验

(1) 实验前应进行环境条件的评价，用待测试虫或家蝇成虫 20~30 只放在环境中，过夜后死亡率小于 5%才可进行实验；

(2) 杀虫剂：所使用的杀虫剂药膜滤纸及杀虫剂原药需由中国疾控中心传染病所统一提供或推荐；

(3) 药液配置：应使用标定过的容量瓶进行母液的配置，并逐级等比向下稀释，不得等差稀释；

(4) 每组实验必须设 3 组及以上的对照，对环境条件、实验操作等进行质量控制；

(5) 操作实验时应该按照先对照，再从低浓度到高浓度进行操作，否则必须换手套，防止交叉污染；

(6) 试虫挑选保证大小均一，数量适宜，如蚊蝇实验每组在 20~30 只，不可过多也不可过少，德国小蠊实验每组 10 只；

(7) 成蚊实验时应该保证试虫在恢复筒中完全恢复才可进行接触实验；家蝇实验时应保证对照组完全苏醒过来才可进行实验组的点滴。

4. 抗药性监测数据上报

(1) 根据监测试虫种类填报样本采集信息；

(2) 抗药性监测实验一经完成，必须在 5 个工作日内完成数据上报；

(3) 监测点工作完成后，及时提醒省级疾控进行审核，对所填各项数据正确性、合理性认真核查（如部分单位所填数据对照死亡率>20%，每组重复少于 3 个，死亡数大于总数等），并提出整改意见，不要批量点击审核通过；

(4) 需要计算毒力回归线的数据必须计算 LC_{50}/LD_{50} ；

抗药性监测工作完成后需在 5 个工作日内完成系统上报。蚊虫抗药性监测每年 9 月 30 日之前完成数据上报，蝇蟑抗药性监测每年 10 月 30 日之前完成数据上报，如无法按期完成，必须提前与国家疾控相关负责人联系。

三、附录及附表

表 9-1 蚊虫采集信息记录表

表 9-2 家蝇采集信息记录表

表 9-3 德国小蠊采集信息记录表

表 9-4 病媒生物抗药性测定记录表（毒力回归线）

表 9-5 病媒生物抗药性测定记录表（诊断剂量）

表 9-6 WHO 及传染病所推荐的部分诊断剂量

表 9-7 白纹伊蚊幼蚊对常用杀虫剂的 LC_{50} (mg/L) 值

表 9-8 家蝇成虫对常用杀虫剂的 LD_{50} ($\mu\text{g}/\text{♀}$) 值

_____省（自治区、直辖市）_____地（市）_____县（区）

[illegible]

采集单位: _____ 采集人: _____

表 9-2

家蝇采集信息记录表

_____省（自治区、直辖市）_____地（市）_____县（区）

编号	采集时间	采集地点	生境特点	经度，纬度	数量		备注
					成蝇	幼虫	

采集单位：_____ 采集人：_____

表 9-3

德国小蠊采集信息记录表

____省（自治区、直辖市）____地（市）____县（区）

编号	采集时间	采集地点	生境特点	经度，纬度	数量（只或块）				备注
					雌成虫	雄成虫	若虫	卵荚	

采集单位：_____ 采集人：_____

表 9-4

病媒生物抗药性测定记录表（毒力回归线）

_____省（自治区、直辖市）_____地（市）_____县（区）

试虫名称：_____			虫源地名：_____				
药剂名称：_____			经度：_____				
测定人：_____			纬度：_____				
虫态：_____虫龄：_____			英文药名：_____				
培育温度：____℃；相对湿度：____%			处理日期：_____年____月____日至____月____日				
			测定室温：____℃；相对湿度：____%				
处理浓度/剂量 单位	重复 1		重复 2		重复 3		合计
	死虫数	总虫数	死虫数	总虫数	死虫数	总虫数	死/总
对照							/
							/
							/
							/
							/
处理虫数：_____毒力回归线：_____ χ^2 ：_____ 自由度 (n)：_____斜率 b 值 (95%置信限)：_____ LC ₅₀ /LD ₅₀ ：_____95%置信限：_____ LC ₉₅ /LD ₉₅ ：_____95%置信限：_____							
备注：蚊幼虫测定 LC ₅₀ (mg/L)，家蝇成虫测定 LD ₅₀ (0 家蝇雌)；家蝇抗药性监测 时需在备注处填入单只雌家蝇的平均体重 (mg)							

监测单位：_____监测人：_____审核人：_____

表 9-5 _____病媒生物抗药性测定记录表（诊断剂量）

_____省（自治区、直辖市）_____地（市）_____县（区）

试虫名称：_____			虫源地名：_____			
药剂名称：_____			经度：_____			
测定人：_____			纬度：_____			
虫态：_____虫龄：_____			英文药名：_____			
培育温度：____度；相对湿度：____%			处理日期：____年__月__日至__月__日			
			测定室温：_____；相对湿度：____%			
重复	对照		A 杀虫剂名称		B 杀虫剂名称	
			浓度及单位/ 接触时间及单位		浓度及单位/ 接触时间及单位	
	死虫数	总虫数	死虫数	总虫数	死虫数	总虫数
I						
II						
III						
IV						
V						
VI						
VII						
VIII						
IX						
X						
合计						
备注：本表格适用于通过诊断剂量测定成蚊及德国小蠊成虫的抗药性。						

监测单位：_____ 监测人：_____ 审核人：_____

表 9-6

WHO 及传染病所推荐的部分诊断剂量

杀虫剂名称	埃及伊蚊（%）	白纹伊蚊（%）
氯菊酯	0.4	0.4
溴氰菊酯	0.03	0.03
高效氯氟氰菊酯	0.02	0.07
顺式氯氰菊酯	0.04	0.08
残杀威	-	0.05*
噁虫威	0.2	0.2
毒死蜱	0.8	2
马拉硫磷	1.5	0.5*

注：标*为传染病所推荐。接触时间均为 1h。

表 9-7 白纹伊蚊幼蚊对常用杀虫剂的 LC₅₀ (mg/L) 值 (2017 年传染病所媒介室建立)

杀虫剂名称	幼虫 LC ₅₀ (95%CI) , mg/L
溴氰菊酯	0.000469 (0.000376-0.000582)
高效氯氰菊酯	0.000536 (0.000328-0.000750)
氯菊酯	0.001820 (0.001480-0.002230)
顺式氯氰菊酯	0.003180(0.002851-0.003642)
高效氯氟氰菊酯	0.000524(0.000433-0.000624)
双硫磷	0.001320 (0.001048-0.001686)
马拉硫磷	0.013995 (0.011087-0.017897)
杀螟硫磷	0.016649 (0.013426-0.020168)
DDVP	0.024432 (0.017227-0.033958)
残杀威	0.265254 (0.225904-0.309374)
噁虫威	0.615237(0.446601-0.812471)
DDT	0.019053(0.015431-0.022986)

表 9-8 家蝇成虫对常用杀虫剂的 LD₅₀ (μg/♀) 值 (2022 年传染病所媒介室建立)

杀虫剂名称	LD ₅₀ (95%CI), μg/♀
溴氰菊酯	0.002236 (0.002101-0.002385)
高效氯氰菊酯	0.003692 (0.003331-0.004110)
氯菊酯	0.007152 (0.006454-0.007866)
敌敌畏	0.07420 (0.06784-0.08214)
残杀威	0.4159 (0.3600-0.4842)
呋虫胺	0.1036 (0.09737-0.1105)

第四部分 病原学监测

第一章 鼠传病原监测

一、监测对象

（一）鼠类宿主动物

1. 生态学监测标本

参照《全国病媒生物监测方案（2024 年版）》（国疾控综监测发〔2024〕21 号）和《技术指南》“鼠类监测”相关要求执行。监测范围主要包括城镇居民区、重点行业（餐饮、食品制售、建筑工地、屠宰场和酿造厂等）、农村居民区、农田和林地等生境。

2. 补充监测标本

各地可根据本地鼠传疾病流行情况和本地条件适当补充采样区域，增加其他生境鼠类生物标本的采集。

3. 鼠类监测标本的数量

各监测点（市级）全年标本合计不少于 200 只，每 6 个月不少于 100 只，包括全部生态学监测和补充监测所获鼠类标本。

（二）鼠传病原

本技术指南主要针对法定传染病中的主要鼠传病原、引起新发和再发传染病的鼠传病原以及具有潜在威胁人类健康的鼠传病原进行监测。监测病毒为汉坦病毒和大别班达病毒（*Dabie bandavirus*）。各地应根据实际情况，选择至少 2 种致病菌进行监测，监测范围包括以下病原：致病性钩端螺旋体（问号钩端螺旋体）、地方性斑疹伤寒立克次体（莫氏立克次体）、嗜吞噬细胞无形体、巴尔通体、恙虫病东方体以及土拉弗朗西斯菌。

二、监测时间

首先参照《技术指南》中“鼠类监测”执行，采集生态学监测标本。标本数量不足时，可根据当地实际情况，在目标病原的鼠间流行高峰期增加监测。

三、监测方法

（一）鼠类宿主动物

参照《技术指南》中“鼠类监测”执行（表 1），记录标本基本信息（附表 10-1）。

表 1 鼠类动物采集方法

宿主动物	采集方法 ^a		
	常规监测点	补充监测点 ^b	鉴定方法
鼠类	夹（笼）夜法	夹（笼）夜法	形态学和（或） 分子生物学 ^c
注： ^a 参照《技术指南》； ^b 可根据当地鼠传病原和相关传染病的流行情况适当增加多种生境和流行高峰期鼠类生物标本的采集； ^c 参考附录 2-3 鼠类分子鉴定方法			

