

中华人民共和国卫生行业标准

WS 271—2007

感染性腹泻诊断标准

Diagnostic criteria for infectious diarrhea

2007-04-17 发布

2007-10-15 实施



中华人民共和国卫生部 发布

目 次

前言	III
1 范围	1
2 术语和定义	1
3 诊断依据	1
4 诊断原则	2
5 诊断	2
6 鉴别诊断	2
附录 A(资料性附录)常见感染性腹泻的主要特征	3
A.1 沙门菌肠炎	3
A.2 肠致泻性大肠杆菌肠炎	3
A.3 致泻性弧菌肠炎	3
A.4 弯曲菌肠炎	4
A.5 小肠结肠炎耶尔森菌肠炎	4
A.6 轮状病毒肠炎	4
A.7 诺瓦克病毒肠炎	4
A.8 肠腺病毒肠炎	4
A.9 隐孢子虫病	5
A.10 蓝氏贾第鞭毛虫肠炎	5
附录 B(规范性附录)实验室诊断方法	6
B.1 沙门菌检验	6
B.2 肠致泻性大肠杆菌检验	7
B.3 副溶血性弧菌检验	11
B.4 弯曲菌检验	13
B.5 小肠结肠炎耶尔森菌检验	15
B.6 轮状病毒检验	17
B.7 诺瓦克病毒检验	19
B.8 肠腺病毒检验	19
B.9 隐孢子虫检验	20
B.10 蓝氏贾第鞭毛虫检验	21
附录 C(资料性附录)感染性腹泻的鉴别诊断	23

前 言

根据《中华人民共和国传染病防治法》制定本标准。

按照国家质检总局 国家标准委公告(2005 年第 146 号),GB17012—1997《感染性腹泻的诊断标准及处理原则》自本标准实施之日起废止。

本标准的附录 A、C 是资料性附录,附录 B 是规范性附录。

本标准由卫生部传染病标准专业委员会提出。

本标准由中华人民共和国卫生部批准。

本标准起草单位:江苏省疾病预防控制中心及江苏省人民医院、南京市第二人民医院、中国疾病预防控制中心。

本标准主要起草人:汪华、阚飙、方肇寅、冉陆、赵伟、李军、朱凤才、史智扬、顾玲、郭喜玲、张雪峰。

感染性腹泻诊断标准

1 范围

本标准规定了除霍乱、痢疾、伤寒、副伤寒以外的感染性腹泻的诊断依据、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工作人员对感染性腹泻的诊断和报告。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准：

2.1 腹泻(diarrhea)

每日排便 3 次或以上，且粪便性状异常，如稀便、水样便，黏液便、脓血便或血便等。

2.2 感染性腹泻(infectious diarrhea)

由病原微生物及其产物或寄生虫所引起的、以腹泻为主要临床特征的一组肠道传染病，本标准则仅指除霍乱、痢疾、伤寒、副伤寒以外的感染性腹泻。

3 诊断依据

3.1 流行病学史

全年均可发病，但具有明显季节高峰，发病高峰季节常随地区和病原体的不同而异；细菌性腹泻一般夏秋季节多发，而病毒性腹泻、小肠结肠炎耶尔森菌腹泻等则秋冬季节发病较多。发病者常有不洁饮食(水)和(或)与腹泻病人、病原携带者、腹泻动物、带菌动物接触史，或有流行地区居住或旅行史；需排除致泻性的过敏原、化学药品暴露史及症状性、器官功能失调等非感染性腹泻病史。食(水)源性感染常为集体发病并有共进可疑食物(水)史；某些沙门菌(如鼠伤寒沙门菌)、肠致病性大肠杆菌(EPEC)、A 组轮状病毒和柯萨奇病毒感染可在婴儿群体中引起暴发流行。主要病原体引起的感染性腹泻的流行病学特征参见附录 A。

3.2 临床表现

3.2.1 每日大便次数 ≥ 3 次，粪便性状异常，可为稀便、水样便，黏液便、脓血便或血便，可伴有恶心、呕吐、腹痛、发热、食欲不振及全身不适。病情严重者，常并发脱水、酸中毒、电解质紊乱、休克等，甚至危及生命。主要病原体引起的感染性腹泻的临床特征参见附录 A。

3.2.2 已排除由 O₁ 血清群和 O₁₃₉ 血清群霍乱弧菌、志贺菌属、溶组织内阿米巴及伤寒沙门菌以及甲、乙、丙型副伤寒沙门菌所致的腹泻。

3.3 实验室检查

3.3.1 粪便常规检查

粪便有性状改变，常为黏液便、脓血便或血便、稀便、水样便。

黏液便、脓血便或血便，镜检可有多量红、白细胞，多见于沙门菌、侵袭性大肠杆菌、肠出血性大肠杆菌、弯曲菌、耶尔森菌等细菌和某些病毒等所致的腹泻。

稀便、水样便，镜检可有少量或无红、白细胞，多见于肠产毒性大肠杆菌、轮状病毒、隐孢子虫、气单胞菌等所致的腹泻。

3.3.2 病原检查

从粪便、呕吐物、血等标本中检出 O₁ 血清群和 O₁₃₉ 血清群霍乱弧菌、志贺菌属、溶组织内阿米巴、伤寒沙门菌以及甲、乙、丙型副伤寒沙门菌以外的感染性腹泻病原体，或特异性抗原、特异性核酸片段检测

阳性(详见附录 B)。

注:应用分子生物学方法开展病原检测时,应遵照相关规定执行。

4 诊断原则

临床诊断应综合流行病学资料、临床表现和粪便常规检查等进行。病原确诊则应依据从粪便、呕吐物、血等标本中检出病原体,或特异性抗原、特异性核酸片段检测阳性。

5 诊断

5.1 临床诊断病例:应同时符合 3.2、3.3.1,3.1 供参考。

5.2 确诊病例:应同时符合临床诊断和 3.3.2。

6 鉴别诊断

应与霍乱、伤寒、副伤寒、细菌性痢疾、阿米巴痢疾、非感染性腹泻做鉴别诊断。参见附录 C。

附录 A

(资料性附录)

常见感染性腹泻的主要特征

A.1 沙门菌肠炎

沙门菌肠炎包括除伤寒及甲、乙、丙型副伤寒以外的所有沙门菌感染。沙门菌为革兰阴性短小杆菌,无荚膜,有动力,抗原结构复杂。在水、牛乳或肉类食品中能存活一年以上,加热 60℃ 30min 可灭活,对含 0.3mg/L~0.5mg/L 余氯的氯化消毒饮用水及酚、阳光等敏感。传染源为病人、带菌者、患病及带菌动物。以食源性和医源性传播为主,也可通过水源、接触传播。人群普遍易感,幼儿(尤其 1 岁以内)更敏感。全年均可发病,夏秋季多发。沙门菌感染可呈胃肠型、伤寒型和败血型。胃肠型潜伏期多为 6h~24h,急性起病,伴恶心、呕吐、腹痛、腹泻。婴幼儿较易发生脱水和电解质紊乱。粪便多为黄色或绿色稀水便,亦可带有黏液和血,粪便镜检可见较多的白细胞及红细胞,并可见巨噬细胞。

A.2 肠致泻性大肠杆菌肠炎

大肠杆菌是革兰阴性杆菌,无芽孢,多有鞭毛。主要抗原为 O、H、K 抗原。引起感染性腹泻的有 5 个病原群:肠致病性大肠杆菌(EPEC)、肠产肠毒素性大肠杆菌(ETEC)、肠侵袭性大肠杆菌(EIEC)、肠出血性大肠杆菌/产志贺毒素大肠杆菌(EHEC/VTEC)、肠集聚性黏附大肠杆菌(EAggEC)。该菌对热的抵抗力较其他肠道杆菌强,55℃ 60min 或 60℃ 15min 仍有部分细菌存活。在自然界的水中可存活数周至数月,在温度较低的粪便中存活更久。

肠致病性大肠杆菌(EPEC) 传染源主要是病人及带菌者,以粪-口途径为主要传播方式,人群普遍易感,但幼儿多见,5 月~6 月为发病高峰。轻症者不发热,大便每日 3 次~10 余次,黄色蛋花样,量较多;重症患者可有发热、呕吐、腹痛、腹胀,呈黏液便,腹泻严重者可有脱水、酸中毒表现。成人常急性起病,脐周腹痛伴痢疾样大便。粪便镜检可见少许红、白细胞,偶可满视野,并有大量脂肪颗粒。

肠产肠毒素性大肠杆菌(ETEC) 病人和带菌者为主要传染源,主要通过被污染的水体、食品、牛奶、饮料等传播,可散发或暴发流行,多表现为“旅游者腹泻”或食物中毒。人群对 ETEC 普遍易感,成人、小儿均可发病。潜伏期一般为 0.5d~7d。症状表现为分泌性腹泻,大便呈水样。伴有腹部痉挛、恶心、呕吐、头痛、肌痛,很少发热。病情轻重不等,有的仅有轻微腹泻,有的呈重症霍乱样,重度脱水、酸中毒,甚至死亡。

肠侵袭性大肠杆菌(EIEC) 可通过污染的水和食物引起暴发或流行,也可因接触传播形成散发病例;成人、儿童均可发病。临床表现与菌痢相似,临床上表现为发热、腹痛、腹泻、里急后重、脓血便。

肠出血性大肠杆菌/产志贺毒素大肠杆菌(EHEC/VTEC) 家禽和家畜为其贮存宿主和主要传染源,病人和无症状携带者也是传染源之一;经消化道以及接触传播;人群普遍易感,但以老人、儿童为主;季节性明显,7 月~9 月为流行高峰。主要临床表现为突发腹部痉挛性疼痛、不适,初为水样便,继之转为鲜血性粪便,不发热或低热,可伴恶心、呕吐及上感样症状。大便镜检极少见炎症渗出性细胞。多数病人表现为自限性疾病;少数病人可继发急性溶血性尿毒症综合征(HUS)以及血栓性血小板减少性紫癜。

肠集聚性黏附大肠杆菌(EAggEC)主要与小儿顽固性腹泻有关,症状可持续两周或以上。

A.3 致泻性弧菌肠炎

本标准中致泻性弧菌包括副溶血弧菌、河弧菌、拟态弧菌、霍利斯弧菌等。副溶血弧菌为革兰染色阴性、无芽孢、具有鞭毛,呈杆状或稍弯曲样,形态多变,嗜盐生长。氧化酶阳性,不发酵蔗糖。临床分离

