

中华人民共和国卫生行业标准

WS 271—2026
代替 WS 271—2007

感染性腹泻诊断标准

Diagnostic standard for infectious diarrhea

2026-07-01 发布

2027-06-01 实施

国家卫生健康委员会
国家疾病预防控制局

发布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 诊断依据	1
4.1 流行病学史	1
4.2 临床表现	1
4.3 实验室检查	1
5 诊断原则	2
6 诊断标准	2
6.1 临床诊断病例	2
6.2 确诊病例	2
7 鉴别诊断	3
附录 A（资料性） 引起感染性腹泻的主要病原体及常见感染性腹泻的主要特征	4
附录 B（规范性） 实验室诊断方法	8
附录 C（资料性） 感染性腹泻的鉴别诊断	28

前 言

本标准强制性标准。

本标准代替 WS 271—2007《感染性腹泻诊断标准》，与 WS 271—2007 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- 更改了“腹泻”和“感染性腹泻”的定义（见 3.1 和 3.2，2007 年版的 2.1 和 2.2）；
- 更改了诊断依据中的流行病学史、临床表现和实验室检查的描述（见 4.1～4.3，2007 年版的 3.1～3.3）；
- 更改了诊断原则的描述（见第 5 章，2007 年版的第 4 章）；
- 更改了临床诊断病例的诊断标准，确诊病例按细菌性腹泻、病毒性腹泻、寄生虫性腹泻和其他病原体引起的腹泻分别列出了诊断标准（见 6.1 和 6.2，2007 年版的 5.1 和 5.2）。

本标准由中国疾病预防控制中心负责组织技术审查、技术咨询、协调性和格式审查，由国家卫生健康委员会会同国家疾病预防控制中心共同管理。

本标准起草单位：江苏省疾病预防控制中心、中国疾病预防控制中心传染病预防控制所、中国疾病预防控制中心、江苏省人民医院、中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所、复旦大学附属儿科医院、北京市疾病预防控制中心、广东省疾病预防控制中心、江苏省血吸虫病防治研究所。

本标准主要起草人：鲍倡俊、熊衍文、常昭瑞、金柯、靳淼、曾玫、张代涛、李柏生、戴洋、张雪峰。

本标准及其所代替标准的历次版本发布情况为：

- 2007 年首次发布为 WS 271—2007；
- 本次为第一次修订。

感染性腹泻诊断标准

1 范围

本标准规定了除霍乱、细菌性和阿米巴性痢疾、伤寒、副伤寒以外的感染性腹泻的诊断依据、诊断原则、诊断标准和鉴别诊断。

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 规范性引用文件

本标准没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

腹泻 diarrhea

24h 排便 3 次或以上（或者排泄次数比个体正常情况下增多），且粪便性状异常，如稀便、水样便、黏液便、脓血便或血便等。

3.2

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、以腹泻和（或）呕吐为主要临床特征的一组胃肠道传染病，含急性胃肠炎（acute gastroenteritis）。

4 诊断依据

4.1 流行病学史

发病者常有不洁饮食（水）史和/或与腹泻呕吐病例、病原携带者、感染动物接触史，或有流行地区居住或旅行史；应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、炎症性肠病等非感染性腹泻病。集体（聚集或暴发）发病的食（水）源性感染常有共进可疑食物（水）史。主要病原体引起的感染性腹泻的流行病学特征见附录A。

4.2 临床表现

以腹泻和（或）呕吐为主，可伴有腹痛、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。主要病原体引起的感染性腹泻的临床特征见附录A。

4.3 实验室检查

4.3.1 粪便常规检查

粪便有性状改变，常为稀便、水样便、黏液便、脓血便或血便等。

稀便、水样便，镜检可有少量或无红细胞、白细胞，多见于肠产毒性大肠埃希菌、轮状病毒、诺如病毒、肠腺病毒、气单胞菌、隐孢子虫、蓝氏贾第鞭毛虫等所致的腹泻。

黏液便、脓血便或血便，镜检可有多量红细胞、白细胞，多见于非伤寒沙门菌、肠侵袭性大肠埃希菌、肠出血性大肠埃希菌、弯曲菌、小肠结肠炎耶尔森菌等所致的腹泻。

4.3.2 形态学检查

4.3.2.1 粪便电镜镜检见特征性病毒颗粒。

4.3.2.2 显微镜镜检粪便或小肠液涂片查见寄生虫滋养体、包囊或卵囊等。

4.3.3 免疫学检测

4.3.3.1 粪便、呕吐物、肛拭子标本胶体金免疫层析试验检测阳性。

4.3.3.2 粪便、呕吐物、肛拭子标本病原体特异性抗原酶联免疫吸附试验（ELISA）或间接荧光抗体试验（IFA）等检测阳性。

4.3.3.3 恢复期血清抗体滴度较急性期血清抗体滴度高4倍或以上。

4.3.4 核酸检测

粪便、呕吐物、肛拭子标本病原体特异性核酸检测阳性。开展病原核酸检测应按相关规定执行。

4.3.5 分离培养

粪便、呕吐物、肛拭子病原体分离培养阳性。实验室诊断方法按附录B。

5 诊断原则

根据流行病学史、临床表现及实验室检查结果予以诊断。

6 诊断标准

6.1 临床诊断病例

6.1.1 同时符合本标准第4.2条和第4.3.1条，结合本标准第4.1条作出判断。

6.1.2 同时符合本标准第4.2条和第4.3.3.1条。

6.1.3 符合本标准第4.2条，且同时符合本标准第4.3.3.2条、第4.3.4条中任一项（病毒性腹泻除外）。

6.1.4 在聚集性或暴发疫情中，确诊病例的密切接触者或共同暴露者符合本标准第4.2条。

6.2 确诊病例

6.2.1 细菌性腹泻

临床诊断病例符合本标准第4.3.5条。

6.2.2 病毒性腹泻

临床诊断病例同时符合本标准第4.3.2.1、4.3.3.2、4.3.3.3、4.3.4、4.3.5条中任一项。

6.2.3 寄生虫性腹泻

临床诊断病例符合本标准第4.3.2.2条。

6.2.4 其他病原体引起的腹泻

临床诊断病例符合从粪便、呕吐物等标本中检出除细菌、病毒、寄生虫外其他病原体或特异性抗原、特异性核酸片段检测阳性等。

7 鉴别诊断

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

附 录 A

(资料性)

引起感染性腹泻的主要病原体及常见感染性腹泻的主要特征

A.1 引起感染性腹泻的主要病原体种类

引起感染性腹泻的主要病原体种类见表A.1。

表 A.1 引起感染性腹泻的主要病原体种类

种类	主要病原体
细菌	非伤寒沙门菌
	致泻性大肠埃希菌：肠致病性大肠埃希菌、肠产毒性大肠埃希菌、肠侵袭性大肠埃希菌、肠出血性大肠埃希菌/产志贺毒素大肠埃希菌、肠集聚性大肠埃希菌等
	致泻性弧菌：副溶血弧菌、不产霍乱肠毒素的霍乱弧菌、河弧菌、弗尼斯弧菌、拟态弧菌、霍利斯弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌等
	弯曲菌：空肠弯曲菌、结肠弯曲菌等
	耶尔森菌：小肠结肠炎耶尔森菌等
	其他细菌：单胞菌、厌氧芽孢杆菌等
病毒	轮状病毒、诺如病毒、札如病毒、星状病毒、肠腺病毒等
寄生虫	隐孢子虫、蓝氏贾第鞭毛虫等
其他	真菌等

A.2 常见感染性腹泻的主要特征

A.2.1 非伤寒沙门菌感染

本标准中非伤寒沙门菌感染指除伤寒及甲、乙、丙型副伤寒以外的其他沙门菌引起的以腹泻为主的肠道内感染。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0.3 mg/L~0.5 mg/L余氯的氯化消毒饮用水及酚、阳光等敏感。非伤寒沙门菌感染为重要人兽共患病之一，传染源为病例、带菌者、患病及带菌动物。以食源性和医源性传播为主，也可通过水源及接触传播。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。潜伏期多为6h~24h，急性起病，伴恶心、呕吐、腹痛、腹泻、发热或不发热。婴幼儿较易发生脱水和电解质紊乱。免疫力低下或免疫抑制人群（如婴幼儿、老人、艾滋病患者、肿瘤患者等）易发生侵袭性沙门菌感染(如菌血症、败血症等)。粪便多为黄色或绿色稀水便，亦可带有黏液和鲜血，部分病例粪便镜检可见较多的白细胞及红细胞，并可见巨噬细胞。

A.2.2 致泻性大肠埃希菌感染

大肠埃希菌是革兰阴性杆菌，无芽孢，多有鞭毛。主要抗原为菌体（O）和鞭毛（H）抗原。引起感染性腹泻的主要有5个致病型：

- 肠致病性大肠埃希菌（EPEC）；
- 肠产毒性大肠埃希菌（ETEC）；
- 肠侵袭性大肠埃希菌（EIEC）；
- 肠出血性大肠埃希菌/产志贺毒素大肠埃希菌（EHEC/STEC）；
- 肠集聚性大肠埃希菌（EAEC）。