（二）鼠传病原

鼠传病原检测可选择单重荧光定量 PCR 法、多重荧光定量 PCR 法（荧光探针法、熔解曲线法等），以及全自动多病原核酸快速检测系统等具有同等检测性能的设备和方法。检测操作前，提前准备好所需试剂和耗材，调试仪器，核对标本。具体操作主要包括鼠类动物组织标本采集、保存和运输、核酸提取和扩增、结果判读和数据分析。核酸扩增检测与核酸提取步骤需要分区操作，在专门的 PCR 室或区

域进行。

1. 组织标本采集、保存和运输

鼠类肝、脾、肺和肾生物组织取样在生物安全二级实验室或等同于生物安全二级防护操作区完成。

(1) 主要仪器设备、试剂与耗材

生物安全柜、-80 °C 全超低温冰箱、液氮罐、眼科镊、眼科剪、大号镊子、冻存管、鼠袋、搪瓷盘、固定板；RNAlater 保存液、75% 乙醇、棉球。

(2) 鼠类采集

捕获的活鼠连同鼠笼装入鼠袋，扎紧袋口，严防体表寄生虫逃逸。将捕获的死鼠从鼠夹上取下，单只装入鼠袋，扎紧袋口，严防体表寄生虫逃逸。登记捕获方法、时间、地点、状态（活体、死亡、是否腐败等）等鼠标本的基本信息（附表 10-1）。未解剖动物不可置于-20 °C、-40 °C 和-80 °C 冻存。

(3) 鼠类脏器组织采集

1) 操作用的解剖器械均需高压灭菌处理，将所用器械以解剖顺序依次排列在搪瓷盘内。

2) 鼠体固定于解剖盘或固定板上，腹部向上，用 75%乙醇棉球消毒腹部皮肤。

3) 以镊子提起下腹部皮肤，用剪刀剪开，并沿正中线直剪到颈部。

4) 打开腹腔，切取适量肝、脾和肾组织放入冻存管中，保存在-20 °C、-40 °C 或-80 °C 超低温冰箱或液氮罐中。

5) 切开膈肌，剪断两侧软肋骨，打开胸腔，切取适量肺组织放

入冻存管，保存在-20℃、-40℃或-80℃超低温冰箱或液氮罐中。同一只鼠的组织标本可以置于同一管中。

6) 解剖完毕，将剩余鼠体消毒灭菌按医疗废弃物处理，75%乙醇处理操作台面，紫外消毒 30 min。所用的器械均需高压消毒处理。

7) 用于病原检测的组织标本可直接冷冻保存（-20℃、-40℃或-80℃超低温冰箱）或液氮罐中保存；也可置于 RNAlater 保存液中，再保存于-20℃、-40℃或-80℃冰箱中。RNAlater 保存液中新鲜组织的 RNA 可以完好地在-20℃、-40℃或-80℃下长期保存。标本运送时采用低温冷藏运输，避免组织化冻。

2. 核酸提取

（1）主要仪器设备、试剂与耗材

组织研磨仪、核酸提取仪、超微量核酸浓度测定仪、10-1000 μL 移液器；动物组织基因组 DNA/RNA 提取试剂盒、PBS 缓冲液、1.5 mL 和 2 mL 无核酸酶离心管、氧化锆或不锈钢研磨珠。

（2）组织研磨

1) 提前准备好装有适量研磨珠（Φ1.2 mm，20~30 颗）的 2 mL 离心管，高压灭菌备用。

2) 剪取等量肝、脾、肾和肺（较其他组织多 1 倍）组织置于上述装有研磨珠的 2 mL 离心管中，质量约为 25-30 mg，加入 200-300 μL 的 1×PBS 缓冲液。

3) 盖紧离心管盖，做好标记，放入研磨仪适配器样品架中。

4) 将样品架放入夹具中装好拧紧，打开研磨仪开关，选择程序进行研磨。

5) 将样品架放入夹具中装好拧紧，打开研磨仪开关，选择程序

进行研磨。

研磨参数为：速度 1600 rpm；时间 30 s；暂停 10 s；循环 3 次。
或者根据仪器设备具体情况设定参数。

6) 结束后取出研磨管，匀浆基本无组织块即可。轻甩离心后用于后续实验。

(3) 核酸纯化

1) 按照核酸提取试剂盒说明取适量标本（研磨液）进行裂解，使用 1000 μL 研磨枪头充分吹打混匀，勿产生泡沫。

2) 以下步骤为自动化核酸提取常规步骤，可根据仪器设备具体情况适当调整。

3) 取出试剂盒中的各组分，平衡至室温，将可能粘附在预封装深孔板铝膜及孔壁的液体甩至孔底，然后静置 3 min。

4) 小心撕开预封装深孔板铝膜，向第 1、7 列（A1-H1、A7-H7 孔位）依次加入上步的消化混合液和 40 μL 蛋白酶 K 溶液。

5) 将预封装深孔板放入提取仪中，插上搅拌套，选择相应的提取程序（或者扫描预封装深孔板上的二维码），点击“开始”运行。

6) 按规定程序进行自动化提取。

7) 自动化程序结束后，将第 6 及第 12 列的洗脱液（即核酸溶液）转移至无核酸酶的离心管中，测定浓度，-20 $^{\circ}\text{C}$ 、-40 $^{\circ}\text{C}$ 或 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存待检。

3. 实时荧光定量 PCR/RT-PCR 检测鼠传病原

主要仪器设备、试剂与耗材包括：荧光定量 PCR 仪，10-1000 μL 移液器；Taqman 探针 qPCR 试剂盒（适用于 DNA 病原），一步法 Taqman 探针荧光定量 RT-PCR 试剂盒（适用于 RNA 病毒）；10-1000

μL 吸头、1.5-2.0 mL 无核酸酶离心管。

(1) 莫氏立克次体等 6 种鼠传致病菌

1) 引物和探针序列见表 2。

表 2 检测 6 种鼠传致病菌的引物和探针序列

检测病原	引物和探针名称	引物和探针序列 (5'-3')
莫氏立克次体	Pr47F	TGTTGATGGTGCAGGATTGA
	Pr110R	CGAATTTGTAGCGACAGGAAGA
	mo-T	FAM-CAAACCTGGCGCTGGTGT-MGB
嗜吞噬细胞无形体	wu-FP	CCACGCAAGTCGCATTGAT
	wu-RP	GCCGGGTACTTTCGCAATT
	wu-T	FAM-CTTACAGGTGCTATCATC-MGB
恙虫病东方体	Ot56 kD-F	CGCCAGTRATMATTCCTCCRA
	Ot56 kD-R	TTYWGCTAGTGCRATAGAATTRG
	Taqman-Ot	FAM-TAAGGACCACACTCTAATC-MGB
土拉弗朗西斯菌	AKR-F	GCAGGGCGAGCACCATT
	AKR-R	ATCTTGCATGGTCACCACTTGA
	AKR-T	FAM-CGATATTTGCCTGTTAGCACTCCT-BHQ1
巴尔通体	ssrA-F	GCTATGGTAATAAATGGACAATGAAATAA
	ssrA-R	GCTTCTGTTGCCAGGTG
	ssrA-T	FAM-ACCCCGCTTAAACCTGCGACG-BHQ1
致病性钩端螺旋体	Lepto F	CCCGCGTCCGATTAG
	Lepto R	TCCATTGTGGCCGR (A/G) ACAC

	Lepto P	FAM-CTCACCAAGGCGACGATCGGTAGC-BHQ1
--	---------	-----------------------------------

2) 扩增体系

反应体系按试剂盒说明书配制。以下为示例，总体积为 20 μL ，Taq DNA 聚合酶和 dNTP 混合液 qPCR Master Mix 10 μL ，探针 0.4 μL （终浓度 200 nmol/L），上下游引物各 0.8 μL （终浓度 400 nmol/L），DNA 模板 3-5 μL ，去离子水补齐。反应设阳性和空白对照，阳性对照模板为检测病原的靶标序列质粒标准品或者核酸。

3) 反应参数

第 1 步，95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min，1 个循环；第 2 步，95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s，60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s，40 个循环。

4) 结果判读与记录

请参照各仪器使用说明书进行设置，反应结束后自动保存结果。根据扩增曲线图像，分析后调节基线，通常为系统默认（用户可根据实际情况自行调整）。各类鼠传病原检测阈值：莫氏立克次体 $\text{Cq} \leq 36$ 、嗜吞噬细胞无形体 $\text{Cq} \leq 35$ 、恙虫病东方体 $\text{Cq} \leq 33$ 、土拉弗朗西斯菌 $\text{Cq} \leq 36$ 、巴尔通体 $\text{Cq} \leq 35$ 和致病性钩端螺旋体 $\text{Cq} \leq 35$ 。以上阈值为应用伯乐 CFX96 扩增仪判断标准，如使用其他型号扩增仪应重新评估检测阈值。记录判读结果并存档（附表 10-2）。

(2) 实时荧光定量 RT-PCR 检测汉坦病毒及分型

1) 引物和探针序列见表 3。

表 3 检测汉坦病毒的引物和探针序列

汉坦病毒分型	引物和探针名称	引物和探针序列 (5'-3')
--------	---------	-----------------

汉滩型 HTNV	HF (771-793)	GCTTCTTCCAGATACAGCAGCAG
	HR (862-884)	GCCTTTGACTCCTTTGTCTCCAT
	HP (811-839)	FAM-CCTGCAACAAACAGGGAYTACTTACGGCA-BHQ1
汉城型 SEOV	SF (217-237)	GATGAACTGAAGCGCCAACTT
	SR (272-291)	CCCTGTAGGATCCCGGTCTT
	SP (239-263)	HEX-CCGACAGGATTGCAGCAGGGAAGAA-BHQ1
注：方法引自庞正. 病毒性出血热多重荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立[D]. 中国疾病预防控制中心, 2013.		