株大多神奈川试验阳性,环境分离株一般为阴性。耐碱畏酸,对热敏感,56℃ 3min 死亡,一般消毒剂敏感。本病传染来源为带菌的海产品,近海淡水鱼带菌较高。患者为传染源。本菌主要通过食物传播;各年龄均易感,以青壮年居多;7月~9月为发病高峰。本病潜伏期 2h~4d,平均 15h。起病急骤,腹泻、腹痛、恶心、呕吐、发热,重症可脱水,循环衰竭,少数有中毒性休克。粪便呈水样便、血水便或脓血便,镜检可见白细胞和脓细胞,常伴有红细胞,亦可见巨噬细胞。

A.4 弯曲菌肠炎

弯曲菌为微需氧,革兰染色阴性,多形态性,无芽孢,引起人类腹泻的主要是空肠弯曲菌、结肠弯曲菌。空肠弯曲菌感染后肠道产生局部免疫,血中也产生抗 O 的 IgG、IgM、IgA 抗体,有一定保护力。该菌抵抗力不强,对热敏感,60℃ 5min 即可灭活,对物理和化学消毒剂均敏感。本病为人畜共患病,主要传染源是家禽、家畜和鸟类,急性期患者和带菌者可为传染源。主要经食物和水传播,也可接触传播。人群普遍易感。全年均可发病,夏秋季多发。平均潜伏期 3d~5d,主要症状为发热、腹泻、腹痛,少数伴有呕吐;粪便呈黄色水样便,部分为黏液便和脓血便。典型者脐周呈痉挛性绞痛。粪便镜检可见白细胞或多量红细胞及脓细胞。

A.5 小肠结肠炎耶尔森菌肠炎

为人畜共患疾病,系由小肠结肠炎耶尔森菌引起。该菌为嗜冷菌,革兰阴性无芽孢杆菌。可在-2℃~45℃生长。对湿热和化学消毒剂敏感。本病传染源为患者、带菌者、患病和带菌动物。多为消化道传染。人群普遍易感。全年均可发病,以秋、冬、春季较多。潜伏期 4d~10d。主要表现为突然发热,腹痛和腹泻,部分可有类似于阑尾炎症状、慢性反应性关节炎及结节性红斑以及败血症、突眼性甲状腺肿等。粪便呈水样稀便,可带黏液,偶带脓血,镜检可见白细胞、红细胞。

A.6 轮状病毒肠炎

人轮状病毒属于呼肠病毒科,基因组为 11 个片段的双股线型 RNA,直径约为 70nm~75nm,呈球形,有双层衣壳,从内向外呈放射状排列,电镜下完整颗粒如车轮状。根据内层衣壳多肽构成的组特异性抗原,可分为 A~G 七组,其中 A、B、C 组和人类疾病有关。外膜壳蛋白(病毒结构蛋白:VP)VP4 和 VP7 是其主要中和抗原,能刺激机体产生相应抗体。VP4 中和抗体的作用很弱,且有一定的交叉,而 VP7 中和抗体对机体有保护作用。病毒在外界环境中比较稳定,在室温中可存活数月,耐酸、耐碱,55℃ 30min 可使其灭活。本病传染源为患者和无症状携带者;传播途径主要经粪-口途径传播,也可经接触和呼吸道传播;人群均易感。A 和 C 组主要感染儿童,以秋冬季节多见;潜伏期 2d~3d,主要症状为腹泻和呕吐,可伴发热和(或)呼吸道症状,严重者常伴有脱水及代谢性酸中毒,常并发肺炎、心肌炎、脑炎及病毒血症;大便为水样便或黄绿色稀便,无黏液、无脓血。B 组主要感染成人,常于 5 月~6 月短期暴发流行;潜伏期 2d~3d,以腹泻为主,伴恶心、呕吐、腹痛、乏力等症状。大便多为黄色水样便,无黏液及脓血。镜检多无异常,少数可见少量白细胞。

A.7 诺瓦克病毒肠炎

诺瓦克病毒属于杯状病毒科,诺如病毒属,为单正链 RNA 病毒,无包膜,直径 27nm~35nm,电镜下呈圆球状或多面状。有很强的耐乙醚、耐酸及耐热能力。传染源是病毒感染者和患者,主要是患者;粪-口传播途径为主,散发病例为人-人接触感染,暴发流行常由食物和水的污染造成;全年均可发病,但以秋冬多见;主要侵袭成人和大龄儿童。潜伏期 24h~48h,主要表现为腹泻、腹痛、恶心、呕吐,可伴有低热、头痛、肌痛、乏力及食欲减退;粪便为黄色稀水便,无脓血和黏液;镜检可见白细胞或脂肪滴。

A.8 肠腺病毒肠炎

腺病毒为无包膜的双股 DNA 病毒,至少分为 47 个血清型,其中 40 型和 41 型即肠腺病毒。病毒

颗粒呈球形,直径 70nm~90nm,病毒体呈类似通讯卫星样结构。腺病毒对酸碱及温度的耐受范围较宽,对脂溶剂有较强的抵抗力,紫外线照射 30min 或 56℃ 30min 可被灭活。传染源为患者和隐性感染者;可经接触、粪-口途径及呼吸道传播;婴幼儿多发;无明显季节性,秋冬季节多发;以散发和地方性流行为主。潜伏期 3d~10d。临床症状以腹泻为主,可伴呕吐、发热,亦可有呼吸道感染症状。粪便呈水样便或稀水便,少数可有黏液;镜检无脓细胞及红细胞,可有少量白细胞。

A. 9 隐孢子虫病

隐孢子虫病是由隐孢子虫引起的人兽共患寄生虫病。隐孢子虫是一种专性细胞内生长的机会致病寄生原虫。隐孢子虫生活史包括卵囊、子孢子、滋养体、裂殖体、雌雄配子体及合子等阶段,仅需单一宿主即可完成,整个生活史约 5d~15d 完成。目前至少已发现的 6 种隐孢子虫中,感染人和哺乳动物的主要是微小隐孢子虫。虫卵囊对多种常用消毒剂和化学品有较强的抵抗力,在湿冷的环境下可存活数月或 1 年左右。感染隐孢子虫的动物和人以及无症状带虫者为传播本病的主要传染源。传播方式以粪-口、手-口途径为主。感染与职业及免疫功能状态有关。农民、兽医及实验室工作人员多发。全年均可发病,但温暖、潮湿的夏秋季节多见。平均潜伏期 7d。临床主要表现为腹泻、腹痛、恶心、呕吐、厌食、乏力及体重下降等,可伴有低热。免疫功能缺陷者,尤其是艾滋病患者,缓慢起病,腹泻持续。大便可呈水样便或黏液便,无脓血,可有恶臭,粪镜检可见白细胞或脓细胞。在免疫功能缺损患者中,偶有发生呼吸道感染等肠外表现,胆道感染亦有发现。

A. 10 蓝氏贾第鞭毛虫肠炎

蓝氏贾第鞭毛虫为单细胞原虫,归属双滴虫目、六鞭毛科。营两分裂繁殖。其生活史分滋养体(营养繁殖阶段)和包囊(传播阶段)两个时期。滋养体主要寄生于人和动物的十二指肠或上段小肠,偶尔寄生于胆道或胰管。包囊在外界存活能力强,在氯化消毒水(0.5%)中可生存 2d~3d,在粪便中可维持 10d 以上。传染源为排出包囊的人和动物。可经水、食物、接触以及苍蝇等媒介传播。全年均可发病,夏秋季高发。我国各地均有发生,但以南方多见。感染以小儿为多见。本病潜伏期 1 周~2 周。临床表现多为自限性腹泻、无症状带虫、慢性腹泻以及相关的吸收障碍和体重减轻。腹泻为突发性恶臭水样便、糊状或块状便。若未及时治疗可发展为慢性。寄生胆道可发生胆囊炎、胆管炎或累及肝脏肿大、阑尾炎等。

附 录 B
(规范性附录)
实验室诊断方法

B.1 沙门菌检验

B.1.1 标本收集

根据腹泻患者的病程及临床表现等,采集相应的标本,发病第一周采血 5mL,第二、三周取粪便 2g~5g 或尿液 10mL~15mL,粪便挑取有脓血、黏液部分,尿液留取中段尿或采用无菌导尿。所采集的标本尽快检验,运送时间超过 2h 者,标本应放入 Cary-Blair 运送培养基中,在冷藏条件下送检;或将粪便标本直接接种增菌培养基,室温条件下运送。

B.1.2 分离培养

B.1.2.1 直接分离培养

采集病人急性期、用药前新鲜粪便、呕吐物、尿液沉淀物(经 3 000r/min 离心沉淀 10min~15min,倾去上清液)标本接种于强选择性培养基(SS、BS、WS、HE 琼脂等)和弱选择性培养基(Mac、EMB 琼脂)平板各一块;血标本接种于血琼脂或营养琼脂平板,35℃~37℃培养 18h~24h,从平板上挑取可疑菌落(详见表 B.1)进行鉴定。

表 B.1 沙门菌属在选择性琼脂平板上的菌落特征

选择性琼脂平板	菌落特征
亚硫酸铋琼脂(BS)	还原亚硫酸铋菌落为黑色或墨绿色,菌落周围培养基可呈黑色有金属光泽;有些菌株不产生硫化氢,形成灰绿色菌落,周围培养基不变
伊红美蓝琼脂(EMB)	无色半透明
HE 琼脂 WS 琼脂	蓝绿色或蓝色,多数菌株产硫化氢,菌落中心黑色或几乎全黑色
SS 琼脂	无色半透明,产硫化氢菌株有的菌落中心带黑色
麦康凯琼脂(Mac)	无色半透明

B.1.2.2 增菌培养

取新鲜粪便、呕吐物、尿液沉淀物 0.5g~1g 接种于 10mL 氯化镁孔雀绿增菌液或四硫酸钠煌绿增菌液或亚硒酸盐增菌液等;血液 5mL 接种于 50mL 葡萄糖肉汤或胆汁葡萄糖肉汤中,35℃~37℃增菌 6h~8h,挑取增菌液分离培养,培养同 B.1.2.1。

B.1.3 鉴定

B.1.3.1 镜检

沙门菌革兰染色显微镜下可见革兰阴性小杆菌,大小(1~3) μm ×(0.4~0.9) μm 。

B.1.3.2 生化试验

挑取可疑菌落移种于三糖铁(或 KIA)和 MIU 上,并作氧化酶、硝酸盐、KCN、赖氨酸试验;或移种于沙门菌生化鉴定板(条);或使用微生物自动鉴定系统(仪)进行鉴定。凡生化反应符合表 B.2、表 B.3 的,以沙门菌属诊断血清作玻片凝集试验。

