

霍乱防治手册

(第六版)

卫生部疾控局

年 月

霍乱防治手册（第六版）

编委会

主 编

副 主 编

参编人员 （按姓氏笔画为序）

审稿专家 （按姓氏笔画为序）

主 审

前 言

霍乱发病急、进展快、能够快速大范围传播甚至引起全球流行，在我国以及全球其他国家，不论作为传染病问题、还是在食品和环境安全方面，都属于重点防控的传染病。

我国针对霍乱的防控一直未松懈，从多方面加强应对，包括制定法规、建设防控体系与队伍、发展技术能力等，并充分结合群防群治的力量。霍乱第七次全球大流行始于1961年，并于当年在我国引起流行。为促进我国霍乱防控的技术能力，在1962年开始，卫生部通过组织专业人员、结合实践经验和技术进行关于霍乱防治的技术手册的编写，至今已制订了五版《霍乱防治手册》（不同版曾命名《副霍乱防治手册》和《副霍乱、霍乱防治手册》），用以指导霍乱的预防、控制、治疗，普及防控知识，规范防控技术，提升防控能力，在我国数十年的霍乱防控中发挥了不可替代的作用。

当前霍乱在全球和我国的流行，也不断出现新的形势。当前全球仍处于第七次霍乱大流行中。世界卫生组织统计的年度霍乱报告，在进入二十一世纪仍一直处于高发状态；非洲一些地区已成为持续高发区；霍乱依然在向全球扩散，2010年拉丁美洲的海地在本地霍乱静息一百年后、出现了迄今一个国家范围的最大霍乱暴发，至今仍未停息。在我国，随着我国社会与经济发展、生活和卫生条件改善，霍乱流行在经历几起几落后，现在处于低发态势。近几年主要表现为病例数少而分散；时有聚餐暴发，有时出现持续一月至数月、并涉及多地区多省的暴发流行；与东南亚等国家的邻近地区有输入疫情。当前面临的问题是，出现疫情的社会关注度明显提高；暴发流行因素依然存在，并且复杂；仍有长时间的流行，难以溯源、并在不同局部地区衍生出多种和多方面感染因素，包括自由市场和街头摊点等，需全社会参与才能有效防控；腹泻病中较少比例的就诊、往往造成出

现病例后难以及早发现，等等。因此，这实际上导致霍乱的监测、预警和控制难度并未减小。

当前我国传染病防控政策、策略、措施以及技术等方面，也在不断发展。1999年第五版《霍乱防治手册》执行以来，我国在传染病控制的管理与处置方面发布了多项新的相关法规、指南，出现霍乱疫情即作为突发公共卫生事件开展应急处置。我国疾病控制和临床救治能力和水平不断提高，有关霍乱的检测和监测技术不断更新，因此有必要对第五版《霍乱防治手册》进行修订，以适应当前的有关疾病控制政策法规以及疾控体系的技术能力和需求。

在卫生部疾病控制局的领导下，第六版《霍乱防治手册》编委会组织在霍乱防控一线的工作人员进行了新版的修订，并经过了专家审阅。修订原则是适应当前传染病控制策略要求、密切配合相关法规、具备明晰的操作性、并更新技术内容，充分体现与时俱进的特点。在内容修订上，主要是将与霍乱控制相关的流行病学、病原学和临床学基础知识、结合近十年的新进展在概述中进行了统一介绍。自第一章起，为防、查、诊、治相关的技术操作内容。在新版的这些章节中，将常规疾病监测与疫情调查处置分开，对疫情流行病学调查程序进行了扩充；结合了相关法规和工作，将霍乱疫情作为突发公共卫生事件、强调了突发事件应对；加入了自然灾害中的霍乱预防、以及边境输入霍乱监测与防控；消毒部分单独列出，按当前新的消毒处置方式进行了更新；实验室检测部分，规范了检测流程，增加了新的常用技术（包括核酸检测、现场快速检测）、删除了不常用和非规范的技术方法，并更新了药敏检测方法；增加了生物安全内容；增加了霍乱弧菌分子分型等新监测技术，以利于溯源分析和尽早发现暴发，促进实验室分析与流行病学调查的结合，为霍乱监测防控提供新的手段；临床治疗中更新了临床药物和部分治疗方案，并扩充了霍乱病人收治中隔离区（室）的设置和工作要求。

本手册的修订，自 2011 年 11 月 23 日启动，至完稿经历了八个月的时间，经过了三次集中编写会议、数次的专家组稿以及八个月期间编写组的组稿修改和专家的审阅，经历了可以说达到激烈程度的技术和学术争论，并达成共识。组稿期间，还得到江苏、山东和云南省卫生厅与省疾病预防控制中心、山东省聊城市疾病预防控制中心对讨论会议的大力支持。另外，组稿人员也积极征求了更多专家的意见。在此，对各相关单位和专家的贡献表示衷心的感谢。现在最终形成了《霍乱防治手册》第六版，本手册希望能为各级疾病预防控制机构包括卫生行政、技术、健康教育等单位、临床单位、医学院校等相关人员提供霍乱防控工作和知识的参考，并诚恳请读者在阅读和使用中提出宝贵的意见，以使手册将来进行得到完善，使我国的霍乱防控策略和技术手段不断得到完善，更好地服务于我国传染病防控的总体工作。

《霍乱防治手册》（第六版）编委会

2012 年 7 月

目 录

概 述

第一章 流行病学、病原学和发病机理

第一节 流行环节

第二节 流行特征和流行影响因素

第三节 病原学

第四节 发病机理与病理学

第二章 预防措施

第一节 组织管理

第二节 霍乱监测

第三节 经常性预防措施

第四节 重大自然灾害中灾区的霍乱预防

第五节 边境地区霍乱的监测与防控

第三章 疫情调查处置

第一节 流行病学调查

第二节 控制措施

第三节 消毒处置

第四节 防制效果评价与疫点、疫区解除

第四章 实验室检测分析

第一节 实验室工作体系和检测报告程序

第二节 实验室检测

第三节 用于疫情调查分析的菌株分型

第四节 耐药性检测

第五节 实验室生物安全

第五章 诊断与治疗

第一节 临床表现

第二节 诊断及鉴别诊断

第三节 治疗

第四节 隔离区室的卫生与消毒

附表

附件

概 述

霍乱 (Cholera) 是由 O1 血清群或 O139 血清群霍乱弧菌引起的急性肠道传染病, 典型病例以剧烈水样腹泻为主要症状, 可在短时间内导致脱水、电解质平衡失调、代谢性酸中毒, 严重者可迅速发展为循环衰竭, 并导致死亡。但轻型病例较为多见, 并存在带菌者。该病以发病急、传播快、波及范围广、能引起大范围乃至世界性的大流行特征。历史记载, 自 1816 年以来已发生七次霍乱全球大流行, 世界卫生组织 (WHO) 认为当前仍处在第七次全球大流行中, 此次流行历时最长 (已 52 年), 但迄今仍未停息。霍乱是《中华人民共和国传染病防治法》规定的甲类传染病, 我国《国境卫生检疫法》(2007 年主席令第 83 号令) 及《国内交通卫生检疫条例》(1998 年国务院第 254 号令) 也将霍乱列为检疫传染病之一。

(一) 病原体

霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 是弧菌科 (Vibrionaceae) 弧菌属 (*Vibrio*) 中一组具有相似生化性状、相同鞭毛抗原、不同菌体抗原的弧菌的统称。按照菌体脂多糖抗原的不同, 已分出 210 余个血清群。在这些霍乱弧菌中, 仅 O1 群和 O139 群霍乱弧菌产毒株会导致霍乱流行, 而 O1 和 O139 群的非产毒株以及其他血清群霍乱弧菌只引起偶然的散发病例或导致很小规模的暴发。

1883 年, 德国人科赫 (Robert Koch) 首次分离出霍乱弧菌; 1892 年, 国际卫生会议将霍乱纳入国际卫生检疫疾病。其后, 病原学研究证明第六次霍乱世界大流行由 O1 群霍乱弧菌古典生物型 (Classical biotype) 引起; 而目前的第七次大流行 (始于 1961 年) 的病原菌则为 O1 群的埃尔托生物型 (El Tor biotype, 以前将该菌引起的霍乱称为“副霍乱”)。1992 年 10 月, 印度出现 O139 群产毒菌株引起的霍乱暴发, 目前该血清群导致的霍乱问题还局限在东南亚部分国家。

0139 群霍乱弧菌产生与霍乱弧菌相同的毒素，其感染导致的致病机制与 01 群相同，因此属于霍乱的报告和处理范畴。

（二）霍乱感染与治疗

霍乱弧菌经口感染，通过胃酸屏障后到达小肠，粘附于小肠黏膜表面，在肠腔的碱性环境中迅速繁殖，并产生霍乱毒素；毒素作用于小肠黏膜，引起肠液的大量分泌，导致腹泻、脱水，严重者引发循环衰竭及代谢性酸中毒等。如抢救不及时或治疗不得当，可于发病后数小时至数十小时内死亡。临床上可按病人的脱水与循环衰竭程度将其区分为轻、中、重三型。治疗中、重型病例的主要措施是及时、足量地补充水分和电解质。轻型病例使用口服补液盐治疗可获得良好效果。使用敏感的抗生素，可达到减少腹泻量、缩短排菌期及降低病后带菌率等疗效。

（三）霍乱的流行

霍乱弧菌属于河口水体的自然菌群，当产毒霍乱弧菌在自然水体中大量增殖、并且经水和食物（如污染的海产品）进入人群，则导致疾病的发生和流行。霍乱的传染源是病人和带菌者。通过被霍乱弧菌污染的食物和水，或者与病例密切接触而引起个体感染，病人和带菌者的粪便再次污染水和食物，是霍乱疫情在人群中持续存在和扩大的重要危险因素。霍乱流行地区多位于沿海，但内陆地区也能发生，尤其在卫生条件差的人群中。流行高峰多见于高温高湿季节。可通过病人、带菌者的活动以及水产品贸易等造成远程传播。自然因素可影响霍乱流行过程，霍乱的流行与地区的卫生条件、生活习惯等社会因素也密切相关。

人类是霍乱弧菌已知且唯一的自然宿主。人群对霍乱普遍易感，病后虽可产生比较稳固的免疫力，但仍然存在再次感染的可能性。并且 01 群和 0139 群霍乱弧菌感染的交叉免疫保护并不完全。

在七次世界大流行中，霍乱的传播均源于东南亚。印度恒河三角洲已是霍乱的地方性流行区。十九世纪初，由于交通日益发达，加之通商、朝圣和战争等因

素，霍乱开始从东南亚向世界各地传播。数次霍乱大流行中，均记载有数十万至数百万人的死亡，扩散流行涉及北欧。目前的第七次大流行起于 1961 年，六十年代报告病例几乎均在亚洲，七十年代非洲报告了更多的病例，九十年代传播到南美洲，引起持续数年的流行。目前，非洲霍乱情况最为严重，欧洲、大洋洲和北美洲发达国家以输入性病例为主。中美洲一些国家有时出现严重的暴发流行。海地自 2010 年 10 月发现霍乱暴发以来，至 2012 年 6 月 16 日，已累计报告病例 551,534 例，累计住院 301,135 例，累计死亡 7,294 例，2012 年 6 月 10 日~16 日一周仍新增病例 2,908 例，成为目前全球最严重的霍乱暴发疫情。2000 年以来，WHO 每年接到的霍乱病例报告全球合计数均超过 10 万例。2010 年，48 个国家报告 317,534 例，死亡 7,543 例，病死率 2.38%。但需要指出的是这些数字明显偏低，因很难监测到某些国家或地区的实际发病数。WHO 在 2010 年一份关于霍乱疫苗立场的文件中指出，估计全球霍乱发病数高达每年 300 万~500 万例，并有 10 万~13 万人因此而死亡。

霍乱于 1820 年、在第一次大流行期间即传入我国，其后历次大流行，我国均遭侵袭。第七次世界大流行开始后，1961 年 6、7 月间，我国广东省阳江县最先发现霍乱病例。截至 2010 年，全国累计报告霍乱病例 30 多万例。大致在 1961~1964 年间、1977~1989 年间、1993~2001 年间，我国出现了三次全国范围、跨多年度的霍乱流行。2001 年后，霍乱疫情较为平稳，除 2005 年在多省出现一波分子分型相同或几乎一致的 O1 群埃尔托型霍乱弧菌导致的流行外，其余年份多以散发和聚餐暴发为主，偶然有个别地区的局限性暴发，年报告病例多在数十例至三百例以内，病死罕见。1992 年东南亚出现 O139 群霍乱弧菌导致的霍乱暴发以来，1993 年 5 月，我国新疆柯坪县首先报告 O139 霍乱暴发，期后多地也相继发现 O139 群霍乱病例。至目前全国有二十多个省（直辖市/自治区）报告过 O139

霍乱病例，但疫情主要表现为散发以及聚餐导致的局限暴发，尚未造成广泛的流行。

（四）预防控制

在发生霍乱时，控制霍乱传播的主要措施包括：尽早发现病例、隔离救治、改善饮水饮食卫生和生活环境卫生、以及动员社会广泛参与等，应遵循“早、小、严、实”的原则。如发生长时间大范围流行，或发生自然灾害，或举办大型集会，而公共卫生条件短时间难以彻底改善，或难以保证必要的卫生要求时，可考虑人群接种霍乱疫苗作为辅助性措施。目前，已有口服霍乱疫苗在一些国家获得使用许可，主要针对 O1 群，能提供短期的保护。针对 O139 群的疫苗、以及不加保护性毒素 B 亚单位的全菌疫苗预防效果正在评价。

中国的霍乱流行曾经历了一个高发病率和高病死率的广泛流行阶段。我国的卫生防疫工作者根据霍乱的流行病学特点和多年的防治经验，总结出霍乱疫点的处置的“早、小、严、实”的原则，即“时间要早、范围要小、措施要严、落到实处”，针对霍乱应强调综合防控，实行“政府主导、部门配合、社会参与、依法实施”的综合防控策略和指导思想。经过近五十年的努力，同时随着经济发展、人民生活水平提高以及医疗卫生服务改善，我国目前霍乱疫情基本控制在较低的水平。从长远来看，保障食品安全和饮水卫生、提高人群卫生意识和改善生活卫生条件等，是预防和控制霍乱的关键。

第一章 流行病学、病原学和发病机理

第一节 流行环节

一、传染源

霍乱病人和带菌者是传染源。人感染霍乱弧菌后的主要症状为腹泻，但严重程度不一，受感染者中轻症的多、重症的少，严重脱水的典型病人仅占感染者的一小部分。

（一）病人

急性期病人的排泄物中含有大量霍乱弧菌，中、重型病人由于频繁的腹泻和呕吐，极易污染周围环境，因而是重要的传染源。但轻型病人由于不及时就诊，且临床上易误诊和漏诊，不易被发现，而这些轻型病人不仅可排菌，且可自由活动，广为传播，其流行病学意义更大。

（二）带菌者

指检测时无临床表现但能从粪便或肛拭子中检出霍乱弧菌的人。在公共卫生方面，可分为潜伏期带菌者、病后带菌者（分恢复期带菌和慢性带菌）和健康带菌者等多种类型。

1. 潜伏期带菌者：霍乱的潜伏期较短，一般为数小时至 5 天左右。多数为 1~2 天。病人在潜伏期末常能从粪便中查出霍乱弧菌，有时在腹泻出现前数日即能查出。

2. 病后带菌者：病人在临床症状消失后的 3 个月内带菌的，被视为恢复期带菌者；病后排菌超过 3 个月者，称为慢性带菌者。恢复期带菌的时间一般不超过 1 周。据统计，未经抗菌药物治疗的患者，病后 1 周内停止排菌者约占 80%，2 周内约占 90%，3 周内达 95% 以上，持续 4 周以上者很少。慢性带菌时间可持续

数月数年。国内曾有多起病后带菌达 400 天以上的慢性带菌者的报道，国外报道慢性带菌最长者达 10 年。这种带菌通常是胆囊或胆道带菌所致。

3. 健康带菌者：指粪便中虽排出霍乱弧菌而始终没有临床表现者。这种带菌者的排菌时间一般不超过 7 天。在霍乱的感染者中，常有 60%~80% 始终无临床症状表现，并以健康带菌者的形式出现。

二、传播途径

霍乱是经粪-口感染的肠道传染病。主要经水、食物及生活密切接触传播。

（一）经水传播

对于缺乏安全饮用水的地区，经水传播常是最主要的传播途径。历次较广泛的霍乱流行或暴发多与水体被污染有关。

霍乱弧菌主要存在于河口水体，依附于浮游生物生存，并且也属于这些环境的自然菌群，致使水体成为霍乱弧菌的重要贮存场所。当产毒霍乱弧菌在自然水体中大量增殖、并且经水和食物（如污染的海产品）进入人群，则导致疾病的发生和流行。在内陆地区，病人粪便污染水体如池塘、湖泊、井水等，也会在这些水体中检出霍乱弧菌并成为感染来源。病人和带菌者的粪便再次污染水和食物，是霍乱疫情在人群中持续存在和扩大的重要因素。在霍乱流行期间，在病人附近的水体中常可查到与病人菌型一致的霍乱弧菌。霍乱弧菌在水中存活时间较长，一次污染后有可能使水体较长时间保持传播能力。水栖动物被污染后，霍乱弧菌有可能在其体内存活较长的时间并继续污染水体。

经水传播的特点是常呈现暴发、流行，病人多沿被污染的水体分布。

（二）经食物传播

受霍乱弧菌污染的食物在霍乱传播中的作用一般次于经水传播；但在已有安全饮用水的地区，因饮食卫生等问题可造成食物受霍乱弧菌污染，进而导致霍乱的食物性传播甚至暴发。食物在生产、运输、加工、贮存和销售中都有可能被霍