2) 扩增反应体系

反应体系按试剂盒说明书配制。以下为示例，总体积为 25 μL ，反应设阳性和空白对照。

成分（浓度）	体积（ μL ）
2×Reaction Mix	12.5
上游引物 HF（10 μM ）	0.5
下游引物 HR（10 μM ）	0.5
探针 HP（10 μM ）	0.3
上游引物 SF（10 μM ）	0.5
下游引物 SR（10 μM ）	0.5
探针 SP（10 μM ）	0.3
Enzyme mix	1.0
RNA 模板	5.0
加无核酸酶水至	25.0

注：此反应为多重 RT-qPCR。

3) 反应参数

50 °C 30 min; 95 °C 10 min; 95°C 15 s, 60 °C 45 s, 40 个循环。

4) 结果判读与记录

检测阈值为 $C_q \leq 35$ 。记录判读结果并存档（附表 10-2）。

(3) 实时荧光定量 RT-PCR 检测大别班达病毒

1) 引物和探针序列见表 4。

表 4 检测大别班达病毒的引物和探针序列

基因片段	引物和探针名称	序列和探针序列 (5'-3')
S 基因	S-F-3	GGGTCCCTGAAGGAGTTGTAAA
	S-R-3	TGCCTTCACCAAGACTATCAATGT
	S-Probe-3	TexasRed-TTCTGTCTTGCTGGCTCCGCGC-BHQ2
L 基因	L-F-3	AGTCTAGGTCATCTGATCCGTTYAG
	L-R-3	TGTAAGTTCGCCCTTTGTCCAT
	L-Probe-3	HEX-CAATGACAGACGCCTTCCATGGTAATAGGG-BHQ1
M 基因	M-F-3	AAGAAGTGGCTGTTCATCATTATTG
	M-R-3	GCCTTAAGGACATTGGTGAGTA
	M-Probe-3	FAM-TCATCCTCCTTGGATATGCAGGCCTCA-BHQ2

2) 扩增反应体系

反应体系按试剂盒说明书配制。以下为示例，总体积为 25 μ L，

反应设阳性和空白对照。

成分（浓度）	体积（ μL ）
2×Reaction Mix	12.5
上游引物 S-F-3 (10 μM)	0.5
下游引物 S-R-3 (10 μM)	0.5
探针 S-Probe-3 (10 μM)	0.3
上游引物 L-F-3 (10 μM)	0.5
下游引物 L-R-3 (10 μM)	0.5
探针 L-Probe-3 (10 μM)	0.3
上游引物 M-F-3 (10 μM)	0.5
下游引物 M-R-3 (10 μM)	0.5
探针 M-Probe-3 (10 μM)	0.3
Enzyme mix	1.0
RNA 模板	5.0
加无核酸酶水至	25.0
注：此反应为多重 RT-qPCR。	

3) 反应参数

50 °C 30 min; 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 45 s, 40 个循环。

4) 结果判读与记录。

检测阈值为 $C_q \leq 35$ 。记录判读结果并存档（附表 10-2）。

四、数据上报

各监测点负责完成辖区内的鼠传病原监测数据收集、整理与上报。

参照“表 1-2 不同病媒生物的监测频次、时间及数据上报要求”将监测结果上报至“全国重要病媒生物监测系统”的“鼠传病原监测”模块中。按“监测系统”要求填写，保证录入数据真实可靠，其中“检测人”“填报人”和“样品采集人”需录入中文真实姓名。上级疾病预防控制中心需及时审核上报数据的准确性与完整性。

五、质量控制

监测数据的质量控制体系是确保监测数据准确、可靠和具有代表性的重要手段。一个完善的数据质量控制体系能够确保数据的可信度，为传染病预防控制提供决策支持。以下是鼠传病原监测数据质量控制的主要内容：

（一）前期准备

明确监测目的和要求，确定监测数据的种类、范围和精度等要求，建立明确的质量控制管理制度，有体系文件和相关记录，全过程可追溯，确保监测数据准确可靠。

1. 工作部署的下达

（1）各级疾控机构发布相关工作指导文件，包括国家级的《监测方案》和《技术指南》以及省、市级监测实施方案（执行方案或者工作意见等）。

（2）通过“会议+培训”等方式清晰传达上述文件和相关操作内容。

（3）如有“监测方案”修订，应尽快以文件形式发布，有必要则需进行相应培训。

2. 实验室质量控制管理

各相关实验室依据相关法律法规和行业标准进行质控管理，主要包括以下实验室的操作活动。可参照实验室质量认可体系管理相关实验室环境、操作流程、设备、管理文件和人员培训等内容。

（1）生物安全实验室：注意组织与管理、人员培训与资质、设施与设备、实验材料管理、操作规范和废弃物处理等方面。

（2）PCR 实验室：分区管理，制定登记、消毒和实验室环境监测制度；规范管理专用仪器设备和试剂耗材的使用；对操作人员进行岗位规范化培训；制定实验标准操作程序；制定技术资料档案管理制度，规范管理相关档案资料等内容。

（3）仪器设备：有统一规范的管理制度，如建立设备档案，设置唯一标识，由经培训的授权人员操作，定期维护和校准等。注意分区使用与流向管理，需按照实验室分区严格使用，遵循单一流向制度，防止交叉污染。故障设备不可再进行实验检测活动，应设置“停用标识”，以避免误用。更换检测设备可能对检测结果造成影响的，要进行评估，并记录结果。

（4）试剂和耗材：有统一规范的管理制度，保证质量的前提下，按照《监测方案》和《技术指南》要求选择适用的试剂和耗材。实验室应根据试剂和耗材的性质，合理选择储存方式和时间，确保试剂和耗材的使用性能不变。更换试剂或者耗材可能对检测结果造成影响的，要进行评估，并记录结果。使用过程中，如发现试剂或者耗材存在问题，应立即停止使用，实验结果需重新评估，并记录相关情况。

（5）实验操作人员：培训上岗，熟练掌握相关操作技术，有质控意识，具备生物安全知识和意识等。

（6）监测方法：在符合“监测方案”的基础上，制定符合本地实验室工作实际情况的标准操作流程（SOPs），确保结果数据的准确性和可靠性。

（二）采样

1. 采样设计

采样时间和采样点按照《监测方案》和《技术指南》要求，以市级为单位，确保采样具有代表性，能够反映整体情况。特别需要关注近年发生相关传染病的地区鼠类宿主带毒/菌情况。不在监测范围内的、有病例发生的采样点应扩大监测，或者向上级疾控机构提出监测需求与理由。

2. 采样过程控制

对采样人员进行培训，确保采样技术熟练、过程符合规范，避免人为因素导致的误差。

(1) 现场：获取鼠类动物的区域包括“生态学”和“补充”监测场所。

(2) 采样工具：鼠夹、鼠笼、鼠饵和鼠袋等。

(3) 采样记录：必须准确记录时间、地点、采样人员、地理位置和环境等信息。

(4) 运输：捕获的动物做到一只一袋，袋口密封，保证体表寄生虫不能爬出，置于符合生物安全要求的保温箱或者转运箱中；外环境炎热、运输时间较长时，需要将动物标本低温冷链运送至实验室。

(5) 鼠种鉴定：在进行动物解剖取样前要进行种类鉴定和记录，有鉴定困难的标本保留鼠体形态标本和组织（或核酸）标本逐级寻求上级鼠类分类专家指导鉴定工作。有新发现鼠种不在监测上报系统中列出的，需要在词条记录的备注中注明鼠种。

(6) 动物组织采集：动物采集后立即送到生物安全实验室进行解剖，采集肝、脾、肺和肾组织，每种组织留取 2 份置于采样管中，每管中各包括肝（g）、脾（p）、肺（f）、肾（s）4 种组织，1 管用于检测，1 管送省级疾控实验室进行复核验证。管身标识清晰，标注编号（具有唯一性）、组织类型和日期。注意在动物组织采集前要核实编号等信息，解剖采样时一只动物用一套消毒后的剪刀镊子。

(7) 动物组织保存：标本采集完成如不立即进入检测流程，需

立即置于-20℃以下冰箱保存，或者加 RNAlater 组织保存液，按照使用说明操作后置于冰箱保存待检。标本在完成检测前避免反复冻融，以免影响检测结果。

（三）检测

在检测标本的整个过程中，各个环节的要素都会对结果产生影响，各环节的质量控制是保证结果准确可靠的基本要求。全部检测环境要符合生物安全和标本处理要求。操作人员需有定期培训和记录，熟练掌握相关实验技术，并有定期考核制度。

确保所有仪器处于正常的工作状态，移液器、封膜仪和荧光定量 PCR 仪等均可能影响核酸检测结果的准确性，更换不同厂家和型号的仪器时要进行质控品的结果比对并记录结果。可通过实验室质量认证认可体系定期进行仪器校验，也可请仪器生产厂家进行定期校验和保养。