B.1.3.3 血清凝集试验

O 抗原试验 用 A~F 多价 O 血清做玻片凝集试验,同时用生理盐水做对照。被 A~F 多价 O 血清凝集者,依次用 O:4;O:3,10;O:7;O:8;O:9;O:2 和 O:11 等因子血清做凝集试验。符合沙门菌属

定义,A~F 多价“O”血清不凝集,送有关部门进一步鉴定。

H 抗原试验 先用多价 H 血清做凝集试验,如有一种或两种多价血清凝集,再用这种多价血清的各种 H 因子血清检查以确定第 1 相和第 2 相的 H 抗原。

Vi 抗原试验 用 Vi 因子血清检测。

表 B.2 沙门菌在三糖铁琼脂内的反应结果

类型	斜面	底层	产气	硫化氢
A1	—	+	+/-	+
A2	+	+	+/-	+
A3	—	+	+	—
A4	—	+	—	—

注: +表示阳性; —表示阴性; +/-表示多数阳性少数阴性。

表 B.3 沙门菌生化反应结果

类型	靛基质	尿素	KCN	硝酸盐	赖氨酸	硫化氢	氧化酶
B1	—	—	—	+	+	+	—
B2	+	—	—	+	+	+	—
B3	—	—	—	+	+/-	—	—

注: +表示阳性; —表示阴性; +/-表示多数阳性少数阴性。

B.1.4 菌型的判定和结果报告

综合以上生化试验和血清学分型鉴定结果,判定菌型并报告结果。

B.2 肠致泻性大肠杆菌检验

B.2.1 标本收集

采集病人急性期、用药前新鲜粪便、呕吐物标本(5g),尽快送检。运送时间超过 2h 时,标本应放入 Cary-Blair 运送培养基中,在冷藏条件下送检;或将粪便标本直接接种增菌培养基,室温条件下运送。

B.2.2 分离培养

B.2.2.1 直接分离培养

取新鲜粪便、呕吐物标本分别接种于麦康凯琼脂或伊红美蓝琼脂等对大肠杆菌抑制性较弱的选择性鉴别培养基或其他商品化的培养基,37℃培养 24h。从平板上挑取可疑菌落(详见表 B.4)进行鉴定。

B.2.2.2 增菌培养

对于疑似肠出血性大肠杆菌 O₁₅₇ : H₇ 感染标本,需经 mEC 肉汤增菌液增菌 6h,免疫磁珠捕获后,转种于 O₁₅₇ 显色培养基(Chromagar O₁₅₇)或山梨醇麦康凯琼脂。大肠杆菌的呕吐物标本等先经营养肉汤于 37℃增菌培养,待有菌生长后,挑取 1~2 接种环转种至弱选择性培养基上。37℃培养 24h。从平板上挑取可疑菌落(详见表 B.4)进行鉴定。

表 B.4 大肠杆菌在选择性琼脂平板上的菌落特征

选择性琼脂平板	菌落特征
麦康凯琼脂	大肠杆菌发酵乳糖,在麦康凯琼脂呈桃红色不透明菌落
伊红美蓝琼脂(EMB)琼脂	黑紫色或红紫色,圆形,边缘整齐,表面光滑湿润,常具有金属光泽,也有的呈紫黑色,不带或略带金属光泽,或粉红色,中心较深的菌落
O ₁₅₇ 显色培养基(Chromagar O ₁₅₇)	肠出血性大肠杆菌 O ₁₅₇ : H ₇ 呈紫红色或浅紫色菌落
山梨醇麦康凯琼脂	肠出血性大肠杆菌 O ₁₅₇ : H ₇ 呈不发酵山梨醇的乳白色菌落或迟缓发酵山梨醇的红色菌落

B. 2. 3 初步鉴定

挑取可疑菌落作革兰染色镜检、生化反应并与大肠杆菌多价血清作玻片凝集试验,阳性者用单价血清作进一步鉴定。

B. 2. 4 鉴定

B. 2. 4. 1 肠致病性大肠杆菌(EPEC)

- a) 标本:水样或蛋花汤样便、呕吐物;
- b) 革兰染色镜检及生化反应符合大肠杆菌特征;
- c) 血清学鉴定符合 EPEC 血清型(表 B. 5);

表 B. 5 常见肠致泻性大肠杆菌的 O 血清群及血清型

婴幼儿腹泻			成人 and 儿童腹泻				
EPEC			ETEC		EIEC	EHEC	EAEC
O ₂₀	O ₂₆	O ₄₄	O ₆ : K ₁₅ : H ₁₆	O ₈ : K ₄₀ : H ₉	O ₂₈ ac	O ₁₅₇ : H ₇	O ₉ : K ₉₉
O ₅₅	O ₈₆	O ₁₁₁	O ₈ : K ₂₅ : H ₉	O ₈ : K ₄₇ : H ⁻	O ₁₁₂	O ₂₆ : K ₆₂ : H ₁₁	O ₁₀₁ : K ₉₉
O ₁₁₄	O ₁₁₉	O ₁₂₅	O ₁₁ : H ₂₇	O ₁₅ : H ₁₁	O ₁₂₄	O ₁₁₁	
O ₁₂₆	O ₁₂₇	O ₁₂₈	O ₂₀ : H ⁻	O ₂₅ : K ₇ : H ₄₂	O ₁₃₆		
O ₁₄₂	O ₁₅₈		O ₂₅ : K ₉₈ : H ⁻	O ₂₇ : H ₇	O ₁₄₃		
			O ₂₇ : H ₂₀	O ₆₃ : H ₁₂	O ₁₄₄		
			O ₇₃ : H ₄₅	O ₇₈ : H ₁₁	O ₁₅₂		
			O ₇₈ : H ₁₂	O ₈₅ : H ₇	O ₁₆₄		
			O ₁₁₄ : H ₂₁	O ₁₁₅ : [H ₅₁] ¹⁾			
			O ₁₂₇ : H ₁₂	O ₁₂₈ : H ₇			
			O ₁₂₈ : H ₂₁	O ₁₃₉ : H ₂₈			
			O ₁₄₈ : H ₂₈	O ₁₄₉ : H ₄			
			O ₁₅₉ : H ₄	O ₁₅₉ : H ₂₀			
			O ₁₅₉ : H ₃₄	O ₁₆₆ : H ₂₇			
			O ₁₆₉ : H ⁻				

注: ¹⁾ 无动力的变异。

d) PCR 检测 eae 基因:引物对为 SK1/SK2,扩增片段长度为 881bp,序列如下:

SK1;5'-CCCGAATTTCGGCACAAGCATAAGC-3'

SK2;5'-CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTTCG-3'

PCR 反应体积为 50μL: 10mmol/L Tris-HCl (pH 8.3); 50mmol/L KCl; 0.1% Triton X-100; 1.5mmol/L MgCl₂; 2.5U Taq 酶; 0.2mmol/L dNTP; 5μL DNA 模板; 引物 SK1 和 SK2 各 0.125μmol/L; 补足无 RNA 酶水至 50μL。同时设阴性、阳性及空白对照。

PCR 反应程序: 95℃ 预变性 10min; 94℃ 变性 1min, 52℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 1min, 共 35 个循环, 最后一个循环 72℃ 延伸 10min。

电泳及结果判断: PCR 产物在 1.5% 琼脂糖上电泳, 紫外透射仪或凝胶成像系统中观察到扩增目的片段长度为 881bp 判为 eae 基因阳性。

B. 2. 4. 2 肠产毒性大肠杆菌(ETEC)

- a) 标本:霍乱样水样便、呕吐物;
- b) 革兰染色镜检及生化反应符合大肠杆菌特征;
- c) 血清学鉴定符合 ETEC 血清型(表 B. 5);

d) 检出大肠杆菌不耐热肠毒素(LT)和(或)耐热肠毒素(ST)。测定 LT 可用兔肠段结扎试验、皮肤试验、ELISA、Biken 试验、平板免疫溶血试验、DNA 探针杂交和聚合酶链反应(PCR)等方法;测定 ST 可用乳鼠灌胃试验、ELISA、PCR、DNA 探针杂交等方法。

PCR 同时检测 *elt* 和 *est* 基因:引物对分别为 LT_L/LT_R 和 AL_{65}/AL_{125} , 扩增片段长度分别为 322bp 和 147bp, 序列如下:

$LT_L: 5'-TCTCTATGTGCATACGGAGC-3'$

$LT_R: 5'-CCATACTGATTGCCGCAAT-3'$

$AL_{65}: 5'-TTAATAGCACCCGGTACAAGCAGG-3'$

$AL_{125}: 5'-CCTGACTCTTCAAAAGAGAAAATTAC-3'$

PCR 反应体积为 50 μ L: 10mmol/L Tris-HCl (pH 8.3); 50mmol/L KCl; 0.1% Triton X-100; 1.5mmol/L $MgCl_2$; 2.5U *Taq* 酶; 0.2mmol/L dNTP; 5 μ L DNA 模板; 引物 LT_L 和 LT_R 各 0.25 μ mol/L; 引物 AL_{65} 和 AL_{125} 各 0.5 μ mol/L; 补足无 RNA 酶水至 50 μ L。同时设阴性、阳性及空白对照。

PCR 反应程序: 95 $^{\circ}C$ 预变性 10min; 94 $^{\circ}C$ 变性 1min, 52 $^{\circ}C$ 退火 1min, 72 $^{\circ}C$ 延伸 1min, 共 35 个循环, 最后一个循环 72 $^{\circ}C$ 延伸 10min。

电泳及结果判断: PCR 产物在 1.5% 琼脂糖上电泳, 紫外透射仪或凝胶成像系统中观察到扩增目的片段长度为 322bp 和(或)147bp 判为 *elt* 和(或)*est* 基因阳性。

B. 2. 4. 3 肠侵袭性大肠杆菌(EIEC)

- a) 标本: 细菌性痢疾样便、呕吐物;
- b) 革兰染色镜检为革兰阴性杆菌;
- c) 生化反应: 不发酵或迟缓发酵乳糖, 不产气, 除 O_{124} 外无动力, 酒石酸盐阴性, 赖氨酸脱羧酶阴性;
- d) 血清学鉴定符合 EIEC 血清型(表 B. 5);
- e) 豚鼠角膜结膜试验(Sereny 试验)、Hela 细胞侵入试验阳性, PCR 或 DNA 探针检测侵袭基因。

PCR 检测 *ipaH* 基因: 引物对为 *ipaIII/ipaIV*, 扩增片段长度为 619bp, 序列如下:

$ipaIII: 5'-GTTCTTGACCGCCTTCCGATACCGTC-3'$

$ipaIV: 5'-GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC-3'$

PCR 反应体积为 50 μ L: 10mmol/L Tris-HCl (pH 8.3); 50mmol/L KCl; 0.1% Triton X-100; 1.5mmol/L $MgCl_2$; 2.5U *Taq* 酶; 0.2mmol/L dNTP; 5 μ L DNA 模板; 引物 *ipaIII* 和 *ipaIV* 各 0.125 μ mol/L; 补足无 RNA 酶水至 50 μ L。同时设阴性、阳性及空白对照。

PCR 反应程序: 95 $^{\circ}C$ 预变性 10min; 94 $^{\circ}C$ 变性 1min, 52 $^{\circ}C$ 退火 1min, 72 $^{\circ}C$ 延伸 1min, 共 35 个循环, 最后一个循环 72 $^{\circ}C$ 延伸 10min。

电泳及结果判断: PCR 产物在 1.5% 琼脂糖上电泳, 紫外透射仪或凝胶成像系统中观察到扩增目的片段长度为 619bp 判为阳性。

B. 2. 4. 4 肠出血性大肠杆菌(EHEC)

- a) 标本: 早期为水样便, 后为血便、呕吐物;
- b) 革兰染色镜检为革兰阴性杆菌;
- c) 生化反应: 不发酵或迟缓发酵山梨醇, 赖氨酸、鸟氨酸、鼠李糖、蔗糖、蜜二糖阳性, 精氨酸、苦杏仁苷阴性;

d) 血清型鉴定: 其血清型为 $O_{157}: H_7$ (其中 H_7 鞭毛抗原采用试管凝集试验法进行鉴定), $O_{26}: K_{62}: H_{11}, O_{111}$ (表 B. 5); $O_{157}: H_7$ 的血清型亦可采用 PCR 检测 O_{157} 和 H_7 特异性基因的方法鉴定, 引物序列见表 B. 6;

表 B.6 O₁₅₇ : H₇ 特异基因检测引物序列

引物名称	引物序列	目的基因	片段大小 bp
O ₁₅₇ -F	5'-TTCAAACAGAGGACCATC-3'	rfbO ₁₅₇	636
O ₁₅₇ -R	5'-CCCAGCCACTAAGTATTG-3'		
flicH ₇ -F	5'-GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC-3'	flicH ₇	625
flicH ₇ -R	5'-CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC-3'		

O₁₅₇ O 抗原特异基因检测:反应总体积为 25 μ L,在 0.2mL 离心管中依次加入:10 $\times$ Buffer 2.5 μ L, 2mmol/L dNTPs 2.5 μ L,引物各 0.5 μ L(10pmol/ μ L),*Taq* 酶 1U,模板 1 μ L,补足无 DNA、RNA 酶水至 25 μ L。反应程序:94 $^{\circ}$ C 5min,模板 DNA 预变性;然后 94 $^{\circ}$ C 变性 1min,56 $^{\circ}$ C 退火 1min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。每次试验均设阴、阳性对照及空白对照。

鞭毛抗原 H₇ 特异基因检测:反应总体积为 50 μ L,在 0.2mL 离心管中依次加入:10 $\times$ Buffer 5 μ L, 2mmol/L dNTPs 5 μ L,引物各 0.25 μ L(10pmol/ μ L),*Taq* 酶 1U,补足无 DNA、RNA 酶水至 50 μ L,模板 1 μ L。反应程序及试验对照均同 O 抗原特异基因检测。

e) Vero 细胞培养法检测 VT 毒素,或送上一级有条件 CDC 进行 PCR 检测 VT1、VT2、eaeA 和 Hly 毒力基因。

B.2.4.5 肠集聚性黏附大肠杆菌(EAggEC)

- a) 标本:水样便、呕吐物;
- b) 革兰染色镜检及生化反应符合大肠杆菌特征;
- c) Hep-2 细胞黏附试验检测细菌对细胞的集聚性黏附或 PCR、DNA 探针技术检测特异性基因。

PCR 检测 *aggR* 基因:引物对为 *aggRks1/aggRkas2*,扩增片段长度为 254bp,序列如下:

aggRks1:5'-GTATACACAAAAGAAGGAAGC-3'

aggRkas2:5'-ACAGAATCGTCAGCATCAGC-3'

PCR 反应体积为 50 μ L; 10mmol/L Tris-HCl(pH 8.3); 50mmol/L KCl; 0.1% Triton X-100; 1.5mmol/L MgCl₂; 2.5U *Taq* 酶; 0.2mmol/L dNTP; 5 μ L DNA 模板; 引物 *aggRks1* 和 *aggRkas2* 各 0.25 μ mol/L; 补足无 RNA 酶水至 50 μ L。同时设阴性、阳性及空白对照。

PCR 反应程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 10min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1min, 52 $^{\circ}$ C 退火 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 共 35 个循环, 最后一个循环 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

电泳及结果判断:PCR 产物在 1.5% 琼脂糖上电泳,紫外透射仪或凝胶成像系统中观察到扩增目的片段长度为 254bp 判为阳性。

B.2.4.6 肠致泻性大肠杆菌种间鉴别

引物对 SK1/SK2、VTcom-u/VTcom-d、LT_L/LT_R、AL₆₅/AL₁₂₅、ipa III/ipa IV 和 *aggRks1/aggRkas2* 分别检测 *eae*、*stx*、*elt*、*est*、*ipaH* 和 *aggR* 基因。详见表 B.7。

表 B.7 多重 PCR 法鉴别肠致泻性大肠杆菌引物序列

引物名称	引物序列	目的基因	片段大小 bp
SK1	5'-CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC-3'	<i>eae</i>	881
SK2	5'-CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG-3'		
VTcom-u	5'-GAGCGAAATAATTTATATGTG-3'	<i>stx</i>	518
VTcom-d	5'-TGATGATGGCAATTCAGTAT-3'		
AL ₆₅	5'-TTAATAGCACCCGGTACAAGCAGG-3'	<i>est</i>	147

续表

引物名称	引物序列	目的基因	片段大小 bp
AL ₁₂₅	5'-CCTGACTCTTCAAAAGAGAAAATTAC-3'		
LT _L	5'-TCTCTATGTGCATACGGAGC-3'	elt	322
LT _R	5'-CCATACTGATTGCCGCAAT-3'		
ipaⅢ	5'-GTTCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC-3'	ipaH	619
ipaⅣ	5'-GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC-3'		
aggRks1	5'-GTATACACAAAAGAAGGAAGC-3'	aggR	254
aggRkas2	5'-ACAGAATCGTCAGCATCAGC-3'		

PCR 反应体积为 50 μ L; 10mmol/L Tris-HCl (pH 8.3); 50mmol/L KCl; 0.1% Triton X-100; 1.5mmol/L MgCl₂; 2.5U *Taq* 酶; 0.2mmol/L dNTP; 5 μ L DNA 模板; 引物 SK1、SK2、ipaⅢ和 ipaⅣ各 0.125 μ mol/L; 引物 VTcom-u、VTcom-d、LT_L、LT_R、aggRks1 和 aggRkas2 各 0.25 μ mol/L; 引物 AL₆₅和 AL₁₂₅各 0.5 μ mol/L; 补足无 RNA 酶水至 50 μ L。同时设阴性、阳性及空白对照。

PCR 反应程序: 95℃预变性 10min; 94℃变性 1min, 52℃退火 1min, 72℃延伸 1min, 共 35 个循环, 最后一个循环 72℃延伸 10min。

电泳及结果判断: PCR 产物在 1.5% 琼脂糖上电泳, 紫外透射仪或凝胶成像系统中观察到扩增目的片段长度分别如表 B.7 中所述则判相应基因为阳性。

综合以上生化试验和血清学分型鉴定结果, 判定菌型并报告结果。

B.3 副溶血性弧菌检验

B.3.1 标本的收集

急性期、用药前采集病人新鲜粪便标本 2g~5g 或 2mL~5mL, 所采集标本尽快检测。运送时间超过 2h 者, 标本应放入 Cary-Blair 运送培养基中; 或将粪便标本直接接种增菌培养基, 室温条件下运送。

B.3.2 分离培养

B.3.2.1 直接分离培养

取新鲜粪便接种于氯化钠蔗糖琼脂或 35g/L 氯化钠琼脂或 TCBS 琼脂等选择性培养基, 35℃~37℃培养 18h~24h, 从平板上挑取可疑菌落(详见表 B.8)做进一步鉴定。

B.3.2.2 增菌培养

取新鲜粪便 0.5g~1g 或 0.5mL~1mL 接种于 10mL 氯化钠结晶紫增菌液(副溶血性弧菌增菌液)或碱性蛋白胨水等增菌液, 35℃~37℃培养 6h~8h, 挑取增菌液分离培养, 培养同 B.3.2.1。副溶血性弧菌在培养基上生长特性见表 B.8。

表 B.8 副溶血性弧菌在选择性琼脂平板上的菌落特征

选择性琼脂平板	菌落特征
氯化钠蔗糖琼脂	因不发酵蔗糖菌落近似培养基颜色, 绿色或蓝绿色
35g/L 氯化钠琼脂	菌落无色不透明
TCBS 琼脂	因不发酵蔗糖菌落呈绿色或蓝绿色