乱弧菌污染。食物污染的来源可以是因病人或带菌者的直接污染，也可以是因为受污染的饮用水、水产品等在食品加工过程中因操作不当造成污染。在受污染的食物中，霍乱弧菌可存活数小时到数天，甚至 1~2 周，条件适宜时还可大量繁殖。另外，有资料显示苍蝇也可因叮食患者呕吐物、粪便等污染物造成机械带菌，并继而污染到食物上，在传播中起到机械传播的作用，也是造成疫源扩散的一种方式。而随交通和贸易的发展，受污染的食物运销外地时还可引起远程传播。

经食物传播与制作、烹调及食用的方法有很大关系，沿海地区因生食、半生食、盐腌生食等食用方法不当而受染者较多，而在内陆地区，以食品加工环节中的生熟不分造成食品污染多见。经食物、尤其是海水产品类（如甲壳类、贝壳类等）造成霍乱传播是近年来我国霍乱发病的主要危险因素；举办婚丧酒宴或其他聚餐而引起的食物型暴发是近年国内部分地区霍乱流行的主要形式之一，应予高度重视。

霍乱在局部地区暴发流行时，原始污染食品进入人群并引起感染和暴发，继而可能由病人排菌导致水体污染等、以及经污染水体再次污染本地食物，经加工销售等环节，从而导致疫情扩散。当原始污染食品已耗尽、或多数病例已由本地污染食品和水所导致时，流行病学调查可能难以追溯原始污染食品，因此，在一些重点地区开展水产品及水体污染状况的持续监测工作，对分析疫情源头和评估疫情发展至关重要。

（三）经生活接触传播

因接触了霍乱病人、带菌者的粪便或呕吐物以及接触其他一些被霍乱弧菌污染的物品而造成大范围传播的事件较为少见，这种传播主要是因为经手-口途径造成个别人员的感染。接触传播多在人员密集、卫生条件差的情况下发生，并可在小范围内引起续发感染。

三、人群易感性

无论种族、年龄和性别，人群对霍乱弧菌普遍易感。但受胃酸及免疫能力等个体因素影响，感染后并非人人都发病。人体感染霍乱弧菌后可在肠道局部产生分泌性抗体 IgA，在血清中产生凝集素、杀弧菌抗体（抗菌免疫）和抗毒抗体（抗毒免疫）。该肠道局部免疫和体液免疫的联合作用，可使病后获得良好的免疫保护，但并不排除少数人病后再次感染的可能性。

第二节 流行特征和流行影响因素

一、霍乱的流行特征

（一）地区分布

发生霍乱疫情的地区分布一般多以沿海为主，特别是江河入海口附近的江河两岸及水网地带，也可传入内陆、高原和山地，甚至沙漠地区，主要是在一些经济水平差和卫生条件欠缺的地区，一旦有霍乱弧菌引入，均会造成疫情扩散。霍乱的地方性流行与霍乱弧菌的自然生态、地方的社会因素、人群的生活习性等密切相关。一般说来沿海沿江地区的发病率高于平原，平原高于半山区和山区，盐碱地区高于非盐碱地区。随着交通、经济贸易活动、人员流动等，会造成霍乱疫情的快速异地播散。

（二）季节分布

霍乱在各地的流行季节与当地的自然地理条件（如纬度、气温、雨量等）密切相关。我国绝大多数地区的发病季节一般在 5~11 月，流行高峰多在 7~10 月。在我国华南等热带和亚热带地区，霍乱的季节特征不明显，全年均可出现散发、

暴发或流行。由于地区经济不发达、卫生保障不足、生活习惯易致腹泻病流行的地区，有时会在寒冷季节也出现霍乱疫情。

（三）人群分布

由于人群对霍乱普遍易感，霍乱发病的人群分布常因受威胁人群的年龄、职业和生活习性而变化。

1. 年龄分布：各年龄组普遍易感，但因免疫水平和感染机会不同，不同年龄组的发病率有所差异。

2. 性别分布：一般男女发病率无本质差异，但有时因活动范围和感染机会等不同而有所不同。

3. 职业分布：不同职业发病率有一定差别，如渔民、船民、农民等发病较多。近年来流动人口作为一个特定群体，已成为某些地区中的主要发病人群，这与他们的经济水平、居住条件、卫生条件和卫生习惯等有关。

（四）流行形式

霍乱的流行形式主要有散发、暴发、流行等多种形式，目前我国以散发和暴发多见。散发多由偶然因素引起，并且因污染有限，没有引起扩散。暴发是在一个局部地区，短期内发生大量病人，在流行病学上指要具有共同暴露因素等流行病学联系的多个病例。暴发常呈是水型或食物型，包括聚餐所引起。长时间大范围流行，则主要发生在经济水平低、卫生条件差的地区，控制能力不足，导致持续数月甚至数年流行。有时观察到少数病人散在发生，多呈一户一例或一村一例或数例，而相互间往往不易找出明显联系，一方面可能是疫情的真实情况，但必须考虑还有病人或带菌者未被发现，或只报告病原学诊断病例，掩盖了真正的流行严重程度，这将导致难以快速控制疫情。一般新疫区以暴发多见，老疫区以散发多见。这些不同的流行形式，也与不同类型的病原体有关。古典型霍乱弧菌、埃尔托型霍乱弧菌的产毒株常引起暴发和地方性流行，而埃尔托型霍乱弧菌的非

产毒株却只引起散发病例。从现有资料分析，0139 群霍乱弧菌既可引起暴发，也多有散发，其特点似与埃尔托霍乱基本一致，但目前我国观察到的 0139 群霍乱弧菌导致的疫情主要表现为散发、或因聚餐导致的暴发。当然，霍乱的流行形式还与所采取之防治措施密切相关。

霍乱自流行区向外扩散，有短程传播和远程传播两种方式。短程传播表现为流行区或疫点的逐渐扩大，主要是通过环境的污染（尤其是水体与食物污染）以及病人与带菌者的活动而实现。远程传播时，霍乱从一地传到另一地或从一国传到另一国，主要是通过轻型病人、带菌者和在某些情况下通过食品的转移而实现。现代人流物流的日益发展也为此类传播创造了有利条件。同时，有研究认为沿海洋流的运动以及海水产品贸易等因素也可造成远程传播。

二、霍乱流行的影响因素

影响霍乱流行的因素包括自然因素和社会因素两大类，其中社会因素的作用更为重要。对这些因素的研究是评估霍乱发病趋势的重要指标。

（一）自然因素

自然因素又可分为生物学因素和环境因素两类。

1. 生物学因素：主要取决于霍乱弧菌的生物学特性以及生态学等因素，例如霍乱弧菌的菌型、产毒性、自然生态等。从我国几次全国性流行的情况可见，每一个流行阶段均有一个相对独特的菌型引起，但不同阶段菌型的差异仍有待进一步探讨。

2. 环境因素：主要包括气候、地理以及自然灾害等要素。某些异常的自然现象或灾害，如洪涝水灾、海啸等，容易造成疫情扩散与蔓延；而在旱灾、地震等灾害时，水体或食物一旦被污染也易引起暴发或流行。

近年来，一些针对环境因素对霍乱传播的影响研究认为：霍乱发病集中在温暖的夏秋季，流行强度随季节波动明显，霍乱流行与自然水体水温升高和浮游动

物大量繁殖密切相关。气候、环境因素直接或间接影响霍乱流行的范围和强度，高温、降雨等气候可能对霍乱的传播产生驱动效应。在地方性流行地区建立的描述霍乱流行动力学数学模型显示气候因素和人群的霍乱免疫水平是影响霍乱流行的两个重要因素，并且两者之间相互影响。一些研究还提出环境因素对霍乱弧菌毒力基因的水平转移和产毒株的形成可能具有促进作用。

（二）社会因素

社会因素主要包括社会的安定和谐、群众的经济收入、生活质量、医疗保障水平、公共卫生状况、人口流动以及社会习俗等要素。医疗水平和医疗服务的可及性往往决定着霍乱患者是否得到及时救治。公共卫生设施、安全饮用水和食品安全措施等公共卫生服务以及人口流动、公众自我保健意识、风俗习惯等均可直接或间接地影响霍乱的流行强度。

社会因素往往在霍乱的流行与控制中发挥着推波助澜的作用。公众生活水平低下，社会环境恶劣，往往会增加霍乱流行的风险。在生活贫困、卫生状态差的地区，由于公共卫生设施匮乏，医疗保健水平低，病人粪便污染水体，会造成疫情扩散、流行加重和长期存在。相反，社会生活水平的提高，公共卫生服务的普及则为霍乱的防治和限制流行提供良好的基础。因此，提供适宜的医疗服务、采用行为干预措施、改善饮水卫生和生活卫生设施、动员社区参与等被认为是最为重要的霍乱防治措施。

第三节 病原学

一、弧菌与霍乱弧菌

霍乱弧菌属于弧菌科弧菌属。2005年5月发布的《伯杰氏系统细菌学手册》

中，弧菌科 (*Vibrionaceae*) 包括弧菌属 (*Vibrio*)、盐弧菌属 (*Salinivibrio*) 和发光杆菌属 (*Photobacterium*) 三个属共 51 个种，此后一些种又被归入一个新的属 *Aliivibrio*。至 2006 年，已报道弧菌科细菌超过 80 个不同的种，有 24 个种可致动植物疾病。弧菌属中与人致病相关或者从人的临床标本中分离到过的种包括霍乱弧菌、副溶血弧菌 (*V. parahaemolyticus*)、河弧菌 (*V. fluvialis*)、拟态弧菌 (*V. mimicus*)、麦氏弧菌 (*V. metschnikovii*)、霍利斯弧菌 (*V. hollisae*)、溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*)、弗尼斯弧菌 (*V. furnissii*)、创伤弧菌 (*V. vulnificus*)、海鱼弧菌 (*V. damsela*)、辛辛那提弧菌 (*V. cincinnatiensis*) 和鲨鱼弧菌 (*V. carchariae*) 等，从公共卫生上，霍乱弧菌、副溶血弧菌和创伤弧菌是报道感染占优势的人类致病菌，由河弧菌和拟态弧菌所致的感染也时有报告。

目前引起人群霍乱感染并可致暴发和大范围流行的、主要是霍乱弧菌中 01 群和 0139 群的产霍乱毒素的菌株。能从病原学上确认的，已知 01 群古典生物型 (Classical) 和埃尔托生物型 (El Tor) 分别引起了第六次和第七次世界大流行；0139 群产毒株引起的暴发流行目前还局限在亚洲。另外，也陆续报道了一些由 01/0139 群非产毒株、以及非 01/非 0139 群的非产毒株引起的腹泻病例。

二、形态与染色

霍乱弧菌为革兰氏阴性细菌，自病人新分离的 01 群霍乱弧菌，在显微镜下观察为短小稍弯曲的杆状菌，无芽胞，无荚膜，菌体两端钝圆或稍平，一般长 1.5~2.0 μm ，宽 0.3~0.4 μm 。菌体单端有一根鞭毛，常可达菌体长度的 4~5 倍，运动极为活泼，在暗视野显微镜下观察，呈快速穿梭状。0139 群霍乱弧菌的形态及运动与 01 群霍乱弧菌相似，但 0139 群霍乱弧菌在电镜下一般可见菌体周围包绕着一层比较薄的荚膜。

三、基因组

霍乱弧菌是一大类基因组复杂、生化代谢和基因差异较大的菌群，而目前流行的 01 群和 0139 群产毒株，是其中一类特殊的菌群（克隆群），具有霍乱毒素基因和携带毒素基因的溶原性噬菌体 CTX Φ 基因簇，基因组非常相似，进化上呈高度克隆化。不同血清群霍乱弧菌的基因组差异较大，特别是非产毒的 01/0139 群、以及非 01/非 0139 群。霍乱弧菌有两个环状染色体。第一个被测序的菌株是 01 群埃尔托型产毒株 N16961，两个染色体 DNA 大小各分别为 2,961,146bp（染色体 I）和 1,072,314bp（染色体 II），共预测了 3,885 个基因的阅读框，其中染色体 I 上有 2,770 个，染色体 II 上 1,115 个。大部分的霍乱弧菌生存所需基因位于染色体 I 上。

0139 群与 01 群埃尔托型的流行菌株之间，最主要的差异集中在两个区域，第一个是编码 O 抗原的基因，这也是二者之间血清群差异的根本所在。第二个是弧菌毒力岛 VPI-II 中的 20 余个基因的区域，此区域中包含了编码神经氨酸酶的基因。基因组其他部分则非常相似。

四、培养特性

霍乱弧菌的营养要求简单，在普通培养基上生长良好，属兼性厌氧菌，生长温度为 16℃~42℃，培养温度以 37℃ 适宜。钠离子可刺激生长，但在高于 8% NaCl 环境中不生长。可繁殖的酸碱度 (pH) 为 6.0~9.2，适宜的 pH 为 7.2~7.4。因此，用于初分离的选择性培养基和增菌培养基的 pH 选择 8.4~8.6（也有使用 pH 9.2 的培养基），以抑制其他细菌生长。01/0139 群霍乱弧菌是繁殖速度最快的细菌之一，在碱性蛋白胨水（APW）中生长迅速，在培养的最初数小时其生长可超过大肠杆菌，特别是 01 群埃尔托型霍乱弧菌培养 2h~3h 后，有些可在培养液体表面开始形成菌膜。常利用这种生长速度快和好氧性，在培养 6h~8h 后，取液体上层生长物作弧菌分离。

为提高检出率，一般使用选择性培养基进行分离培养。霍乱弧菌的选择性分离培养基有强、弱之分，强选择性的分离培养基主要包括硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖（TCBS）琼脂、庆大霉素琼脂、4号琼脂等；弱选择性分离培养基主要是碱性琼脂、碱性胆盐琼脂。TCBS在全球应用广泛，并为WHO推荐，可同时分离霍乱弧菌、副溶血弧菌；庆大霉素琼脂、4号琼脂则是我国科学工作者研制的用于分离霍乱弧菌的强选择性培养基。

五、生化特性

霍乱弧菌能发酵多种糖类，对葡萄糖、麦芽糖、甘露糖、甘露醇、蔗糖、半乳糖、左旋糖、糊精和可溶性淀粉产酸不产气，迟缓发酵乳糖、不发酵阿拉伯糖、卫茅醇、水杨素、木胶糖、侧金盏花醇和肌醇。

对于来源于粪便标本的可疑霍乱弧菌菌落，在进行诊断血清凝集确认之前通常不需要进行生化特性的测定，是由于目前仅O1群和O139群霍乱弧菌具有较大的公共卫生意义，通常进行菌落筛选时，直接用O1/O139群诊断血清或单克隆抗体进行凝集鉴定；在没有诊断血清或诊断单抗时，下列生化试验中前四项有辅助筛选作用，弧菌抑制剂O/129试验有助于O1群与O139群霍乱弧菌的鉴别。

1. 氧化酶试验（Oxidase test）：弧菌属细菌大部分为阳性（其中仅麦氏弧菌与产气弧菌氧化酶阴性），作为弧菌菌落的简易辅助鉴定方法有一定意义，可区别于肠杆菌科细菌，后者氧化酶试验阴性。

2. 粘丝试验（String test）：弧菌属细菌大部分为阳性（但某些副溶血弧菌为阴性），有助于区分非弧菌如气单胞菌属细菌，后者粘丝试验阴性。

3. 克氏双糖铁（Kligler iron agar, KIA）和三糖铁琼脂（triple sugar iron agar, TSI）：霍乱弧菌在KIA上的反应类似于不发酵乳糖的肠杆菌科细菌，KIA和TSI可用于排除假单胞菌属和部分肠杆菌科细菌。

4. 赖氨酸铁琼脂 (Lysine iron agar, LIA) : 霍乱弧菌 LIA 的典型反应是碱性 (紫色) 斜面, 碱性 (紫色) 底层, 不产气, 不产 H_2S , 有助于筛选气单胞菌属和不产生赖氨酸脱羧酶的其他弧菌。

5. 弧菌抑制剂 0/129 (2, 4-diamino-6, 7-diisopropyl pteridine phosphate, 二氨基二异丙基喋啶) 敏感试验: 01 群霍乱弧菌 90% 以上对 $10\mu g/ml$ 0/129 敏感, 但大部分 0139 群霍乱弧菌具抗性。

6. V-P 试验 (Voges-Proskauer test) : 检查弧菌分解葡萄糖是否产生乙酰甲基甲醇。大多数埃尔托型霍乱弧菌 V-P 试验阳性, 而古典型霍乱弧菌除少数例外均为阴性, 因此, 用来鉴别霍乱弧菌古典型与埃尔托型尚有一定意义, 0139 群霍乱弧菌本试验多为阳性。

六、抗原构造和血清分型

01 群、0139 群和非 01/ 非 0139 群霍乱弧菌的不同血清群是根据其表面脂多糖抗原 (O 抗原) 的不同而区分的, 目前已鉴定到 210 余个血清群。霍乱弧菌的鞭毛抗原 (H 抗原) 相同。有多个基因控制霍乱弧菌 O 抗原的合成, 这些基因簇位于染色体上。

01 群霍乱弧菌按菌体抗原成分的不同可分成 3 个血清型, 小川型 (Ogawa) 含 A、B 抗原因子, 也含少量 C 因子成分; 稻叶型 (Inaba) 含 A、C 因子; 而彦岛型 (Hikojima) 含 A、B、C 因子。A 为群特异性抗原, B、C 为型特异性抗原。小川型单价血清即 B 因子血清, 稻叶型单价血清即 C 因子血清。由于小川型菌株含有少量 C 抗原, 在稻叶单价血清中常出现弱凝集; 但稻叶型菌在小川型单价血清中并不起反应。彦岛型菌很少见, 是小川型与稻叶型的中间型, 在鉴定时, 必须与两型单价血清都呈强的凝集、且试管凝集滴度均达到两单价血清原效价一半以上才能确认。