选择质量和信誉好的厂商试剂与耗材，不同品牌及不同批次均应进行试剂验收并记录结果，包括敏感性、特异性等。各检测实验室需要依据《监测方案》和《技术指南》提供的检测方法，制定符合各自实验室实际操作流程的 SOPs，并严格遵循 SOPs 进行操作，如有更改则需重新评估比对检测结果并记录。通过实验室各环节要素质量控制，提高实验室检验工作的精密度。以下是在鼠类标本病原检测各主要环节中需要注意的质量控制点。

1. 标本预处理

在提取核酸前，需要进行研磨匀浆，注意控制在最短时间内完成，

以免研磨时间过长导致核酸降解；完成研磨后，需要立即进入核酸提取环节。做到“不提取不研磨，研磨就要提取”。

2. 核酸提取

肝脾肺肾 4 种组织可混合在一管中提取核酸，要注意剪取适量组织，过多会导致提取的核酸质量下降影响检测结果。提取后需要测定浓度和质量值，观察是否提取成功。提取后尽快进行检测，否则 RNA 易于降解，导致假阴性结果增多。如无法尽快检测，核酸应立即置于 -80 °C 冰箱保存待检，一周内完成检测。

3. 实时荧光定量 PCR/RT-PCR （qPCR/RT-qPCR）

（1）反应体系：为减少实验数据错误、降低误差，保证标本检测的准确性，避免检测过程中的假阴性和假阳性，在进行核酸扩增这一步必须设置质控品，至少包括阳性对照（PC）、阴性对照（NC）或者无模板对照（No Template Control, NTC），以监控系统故障、反应体系污染情况、核酸提取有效性及扩增效率。

（2）重复实验：同一标本设置平行孔，一般为 2-3 孔，如果结果判定有疑义，则需要进行重复实验，至少 2 次，再进行结果判定。当质控品结果超出规定的失控限，不论实验结果是否满意都应弃去不用，重新进行试验，要保存所有的质控数据和失控处理记录。

（3）试剂和耗材：是 qPCR/RT-qPCR 实验室过程中重要环节。荧光染料需避光保存，加入反应液后应尽快上机，以防探针见光后荧光强度减弱或消失。所有试剂在开启之前都需瞬时离心，配制完成后仍需瞬时离心去除气泡。应使用无 RNase 的实验器具及耗材。

(4) 预防污染：实验完成后，反应的离心管做到“无必要，不开盖”，特别是阳性对照管。在全过程中，要严守 SOP 手册进行操作，手册中应将可能造成污染的环节进行提示，以及发生污染后的处理方法，避免污染导致的假阳性结果。

(四) 数据处理与上报

数据处理包括采集、审核与录入等多个关键环节，需要设置双人负责，以确保数据准确无误上报到“监测系统”。

1. 数据采集

确保数据采集过程无误，首先观察质控品结果是否达到要求，确认实验是否成立，读取标本结果时注意核对编号或者名称，避免数据混淆、漏读、丢失或污染。

2. 实验结果 Cq (Ct) 值审核

对采集的数据进行审核，剔除异常值、错误值等，确保数据的准确性。

3. 数据保存

保存全部纸版实验过程、结果和质控等记录，有完整实验名称、日期、操作人员、实验步骤和结果等内容；如为电子记录，保存内容和质量需同纸版一致。

4. 数据录入

录入人需要提前接受培训，做到“无必要不换人，换人必培训”，实名录入数据信息。严格遵守“监测方案”要求，做到“已检测—有结果”，“未检测—无阴阳”，结果阳性标本必须录入 Cq (Ct) 值，保

证每条记录的完整性。

5. 数据审核

各环节设置审核人，记录审核过程，各级审核人认真履行审核工作，避免数据审核不通过多次退回。市级、省（自治区、直辖市）及国家级审核人必须认真逐条审核数据，保证每条数据录入信息的准确性、完整性和真实性。

6. 定期自查与外部审查

定期对监测数据进行自查和外部审查，确保数据质量。各监测点对异常监测数据需要进行实验复核，记录过程与结果。省（自治区、直辖市）级疾控中心对监测点标本检测结果需要进行实验复核，每年至少开展 1 次，记录过程与结果。

随机抽取检测阳性样本和阴性样本开展复核检测，抽样复核率应不少于检测样本量的 5%。如果每种病原检出阳性样本数少于 10 份时，应全部开展复核检测。

中国疾病预防控制中心传染病预防控制所和病毒病所共同组织全国监测单位病原监测工作的质量控制评价。

六、附表及附录

表 10-1 鼠类宿主动物采集情况登记表

表 10-2 实时荧光定量 PCR/RT-PCR 法检测鼠传病原结果记录表

附表 10-1 动物采集情况登记表

监测点：_____ 省（自治区、直辖市）_____地（市）

采集时间：_____年_____月_____日

标本 编号 ^a	鼠种	性别	采集 地点 ^b	生境 ^c	捕获 方法	经纬 度	海拔	备注

填表人：_____；审核人：_____

注：^a 应与鼠类生态学监测采集的动物编号一致；^b 填写区（县）—街道（乡、镇）；^c 城镇居民区、农村居民区、重点行业、农田耕地、森林、灌丛、草原、湿地、高山植被、荒漠/半荒漠、绿洲、自定义

第二章 蚊传病原监测

一、监测点

在病媒生物生态学监测的基础上，每个省份选择 2~5 个地级市作为蚊传病原学监测点。每个蚊传病原学监测点至少选 2 个县（区）开展监测工作。

二、监测对象

（一）雌性成蚊

1. 生态学监测标本

参照《全国病媒生物监测方案》（国疾控综监测发〔2024〕21 号）、《技术指南》中“蚊类监测”相关要求执行。监测生境包括城镇居民区、公园（含街心公园）、医院，农村居民区和牲畜棚（牛棚、猪圈、羊圈、养殖场等）。除牲畜棚外，其他均在外环境中进行

2. 补充监测标本

各地可根据本地蚊传疾病流行情况和本地生境条件适当补充采样区域，增加其他生境标本的采集。

3. 蚊虫监测标本的数量

采集蚊虫标本包括淡色/致倦库蚊、三带喙库蚊、白纹伊蚊/埃及伊蚊、中华按蚊和当地其他优势蚊种。监测点根据当地蚊媒传染病流行情况，每监测点选择至少 2 种重要蚊媒，各不少于 4000 只，总数不低于 8000 只。

（二）蚊虫监测病原

本方案主要针对登革病毒、乙型脑炎病毒、黄热病毒、西尼罗病毒和寨卡病毒 5 种黄病毒属病原以及基孔肯雅病毒和辛德毕斯病毒 2 种甲病毒属病原开展监测。每监测点选择至少 2 种重要蚊媒进行监测，每蚊种根据当地蚊媒传染病流行历史及现状选择不少于 2 种病原进行检测。不同蚊种建议检测的病原种类详见表 1。

表 1. 不同蚊种建议检测的病原种类列表

序号	蚊种	建议检测病原种类
1	淡色/致倦库蚊	乙型脑炎病毒；西尼罗病毒；辛德毕斯病毒
2	三带喙库蚊	乙型脑炎病毒；西尼罗病毒；基孔肯雅病毒；辛德毕斯病毒
3	白纹伊蚊/埃及伊蚊	登革病毒；黄热病毒；乙型脑炎病毒；西尼罗；基孔肯雅病毒；辛德毕斯病毒；寨卡病毒
4	中华按蚊	乙型脑炎病毒
5	当地其他优势蚊种	自行选择易传播病原

三、监测时间

监测时间：在蚊虫活动高峰期和蚊传疾病流行季节开展监测，原则上在 6-9 月每月开展监测，蚊传疾病流行地区 10 月增加 1 次。

四、监测方法

（一）蚊虫采集

1. 蚊虫采集方法

标本采集方法参照《技术指南》中“蚊虫监测”。采集方法包括诱蚊灯法/CO₂ 诱蚊灯法和人诱停落法/双层叠帐法等。各地可结合本地实际情况，增加其他采集方法。

2. 蚊虫标本分类鉴定

采样点采集的蚊虫立即低温冷链带回实验室进行分类鉴定，置于-20℃冰箱 10~20min，蚊虫被冻晕后置于铺有冰排的白纸上，通过形态学进行分类鉴定，填写蚊媒标本采集信息表（见表 11-1），分装于冻存管内，每管 20~30 只。无法通过形态学鉴定的蚊虫，可利用分子生物学方法鉴定。

3. 标本保存和运输

标本应保存在-80℃冰箱或液氮中。在不满足保存条件的情况下，标本应浸泡于 RNA later 储存液中，4℃过夜，第二天放置-80℃以下条件保存。标本采用干冰运输，运输过程应遵守国家相关生物安全规定。

（二）蚊传病原检测方法

1. 标本前处理

（1）将标本从冻存管取出，放入装有适量氧化锆（Φ1.2 mm, 20~30 颗）和 0.5~1ml Hank's 液的 2 mL 离心管研磨管中。

（2）用研磨器研碎（根据研磨器条件自行调整，组织破碎完全

即可), 轻甩离心后用于核酸提取。

(3) 如不能及时提取, 应将标本保存于 -80°C 以下冰箱, 并记录标本量和盒中位置。

2. 核酸提取

(1) 取出核酸提取试剂盒中的各组分, 平衡至室温, 将可能粘附在预封装深孔板铝膜及孔壁的液体甩至孔底, 静置 3 min。

(2) 小心撕开预封装深孔板铝膜, 向第 1、7 列 (A1-H1、A7-H7 孔位) 依次加入上步的蚊虫研磨液和蛋白酶 K 溶液。

(3) 将预封装深孔板放入提取仪中, 插上搅拌套, 选择相应的提取程序, 点击“开始”运行。

(4) 按规定程序进行自动化提取。

(5) 自动化程序结束后, 将第 6 及第 12 列的洗脱液 (即核酸溶液) 转移至无核酸酶的离心管中, 测定浓度, -80°C 保存待检。

3. 巢式 RT-PCR 法检测登革、乙型脑炎、西尼罗和黄热病毒, 反应体系按试剂盒说明书配制, 总体积为 $25\ \mu\text{L}$ 。引物序列见表 2。

