

- vaccinated women; a modelling study[J]. Lanc Oncol, 2018, 19(12): 1569-1578.
- [8] ARBYN M, XU L, SIMOENS C, et al. Prophylactic vaccination against human papillomaviruses to prevent cervical cancer and its precursors (protocol) [J]. Cochrane Database Systemat Rev, 2018, 5. DOI: 10.1002/14651858.CD009069.
- [9] PALMER T, WALLACE L, POLLOCK K G, et al. Prevalence of cervical disease at age 20 after immunisation with bivalent HPV vaccine at age 12-13 in Scotland: retrospective population study[J]. BMJ, 2019, 365: 11161. DOI: 10.1136/bmj.11161.
- [10] 曾晓敏, 任泽航, 魏雪灵, 等. 中山大学本科生对 HPV 及疫苗认知的调查[J]. 现代预防医学, 2015, 42(10): 1822-1825.
- [11] 周艺, 刘玉环, 刘智华, 等. 大学生对人乳头瘤病毒感染的认知情况调查[J]. 现代预防医学, 2012, 39(17): 4453-4454, 4459.
- [12] SHAZIARASHID, SATYANARAYANAL A, BHUDEVC. Knowledge, awareness and attitude on HPV, HPV vaccine and cervical cancer among the college students in india [J]. PLoS One, 2016, 11(11): e0166713.
- [13] 庞震苗, 陈西金, 向媛薇. 广州大学城女大学生对人乳头瘤病毒疫苗的认知及接种意愿影响因素调查分析[J]. 保健医学研究与实践, 2016, 13(2): 22-24.
- [14] 朱颖蓉, 胡小玲, 盛彩华. 大学生对 HPV 疫苗的认知及态度调查[J]. 当代护士(下旬刊), 2017(11): 25-27.
- [15] ZHAO F H, TIGGELAAR S M, HU S Y, et al. A multi-centersurvey of HPV knowledge and attitudes toward HPV vaccination among women, government officials, and medical personnel in China[J]. Asian Pac J Canc Prev, 2012, 13(5): 2369-2378.
- [16] LEE P W H, KWAN T T C, TAM K F, et al. Beliefs about cervical cancer and human papillomavirus (HPV) and acceptability of HPV vaccination among Chinese women in Hong Kong [J]. Prev Med, 2007, 45(2/3): 130-134.
- [17] 陆瑾, 牟文, 周文瑜, 等. 上海市大学生、政府人员和医务人员乳头瘤病毒疫苗认知及态度调查[J]. 中国疫苗和免疫, 2016, 22(1): 70-75.

收稿日期: 2020-06-20 修回日期: 2020-08-10 本文编辑: 顾璇

· 疾病控制 ·

## 一起空肠弯曲菌食源性疾病突发事件的流行病学和病原学研究

商晓春, 周晓红, 帅慧群, 黄清虹, 赵雪琴, 徐皓月

浙江省杭州市下城区疾病预防控制中心, 310003

**【摘要】** 目的 对空肠弯曲菌所致的食源性疾病事件进行病原学研究及溯源分析, 为突发食源性疾病事件的应急处置提供依据。方法 采用现场流行病学调查方法对疫情实施调查, 可疑样本先用多重巢式 PCR 快速筛查 22 种常见胃肠道病原, 锁定目标病原后, 将病原菌分离鉴定与实时荧光定量 PCR 同步检测。对检出的空肠弯曲菌进行 PFGE 分子分型, 用 BioNumerics 软件进行同源性分析。结果 共有病例 91 例, 采集样本 49 件。从 27 件病例样本中分离出 15 株空肠弯曲菌, PFGE 分为 2 种带型, 其中 14 株带型完全一致, 另 1 株为另一带型, 2 种带型相似性为 66.7%。结合流行病学调查、实验室病原学检测和 PFGE 分析, 判定此次事件为一起空肠弯曲菌引起的食源性疾病暴发事件。结论 传统分离培养检测方法结合 FilmArray 多重 PCR 系统、实时荧光定量 PCR、PFGE 分型技术可快速、准确确定和追溯病原。

