

空肠弯曲菌、结肠弯曲菌检验方法团体标准解读

张茂俊¹ 顾一心¹ 李颖² 鞠长燕³ 周贵兰¹ 郭云昌⁴ 遇晓杰⁵ 段永祥³ 张建中¹
¹中国疾病预防控制中心传染病预防控制所,北京 102206; ²北京市顺义区疾病预防控制中心 101300; ³深圳市南山区疾病预防控制中心 518052; ⁴国家食品安全风险评估中心,北京 100022; ⁵黑龙江省疾病预防控制中心,哈尔滨 150030
通信作者:张茂俊, Email: zhangmaojun@icdc.cn

【摘要】 空肠弯曲菌和结肠弯曲菌是重要的食源性病原菌,是导致人类弯曲菌病的重要菌种。病原菌的培养、鉴定是食品污染以及人和动物感染诊断的“金标准”。中国 CDC 传染病预防控制所和国家食品安全风险评估中心等单位撰写了《空肠弯曲菌、结肠弯曲菌检验方法(T/CPMA 006—2019)》团体标准。标准以“科学性、规范性、适用性和可行性”为基本原则,提出从不同种类的标本、样品中空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的分离培养以及鉴定的方法,用于指导和规范我国不同种类的标本以及样本中两种弯曲菌的检测过程、检测步骤和鉴定方法,提高空肠弯曲菌、结肠弯曲菌的检测水平。

【关键词】 空肠弯曲菌; 结肠弯曲菌; 分离; 鉴定

基金项目 深圳市“医疗卫生三名工程”引进高层次医学团队项目(SZSM201803081); 国家重点基础研究发展计划(2013CB127204)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2019.09.006

Interpretation for the group standards of the Isolation and Identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*

Zhang Maojun¹, Gu Yixin¹, Li Ying², Ju Changyan³, Zhou Guilan¹, Guo Yunchang⁴, Yu Xiaojie⁵, Duan Yongxiang³, Zhang Jianzhong¹

¹National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China; ²Shunyi District Center for Disease Control and Prevention, Beijing 101300, China; ³Nanshan Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518052, China; ⁴China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100022, China; ⁵Heilongjiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Haerbin 150030, China

Corresponding author: Zhang Maojun, Email: zhangmaojun@icdc.cn

【Abstract】 Foodborne *Campylobacter* is recognized as the leading causes of the bacterial diarrheal illness in both developing and developed countries. *C. jejuni* and *C. coli* caused 95% of the human campylobacteriosis. Bacteria culture has been recognized as the “Gold standard” for the diagnosis of the *Campylobacter* infection. The National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention coordinated the experienced researchers from China National Center for Food Safety Risk Assessment and other local Centers for Disease Control and Prevention to write up the standards for entitled Isolation and Identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* (T/CPMA 006—2019). The standard is drafted with principles of emphasizing the scientific, normative, applicability and feasible nature. This group standard recommended the procedures and steps for the isolation and identification of *C. jejuni* and *C. coli* from variant samples. The standard aims to improve the capacity for *Campylobacter* identification in China.

【Key words】 *Campylobacter jejuni*; *Campylobacter coli*; Isolation; Identification

Fund programs: Sanming Project of Medicine in Shenzhen (SZSM201803081); Major State Basic Research Development Program (2013CB127204)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2019.09.006

弯曲菌感染导致的疾病称为弯曲菌病,属于人类新发传染病之一,空肠弯曲菌和结肠弯曲菌是导致人类弯曲菌病的主要菌种^[1-2]。除肠炎外,空肠弯曲菌的感染可以导致格林-巴利综合征

(Guillain-Barré syndrome, GBS)^[3]。GBS 是一种自身免疫导致急性神经肌肉瘫痪,残疾率 7%~15%,死亡率 3%~10%,目前没有特效药物,疾病负担严重,美国将可导致 GBS 空肠弯曲菌列为生物恐怖病