表 2 检测登革、乙型脑炎、西尼罗和黄热病毒的引物序列

PCR	引物	序列 (5' -3')	片段大小 (bp)	反应条件
第1轮	XF-F1	AACATGATGGGVAARMG WGARAA	263	95°C 10min; 95°C 30s, 52°C 30s, 72°C 30s, 35 个循环; 72°C 5min
	XF-R	GTRTCCCANCCDGC DGTR TCATCNGC		
第2轮	XF-F2	AARGGMAGYMGNGCHAT HTGGT	215	95°C 10min; 95°C 30s, 54°C 30s, 72°C 30s, 35 个循环; 72°C 5min
	XF-R	GTRTCCCANCCDGC DGTR		

		TCATCNGC		
注：方法引自Zhijing Xue, etc. Establishment and Application of Heminested RT-PCR Assay for Detection of Mosquito-Borne Flavivirus - Guizhou Province, China, 2018. China CDC Wkly. 2021 Jan 1;3（1）:4-9.				

1%浓度琼脂糖电泳分析，确定是否扩增出特异性条带。结果判读：

阳性：第2轮电泳显示215bp的DNA片段。

阴性：无特异性核酸片段扩增。

阳性结果的PCR产物需要进一步送公司进行一代测序，测序结果经过序列比对后最终确定该蚊虫标本携带的具体病原。记录判读结果并存档（见表11-2和表11-4）。

4. 巢式RT-PCR法检测辛德毕斯病毒和基孔肯雅病毒，反应体系按扩增试剂说明书配制，总体积为25μL。引物序列详见表3。

表3 检测辛德毕斯病毒和基孔肯雅病毒引物序列

引物	序列（5'-3'）	片段大小 （bp）	反应条件
XA-F1	AGAGCRTTYTCGCATCTRGCYAK	433	95℃ 10min； 95℃ 30s， 54℃ 30s， 72℃ 30s， 35 个循环； 72℃ 5min
XA-R	ACATGAACKGRGTKGTGTCRAAS CCWAYCC		
XA-F2	TGCCCCBRTGCGBAGYSCVGAAGA YCC	310	95℃ 10min； 95℃ 30s， 60℃ 30s， 72℃ 30s， 35 个循环； 72℃ 5min
XA-R	ACATGAACKGRGTKGTGTCRAAS CCWAYCC		
注：方法引自薛志静，等。蚊媒甲病毒属病毒半巢式PCR方法的建立及应用.中国媒介生物学及控制杂志.2021.32（4）:132-138.			

1%浓度琼脂糖电泳分析，确定是否扩增出特异性条带。结果判读：

阳性：第2轮电泳显示310bp的DNA片段。

阴性：无特异性核酸片段扩增。

阳性结果的PCR产物需要进一步送公司进行一代测序，测序结果经过序列比对后最终确定该蚊虫标本携带的具体病原。记录判读结果并存档（见表11-2和表11-4）。5. 实时荧光定量RT-PCR检测乙脑病毒，反应体系按扩增试剂说明书配制，总体积为25μL。引物和探针序列详见表4。

表4 实时荧光定量RT-PCR检测乙脑病毒引物和探针序列

引物名称		序列（5'-3'）	反应条件
乙脑	Universal-JEV-F	GCCACCCAGGAGGTCCTT	45℃ 10 min; 95℃ 10 min; 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 40 个循环
	Universal-JEV-R	CCCCAAAACCGCAGGAAT	
	Universal-JEV-Probe	FAM-CAAGAGGTGGACGGCC-MGB	
注：方法引自 Nan Shao, etc. TaqMan Real-time RT-PCR Assay for Detecting and Differentiating Japanese Encephalitis Virus. Biomed Environ Sci. 2018 Mar;31（3）:208-214.			

检测阈值为 $C_q \leq 35$ 为阳性。记录判读结果并存档（见表11-3和表11-4）。

6. 实时荧光定量RT-PCR检测登革和黄热病毒，反应体系按扩增试剂说明书配制，总体积为25μL。引物和探针序列详见表5。

表5 实时荧光定量RT-PCR检测登革和黄热病毒引物和探针序列

引物名称		序列（5'-3'）	反应条件
	DENV-F	GGAAGTAGAGCAATATGGTACATGTG	50°C 30min; 95°C

登革 病毒	DENV-R	CCGGCTGTGTCATCAGCATAYAT	10min; 95°C 15s, 60°C 45s, 40 个循环
	DENV-Probe	Texas Red - TGTGCAGTCCTTCTCCTTCCACTCCACT -BHQ2	
黄热 病毒	YFV-F	GAGGAAGGGTGTCTCCAGGAA	
	YFV-R	ACATGTTGGCATAGGCTTTGCT	
	YFV-Probe	CY5- CTGGATGATCAAGGAAACAGCTTGCCT C-BHQ2	

注：方法引自 Zheng Pang, etc. Comprehensive Multiplex One-Step Real-Time TaqMan qRT-PCR Assays for Detection and Quantification of Hemorrhagic Fever Viruses. PLoS One. 2014 Apr 21;9（4）:e95635.

检测阈值为 $C_q \leq 35$ 为阳性。记录判读结果并存档（见表 11-3 和表 11-4）。

7. 实时荧光定量 RT-PCR 检测寨卡病毒，反应体系按扩增试剂说明书配制，总体积为 25 μ L。引物和探针序列见表 6。

表 6 实时荧光定量 RT-PCR 检测寨卡病毒引物和探针序列

引物名称		序列 （5'— 3'）	反应条件
寨 卡 病 毒	ZIKV-F	AARTACACATACCARAACAAAGTG GT	50℃ 30min ； 95℃ 10min ； 95℃ 15s ， 60℃ 1min, 40 个循环
	ZIKV-R	TCCRCTCCCYCTYTGGTCTTG	
	ZIKV-Probe	FAM-CTYAGACCAGCTGAAR-BBQ	
注： 方法引自 Oumar Faye, etc. Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught Mosquitoes. Virol J. 2013 Oct 22:10:311.			

检测阈值为 $C_q \leq 35$ 为阳性。记录判读结果并存档（见表 11-3 和表 11-4）。

8. 实时荧光定量 RT-PCR 检测西尼罗病毒，反应体系按扩增试剂说明书配制，总体积为 $25\mu\text{L}$ 。引物和探针序列见表 7。

表 7 实时荧光定量 RT-PCR 检测西尼罗病毒引物和探针序列

引物名称		序列 (5'—3')	反应体系
西尼罗病毒	WNV-F	CGGAAGTYGRGTAKACGGTGCTG	50°C 30min ;
	WNV-R	CGGTWYTGAGGGCTTACRTGG	95°C 10min ;
	WNV-Probe	FAM-WCCCCAGGWGGACTG-MGB-NFQ	95°C 15s, 60°C 1min, 40 个循环
注：方法引自 Ana Vázquez, etc. Real time PCR assay for detection of all known lineages of West Nile Virus. J Virol Methods. 2016 Oct;236:266-270.			

检测阈值为 $C_q \leq 35$ 时可判为阳性，记录判读结果并存档（附表 11-3 和表 11-4）。

9. 实时荧光定量 RT-PCR 检测基孔肯雅病毒，反应体系按扩增试剂说明书配制，总体积为 $25\mu\text{L}$ 。引物和探针序列详见表 8。

表 8 实时荧光定量 RT-PCR 检测基孔肯雅病毒引物和探针序列

引物名称		序列 (5'—3')	反应条件
基孔肯雅病毒	CHIKV-F	CATCTGCACYCAAGTGACCA	50°C 30min ;
	CHIKV-R	GCGCATTTTGCCTTCGTAATG	95°C 10min ;
	CHIKV-Probe	Cal fluor 610-GCGGTGTACACTGCCTGTGACYGC-BHQ2	95°C 15s, 55°C 40s, 68°C 20s, 45 个循环
注：方法引自 Jesse J Waggoner, etc. Clinical evaluation of a single-reaction real-time			

RT-PCR for pan-dengue and chikungunya virus detection. J Clin Virol. 2016 May;78:57-61.

检测阈值为 $C_q \leq 35$ 时可判为阳性，记录判读结果并存档（见表 11-3 和表 11-4）。

10. 实时荧光定量 RT-PCR 检测辛德毕斯病毒，反应体系按扩增试剂说明书配制，总体积为 25 μ L。引物和探针序列详见表 9。

表 9 实时荧光定量 RT-PCR 检测辛德毕斯病毒引物和探针序列

引物名称		序列 （5'— 3'）	反应体系
辛德毕斯病毒	SINV-F	GGTTCCTACCACAGCGACGAT	50℃ 30min; 95℃ 10min; 95℃ 15s, 60℃ 1min, 45 个循环
	SINV-R	TGATACTGGTGCTCGGAAAACA	
	SINV-Probe	FAM-TTGGACATAGGCAGCGCA-MGB-NFQ	
注：方法引自 Jussi Sane, etc. Development and evaluation of a real-time RT-PCR assay for Sindbis virus. J Virol Methods. 2012 Jan;179（1）:185-8.			