**【关键词】** 弯曲杆菌; 空肠; 疾病暴发流行; 流行病学研究; 公共卫生

**【中图分类号】** R 181.3 R 155 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-9817(2020)11-1741-04

空肠弯曲菌(*Campylobacter Jejuni*)是一种能引起人类细菌性急性腹泻的重要人畜共患病原菌, 广泛分布于多种动物体内, 特别是禽类, 属于正常携带细菌<sup>[1-2]</sup>。该菌可通过粪便排菌、屠宰加工等过程污染水源和动物源产品, 并通过食物链传递给人类, 引发食源性疾病, 由空肠弯曲菌引起的细菌性急性腹泻在我国基本上为散发病例<sup>[3-4]</sup>。2018 年 12 月发生在杭

州市下城区 1 所学校的食源性疾病事件属于罕见的暴发性疫情。经传统细菌培养方法, 结合全自动细菌鉴定、巢式多重 PCR、实时荧光定量 PCR 方法检测目标病原, PFGE 技术对分离的菌株进行分子分型溯源, 最终确认本次食源性疾病突发事件由空肠弯曲菌引起, 现将结果报道如下。

### 1 资料来源与方法

**1.1 资料来源** 在发生本次食源性疾病突发事件的学校, 采集病例粪便 27 份(学生 26 份, 教师 1 份)、食堂员工肛拭 7 份、教室各楼层直饮水样 6 份、末梢水样 2 份、食堂涂抹物 7 份(蔬菜砧板 3 份、盛菜桶 2 份、刀

**【作者简介】** 商晓春(1961- ), 女, 杭州市人, 大学本科, 主任技师, 主要从事病原微生物检验及实验室管理工作。

**【通信作者】** 周晓红, E-mail: 1219288551@qq.com

DOI: 10.16835/j.cnki.1000-9817.2020.11.038

具和水产砧板各 1 份), 共计 49 件。未采集到学校餐食留样。

## 1.2 材料

1.2.1 主要试剂 改良 EC 肉汤(mecfn)和 Preston 肉汤、麦康凯琼脂、伊红美蓝琼脂、3%过氧化氢溶液、氧化酶试纸、马尿酸盐、吡啶乙酸酯纸片等弯曲菌、沙门菌、志贺菌、霍乱弧菌、副溶血弧菌、致泻性大肠埃希菌分离鉴定培养基(广东环凯公司), mCCDA 琼脂和哥伦比亚血琼脂(英国 OXOID 公司), VITEK 2 Compact NH 和 GN 鉴定卡、FilmArray 胃肠道疾病(GI)测试条(法国生物梅里埃), 空肠弯曲菌核酸检测试剂盒(上海辉睿公司), 诺如病毒、轮状病毒、星状病毒、扎如病毒、肠道腺病毒核酸检测试剂盒(江苏硕世公司), 限制性内切酶 Xba I、Sma I (TaKaRa 大连宝生物)、Seakem Gold 琼脂糖(瑞士 Lonza)。所用试剂均经质量验证合格, 并在有效期内使用。

1.2.2 主要仪器 低温培养箱(德国 Binder); FilmArray 巢式多重 PCR 系统、细菌比浊仪、VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定系统(法国生物梅里埃); 7500 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI); ANOXOMAT MARK II 厌氧微需氧培养系统(荷兰 MART); CHEF-MAPPER 型脉冲场凝胶电泳仪、Universal HoodII 凝胶成像系统(Bio-Rad USA); BioNumerics Version 6.6 分析软件(Applied Maths USA)。

## 1.3 实验方法

1.3.1 常见肠道病原体常规检测 参照国标方法对标本进行沙门菌、志贺菌、霍乱弧菌、副溶血弧菌、致泻大肠埃希菌分离培养, 全自动生化鉴定系统对疑似菌进行生化鉴定。诺如病毒、轮状病毒、星状病毒、扎如病毒、肠道腺病毒核酸采用实时荧光 PCR 方法。

1.3.2 肠道多病原快速筛查检测 将病例和食堂员工便样制成若干混合样, 采用多病原快速分析(GI)测试条, 进行 13 种细菌(弯曲菌属、难辨梭菌毒素 A/B、类志贺邻单胞菌、沙门菌属、弧菌属、霍乱弧菌、小肠结肠炎耶尔森菌、致泻性大肠埃希菌/志贺菌 6 种)、5 种病毒(F 组腺病毒 40/41、星状病毒、诺沃克病毒 GI/GII、A 群轮状病毒、札幌病毒)、4 种原生动物(隐孢子虫、环孢子虫、溶组织内阿米巴、兰伯贾第鞭毛虫)共 22 种常见胃肠道病原快速筛查。