0139 群霍乱弧菌不与 01 群血清及其 A、B、C 因子血清发生凝集, 但能和

022 群、0155 群霍乱弧菌及 01 群霍乱弧菌粗糙型发生交叉凝集，故用 0139 群霍乱弧菌 O 抗原制备的诊断血清必须经过至少上述三群菌株的吸收。

在病例检测或是在实验室保存与传代过程中，有报道观察到 01 群霍乱弧菌分离株的血清型别转变，甚至同一霍乱病人在不同日期曾分离出小川、稻叶和彦岛三种血清型菌株。在实验室无菌小白鼠经口感染可以得到“小川→稻叶”、“稻叶→小川”以及“光滑→粗糙”、“粗糙→光滑”的变异株。血清型转变与一个称为 *rfbT* 的基因表达有关，当 *rfbT* 表达正常，表现为小川血清型；当 *rfbT* 基因发生变异或基因产物功能低下时，表现为稻叶血清型。

七、毒力因子和致病性

霍乱弧菌的致病性表现为弧菌进入小肠后，靠活泼的鞭毛运动穿过黏膜表面的黏液层，粘附于小肠上皮细胞刷状缘的微绒毛上，定居繁殖并分泌霍乱毒素 CT，导致大量水分由细胞内进入肠腔，超过肠道的吸收能力，以致出现大量腹泻和呕吐。最主要的毒力元件包括霍乱毒素（CT）和毒素共调菌毛（Toxin coregulated pilus, TCP）等。

（一）CT

CT 是霍乱弧菌的主要毒力因子，也是目前已知的致泻毒素中最强烈的毒素。不产生 CT 的霍乱弧菌对人不致病或偶然有些菌株引起腹泻。CT 为典型的 A-B 亚单位型毒素，一个全毒素蛋白包括 1 个 A 亚单位（CT-A）和 5 个 B 亚单位（CT-B）。A 亚单位分子量约 27.2kDa，包括 A1 和 A2 两个多肽。A1 是毒素的生物学活性部分，A2 起连接 A1 与 B 亚单位的作用。成熟的 B 亚单位约 11.6kDa，为非毒素蛋白，负责毒素与宿主细胞表面膜受体（GM1 神经节苷脂）的结合，介导 CT-A 进入细胞。CT-A 激活腺苷酸环化酶，使环磷酸腺苷（cAMP）含量增高。cAMP 是细胞内的关键信使分子，其浓度升高激活了一个 cAMP 依赖的蛋白激酶，引起蛋白质磷酸化。在隐窝细胞内，蛋白质磷酸化导致 Cl^- 分泌增加，在绒毛细胞内，可

导致 NaCl 偶联吸收能力降低。由于离子交换紊乱，造成肠内水、离子丢失，引起严重的霍乱特征性的水样腹泻。

编码 CT 毒素的 *ctxAB* 基因是霍乱弧菌中溶原性噬菌体 CTX Φ 基因组的一部分，被诱导出来的噬菌体 CTX Φ 呈长丝状，能够以霍乱弧菌菌毛 TCP 作为受体，感染具有 TCP 的非产毒霍乱弧菌，从而携带 *ctxAB* 基因水平转移，使非产毒株转变为产毒株。

对霍乱肠毒素的检查有生物学、免疫学和分子生物学方法。生物学检查法包括各种实验动物模型和细胞方法。常用的动物测毒有家兔肠段结扎法、乳兔肠内注射法、乳兔灌胃法等。免疫学测毒法有反向被动血凝试验 (RPHA)、被动免疫溶血试验 (PIH)、毒素与抗毒素琼脂扩散试验、放射免疫测定 (RIA) 和酶联免疫吸附试验 (ELISA) 等。以上是以往使用的经典方法，目前的分子生物学方法常用特异性的引物进行 *ctxAB* 基因的 PCR 检测，具有简单、快速、特异性强等特点。

(二) 定居因子

TCP 是霍乱弧菌的重要定居因子之一，属于 IV 型菌毛，直径 3 nm ~ 7nm，长 5 μ m ~ 10 μ m，周生于菌体，也可聚集成束，束宽 0.5 μ m ~ 0.8 μ m。其主要亚单位为 TcpA。TCP 合成组装及调控基因成簇存在于霍乱弧菌一个称为 VPI 毒力岛上。抗 TCP 的抗体是有效抵抗霍乱弧菌感染的重要因素。另外，辅助定居因子 (accessory colonization factor, ACF) 在实验研究中发现也发挥一定的肠道定居能力，其编码基因簇紧邻于 TCP 基因簇的下游，具有定居能力但比 TCP 弱很多。

其它定居因子包括血凝素、脂多糖、外膜蛋白以及其它一些菌毛等，这些外膜结构在霍乱弧菌的粘附中也发挥作用。在霍乱弧菌中发现一些血凝素如 L-海藻糖敏感血凝素和 D-甘露糖 L-海藻糖抗性血凝素与其在小肠内定居相关。

（三）其他毒素

除 CT 毒素外，霍乱弧菌还产生溶血素/溶细胞素和 RTX 外毒素 (repeats in toxin)，但这些因素对致人腹泻的具体作用还待确定。少数菌株能产生志贺样毒素、热稳定毒素 (ST)、钠通道抑制剂、热稳定直接溶血素等。

八、耐药性

从目前监测报告来看，流行的霍乱弧菌菌株耐药已开始出现多耐药问题，但尚不严重，还没有像结核杆菌等广泛引起治疗问题。但不同地区和不同流行时间的菌株耐药性有不同。上世纪七十年代在全球进行的霍乱弧菌抗生素敏感性监测显示，大多数菌株对用于腹泻性疾病治疗的抗生素是敏感的。然而，九十年代以后，关于霍乱弧菌产毒株耐药的报道在许多国家逐渐增多，其中许多是关于多耐药菌株的 (MAR)。例如，1990-1991 年在赞比亚分离的霍乱弧菌只有 2%-3% 的耐药株，而 1991-2004 年，对四环素、氯霉素、强力霉素和磺胺甲基异恶唑的耐药就分别上升至 95%、78%、70% 和 97%。喀麦隆分离的菌株对磺胺甲基异恶唑、四环素、氯霉素、链霉素和氨苄西林的多重高耐药。世界各地霍乱菌株耐药的情况还比较复杂，耐药的抗生素的种类差别很大，即使是在地理位置相邻的区域。O139 群霍乱弧菌出现以后，大部分菌株对磺胺甲基异恶唑、甲氧苄啶、链霉素耐药，对其它抗生素的耐药性也显著提高。

目前监测看，我国 O1 群 El Tor 型菌株的耐药情况不严重，除奈啶酸、四环素和复方新诺明的耐药率上升到近 30% 外，其他如氨苄西林、头孢曲松、诺氟沙星、氯霉素、强力霉素、阿奇霉素、呋喃妥因、庆大霉素、阿米卡星的敏感率都在 95% 以上。但需注意耐药率正逐步上升。O139 群菌株基本和国外菌株的报道相似，存在多重耐药问题，实验分析发现超过半数的菌株对氯霉素、卡那霉素、萘啶酸、四环素、氨苄西林和复方新诺明耐药，大部分 O139 群霍乱弧菌对链霉素、红霉素和多粘菌素 B 耐药或者中度耐药。

九、表型变异

霍乱弧菌在环境、宿主、培养条件和抗生素等多种选择性压力的作用下可发生多种变异。有的变异伴随毒力的减弱或丧失，如 S-R 变异，有动力变为无动力。

1. 形态变异：霍乱弧菌在人工培养基上保存稍久，可失去典型弧状成为直杆状。在某些因素影响下，可失去动力。

2. S-R 变异：指菌落的光滑（S）型-粗糙（R）型变异。自急性期病人分离的霍乱弧菌菌落多为光滑（S）型，但从恢复期病人或长期带菌者分离的菌株有时呈粗糙型。检查弧菌粗糙型需要用粗糙型血清做玻片凝集试验。皱褶型菌落（rugose）与粗糙型不同，菌落带黄色，不透明，表面有皱褶，经培养基传代的菌株常常可见到皱褶型。与光滑型菌落相比，皱褶型和粗糙型菌落分泌更多的胞外多糖（exopolysaccharide），生物膜形成能力明显增强，对氯化水、渗透压和氧化应激等不良因素有更强的抵抗力。

3. L 型：在某些特定条件下，菌株由于细胞壁缺损，可出现 L 型，在培养基上呈油煎蛋状的菌落形态。L 型在一般培养基上不易检出与认识，需使用 L 型培养基才能检出。

4. 活的非可培养状态（viable but nonculturable state, VBNC）：在环境生长条件不利的情况下，霍乱弧菌可以进入 VBNC 状态。此时用常规的分离方法无法分离出来，但这些细菌仍是活的，需要经过动物肠道等实验方法得到复苏，再使用培养基分离出来。VBNC 状态的细菌，仍能保持细胞膜的完整性，具有低水平的呼吸作用及代谢活性，还存在一些基因表达，但没有正常生长状态下的细胞分裂。表现为菌体收缩变形，细胞壁、细胞膜结构发生显著变化，细胞质密度增大，蛋白质、核糖体及 DNA 组成发生变化等特征，条件适宜后能够再次回到可培养状态。霍乱弧菌的 VBNC 状态是其在环境水体中长期存活的非常重要的方式。

5. 溶血性变异：埃尔托型霍乱弧菌有非溶血变种。埃尔托型霍乱弧菌存在着下述类型：稳定的溶血株；稳定的不溶血株；分离时为非溶血株，经人工培养传代成为溶血株，或者溶血株经传代后失去溶血性以及两者的混合型。

十、环境生存

霍乱弧菌是河口、海水中的正常菌群，被认为是沿海河口微生物生态系统的重要组成部分。虽说 O1 群和 O139 群霍乱弧菌是引起人类霍乱流行的主要致病菌，但非 O1/非 O139 群菌株比 O1 群和 O139 群菌株在环境水体中更容易分离到。在霍乱非流行区及远离被霍乱病人污染的地区，环境水体中分离的 O1 群霍乱弧菌一般是不产 CT 毒素的。

环境因素对霍乱弧菌的生长繁殖、毒力因子表达等有直接影响，已发现水体温度和 pH 值是其中的重要影响因素。一定范围内水温的升高有利于霍乱弧菌在内的弧菌属的快速增殖，偏碱性的生长环境（pH 值 8.0~8.5）能够促进霍乱弧菌的生长繁殖。

水体中的大量浮游植物通过直接和间接的方式影响霍乱弧菌。一方面，浮游植物在适宜的温度，日照和营养条件下，通过光和作用改变水体中氧气和二氧化碳的浓度，使水体的 pH 升高，更适合霍乱的生长繁殖；另一方面，浮游植物可为霍乱弧菌的生长提供营养和保护。

浮游动物与霍乱弧菌的关系十分密切，从多个方面影响霍乱的传播和感染过程。能够合成基丁质（chitin）的水生动物如桡足虫类、片足虫类和甲壳类是霍乱弧菌感染人类的中间宿主，桡足类浮游动物对霍乱弧菌具有明显的富集作用，霍乱弧菌可大量的附着在桡足类动物的胸甲和肠道内，霍乱弧菌通过基丁质酶分解利用基丁质作为食物来源。另外，浮游动物为霍乱弧菌提供适宜的生存境并提供保护，使其在低温或者酸性条件下仍然能够生存。霍乱弧菌在环境中维持和存活，可能涉及“活的非可培养状态”、“皱褶”及“生物膜”

(biofilm) 形成等存在形式，这些形式有利于其在恶劣的环境中生存。

另外，从自然环境上讲，气温升高、厄尔尼诺等异常气候变化也可直接影响到自然界中霍乱弧菌的生存、扩散及其种群密度的变化。气温升高使霍乱弧菌能够向高纬度地区传播，流行持续的时间延长；气温升高引起海平面升高使海水入侵，增加内陆水体的盐度，进而扩大霍乱弧菌适宜生存的范围。有研究表明，上世纪九十年代波及多个大洲数百万人发病及数万人死亡的霍乱大流行，与厄尔尼诺现象密切相关。

十一、抵抗力和存活力

弧菌在水中存活时间取决于许多因素，诸如菌株的遗传特征、污染的菌量、水的温度、酸碱度以及水中的细菌、盐分和有机物的含量等。一般在未经处理的河水、塘水、井水、海水中，埃尔托型霍乱弧菌可在一至三周甚至更长时间内仍被分离出来。在有藻类或甲壳类等生物的淡盐水中可进一步使其存活时间延长，在条件适宜时可以繁殖，甚至越冬。O139 群霍乱弧菌生存能力因水体而异，有的弱于 O1 群霍乱弧菌，有的则强于 O1 群霍乱弧菌。

在各类食品上存活时间受下列因素影响：污染程度、温湿度、酸碱度、盐分、糖分和水分含量。在高盐（15% 以上）、高糖（40% 以上）或干燥食品中，埃尔托型霍乱弧菌的存活一般不超过一至二日，但在鲜鱼、鲜肉和贝壳类食物上存活（被分离出来）时间可达一至二周。在蔬菜、水果上存活一周左右。在食品上的弧菌于冰箱保存（5℃ ~ 10℃）比室温（30℃ ~ 32℃）存活时间长。在水产品、海产品、加工过的熟食等食品受到霍乱弧菌污染后，如温度、酸碱度等条件适宜时，不仅能存活较长时间，还可大量繁殖，达到足以使人受染的数量，从而引起食物型传播或暴发。

弧菌对热、干燥、直射日光都很敏感，加热是杀死弧菌的最好方法。水中弧菌经 100℃ 煮沸一至二分钟即可被杀死。干热 100℃ 亦可杀死。霍乱弧菌对低温

和碱耐受力较强，对酸和强氧化剂极为敏感。2.5/万过氧乙酸直接作用于埃尔托型霍乱弧菌，细菌即刻死亡。对各种常用消毒剂，如含氯制剂、碘制剂均敏感。

第四节 发病机理与病理学

一、致病机理

霍乱弧菌经口进入胃后，可被胃酸杀死。如因胃酸缺乏或大量进食、饮水，使胃酸稀释而酸度降低或入侵弧菌数量很多时，未被杀死的弧菌即进入小肠。在穿过小肠黏膜表面的黏液层之后，弧菌即粘附于肠上皮细胞表面并在此大量繁殖，同时产生强烈的外毒素，即霍乱肠毒素。霍乱肠毒素有A、B两个亚单位，肠毒素借助其结合亚单位（B亚单位）结合于上皮细胞膜受体GM1神经节苷脂，使具有毒素活性的亚单位（A亚单位）进入细胞膜，从而激活细胞膜中的腺苷酸环化酶（AC），使三磷酸腺苷（ATP）转变成环磷酸腺苷（cAMP）。由于细胞内环磷酸腺苷浓度增高，从而促进细胞内一系列酶反应，结果使小肠黏膜上皮细胞分泌功能大为增强。肠液分泌大量增加以至超过了肠道正常吸收功能，因而出现剧烈的水样腹泻。

霍乱肠毒素是引起本病的主要原因。弧菌裂解后释放的内毒素以及弧菌产生的酶（如神经氨酸酶）、其他毒素（如溶血素）和代谢产物等在本病的发病中可能也起一定的作用。

二、病理

霍乱患者粪便为等渗性。肠液丧失的持续时间常可数小时至7~8天，大量腹泻的持续时间与疾病的严重程度成正比。

霍乱患者所有临床表现和生化异常，都是由于等渗液体的大量丧失造成的。大量液体的丧失是重型霍乱患者低血容量性休克的直接原因。由于丢失的液体中蛋白含量低，而主要成分为水和小分子物质，因此，血液浓缩，血浆蛋白浓度升高。霍乱粪便中钾和碳酸氢盐含量较高，常导致严重的全身低钾和代谢性酸中毒。死亡的主要原因是低血容量性循环衰竭和代谢性酸中毒。霍乱患者的液体丧失发生于整个小肠，按单位长度丧失液体量估计，以十二指肠最多，回肠最少。没有胃液过度分泌的证据，肠道吸收功能依然正常。

霍乱病程中形成的病理改变常甚轻微，仅表现为杯状细胞中黏液的明显减少、肠腺和微绒毛轻度扩张以及黏膜固有层轻度水肿。患者死后病理解剖所见，主要为严重脱水现象，尸体迅速僵硬，皮肤发绀，手指皱缩，皮下组织及肌肉极度干瘪。胃肠道的浆膜层干燥，色深红，肠内充满米泔水样液体，偶见血水样物，肠黏膜发炎松弛，但无溃疡形成，偶有出血。淋巴滤泡显著肿大，胆囊内充满黏稠胆汁。心、肝、脾等脏器多见缩小。肾脏无炎性变化，肾小球及间质的毛细血管扩张，肾小管上皮有浊肿变性及坏死。其他内脏及组织亦可有出血及变性等变化。

第二章 预防措施

霍乱防治必须贯彻“预防为主”的方针，坚持“标本兼治、治本为主”的原则，深入开展宣传教育，普及以霍乱为重点的肠道传染病防治知识，充分发挥各级医疗机构在监测与防治中的重要作用，有针对性地制订本地区的预防控制规划。要抓早、抓紧、抓落实，采取以“三管一灭”为中心的综合性预防措施，逐步减少和控制本病发生和流行的因素。

各项措施应在当地政府领导下，各有关行政和技术部门密切配合，分工协作，各司其职，各尽所能，并动员全社会参与。

第一节 组织管理

一、明确职责分工

霍乱预防遵循分级负责、属地管理的原则，各有关部门履行以下职责。

（一）各级人民政府

领导本行政区域内的霍乱防治工作。建立健全霍乱防治工作机制，明确各部门的职责和任务。制定霍乱防治规划并组织实施，建立以卫生行政部门为主导、多部门参与配合的协调工作机制。

（二）卫生行政部门

做好政府的参谋，适时向政府提出霍乱防治规划、意见、建议和处置方案，并组织实施疫情防控，协调疾病预防控制机构、卫生监督机构和医疗机构共同做好预防控制工作，开展技术培训和健康教育。