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。

典型的肠致病性大肠埃希菌（EPEC）传染源主要是病例及带菌者，而非典型EPEC除人外，动物为重要宿主。EPEC以粪-口途径为主要传播方式，以婴幼儿多见；5月、6月为发病高峰。轻症者不发热，大便每日3次~10余次，呈黄色蛋花样便，量较多；重症病例可有发热、呕吐、腹痛、腹胀，呈黏液便，呕吐、腹泻严重者可有失水、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细胞、白细胞，偶可满视野，并有大量脂肪颗粒。

肠产毒性大肠埃希菌（ETEC）病例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，水样便，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。镜检可有少量或无红细胞、白细胞。

肠侵袭性大肠埃希菌（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，表现为发热、腹痛、腹泻、里急后重、脓血便。粪便镜检可有红细胞、白细胞。

肠出血性大肠埃希菌/产志贺毒素大肠埃希菌（EHEC/STEC）中，O157:H7是重要的血清型。牛羊等反刍动物为EHEC/STEC贮存宿主和主要传染源，病例和带菌者也是传染源之一；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。大便镜检几无炎症渗出性细胞。多数病例表现为自限性疾病；少数病例可出现急性溶血性尿毒综合征（HUS）以及血小板减少性紫癜（TPP）。HUS和TPP通常出现在腹泻发生后5d~10d，病死率一般在10%左右，应早期识别和处理。血性便病例镜检可见大量红细胞。

肠集聚性大肠埃希菌（EAEC）主要传染源是人，主要与小儿顽固性腹泻有关，症状可持续两周或以上，也是HIV感染者腹泻的常见病原菌，其典型症状包括水样便、黏液样便、分泌性腹泻，通常无呕吐或很少出现呕吐，不伴有发热或仅有低热。部分病例粪便镜检可见红细胞。

A.2.3 致泻性弧菌感染

致泻性弧菌革兰染色阴性，多呈短杆状或弯曲样，无芽孢，有鞭毛。需氧或兼性厌氧，多有嗜盐性，耐碱畏酸，对热敏感。氧化酶阳性，黏丝试验阳性（副溶血弧菌除外），基因组为双染色体。广泛分布于温带和热带海洋、海口和近海岸水体中，水温升至18℃以上可大量繁殖。引起人类弧菌性胃肠炎，主要通过污染的食物、水等传播，可常年发病，夏秋季为发病高峰，沿海地区发病较高。各年龄均易感，儿童和青壮年居多，病例大多有生食海鲜、接触海水或进食被污染食物的饮食史。临床潜伏期长短不一，短至几小时或长至数天，病例有恶心、呕吐、腹痛及腹泻等临床症状，可有或无发热，重症可脱水，循环衰竭，少数有中毒性休克。粪便可呈水样便、血便或脓血便，镜检可见白细胞和脓细胞，常伴有红细胞，亦可见巨噬细胞。常见的引起人类弧菌性胃肠炎的致泻性弧菌包括副溶血弧菌、不产霍乱肠毒素的霍乱弧菌、河弧菌、弗尼斯弧菌、创伤弧菌、拟态弧菌、霍利斯弧菌、溶藻弧菌等，其中副溶血弧菌肠炎、不产霍乱肠毒素的霍乱弧菌、河弧菌和溶藻弧菌导致的胃肠炎较为常见。

A.2.4 弯曲菌感染

弯曲菌为微需氧菌，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和结肠弯曲菌。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。弯曲菌感染引起的疾病称为弯曲菌病，为人兽共患病，主要传染源是家禽、家畜和鸟类，急性期病例和带菌者可作为传染源。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，有冬春季的发病高峰。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. 2.5 小肠结肠炎耶尔森菌感染

小肠结肠炎耶尔森菌感染造成的疾病称为“耶尔森菌病”，是一种食源性疾病，也是一种人兽共患病。小肠结肠炎耶尔森菌为革兰阴性、无芽孢短小杆菌，在0℃~45℃都可生长，最佳生长温度为25℃~28℃，具有嗜冷性，在冰箱等低温环境下能够长期存活。对湿热和化学消毒剂敏感。耶尔森菌病主要传染源为被小肠结肠炎耶尔森菌污染的食物和带菌动物，主要通过粪-口途径传播。部分脓毒症病例是由于输入了耶尔森菌无症状带菌者的血液而受到血源性感染。人群普遍易感，报告的病例以婴幼儿居多。全年均可发病，以冬春季发病较多。该病潜伏期1 d~10 d，主要表现为急性胃肠炎，部分伴有发热、腹痛，部分病例表现为右下腹痛的末端回肠炎，应与阑尾炎鉴别。粪便呈稀便、水样便或黏液便，偶尔可见带血，镜检可见白细胞、红细胞。部分病例在发生腹泻开始后的几天到几个月，可出现反应性关节炎、结节性红斑、突眼性甲状腺肿、耶尔森菌肝炎、心内膜炎、肾炎等多种自身免疫性肠外并发症，并持续数月。严重感染可发生脓毒症，病死率在40%以上。病例临床表现不尽相同：急性胃肠炎多见于婴幼儿，末端回肠炎多见于青少年；人类白细胞抗原B27（HLA-B27）等位基因携带者、免疫抑制病例感染后更易发生自身免疫性肠外并发症；铁过载的病例感染后更易发生全身性感染。

A. 2.6 轮状病毒感染

人轮状病毒属于呼肠孤病毒科，基因组为11个分节段的双链RNA，病毒直径约为70 nm~75 nm，呈球形，具有外层衣壳、中间层衣壳和内层衣壳的3层结构。由于外层衣壳表面有60个长度为12 nm的穗状物突起，电镜下完整病毒颗粒如车轮状。根据构成中间层衣壳的组特异性抗原（VP6），目前将轮状病毒分为9个组（A~D、F~J）。A、B、C、H组可以感染人类，其中A组轮状病毒的感染最常见，占所有轮状病毒感染的90%。在同一组内，根据两个外壳蛋白VP7和VP4的不同，将轮状病毒分为不同的G和P基因型。目前A组轮状病毒全球主要流行株为G9P[8]、G8P[8]、G3P[8]、G1P[8]、G2P[4]、G4P[8]等，我国轮状病毒的流行株曾以G9P[8]为主，但近几年G8P[8]呈现快速增加，并在多地成为优势流行株。轮状病毒在外环境中较稳定，室温下可存活数月，耐酸、耐碱，55℃作用30min可使其灭活。本病传染源为病例和隐性感染者，传染期为症状开始前，以及症状消失后3d内；主要经粪-口途径传播，密切接触也可传播，存在经呼吸道气溶胶传播的可能；A组轮状病毒主要感染5岁以下儿童尤以2岁以下儿童为甚，是儿童重症脱水性腹泻的最主要病原，全年散发，秋冬季为高发季节；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，一般症状持续4 d~8 d，严重者常伴有脱水及代谢性中毒，可有肠道外表现，如呼吸道感染、惊厥、心肌炎、脑炎等；大便为水样便或黄色稀便，无黏液、无脓血。B组轮状病毒主要感染成人，我国在20世纪80年代曾有一次大规模暴发，目前鲜有病例；潜伏期2 d~3 d，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。C组轮状病毒主要感染儿童，以散发病例为主，感染率低。H组轮状病毒主要感染成人，在我国曾引起暴发，目前未有病例报道。

A. 2.7 诺如病毒感染

诺如病毒属于杯状病毒科，诺如病毒属，为单股正链RNA病毒，无包膜，直径27 nm~40 nm，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。诺如病毒传染源为诺如病毒胃肠炎患者及无症状感染者，患者在潜伏期即可排出诺如病毒，排毒高峰在发病后 2 d~5 d，持续约2周~3周。传播途径为粪-口途径，方式多样，包括接触感染者或感染者的粪便和呕吐物、间接接触被粪便或呕吐物污染的物品和环境、摄入被污染的食物或水以及呕吐物产生的气溶胶等。诺如病毒全人群均易感。全年散发，暴发流行季节一般在冬春季。潜伏期12 h~48 h，症状主要以腹泻和/或呕吐为主，可伴有腹痛、恶心、发热、头痛、肌痛、乏力，及食欲减退等，症状一般在12 h~72 h自愈。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. 2.8 肠腺病毒感染

腺病毒为无包膜的双股DNA病毒，至少分为67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70 nm~90 nm，病毒体呈类似通信卫星样结构。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。传染源为病例和隐性感染者，可经接触、粪-口途径和呼吸道传播，婴幼儿多发，无明显季节性，以散发和地方性流行为主。潜伏期3 d~10 d。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. 2.9 隐孢子虫感染