1.3.3 空肠弯曲菌分离培养 采用滤膜分离培养法, 取便样 0.1~0.3 g 接种 Preston 肉汤(并用于 PCR 检测), 微需氧培养罐(6% O<sub>2</sub>、7.2% CO<sub>2</sub>、7.2% H<sub>2</sub> 和 79.7% N<sub>2</sub>) 42 ℃, 48 h 增菌后, 取 0.45~0.60 μm 孔径无菌滤膜平衡至室温后, 轻贴于 mCCDA 琼脂平板表面中央, 不能产生气泡, 再将 250~300 μL 增菌液分数

次均匀滴加在滤膜上, 待菌液充分渗透后, 揭去滤膜翻转平板, 42 ℃ 微需氧培养 24~48 h。挑取 mCCDA 琼脂平板上有光泽、湿润扁平呈扩散倾向生长的可疑菌落, 分离哥伦比亚血平板, 继续 42 ℃ 微需氧培养 48 h, 挑取纯化单个疑似菌落, 进行革兰染色观察菌体形态及动力, 进行微需氧 25 ℃ 生长、有氧 42 ℃ 生长、氧化酶和过氧化氢酶、马尿酸盐水解和吡啶乙酸酯水解试验, 符合弯曲菌生物学特征的纯培养物, 再用 VITEK 2 Compact NH 鉴定卡确认。

1.3.4 空肠弯曲菌核酸检测 样本直接实时荧光定量 PCR 检测: 取样本 Preston 肉汤, 全自动核酸提取仪提取核酸。分离空肠弯曲菌菌株 PCR 鉴定: 将生化鉴定结果符合的菌株制成菌悬液, 提取核酸进行 PCR 复核。依据实时荧光定量 PCR 试剂盒说明书进行检测, 靶序列为空肠弯曲菌基因保守区域, 反应程序为 95 ℃ 预变性 5 min, 40 个扩增循环, 循环中 95 ℃ 变性 10 s, 55 ℃ 退火延伸 30 s, 采集荧光值, FAM 通道检测。

1.3.5 PFGE 分子分型方法 采用 PulseNet International 推荐的 PFGE 分子分型标准方法, 将空肠弯曲菌制成 5.0~5.5 麦氏单位菌悬液, 空肠弯曲菌使用限制性内切酶 Sma I (40 U), 沙门菌标准株 H 9812 使用限制性内切酶 Xba I, 37 ℃ 酶切 2 h; 起始电流 132 mA, 电压梯度 6 V/cm, 夹角 120°, 线性斜坡, 电泳参数为 6.76~36.38 s, 19 h; 胶块电泳后使用 GelRed 染色, 纯水脱色, 凝胶成像系统读取电泳图谱。

1.4 统计学方法 获得的 PFGE 图谱应用 BioNumerics (Version 6.6) 软件进行聚类分析, 设置 UPGMA 方法进行结果比较, 输出结果显示菌株聚类图形和图谱之间的相似性。条带位置的差异容许度选择 1.7%, 优化值选择 0.5%。若聚类结果显示相似性大于 65%~70% 可认定为同一亚群, 相似性大于 80% 可认定为同一亚型(即来源于亲缘性相近的菌株), 相似性大于 90% 可认定为同一克隆株; 否则就是不同亚群或不同亚型的菌株<sup>[5-6]</sup>。

## 2 结果

2.1 流行病学调查结果 2018 年 12 月 3 日上午接到疫情报告, 辖区某学校有多个班级多名学生出现腹泻、呕吐、发热等症状。现场流行病学调查显示, 共有病例 91 例, 分布 14 个班级, 其中 90 例学生, 1 例教师; 男性 52 例, 女性 39 例, 无食堂员工病例。主要症状表现为腹泻、腹痛、发热, 其中腹泻 85 例, 占 93.41%; 腹痛 55 例, 占 60.44%; 发热 56 例, 占 61.54%; 呕吐 24 例, 占 26.37%; 头痛头晕 24 例, 占