（三）疾病预防控制机构

在卫生行政部门的领导下，负责组织实施霍乱疫情监测、流行病学调查与处置、技术培训和指导、督导检查以及对医疗机构的技术指导和督查等任务，并及时提出预防控制策略、建议。

（四）卫生监督机构

应定期对各单位饮用水、环境、医院等进行卫生监督检查，对不符合卫生要求的用水、饮水、厕所设置以及疾病预防控制机构和医疗机构防治措施执行情况等方面出现的问题提出整改意见。依法监督，积极开展卫生法律法规宣传教育。

（五）食品安全监管机构

应定期对各单位食品等进行监督检查，对食品生产、流通等环节不符合卫生要求的，实施限期整改、封存、召回等措施。积极开展食品安全法律法规宣传教育。

（六）医疗保健机构

承担责任范围内的霍乱诊断、排查和隔离治疗，健全感染性疾病科（或肠道门诊、腹泻病门诊）、公共卫生科工作，严格执行疫情报告制度，开展规范化治疗，严格掌握病例出院标准，做好本单位的消毒处理工作，防止院内感染，尤其保证医院排污处理符合规范要求。基层医疗机构应加强疑似病例的排查，包括送检标本、隔离治疗等。在霍乱防控工作上接受疾病预防控制机构的业务指导。

二、监督检查

各有关机构要把霍乱的督导检查纳入年度工作计划，明确分工，任务落实到人，实行责任追究制。督导组由卫生行政部门牵头，包括疾病预防控制、卫生监督、食品安全、医疗保健等机构，按计划定期或根据疫情随时检查或抽查各部门防治工作落实情况。凡因工作失职造成疾病流行的，应依法追究责任人。

第二节 霍乱监测

健全的监测体系是霍乱防控的基础工作和重要手段。霍乱防控需要通过监测及时发现病例和相关疫情，及时反应，才能有效控制疫情。同时，监测也是霍乱疫情预警的手段。

目前，我国霍乱处于低发期，但局部地区的暴发疫情时有发生，因此，霍乱监测的重点在于及时敏锐地发现霍乱病例、及时规范开展流行病学调查和处置，防止疫情的扩散，加强对流行病学危险因素等信息的分析利用。霍乱监测工作由各级卫生行政部门组织实施，疾病预防控制机构负责提供相应技术支持，各级医疗卫生机构承担具体监测任务。

一、疫情监测

（一）病例发现与报告

1. 病例的发现

各级医疗机构应做好日常腹泻病人的就诊登记，对有霍乱疑似症状的病人应立即采集标本（粪便、肛拭子或呕吐物）进行检测。检测方法可采用快速检测（如霍乱弧菌胶体金试纸条、制动实验等）、分离培养、核酸扩增检测等。需要考虑检测方法的灵敏性、特异性和实验质量控制，对检测阴性但仍怀疑的病例，应进行隔离收治，并采集标本送辖区疾病预防控制中心或上级机构进行检测；无检测能力的基层医疗单位，须采集标本送至辖区疾病预防控制中心进行检测。

在霍乱流行季节（5-10月），医疗机构需要设置感染科或肠道门诊或腹泻病专室（桌），对前来就诊的腹泻病人的信息进行登记，便于病例追踪，对疑似或具有典型霍乱临床症状（剧烈腹泻、水样便或稀便、不发热或低热、以及迅速出现脱水、肌肉痉挛及循环衰竭）者，应重点采样和检测；有明确流行病学史（如与霍乱病人同餐、同住或护理者、或来自明确霍乱流行的地区），并出现腹泻、

呕吐症状，排除其它原因，应怀疑霍乱的可能。在非流行季节或非流行地区，尤其需要具备霍乱诊断意识。

2. 病例的报告

各级各类医疗机构、疾病预防控制机构，其执行职务的人员和乡村医生、个体开业医生等，发现霍乱病例时，应按照《传染病防治法》的有关规定，于2小时内通过传染病疫情网络直报系统进行网络直报。未实行网络直报的责任报告单位应于2小时内以最快的通讯方式（电话、传真）向当地疾病预防控制机构报告，并于2小时内寄送出传染病报告卡；当地疾病预防控制机构收到报送的传染病报告卡后，应于2小时内通过网络进行直报，并及时填报实验室检测结果。

3. 个案调查

疾病预防控制机构在接到辖区内霍乱病例报告后，应立即开展对病例的流行病学调查。首先要核实诊断，对病例和带菌者进行详细的个案调查，将获得的临床表现、流行病学史、病原学检测等信息填入个案调查表，并对密切接触者进行调查，根据流行病学调查结果采取相应的预防控制措施。霍乱病例个案调查中，要求进行详细的饮食史、接触史、活动与旅行史。注意不能仅询问是否饮用生水、食用生菜，而且要将有关可疑饮食种类、食用地点、购买地点等涉及污染来源追踪所需信息，均进行详细询问和记录。霍乱病例个案调查表可通过霍乱专报系统进行报告。

霍乱个案病例的调查处置详见第三章“疫情调查处置”有关章节。

（二）暴发监测

1. 暴发的发现

暴发是指在短时间内一定范围内发生多个霍乱病例或带菌者。但暴发早期多表现为散发。当医务人员在短时间发现有症状相似、有共同聚餐史等流行病学史的2例及以上腹泻病例、尤其具有霍乱疑似症状的病例时，要及时报告当地疾病

预防控制机构。疾病预防控制机构人员要及时调查核实。在仅发现多个散在病例时，当地疾病预防控制机构需要调查病例之间有无流行病学联系，并考虑是否存在其他病例没有就诊以及没有被发现，实验室人员对菌株进行检测、发现分子分型型别一致的多个菌株时，要立即告知流行病学调查人员，以进行调查核实，以判断是否存在共同暴露因素。同时，建筑工地、学校、幼儿园等企事业单位发现聚集性腹泻病例时，应主动与当地疾控机构联系，以进行调查核实。

2. 暴发的报告和调查

按照《中华人民共和国传染病防治法》规定，各级各类医疗机构、疾病预防控制机构、卫生检验机构执行职务的医务人员发现霍乱暴发、流行疫情时，需按照《国家突发公共卫生事件应急预案》的规定，通过“突发公共卫生事件报告管理信息系统”进行报告。

疾病预防控制机构在暴发疫情调查处理过程中要进行主动搜索，及时发现感染者。对暴发疫情中的个案进行流行病学调查，找出传染来源、传播因素，评价扩散危险程度。并采集腹泻病例标本、相关的食品标本、环境标本（水体、家居环境）等，进行霍乱弧菌的分离，以及菌株的生物学特征、分子分型检测，以帮助分析此起暴发的原因。

暴发疫情处理结束后，要及时收集、整理、统计、分析调查资料，写出详细的报告，报告主要内容包括：疫情概况、首发病例或指示病例的描述、流行基本特征、暴发原因、实验室检测结果和病原分型、控制措施和效果评估等。在疫情控制工作结束后7天内完成结案报告，随同暴发调查关键信息一览表，通过“突发公共卫生事件报告管理信息系统”进行报告。

霍乱暴发疫情的调查处置详见第三章“疫情调查处置”。

二、重点人群监测

在加强医疗机构以感染性疾病科（肠道门诊、腹泻病门诊）为主体的腹泻病监测体系的同时，要根据流行病学指征及防控工作的需要选择一定的时机、地区和对象，进行重点人群监测，开展腹泻病例检索和霍乱弧菌的实验室检测。但不能无依据扩大查源。

重点人群主要包括以下：阳性水点周围人群；与本次流行有关的重点职业人员，如渔民、船民、医务工作者、饮食及旅游服务行业人员、粪管人员、清洁工人、流动人口（特别是建筑工地工人及其他群居人群）、经常外出人员等；有追溯传染来源意义的上一流行季节的病人、带菌者和旧疫点人群；具有流行病学指征的有关地区（如：重点边境地区、沿海地区等）的人群及出入国境人员。注意根据不同情况，重点人群有所不同。

重点人群监测，可通过在当地医疗机构加强门诊检诊、设立专门检测和监测报告点、收集人群标本开展霍乱弧菌分离检测等方式进行。

三、危险因素监测

造成霍乱传播流行的危险因素，在不同地区以及不同时间会有所不同，主要经过水和食物，需要注意常见的食源性危险因素，如海产品、被含霍乱弧菌的河沟水污染的蔬菜、不卫生的大排档、小吃摊等，但也要注意少见的因素，如跨境传播。气候因素中常见的影响因素为沿海地区台风和海水倒灌等，均曾造成霍乱的感染扩散。危险因素监测能够用于疫情预警、疫情溯源、明确霍乱防控工作重点、制订防控策略等。

（一）环境监测

根据流行病学分析提供的线索结合传染来源和污染范围的推断、以及既往监测的信息，因地制宜确定需要开展的环境因素调查。

1. 环境水体

环境水体为必检对象，在以经水传播为主的地区尤为重要，比如沿海地区、没有安全供水而主要依靠自然水体和水井的地区等。疫点周围及直接关联的水体是监测的重点。其他易于污染的水体如粪肥污染处、医院污水排放处、水产品码头、沟河盲端、船只来往的交通河道、渔港、海港、市政下水道排放处及海产品交易市场出水口等，也应根据流行病学指征抽样检查。

在霍乱易发多发地区，根据当地霍乱疫情及可能的威胁，可设环境水体长期监测点。环境水体包括淡水和海水养殖场、亚热带地区沿海水域、江河入海口河口水体、水产品码头、海产品交易市场出水口、与人群生活关系密切的河流、池塘、湖泊、水井以及乡镇自来水厂源水等。阳性水体应定期复查，直到完全阴转。

2. 其他外环境

医院污水排放口、下水道排放口，苍蝇可能污染的其他环境等，均可适当采样检查，以便了解是否受污染以及污染的范围。

（二）食品监测

在霍乱多发地区，根据流行病学指征定期开展市售食品的监测。监测的重点包括水产品、海产品以及生冷、卤制食品。

在流行季节，各地以海/水产品批发市场和餐馆为重点，采集甲鱼、牛蛙、贝类、甲壳类产品，详细记录养殖地点和销售地点等信息，并进行霍乱弧菌的实验室检测。

四、病原为基础的实验室监测

在监测中分离到的霍乱弧菌，必须进行血清群、血清型和生物型、是否产霍乱毒素或携带霍乱毒素基因的检测。对来自病例、带菌者、还是食品与水体等的霍乱弧菌产毒株，应尽快完成菌株的分子分型，主要为脉冲场凝胶电泳（PFGE）分型，并传至中国细菌性传染病分子分型实验室监测网络（PulseNet China）中心数据库进行全国分离菌株的信息比对。不能进行菌株鉴定或分子分型的实验

室，要尽快将菌株送至上一级实验室进行检测；不能进行分子分型的省级疾控中心实验室，应尽快将产毒菌株按生物安全管理规定，送至中国疾控中心传染病所进行鉴定和分型检测。菌株的分型能够为评价疫情风险、及早发现暴发、追溯感染和污染溯源等方面发挥重要作用，与流行病学调查密切配合，对霍乱防控具有重要的意义。

第三节 经常性预防措施

无论是发生过霍乱的地区还是未发生过霍乱的地区，都要贯彻“预防为主”的方针，并按照《中华人民共和国传染病防治法》对甲类传染病的报告管理要求以及其他相关法律法规，开展预防工作，防患于未然，根据当地实际情况，落实经常性预防措施。这些预防措施同样对其他腹泻病的防控发挥重要作用。

一、加强食品安全的监管，建立食品追踪溯源制度

严格贯彻落实《中华人民共和国食品安全法》及其实施条例等法律法规，开展食源性致病菌监测和食源性疾病报告工作，加大食品安全监督和管理力度。

各地应根据国家食品安全风险监测计划的要求，制定辖区内食源性致病菌监测方案并组织实施。各级各类医疗机构应做好食源性疾病的报告，一旦发现食源性疾病病例或疑似病例，应及时向所在地县级卫生行政部门报告；接到报告的卫生行政部门应当汇总、分析有关疾病信息，及时向本级人民政府报告，同时报告上级卫生行政部门。

加强对食品经营单位的经常性卫生检查和卫生管理，特别是餐饮行业、农贸市场、集体食堂等重点环节和重点场所。建立、完善食品及其原料的登记、溯源制度，加强餐饮和销售环节的管理，严格执行食品安全要求。

严格执行饮食从业人员准入制度，依法进行体检、发放健康证明。有计划地对流行区内餐饮从业人员进行采便检查。当发现不符合食品安全标准时，应做出停止食品出售或责令餐饮单位停业整顿的处理。

二、确保饮用水安全

水是霍乱的主要传播途径之一。各级政府应制订长远规划和近期目标，加快城乡集中供水建设。

在已经实现集中供水的地区，要保护好水源，确保不受污染。供水单位必须制定严格执行操作程序，饮用水管理和消毒人员要相对固定，并定期接受专业技术培训。疾控机构应开展水质监测。

在没有实行集中供水的地区，应采取有效措施保护水源，改善饮用水条件。饮用水井要设置井台、井栏、排水沟，使用公用水桶；引用河塘水的地方，要严格分段，分塘用水，严禁在饮用水源内洗刷粪具、洗涤衣物。可制定卫生公约，提倡饮水消毒、不喝生水的良好卫生习惯。

此外，要做好托幼机构、学校、医疗机构等重点场所的用水管理。托幼机构和学校要保证幼儿、学生喝到开水，并教育其不饮用生水。医疗机构的污水必须进行无害化处理，后方可排放。

三、开展爱国卫生运动，搞好环境卫生

各地在夏秋季发动群众开展经常性爱国卫生运动，改善环境卫生，消除苍蝇孳生场所，喷洒药物消灭蝇蛆，有效降低苍蝇密度。

在城镇，应结合城市建设规划，解决好杀蛆灭蝇、粪便贮存、污水排放和垃圾处理，特别是医疗卫生机构的粪便和污物处理。在农村，结合社会主义新农村建设和农业生产特点，使用水粪的地区要建立无害化厕所或沼气池，使用干粪的地区要实行高温堆肥发酵，厕所、蓄粪场要远离饮用水源。

四、积极开展健康教育

各级政府要领导、协调、支持健康教育和健康促进工作，新闻、广播、教育、影视、文化、出版等部门都有普及卫生防病知识的责任和义务。充分利用网络、电视、广播、报刊、宣传栏等多种媒体形式，以生动活泼的方式、通俗易懂的语言和贴近生活的实例，把健康教育的内容融入其中，切实提高宣传教育的实际效果。

宣传内容包括以霍乱为重点的肠道传染病防治的基本知识，注意饮食卫生，提倡喝开水，不吃生食，生吃瓜果要洗净，食物制作加工要生熟分开，饭前便后要洗手，使公众养成良好的卫生习惯，把好“病从口入”关。

宣传的内容和形式要根据不同对象进行适当的调整，如：一般民众、城市居民、农民工、务农人员、不同年龄段的学生等，应根据他们的生活环境和条件、文化程度、接受能力、兴趣等，有针对性地制定宣传教育方案和组织形式，增强吸引力，讲求实效。

五、预防接种

预防接种是有效防控霍乱疫情的特异性措施，目前已有口服霍乱疫苗可以使用，一类是将灭活霍乱弧菌菌体加表达纯化的霍乱毒素 B 亚单位 (rBS - WC)，这类已上市疫苗包括国外的“Dukroal”以及我国的“可唯适”。另一类是简化的仅含灭活菌体的口服疫苗，如国外的“Shanco1”。WHO 提出在霍乱出现地方性流行时，需要实施的控制措施包括开展适当的治疗、改善饮用水卫生和卫生设施以及动员社区参与等，同时可考虑把接种霍乱疫苗作为辅助性措施之一，但不应干扰前述主要控制措施的开展。rBS - WC 类疫苗是基于针对霍乱抗菌与抗毒素免疫的协同，因而除可预防霍乱外，对产肠毒素大肠杆菌 (ETEC) 引起的流行性腹泻 (包括旅行者腹泻常见病因) 也有较好的交叉保护作用。目前由于国内霍乱感染日益减少，因而难以界定在什么情况下使用霍乱疫苗，因为在不同地区和不同季节，

霍乱流行情况或潜在流行危险很复杂。由此，建议由卫生行政部门组织相关专家组成委员会启动是否在该地区使用霍乱疫苗的评估，包括：人群长期获得安全饮水的可及性、公共卫生防护能力、生活环境的卫生条件、是否容易发生肠道传染病流行等等，已发生霍乱流行、在短期（比如数月）内持续流行难以消除、而人群普遍处于感染危险状态时，也需要考虑非疫苗的控制能力如何。另外，由于抗01群霍乱菌苗不能对0139霍乱产生有效的交叉保护，因此这点也须考虑在内。

针对将到霍乱流行地区旅行和工作的人员，包括出国旅游者、出国劳务人员、维和部队、宗教朝觐人群等，尤其是所赴地区正处于流行中或易流行季节，建议提前3周或4周口服霍乱疫苗，并关注我国出入境检验检疫部门、旅游部门向公众发布的国际旅行建议。

六、规范疫情的报告和管理

做到早发现、早报告、早诊断、早隔离、早处理，这是有效管理传染源、迅速控制疫情的首要环节。要建立健全由各级卫生行政部门、医疗保健机构、疾病预防控制机构相结合的疫情报告网络，明确制度和责任，加强疫情报告管理。在针对群众的健康教育中，要加入鼓励腹泻病例及早就诊、慎用抗生素的宣传教育。疾控机构做好舆情监测，对媒体、群众通过不同形式公开或者直接电话报告的腹泻病例或疫情、要积极进行专业判断以及必要的调查。

各级医疗机构、疾病预防控制机构和基层卫生单位要切实执行《中华人民共和国传染病防治法》中有关甲类传染病的管理规定。发现霍乱病例或疑似病例时立即进行处置，同时按规定在2小时内进行网络直报或用最快的通讯方式（电话、传真）向当地县级疾病预防控制机构报告。