检测阈值为 $C_q \leq 35$ 时可判为阳性，记录判读结果并存档（见表 11-3 和表 11-4）。

蚊传病原检测可使用巢式 RT-PCR 法或者荧光定量 RT-PCR 法进行检测，也可以使用质量可靠的商品化试剂盒进行检测。

五、数据上报

（一）上报内容

蚊传病原学检测结果通过《全国重要病媒生物监测系统》上报监测数据。阳性标本的序列：文件夹名称为其标本号，包括原始测序彩图文件和序列文件的电子版拷贝；各省疾控提交当年全省监测数据年

报总结，发送邮件至 wenbyjc@icdc.cn。

（二）上报时间

各监测点检测标本工作结束 5 个工作日内上报数据。

六、质量控制

（一）采样

1. 监测对象及采集方法

按照“监测方案”要求，必须完成“蚊虫生态学”标本的病原监测，标本数量不足时需要补充采集蚊虫标本。监测对象为雌性成蚊。采集蚊虫不应为蚊幼虫、幼虫新羽化成蚊、雄蚊。

补充采集蚊虫标本的采集方法，不局限于生态学采集的方法，各监测点可根据当地情况自行选择采集方法。

2. 监测频次、时间

“监测方案”规定原则上在 6-9 月每月开展蚊传病原监测，各监测点可根据当地实际蚊虫活动高峰期和蚊传疾病流行季节适当提前或推迟检测时间，但每年监测的连续月份不能少于 4 个月。

3. 采样过程控制

（1）运输：蚊虫标本从采样点运往实验室分类鉴定的过程中，应置于符合生物安全要求的低温保温箱或转运箱中，4℃低温冷链运送至实验室。

（2）蚊种复核：用于蚊传病原学检测的蚊虫，需挑取形态学较完好的 5~10 个蚊虫制作针插标本，用于蚊种复核。

(3) 蚊种鉴定：蚊虫运至实验室后，置于-20℃冰箱 10~20min，蚊虫被短暂冻晕后置于铺有冰排的白纸上进行分类鉴定。标本分类鉴定前避免于≤-20℃冰箱内反复冻融，当天如无法分类鉴定，可暂放 4℃冰箱储存过夜，第二天务必及时完成分类鉴定工作。

(4) 标本管号需用附表 11-1 中规定方法进行编号，并用不易掉色的笔标记于管上。

(5) 标本储存：标本应保存在-80℃冰箱或液氮中。

(6) 标本运输：标本采用干冰运输，运输过程应遵守国家相关生物安全规定。

(二) 检测

1. 标本预处理

(1) 采集标本后的 1 周内开展病原检测工作。

(2) 标本处理前，可将生物安全柜开紫外灯照射 30min，并使用 RNA 酶清除剂擦拭实验台。

(3) 用 2.0ml 的离心管进行研磨，管底空间较大可保证标本充分研磨。整个研磨过程需使用无 RNase 试剂和耗材，或高温灭活 RNase 的试剂和耗材。

(4) 在提取核酸前，需要进行研磨匀浆，注意控制在最短时间内完成，以免研磨时间过长导致核酸降解，推荐使用低温研磨仪。

(5) 研磨要充分，研磨后的匀浆液中不能观察到组织块。

(6) 完成研磨后，需要立即进入核酸提取环节。

2. 核酸提取

(1) 全自动核酸提取试剂盒存放时需正置，确保提取试剂全部沉降至孔底。

(2) 20~30 只蚊虫 1 管进行研磨和提核酸，放置蚊虫过多会导致提取的核酸质量下降影响检测结果。

(3) 提取后需要测定浓度和质量值，观察是否提取成功。

(4) 提取后尽快进行检测，否则 RNA 易于降解，导致假阴性结果增多。如无法尽快检测应立即置于-80℃冰箱保存待检，一周内完成检测。

(5) 剩余蚊虫研磨液需冻存于-80℃冰箱，以备国家或省级疾控进行抽样复核。

3. 巢式 RT-PCR

(1) 超净台和生物安全柜使用前，建议使用核酸清除剂擦拭实验台。

(2) 加样后的枪头放入自封袋封好后，再放入利器盒，避免交叉污染。

(3) 第一轮 PCR 反应后，开盖取 PCR 产物用于第二轮的模板时，应避免遗洒造成污染。

(4) 配置琼脂糖凝胶时，应将琼脂糖充分加热溶解，自然冷却，保证琼脂糖均匀溶解于缓冲液。

(5) 琼脂糖电泳的条件为电压 120V，30min。电压过高或过低均会影响琼脂糖凝胶成像结果分析。

(6) 其他注意事项，参考实时荧光定量 PCR 相关规定。

(三) 数据处理与上报

数据处理包括采集、审核与录入等多个关键环节，需要设置双人负责，以确保数据准确无误上报到“监测系统”。

1. 数据采集

确保数据采集过程无误，首先观察质控品结果是否达到要求，确认实验是否成立，读取标本结果时注意核对编号或者名称，避免数据混淆、漏读、丢失或污染。

2. 实验结果审核

对采集的数据进行审核，剔除异常值、错误值等，确保数据的准确性。对于国内首发或长期未监测到病原，如出现阳性结果，需要使用第二种方法进行验证。

3. 数据保存

保存全部纸版实验过程、结果和质控等记录，有完整实验名称、日期、操作人员、实验步骤和结果等内容；如为电子记录，保存内容和质量需同纸版一致。

4. 数据录入

录入人需要提前接受培训，做到“无必要不换人，换人必培训”，实名录入数据信息。严格遵守“监测方案”要求，做到“已检测—有结果”，“未检测—无阴阳”，荧光定量 PCR 检测结果阳性标本必须录入 Cq（Ct）值，保证每条记录的完整性。

5. 数据审核

各环节设置审核人，记录审核过程，各级审核人认真履行审核工作，避免数据审核不通过多次退回。市级、省（自治区、直辖市）及

国家级审核人必须认真逐条审核数据，保证每条数据录入信息的准确性、完整性和真实性。

6. 定期自查与外部审查

定期对监测数据进行自查和外部审查，确保数据质量。各监测点对异常监测数据需要进行实验复核，记录过程与结果；省（自治区、直辖市）级疾控中心每年至少开展 1 次对监测点标本检测结果进行实验复核，记录过程与结果。

（四）结果复核

随机抽取检测阳性样本和阴性样本开展复核检测，抽样复核率应不少于检测样本量的 5%。如果每种病原检出阳性样本数少于 10 份时，应全部开展复核检测。

中国疾病预防控制中心传染病所、病毒病所按职责分工从监测系统中选取复核的标本编号下发给各监测省（自治区、直辖市）疾控中心；通过对上送的标本进行检测结果复核，评估各省（市、自治区）检测质量；组织各省级疾病预防控制中心病原检测能力的室间质量评价。

七、附表及附录

表 11-1 病媒生物蚊媒标本采集信息表

表 11-2 巢式 RT-PCR 法检测蚊传病原结果记录表

表 11-3 荧光定量 RT-PCR 法检测蚊传病原结果记录表

表 11-4 病媒生物蚊传病原学检测结果统计表

附录 11-1 蚊虫标本处理标准操作程序

附录 11-2 RT-hemi-nested PCR 法检测蚊媒病毒核酸标准操作程序

附录 11-3 荧光定量 RT-PCR 法检测蚊媒病毒核酸标准操作程序

表 11-1 病媒生物蚊媒标本采集信息表

标本号 ^a	蚊种	数量 ^b	采集生境 ^c	采样点地址 ^d	采样点经纬度	海拔	备注

注：^a 储存蚊子的管号；标本号编号原则：行政区域名+市名首字母+蚊种首字母+年份+储存管序号，行政区域名：详见《中华人民共和国信息产业部关于中国互联网络域名体系的公告》，市名和蚊种名取前两个字的首字母，举例：吉林省长春市淡色库蚊 2024 年第 58 管，标本号为 jlccds24/58；^b 每管内装蚊子数量；^c 为居民区、公园、医院、农户、牛棚、猪圈和养殖场；^d 采样点地址：请详细到村、街道。

监测方法：_____监测时间：_____监测单位：_____监测人：_____

表 11-2. 巢式 PCR 法检测蚊传病原结果记录表

监测点：_____省（自治区、直辖市）_____地（市） 填表人：_____

标本号	采样点地址	采集时间	检测时间	蚊种	登革病毒	黄热病毒	乙型脑炎病毒	西尼罗病毒	基孔雅病毒	辛德斯病毒	寨卡病毒	其他病原
					+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	列出病原名称
	检测单位：_____检测人签字：_____负责人签字：_____											

表 11-3. 荧光定量 RT-PCR 法检测蚊传病原结果记录表

监测点：_____省（自治区、直辖市）_____地（市） 填表人：_____

标本号	采样点地址	采集时间	检测时间	蚊种	登革病毒		黄热病毒		乙型脑炎病毒		西尼罗病毒		基孔肯雅病毒		辛德毕斯病毒		寨卡病毒		其他病原
					+	CT值	+	CT值	+	CT值	+	CT值	+	CT值	+	CT值	+	CT值	列出病原名称
	检测单位：				检测人签字：				负责人签字：										