原之一,防控空肠弯曲菌的感染可有效降低GBS的发生^[4]。

2007年我国吉林省长春市发生了36人GBS的暴发,后期的调查研究证实空肠弯曲菌前期的感染是此次GBS暴发的主要病因^[5];2011年美国-墨西哥交界处发生弯曲菌感染导致26人GBS暴发^[6];2019年秘鲁发生大规模的空肠弯曲菌感染导致GBS的暴发(目前调查仍在进行中)。这种感染后导致严重临床后果聚集性疫情暴发增加了我国乃至世界对于这种突发公共卫生事件和食品安全工作的压力。

病原菌的分离培养是诊断感染以及食品污染风险评估的金标准。由于弯曲菌体外培养条件苛刻,加上近年来由于我国不同种类标本中其他细菌抗药性的增加,现行国标《GB 4789.9—2014食品安全国家标准食品微生物学检验空肠弯曲菌检验》以及我国卫生行业标准《感染性腹泻诊断标准(WS 271—2007)》中关于弯曲菌的检测方法以及WHO、ISO等推荐的基于应用选择性培养基检测弯曲菌的方法,已经不能准确反映我国食品中弯曲菌的污染以及腹泻患者中空、结肠弯曲菌的感染现状。

为进一步提高我国不同种类标本及样本中空、结肠弯曲菌检出效率,由中国CDC传染病预防控制所、国家食品安全风险评估中心、黑龙江省CDC、北京市顺义区CDC、深圳市南山区CDC共同完成《空肠弯曲菌、结肠弯曲菌检验方法(T/CPMA 006—2019)》的撰写及评估工作^[7]。

一、起草背景

弯曲菌体外培养条件苛刻,加上近年来由于我国不同种类标本中其他细菌抗药性的增加,现行检测方法已经不能准确反映我国食品中弯曲菌的污染现状以及腹泻患者中空、结肠弯曲菌的感染现状。应用传统的选择性培养基的方法,前期研究报导我国大样本量的腹泻患者筛查的报告中,空肠弯曲菌在经济不发达的地区儿童腹泻患者检出率<0.13%,经济发达地区成年人及儿童腹泻患者空、结肠弯曲菌的检出率为零,我国>65岁腹泻患者空肠弯曲菌的检出率为0.5%,均提示我国弯曲菌的疾病负担被极大低估。从我国现状出发,建立有效的空、结肠弯曲菌实验室检测技术,对于我国弯曲菌感染的疾病负担的评估、相关干预策略的制定以及高致病性空肠弯曲菌传播的防控都具有重要意义。

本团体标准的检验方法基于细菌动力特征的过滤法,与通用的选择性培养技术相结合,优化了空、结肠弯曲菌的过滤培养及分子鉴定技术。应用本技

术进行我国腹泻患者弯曲菌感染的检测和监测以及禽肉食品中空、结肠弯曲菌的检测,目前成年人腹泻患者弯曲菌的检出率达到7%~15%,市场零售禽肉标本的检出率为30%~80%,禽类泄殖腔粪便标本检出率80%~100%。

二、前期工作基础

中国CDC传染病预防控制所自20世纪90年代开始进行弯曲菌病原学及空肠弯曲菌感染导致GBS的致病机制研究。目前承担我国弯曲菌感染的预防和控制工作以及弯曲菌感染的相关病原学检测、监测的技术支持。在本团体标准方法制定过程中,负责检测方法的标准化的建立以及技术参数修正、标准的撰写工作。本研究团队分别于2016、2017年通过2次国家级继续教育项目,以培训班的形式,针对对本方法进行全国范围的推广、应用,目前已经取得良好效果。

国家食品安全评估中心承担着“从农田到餐桌”全过程食品安全风险管理的技术支撑任务,在标准制定的过程中负责标准的食品样本检测的相关技术参数参数的完善及方法的实施、验证。黑龙江省CDC在标准制定的过程中负责标准的技术方法参数的修改及方法的实施、确定,同时作为标准的使用者,完成标准方法的比对和验证报告。

北京市顺义区CDC在标准方法完善的过程中进行新方法为期2年的食源性腹泻患者粪便标本及禽肉食品中弯曲菌的检测验证:2017年全年和2018年1—10月腹泻病例粪便中空、结肠弯曲菌分离率分别为10.48%和9.23%。并于2018年6月利用该技术成功在国内首次识别一起由结肠弯曲菌和空肠弯曲菌混合感染造成的食源性弯曲菌病暴发时间。2018年顺义区CDC利用该方法完成鸡胴体空、结肠弯曲菌检测,检出率达到75.00%,也成为2016年北京市唯一从腹泻病例中成功分离到弯曲菌的单位^[8-10]。