各级医疗机构和疾病预防控制机构的工作人员、乡村医生等要认真做好疫情报告工作。无论在流行季节或非流行季节，都应具备腹泻病例中霍乱感染的筛检

排查意识，主动发现传染源并及时报告。在各基层单位及海关、交通、宾馆、车站、码头等处，指定专人负责疫情报告。

七、建立与完善以感染性疾病科（肠道门诊）为主体的腹泻病诊疗监测体系

各医疗单位建立以感染性疾病科和肠道门诊（腹泻病门诊）为主、涵盖内科、儿科、急诊科等科室的腹泻病尤其是霍乱的诊断、报告与治疗体系。按照卫生部的要求，二级及以上综合性医疗机构须设立感染性疾病科，其他综合性医疗机构应设立肠道门诊（腹泻病门诊）。基层医疗机构（社区卫生服务中心、乡镇卫生院、村卫生室等）应在流行季节指定专室或专桌诊治腹泻病病例。在一般情况下，肠道门诊可在每年5月~10月开设，各地可根据疾控机构风险评估、其他工作需要，提前开设或根据需要常年开设。

肠道门诊（腹泻病门诊）一般包括诊疗室、观察室、专用厕所等，指派专（兼）职医、护、检人员，配备专用医疗设备、抢救药品、消毒药械、粪便标本采集和存放的试剂耗材以及霍乱快速诊断试剂，制订严格的工作制度与隔离消毒制度。在霍乱易发季节，要对相关科室医务人员进行霍乱诊疗的培训和意识教育。肠道门诊（腹泻病门诊）工作人员要熟练掌握霍乱等腹泻病的诊断、治疗、抢救、登记、疫情报告等专业技术，真正把“逢泻必登、逢疑必检、逢泻必治、逢泻必报”落到实处。对中、重型腹泻病人应在门诊就地积极治疗抢救或留床观察，并做好详细的病历记录。如需转院，应有专车及医护人员陪送。

感染性疾病科、肠道门诊（腹泻病门诊）对就诊的每一例腹泻患者进行粪便直接镜检，做好标本登记。对所有霍乱疑似临床症状体征的患者，立即采集粪便标本，并立即进行霍乱弧菌的快速检测以及分离培养。无检测分离培养条件的医疗单位必须经由检验人员或门诊医务人员按要求采集标本，详细登记姓名、地址、联系方式以及其他门诊信息后，立即送到当地疾病预防控制中心进行分离培养和

鉴定。如遇外地病人，应登记原省市县详细住址、单位以及入住宾馆，务必防止因登记不详、字迹不清而延误疫情处理。接诊医务人员和检验人员需注意检测方法的规范与灵敏性、标本采集时的局限因素（如发病时间长、使用了大量抗生素、未能规范采集和运输标本等），科学对待阴性结果，在接诊医务人员仍高度怀疑霍乱感染时，仍需规范隔离治疗。

感染性疾病科、肠道门诊（腹泻病门诊）每月应进行一次自查。市县区级卫生行政部门每年应进行一至两次督导检查，协助解决实际问题。

八、渔船民和交通运输的卫生管理

渔民、船民是较特殊的霍乱易感人群。以相应主管部门和所属乡镇为主，卫生、公安、民政等有关部门密切配合，加强对渔船民的管理。逐步完善船只的卫生设施，做好肠道传染病防治知识的宣传。发现吐泻病例要及时就近诊治。港口、闸口、船舶集中停靠的码头，要建立公共厕所等卫生设施，并严格消毒处理粪便。

船舶中发现疑似病例，须就近停靠，服从管理。病例的采样、调查、诊治等工作由当地卫生行政部门统一协调处理，并按照疫点的要求进行处置。对来自疫区的船舶，要主动加强监测，必要时可对船上人员进行粪检或预防服药。

铁路、交通、民航等部门，要做好对车辆、船舶、飞机与车站、港口、机场的经常性卫生管理。在霍乱流行季节，应主动加强对车辆、船舶、飞机上旅客的观察。一旦发现病例或疑似病例，应就近隔离治疗；对密切接触者预防服药，并对其乘坐的交通工具（特别是沿途所使用的厕所）进行彻底消毒处理。

九、其他重点人群的卫生监测管理

在流动人口较为集中的地区和单位，尤其当地外来人口聚居地，如城乡结合部、车站、码头、厂矿、企业、收容所和大型建筑工地等，因人口流动频繁，不易进行长期固定监测，应着重加强经常性预防与卫生监督。各有关单位应建立健全食堂、宿舍、污水/污物处理站、厕所等各项卫生管理制度，解决好生活饮用

水、餐饮以及垃圾粪便处理等问题,同时做好单位员工的卫生防病健康教育工作。有条件的大型建筑工地,可以设立卫生室,聘用具有执业资格的专业人员,并应得到主管部门的批准。外来人口聚居地的非安全供水(如水井、自装自来水系统、池塘、河沟等),是霍乱弧菌(及其他肠道致病菌)重点监测的目标。

十、疾病预防控制机构霍乱监测防控能力建设和完善

各级疾病预防控制机构应加强传染病防控体系和能力的建设与完善。重点做好流行病学、实验室检测、消毒等专业技术人员培训,使其熟练掌握霍乱等肠道传染病防治相关知识和技能,并做好相应的物资储备,做到人员、技术、物资三落实。

实验室检测能力是疾病预防控制体系建设的重要内容之一,包括实验室检测人员的数量和素质、检测工作能力、仪器设备配置、实验室环境条件、实验室质量管理和生物安全等内容。各地应积极开展实验室能力建设,进一步健全细菌学实验室,为传染病的科学防控提供技术支持。

各级疾病预防控制机构应经常性地对下级疾病预防控制机构(特别是基层疾病预防控制专业人员)开展疫情防控和调查处置等工作进行技术指导、培训和开展联合调查。

第四节 重大自然灾害中灾区的霍乱预防

自然灾害包括地震、海啸、台风、洪水、火山爆发、泥石流、干旱等。我国自然灾害种类多、发生频率高、分布地域广、经济损失大,严重危及人民群众健康及生命安全。自然灾害发生后,饮用水供应系统和卫生设施遭到破坏、食物和燃料短缺、水体污染、居住条件破坏、人口迁移、群居条件差、精神紧张等,造

成传染病发生与流行的条件和危险性明显增加。霍乱是《传染病防治法》规定管理的甲类传染病，因此尤其须重视以霍乱为主的肠道传染病的暴发流行。

一、灾后霍乱等肠道传染病的风险评估

在自然灾害发生后的各阶段，卫生行政部门均需采取适当方式不断开展公共卫生风险评估，以及时了解灾区居民的卫生状况并分析其需求，为制定救灾防病工作策略和措施提供参考依据。风险评估始终是动态进行的，经过“评估→策略制定与调整→再评估→再调整”及其反复的过程。

灾害发生后，卫生行政部门在政府领导下，尽快开展灾区现场快速卫生评估，了解灾情、人员伤亡及医疗、疾控等卫生部门损失情况，搜集灾区与公共卫生相关的居住、食品、饮用水、环境卫生、重点传染病疫情史、媒介生物、医疗和公共卫生服务、灾民健康需求等方面的信息，识别最主要的公共卫生威胁和隐患，使卫生应急措施与灾区实际需求相一致。

通过对灾区的肠道传染病历史疫情和现状的分析以及现场快速卫生评估，以材料总结、专家咨询等方式，定性总结灾害可能对肠道传染病的发生、传播造成的影响以及风险因素，形成风险评估框架。然后通过专家咨询，对霍乱等肠道传染病在灾区发生传播的可能性、流行强度和影响因素是否改变及改变程度、切实可行的防控措施等进行科学分析，确定防控的重点病种及其风险等级，为科学、规范地开展疫情防控提供参考依据。

二、以霍乱为重点的腹泻病监测与防控体系的恢复重建

灾后霍乱预防的关键是疾病预防控制体系和医疗救治体系的恢复，重点建立监测系统和诊疗系统。

(一)在疾病控制体系重建规划中确定以霍乱为主的肠道传染病的防控方案以风险评估结果为参考，根据可以利用的医疗卫生资源(人员、设施和技术条件等，包括本地的和外部救援力量)，迅速制定医疗、疾控等卫生机构灾后恢

复重建方案，将其纳入政府整体规划，积极争取政策支持，力争优先安排，确保灾区尽快恢复医疗卫生服务能力和服务秩序。在重建方案中明确以霍乱为重点的肠道传染病的防控工作方案。

（二）确立以霍乱为重点的肠道传染病的监测工作体系并开展工作

灾区卫生行政部门根据灾害种类和范围、波及的人群、医疗卫生机构受损情况以及当地原有肠道传染病发病情况，因地制宜、整合卫生资源，在灾区建立或完善肠道传染病疫情监测报告和防控体系。通过部署新的移动通讯报告网络、或能够继续开展工作的原疫情报告系统等，建立灾区现场的信息收集报告系统。灾区现场设立专门的疫情报告监测组，建立与灾区临时医疗点、原行政区域划分或灾民安置区域划分密切联系的信息统计渠道，总结监测报告，向灾区救援指挥中心和后方管理部门（包括国家、省卫生行政部门和疾控机构）报告。医疗、疾控等卫生专业技术人员要迅速到位，立即开展霍乱等急性肠道传染病的监测与防控工作。在当地卫生医疗机构与人员损失较严重时，通常应急阶段、主要依靠外部救援人员的直接工作参与甚至主导，此时需要积极联系救灾指挥中心、统一协调安排工作，同时要与当地能开展工作的疾控和医疗机构人员积极联系，共同开展工作。

三、基于临时安置点的灾区肠道传染病防控工作

（一）临时安置点的卫生要求

灾区临时安置点必须选择对人群健康和安全有保障的场所或地点。最重要的标准是接近安全水源，并且安置点垃圾粪便等能进行安全处理、不污染水体。须指派专人对安置点内的水源进行消毒和保护，尤其注意做好末梢水的消毒处理，可以使用漂白粉或漂白粉精片（净水片）消毒。同时要常规采集水体标本进行卫生检测。

食品供应要加强对制作加工、运输、储存、分发等环节的监督管理。建立外源食物检查制度。运输过程、临时储存中严格采取卫生措施、保障食品安全无污染。加强灾民安置点食品加工供应的卫生安全，提供必要的加工储存设施，积极开展卫生饮食健康教育。

做好排泄物和废弃物处理，保持良好的环境卫生。临时安置点应选择灾民易接近的地方修建数量充足的厕所，注意环境安全，防止环境污染尤其防止水体污染。临时安置地区应配备集中垃圾箱回收处理站，进行常规消杀处理，并组织人员定期回收生活垃圾。要指定专业人员对集中收集的排泄物和废弃物进行妥善处理，避免造成二次污染。

（二）加强临时安置点的医疗卫生服务

按照每 1000 名受灾群众配置不少于 1 名医疗卫生人员的标准，建立临时医疗点或派出巡回医疗队，做好医疗救治服务。强化疫情监测和报告，及时发现和处置各类疫情和突发公共卫生事件。做好安置点消杀、灭虫和环境卫生工作。加强饮水和食品安全、保障临时安置点受灾群众饮食安全。做好防控知识宣传和开展心理干预，消除恐慌情绪。

（三）以霍乱为重点的肠道传染病防控

1. 加强以霍乱为重点的肠道传染病监测和疫情报告。各级各类医疗机构或责任报告人发现霍乱、菌痢等疑似病例、确诊病例以及病原携带者，应于 2 小时内通过传染病疫情监测信息系统进行报告。

2. 及时有效处置疫情。灾区卫生行政部门组织疾控、临床等专业技术人员，调查危险因素，采取以隔离治疗病人和带菌者、“三管一灭一宣传”（即管理食品、水、粪便，灭蝇、健康教育）、消杀和必要的应急接种为主的综合性防控措施，针对疫点按照“时间要早、范围要小、措施要严、落到实处”（简称“早、小、严、实”）的原则，争取在最短时间内解决好疫点问题。

3. 积极开展健康教育。在灾区开展预防肠道传染病的宣传教育，防止“病从口入”。积极宣传饮食卫生，教育正确使用消杀药品，督促出现腹泻症状时应及时就诊、自觉隔离。

4. 开展风险评估。根据灾区肠道传染病发生的种类、数量、暴发疫情发生的范围与影响、各项救灾防病工作的进展情况，对肠道传染病的总体防控措施、实施、效果等进行评估，根据评估结果，及时调整防控策略和措施，指导灾区的肠道传染病防控工作，减少肠道传染病的发生，及早控制肠道传染病疫情，保证大灾之后无大疫。

第五节 边境地区霍乱的监测与防控

我国与多个国家通过陆路接壤，多数接壤地区人员物品交流频繁。尤其南部，邻近国家曾多次出现霍乱暴发流行，我国边境地区也出现了霍乱输入病例以及所导致的疫情。霍乱属于《中华人民共和国国境卫生检疫法》规定的检疫传染病，因此，加强边境地区霍乱监测与防控，是防止霍乱传入和采取主动应对措施的必要方面。由于边境地区传染病防控具有涉外的特殊性，需要积极与邻接国家建立信息交流渠道，本着平等互利的原则开展传染病联防联控。邻近国家居民在我国境内以霍乱所进行的诊断治疗，均需报告我国当地疾控中心。

一、成立霍乱防控领导小组

我国与邻国接壤省份的边境地区，应成立霍乱防控工作领导小组，尤其在疫情高发以及已有疫情发生的情况下。以当地政府领导任组长，卫生行政部门和其它相关部门任副组长，由卫生、检验检疫、边防、公安、交通运输、食药监局、

财政、外事等部门领导为成员，建立霍乱防控工作领导小组，负责领导、组织、协调和检查督导此项工作。

二、制定霍乱疫情处置应急预案

制定当地霍乱疫情应急预案，各部门相互协作，各司其职，各尽其能，根据日常分工和职能开展监测工作，发生疫情时，视具体情况，分级启动应急预案，并做出相应的应急响应。

三、霍乱疫情的报告和疫情分级与预警

医疗卫生机构、有关单位发现疑似霍乱病例，应当按照我国传染病防治法以及突发公共卫生事件管理条例的规定，在2小时内向当地疾病控制中心报告，以获得技术支持和进行检测核实。当地疾病预防控制中心应根据相关规定逐级向上报告。

根据霍乱疫情的进展及特点，按霍乱疫情处置应急预案进行将预警分级，并根据预警分级做出相应的应急响应。

四、霍乱疫情信息的交流

（一）外事部门

做好突发公共卫生事件应急处理的涉外相关事务，加强与境外的信息沟通，及时了解境外传染病发生的情况，并及时报告领导小组。

（二）边防和出入境卫生管理部门

加强对出入境、特别是便道入境人员的监管，发现可疑病人及时报告疾控中心，情况紧急，病人需救治时，由领导小组协调县/市级医院或急救中心专车进行转诊，并及时对患者（疑似病例）污染的场所进行消毒处置。

（三）出入境检验检疫部门

加强国境口岸出入境人员的检疫和医学留验观察工作，加强对出入境海水产品的检疫检测，及时收集和提供边境地区传染病疫情信息，发现情况及时报告领导小组。

发现霍乱疑似病例，须及时向当地疾控中心报告，病人急需救治时，由领导小组协调县级人民医院或急救中心专车进行转诊，并及时对患者（疑似病例）污染的场所进行消毒处置。对患有霍乱、来自霍乱流行区的人或与霍乱病例密切接触的人，国境卫生检疫机关应当区别情况，发给就诊方便卡，实施留验或采取其他预防、控制措施，并及时通知当地卫生行政部门。各地医疗机构对持有就诊方便卡的人员，应优先诊治。

检出阳性入境海水产品时及时通报当地报告疾控中心，并将有关疫情情况报告当地霍乱防制工作领导小组，对相关海水产品按检疫条例相关规定处理。

五、边境地区霍乱疫情应急响应

（一）防控领导小组

根据需要责成疫情发生地乡镇政府和有关部门协助卫生行政部门做好信息收集、人员隔离、疫情发生区域范围的确定与封锁、公共卫生设施的落实和卫生宣传教育工作；启动应急储备基金和物资，保证霍乱疫情应急处理所需的医疗救治和防护设备、药品、医疗器械等物资供应；保障霍乱病人得到及时、有效治疗。涉及口岸卫生的，按照国务院颁布《国境口岸卫生监督办法》进行口岸卫生监督处理。

（二）卫生部门

1. 当地卫生行政部门：成立卫生部门霍乱疫情应急处置领导小组，组织协调本行政区域内医疗卫生力量参与霍乱疫情应急处置工作，协调解决应急物质储备，并对各地应急处置工作进行督导检查。落实 24 小时值班制度，及时向政府霍乱防制领导小组和上级卫生行政部门报告疫情和处置进展信息。

2. 当地疾控机构：组织疫情组、流行病学调查组、消毒处理组和检验组，负责本行政区域内霍乱疫情信息的收集、汇总分析、信息上报；参与和指导现场流行病学调查、疫情监测与报告、外环境监测、疫点、疫区划定和消毒，病原学监测；负责病例样本的采集、检测、上送；按照卫生部《国家突发公共卫生事件相关信息报告管理工作规范》的要求，对霍乱疫情应急处置情况依照疫情的发生、发展、控制过程进行初次报告，进展报告和结案报告。

3. 县市级人民医院：指定县市级人民医院为定点医疗医院，成立医疗救治专家组，负责制定和完善医疗救治方案，参与霍乱病人的医疗救治，并做好病人隔离，院内消毒，疫（病）情报告等工作。做好密切接触者的医学观察，协助疾病预防控制中心开展个案调查。做好需转诊患者（疑似病例）的转运和转运车辆的消毒。