B.3.3 鉴定

B.3.3.1 镜检

挑取可疑菌落涂片镜检, 副溶血性弧菌革兰染色后显微镜下可见革兰阴性无芽孢杆菌, 细菌形态多

变,有杆状、弧状、丝状及球状。不同的培养基上生长的菌体差异很大:在高盐琼脂上呈球杆状;在血琼脂上主要呈卵圆形,少数球杆状,也有丝状。悬滴标本运动活泼。

B. 3. 3. 2 生化试验

挑取可疑菌落转种三糖铁琼脂培养基并作氧化酶、耐盐生长试验,并接种蔗糖、V-P、甲基红等生化反应培养基。具体内容见表 B. 9。

综合镜检和生化反应结果判断菌型并报告结果。

表 B. 9 致病性弧菌鉴定表

项 目	霍乱 弧菌	拟态 弧菌	副溶血 弧菌	创伤 弧菌	溶藻 弧菌	辛辛 那提 弧菌	河弧 菌	弗尼斯 弧菌	雀周鱼 弧菌 (少女鱼 弧菌)	霍利斯 弧菌	麦氏 弧菌	气单 胞菌	邻单 胞菌
最适生长温度(℃)	37	37	37	37	37	25,35	37	37	25	25,36	37	28	37
氧化酶	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
硝酸盐还原	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
靛基质	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+/-	+/-	+/-	+
VP	+/-	-	-	-	+/-	+	-	-	+	-	+/-	+/-	-
尿素酶	-	-	-/+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
L-赖氨酸	+	+	+	+	+	+	-	-	+/-	-	-/+	-	+
L-鸟氨酸	+	+	+	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	+
L-精氨酸	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+/-	+	+
葡萄糖产气	-	-	-	-	-	-	-	+	-/+	-	-	+/-	-
乳糖	-/+	+/-	-	+	-	-	-	-	-	-	+/-	-/+	-
麦芽糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+/-
D-甘露醇	+	+	+	+/-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
蔗糖	+	-	-	-/+	+	+	+	+	-	-	+	+/-	-
L-阿拉伯糖	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+/-	-
纤维二糖	-	-	-	+	-	+	-/+	-/+	-	-	-	+/-	-
水杨素	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+/-	+/-
明胶酶	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+/-	+	-
在不同盐量肉汤中 生长试验													
0%NaCl	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
3%NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6%NaCl	+/-	+/-	+	+/-	+	+	+/-	+/-	+	+/-	+	-	-
8%NaCl	-	-	+	-	+	-	-/+	+/-	-	-	+/-	-	-
10%NaCl	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-
O/129 敏感性													
10μg	S	S	R	S	R	R	R	R	S	nd	S	R	S
150μg	S	S	S	S	S	S	S	S	S	nd	S	R	S
TCBS 生长	Y	G	G	G	Y	Y	Y	Y	G	G	Y	Y	G

注:+,阳性;- ,阴性;+/- ,多数阳性,少数阴性;-/+ ,多数阴性,少数阳性;nd,不定;S,敏感;R,耐药;Y,黄色;G,绿色

B.4 弯曲菌检验

B.4.1 标本收集

于急性期、用药前采集病人新鲜粪便标本 10g,立即送实验室进行培养,运送时间超过 2h 者,应放入 Cary-Blair 运送培养基,4℃冷藏送检;或将粪便标本直接接种增菌肉汤,并置于微需氧环境下,室温条件下运送。

B.4.2 粪便标本直接镜检

急性期患者的粪便可直接作涂片检查,革兰染色或用 0.3%碱性复红单染色镜检,弯曲菌为细长、弯曲、呈 S 形或“海鸥展翅”状、无芽孢的革兰阴性菌。液体标本在暗视野显微镜下可见投标式或螺旋式动力,霍乱弧菌制动试验阴性,提示弯曲菌感染。

B.4.3 分离培养方法

B.4.3.1 培养条件

本菌为微需氧菌,在 6% O₂、7% CO₂、7% H₂、80% N₂ 条件下生长最好。

可以使用:①混合气体法;②烛缸培养法;③微需氧产气袋法。

B.4.3.2 直接培养

急性期、用药前采集的病人新鲜粪便标本可直接划线接种 CCD 琼脂平板(charcoal, cefoperazone, desoxycholate agar),37℃微需氧培养 24h~72h。

B.4.3.3 增菌培养

病人新鲜粪便标本 5g 接种弯曲菌增菌肉汤(Preston 肉汤),37℃微需氧培养 24h~72h 后划线接种 CCD 琼脂平板,37℃微需氧培养 24h~72h。

B.4.3.4 可疑菌落在培养基上的形态特征

弯曲菌在 CCD 琼脂平板为灰色、湿润、沿划线生长,菌落常常呈不规则圆形。空肠弯曲菌通常为灰绿色的菌落,有或无金属光泽。结肠弯曲菌的菌落为奶油灰、湿润、突起。

B.4.4 鉴定

B.4.4.1 镜检

B.4.4.1.1 革兰染色镜检

弯曲菌为细长、弯曲、呈 S 形或“海鸥展翅”状、无芽孢的革兰阴性菌。

B.4.4.1.2 暗视野显微镜镜检

液体标本在暗视野显微镜下可见投标式或螺旋式动力,霍乱弧菌制动试验阴性。

B.4.4.2 生化鉴定

将可疑菌落划线接种到哥伦比亚血琼脂平板进行分纯,37℃微需氧培养 48h。挑取菌落做生化反应进行确认。弯曲菌的生化鉴别见表 B.10。

表 B.10 弯曲菌属种的生化鉴别表

	空肠弯曲菌 <i>Campylobacter jejuni</i>	结肠弯曲菌 <i>Campylobacter coli</i>	红嘴鸥弯曲菌 <i>Campylobacter lari</i>
过氧化氢酶试验	+	+	+
氧化酶试验	+	+	+
马尿酸盐水解试验	+	—	—
吡啶醋酸酯水解试验	+	+	—

马尿酸盐水解试验 用接种环自哥伦比亚血琼脂平板刮取菌苔,接种到 0.4mL 含 1%的马尿酸钠溶液中,振摇试管以分散培养物,置 37℃培养 2h。然后向试管中加入 0.2mL 茆三酮试剂,将试管于 37℃放置 10min,出现紫/蓝色者为阳性反应,无色或灰色为阴性反应。以阴性菌和阳性菌做对照。

吡啶醋酸酯水解试验 取 50 μ L 含 10% 吡啶醋酸酯的溶液, 将其吸附到直径为 6mm 的纸片上, 将纸片在空气中晾干。挑取可疑菌落生长物, 将其直接涂布在纸片上, 同时滴加一滴无菌蒸馏水, 观察 5min~10min。纸片显示蓝绿色为弯曲菌反应阳性。

B. 4. 5 菌种保存

将菌株接种在哥伦比亚血平板上, 37℃ 微需氧培养 48h, 刮取菌苔, 悬浮于含 20% 甘油的脑心肉汤, 置于 -70℃ 冰箱保存。复苏时, 将菌种管取出化冻并摇动均匀后, 整管转种不加抗生素的弯曲菌增菌肉汤 37℃ 培养 48h~72h。

B. 4. 6 结果报告

根据 B. 4. 4. 1、B. 4. 4. 2 结果, 报告是否检出空肠弯曲菌或结肠弯曲菌。

腹泻病人同时感染空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的情况很常见。

B. 4. 7 培养基

B. 4. 7. 1 弯曲菌增菌肉汤

B. 4. 7. 1. 1 成分

A 组

布氏肉汤

Lab-Lemco 牛肉粉	10g
蛋白胨	10g
氯化钠	5g
蒸馏水	1 000mL

B 组

弯曲菌生长促进剂

丙酮酸钠(Sodium pyruvate)	0. 25g
焦亚硫酸钠(Sodium pyrosulfite)	0. 25g
硫酸亚铁(Ferrous sulfate)	0. 25g

C 组

抗生素

多黏菌素 B(Polymyxin B)	5 000IU
甲氧苄啶(Trimethoprim)	10mg
利福平(Rifampicin)	10mg
放线菌酮(Cycloheximide)	100mg
冻融的马血(或脱纤维兔血)	50mL

D 组

B. 4. 7. 1. 2 制法

A 组各组分混合, 加热溶解, 校正 pH 值到 7.0 $\pm$ 0.2。装瓶, 每瓶 100mL。121℃ 高压灭菌 15min, 备用。此为布氏肉汤基础培养基。

临用前, 每 100mL 布氏肉汤基础培养基中加入冻融的马血(或脱纤维兔血) 5mL、B 组混合液 0. 5mL 和 C 组抗生素混合液 0. 5mL, 摇匀备用。

B 组混合液的制备: 丙酮酸钠、焦亚硫酸钠和硫酸亚铁均称取 0. 125g, 加入 2mL 无菌蒸馏水, 摇匀备用。

C 组抗生素混合液的制备: 分别称取多黏菌素 B 10mg、甲氧苄啶 10mg、利福平 10mg 和放线菌酮 100mg, 加入 2mL 的 1: 1 丙酮和无菌蒸馏水溶液, 摇匀备用。

在对抗生素进行操作时的安全注意事项: ①使用的抗生素中包含有放线菌酮, 如接触到皮肤, 应立即用大量肥皂水冲洗; ②穿适当的保护性衣服, 戴手套。

B. 4. 7. 2 CCD 琼脂

B. 4. 7. 2. 1 成分

布氏肉汤	25g
Lab-Lemco 牛肉粉	10g

蛋白胨	10g
氯化钠	5g
微生物用碳粉	4g
酪蛋白水解产物	3g
脱氧胆酸钠	1g
硫酸亚铁	0.25g
丙酮酸钠	0.25g
琼脂	12g
蒸馏水	1 000mL
头孢哌酮(Cefoperazone)	32mg
两性霉素 B(Amphotericin B)	10mg

B. 4. 7. 2. 2 制法

除抗生素外,各组分混合,加热溶解,校正 pH 值到 7.0 ± 0.2 。121℃ 高压灭菌 15min,冷却至 50℃,加入抗生素混合液 0.5mL(以水为溶剂),摇匀,倾注平板。平板要密封避光保存,使用前置 37℃ 孵育 18h。

操作头孢哌酮和两性霉素 B 要注意安全保护,穿适当的保护性衣服,戴手套。

B. 5 小肠结肠炎耶尔森菌检验

B. 5. 1 标本的收集

于急性期使用抗生素前采集新鲜粪便标本和血液等标本,立即送实验室进行检测,运送时间超过 2h 者,应放入 Cary-Blair 运送培养基,4℃ 冷藏送检。血液标本应先进行增菌。

B. 5. 2 分离培养方法

B. 5. 2. 1 直接分离培养

将粪便标本直接接种于麦康凯培养基或 CIN 等选择性琼脂平板上,26℃ 培养 24h~48h。从平板上挑取可疑菌落(在麦康凯平板上挑选乳白色、透明的小菌落;在 CIN 平板上挑取鲜艳的紫红色菌落,小肠结肠炎耶尔森菌在此平板上呈公牛眼状为其典型形态),分别接种改良克氏双糖铁琼脂,26℃ 培养 24h。将改良克氏双糖铁琼脂上、下两层均产酸且不产硫化氢者转种 Rustigian's 尿素培养基,尿素阳性者分别转种两支半固体培养基,各置于 26℃ 和 37℃ 培养 24h。26℃ 有动力且 37℃ 无动力者为小肠结肠炎耶尔森菌疑似菌株,分别进行生化鉴定和血清分型。

B. 5. 2. 2 增菌培养

取约 1g 粪便标本接种于 10mL 改良磷酸盐缓冲液,于 4℃ 分别增菌培养 7d、14d 和 21d 后取增菌培养物转种于麦康凯或 CIN 等平板,26℃ 培养 24h~48h。从平板上挑取可疑菌落,同 B. 5. 2. 1。