表 11-4

病媒生物蚊传病原学检测结果统计表

填表时间：_____年_____月_____日

监测点 ^a	标本号范围 ^b	蚊虫数量 (只) ^c	蚊种	检测病原体种类	阳性管数 ^d	批阳性率 ^e	最小感染率 ^f	检测日期	检测人
	xxxxsd1-100	2000	三带喙库蚊	乙型脑炎病毒	2	2%	1‰		

监测单位：_____； 填表人：_____

注：^a病媒生物病原学监测点；^b检测该蚊种的所有标本号；^c检测该蚊种的总蚊虫数量；^d检测出病原阳性的管数；^e批阳性率=PCR 阳性管数/检测管数×100；^f最小感染率=PCR 阳性管数/检测蚊虫数量×1000。

—

第三章 蜱传病原监测

一、监测点

每个地市级监测点在辖区内选择 2 个县(区)开展蜱传病原监测,所选县(区)原则上与蜱类的生态学监测点相一致。

二、监测对象

(一) 样本来源

1. 游离蜱: 参照《全国病媒生物监测方案(2024 年版)》(国疾控综监测发〔2024〕21 号), 选择农村外环境、景区、居民区等生境, 采集蜱类样本。

2. 寄生蜱: 参照《全国病媒生物监测方案(2024 年版)》(国疾控综监测发〔2024〕21 号), 选择农村居民区和城镇居民区内散养的家犬、宠物犬和家畜, 采集动物体表寄生蜱。

(二) 蜱传病原

针对严重危害人群健康的蜱传病原体开展监测: 细菌类主要包括斑点热群立克次体、嗜吞噬细胞无形体、查菲埃立克体、贝纳柯克斯体、伯氏疏螺旋体和回归热螺旋体; 病毒类包括大别班达病毒、克里米亚—刚果出血热病毒和森林脑炎病毒。

各监测点应按要求完成蜱样本中斑点热群立克次体、嗜吞噬细胞无形体、查菲埃立克体和大别班达病毒的检测工作, 即上述四类病原为监测必选病原; 其他病原监测可根据当地蜱媒传染病流行历史及现状任选。

三、监测时间及样本数量

1. 监测时间：每年的4月上旬、5月上旬、7月上旬、9月上旬分别开展蜱类样本的采集。各地可根据当地气候条件、蜱类活动高峰和实际工作情况，对采集时间进行微调，建议长江以南地区在10-12月增加1次样本采集。采集工作结束后的15个工作日内完成病原检测工作。（注：湖北、河南、山东、浙江、安徽、辽宁6个省份除完成上述任务外，还需根据当地蜱虫活动情况在3月、6月、8月和10月开展蜱虫携带大别班达病毒检测工作。）

2. 样本数量：每个地市级监测点，全年检测数量不少于400只，即平均每月检测样本数量不少于100只，蜱虫地区分布广泛或者分布密度较大的监测点应适当增加检测数量。对于生态学监测中获得的样本数量不足时，可在重点地区（如人群活动较多的公园绿地、村庄道路两侧等地方）补充采集蜱类样本，以达到病原学监测要求。（注：湖北、河南、山东、浙江、安徽、辽宁6个省份在3月、6月、8月和10月共需采集至少100只蜱虫样本，用于大别班达病毒的检测。）

四、监测方法

（一）蜱类样本采集方法

参照《技术指南》中“蜱类监测”，游离蜱采用布旗法，寄生蜱采用宿主体表检蜱法。

（二）蜱类样本的保存和运输

1. 样本保存

采集的蜚虫带回实验室后，可暂存于 4℃ 冰箱内（不要超过 7 天）；有条件的实验室可存放在 -80℃ 冰箱内，注意避免反复冻融。并请尽快完成蜚样本的形态学鉴定（用于病原检测的蜚个体，严禁用热水浇烫，因为可能造成蜚体内携带病毒核酸的降解，影响实验结果；由于蜚在低温环境下爬行缓慢，所以可将蜚虫置于下面垫有白色冰袋或者冰排的白纸上或者玻璃平皿中进行肉眼观察，做出初步的形态学鉴定；肉眼观察无法确定蜚种时，可将其置于显微镜下，仔细观察有无肛沟，假头基，须肢，盾板花纹及色斑，眼睛，基节等鉴别特征。仍无法鉴定蜚种者，可通过分子生物学方法测定分析其 16s rRNA 序列或者 COI 基因序列确定蜚种。

而后按照采样地点、动物宿主、蜚种将采集的蜚虫分别放入不同的 1.5ml 离心管内（注意：若发现幼蜚，必须将其与若蜚和成蜚分开保存），建议每管放 1~5 只蜚虫，最多不超过 10 只。做好编号记录后，尽快完成后续实验室检测工作。

2. 样本运输

尽量采用低温冷藏运输（如：可利用装有冰块的矿泉水瓶等工具保证运输温度为 4℃ 左右），并应遵守国家相关生物安全规定。

（三）实验室检测

1. 蜚样本的实验前处理

（1）清洗：取出装有蜚虫样本的 1.5ml 离心管，向管中加入 1ml 75% 的酒精，浸泡蜚样本 5min，然后用移液器吸出酒精并弃去，室温下晾干蜚体表残留的酒精或者用高压灭菌的棉团将蜚擦净。再用 PBS（pH7.4 的磷酸盐缓冲液）或者无菌蒸馏水清洗蜚体 3 次，并再次用高压灭菌的棉团将蜚擦净或将蜚置于无菌滤纸上晾干。最后将蜚转移

至 2ml 的无 DNA 酶、无 RNA 酶、无菌研磨管内。

(2) 研磨：向研磨管中加入 500 μ l 4℃预冷的 PBS 缓冲液或者 Hank' s 液，3~5 颗直径 2mm 的不锈钢珠，研磨机设置 1800rpm，研磨 30s，休息 10s，共 6 个循环，对蜱虫样本震荡研磨。充分匀浆后，将匀浆液分成 2 份，一份用于提取全基因组 DNA 和 RNA，另一份保存于-80℃备用。

2. 核酸提取

可利用基因组 DNA 和 RNA 共提试剂盒，同时提取蜱组织研磨液中的总 DNA 和总 RNA（手工和全自动核酸提取仪均可）；也可以利用商品化的动物组织 DNA 提取试剂盒专门提取研磨液中的基因组 DNA，再利用商品化的总 RNA 提取试剂盒提取研磨液中的 RNA，操作步骤严格按照试剂盒操作说明书进行。提取的核酸进行浓度测定后，尽快完成病原检测，并做好备份（-80℃保存，避免反复冻融）。

3. 分子生物学检测

可选择单重荧光定量 PCR 法、多重荧光定量 PCR 法（荧光探针法、熔解曲线法等），以及全自动多病原核酸快速检测系统等具有同等检测性能的设备和方法。每次实验均需设置阳性对照和空白对照，阳性对照为含有目标基因片段的质粒标准品或者核酸，空白对照为无菌去离子水。结果判读时，请参照各仪器使用说明书进行设置，反应结束后自动保存结果，根据扩增图像调节基线，设置循环阈值，通常为系统默认（用户可根据实际情况自行调整）。

(1) 荧光定量 RT-PCR 方法检测大别班达病毒的 S、M、L 三个基因片段，采用一步法荧光定量 RT-PCR 试剂盒。反应体系按试剂盒说明书配制，总体积为 25 μ l。引物和探针序列详见表 1：

表 1 检测大别班达病毒的引物和探针序列

基因片段	引物名称	序列 （5'—3'） 和探针标记	反应条件
S 基因	S-F-3	GGGTCCCTGAAGGAGTTGTAAA	55 ℃ 15 min（逆转录）； 95 ℃ 10 min（预变性）； 95 ℃ 15 s，60 ℃ 45 s， 40个循环
	S-R-3	TGCCTTCACCAAGACTATCAATGT	
	S-Probe-3	Texas Red- TTCTGTCTTGCTGGCTCCGCGC-BHQ2	
L 基因	L-F-3	AGTCTAGGTCATCTGATCCGTTYAG	
	L-R-3	TGTAAGTTCGCCCTTTGTCCAT	
	L-Probe-3	HEX- CAATGACAGACGCCTTCCATGGTAATAGGG-BHQ1	
M 基因	M-F-3	AAGAAGTGGCTGTTCATCATTATTG	
	M-R-3	GCCTTAAGGACATTGGTGAGTA	
	M-Probe-3	FAM- TCATCCTCCTTGGATATGCAGGCCTCA-BHQ2	

注：此方法为多重qPCR，引自Sun Y, Liang M, Qu J, et al. Early diagnosis of novel SFTS bunyavirus infection by quantitative real-time RT-PCR assay[J]. Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology, 2012, 53（1）:48-53.

三个基因片段中，任一基因的检测阈值为 C_q （或称 C_t 值） ≤ 35 时，可判为阳性。记录判读结果并存档（见表 12-2）。

荧光定量 PCR 方法检测斑点热群立克次体，反应体系按扩增试剂说明书配制，总体积为 25 μ l，引物和探针序列详见表 2：

表 2 检测斑点热群立克次体的引物和探针序列

基因片段	引物名称	序列 (5'—3') 和探针标记	反应条件
ompB 基	SFG-F	TGA CGT TGG TAC AGA CGG TAC T	95 °C 30s 预变

因	SFG-R	TTG AGT TTT GGG TTA TTG CAA CTT TAG	性; 95 °C 5s, 59°C 35s, 45 个循环
	SFG-P	FAM-CTG CCT TTA AAA CAG C-MGB	

注：此方法引自 牛东升,杨晓,陈梅玲等.实时荧光定量 PCR 检测斑点热立克次体的方法建立[J]. 解放军医学杂志, 2008, 33 (11) :1297-1299.