4. 各乡镇卫生院（社区卫生服务中心）、民营医疗机构：开设肠道门诊（腹泻病门诊），负责完成门诊和住院腹泻病人的登记、样本采集、检索和信息上报；参与现场流行病学调查、外环境监测，疫点、疫区的消毒；负责病例样本的采集送检；对霍乱疫情应急处理情况依照疫情的发生、发展、控制过程进行信息的收集上报。对接诊的门诊疑似病例及时报告当地疾病预防控制中心，需转诊的由领导小组协调县/市级医院或急救中心专车进行转诊，并及时对患者（疑似病例）污染的场所进行消毒处置。

5. 卫生监督机构：负责按照《传染病防治法》等的有关规定，加大对各医疗卫生机构（含民营医院、个体诊所）的监管，督促规范各项应急处置措施的落实。

6. 爱国卫生运动办公室：负责组织开展爱国卫生运动和大众健康宣传教育。

（三）食品药品监督管理部门

加强对辖区内餐饮经营单位的监管，严格餐具消毒，限制不符合卫生要求的生、冷食品出售；负责突发公共卫生事件应急处理药品、医疗设备和器械的监督管理。

（四）检验检疫部门

加强国境口岸出入境人员的检疫和医学留验观察工作，及时收集和提供边境地区传染病疫情信息，按照国务院颁布《国境口岸卫生监督办法》进行口岸卫生监督，做好出入境通道的消毒措施，协助卫生部门做好追踪、采样等工作，根据疫情流行态势建立临时检疫站（点）。

（五）外事部门

做好突发公共卫生事件应急处理的涉外事务，负责依授权向境外通报情况；加强与境外的信息沟通，尽可能实现双边共同采取有力措施，将危害降到最低。

（六）公安部门

密切关注疫情动态，与卫生等相关部门依法及时妥善处理突发公共卫生事件有关安全问题，加强治安管理，维护社会稳定。协助卫生部门落实强制隔离措施，做好交通疏导等保障工作。

（七）边防部门

加强对出入境，特别是便道入境人员的监管，发现可疑病人及时报告疾控中心。

（八）文体广电旅游部门

协助卫生、检验检疫做好旅游团队及人员疫情监测、健康教育工作，督促旅行社、宾馆、饭店落实预防措施，必要时劝阻或限制疫区旅游活动。

（九）教育部门

加强各级各类学校的管理，组织落实学校肠道传染病预防控制措施，做好在校学生、教职员工的宣传教育和自我防护工作。加强对腹泻学生的及时排查和报告工作。

（十）工商部门

加强市场监管，维护正常市场秩序。

（十一）宣传部门

规范疫情应急处置的宣传报道，加大疾病预防知识的宣传。

（十二）交通运输管理部门

加强运输工具的管理，必要时设置临时交通检疫站，对可能受污染的车辆进行消毒，防止传染病通过交通工具传播。

（十三）财政部门

及时安排应急处理专项资金，并对经费使用情况进行监督。

（十四）各镇人民政府

履行相应的职能，配合卫生部门做好辖区信息收集、报告、消杀、家庭隔离观察等应急处理工作。

六、霍乱疫情的解除

当疫点（区）内各项措施均已落实，所有病例、带菌者粪检连续两次阴性，无新的病例或带菌者出现时，经霍乱防制领导小组组织专家判定，并报请上一级政府批准后可宣布解除疫情。

第三章 疫情调查处置

霍乱疫情的现场调查处置要本着及时、高效、配合默契的原则，强调疫情的调查与处理同步、流行病学调查与实验室检测紧密结合、多部门配合协作共同参与。

第一节 流行病学调查

对疑似或确定的霍乱疫情开展流行病学调查，目的是尽快确定病因、感染来源、传播危险因素等，以便及时采取针对性措施，控制疫情蔓延。流行病学调查的具体任务是要对疫情性质作出判定（确认或排除散发或暴发），明确感染来源、疫情波及范围、疫情发展趋势、可能的危险因素。接到霍乱疫情报告后，开展调查的主要工作流程和工作内容见图 1。

一、调查前的准备

（一）人员组织

调查人员主要包括现场流行病学和病原微生物学专业的人员，必要时请临床医生参与病例的会诊，并邀请卫生监督、食品安全等相关机构专业人员参与危险因素分析及控制措施制定与落实等工作。

（二）用品准备

主要是用于现场调查的物品、记录单以及防护用品等，包括霍乱个案调查表、密切接触者登记表、标本采集记录表、数码照相机；一次性手套、长筒橡皮手套、长筒靴、工作服等个人防护用品以及其他相关物品。

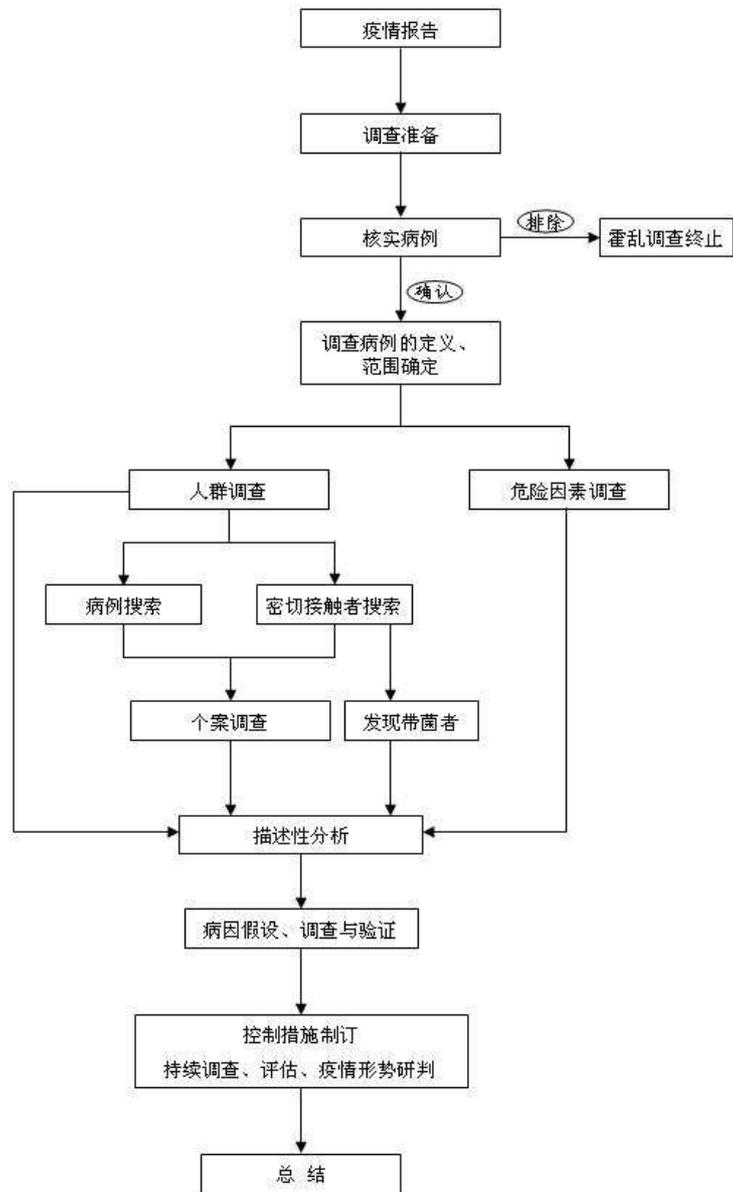


图 1. 霍乱疫情调查的主要工作步骤和内容。

（三）标本采集检测用品

采样拭子（用于核酸扩增检测时，应使用灭菌人造纤维拭子和塑料棒）、吸管、带盖密闭的塑料管（杯）、自封式塑料袋、标签纸、油墨耐水性记录笔、运送培养基、培养皿及选择性培养基（包括强选择性和弱选择性）、增菌培养基及增菌液、诊断血清和鉴别诊断用试剂、其它实验室可能需要的试剂与耗材（如适于现场使用的快速检测试剂）。

（四）调查前的沟通：调查前需要及时与地方政府、卫生行政部分、疾控机构、医疗机构等部门和机构的有关人员进行沟通，就如何开展调查进行磋商；按照疫情发生的具体情况，需要时与教育行政部门、学校、工商（集贸市场管理）、城管（街头摊贩）、公安部门、检验检疫部门、水上交通管理等部门沟通，共同开展调查或取得支持配合。

（五）交通和通讯准备

包括交通运输车辆、手机、传真、配备无线上网卡的笔记本电脑等。

（六）消杀器具及药品，见本章第三节“消毒处置”。

二、疫情核实

疫情核实是首要步骤，包括对对病例诊断的核实和疫情信息的核实。

（一）核实病例诊断

内容包括对报告病例的临床症状、病原学检测的核实。在病原学检测结果上，以县区为单位的首发病例病原学检测结果应送平级或上一级实验室复核。

（二）疫情信息核实

通过疫情报告等途径获得霍乱疫情信息后，除对病例诊断的核实外，应对疫情的其他方面信息、如流行病学史等的真实性进行核实，以排除各种原因造成的误报、错报等；尤其对通过非正规途径获得的疫情信息，更应根据上报或其它消息来源，再次询问报告人、并派出专业人员前往现场（如医院、疫情发生地）核

实聚集性病例或暴发疫情的基本情况和分布特征，初步判定疫情性质和严重程度。在疫情得到核实后，应立即向同级卫生行政部门及上级疾病预防控制机构报告；并尽快开展流行病学调查，以进一步明确疫情的形势，形成分析报告，确定疫情性质（散发事件与暴发事件），提出病因假设、防治措施和下一步工作计划等。

三、明确病例定义

流行病学调查的病例定义不同于病例的诊断标准。霍乱疫情病例定义包含特定的时间、地区、人群和临床症状等基本要素，为进一步明确疫情相关病例，也可将体征检测、实验室结果等要素纳入，比如霍乱弧菌分离株的血清群（型）和生物型别。为有利于溯源，必要时也将分离菌株的分子分型（PFGE）的型别作为病例定义内容，以区别于其他源头因素导致的其他暴发病例。简而言之，流行病学调查的病例定义是针对现场和群体为目标确定的更为宏观的搜索标准，而诊断标准仅是诊断临床个体患者以辅助治疗为目的的判断依据。

调查中需要注意的是：病例定义是用于流行病学调查的人口健康状况统计，为搜索病例、判定疫情发展趋势服务。因此，不应简单地将搜索病例归结为患者的诊断结果，不应以搜索病例作为疫情的报告依据。病例的报告应以诊断标准为依据，对符合诊断的患者进行报告。同样，在最终形成调查结论或进行疫情趋势分析时，应对以病例定义搜索发现的病例进行个体诊断，按诊断标准归入相关的统计类型。

根据病例定义涉及的要素，在制定霍乱疫情调查的病例定义前，应向疫情指征病例及其参与诊治的医务人员了解指征病例的发病时间、症状和体征、流行病学史等基本信息，这对划定病例定义涉及的时间、地区、人群等因素十分重要。同时，病例定义可随调查的不断深入而调整。在调查初期暴发与特定危险因素的关系尚不明确时，可以采用灵敏度高的病例定义，比如以霍乱症状体征、而不能

仅依靠是否分离到霍乱弧菌为依据，以便最大限度地发现病例；随着调查的深入再逐步调整（如修订时间范围、增加特定的暴露史如共同进餐/聚餐史、分离菌株特征及其分子分型的型别），提高特异性。

四、开展病例搜索

为查明疫情的波及范围及影响人群，在疫情可能波及的时间、地区和人群范围内，根据病例定义积极开展病例搜索。病例搜索的方法一般包括：医疗机构就诊病例回顾搜索、入户搜索和应急监测等方式开展。可考虑先以一览表的形式对划定的人群进行健康登记；在登记时如发现某人具有符合病例定义临床症状和/或实验室检测结果时，应进行归类以便开展核实诊断、个案调查、密切接触者调查等工作，以供调查分析使用。

进行病例搜索时，应注意下列情况的信息收集：

（一）对已经明确可疑暴露史的疫情，应收集所有暴露人员的名单，并联系了解各暴露人员的健康情况。

（二）对发生在工厂、学校、看护和托幼机构或其他集体单位的疫情，可通过收集缺勤记录、晨检和校医（厂医）记录，了解可能发病的人员，并要求集体单位负责人或校医（厂医）等协助跟进人员的健康情况。

（三）发生霍乱疫情时，在可能波及的地区建立应急监测哨点，强调各级各类医疗机构对前来就诊的腹泻病人进行流行病学史问询、开展霍乱弧菌相关检测。

五、个案调查

个案调查是指针对每例霍乱病例（或带菌者）开展以调查患者发病危险因素、病后污染情况为主要内容的过程。个案调查是追踪密切接触者、判断疫情形势和制定防疫措施的重要基础。

（一）个案调查的任务和要求

主要包括：推断个体可疑发病因素；为追踪密切接触者及有共同暴露史等高危人群提供相关线索；为疫点和疫区的划定提供基础；为追溯传染源、查明传播途径和污染范围及判定传染来源的性质等提供线索。

（二）个案调查的主要内容

包括个人信息、临床信息、流行病学史以及病后活动情况等四个方面。

1. 个人信息：包括患者及其家庭成员（或共同居住生活者）的基本信息，如姓名、性别、年龄、民族、职业、住址、联系方式等。

2. 临床信息：包括患者的发病和诊疗经过、临床表现、霍乱临床分型、及实验室检测结果等。为分析病例发病危险因素需要，病例的基础疾病史（如胃炎、胆囊炎、胃切除等胃部手术）也可考虑收集。

3. 流行病学史：包括患者个人生活习惯、发病前 5 天饮食史（包括食品种类、进食量、进食时间、地点、烹饪方式、购买食品地点、以及聚餐和外出就餐情况等要素）、饮水情况、与饮食相关的活动及范围等。需请病例仔细回忆，尽可能减少偏倚。病例较多时，绘制病例（或带菌者）分布的简要地图，标出病人和带菌者的住址（发病地点）、发病日期、附近水源和餐馆小吃摊点等。要特别注意收集每例病例在病前 5 天的购买食品（包括蔬菜水果、其他生熟食等）的地点（包括菜市场、超市、小吃摊点等）、外出就餐地点、在外饮水地点等，必要时与病例居住地址一起标注地图。

4. 病后活动：询问和记录患者病后至调查时的活动情况，用于对密切接触者判断和疫点划定。询问记录病后患者排便、呕吐地点等，以进行必要的环境消毒、以及用于污染涉及范围的分析。

个案调查应依据疾病的特点、地区饮食习惯、风俗因素等情况详细制定有针对性、有流行病学意义的调查内容。一般地，可参考本手册提供的霍乱流行病学

个案调查表作参考模板（见附表 1）开展调查，但应注意该调查表为原则性设计，需要根据实际情况对相关内容进行调整和扩充。

对报告病例及病例搜索获知的符合霍乱诊断标准的病例，均应报告和开展个案调查。病例报告的要求详见第二章第二节“霍乱监测”部分。

六、密切接触者调查

在开展核实诊断和病例搜索的同时，结合个案调查信息同步进行密切接触者的判断，并采取相应的管理措施。

密切接触者的判断：判断依据主要是在病人发病前 5 天及其病后或带菌者被发现前 5 天内，与病人或带菌者具有共同的饮食暴露史、共同居住生活史来界定。应注意的是有共同饮食暴露史的人员可能并不相互认识，如在相同时段相同餐馆的就餐者，他们既可能具有共同饮食暴露史也可能没有，这种情况下需要调查者对个案调查资料进行综合分析以便进行判断。

对密切接触者应实行持续 5 天的医学观察和开展粪检霍乱弧菌等工作。详见本章第二节“控制措施”部分。

七、描述性分析

通过信息收集、归纳整理和数据分析等方式客观描述霍乱疫情状况。在处理霍乱疫情时，均应根据调查的情况详细描述疫情的特征、三间分布及发生和发展趋势等。

描述性分析的重要目标是提出病因假设、判断疫情性质、分析发病趋势、制定阶段防治措施和下一步工作计划等。对流行病学调查所获得的各种资料进行描述性分析时，应由表及里，找出各种现象间的内在联系，并形成病因假设，以及对正在实施的各项措施加以修改和充实；同时，根据调查的深入程度随时开展阶段性的描述性分析，以便及时调整调查策略、防控措施等。

描述性分析报告主要内容包括：背景信息、疫情发现经过、病例临床表现、流行病学特征、发病危险因素推断（分析）、（初步）调查结果、已采取措施及下一步工作建议等。在进行霍乱疫情的描述性分析时，应充分考虑霍乱发生的背景，例如：当地的自然地理、水系分布尤其是生活饮用水体分布、气候条件、社会经济状况；人口构成及分布特点；风俗习惯；卫生服务与设施情况；近年来霍乱发病及监测工作情况；邻近地区霍乱发病情况；灾害发生情况如暴雨、台风、洪水等，以扩展流行病学分析的思路。

在进行分析时，应特别注意下述内容：传染来源；病例相互间的传播关系；密切接触者发病与带菌状况；可能污染的场所和传播因素；居民饮食习惯、饮用水状况和水体污染情况；病例（或带菌者）分布与水系分布的关系；海、水产品贸易和消费情况；菌型、耐药性与流行表现及临床类型的关系；预防与控制措施的效果评价以及对疫情趋势的估计等。

调查人员要深入现场，详细询问和掌握第一手材料，归纳整理病例搜索、个案调查和密切接触者调查等信息进行客观分析，切忌主观臆断。对依据不足、暂难作结论的事件，可通过描述和提出疑问及下一步建议，不要强作结论。

八、病因假设与验证

基于调查获得的已知事实、数据和信息，进行病因假设的推断。在完成描述性分析后，应归纳形成疫情波及人群、致病因素、可疑传染来源等的与病因调查相关的假设，并通过调查和分析进行验证，以解释疫情发生的原因，进而指导救治和防控、以及进一步的病因研究。病因假设的提出应能被调查获取的信息（临床特点、初步流行病学调查和实验室检测结果）所支持，并能够解释大部分的病例；切忌脱离调查信息，以及凭借经验主观武断。