B. 5. 3 生化鉴定

所有的生化反应均在 26℃ 培养。本菌主要生化反应情况见表 B. 11。

表 B. 11 典型小肠结肠炎耶尔森菌主要的生化反应情况

项目	结果	项目	结果	项目	结果
动力 25℃	+(—)	苯丙氨酸脱氨酶	—	蜜二糖	—(+)
37℃	—	氧化酶	—	鼠李糖	—(+)
V-P25℃	+(—)	葡萄糖产气	—	蔗糖	+(—)
37℃	—	尿素酶	+	棉子糖	—(+)
靛基质	V	乳糖酏(氧化)	+	山梨糖	+
硝酸盐还原	+	鸟氨酸脱羧酶	+	蕈糖	V

续表

项目	结果	项目	结果	项目	结果
卵磷脂	V	精氨酸脱羧酶	—	木胶糖	V
β-半乳糖苷酶	+	赖氨酸脱羧酶	—	七叶灵	V
甲基红	+	D-树胶醛糖	—	水杨苷	V
枸橼酸盐	V	D-树胶醛糖	+		

注：+（—）：多数菌阳性，少数菌阴性；—（+）：多数菌阴性，少数菌阳性；V：不同生物型结果不同。

B. 5. 4 血清学检测

本菌具有菌体 O 抗原和鞭毛 H 抗原。用现在国际常报告的 80 多个 O 抗原因子，可将本菌分成不同血清型。目前我国已报告的血清型有 54 个。

B. 5. 5 毒力基因检测

PCR 法检测小肠结肠炎耶尔森菌 *ail*（黏附侵袭基因）、*ystA*（耐热性肠毒素 A）、*ystB*（耐热性肠毒素 B）、*yadA*（黏附素基因）、*virF*（毒力因子基因）毒力基因，引物序列见表 B. 12。

表 B. 12 小肠结肠炎耶尔森菌毒力基因引物序列

引物名称	引物序列	目的基因	片段大小 bp
<i>Ail-F</i>	5'-TAA TGT GTA CGC TGC GAG-3'	<i>ail</i>	351
<i>Ail-R</i>	5'-GAC GTC TTA CTT GCA CTG-3'		
<i>YstA-F</i>	5'-ATC GAC ACC AAT AAC CGC TGA G-3'	<i>ystA</i>	79
<i>YstA-R</i>	5'-CCA ATC ACT ACT GA CTT CGG CT-3'		
<i>YstB-F</i>	5'-GTA CAT TAG GCC AAG AGA CG-3'	<i>ystB</i>	146
<i>YstB-R</i>	5'-GCA ACA TAC CTC ACA ACA CC-3'		
<i>YadA-F</i>	5'-CTT CAG ATA CTG GTG TCG CTG T-3'	<i>yadA</i>	849
<i>YadA-R</i>	5'-ATG CCT GAC TAG AGC GAT ATC C-3'		
<i>VirF-F</i>	5'-GGC AGA ACA GCA GTC AGA CAT A-3'	<i>virF</i>	561
<i>VirF-R</i>	5'-GGT GAG CAT AGA GAA TAC GTC G-3'		

注：* 表示 O：8 血清型小肠结肠炎耶尔森菌扩增产物片段大小。

B. 5. 5. 1 *ail* 基因检测：反应总体积为 25μL，在 0.2mL 离心管中依次加入：10×Buffer 2.5μL，2mmol/L dNTPs 2.5μL，引物各 1.2μL（10pmol/μL），3U/μL *Taq* 酶 0.2μL，模板 2μL，补足无 RNA 酶水至 25μL。反应程序：94℃ 10min，模板 DNA 预变性；然后 94℃ 15s，57℃ 30s，72℃ 30s，25 个循环；最后 72℃ 延伸 10min。每次试验均设阴、阳性对照及空白对照。电泳及结果判断：PCR 产物在 1.5% 琼脂糖上电泳，紫外透射仪或凝胶成像系统中观察到扩增目的片段长度为 351bp 判为 *ail* 基因检测阳性。

B. 5. 5. 2 *ystA* 基因检测：反应体系同 B. 5. 5. 1。反应程序：94℃ 10min，模板 DNA 预变性；然后 94℃ 15s，61℃ 30s，72℃ 30s，25 个循环；最后 72℃ 延伸 10min。每次试验均设阴、阳性对照及空白对照。电泳及结果判断：PCR 产物在 1.5% 琼脂糖上电泳，紫外透射仪或凝胶成像系统中观察到扩增目的片段长度为 79bp 判为 *ystA* 基因检测阳性。

B. 5. 5. 3 *ystB* 基因检测：反应体系、反应程序及电泳同 B. 5. 5. 2，扩增目的片段长度为 146bp 判为 *ystB* 基因检测阳性。

B. 5. 5. 4 *yadA* 基因检测：反应体系同 B. 5. 5. 1。反应程序：94℃ 10min，模板 DNA 预变性；然后 94℃ 15s，60℃ 30s，72℃ 30s，25 个循环；最后 72℃ 延伸 10min。每次试验均设阴、阳性对照及空白对照。电泳及结果判断：PCR 产物在 1.5% 琼脂糖上电泳，紫外透射仪或凝胶成像系统中观察到扩增目的片段长度为 849bp（或 759bp）判为 *yadA* 基因检测阳性。

B.5.5.5 virF 基因检测:反应体系同 B.5.5.1。反应程序:94℃ 10min,模板 DNA 预变性;然后 94℃ 15s,63℃ 30s,72℃ 30s,25 个循环;最后 72℃ 延伸 10min。每次试验均设阴、阳性对照及空白对照。电泳及结果判断:PCR 产物在 1.5% 琼脂糖上电泳,紫外透射仪或凝胶成像系统中观察到扩增目的片段长度为 561bp 判为 virF 基因检测阳性。

B.6 轮状病毒检验

B.6.1 标本收集

B.6.1.1 粪便:收集患者早期腹泻粪便约 10g 或 10mL,置无菌容器内,冷藏运送至实验室,4℃ 或 -20℃ 保存备检。

B.6.1.2 血液标本:如做抗体测定,必须采集 2 份血清标本。第 1 份(急性期)在发病时尽早采集,第 2 份在发病后 1 个月左右采集。无菌条件下抽取 5mL 血液,置于消毒试管。室温放置 2h,待凝固后分离血清。

B.6.2 实验室检查(可采用下列方法之一检验)

B.6.2.1 电镜检查:直接电镜或免疫电镜检查病毒颗粒。

B.6.2.1.1 腹泻患者粪便上清液 0.2mL~0.5mL。

B.6.2.1.2 直径约为 3mm 的铜网,每网为 200 目,以 0.25% Formvar 制备铜网上的支持膜,干燥后备用。

B.6.2.1.3 染色液:1% 醋酸铀或 2.5% 磷钨酸。

B.6.2.1.4 血清:①病人恢复期血清(1:5 或 1:10 稀释);②兔抗 ADRV 诊断血清,其效价 1:64(对流免疫电泳)以上,用时以生理盐水作 1:20~1:50 稀释。

B.6.2.1.5 直接电镜法:取腹泻患者粪便上清液约 0.2mL~0.5mL,加等量氯仿,振摇 3min~5min,3 000r/min 离心 15min~25min,取其上相液,用微量吸液器滴入有支持膜的铜网上,1min~2min 后,用滤纸轻轻吸去铜网上的液体,自然干燥待检。对标本负染。用染色液染 1min,吸去多余染液,干燥后上电镜观察。电镜下观察标本中的病毒颗粒,见到特殊轮形的病毒即可确定。

B.6.2.1.6 免疫电镜:取经 3 000r/min 离心的粪便上清液 50μL~100μL,加入病人恢复期血清或兔抗 ADRV 血清(稀释后)50μL~100μL 混合,37℃ 作用 1h,4℃ 过夜。将铺于载玻片上 1% 琼脂糖(厚约 3mm)用刀片切成 0.5cm×0.5cm 的方块,置于 3 层滤纸上,用毛细吸管将抗原-抗体作用液滴在小方形的琼脂糖块上,迅速将铜网放在液滴上,待铜网几乎贴在琼脂糖块上时,取下铜网,用滤纸轻轻吸去铜网上的液体,自然干燥后用染色液染 1min,吸去多余染液,干燥后上电镜观察,见到特殊轮形的病毒即可确定。

B.6.2.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE):将粪便标本用 PBS 稀释成 10%,加 SDS(终浓度为 1%)于 56℃ 30min 处理后用等量酚、氯仿简单抽提病毒 RNA,用 10% 不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳后用硝酸银染色,可见清晰、典型的 11 条 dsRNA 条带,根据电泳图形判定结果。

B.6.2.2.1 A 组轮状病毒是婴幼儿腹泻的主要病原,电泳图可见 11 条 RNA 区带分四组,其排列为 4.2.3.2。依据第 IV 组 10 和 11 RNA 片段电泳距离不同,把轮状病毒分为两个亚群:亚群 I 为短型(S 型),两片段距离短;亚群 II 为长型(L 型),两片段距离长。

B.6.2.2.2 B 组轮状病毒即成人腹泻轮状病毒,主要引起青壮年腹泻。11 条 RNA 电泳图的分布模式为 4.2.1.1.1.1.1(或描述为 4.2.2.3),第 7.8.9 节段明显分开。

B.6.2.2.3 C 组轮状病毒,主要引起婴幼儿腹泻,11 条 RNA 电泳图的分布模式为 4.3.2.2,易于与 A 组和 B 组轮状病毒区别。

B.6.2.3 琼脂糖凝胶电泳:提取的病毒 RNA 直接用 1% 琼脂糖凝胶电泳 1h~1.5h,溴化乙啶染色后紫外灯下或凝胶成像系统观察,依据电泳图形判定结果。电泳图形的分布模式从上到下为 3.2.3.2 的规律。此外,还可以根据第 4 组 2 个片段迁移率上的差别,把 A 组轮状病毒分成长型和短型,此法比

PAGE 电泳分析简单快速,但检测灵敏度较低。

B. 6. 2. 4 ELISA 检测法:检测病毒颗粒和抗原。有商品试剂盒供应,试验按常规方法进行。

B. 6. 3 反转录聚合酶链反应(RT-PCR):从粪便标本中可检测出浓度很低的轮状病毒。根据病毒 VP7 或 VP4 基因在不同型的轮状病毒株间有高度变异而在同型毒株之间这一变异区高度保守的特征,运用反转录后巢式 PCR 可区分轮状病毒的不同基因型,并可检测到不同轮状病毒的混合感染。根据检测不同基因片段的需要有多种引物序列可以选择,详见表 B. 13。PCR 反应体系及反应条件按选择的试剂及扩增仪而有所不同。扩增产物按常规进行电泳及结果判断。