隐孢子虫是一种专性细胞内生长的机会致病寄生原虫，隶属于孢子虫纲，球虫目，其生活史包括卵囊、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，完成整个生活史约13 d~15 d；目前已发现的48种隐孢子虫中，感染人的主要是微小隐孢子虫和人隐孢子虫；感染隐孢子虫的人和动物以及无症状带虫者为传播本病的主要传染源；感染阶段为卵囊，人经口食入隐孢子虫卵囊获得感染，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；传播方式以粪-口为主；全年均可发病，但温暖、潮湿夏秋季节多见；本病潜伏期为2 d~28 d，多数为7 d~10 d；急性期临床症状的严重程度与病程取决于宿主的免疫状态和营养状况。免疫功能正常患者的症状较轻，主要为急性自限性腹泻，一般无脓血，每日排便2次~20余次；病程多持续7 d~14 d，最短1 d~2 d；免疫缺陷患者，腹泻程度严重，常表现为霍乱样水泻。严重感染的幼儿可出现喷射性水样便，量多，常伴有痉挛性腹痛、腹胀、恶心、呕吐、食欲减退或厌食、口渴和发热。慢性期患者病程多为20 d~60 d，长者数年。免疫功能异常的感染者症状明显且病情重，持续性霍乱样水泻最为常见，每日腹泻数次至数十次，每日水泻便量常见为3 L~6 L，最多可达17 L，导致水、电解质紊乱和酸中毒。免疫功能缺损者尤其是HIV/AIDS患者，隐孢子虫感染后可导致广泛播散，并发胆道、胰管或呼吸道等肠外器官隐孢子虫病，表现为胆囊炎、胆管炎、胰腺炎和肺炎；当症状消失后数周内仍有卵囊随粪便排出。儿童营养不良以及某些病毒性感染，如麻疹、水痘和巨细胞病毒感染，也会因暂时的免疫功能异常而并发隐孢子虫病，引起严重慢性腹泻。隐孢子虫感染并发症包括水电解质紊乱，其他病原体混合感染，部分有腹部痉挛性疼痛、恶心、呕吐、厌食、发热和全身不适等。

A. 2.10 蓝氏贾第鞭毛虫感染

蓝氏贾第鞭毛虫（简称贾第虫）为单细胞原虫，归属双滴虫目，六鞭毛科，贾第鞭毛虫属。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，在水中或凉爽的环境中可存活2个月之久；传染源为排出包囊的人和动物，主要通过粪-口途径传播，包括水源性传播、食物传播、人与人密切接触传播和性接触传播等方式；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，最长45d；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等；儿童严重感染且未经及时治疗，腹泻病程较长，常出现消瘦、贫血、生长发育迟缓、肝脾大和营养吸收障碍等；艾滋病病例及其他免疫功能低下的病例合并贾第虫感染，临床表现常较严重，对药物治疗反应不佳，病例难以康复，病死率高，会发生多种并发症且较易向其他脏器扩展；偶尔可异位寄生于胆道发生胆囊炎、胆管炎或累及肝脏肿大、阑尾炎等。

附 录 B

（规范性）

实验室诊断方法

B.1 沙门菌检验

B.1.1 标本收集

采集腹泻病例急性期、宜在抗生素应用以前的新鲜粪便2 g~5 g或2 mL~5 mL，置于干净广口容器内，粪便挑取有脓血、黏液部分，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4℃冷藏条件下48 h内送检，超过48h未送检的粪便，宜在-80℃30%甘油肉汤冻存；或将粪便标本直接接种增菌培养基，室温条件下运送。如不易获得粪便，或排便困难的病例及幼儿，可采用直肠拭子法采便：将棉拭子前端用30%无菌甘油或等渗盐水（0.9%氯化钠）浸润（棉拭子多余的液体贴管壁挤出），然后插入肛门4 cm~5 cm（幼儿约2 cm~3 cm）处，轻轻在直肠内旋转，于紧靠肛环边的隐窝处采集直肠表面黏液后取出，拭子放入可旋盖密封的离心管或含Cary-Blair培养基的离心管中，旋紧盖子以防水分丢失和漏洒。肛拭子运送条件同新鲜粪便。

B.1.2 分离培养

B.1.2.1 直接分离培养

腹泻粪便中沙门菌直接分离培养阳性率低于增菌培养，常规不推荐粪便直接分离培养沙门菌。

取新鲜粪便、呕吐物标本直接接种于中等强度选择性培养基[沙门菌显色培养基、木糖赖氨酸去氧胆酸钠琼脂（XLD）、亚硫酸铋琼脂（BS）、Hektoen肠道菌（HE）琼脂等]和弱选择性培养基（麦康凯琼脂（MAC）、伊红美蓝琼脂（EMB））平板各一块，35℃~37℃培养18 h~24 h，从平板上挑取可疑菌落（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
沙门菌显色培养基	根据培养基说明书鉴定，多数沙门菌为紫色或淡紫色菌落，但亚利桑那沙门菌为蓝色菌落；菌落圆形，边缘整齐，表面光滑湿润
木糖赖氨酸去氧胆酸钠琼脂（XLD）	多数菌株产硫化氢，菌落中心黑色或几乎全黑色，菌落周围透明；不产硫化氢菌株为无色透明菌落；菌落均为圆形，边缘整齐，表面光滑湿润
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；菌落圆形，边缘整齐，表面光滑湿润
Hektoen 肠道菌琼脂（HE）	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；菌落圆形，边缘整齐，表面光滑湿润
麦康凯琼脂（MAC）	无色半透明；菌落圆形，边缘整齐，表面光滑湿润
伊红美蓝琼脂（EMB）	无色半透明；菌落圆形，边缘整齐，表面光滑湿润

B.1.2.2 增菌培养

取新鲜粪便、呕吐物0.5 g~1 g或1mL接种于10 mL亚硒酸盐煌绿增菌液（SBG）或四硫酸钠煌绿增菌液（TTB）或亚硒酸盐半胱氨酸增菌液（SC）中；35℃~37℃增菌6 h~8 h，挑取1~2接种环增菌

液分别转种至强选择性和弱选择性培养基平板各一块，35℃～37℃培养18 h～24 h，从平板上挑取可疑菌落（见表B.1）进行鉴定。

将肛拭子直接置于10mL亚硒酸盐煌绿增菌液（SBG）或亚硒酸盐半胱氨酸增菌液（SC）中；35℃～37℃增菌6 h～8 h，挑取1～2接种环增菌液分别转种至强选择性和弱选择性培养基平板各一块，35℃～37℃培养18 h～24 h，从平板上挑取可疑菌落（见表B.1）进行鉴定。

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

挑取可疑菌落接种于三糖铁（TSI）或双糖铁（KIA）和动力吡啶尿素（MIU）培养基上，并做氧化酶、硝酸盐还原、氰化钾（KCN）抑菌、赖氨酸脱羧试验；或接种于细菌生化鉴定板（条）；或利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的菌株，随后利用沙门菌属诊断血清做玻片凝集试验。

表 B.2 沙门菌在 TSI 或 KIA 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，产酸（黄色）；- 表示阴性，不产酸（红色），+ / - 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.1.3.3 血清凝集试验

O抗原试验：用A～F或A～S多价O血清做玻片凝集试验，同时用生理盐水做对照。对A～F多价O血清凝集者，依次用04；07；08；09；02和011等因子血清做凝集试验。生化符合沙门氏菌属定义，但A～F或A～S“O”多价血清不凝集，送具备菌株分型和鉴定资质的实验室进一步鉴定。

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单因子血清检查以确定第1相和第2相的H抗原，必要时做反相诱导。

Vi抗原试验：用Vi因子血清检测。

B.1.3.4 分子鉴定

利用经过评价的特异性及敏感性均较高的引物对疑似沙门菌菌落进行1个或多个沙门菌特异靶基因或核酸片段的扩增，从而快速鉴定沙门菌属或其血清型。

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，判定血清型并报告结果，注意报告血清型名称的同时报送抗原式，无法确定具体血清型时则报告抗原式，对于邦戈尔沙门菌及肠道沙门菌亚种II、IIIa、IIIb、IV、VI则报告亚种名称加抗原式，对于已经进行血清凝集试验但暂时无法获得准确血清型的菌株则报告未分型。结果报告格式示例：

- a) 检出沙门菌，鼠伤寒血清型（4,5,12:i:1,2）；
- b) 检出沙门菌，鼠伤寒变种（4,5,12:i:-）；
- c) 检出沙门菌，4,5,12:-:-；
- d) 检出沙门菌，4,5,12:-:1,2；
- e) 检出沙门菌，肠道亚种II（58:1,z13,z28:z6）；
- f) 检出沙门菌，肠道亚种IIIa（13,23,:g,z51:-）；
- g) 检出沙门菌，未分型。

B.1.5 核酸检测

核酸检测包括DNA检测和RNA检测，RNA检测更能反映活菌状态。一般不宜直接对粪便原始标本进行沙门菌核酸检测（全基因组或Meta测序除外），增菌后利用增菌液或获得可疑菌落后进行核酸检测。通常利用经过评价的特异性及敏感性均较高的引物进行1个或多个沙门菌特异靶基因或核酸片段的扩增检测。可使用市售的检测规定片段的商品化试剂盒。推荐沙门菌属荧光PCR检测引物见表B.4。

表 B.4 沙门菌属核酸检测引物序列

靶基因名称	引物名称	引物和探针序列（5' -3'）	退火温度/℃	PCR 产物长度/bp
<i>ttr</i>	<i>stf</i>	TTTCGCCACATCACGGTAGC	60	97
	<i>str</i>	CAGGAGATTACAACATGGCTAA		
	<i>stp</i>	FAM-CCAAAAGTGACCATCCCACCGACGGC-BHQ		