深圳市南山区CDC在标准建立的过程中负责完成动物粪便样本、食品样本及腹泻患者粪便样本食物链条上进行弯曲菌过程检测、监测方法的验证和报告。应用本团体标准方法,在针对腹泻患者粪便标本的检测中,检出率由5.0%提高到10.3%,禽肉样本检出率由1.7%提高到36.5%;直接过滤法,禽类肛拭子由4%提高到27%。

三、编制原则

本标准遵循“科学性、规范性、适用性和可行性”的原则,根据国家相关的法律、法规和法规性文件、行业标准以及规范的要求,结合团队的前期研究成

果和推广使用效果进行编制。

本标准的制定符合中国国情,旨在满足国内弯曲菌检测、监测及相关研究单位的需求,促进我国弯曲菌的检测和研究能力。

四、团体标准的内容

本团体标准规定了空肠弯曲菌、结肠弯曲菌检验方法的适用范围,使用设备和材料,培养基和试剂以及检测程序、检测步骤、结果报告和生物安全注意事项等内容。其中主要的检测程序包括以下几个方面:

1. 标本及样品采集、运输及前期处理:包括腹泻患者或者健康者粪便标本、家禽、家畜及其泄殖腔中粪便标本、整禽胴体及分割肉样品、蔬菜、水果等样品和水样品等。

2. 细菌培养:包括培养条件、粪便标本增菌培养、禽肉、蔬菜、水果等样品漂洗液增菌培养、水样品富集液增菌培养、过滤培养等内容。

3. 菌种鉴定:包括菌落形态及革兰染色鉴定、生化试验鉴定、核酸检测鉴定等内容。

五、团体标准使用注意事项

标本的质量对于细菌分离培养的结果具有重要的影响,因此不同标本或者样品的采集、运输和保存是高质量完成检验的保证。前期研究发现,在腹泻患者及食品中存在空、结肠弯曲菌混合感染(污染)的现状。由于空、结肠弯曲菌的表型特征非常相似,生化反应也仅依据空肠弯曲菌表达马尿酸水解酶而结肠弯曲菌不表达来鉴别,但是极少数的空肠弯曲菌存在不表达或者由于生长条件不好而表达很少,导致马尿酸水解试验生化反应结果不显著。因此通过PCR或者其他核酸检测鉴定技术对于两个菌种的鉴定非常重要。中国CDC传染病预防控制所与顺义区CDC联合研究发现:190例腹泻患者空、结肠弯曲菌的分离培养检出率为12.1%,其中空肠弯曲菌的检出率为10.5%,结肠弯曲菌的检出率为1.6%。应用多重荧光PCR的方法针对粪便标本的核酸的检出率为16.3%,其中空肠弯曲菌为11.1%(与分离培养方法相比,没有显著差异),结肠弯曲菌的检出率为4.2%,虽然多重PCR检测的只是标本的核酸而不是活的细菌,但是应用分离培养的方法,如果只挑取3~5个疑似菌落,可能造成结肠弯曲菌感染低估的现象^[11]。