表 B. 13 用于轮状病毒核酸检测及基因分型的寡核苷酸引物

引物名称	引物极性	分型用途	序列(5'-3')	退火温度 ℃	片段大小 bp
Pr1	RV(+)	A 组轮状病毒通用引物	GGT TAGCTCCTTTTAATGTATGGT	58	362
Pr2	RV(-)		ACTGATCCTGTTGGCCATCC		
Beg9	G(+)	G 血清分型	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG	42	1 062
End9	G(-)	第一轮引物	GGTCACATCATACAATTCTAATCTAAG		
RVG9	G(-)	G 血清分型 第二轮共用引物	GGTCACATCATACAATTCT	42	—
aBT1	G1(+)	G1 血清型特异引物	CAAGTACTCAAATCAATGATGG		749
aCT2	G2(+)	G2 血清型特异引物	CAATGATATTAACACATTTTCTGTG		652
aET3	G3(+)	G3 血清型特异引物	CGTTTGAAGAAGTTGCAACAG		374
aDT4	G4(+)	G4 血清型特异引物	CGTTTCTGGTGAGGAGTG		583
Con3	P(+)	P 血清分型	TGGCTTCGCCATTTTATAGACA	42	877
Con2	P(-)	第一轮引物	ATTTCCGACCATTATAACC		
Con3	P(+)	P 血清分型 第二轮共用引物	TGGCTTCGCCATTTTATAGACA	42	—
1T1	P1(-)	P1 血清型特异引物	TCTACTTGGATAACGTGC		346
2T1	P2(-)	P2 血清型特异引物	CTATTGTTAGAGTTAGAGTC		484
3T1	P3(-)	P3 血清型特异引物	TGTTGATTAGTTGGATTCAA		268
4T1	P4(-)	P4 血清型特异引物	TGAGACATGCAATTGGAC		392
5T1	P5(-)	P5 血清型特异引物	ATCATAGTTAGTAGTCGG		584

B. 6. 4 病毒分离

B. 6. 4. 1 细胞系:原代非洲绿猴肾或传代非洲绿猴肾细胞(MA104)细胞等。

B. 6. 4. 2 细胞培养基成分:Eagle's 培养液、3%谷氨酰胺、青/链霉素(10 000μg/mL、10 000μg/mL)、胎牛血清、7.5%碳酸氢钠、10μg/mL 结晶胰酶。

B. 6. 4. 3 生长液:100mL Eagle's 生长液中包含 Eagle's 液 84mL、胎牛血清 10mL、青/链霉素 2mL、3%谷氨酰胺 1mL、7.5%碳酸氢钠调液体 pH 值至 7.2~7.4。

B. 6. 4. 4 维持液:100mL Eagle's 维持液中包含 Eagle's 液 92mL、胎牛血清 2mL、青/链霉素 2mL、3%谷氨酰胺 1mL、7.5%的碳酸氢钠调液体的 pH 值至 7.2~7.4。

B. 6. 4. 5 实验步骤:粪便上清液 0.2mL~0.5mL 先加青/链霉素 0.2mL 4℃过夜处理或用 0.45μm 除菌滤器过滤,将标本用终浓度为 10μg/mL 结晶胰酶在 37℃作用 30min,接种到生长至 80%单层细胞管,37℃吸附 1h,弃去标本液,换上细胞维持液(含胰酶 0.5μg/mL~1.0μg/mL),在 37℃孵育至出现细胞病变,按照上述方法在细胞内连续传代三次。用特异免疫血清作中和试验进行鉴定。对于粪便标本

中轮状病毒的初次分离,最好先在原代细胞上传几代适应后再传至 MA104 细胞大量增殖。一般实验室限于条件,不易做到病毒分离。

B.7 诺瓦克病毒检验

B.7.1 标本采集

B.7.1.1 粪便标本应在发病首日采集,至多不能超过发病急性期(48h~72h)。每份标本量约 10mL~50mL。25h~48h 采集的粪便标本,阳性检出率最高。

B.7.1.2 病人呕吐物是粪便标本的最佳补充,有助于病原的诊断。

B.7.1.3 若是饮用水,需用大容量(5L~100L)浓集病毒后检测。从流行病学角度出发,在水、食物或其他外环境标本中检出诺瓦克病毒有重要意义。

B.7.1.4 采集患者急性期(发病 5d 内)和恢复期(发病 3 周~6 周)血清,-20℃长期保存。

B.7.2 实验室检查

B.7.2.1 电镜检查:实验方法同轮状病毒电镜检查。

B.7.2.2 ELISA 方法:通过纯化的重组杆状病毒高效表达的诺瓦克病毒衣壳蛋白作为抗原,直接检测病人血中特异性 IgG 抗体。因存在隐性感染情况,需确认患者急性期和恢复期双份血 IgG 抗体滴度出现≥4 倍增长。

B.7.2.3 反转录聚合酶链反应(RT-PCR)

B.7.2.3.1 按常规提取病毒 RNA 作为模板。引物设计选择病毒 RNA 聚合酶区域。可选择一对或同时用两对引物(详见表 B.14)进行反转录聚合酶链反应。

表 B.14 用于诺瓦克病毒核酸检测寡核苷酸引物

引物	引物序列	片段大小 bp
P289	5'-TGA CGA TTT CAT CAT CAC CAT A-3'	319
P290	5'-GAT TAC TCC AGG TGG GAC TCC AC-3'	
P3	5'-GCA CCA TCT GAG ATG GAT GT-3'	206
P51	5'-GTT GAC ACA ATC TCA TGA TC-3'	

B.7.2.3.2 反应体系及反应条件按选择的试剂及扩增仪有所不同。扩增产物按常规进行电泳及结果判断。

B.8 肠腺病毒检验

B.8.1 标本采集:同 B.6.1。

B.8.2 实验室检测

B.8.2.1 ELISA 方法:有商品试剂盒供应,试验按常规方法进行。

B.8.2.2 聚合酶链反应(PCR 方法)

B.8.2.2.1 常规方法提取标本中病毒 DNA 作为模板。

B.8.2.2.2 采用与 Ad40 及 Ad41 六邻体基因高度保守区互补引物扩增腺病毒 DNA。引物 hexAA1885 的序列为:5'-GCC GCA GTG GTC TTA CAT GCC ACA CTC-3';引物 hexAA1913 的序列为:5'-CAG CAC GCC GCG GAT GTC AAA GT-3'。

B.8.2.2.3 反应体系:10×buffer 5μL(含 1.5mmol/L MgCl₂),2mmol/L dNTPs 5μL,引物 hexAA1885 和 hexAA1913 各 0.8μmol/L、1.5U Taq DNA 酶、5μL 提取的模板 DNA,补足 DH₂O 至 50μL。

B.8.2.2.4 反应条件:94℃预变性 3min,94℃变性 40s,55℃退火 40s,72℃延伸 40s,共 35 个循环,最

后一个循环 72℃ 延伸 10min。PCR 产物电泳及观测按常规进行,扩增目的片段为 300bp。

B. 8. 2. 2. 5 扩增产物的限制性内切酶分析(病毒分型):按 PCR 产物纯化试剂盒说明书操作,纯化 PCR 扩增产物。取 10 μ L PCR 扩增产物加 2U~5U 限制性内切酶 Rsa I,总反应体积 20 μ L。置 37℃ 水浴中过夜。取 10 μ L 酶切产物进行 1% 琼脂糖(含荧光染料)电泳,标准分子量 Marker 作参照,置紫外光下或凝胶成像系统观察。纯化的扩增产物经 Rsa I 酶切后可清楚地将肠道腺病毒 40 型和 41 型区别开,Ad40 被水解为 256bp 和 45bp 两个片段,Ad41 被水解为 211bp 和 90bp 两个片段。

B. 8. 2. 3 琼脂糖凝胶电泳分析:取 DNA 标本 20 μ L 加限制性内切酶 Sma I 50U,10 倍 Sma I 酶缓冲液 5 μ L,再加蒸馏水至 50 μ L,混匀后 37℃ 振荡水浴 1h,70℃ 水浴 5min 终止酶解。取酶解物进行琼脂糖凝胶电泳,溴乙啶染色,紫外光下或凝胶成像系统观察,腺病毒 40 和 41 型分别显示独特的酶切图谱。排列模式 3. 2. 2. 1 为腺病毒 40 型,排列模式 3. 3. 3. 1 和 3. 3. 4. 1 为腺病毒 41 型。

B. 8. 2. 4 病毒分离

B. 8. 2. 4. 1 细胞系:腺病毒 40 和 41 型能在 Grahm293 细胞、张氏结膜细胞和第三代食蟹猴肾细胞(tCMK cells)中生长。但 Grahm293 细胞目前是腺病毒最敏感的细胞。

B. 8. 2. 4. 2 细胞培养基成分:EagLe's 培养液、3% 谷氨酰胺、青/链霉素(10 000 μ g/mL,10 000 μ g/mL)、胎牛血清、7. 5% 碳酸氢钠。

B. 8. 2. 4. 3 生长液:100mL EagLe's 生长液中包含 EagLe's 液 84mL、胎牛血清 10mL、青/链霉素 2mL、3% 谷氨酰胺 1mL、7. 5% 碳酸氢钠调液体 pH 值至 7. 2~7. 4。

B. 8. 2. 4. 4 维持液:100mL EagLe's 维持液中包含 EagLe's 液 92mL、胎牛血清 2mL、青/链霉素 2mL、1% 谷氨酰胺 1mL、7. 5% 的碳酸氢钠调液体的 pH 值至 7. 2~7. 4。

B. 8. 2. 4. 5 实验步骤:粪便上清液 0. 2mL~0. 5mL 先加青/链霉素 0. 2mL 4℃ 过夜处理或用 0. 45 μ m 除菌滤器过滤,接种到生长至 80% 单层细胞管,37℃ 吸附 1h,弃去标本液,换上细胞维持液,置 37℃ 孵育至出现细胞病变,按照上述方法在细胞内连续传代三次。用特异免疫血清作中和试验进行鉴定。肠腺病毒 40/41 型感染 Grahm293 细胞 12d 后,细胞出现特征性病变,细胞肿胀变圆,成堆呈葡萄状。在传代培养第二代时 10d 左右出现局灶性病变,15d 后病变完全。