B.2 致泻性大肠埃希菌检验

B.2.1 标本收集

采集病例急性期、未用抗生素前新鲜粪便、呕吐物标本（1 g），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埃希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，36℃±1℃培养24 h。从平板上挑取可疑菌落（见表B.5）进行鉴定。

B.2.2.2 增菌培养

对疑似致泻性大肠埃希菌感染相关标本，可经大肠埃希菌肉汤（EC肉汤）增菌后接种麦康凯等选择性培养基；如疑似肠出血性大肠埃希菌O157:H7感染标本，经改良EC肉汤（mEC）增菌液增菌6h，可选用O157免疫磁珠对增菌液中的目标菌进行富集，增菌液或经免疫磁珠富集后的悬液接种于亚碲酸钾-头孢菌素-山梨醇麦康凯琼脂（CT-SMAC）、O157显色培养基（如科玛嘉 O157）或山梨醇麦康凯琼脂。大肠埃希菌的呕吐物标本等先经营养肉汤于36℃±1℃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，36℃±1℃培养24 h。从平板上挑取可疑菌落（见表B.5）进行鉴定。

表 B.5 大肠埃希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（MAC）	大肠埃希菌发酵乳糖，在麦康凯琼脂呈桃红色不透明菌落；少部分不发酵乳糖，菌落为无色
伊红美蓝琼脂（EMB）	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；不发酵乳糖的菌落为无色或浅粉色
亚碲酸钾-头孢菌素-山梨醇麦康凯琼脂（CT-SMAC）	大肠埃希菌 O157:H7 呈不发酵山梨醇的无色灰心菌落，部分菌株发酵或迟缓发酵山梨醇为红色菌落
O157 显色培养基	根据培养基说明书鉴定，大肠埃希菌 O157:H7 多呈紫红色或浅紫色菌落

B.2.3 致病型鉴定

B.2.3.1 肠致病性大肠埃希菌（EPEC）

疑似菌落符合下列特征鉴定为EPEC：

- 标本：水样或蛋花汤样便、呕吐物等；
- 革兰染色镜检及生化反应符合大肠埃希菌特征；
- 存在特异性紧密黏附素（intimin）基因 *eae*，但不含志贺毒素基因1和2（*stx1*和*stx2*）；
- 典型EPEC（typical EPEC，tEPEC）除含有 *eae* 基因外，还携带EAF质粒编码的束状菌毛基因 *bfp*，而非典型EPEC（atypical EPEC，aEPEC）不含 *bfp* 基因（见表B.6）。

B.2.3.2 肠产毒性大肠埃希菌（ETEC）

疑似菌落符合下列特征鉴定为ETEC：

- 标本：霍乱样水样便、呕吐物等；
- 革兰染色镜检及生化反应符合大肠埃希菌特征；
- 存在特异性热不稳定肠毒素（heat-labile enterotoxin）基因 *lt*，猪源热稳定肠毒素（heat-stable enterotoxin）基因 *stIa* 或人源热稳定肠毒素基因 *stIb* 中的任何一种或以上（见表B.6）。

B.2.3.3 肠侵袭性大肠埃希菌（EIEC）

疑似菌落符合下列特征鉴定为EIEC：

- 标本：细菌性痢疾样便、呕吐物等；
- 革兰染色镜检为革兰阴性杆菌；
- 生化反应：不发酵或迟缓发酵乳糖，不产气，部分菌株无动力，酒石酸盐阴性，赖氨酸脱羧酶阴性；
- 存在特异性侵袭性质粒抗原H（invasive plasmid antigen H）基因 *ipaH*（见表B.6）；
- 进一步通过系统生化反应同志贺菌属相鉴别。

B.2.3.4 肠出血性大肠埃希菌（EHEC）/产志贺毒素大肠埃希菌（STEC）

疑似菌落符合下列特征鉴定为EHEC/STEC:

- 标本: 早期为水样便, 后为血便、呕吐物等;
- 革兰染色镜检为革兰阴性杆菌;
- 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、苦杏仁甙阴性;
- 存在特异性志贺毒素 1 基因 (*stx1*) 和/或志贺毒素 2 基因 (*stx2*), 统称为 STEC, 部分菌株可携带 *eae* 基因 (见表 B.6);
- 血清群为 O26、O45、O103、O111、O121、O145 及 O157, 同时携带 *eae* 基因的菌株, 通常具有更强的致病性, 更容易引起出血性肠炎及 HUS, 通常称为 EHEC。

B.2.3.5 肠集聚性大肠埃希菌 (EAEC)

疑似菌落符合下列特征鉴定为EAEC:

- 标本: 水样便、黏液便、呕吐物等;
- 革兰染色镜检及生化反应符合大肠埃希菌特征;
- 存在特异性集聚黏附性菌毛调节基因 *aggR*;
- 部分非典型 EAEC (*aggR* 基因阴性) 菌株, 可检测特异性质粒编码的细菌外膜透性酶基因 *aatA* 和染色体源性的 VI 型分泌系统蛋白基因 *aaiC* (见表 B.6)。

表 B.6 致泻性大肠埃希菌核酸检测引物序列

致病型	靶基因	引物序列 (5' -3')	产物长度/bp	退火温度/℃
EPEC/STEC	<i>eae</i>	F: TCAATGCAGTTCCGTTATCARTT	482	58
		R: GTAAAGTCCGTTACCCCAACCTG		
tEPEC	<i>bfpB</i>	F: CACCTCATTTGCTGAAGTCG	904	56
		R: CAGAACACCTCCGTTATGC		
ETEC	<i>lt</i>	F: CTCTCTATGTGCAYACGGAGC	325	58
		R: TTCCATACTGATTGCCGCAA		
	<i>stla</i>	F: TGTATTATCTTTCCCCTCTTTTAG	160	55
		R: ACAACAMARTTCACAGCAGTAA		
	<i>stlb</i>	F: GCTCAGGATGCTAAACCAG	138	56
		R: ACAACAMARTTCACAGCAGTAA		
EIEC	<i>ipaH</i>	F: TTGACCGCCTTTCCGATAC	612	58
		R: GGTCAGCCACCCTCTGAG		
STEC	<i>stx1</i>	F: GGATGCAGATAAATCGCCAT	370	56
		R: GCAACTCGCGATGCATGAT		
	<i>stx2</i>	F: CAGTCGTCACTCACTGGTTTCA	283	60
		R: GGATATTCTCCCCACTCTGACAC		
	<i>*stx2f</i>	F: TCTCAGGGTGGTRTTTCTGTT	986	56
		R: AACAAATGGCTGCAAATTCAT		
EAEC	<i>aggR</i>	F: TAAGACGCCTAAAGGATGCC	249	57
		R: CAGAAAAGAAGCTTACAGCCG		
	<i>aatA</i>	F: GAATACGAAATTGCAAAGCG	761	55
		R: GAAATGTGCTGCAGAAGAAA		
	<i>aaiC</i>	F: ATTGTCCTCAGGCATTTCAC	215	56
		R: ACGACACCCCTGATAAACAA		
大肠埃希菌	<i>rrs</i>	F: CCCCTGGACGAAGACTGAC	401	60
		R: ACCGCTGGCAACAAAGGATA		

*该引物覆盖除 *stx2f* 亚型外的其他 *stx2* 亚型。

B.2.4 血清分型

在通过特异性基因检测确定大肠埃希菌的致病型后, 可进行O抗原和H抗原分型分析。O:H血清型可通过传统血清凝集法确定, 亦可通过针对特异性O抗原基因簇和H抗原基因的PCR方法进行确定。

B.3 致泻性弧菌检验

B.3.1 标本的收集

急性期、未用抗生素前采集病例新鲜粪便标本或（和）呕吐物标本2 g~5 g或2 mL~5 mL，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

取新鲜粪便接种于硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖（TCBS）琼脂或（和）弧菌显色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做进一步鉴定。霍乱弧菌、副溶血性弧菌、河弧菌、弗尼斯弧菌、拟态弧菌和溶藻弧菌在选择性培养基上生长特性见表B.7。

B.3.2.2 增菌培养

取新鲜粪便0.5 g~1 g或0.5 mL~1 mL接种于pH8.8~9.0的碱性蛋白胨水增菌液，35℃~37℃培养6h~8h，从菌膜下表层取一接种环培养物，划线接种于TCBS或（和）弧菌显色琼脂平板，35℃~37℃培养18 h~24 h进行分离培养，挑取可疑菌落（见表B.7）做进一步鉴定。

表 B.7 致泻性弧菌在选择性琼脂平板上的菌落特征

致泻性弧菌	TCBS 琼脂菌落特征	弧菌显色琼脂菌落特征 ^a
霍乱弧菌	黄色，扁平，直径 2 mm~3 mm	蓝绿色，直径 2 mm~3 mm
副溶血性弧菌	绿色或蓝绿色，直径 3 mm~5 mm	紫红色，直径 2 mm~3 mm
河弧菌	黄色，直径 2 mm~3 mm	粉红或粉白色，直径 2 mm~3 mm
弗尼斯弧菌	黄色，直径 2 mm~3 mm	无色，直径 3mm~5 mm
溶藻弧菌	黄色，直径 3 mm~5 mm	无色，直径 2 mm~3 mm
拟态弧菌	绿色或蓝绿色，直径 2 mm~3 mm	浅蓝绿色，直径 2mm~3 mm
创伤弧菌	绿色或蓝绿色，直径 2 mm~3 mm	蓝绿色，直径 3 mm~5 mm