检测阈值为 C_q （或称 C_t 值） ≤ 35 时可判为阳性，记录判读结果并存档（见表 12-2）。

（2）荧光定量 PCR 方法检测嗜吞噬细胞无形体，反应体系按扩增试剂说明书配制，总体积为 25 μ l。引物和探针序列详见表 3：

表 3 检测嗜吞噬细胞无形体的引物和探针序列

基因片段	引物名称	序列（5'—3'）和探针标记	反应条件
<i>gltA</i> 基因	AP-F	CCA CGC AAG TCG CAT TGA T	95 °C 30s 预变性
	AP-R	GCC GGG TAC TTT CGC AAT T	95 °C 5s, 59°C
	AP-P	FAM-CTT ACA GGT GCT ATC ATC-MGB	35s, 45 个循环

注：此方法引自 张晶波, 温博海, 陈梅玲, 等 . 荧光定量 PCR 检测嗜吞噬细胞无形体[J]. 中国人兽共患病学报, 2006, 22 (4) :289-293.

检测阈值为 C_q （或称 C_t 值） ≤ 35 时可判为阳性，记录判读结果并存档（见表 12-2）。

（3）荧光定量 PCR 方法检测查菲埃立克体，反应体系按扩增试剂说明书配制，总体积为 25 μ l。引物和探针序列详见表 4：

表 4 检测查菲埃立克体的引物和探针序列

基因片段	引物名称	序列（5'—3'）和探针标记	反应条件
<i>16s rRNA</i>	E.cha-F	AGC CTA ACA CAT GCA AGT CGA A	95 °C 30s 预变性

基因	E.cha-R	CCC GTC TGC CAC TAA CAA TTA TT	95 °C 5s, 59°C
	E.cha-P	FAM-CAA TTG CTT ATA ACC TTT TG-MGB	35s, 45 个循环

注：此方法引自 张晶波, 温博海, 陈梅玲, 等 . 荧光定量 PCR 检测查菲埃立克体 [J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2006, 13 (4) :212-216.

检测阈值为 C_q （或称 C_t 值） ≤ 35 时可判为阳性，记录判读结果并存档（见表 12-2）。

注意：上述检测斑点热群立克次体、嗜吞噬细胞无形体和查菲埃立克体三种病原的荧光定量 PCR 反应条件相同，可同时放入 PCR 仪中进行检测（请注意：不是多重 PCR，不能放入同一反应管中）。

（4）荧光定量 PCR 方法检测伯氏疏螺旋体，反应体系按扩增试剂说明书配制，总体积为 25 μ l。引物和探针序列详见表 5：

表 5 检测伯氏疏螺旋体的引物和探针序列

基因片段	引物名称	序列（5'—3'）和探针标记	反应条件
<i>recA</i> 基因	recA-F	GTT CTG CAA CAT TAA CAC CTA AAG CTT	94°C 2min 预变性， 94°C 10s, 54°C
	recA-R	AGG TGG GAT AGC TGC TTT TAT TGA T	30s, 40 个循环
	recA-P	6-FAM-ACAGGATCAAGAGCATG-BHQ1	

检测阈值为 C_q （或称 C_t 值） ≤ 35 时可判为阳性，记录判读结果并存档（见表 12-2）。

（5）荧光定量 PCR 方法检测贝纳柯克斯体，反应体系按扩增试剂说明书配制，总体积为 25 μ l。引物和探针序列详见表 6：

表 6 检测贝纳柯克斯体的引物和探针序列

基因片段	引物名称	序列（5'—3'）和探针标记	反应条件
------	------	----------------	------

23S rRNA	Cb-F	CGGCTGAATTAAAGCGATTATTTT	50 °C 2 min (可选); 95 °C 10 min; 预变性 95 °C 15 s, 60 °C 2 min, 40 个循环
	Cb-R	CGTAACCACACACGCATCTCA	
	Cb-P	FAM-CCGAACCCATTGCAA-BHQ1	

若使用的 PCR 扩增试剂中含有 UDG 防污染系统, 设置反应程序时需含有 50 °C 2 min 这个步骤, 若不含 UDG, 则不设置该步骤。检测阈值为 C_q (或称 C_t 值) ≤35 时可判为阳性, 记录判读结果并存档 (见表 12-2)。

(四) 序列分析

由于斑点热群立克次体是由若干种病原体组成的一群立克次体科的致病性微生物, 当检测斑点热群立克次体的荧光定量 PCR 结果为阳性时, 需再通过普通 PCR 方法进一步扩增 *ompA* 基因, 得到阳性扩增条带后, 将扩增产物送测序公司进行序列测定和拼接, 根据基因序列的系统进化分析结果来确定是哪一种斑点热群立克次体; 不具备序列分析能力的实验室, 可将阳性 DNA 样本送至国家级、省级或有能力的市级实验室进行相关实验分析工作。

五、数据上报

(一) 上报内容

地市级监测点负责收集汇总采样信息及检测结果, 审核后形成附表 12-1、12-2 和 12-3, 上报给省级蜱传病原监测工作负责人, 省级将本省各个蜱传病原监测点的数据汇总、审核后, 上报至国家级指定邮箱; 当斑点热群立克次体的荧光定量 PCR 检测结果呈阳性时, 需进行序列测定, 此时, 上报数据内容应包含所有斑点热群立克次体阳性样本的扩增

产物测序结果（只提供拼接好的完整核酸序列，序列文件命名为“检测管号+监测点名称”）。

（二）上报时间

各地市级监测点应在实验室检测工作结束后的 3 个工作日内上报至省级，省级在 2 个工作日内完成数据的汇总审核并上报至国家级，即每次采样后的 20 个工作日内完成此次蜱样本携带病原检测结果的审核及上报。

（三）上报途径

相关数据发送邮件至 chongmeishi@163.com 和 pichuan@icdc.cn，待全国病媒生物监测系统升级完善以后，再通过系统平台上报。

六、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和考核。

（二）实验室检测质控

1. 核酸检测实验室需要分区管理，易污染区域可用核酸清除剂进行经常性喷洒或擦拭。
2. 专用设备、试剂耗材规范管理，微量移液器定期校准。
3. 建立标准操作规程，将实验室相关 SOP 放置或张贴在方便实验人员取阅的位置。

4. 每年至少组织一次实验室内部评估（质控品自测）。

（三）病原学检测结果核实

随机抽取检测阳性样本和阴性样本开展复核检测，抽样复核率应不少于检测样本量的 5%。如果每种病原检出阳性样本数少于 10 份时，应全部开展复核检测。

中国疾病预防控制中心传染病预防控制所、病毒病预防控制所按职责分工选取复核的标本编号下发给各监测省（自治区、直辖市）疾控中心，通过对上送的标本进行检测结果复核，评估各省（市、自治区）检测质量。

七、附表

表 12-1 蜱类样本采集信息表

表 12-2 蜱传病原检测结果原始记录表

表 12-3 蜱传病原检测结果统计表

表 12-1

蜚类样本采集信息表

采样时间：_____ 采样单位：_____ 采样人：_____

现场采样 样本管号 a	蜚种（若为幼 蜚，请在此注 明）	数量 b	采集生境 c	采样点地址 d	采样点经度	采样点纬度	海拔	动物宿主 e

注：a 储存蜚的管号；样本号编号原则：采集年份+行政区域名+市名首字母+储存管序号，行政区域名：详见《中华人民共和国信息产业部关于中国互联网络域名体系的公告》，市名取前两个字的首字母，举例：2024 年吉林省长春市第 26 管，标本号为 2024jlcc26； b 每管内装蜚虫数量； c 为农村居民区、农村外环境、公园景区、城镇居民区； d 采样点地址：请详细到村、街道； e 采集寄生蜚时须填写此栏。

表 12-2

蜱传病原检测结果原始记录表

监测点：_____省（自治区、直辖市）_____地（市） 填表人：

实验室 样本管号 ^a	蜱 虫 数 量 (只)	对 应 的场 样本 管号	检测 时间	蜱 种	大别班达病毒				斑点热群 立克次体		嗜吞噬细胞 无形体		查菲埃里 克体		贝纳柯克 斯体		伯氏疏螺旋 体		回归热螺旋 体		森林脑炎病 毒		克里米亚-刚 果出血热病 毒	
					+	S 基 因 的 Cq 值	M 基因 的 Cq 值	L 基因 的 Cq 值	+	Cq 值	+	Cq 值	+	C q 值	+	Cq 值	+	Cq 值	+	Cq 值	+	Cq 值	+	Cq 值

注：*如果未检测该病原，请在单元格中填写“未检测”；

[#]如果采用商品化试剂盒法检测，必须在对应单元格处注明“试剂盒品牌”；

^a每一行只能填写 1 个管号。

表 12-3

蜱传病原检测结果统计表

填表时间：_____年_____月_____日；

填表人：_____

监测点 ^a	样本管号范围 ^b	蜱虫数量 (只) ^c	蜱种	检测病原体种 类	阳性管数 ^d	检测管数	批阳性率 ^e	最小感染率 ^f

注：^a蜱传病原监测点行政名称；^b检测该蜱种的所有样本管号；^c检测该蜱种的总数量；^d检测出某病原阳性的管数；^e批阳性率=阳性管数/某病原的检测总管数；^f最小感染率=qPCR 阳性管数/检测蜱虫数量×100%。