B. 9 隐孢子虫检验

人体隐孢子虫病的病原诊断并不困难,主要是从粪便、呕吐物和痰中找到卵囊即可确诊。检查卵囊的方法很多,但多认为急性隐孢子虫病人粪便中卵囊数量多,检查时无需浓集,粪便直接涂片后再用特异的染色方法检查,容易发现卵囊。如果检查与病人或病畜接触过的人群,复查治疗后的病人等,采用浓集法可提高检出率。检查此类人群与环境、水中的隐孢子虫污染情况还可采用免疫学和分子生物学检测方法。

B. 9. 1 标本制备:粪便直接涂成 2 分硬币大小的粪膜(厚于或接近常规涂片),在自然或 37℃ 下使之充分干燥后,滴加甲醇固定 5min,或通过火燃固定后待染色。

B. 9. 2 金胺-酚染色法

B. 9. 2. 1 试剂配制:0. 1% 金胺-酚染色液(第一液):金胺 0. 1g,苯酚 5g,蒸馏水 100mL,充分溶解;3% 盐酸酒精(第二液):盐酸 3mL,95% 酒精 100mL;0. 5% 高锰酸钾液(第三液):高锰酸钾 0. 5g,蒸馏水 100mL。

B. 9. 2. 2 染色步骤:滴加第一液于粪膜上,5min~10min 后水洗;滴加第二液,1min 后水洗;滴加第三液,1min 后水洗;充分干后荧光镜低倍过筛检查,高倍判断结果。

注:染色所用的金胺-酚和高锰酸钾溶液配制后,不宜超过一个月,否则影响染色结果。

B. 9. 2. 3 结果判定:染色后的标本在荧光镜低倍下卵囊为一圆形亮点,高倍下发出乳白色或略带绿色的荧光,多数卵囊周围深染,中央淡染,似厚环状,或深色结构偏位,有些全为深染。卵囊多时似繁星,即使不再用其他方法染色亦可判断。但有的标本可出现非特异的荧光颗粒,应注意鉴别,特别注意与圆孢

子虫卵囊的鉴别,圆孢子虫卵囊($7\mu\text{m}\sim 8\mu\text{m}$)比微小隐孢子虫卵囊大,荧光着色偏暗,内含暗色颗粒状物,或呈不规则的筛网状。本法简便、敏感,适用于批量过筛检查。

B. 9.3 改良抗酸染色法

B. 9.3.1 试剂配制:苯酚复红染色液(第一液):碱性复红 4g, 95%酒精 20mL, 苯酚 8mL, 蒸馏水 100mL; 3%盐酸酒精(第二液):盐酸 3mL, 95%酒精 100mL; 2%孔雀绿原液:孔雀绿 2g, 蒸馏水 100mL; 1:10 孔雀绿工作液(第三液):孔雀绿原液 1mL, 蒸馏水 10mL。

B. 9.3.2 染色步骤:粪便涂片和固定方法同 B. 9.1。滴加第一液于粪膜上, 1.5min~5min 后水洗; 滴加第二液, 1min~3min 后水洗; 滴加第三液, 1min 后水洗; 干后光镜油镜观察。

B. 9.3.3 结果判定:粪便涂片经本法染色后, 卵囊为玫瑰色, 背景为蓝绿色, 对比性很强。卵囊圆或椭圆形, 大小 $5.0\mu\text{m}\times 4.5\mu\text{m}$, 发亮, 因观察的角度不同, 囊内孢子排列似不规则, 呈多形态状, 残余体为暗黑(棕)色颗粒状。经该法染色的标本大多存在许多非特异的抗酸红色颗粒(婴儿的粪便中没有或很少), 大小不等, 染色均匀一致, 不发亮, 内部无结构。此外, 圆孢子虫卵囊用该法染色后不发亮, 呈淡红或深红, 内含大小不等的暗黑色颗粒, 分布不均匀, 有的卵囊不着色, 只见暗色颗粒状物。观察时应注意区别。

B. 10 蓝氏贾第鞭毛虫检验

B. 10.1 标本的收集

B. 10.1.1 粪便标本的收集:按常规进行。

B. 10.1.2 十二指肠抽出液:用作胆道感染的诊断, 也可提高肠道感染的检出率。

B. 10.1.3 血清:检查其中的特异性抗体, 可提高肠道感染的检出率。

B. 10.2 实验诊断

B. 10.2.1 病原学检查:是目前贾第虫病确诊的依据。贾第虫在发育过程中有滋养体和包囊 2 期。贾第虫病患者的水样稀便多为滋养体阳性, 而糊状或块状粪便可能仅含有包囊。

B. 10.2.1.1 滋养体的检查:滋养体在腹泻病人的粪便和十二指肠液中。标本先以 500g 离心 10min, 取沉淀用生理盐水涂片, 用光学显微镜检查。形态从正面观呈倒置纵切梨形, 前端钝圆, 后端尖细, 大小为 $(12\sim 15)\mu\text{m}\times (6\sim 8)\mu\text{m}$, 厚 $2\mu\text{m}\sim 4\mu\text{m}$ 。侧面观呈瓢状, 背面隆起, 腹部内陷形成吸盘。在新鲜标本, 虫体靠鞭毛摆动很活泼。由于滋养体只存在于新鲜的水样标本中, 且分解快, 故检测滋养体, 操作要迅速。

B. 10.2.1.2 包囊的检查:包囊出现在成形粪便或十二指肠液中, 可用碘液(2%)染色法、乙醚乙醛沉淀法和硫酸锌离心浮聚法检查。包囊的形成呈间歇性, 宜隔天检查, 连续 3 次。包囊呈椭圆形, 大小为 $(8\sim 12)\mu\text{m}\times (10\sim 11)\mu\text{m}$ 。囊壁与虫体之间有明显的不均匀空隙, 成熟包囊内有 4 个核。

B. 10.2.1.3 Trichrom 染色(三原染色):三原染色既可用新鲜粪便, 也可用 PVB 固定的粪便。在固定和染色理想的标本中, 背景是蓝绿色, 虫体的细胞质和染色质呈紫红色。新鲜样本观察到的包囊呈现典型的卵(椭)圆形, 一般长 $11\mu\text{m}\sim 14\mu\text{m}$, 成熟的包囊可看到有 4 个核, 未成熟的包囊有 2 个核; 而滋养体则为梨形。Trichrom 染色后看到的滋养体呈典型梨状, 有 2 个泡状核, 位于轴柱的两侧, 核内各有一个大核仁, 四周有空隙, 使并列的双核构成独特的梨形, 而鞭毛则极少在染色的标本中出现。

B. 10.2.2 免疫学检测

B. 10.2.2.1 直接免疫荧光抗体法(DFB):用荧光标记贾第虫的单克隆抗体, 检测粪便中的包囊囊壁抗原。

B. 10.2.2.2 酶免吸附法(ELISA):运用双抗体夹心法, 在载体上(如微孔板、硝酸纤维素膜等)包被贾第虫的多抗和单抗, 并用配对的单抗或多抗做酶或染料标记, 主要检测粪便中的贾第虫包囊囊壁抗原。

国外已有多种免疫学检测贾第虫包囊囊壁抗原的商品试剂盒面世。

B. 10.2.2.3 血清学检查:可使用间接血凝试验, 间接荧光抗体试验或 ELISA 等方法。用以检测人血

清中的贾第虫特异性抗体。IgM 抗体对近期感染的诊断意义较大。

B. 10. 2. 3 分子生物学技术

聚合酶链反应(PCR)作为一种贾第虫的诊断技术目前仍处于试验阶段,无商品试剂盒。引物多选择贾第虫的贾第虫素基因、hsp 基因和 SSUrRNA。PCR 作为检测诊断技术,在水源、环境、食品的监测中前景广阔。

附 录 C
(资料性附录)
感染性腹泻的鉴别诊断

C.1 霍乱

由 O₁ 血清群和 O₁₃₉ 血清群霍乱弧菌感染所致。以剧烈腹泻起病,多数无腹痛,无里急后重;呕吐多为喷射状,不伴恶心;呕吐物及腹泻物呈米泔水样,量多,少数患者有洗肉水样便。脱水严重者常引起肌肉痛性痉挛,皮肤皱瘪,体表温度低于正常。粪便悬滴镜检可发现运动极活泼的弧菌,应进一步作细菌培养,进行鉴别诊断。

C.2 伤寒与副伤寒

由伤寒沙门菌以及甲、乙、丙型副伤寒沙门菌感染所致。主要以持续性高热、玫瑰疹、相对缓脉、肝脾肿大及表情淡漠等为特征。伤寒与副伤寒甲、乙型临床表现以高热、全身毒血症状为主,可伴有腹痛,腹泻少见;副伤寒丙型可呈胃肠炎型发作,病程短,预后好,多在 3d~5d 内恢复。血肥达反应阳性有助于伤寒诊断;血、骨髓、粪便或尿等标本中培养出伤寒或副伤寒沙门菌即可确诊。

C.3 细菌性痢疾

由志贺菌属感染所致。腹泻以脓血便或黏液便较为常见,量少,常有里急后重,多伴有畏寒发热。粪便镜检可发现大量脓细胞、红细胞和巨噬细胞。粪便培养可检出志贺菌。婴幼儿中毒型菌痢或不典型菌痢应通过病原学诊断来鉴别。

C.4 阿米巴痢疾

由溶组织内阿米巴感染所致。潜伏期数周至数月,临床表现多无发热,腹痛轻,无里急后重;腹泻每日数次,量多,为暗红色果酱样血便,有腥臭味;镜检白细胞少,红细胞多,有夏科-雷登结晶,可找到溶组织内阿米巴滋养体。

C.5 非感染性腹泻

过敏性腹泻有接触过敏原史,既往有类似发作;药物性腹泻有服用致泻药物史;酶缺乏性腹泻有遗传病家族史。还有各种内外科疾病引起的症状性腹泻以及器官功能失调性腹泻等,通过详细询问病史,结合相应的检查结果进行鉴别。

中 华 人 民 共 和 国
卫 生 行 业 标 准
感 染 性 腹 泻 诊 断 标 准
WS 271—2007

*

出版发行：人民卫生出版社（中继线 010-67616688）

地 址：北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼

邮 编：100078

网 址：<http://www.pmph.com>

E - mail: pmph@pmph.com

购书热线：010-67605754 010-65264830

印 刷：北京新丰印刷厂

经 销：新华书店

开 本：880×1230 1/16 印张：2

字 数：50 千字

版 次：2008 年 1 月第 1 版 2008 年 1 月第 1 版第 1 次印刷

书 号：14117·111

定 价：14.00 元

版权所有，侵权必究，打击盗版举报电话：010-87613394

（凡属印装质量问题请与本社销售部联系退换）



WS 271—2007