^a为弧菌显色培养基上菌落特征。致泻性弧菌在不同厂家弧菌显色培养基上的菌落特征有所不同，具体参考相关产品的厂家说明书。

B.3.3 鉴定

B.3.3.1 镜检

致泻性弧菌革兰染色显微镜下可见革兰阴性无芽孢杆菌，细菌形态呈杆状、弧状等，常呈多形性。新鲜培养物悬滴法直接镜检在暗室野下可见穿梭状快速运动。

B.3.3.2 生化试验

挑取可疑菌落进行生化初筛（KIA/MIU）、氧化酶、黏丝试验，致泻性弧菌氧化酶阳性，黏丝试验阳性（副溶血弧菌除外）；或用生化仪或生化条进行鉴定。致泻性弧菌不同种的具体生化特征见表B.8。

a) 氧化酶试验：用铂/铈接种环或牙签从无碳水化合物成分的非选择性琼脂上挑取可疑菌落的新鲜培养物，涂抹在滤纸上，取2滴~3滴氧化酶试剂（1%盐酸四甲基对苯二胺）滴加在菌苔上，20s内出现深紫色、紫罗兰或深蓝色为阳性。

b) 黏丝试验：在玻片或平皿上滴一大滴0.5%去氧胆酸钠水溶液，从普通琼脂或其他非选择性琼脂上取一接种环可疑菌落18 h~24 h培养物，放在溶液旁研磨混匀，再与溶液混合制成浓厚悬液。在1min

内菌悬液由混变清并变得很黏稠，用接种环挑取可拉出细丝来者为阳性。阴性者呈均匀悬液状态，与蒸馏水对照相同。

B.3.3.3 血清凝集试验

目前致泻性弧菌中只有霍乱弧菌和副溶血弧菌具有商品化的诊断血清，生化符合的副溶血弧菌和霍乱弧菌可用相应诊断血清做玻片凝集试验进一步鉴定，同时用生理盐水做对照。注意TCBS培养基上的疑似菌落常难以乳化，不宜直接进行玻片凝集，应挑取可疑菌落，先接适宜盐浓度的普通琼脂培养基纯培养后再做玻片凝集。

副溶血弧菌血清凝集试验先准备较浓厚菌悬液，K抗原检测先用不同K混合多价血清与制备的菌悬液做玻片凝集，阳性者再用相应的组份单因子K抗血清进行凝集检测。O抗原检测先将菌悬液121℃灭菌处理1h，菌体沉淀离心重悬再与O群血清做玻片凝集。

霍乱弧菌直接从普通琼脂培养基上挑取菌落与O1和O139群特异性霍乱弧菌诊断血清做玻片凝集，很快出现肉眼可见凝集颗粒者确定为阳性。与O1群血清凝集者，可进一步用小川和稻叶型诊断血清分型。不与O1和O139群诊断血清发生凝集，但生化符合的霍乱弧菌可归为非O1非O139群霍乱弧菌。

B.3.3.4 分子鉴定

可用经过评价的特异性和敏感性较高的种特异性的引物对可疑菌株进行PCR分子鉴定，使用商业化试剂盒提取菌株DNA或制备菌落水煮模板。注意PCR检测每次试验均设阴、阳性对照及空白对照，推荐的参考引物见表B.9。也可使用市售的检测规定片段的商品化试剂盒进行鉴定。

B.3.4 菌型的判定和结果报告

综合生化试验、血清学分型鉴定和分子生物学检测结果，判定感染菌型并报告结果。

表 B.8 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	海鱼弧菌（少女鱼弧菌）	霍利斯弧菌	麦氏弧菌
最适生长温度/℃	37	37	37	37	37	25, 35	37	37	25	25, 36	37
氧化酶	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
硝酸盐还原	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
靛基质	+	+	+	+	+	—	—	—	—	+ / —	+ / —
V P	+/-	—	—	—	+ / —	+	—	—	+	—	+ / —
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	-	-	-	-	+ / -	-	-	-	-	-	-
0/129 弧菌抑制剂											
10μg	S	S	R	S	R	R	R	R	S	R	S
150μg	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TCBS 生长	Y	G	G	G	Y	Y	Y	Y	G	G	Y
注：+ 表示阳性；- 表示阴性；+/-，表示多数阳性，少数阴性；-/+，表示多数阴性，少数阳性；nd，不定；S，敏感；R，耐药；Y，黄色；G，绿。											

表 B.9 致泻性弧菌核酸检测推荐引物序列

致病菌型	靶基因	引物序列 (5'-3')	产物长度 /bp	退火温度 /℃
副溶血弧菌	<i>tlh</i>	F: AAAGCGGATTATGCAGAAGCACTG	450	58
		R: GCTACTTTCTAGCATTTTCTCTGC		
创伤弧菌	<i>vvhA</i>	F: CCGCGGTACAGGTTGGCGCA	519	56
		R: CGCCACCCACTTTCGGGCC		
河弧菌	<i>toxR</i>	F: GACCAGGGCTTTGAGGTGGACGAC	217	65
		R: AGGATACGGCACTTGAGTAAGACTC		
溶藻弧菌	<i>vppC</i>	F: GTGGCTTACACGTTGGAATGATC	142	56
		R: TTTGGCAAGGTCTGTTTGGTTAC		

B.4 弯曲菌检验

B.4.1 标本收集

于急性期、未用抗生素前采集病例新鲜粪便标本5 g~10 g，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；粪便量较少（黄豆粒大小）、便拭子或肛拭子，可直接将标本保存到Cary-Blair运送培养基或者弯曲菌增菌液中，4℃冷藏保存，当天运送实验室检测。保存在增菌液中的标本，运送至实验室后，应至少在24h内，按照增菌培养条件进行增菌培养。

B.4.2 标本的分离培养检测

B. 4. 2. 1 培养条件

本菌为微需氧菌，在5%O₂、10%CO₂、85%N₂条件下生长最好。可使用混合气体法或能产生同样气体环境的其他产气装置。空肠弯曲菌和结肠弯曲菌最适宜的培养温度为42℃。增菌培养可在微需氧环境下42℃增菌24 h~36 h。在平皿上的培养需要在同样微需氧环境下42℃培养24 h~48 h。

B. 4. 2. 2 直接划线培养

采集的病例新鲜粪便标本可直接划线接种于Skirrow 血琼脂平板与Karmali选择性琼脂平板，42℃微需氧倒置培养24 h~48 h。培养24 h后如有疑似菌落，则进行B. 1. 3鉴定，培养24 h后如细菌生长缓慢或者菌落很小，可增加培养时间至48 h，72 h后仍无疑似菌落判断为阴性。

B. 4. 2. 3 增菌过滤培养

从便盒中，挑取黄豆粒大小人粪标本（或取300 μL~500 μL水样便），加入2 mL的弯曲菌Preston增菌液中，充分混匀。将便拭子或者肛拭子放入2 mL的Preston的弯曲菌增菌液中，充分挤压混匀，取出棉签。将加入标本的增菌液在微需氧环境下，42℃增菌培养24 h。

使用0.45 μm滤膜，将其轻轻贴在哥伦比亚血琼脂平板和Karmali琼脂平板中央表面，取出增菌培养物，拧紧培养管的管口后轻轻混匀，拧开管口，取300 μL~500 μL的增菌培养物，分成4点~6点，呈梅花样滴加于滤膜上，注意滴加的液体不能超过滤膜的边缘。在生物安全柜中，等待滤膜上的液体充分透过滤膜（约45min~60min），迅速揭掉滤膜，翻转培养平板，置于微需氧环境中42℃或者37℃，培养24 h~48 h。培养24 h后如有疑似菌落，则进行菌落鉴定，培养24 h后如细菌生长缓慢或者菌落很小，可增加培养时间至48 h，72h后仍无疑似菌落判断为阴性。

B. 4. 3 菌落鉴定

B. 4. 3. 1 形态

空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的形态特征如下。

a) 疑似菌落：空肠弯曲菌和结肠弯曲菌典型菌落形态一般有两种，一种呈浅灰或灰白色、半透明而中心颜色较暗，圆形，光滑，中间凸起、针尖状或小水珠状，直径1 mm~3 mm，边缘整齐、有光泽的单个菌落；另一种呈浅灰白色、半透明、扁平或稍突起、水滴状，形状常呈不规则圆盘状，直径2 mm~5 mm的单个菌落，培养时间增加，菌落直径变大。

b) 革兰染色：空、结肠弯曲菌为革兰阴性，菌体弯曲如小的半个括号状，或呈S形、螺旋状或海鸥展翅状。

B. 4. 3. 2 生化试验鉴定

B. 4. 3. 2. 1 氧化酶试验

挑取至少5个疑似菌落接种到哥伦比亚血琼脂平板进行分纯培养，用接种环或玻璃棒挑取菌落至氧化酶试剂润湿的滤纸上，如果在10s内出现紫红色、紫罗兰或深蓝色为阳性。空肠弯曲菌氧化酶试验阳性，结肠弯曲菌氧化酶试验阳性。