六、展望

通过本团体标准的检验方法,2018年6月顺义区CDC首次识别由于结肠弯曲菌感染导致的急性胃肠炎的暴发事件,2018年4月北京市CDC也识别

一起由于空肠弯曲菌感染导致的旅行者腹泻的暴发^[12]。本团体标准检验方法将提高我国空、结肠弯曲菌的识别能力,从而增强相关食源性疾病的预防控制和基础研究能力。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Kaakousha NO, Castañorodríguez N, Mitchell HM, et al. Global epidemiology of *Campylobacter* infection. [J]. Clin Microbiol Rev, 2015, 28 (3): 687-720. DOI: 10.1128/CMR.00006-15.
- [2] Coker AO, Isokpehi RD, Thomas BN, et al. Human *Campylobacteriosis* in Developing Countries. [J]. Emerging Infect Dis, 2002, 8(3): 237-244. DOI: 10.3201/eid0803.010233.
- [3] 张茂俊, 张建中. 空肠弯曲菌病与格林-巴利综合征[J]. 中华流行病学杂志, 2008, 29(6): 618-621. DOI: 10.3321/j.issn:0254-6450.2008.06.025.
- [4] Zhang MJ, Zhang JZ. *Campylobacteriosis* and Guillain Barre syndrome [J]. Chin J Epidemiol, 2008, 29(6): 618-621. DOI: 10.3321/j.issn:0254-6450.2008.06.025.
- [5] Baker MG, Kvalsvig A, Zhang J, et al. Declining Guillain-Barré syndrome after *Campylobacteriosis* control, New Zealand, 1988-2010 [J]. Emerging Infect Dis, 2012, 18(2): 226. DOI: 10.3201/eid1802.111126.
- [6] Zhang M, Li Q, He L, et al. Association study between an outbreak of Guillain-Barre syndrome in Jilin, China, and preceding *Campylobacter jejuni* infection [J]. Foodborne Pathogens & Disease, 2010, 7(7): 913-919. DOI: 10.1089/fpd.2009.0493.
- [7] Jackson BR, Zegarra JA, Lópezgatell H, et al. Binational outbreak of Guillain-Barre syndrome associated with *Campylobacter jejuni* infection, Mexico and USA, 2011 [J]. Epidemiology & Infection, 2014, 142(5): 1089-1099. DOI: 10.1017/S0950268813001908.
- [8] 中华预防医学会. 空肠弯曲菌、结肠弯曲菌检验方法(T/CPMA 006-2019) [J]. 中华流行病学杂志, 2019, 40(9): 1044-1047. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2019.09.004.
- [9] Chinese Preventive Medicine Association. Identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* (T/CPMA 006-2019) [J]. Chin J Epidemiol, 2019, 40(9): 1044-1047. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2019.09.004.
- [10] Ying L, Shuang Z, Mu H, et al. Prevalence and Molecular Characterization of *Campylobacter* spp. Isolated from Patients with Diarrhea in Shunyi, Beijing [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 52. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00052.
- [11] 李颖, 张爽, 王彦波, 等. 2014—2017年北京市顺义区腹泻病例中沙门菌流行特征与分子分型特征分析 [J]. 疾病监测, 2018, 33(10): 803-808. DOI: 10.3784/j.issn.1003-9961.2018.10.004.
- [12] Li Y, Zhang S, Wang YB, et al. Epidemiological and molecular characteristics of *Salmonella* in patients with diarrhea in Shunyi district of Beijing, 2014-2017 [J]. Dis Surv, 2018, 33(10): 803-808. DOI: 10.3784/j.issn.1003-9961.2018.10.004.
- [13] 李颖, 梁昊, 王苗, 等. 北京市顺义区零售鸡胴体中弯曲菌分布与分子特征研究 [J]. 中国食品卫生杂志, 2019, 31(4): 345-349. 待发表.
- [14] Li Y, Liang H, Wang M, et al. Distribution and molecular characteristics of *Campylobacter* in retail chicken carcass in Shunyi District, Beijing [J]. Chin J Food Hygiene, 2019, 31(4): 345-349. In press.
- [15] Zhang M, Liang H, Wen Z, et al. Comparison of the filtration culture and multiple real-time PCR examination for *Campylobacter* spp. from stool specimens in diarrheal patients [J]. Frontiers in microbiology, 2018, 9: 2995. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02995.
- [16] 张新, 曲梅, 梁志超, 等. 滤膜驱动分离培养法在一起空肠弯曲菌腹泻疫情中的应用 [J]. 中国卫生检验杂志, 2019, 6(29): 1281-1283, 1288.
- [17] Zhang Xin, Qu M, Liang ZC, et al. Application of filter driven selective culture method in diarrhea outbreak caused by *Campylobacter jejuni* detection [J]. Chin J Health Lab Tec, 2019, 29(11): 1281-1283, 1288.

(收稿日期: 2019-08-21)

(本文编辑: 李银鸽)