26.37%;腹胀腹鸣 12 例,占 13.19%。经过流行病学调查发现,发病高峰集中在 12 月 1 日,首例出现在 11 月 28 日 12:00 左右,12 月 4 日起无新发病例。发病就诊学生的检验结果显示,33 份血常规报告中,白细胞和中性粒细胞均增高 13 例,占 39.39%;超敏 C 反应蛋白增高 22 例,占 66.67%。8 份粪便常规报告显示,粪便隐血阳性 5 例,占 62.50%。

**2.2 卫生学调查** 该校为非寄宿制,学校仅提供中餐,所有食品原料由定点招标单位供货,学校食堂统一烧制后,菜、汤装桶由食堂员工送达各班级,由老师统一分发;米饭由学生在食堂窗口自取,餐具学生自带;教师在用餐食堂烹饪间取用。食堂设有粗加工间和烹饪间,无熟食间,所用刀具和砧板均有动植物性标识,放置于同一板架。查看食谱发现,11 月 28 日中餐食堂提供过白切鸡。询问厨师制作过程是,冷鲜鸡去头后送烹饪间烧制完成,再在粗加工间分切装托盘分发至各班级,存在制作流程不规范、生熟操作区域交叉污染的风险。

### 2.3 病原体检测结果

**2.3.1 肠道多种病原体快速筛查结果** 混合便样经 22 种肠道病原快速筛查显示,弯曲菌属核酸阳性,其余 21 种肠道病原核酸均阴性,初步锁定本次事件疑似病原为弯曲菌属。

**2.3.2 空肠弯曲菌检测结果** 根据快速筛查结果,重点进行空肠弯曲菌分离培养,有 15 份发病学生便样在 mCCDA 呈现疑似弯曲菌菌落,经革兰染色为阴性,镜下呈 S 形、海鸥状、逗点状形态。氧化酶、过氧化氢酶、马尿酸盐和吡啶乙酸酯水解试验均阳性,微需氧 25 ℃ 和有氧 42 ℃ 培养均不生长。经苛氧菌(NH)鉴定,15 株均为空肠弯曲菌。

**2.3.3 实时荧光定量 PCR 检测结果** 49 件样本诺如病毒、札如病毒、轮状病毒、星状病毒、肠道腺病毒核酸检测全部阴性。便样 Preston 肉汤直接荧光定量 PCR 检测,15 份样本空肠弯曲菌核酸阳性。15 株分离的空肠弯曲菌株经荧光定量 PCR 复核全部阳性。分离株与样本直接检测核酸结果一致,病例信息吻合。

**2.3.4 空肠弯曲菌 PFGE 分型结果** 15 株空肠弯曲菌 DNA,经限制性内切酶 Sma I 酶切及 PFGE 后,DNA 片段得到较好分离。每株产生 6~9 个清晰电泳条带,见图 1。聚类分析结果显示,15 株空肠弯曲菌分为 2 种带型,其中 14 株带型完全一致,相似性为 100%,标记为 PA1 型,系同一克隆株;另 1 株带型标记为 PA2 型,为不同的克隆株。PA1 和 PA2 之间带型相似性为 66.7%,认为是同一亚群。见图 2。