B. 4. 3. 2. 2 马尿酸盐水解试验

挑取至少5个疑似菌落接种到哥伦比亚血琼脂平板进行分纯培养，用接种环刮取菌苔，接种到0.4 mL含1%的马尿酸钠溶液中，振摇试管以分散培养物，置37℃培养2 h。然后向试管中加入0.2 mL茚三酮试剂，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。空肠弯曲菌马尿酸盐水解试验阳性，结肠弯曲菌马尿酸盐水解试验阴性。

B. 4. 3. 2. 3 吲哚乙酸酯水解试验

取50 μL含10%吲哚乙酸酯的溶液，将其吸附到直径为6 mm的纸片上，将纸片在空气中晾干。挑取至少5个疑似菌落接种到哥伦比亚血琼脂平板进行分纯培养，挑取分纯后的可疑菌落生长物，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。空肠弯曲菌吲哚乙酸酯水解试验阳性，结肠弯曲菌吲哚乙酸酯水解试验阳性。

B. 4. 3. 2. 4 过氧化氢酶试验

挑取至少5个疑似菌落接种到哥伦比亚血琼脂平板进行分纯培养，用接种环挑取菌落，加到干净玻片上的3%过氧化氢溶液中，如果在30s内出现气泡则判定结果为阳性。空肠弯曲菌过氧化氢酶试验阳性，结肠弯曲菌过氧化氢酶试验阳性。

空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的生化鉴定特征见表B. 10。

表 B. 10 空肠弯曲菌和结肠弯曲菌生化试验结果

生化特征	空肠弯曲菌	结肠弯曲菌
氧化酶	+	+
过氧化氢酶	+	+
马尿酸盐水解	+	-
吲哚乙酸酯水解	+	+
注：+表示阳性；-表示阴性。		

B. 4. 3. 3 核酸检测鉴定

空肠弯曲菌和结肠弯曲菌多重 PCR 鉴定的引物序列及扩增片段长度见表 B. 11。

表 B. 11 空肠弯曲菌和结肠弯曲菌多重 PCR 鉴定参考序列

引物名称	推荐序列（5'—3'）	产物长度/bp（鉴定菌种）
16S-F	ATCTAATGGCTTAACCATTAAAC	857（空肠弯曲菌、结肠弯曲菌）
16S-R	GGACGGTAAGTATTTAGTATT	
mapA-CJF	CTATTTTATTTTGAGTGCTTGTG	589（空肠弯曲菌）
mapA-CJR	GCTTTATTTGCCATTTGTTTATTA	
ceuE -CCF	ATTTGAAAATTGCTCCAACATG	462（结肠弯曲菌）
ceuE -CCR	TGATTTTATTATTGTAGCAGCG	

反应程序：95℃预变性 5min，95℃变性 1min，55℃退火 1min，72℃延伸 1min，35个循环后72℃延伸 5min，4℃保存。

可使用市售的具有同等功效的商品化试剂盒进行鉴定。

B. 4. 4 菌种的判定和结果报告

根据B. 4. 3. 1、B. 4. 3. 2、B. 4. 3. 3结果，报告是否检出空肠弯曲菌或结肠弯曲菌。腹泻病例同时感染空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的情况很常见。

B. 5 小肠结肠炎耶尔森菌检验

B. 5. 1 标本的采集与运送

采集腹泻病人急性期、宜在抗生素应用以前的新鲜粪便2 g~5 g或2 mL~5 mL，粪便尽量选取有性状改变部分，置于干净广口容器内，立即送实验室进行检测。运送时间超过2 h者，标本应放入Cary-Blair运送培养基中，在4℃冷藏条件下48h内送达实验室；或将粪便标本直接接种到耶尔森菌改良PBS增菌培养基内，4℃冷藏条件下送达实验室。如不易获得粪便，可采用直肠拭子法采便：将棉拭子前端用无菌甘油或等渗盐水（0.9%氯化钠）浸润（棉拭子多余的液体贴管壁挤出），然后插入肛门4 cm~5 cm（幼儿约2 cm~3 cm）处，轻轻在直肠内旋转，于紧靠肛环边的隐窝处采集直肠表面黏液后取出，拭子放入可旋盖密封的离心管或含Cary-Blair培养基的离心管中或耶尔森菌改良PBS增菌培养基内，旋紧盖子以防水分丢失和漏洒。肛拭子运送条件同新鲜粪便。如果伴有发热，且外周血白细胞高的患者可同时采集全血进行血培养。

B.5.2 菌株分离培养方法

B.5.2.1 直接分离培养

将粪便标本直接接种于耶尔森菌选择性培养基（CIN培养基）或麦康凯（MAC）培养基等选择性琼脂上，25℃~28℃培养24 h~48 h。从培养基上挑取可疑菌落（在CIN培养基上为直径约1 mm~2 mm，中心呈深玫瑰红色，周围有窄透明环的“公牛眼”状菌落；在MAC培养基上为圆形、光滑、湿润、扁平略有凸起、半透明的菌落，中央有极淡的粉色的小菌落）接种于尿素培养基。分解尿素者进一步按本标准第B.5.2.3条进行生化鉴定。

血液标本直接接种血平板或LB平板，也可接种血培养瓶25℃~28℃培养24 h~48 h，对长出的菌落直接按照本标准第B.5.2.3条系统生化鉴定。

B.5.2.2 增菌培养

监测用标本或其他不需要在短时间内获得培养结果的样本，可采用长时间冷增菌的策略提高标本检出率。取约1 g粪便标本接种于10 mL改良磷酸盐缓冲液（改良PBS），于4℃分别增菌培养10 d和20 d后取增菌培养物接种于CIN、MAC等平板，25℃~28℃培养24 h~48 h，按照本标准第B.5.2.1条中的方法从平板上挑取可疑菌落进行分离培养。

B.5.2.3 生化鉴定

使用质量受到公认的生化鉴定试剂对筛选到的可疑菌落是否为小肠结肠炎耶尔森菌进行判断。目前部分商业化系统生化鉴定仪对部分小肠结肠炎耶尔森菌菌株无法给出准确鉴定结果。另外，使用商业质谱鉴定仪判断为非小肠结肠炎耶尔森菌的菌株并不能完全否定，仍要最终通过生化鉴定判断。

本菌主要生化反应情况见表B.12，各生化反应（除37℃条件下动力和VP试验）均在25℃~28℃进行。

表 B.12 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℃	+	葡萄糖产气	-	七叶苷	V
	37℃	-	乳糖	V	水杨酸	V
VP	25℃	V	鸟氨酸脱羧酶	+	H ₂ S	-
	37℃	-	精氨酸脱羧酶	-	吲哚	V
靛基质		V	赖氨酸脱羧酶	-	肌醇	V
甲基红		+	蜜二糖	-	阿拉伯糖	+
枸橼酸盐		-	鼠李糖	-	甘露醇	+

尿素	+	蔗糖	+	纤维二糖	+
苯丙氨酸脱氨酶	-	棉子糖	-		
氧化酶	-	山梨糖	+		
注：+ 表示阳性结果，- 表示阴性结果；V 表示不同菌株结果不同。					

B. 5. 2. 4 血清学检测

该菌具有O抗原，目前已经发现70种以上的血清型。使用分型抗血清或单克隆抗体通过玻片凝集法进行检测，设置盐水作为对照。国际上目前具有商业化试剂可进行检测的血清型为O:12、O:3、O:5、O:8、O:9型，我国小肠结肠炎耶尔森菌病例常见菌株血清型别为O:3与O:9血清型。

B. 5. 3 核酸检测

使用商业化试剂盒提取病例标本DNA，进行小肠结肠炎耶尔森菌特异性基因*foxA*、*ail*的检测，引物序列见表B. 13。

表 B. 13 毒力基因 PCR 扩增引物序列

引物	引物序列 (5' -3')	产物大小/bp	退火温度/℃
<i>foxA</i> 836	GGTTCCTTGAGCGTATTGATG	1094	58
<i>foxA</i> 1950	GGTCATCGGTTTCAGCAGTTT		
<i>ail-F</i>	TAATGTGTACGCTGCGAG	351	57
<i>ail-R</i>	GACGCTTACTTGCACTG		

PCR反应体积为20 μL，引物使用浓度为10 μmol/L，体系内上下游引物各加0.5 μL；Taq酶：1 U/20 μL体系。同时设阴性、阳性及空白对照。

PCR反应程序：95℃预变性10 min；94℃变性15s，退火30s，72℃延伸30s。共25个循环。最后72℃延伸5min。

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

B. 5. 4 结果报告

从临床病例的粪便标本中分离到小肠结肠炎耶尔森菌或检测到小肠结肠炎耶尔森菌特异性基因*foxA*和（或）*ail*即可诊断为小肠结肠炎耶尔森菌感染。

B. 6 轮状病毒检验

B. 6. 1 标本收集

B. 6. 1. 1 粪便

收集病例早期腹泻粪便约10 g或10 mL，置无菌容器内。

B. 6. 1. 2 血液标本

如做抗体测定，应采集2份血液标本。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5 mL血液，置于消毒试管。室温放置2h，待凝固后分离血清。