验证病因假设的调查应视前期调查信息及相关辅助工作提供的证据（如实验室诊断、环境因素调查等）可利用程度确定。例如：根据流行病学描述分析结合

危险因素调查、病原学诊断、病原体分子生物学分析（如 PFGE）等调查结果已足够提供强有力的支持证据证明病因，这时可在描述性分析的基础上，明确病因。但更多时候，要验证病因假设，需要采取分析性流行病学调查的手段实现；甚至需要以专题研究等方式进行持续反复的“假设-验证-再验证”。设计调查时，在获得危险因素后，仍需进行深入调查，例如不能仅局限于“是否吃凉菜”、“是否到小吃摊”等，需要进一步调查食品种类、来源，水体污染来源等，以尽可能调查到源头，采取控制措施，防止持续出现病例。

（一）病例对照研究

是霍乱疫情调查中最为常用的验证病因假设方法。根据临床诊断、基本的流行病学信息、以及病因假设，设立病例组和对照组，并开展调查分析，比较确诊病例组与对照人群（必须是明确不患该病的个体组成）在某危险因素的暴露比例差别，分析其统计学差异，从而判断某危险因素与疾病之间的关联程度。用于病例对照研究的病例组应尽量选择实验室确诊病例，而对照组则应选择具有共同暴露机会的人群中经过粪便检测已排除带菌的人群。

（二）回顾性队列研究

在霍乱疫情调查中，回顾性队列研究常用于某些能明确跟踪并收集所有受累及人群暴露信息的事件的病因推断。在某个特定人群中（如参加某起聚餐的人群），根据是否已接受某种暴露因素及/或暴露程度的差异将人群分组（即研究队列），测量比较这些不同组的发病率等，以探讨暴露的危险因素与疾病的关联程度。有多个可疑的暴露因素时，应分别针对各可疑暴露因素进行队列研究和分析。

（三）专题调查

在霍乱流行的地区，常出现一些零星的散在个案或小型暴发事件，他们相互之间没有明确的关联，也难以在短期内以分析流行病学的方法探讨病因，这种情况下，常采用专题调查的方式继续疫情发生原因的追溯。

（四）结合实验室分析

对病因分析获得的可能感染线索，采集标本开展病原学追踪，如能获得与病例相同的霍乱弧菌菌株，则对病因分析具有极其重要的支持作用。对分析和怀疑的因素（如食品、水体以及其他相关因素），需要采集大量标本进行霍乱弧菌的分离培养，以获得重要证据。另外，实验室工作也不是要在流行病学病因分析之后。大量的环境和饮食标本的霍乱弧菌分离，同样为病因假设提供可能目标。在一些情况下，尤其霍乱疫情早先呈现散在发生时，流行病学难以判断或者调查到这些病例的共同暴露因素，当对这些病例分离株进行病原体分析、尤其是分子分型（PFGE）并获得一致型别，能够提示流行病学人员提出暴发假设、病因假设并进行更细致的调查。

另一个需要注意的是调查启动时间以及初始和次生污染来源问题。在一个局部地区出现霍乱暴发流行时，可能初始的污染食品已消耗，但因为早先出现的病例粪便等污染本地水体和其他因素，造成后续病例的出现。此时开展调查，可能调查到后续病例的感染来源为次生污染因素（如次生的污染水体、次生的污染食物、以及中间因素小吃摊点等等）造成，因此，一些情况下追溯不到初始源头。注意病因调查是为了有效和迅速控制疫情，调查的任何级别的污染源，均需进行管理控制。

九、危险因素调查

根据病因假设提出或通过分析流行病学获知的危险因素，组织开展实验室验证，查明污染，以获得支撑流行病学调查的重要实验证据。必须注意，当从水、食品或相关环境等危险因素指征中检测到霍乱弧菌时，应尽快开展分离菌株的PFGE等分子分型的分析，以获得与病例菌株一致性比较的实验信息，并结合流行病学推理，确定患者与受污染水、食品等的关联程度。与此同时，危险因素的

实验室调查结果还可用于了解污染面的范围，为划定疫点、疫区及评估防控措施效果等提供佐证。

危险因素调查的主要类型包括：水污染调查、食品因素调查和环境因素调查等。

（一）水污染状况调查

在一些不能保障安全饮用供水的地区，水源污染调查应为必查内容，是评估和推断经水传播的重要证据。患者饮用水源、疫点周围及直接关联的水体（如水井、池塘、河沟、自办自来水厂等）是调查的重点。其他易于污染的水体如粪肥污染处、污水排放口、水产品码头、渔港水体等，也应根据流行病学指征开展抽样检查。

水污染调查的采样检测及阳性水体的管理等详见第五章第二节“实验室检测”及本章第二节“控制措施”部分。

（二）食品相关因素调查

通过描述性分析和/或病因假设推论怀疑为食源性因素发病时，开展食品相关因素调查工作有助于提供有力的实验室证据支持。食源性危险因素调查主要包括烹饪污染调查、饮食业人员健康调查、水产品污染调查等内容。

1. 烹饪过程的污染调查：通过仔细询问了解可疑食品从采购到餐桌全过程、厨房卫生状况（包括储存方法、餐厨具的清洁方法、食品加工工具如砧板、刀具、碗碟等是否生熟分开、苍蝇出没情况等）、厕所卫生状况（包括粪便管理、日常消毒处理、蝇虫滋生情况）及污水管理情况；对这些环节采集大量样品进行实验室检测，结合实验室采样检测结果，综合判断获得烹饪存在的或潜在的污染环节。应注意通过食品（包括海、水产品）销售和加工环节导致的交叉污染、造成后续污染食品引起暴发。例如聚餐暴发中，通过病例对照研究可能发现某种凉菜是危险因素，但有可能这种凉菜在加工过程中受带菌海、水产品的交叉污染所致。

烹饪过程污染调查的样品采集,可考虑收集如剩余食物、加工工具(如砧板、刀具、碗碟等)、厨房垃圾及污水、苍蝇等。

2. 食品加工人员的健康调查:在怀疑与餐馆、临时性聚餐等因素相关时,不但要了解食物的烹饪过程,也要调查饮食加工人员的健康状况。餐馆从业人员要纳入密切接触者进行医学观察与管理。同时,向这些人员仔细了解烹饪过程,分析可能的污染线索。

3. 海、水产品污染调查:海、水产品易发生霍乱弧菌污染,并随销售转移到内陆。需要采集海、水产品进行霍乱弧菌分离鉴定。

(三) 环境因素调查

病例生活居住环境调查包括对病例住所及其周边区域的交通、河流、饮用水网、可疑污染源布局;病例(或其家庭)饮(用)水类型;使用的厕所是否有渗漏从而污染周围环境尤其是水体的可能;生活垃圾堆放、处理方式等等。

十、措施制定和形势判断

控制措施的制定和调整始终贯穿流行病学调查的整个过程。在核实疫情后,必须尽快判定疫情的严重程度,提出早期控制措施,防止疫情续发、蔓延,并尽快扑灭疫情。控制措施的制定实施详见本章第二节“控制措施”。

疫情形势分析是根据疫情现况、流行病学调查和实验室检索等结果对疫情发展开展的风险评估。进行疫情形势研判时,应充分考虑的要素包括:发生疫情以来,随时间推移发病人群和地区分布的变化趋势;门诊腹泻病例就诊的变化趋势;病例年龄分布、临床症状特点以及与既往相比是否有变化;与暴发相关的食品或水等危险因素的相关情况;控制措施的有效性;邻近地区的霍乱发病情况;自然与环境因素以及社会因素的影响等等。综合分析霍乱疫情的分布与发展特征和流行因素,对疫情的严重程度和发展变化趋势作出评价,适时调整措施和响应级别,并提出下一步工作建议。

十一、调查总结

调查总结要在调查结束后开展，而且根据需要，常需进行阶段性总结，以便为下一阶段措施的调整提供依据。流行病学调查报告应详尽描述事件调查的起因、调查方式方法、调查结果、病因推断与分析、调查结论及依据、控制措施与效果评价等内容。

根据最终确认的病例数、病例的分布等资料，由卫生行政部门组织相关领域的专家对事件的分级进行研判，评估采取的防控措施效果，对疫情发展的趋势作出预测，总结疫情调查处理过程中的经验和教训，并形成最终的总结报告。

第二节 控制措施

发生疫情后，应迅速组织力量核实诊断，判定疫情的严重程度，查明传播因素，追溯传染来源，以便及时采取更富有针对性的控制措施，防止疫情续发和蔓延，并尽快扑灭疫情。如疫情达到突发公共卫生事件的相应级别，应按照《中华人民共和国传染病防治法》和《突发公共卫生事件应急条例》的规定启动应急预案、组织开展公共卫生行动。如通过调查发现病原体属于产毒株时，应严格按照霍乱采取控制措施；如属非产毒株（或噬菌体-生物分型中的非流行株），可考虑按一般感染性腹泻的控制措施进行处置。

一、疫点、疫区划定

应依据流行病学调查结果、疫情趋势和风险评估科学划定疫点、疫区的范围，并尽可能减少对当地居民的工作、生活影响。疫点、疫区划定和处置目的在于及时发现和管理传染源，切断传播途径，保护易感人群，及时控制疫情的发展。

（一）疫点

指发生病人、疑似病人或发现带菌者的地方，可以考虑为因病例或带菌者的日常起居活动及其排泄病原体可能污染到的范围。要根据流行病学指征来划定疫点，一般指同门户出入有生活接触的住户或与病人、疑似病人、带菌者生活上密切有关的若干户为范围。根据传染源的污染情况，一个传染源可有一个以上的疫点。

（二）疫区

是指持续出现多个霍乱病例的地区。根据疫情流行特征和传播趋势、当前所有疫点的地理分布、水系分布、交通情况、自然村落、其他传播危险因素等要素综合评估来划定疫区。疫区内包含多个疫点。一般在农村以一个村或几个村、一个乡或毗邻乡，在城市以一个或几个居委会或一个街道为范围划为疫区。划分疫区是为了明确采取公共卫生控制措施的范围、防止病原体自疫点向外污染和疫情向外播散。

二、疫点处理

（一）传染源管理

病人、疑似病人和带菌者应实行就地（近）隔离治疗。若转送病人，必须随带盛放吐泻物的容器和消毒药械。对途中污染的物品、地面和运送病人之工具要及时消毒处理。病人、疑似病人及带菌者需在医疗机构或临时医疗点隔离治疗，达到出院标准后方可出院；或经粪便检测阴性后方可解除隔离管理。病人粪便、呕吐物、以及可能被污染霍乱弧菌的物品，均需进行严格消毒处理。

（二）接触者管理

对密切接触者可采用一览表方式登记个人信息和联系方式，并进行医学观察，跟踪5天健康状况，开展卫生宣教，告知医学观察内容，接受便检，不能参加聚餐、集会等活动，必要时对其排泄物进行消毒，防止污染水源、食品。与此同时，采集密切接触者的粪便或肛拭子进行霍乱弧菌检测，这也是发现霍乱带菌

者的主要途径。为及时控制霍乱传播，对所有密切接触者均应开展至少一次粪便或肛拭子的霍乱弧菌培养检测。

一旦接触者出现腹泻等相关症状或粪检检出 O1/O139 群霍乱弧菌，应尽快予以核实诊断和实施隔离治疗；对粪检阴性且无腹泻等相关症状者无需采取服药措施。在无条件及时开展粪检且医疗可及性较差的偏远地区（如远航渔船或医疗资源匮乏的灾区），仍需坚持对密切接触者的粪便进行严格管理消毒，并实施医学观察满 5 天，出现腹泻时立即进行隔离治疗。

（三）疫点消毒

认真做好随时消毒和终末消毒，特别要注意病人、疑似病人和带菌者吐泻物的消毒和处理。受污染的水源、缸水、物品、食具、衣物、病人吃剩的食物、地面、墙壁等都要分别情况消毒处理。要仔细追查病人，对疑似病人和带菌者近期内可能污染过的地方和物品应进行消毒。具体消毒措施详见本章第三节“消毒处置”。

（四）其他措施

由当地政府负责疫点的全面管理，疾病控制部门做好技术指导和技术措施的监督落实。疾病控制部门应加强与疫点所在地镇（街）政府的沟通，督促开展卫生宣教，落实饮用水消毒、杀蛆灭蝇以及改善环境卫生等措施。卫生监督及食品安全部门应加强饮水、饮食卫生的监督活动，督查防控措施的落实。

（五）疫情公布与风险沟通

除按照《传染病防治法》的规定由相关卫生行政部门定时公布疫情外，在发生霍乱暴发事件时，卫生行政部门应根据疫情防控工作的需要依法向公众发布疫情，并告知公众潜在风险及应采取的行动。只有及时公布疫情信息和良好的风险沟通策略才有利于提高公众积极参与防控工作的主人翁意识，减少因隐瞒疫情而

人为造成的谣言和公众恐慌，有利于社会的安定和谐和具有广泛群众基础的防病灭病。

三、疫区处理

除在疫点内采取严格的防疫措施外，还应在疫区范围内开展群众性爱国卫生运动，加强疫点外围的监测与预防工作，及时发现传染源，防止传播。主要工作如下。

（一）应急监测与检索

尽快组织疫区内各级医疗机构开展腹泻病应急监测，建立和强化监测报告系统，落实到单位和人员，以及时发现病人、疑似病人和带菌者。对腹泻病人要做好登记报告、采便送验和及时治疗，发现疑似病人时要及时隔离留验。组织乡村医生或公共卫生人员开展主动监测，认真做好查病报病，规范开展个案调查；对疫区人群，要按流行病学指征进行检索，及时发现传染源，特别要及时发现与首发病例同期内的所有腹泻病人并及时处置。制定应急监测方案时，应依据流行病学调查结果和疫情形势研判，并结合实验室检测能力，通过制定具体的病原检索任务来督促各级医疗机构落实。应急监测的内容不但涵盖腹泻病人，还应覆盖重点人群、水体、水产品、餐饮业等多个方面。

（二）加强生活用水卫生管理

提供安全生活用水是预防和控制霍乱传播的治本之道。各级地方政府应加大力度投入饮用水工程的改造，落实饮水改造工程，保护好饮用水源。在饮用河水的地区，禁止在河内洗涤便桶、病人衣物、食具、食物及下河游泳。饮用塘水的地区，提倡分塘用水。饮用井水的地区，水井要有栏、有台、有盖、有公用水桶，要安排专人负责饮用水消毒。使用以上水体作为生活用水的，需要对水体采样检测水质和分离霍乱弧菌，督促取回水体的消毒。饮用自来水地区，加强出厂水余

氯监测，余氯要符合标准。尤其要注意村镇小自来水厂的水源、制水、供水管道安全，以及加氯消毒。

（三）加强饮食卫生和集市贸易管理

认真执行《中华人民共和国食品卫生法》，不准出售不符合卫生要求的食物。凡不符合卫生要求的饮食店、摊要限期达到卫生要求，在未达到卫生要求前可暂时停止营业。病人、带菌者、密切接触者等与霍乱疫情相关的人员不得从事饮食服务业活动，必要时对饮食从业人员实行带菌检查。

加强集市贸易的食品卫生管理，严格执行各项卫生规章制度，卫生监督部门要加强检查。对被霍乱弧菌污染的食品，必须停止生产及销售，严防发生食源性传播、流行，并应查清污染食品的来源以及销售去向，以便采取相应的防控措施。

（四）做好粪便管理，改善环境卫生

粪便管理以不污染环境，并达到无害化处理为原则。落实农村和城镇的改厕工作，改造、清除可能污染饮用水源的厕所。

（五）落实健康教育与风险沟通工作

疫区内要全面开展预防霍乱的宣传教育工作，告知公众如何预防霍乱、不喝生水、不吃不洁食物、出现腹泻后如何就医等防治知识。同时，因地制宜地开展形式多样、公众易接受的健康教育活动；加强风险沟通，避免造成恐慌情绪发生。健康教育的要点如下：

1. 告知公众，霍乱是因不洁饮食而患病。预防霍乱应做到不喝生水，不吃生冷变质的食物，特别是不生吃海产品和水产品；市场购买的熟食品和隔餐食品要加热煮透；饭前便后要洗手，碗筷要洗净或消毒，生熟炊具要分开，开展防蝇灭蝇；不随地大便，不乱倒垃圾污物，不污染水源。

2. 霍乱的症状体征及传播途径，不及时就诊与隔离治疗的危害。发现吐泻病人及时报告并督促及时就诊。

3. 教育群众做好宴请和聚餐的卫生管理，落实生熟分开的原则，必要时可邀请卫生监督部门指导。

4. 教育群众如何开展散在式供水（缸水等）的饮用水消毒。

（五）国内交通检疫和国境卫生检疫

通过疫情评估发现潜在发生跨区域传播或国境输入等情况时，应根据《中华人民共和国传染病防治法》、《突发公共卫生事件应急条例》和国务院第 254 号令《国内交通卫生检疫条例》的有关规定实施国内交通检疫、限制人群流动，防止传染源扩散。如需国境卫生检疫，由各地国境卫生检疫机构按《中华人民共和国国境卫生检疫法》及有关条例、细则执行。

四、阳性水体的管理

对检出产毒株（产霍乱毒素或具有霍乱毒素基因的菌株）的阳性水体，必须加强管理和监测。应插上警示牌或其他有效告知办法，告戒群众暂勿使用此水。与阳性水体有关的地区，要加强联防。对周围人群或重点人群进行监测；在阳性水体周围检出病人和带菌者时，要引起警惕，防止水型暴发或流行的发生，对水体两岸地区进一步做好饮用水消毒和粪便管理。阳性水体中的水生动、植物，在水体阳性期间禁止捕捞和移植，直至阴转为止。