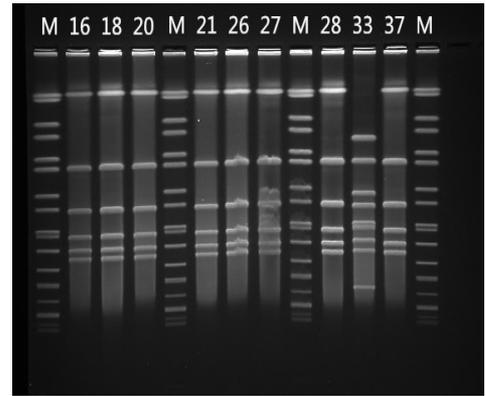


图 1 9 株空肠弯曲菌酶分离株酶切后 PFGE 图谱

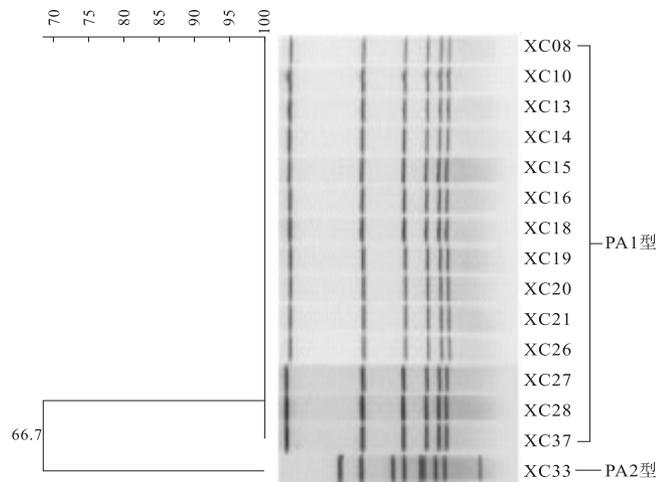


图 2 15 株空肠弯曲菌分离株 PFGE 聚类分析图谱

## 3 讨论

空肠弯曲菌感染潜伏期一般为 3~5 d<sup>[7]</sup>,禽类是感染的主要来源,进食未熟透或生禽肉以及被空肠弯曲菌污染的食物,摄入 500 个活菌以上便易引起发热、呕吐、腹泻、腹痛等胃肠炎感染症状<sup>[8-10]</sup>。20 世纪末以来,空肠弯曲菌逐渐上升为引起食源性感染的主要病因之一,已引起关注,目前国内主要以家禽弯曲菌污染状况分析和调查为主,临床则以儿童空肠弯曲菌散发感染病例分析研究为主<sup>[11-12]</sup>。本事件为空肠弯曲菌感染引发的群体性食源性疾病暴发事件,对于做好由空肠弯曲菌感染引发的群体性食源性疾病暴发事件的流行病学和病原学研究具有较强的指导性。

由于空肠弯曲菌暴发少,病死率低,培养条件苛刻且培养时间较长,对检测人员的经验水平要求较高。同时,目前空肠弯曲菌检测标准仍然以传统方法分离培养技术为主,从而造成检出率较低,不能准确反映该菌在我国食品中的污染状况以及腹泻患者中感染现状,也不适合于食源性疾病事件早期快速检测<sup>[13-14]</sup>。目前业内公认 PCR 检测空肠弯曲菌的敏感

度明显高于分离培养法,特别是多重 PCR 技术简便快速特异性更强,更具有快速鉴别诊断作用,但是对病原菌引起的食源性疾病事件的溯源分析,分离到病原菌仍是最基本的途径<sup>[3,15-16]</sup>。因此,重视分离培养技术对鉴定的地位,努力优化检测方法和流程,探索科学的空肠弯曲菌快速准确检测方法尤为重要。在本次研究中,笔者对空肠弯曲菌检测流程和培养方法进行了优化:首先根据流行病学调查情况,抽取部分可疑样本制成混样,采用巢式多重 PCR 分析技术,快速筛查 22 种常见胃肠道感染病原,60 min 内锁定目标病原,再通过实时荧光定量 PCR 和传统分离鉴定方法同步检测;在分离培养环节,利用细菌动力学特点,采用膜过滤培养技术,减少杂菌的干扰,提高检出率。通过多方法联合应用大大缩短了检测时限。

PFGE 分型技术能反映细菌全基因组遗传学特征,具有重复性好、分辨率强和可溯源等优点,被誉为细菌分子分型的“金标准”<sup>[17]</sup>。目前已广泛用于多种病原微生物的暴发溯源分析及分子流行病学研究<sup>[18-19]</sup>。本研究对 15 株空肠弯曲菌 PFGE 分型结果显示,14 株带型完全一致,提示本次菌株在分子水平具有紧密相关和高度同源性,为同一克隆株,来源于同一遗传背景,从分子水平证实了本次事件是由空肠弯曲菌污染所致。同时现场流行病学、病例临床症状、潜伏期等流行特征均符合空肠弯曲菌感染疫情特点。结合病例发病前食用饮食调查,食堂烧制的白切鸡在制作流程中存在交叉污染风险,从而合理推断白切鸡或其原材料冷鲜鸡在加工过程中受到空肠弯曲菌污染。