B. 6. 1. 3 标本保存与运输

通常对于短途运输（1 d以内），包装盒内放冰袋或冰排，长途运输（1 d~2 d）要用干冰。标本在4℃短期储存，不能超过3 d。标本如果近期不进行检测，应直接在-20℃或-80℃下长期贮存，并避免反复冻融。

B.6.2 实验室检查

B.6.2.1 透射电镜检查

B.6.2.1.1 腹泻病例粪便上清液0.2 mL~0.5 mL。

B.6.2.1.2 直径约为3 mm的覆盖有机膜和碳膜的200目~400目铜网。

B.6.2.1.3 染色液：1%磷钨酸（pH6.8）。

B.6.2.1.4 血清：

为提高电镜的检出率，免疫负染电镜检测前准备病例恢复期血清或轮状病毒免疫动物血清：

a) 病例恢复期血清（1:5或1:10稀释）；

b) 轮状病毒动物免疫血清，其效价1:64以上，用时以生理盐水做1:20~1:50稀释。

B.6.2.1.5 直接负染法

取腹泻病例粪便标本约0.2 mL~0.5 mL，以3000 r/min离心15 min~20 min，取上清5 μL~10 μL滴加到自锁镊子加持的覆膜面向上放置的铜网上，至少1 min后用滤纸在铜网边缘吸除标本液滴。再将5 μL~10 μL染液滴加在铜网上，染色1 min，用滤纸在铜网边缘吸除染液，室温干燥后进行透射电镜观察、检测。视野内看到轮状病毒颗粒即可确定。

B.6.2.1.6 免疫负染法

取经3000 r/min离心的粪便上清液50 μL~100 μL，加入病例恢复期血清或轮状病毒动物免疫血清（稀释后）50 μL~100 μL混合，37℃作用1 h，4℃过夜。取上述混合液5 μL~10 μL滴加到自锁镊子加持的覆膜面向上放置的铜网上，至少1 min后用滤纸在铜网边缘吸除标本液滴。再将5 μL~10 μL染液滴加在铜网上，染色1 min，用滤纸在铜网边缘吸除染液，室温干燥后进行透射电镜观察、检测。视野内看到轮状病毒颗粒即可确定。

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℃处理30 min后，使用商品化试剂盒提取病毒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，根据电泳图型判定结果。

a) 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分4组区带，其分布模式为4: 2: 3: 2。第四组含RNA第10和第11节段，根据其电泳迁移距离不同，把A组轮状病毒进一步分为两个亚群：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) 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4: 2: 2: 3），RNA第7、8、9节段明显分开。

c) 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。

d) H组轮状病毒即新型成人腹泻轮状病毒。11条RNA电泳图的分布模式为4: 2: 1: 1: 1: 1: 1，RNA第3、4节段分开，第5、6节段靠近，第7、8、9节段明显分开。

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1 h~1.5 h, , 依据电泳图型判定结果。此法比PAGE电泳分析简单快速, 但检测灵敏度较低。

B. 6. 2. 4 免疫学检测

B. 6. 2. 4. 1 胶体金免疫层析试验

检测粪便中A组轮状病毒抗原, 有商品试剂盒供应, 试验按常规方法进行。

B. 6. 2. 4. 2 ELISA方法

检测粪便中A组轮状病毒抗原, 有商品试剂盒供应, 试验按常规方法进行。

B. 6. 2. 4. 3 抗体检测

恢复期血清与A组轮状病毒抗原结合较急性期血清4倍及以上增加。不用于常规检测。

B. 6. 2. 5 逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR)

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, 运用逆转录后巢式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选择, 见表B. 14。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. 14 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 /℃	片断大小 /bp
VP7F	G(+)	G 基因分型第一轮引物	ATGTATGGTATTGAATATACCAC	42	882
VP7R	G(-)		AACTTGCCACCATTTTTTCC		
G1-1	G1(+)	G1 基因型特异引物	CAAGTACTC AAATCAATGACGG		618
G2-1	G2(+)	G2 基因型特异引物	CAATGATATTACTACATTTTCTAT G		521
G3-1	G3(+)	G3 基因型特异引物	GCTAAYTCTACACAAGGAG		682
aDT4	G4(+)	G4 基因型特异引物	CGTTTCTGGTGAGGAGTTG		452
aAT8	G8(+)	G8 基因型特异引物	ATTACGCCATTTGTAAATTCA		754
G9-1	G9(+)	G9 基因型特异引物	CTTGATGTAACATAAATAC		179
VP4F	P(+)	P 基因分型第一轮引物	TATGCTCCAGTNAATTGG	42	663
VP4R	P(-)		ATTGCATTCTTTCCATAATG		
2T-1	P4(-)	P[4]基因型特异引物	CTATTATTAGAAGTTAAAGTC		362
3T-1	P6(-)	P[6]基因型特异引物	TGTTGATTAGTTGGATTCAA		146
1T-1D	P8(-)	P[8]基因型特异引物	TCTACTGGRTRACNTGC		224

B. 6. 2. 6 病毒分离

B. 6. 2. 6. 1 细胞系

原代非洲绿猴肾或传代非洲绿猴肾细胞 (MA104) 等。

B. 6. 2. 6. 2 细胞培养基成分

DMEM培养液、青/链霉素 (10000 U/mL、10000 μg/mL)、胎牛血清、15 μg/mL胰蛋白酶。

B. 6. 2. 6. 3 生长液

100 mLDMEM生长液中包含DMEM培养液89 mL、胎牛血清10 mL、青/链霉素1 mL。

B. 6. 2. 6. 4 维持液

DMEM培养液（含2 μg/mL~10 μg/mL胰蛋白酶）。

B. 6. 2. 6. 5 试验步骤

取粪便上清液0.2 mL~0.5 mL先加青/链霉素0.2 mL，4℃过夜处理或用0.45 μm滤器过滤除菌，将标本用终浓度为15 μg/mL胰蛋白酶在37℃作用1 h，接种到生长至80%单层细胞培养管，37℃吸附1 h，弃去标本液，换上细胞维持液（含2 μg/mL~10 μg/mL胰蛋白酶），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3次。对于粪便标本中轮状病毒的初次分离，宜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，不宜做到病毒分离。

B. 7 诺如病毒检验

B. 7. 1 标本收集

B. 7. 1. 1 诺如病毒检测首选粪便标本。粪便标本在出现症状后2 d~3 d内采集，置于无菌容器内，每份标本量约5 g或5 mL以上。

B. 7. 1. 2 呕吐物每份标本采集5 g或5 mL以上，置于无菌容器内。

B. 7. 1. 3 肛拭子：肛拭棉签放入无菌带盖装有2mL无菌PBS缓冲液（10 mmol/L，pH 7.0~7.4）中。

B. 7. 1. 4 采集病例急性期（发病5d内）和恢复期（发病3周~6周）血液样本，分离血清后-20℃长期保存。血清标本不建议做常规诊断。

B. 7. 1. 5 标本保存和运输同轮状病毒第B6. 1. 3条。

B. 7. 2 实验室检查

B. 7. 2. 1 电镜检查

试验方法同轮状病毒电镜检查。

B. 7. 2. 2 免疫学检测

B. 7. 2. 2. 1 ELISA方法

商品化抗原诊断试剂盒可用于诺如病毒的检测，具体操作按其说明书进行。由于ELISA方法敏感性较低，ELISA检测阴性标本仍需核酸检测进一步确认。

B. 7. 2. 2. 2 抗体检测

恢复期血清与诺如病毒样颗粒（VLP）结合较急性期血清4倍及以上增加，不用于常规检测。

B. 7. 2. 3 RT-PCR

B. 7. 2. 3. 1 实时逆转录聚合酶链式反应（Real-time RT-PCR）

Real-time PCR是检测诺如病毒金标准。按常规提取病毒RNA，商品化诺如病毒Real-time RT-PCR检测试剂盒可用来检测诺如病毒，方法按试剂盒说明书进行，也可按表B. 15引物和探针进行检测。

表 B.15 多重荧光定量 RT-PCR 扩增诺如病毒的引物和探针

分组	引物/ 探针	序列 (5'-3')	工作浓度 /nmol/L
GI	Cog 1F	CGYTGGATGCGITTYCATGA	400
	Cog 1R	CTTAGACGCCATCATCATTYAC	400
	probe Ring 1E	FAM - TGGACAGGRGAYCGC - MGBNFQ	200
GII	Cog 2F	CARGARBCNATGTTYAGRTGGATGAG	400
	Cog 2R	TCGACGCCATCTTCATTACACA	400
	probe Ring 2	Cy5 或 QUASAR 670 - TGGGAGGGCGATCGCAATCT - BHQ2	200

B.7.2.3.2 逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR)

Real-time RT-PCR检测阳性的核酸, 进一步用传统RT-PCR扩增, PCR产物进行测序, 通过序列与参考株的系统进化分析, 可进行基因分型, 扩增区域为部分聚合酶和衣壳区, 引物详见表B.16。RT-PCR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。

表 B.16 用于诺如病毒基因分型的引物

基因型	引物	序列 (5'-3')	产物大小/bp
GI	MON432 (+)	TGGACICGYGGICCYAAYCA	579
	G1SKR (-)	CCAACCCARCCATTRTACA	
GII	MON431 (+)	TGGACIAGRGICCYAAYCA	570
	G2SKR (-)	CCRCCNGCATRHCCRTTTRTACAT	

B.8 肠腺病毒检验

B.8.1 标本收集

同本标准第B.6.1条。

B.8.2 实验室检测

B.8.2.1 免疫学检测

B.8.2.1.1 胶体金免疫层析试验: 有商品试剂盒供应, 试验按常规方法进行。

B.8.2.1.2 ELISA方法: 有商品试剂盒供应, 试验按常规方法进行。

B.8.2.1.3 抗体检测: 恢复期血清与抗原结合较急性期血清4倍及以上增加。不用于常规检测。

B.8.2.2 聚合酶链反应 (PCR方法)

B.8.2.2.1 Real-time PCR检测

商品化腺病毒Real-time PCR检测试剂盒用来检测腺病毒, 方法按试剂盒说明书进行, 也可按以下引物和探针进行检测 (表B.17)。

表 B.17 用于肠腺病毒检测的引物

引物/探针	序列 (5'-3')
JTVFF	AACTTTCTCTCTTAATAGACGCC
JTVFR	AGGGGGCTAGAAAACAAA

JTVFAP	FAM-CGAAGAGTGCCCGTGTACAGC-BHQ
--------	-------------------------------

B. 8. 2. 2. 2 传统PCR检测

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。上游引物Ad1的序列为:5'-TTCCCCATGGCICAYAACAC-3';下游引物Ad2的序列为:5'-CCCTGGTAKCCRATRTTGTA-3',扩增片段长度为482bp。通过测序和序列分析进行基因分型。

B. 8. 2. 3 病毒分离

B. 8. 2. 3. 1 细胞系

腺病毒40和41型能在Graham293细胞、张氏结膜细胞和第三代食蟹猴肾细胞(tCMK)中生长。Graham293细胞目前是腺病毒最敏感的细胞。

B. 8. 2. 3. 2 细胞培养基成分

DMEM培养液、青/链霉素(10000 U/mL, 10000 μg/mL)、胎牛血清。

B. 8. 2. 3. 3 生长液

100 mLDMEM生长液中包含DMEM培养液89 mL、胎牛血清10 mL、青/链霉素1 mL。

B. 8. 2. 3. 4 维持液

DMEM培养液。

B. 8. 2. 3. 5 试验步骤

取粪便上清液0.2 mL~0.5 mL,先加青/链霉素0.2mL4℃过夜处理或用0.45 μm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3次。肠腺病毒40/41型感染Graham293细胞12 d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10 d左右出现局灶性病变,15d后病变完全。

B. 9 隐孢子虫检验

B. 9. 1 标本收集

粪便、呕吐物或小肠液按照常规方法收集,如不能及时进行检测,可放在4℃保存,存放不超过72 h。

B. 9. 2 病原学鉴定

B. 9. 2. 1 标本制备

粪便直接涂成1.5 cm大小的粪膜(厚度以覆在报纸上时可透过图片看到字为宜),在自然或37℃下使之充分干燥后,滴加无水甲醇固定3 min~5 min。

B. 9. 2. 2 金胺-酚染色法

B. 9. 2. 2. 1 试剂配制

0.1%金胺-酚染色液(第一液):金胺0.1 g,苯酚5 g,蒸馏水定容至100 mL,用蒸馏水溶解苯酚,缓慢加入金胺,用滤纸过滤到棕色试剂瓶中,室温贮藏;3%盐酸酒精(第二液):盐酸3 mL,95%酒精

100 mL，转移到棕色瓶中，室温贮藏；0.5 %高锰酸钾液（第三液）：高锰酸钾0.5 g，蒸馏水100 mL，将高锰酸钾加到蒸馏水中，充分搅拌，过滤至棕色试剂瓶中，室温贮藏。

B.9.2.2.2 染色步骤

滴加第一液于晾干的粪膜上，10 min~15 min后自来水漂洗；滴加第二液，脱色1 min后水洗；滴加第三液，染色1 min后水洗，晾干后，置于荧光显微镜下观察结果。

注：染色所用的金胺-酚和高锰酸钾溶液配制后，不宜超过1个月，否则影响染色结果。

B.9.2.2.3 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，特别注意与环孢子虫卵囊的鉴别，环孢子虫卵囊荧光着色偏暗，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.9.2.3 改良抗酸染色法

B.9.2.3.1 试剂配制

石炭酸复红染色液（第一液）：碱性复红4 g，95 %酒精20 mL，苯酚8 mL，蒸馏水100 mL，将碱性复红溶于95%酒精，搅拌至全部溶解，缓慢加入苯酚至混合均匀，定容至100 mL，滤纸过滤除去碎渣贮存于棕色试剂瓶中，室温贮藏；10 %硫酸溶液（第二液）：纯硫酸10 mL，蒸馏水90 mL（边搅拌边将硫酸徐徐倾入水中），转移至棕色试剂瓶中，室温贮藏；2 %孔雀绿原液：孔雀绿2 g，蒸馏水100 mL，过滤至棕色试剂瓶中，室温贮藏，1:10孔雀绿工作液（第三液）：孔雀绿原液1 mL，蒸馏水9 mL。

B.9.2.3.2 染色步骤

粪便涂片和固定方法同前。滴加第一液于粪膜上，2 min~10 min后自来水漂洗；滴加第二液，至涂片呈粉红色为止（1min~10min），自来水漂洗；滴加第三液，染色1min~2min后自来水漂洗，晾干，光学显微镜油镜镜检。

B.9.2.3.3 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，卵囊圆或椭圆形，直径4 μm~6 μm，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，环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.9.2.4 金胺酚-改良抗酸染色法

B.9.2.4.1 试剂配制

试剂配制同本标准第B.9.2.2.1条和第B.9.2.3.1条。

B.9.2.4.2 染色步骤

先进行金胺-酚染色后，再用改良抗酸染色法复染。

B.9.2.4.3 结果判定

复染后卵囊形态同抗酸染色法所见，但非特异性颗粒被染成了蓝黑色，极易鉴别。

B.9.3 抗原检测

采用基于单克隆抗体的胶体金免疫层析试纸条或者间接荧光抗体试验，检测隐孢子虫的抗原或者在荧光显微镜下检测隐孢子虫卵囊。采集粪便标本，按照商品化试剂盒产品说明书要求操作和判读结果。

B.9.4 核酸检测

常用核酸检测方法如表B.18所示。

表 B.18 隐孢子虫核酸检测引物序列（巢氏 PCR 法）

靶基因名称	引物名称	引物和探针序列（5'-3'）	退火温度/℃	PCR 产物长度/bp
18S rRNA 核酸片段	第一轮引物	TTCTAGAGCTAATACATGCG	55	830
		CCCATTTCCTTCGAAACAGGA		
	第二轮引物	GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG		
		CTCATAAGGTGCTGAGGAGTA		

B.10 蓝氏贾第鞭毛虫检验

B.10.1 标本收集

粪便、小肠液按照常规方法收集，如不能及时进行检测，可放在4℃保存，通常存放不超过72h。贾第鞭毛虫在发育过程中有滋养体和包囊两种形态，贾第虫病病例的水样稀便多见滋养体，而糊状或块状粪便可能仅含有包囊。

B.10.2 病原学鉴定

B.10.2.1 滋养体的检查

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（12~15）μm×（6~8）μm，厚2μm~4μm。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粪便标本中，且分解快，故检测滋养体操作要迅速。

B.10.2.2 包囊的检查

包囊出现在糊状或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3d。包囊呈椭圆形，大小为（8~12）μm×（7~10）μm。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.10.2.3 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。新鲜标本观察到的包囊呈现典型的卵（椭）圆形，一般长11μm~14μm，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，有两个泡状核，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. 10.3 抗原检测

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,按诊断原理分为酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒和间接荧光抗体(IFA)试剂盒,主要检测粪便中的贾第虫包囊囊壁抗原。采集粪便标本,按照商品化试剂盒产品说明书要求操作和判读结果。

B. 10.4 核酸检测

核酸检测方法目前仍处于试验阶段,无商品化的核酸试剂盒。

附 录 C
(资料性)
感染性腹泻的鉴别诊断

C.1 霍乱

由产霍乱肠毒素的O1或(和)O139血清群霍乱弧菌(产毒株)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,少数病例有洗肉水样便。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,应进一步做细菌培养,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。伤寒主要以持续性高热、玫瑰疹、相对缓脉、肝脾肿大及表情淡漠和白细胞减少等为特征。副伤寒甲、乙型起病常有腹痛、腹泻、呕吐等急性胃肠炎症状,2d~3d后减轻,接着体温升高,出现伤寒样症状;副伤寒丙型可表现为脓毒血症型、伤寒型或急性胃肠炎型,以脓毒血症型多见。血肥达氏反应阳性有伤寒辅助诊断意义;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 阿米巴性痢疾

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和(或)包囊。

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。