在本次事件开展调查时,食堂餐食留样已被校方处理,失去了追查污染食物的最佳机会,无法从食品中追溯病原,污染源病原学证据不够充分。卫生监管部门虽然明确要求学校必须每天对学生的餐食留样,可一旦发生校园食源性疫情,校方常常是在调查前处理了留样,导致疾控部门介入调查时,对于病原的追溯非常不利,应引起卫生管理部门高度重视。本研究未能抽取病例急性期和恢复期血样与分离的空肠弯曲菌做凝集试验,也是不足之处。笔者认为,随着新的检测技术的发展,优化检验流程,联合运用多病原 PCR 快速筛查系统、PFGE 图谱、飞行质谱、二代测序等分析手段,可为食源性暴发疫情快速判定和溯源提供强有力支撑。

#### 4 参考文献

[1] KAAKOUSHA N O, CASTANORODRILGUEZA N, MITCHELLA H

- M, et al. Global epidemiology of *Campylobacter* infection[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2015, 28(3): 687-720.
- [2] COKER A O, ISOKPEHI R D, THOMAS B N, et al. Human campylobacteriosis in developing countries [J]. *Emerg Infect Dis*, 2002, 8(3): 237-244.
- [3] 韦小瑜,李世军,游旅,等.贵州省 8 例空肠弯曲菌病例的病原学诊断与分析[J]. *中国人兽共患病学报*, 2014, 30(10): 1079-1081.
- [4] 李博,陈辉,鞠长燕,等.深圳地区不同领域空肠弯曲菌毒力基因发布及分子分型研究[J]. *现代检验医学杂志*, 2016, 31(5): 107-112.
- [5] TENOVER F C, ARBEIT R D, GOERING R V, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis criteria for bacterial strain typing[J]. *J Clin Microbiol*, 1995, 33(9): 2233-2239.
- [6] TALON D, CAILLEAUX V, THOUVEREZ M, et al. Discriminatory power and usefulness of pulsed-field gel electrophoresis in epidemiological studies of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *J Hosp Infect*, 1996, 32(2): 135-145.
- [7] 林政,董柏青.空肠弯曲菌肠炎流行病学研究近况[J]. *实用预防医学*, 2008, 15(4): 1309-1311.
- [8] 王君玮,王娟,曲志娜,等.空肠弯曲菌对动物源性食品安全的影响及对策[J]. *中国人兽共患病学报*, 2013, 29(11): 1119-1123.
- [9] 王振国,秦学,郑希铭,等.鸡肉中弯曲杆菌属的分离与鉴定[J]. *中国人兽共患病杂志*, 2001, 17(1): 63-64.
- [10] ROBINSON D A. Infective dose of campylobacter in milk [J]. *Br Med J*, 1981, 282(6276): 1584.
- [11] 李佳康,黄雪琳,曾杭,等.成都地区肉鸭屠宰链弯曲菌毒力基因分布及分子分型研究[J]. *中国人兽共患病学报*, 2019, 35(9): 815-820.
- [12] 谢永强,钟华敏,魏艳,等.广州地区儿童空肠弯曲菌感染的检测与分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2016, 37(17): 1119-1123.
- [13] 中华人民共和国卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品微生物检验 空肠弯曲菌检验 GB 4789.9—2014[S]. 北京: 人民卫生出版社, 2014.
- [14] 中华人民共和国卫生部. 感染性腹泻诊断标准 WS 271—2007 [S]. 北京: 人民卫生出版社, 2007.
- [15] 陈荀,刘书亮,吴聪明,等.鸡肉生产链中空肠弯曲杆菌的污染分析及 PFGE 分型研究[J]. *中国人兽共患病学报*, 2012, 28(10): 1012-1016.
- [16] ALLOS B M. *Campylobacter jejuni* infections: update on emerging issue and trends [J]. *Clin Infect Dis*, 2001, 32(8): 1201-1206.
- [17] SWAMINATHAN B, BARRETT T J, HUNTER S B, et al. Pulse net: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States [J]. *Emerg Infect Dis*, 2001, 7(3): 382-389.
- [18] 任淑敏,张良军,刘凡,等.一起由副溶血性弧菌引起的食源性疾病的病原学研究及溯源分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(4): 741-745.
- [19] 许金凤,徐虹,茅凌翔,等.一起食源性食物中毒事件病原的检测与溯源[J]. *江苏预防医学*, 2016, 27(5): 543-545.

收稿日期:2020-05-20 修回日期:2020-07-10 本文编辑:王苗苗