五、疫区预防接种

在流行区和疫区是否使用霍乱疫苗，要组织专家根据当时当地的具体情况，如疫情严重程度、发展形势、流行时间、疫区经济状况、安全生活用水的可及性、公共卫生措施的可实施程度、流行菌株血清群等进行论证后再予定夺。需要接种疫苗时，进行流行病学分析，评估确定接种人群、接种地区范围和接种率。疫苗接种是综合性措施中的一种辅助性措施，与前述主要控制措施相辅相成，但在霍乱的防控实践中，始终应坚持“以切断传播途径为主导”的这一根本原则。

第三节 消毒处置

接到霍乱疫情报告后应同时准备消毒工作。消毒处置包括随时消毒和终末消毒。随时消毒是指有传染源存在时进行的消毒，其目的是及时杀灭或去除传染源所排出的病原微生物。终末消毒是传染源离开后进行的一次彻底的消毒，如霍乱病人出院、转移或死亡后，对其住所及污染的物品进行的消毒。不同消毒对象采用的消毒方式以及常见消毒剂的选择等，详见附件 1 “消毒对象与消毒方法”和附件 2 “常用消毒剂及其选择”。

一、终末消毒

霍乱的终末消毒应在当地疾病预防控制机构的监督指导下，由有关单位和个人及时进行或由当地疾病预防控制机构负责；医院的终末消毒由医院安排专职人员进行。

（一）病家终末消毒

消毒人员接到消毒通知后，应立即检查所需消毒用具、消毒剂和防护用品，做好准备工作，迅速赶赴病家按下列程序开展终末消毒工作。

进行病家消毒时，应仔细了解病人患病前和患病期间居住的房间、活动场所，用过的物品、家具、吐泻物、污染物倾倒或存放地点，以及污水排放处等，测量污染范围内需消毒的房屋体积及地面面积，以及需消毒的污物量，以便确定消毒范围，并根据不同对象及其污染情况，选择适宜的消毒方法（见附件 2），将需集中消毒的污染衣服、床单等用品收集在一起进行处理（或放入大帆布袋或一次性塑料袋中送当地疾病预防控制机构或消毒站消毒）。必要时，检验人员对不同消毒对象进行消毒前采样。消毒前应关闭门窗，保护好水源（盖好灶边井、水缸等），将未被污染的贵重衣物、饮食类物品、名贵字画及陈列品收藏好，并在室

内灭蝇。消毒室内地面、墙壁、家具和陈设物品时，应按照先上后下，先左后右，依次进行。当几个房间均需消毒时，先外后内，由污染轻的到污染重的。

病人的排泄物、呕吐物、分泌物、残余食物等，以及装前述污物的便器、痰盂、痰杯和用过的日常生活用品(食具、毛巾、抹布、牙刷、毛巾等，以及皮张、兽毛、奶制品等)应严格进行消毒。病人用过的餐(饮)具、污染的衣物若不能集中在消毒站消毒时，可就地煮沸或浸泡消毒。浸泡消毒时，必须使消毒液浸透被消毒物品；擦拭消毒时，必须反复擦拭2次~3次；对污染重、价值不大的物品，征得病家同意后焚烧。

室内消毒后，应对厕所、垃圾、下水道口、自来水龙头或饮用水井等进行消毒。

根据需要，到达规定的消毒作用时间后，检验人员对不同消毒对象进行消毒后采样。

(二) 病房的终末消毒

对专门收治霍乱的医院或病区进行终末消毒时，执行消毒的人员应按下列程序开展终末消毒工作。病房终末消毒的重点是对病区内病人专用的厕所或便器，消毒器具、清洁用具，病人吐泻物、废弃物，病床、床头柜、床上用品等必须严格消毒处理。

完成消毒任务后，消毒人员相互将外层防护从头到脚进行喷雾消毒，出污染区在半污染区内，按顺序脱下塑料帽、工作帽、防护眼镜、口罩、连体防水隔离服、鞋套和防水鞋并换上拖鞋，将其一并放入黄色污物袋内连同消毒用具和器械统一进行消毒处理；对手进行浸泡或擦拭消毒；换上拖鞋，进入淋浴间淋浴后，更衣室更换新工作服，出更衣室进入清洁区。

(三) 集中治疗点的终末消毒

集中治疗点除完全参照病房的终末消毒程序进行消毒外，还要特别注意治疗点内所有医疗废物、生活垃圾、污水和环境表面的消毒处理。

（四）霍乱病人或疑似霍乱病人尸体的处理

对霍乱或疑似霍乱病人尸体，需表面先用 5% 漂白粉上清液或 0.5% 过氧乙酸溶液喷雾，口腔、鼻孔、肛门、阴道等开孔处，用浸消毒液的棉花堵塞，然后送火葬场焚化。根据各地风俗习惯，必须入棺或直接入土埋葬时，公共卫生人员应予指导，在尸体上下及两侧撒布新鲜石灰（每具尸体约需石灰 30 斤），然后盖棺封闭或用布包紧，选择远离水源、地势较高处，深埋 1m 以下。医疗和公共卫生人员应说服群众不举行丧礼，提倡火葬。参加尸体处理的全体人员，工作完毕后应进行消毒处理。在少数民族聚居区，由于不同民族的传统丧葬习俗和观念不尽一致，因此在具体处理时，必须谨慎行事，必要时由政府出面，约请该民族中有影响的人士参与协调后再依法处理。做到既坚持尸体处理的科学性，又得到死者亲属的认同和满意。

二、随时消毒

疾病预防控制机构的消毒人员接到患者诊断与消毒通知单后，应立即派人到现场指导随时消毒，必要时提供所需消毒剂与器械。交给病家使用的消毒剂，应标明名称和使用方法。随时消毒由医院安排专职人员进行，对病人应根据病情做到“三分开”与“六消毒”。

“三分开”是指：分住室（条件不具备可用布帘隔开，至少要分床）；分饮食；分生活用具（包括餐具、洗漱用具、便盆、痰罐等）。“六消毒”是指：消毒排泄物；消毒生活用具；消毒双手；消毒衣服、被单；消毒患者居室；消毒生活污水。

护理人员除做好病人的随时消毒外，应做好本人的卫生防护，特别是在护理病人后，应消毒双手。

消毒指导人员与负责随时消毒人员，应共同填写消毒工作记录，及时上报，必要时，采样进行消毒效果检测与评价。

（一）呕吐物的无害化处理

病人的呕吐物应尽量吐入专用容器中，并及时进行处理，防止溢洒。

（二）排泄物的无害化处理

病人要有专用厕所或便器，若条件达不到，可用专用容器收集病人的排泄物。对排入厕所或便器的病人排泄物，若有污水消毒处理设施，可直接水冲；若无污水消毒处理设施，则需严格消毒后排放。用专用容器收集的排泄物和地面的排泄物处理方式同呕吐物。织物上的排泄物应立即处理，可采用煮沸、浸泡等消毒方式进行消毒。

厕所、便器或盛装容器每次使用后应及时消毒，可采用喷雾法或浸泡消毒法进行严格的消毒处理。厕所可采用喷扫消毒剂的方式消毒，便器或盛装容器可采用消毒剂完全浸没的方式消毒，达无害化后方可再次使用。

（三）污染环境的处理

污染的房间、厕所、走廊等环境表面，应先消毒再清除明显的排泄物；对泥土地面还应刮去污染表土，用专用容器盛装后按排泄物处理，再用含氯消毒剂或过氧乙酸进行喷洒消毒；对非泥土地面直接用含氯消毒剂或过氧乙酸进行喷洒消毒。

（四）污染物品的处理

对耐热耐湿物品，如棉织物、金属、陶瓷、玻璃类物品，用加热煮沸 15min 或压力蒸汽灭菌，也可用含氯消毒剂浸泡消毒，也可用季铵盐类消毒剂或其他符合国家卫生标准、卫生规范和相关规定要求的消毒剂进行消毒。

对不耐热不耐湿物品，如书籍、文件、字画、污染的棉絮、皮毛制品、羽绒制品等，可用环氧乙烷灭菌柜处理。

对污染的精密仪器、家电设备等物品可用乙醇、季铵盐类消毒剂擦拭消毒。

对耐湿物品不耐热的物品，如各种塑料制品、用具、容器、人造纤维织物等，可用含氯消毒剂或过氧乙酸浸泡或擦拭表面消毒。也可用符合国家卫生标准、卫生规范和相关规定要求的消毒剂进行消毒。

若需进行熏蒸消毒，则应在密闭环境中进行，室内相对湿度应在 80%以上，温度应在 30℃ ~ 40℃ 为宜。

（五）废弃物的处理

诊疗过程中产生的医疗废物和病人的生活垃圾按感染性废物进行处理，有条件时送医疗废物处理站集中处理；若无条件，则就地及时处理，可进行压力蒸汽灭菌或焚烧处理。

（六）手部卫生

医护人员诊疗前后，接触污染物后，必须进行手卫生。在无明确污染物时，可使用速干手消毒剂进行涂擦消毒；有明显污染物时，应先洗手，干燥后再进行手卫生。病人在饭前便后应进行手卫生，家属在接触病人和污染物后应进行手卫生。

（七）运输工具

车、船内外表面和空间，可用 0.5%过氧乙酸溶液或者 10000mg/L 有效氯含氯消毒剂溶液喷洒至表面湿润。对密闭空间还可用 2%过氧乙酸进行气溶胶喷雾。

（八）污水消毒

疫点内的生活污水，应尽量集中在缸、桶中进行消毒。加入消毒剂混匀作用 1.5h 后，余氯大于 6.5mg/L 时即可排放。集中治疗点和医院宜按照《医院污水处理设计规范》，建集中污水消毒处理装置，条件不具备的情况下，可同上处理。

疫区内的生活污水，可使用含氯消毒剂进行消毒。消毒静止的污水水体时，应先测定污水的容积，而后将消毒剂投入污水中，搅拌均匀，作用 1.5h 后，余

氯大于为 6.5mg/L 时即可排放。对流动污水的水体，应作分期截流，在截流后，测污水容量，再按消毒静止污水水体的方法和要求进行消毒与检测，符合要求后放流，再引入并截流新来的污水，如此分期依次进行消毒处理。

三、饮用水消毒与管理

应加强对集中式给水的自来水厂管理，确保供水安全，集中式供水出厂水余氯量不得低于 0.5mg/L，末梢水余氯量不得低于 0.05mg/L。同时亦应重视对分散式供水的管理与消毒，分散式供水如直接从江、河、渠、塘、井取水者，应在盛水容器内按每升水加入 1mg ~ 5mg 有效氯消毒剂进行消毒，要求作用 30min 后，余氯量应达 0.5mg/L。

（一）井水

可采用直接投加漂白粉消毒法或持续加漂白粉法，具体方法详见附件 1 “消毒对象与消毒方法”部分。

（二）河、湖、塘水

用河、湖水作为饮用水源时，应先定好取水点。清除取水点周围 100m 内各种污染源，禁止在该处洗澡、游泳、洗衣等，并防止牲畜进入。较大的水库和湖泊可采用分区用水，河流可采用分段取水。

水塘多的地区可采取分塘用水，选择水质较好水量较大易于防护的水塘专供饮用。塘的岸边可修建自然渗滤井或砂滤井，以改善水质。

如果在水体中检出肠道传染病病原体，应在沿河、塘边树立警告牌，告诫群众，暂停使用此水。阳性水体中的水生动植物，在水体阳性期间禁止捕捞或移植，直到水体转阴为止。

（三）缸水

由于河、湖及塘水的水量大，流动快，饮用水最好采用缸水法处理。当缸水浊度高于 3 度时，应先经洁治处理（混凝沉淀、过滤）后再进行消毒。

水中余氯量过高，有明显氯臭时，饮用前可用煮沸、吸附和化学中和等方法进行脱氯处理。中和药物的用量，可用递增加药法测试，以刚好使氯臭消失的用量为准。一般情况下，使用硫代硫酸钠进行化学中和时，其用量为余氯量的 1.7 倍以上；用亚硫酸钠时，其用量约为余氯量的 3.5 倍。使用的中和药物应符合有关标准和要求。

四、消毒效果的评价

（一）消毒过程的评价

每次消毒工作均需详细记录，认真填写消毒工作记录表，根据填写的消毒剂用量、浓度、作用时间和消毒方式等内容，与本手册提供的消毒方法进行比较，对消毒措施是否合格做出评价。

（二）消毒效果的评价

通过检测各种消毒对象消毒前后的微生物含量，计算其杀灭率，同时进行相应致病菌—霍乱弧菌的分离与鉴定。物体表面的消毒效果评价宜采用模拟现场试验和现场试验相结合，排泄物、呕吐物和水的消毒效果评价宜采用现场试验。

1. 物体表面的检测方法

病人经常接触的物品是物体表面的检测重点。例如，餐（饮）具、门把手、床头柜、便器等。

（1）现场试验

1) 消毒前采样：将无菌棉拭在含 10mL 磷酸盐缓冲液（PBS）试管中浸湿，并于管壁上挤压至不出水后，对无菌规格板框定的被检物体表面涂抹采样（采样面积为 5cm × 5cm），横竖往返各 8 次，使棉拭四周都接触到物体表面，以无菌操作方式将棉拭采样端剪入原 PBS 试管内，充分振打后，进行活菌培养计数。对不适宜用规格板采样的物体表面（如门把手，热水瓶把等）可按实际面积采样。

2) 消毒后采样: 消毒至设定的时间后, 在消毒前采样点附近的类似部位进行棉拭涂抹采样。除用采样液代替 PBS 外, 其余步骤和方法与消毒前采样相同。

3) 活菌计数: 将消毒前、后样本 4h 内送实验室进行活菌培养计数。菌落数计算公式: 物体表面菌数 (cfu/cm²) = KN/SV。式中: K 为稀释量; N 为平板上菌落数 (cfu); S 为采样面积 (cm²); V 为接种量 (ml)

4) 计算杀灭率:

$$\text{杀灭率} = \frac{\text{消毒前样本菌落数} - \text{消毒后样本菌落数}}{\text{消毒前样本菌落数}} \times 100\%$$

(2) 模拟现场试验

1) 染菌: 以人工染菌的方式进行试验, 可选择桌面、地面、墙壁等物体表面, 一般可用木制桌面为代表。染菌前, 先用消毒剂对需染菌表面进行消毒处理, 然后将制备好的大肠杆菌 (8099) 菌悬液用无菌棉拭均匀涂抹于物体表面, 待自然干燥后进行试验。染菌量为 1.25×10^7 cfu/样本 ~ 1.25×10^8 cfu/样本 (相当于 5×10^5 cfu/cm² ~ 5×10^6 cfu/cm²)。

2) 消毒前采样: 将无菌棉拭在含 10mL 磷酸盐缓冲液 (PBS) 试管中浸湿, 并于管壁上挤压至不出水后, 对无菌规格板框定的染菌物体表面涂抹采样 (采样面积为 5cm × 5cm), 横竖往返各 8 次, 使棉拭四周都接触到物体表面, 以无菌操作方式将棉拭采样端剪入原 PBS 试管内, 充分振打后, 进行活菌培养计数。

3) 消毒后采样: 消毒至设定的时间后, 在消毒前采样点附近的类似部位进行棉拭涂抹采样。除用采样液代替 PBS 外, 其余步骤和方法与消毒前采样相同。

4) 活菌计数: 将消毒前、后样本 4h 内送实验室进行活菌培养计数。计算方法同上。

(3) 霍乱弧菌的分离与鉴定

待消毒结束后，检测物体表面是否存在相应致病菌即霍乱弧菌，方法详见第五章。

2. 排泄物、呕吐物的检测方法

(1) 消毒前采样：取 1mL（或 1g）污染物放入含 9mL PBS 的试管，振荡混匀，取 0.5mL 放入另一含 4.5mL PBS 的试管内。

(2) 消毒后采样：消毒至设定的作用时间时，进行消毒后采样。采样步骤和方法除用采样液代替 PBS 外，其余均与消毒前相同。

(3) 活菌计数：将消毒前、后的样品 4h 内送实验室进行活菌培养计数。计算方法同上。菌落数计算公式：排泄物呕吐物含菌量 (cfu/g 或 cfu/mL) = KN/WV。式中：K 为稀释量；N 为平板上菌落数 (cfu)；W 为试验样本重量或体积 (g 或 mL)；V 为接种量 (mL)。

(4) 霍乱弧菌的分离与鉴定：待消毒结束后，检测排泄物、呕吐物中是否存在相应致病菌即霍乱弧菌，方法详见第四章“实验室检测分析”。

3. 水的消毒效果检测方法

(1) 消毒前采样：取拟消毒水样于 2 个无菌采样瓶中，每瓶 100mL。

(2) 消毒后采样：消毒至设定作用时间后，分别将消毒后水样采入 2 个装有与消毒剂相应中和剂的无菌采样瓶中，每瓶 100mL，混匀，作用 10min。

(3) 活菌计数：将消毒前、后的水样 4h 内送实验室进行检测。将水样注入滤器中，加盖，在负压为 0.05MPa 的条件下抽滤，滤完后，再抽气 5s，关闭滤器阀门，取下滤器。用无菌镊子夹取滤膜边缘，移放在品红亚硫酸钠琼脂培养基平板上。滤膜的细菌截留面朝上，滤膜与培养基完全紧贴。将平皿倒置，放于 37℃ 恒温箱内培养 22h ~ 24h 后观察结果。计数滤膜上生长的带有金属光泽的黑色大肠杆菌菌落。计算方法同上。

水中含菌量计算公式为：水中含菌量 (cfu/mL) =KN/WV。式中：K 为稀释量；N 为平板上菌落数 (cfu)；W 为试验样本重量或体积 (mL)；V 为接种量 (mL)。

(4) 霍乱弧菌的分离与鉴定：待消毒结束后，检测水中是否存在相应致病菌（霍乱弧菌），方法详见第四章“实验室检测分析”。

4. 消毒效果的评价标准

(1) 消毒后消毒对象中未检出霍乱弧菌。

(2) 消毒后消毒对象中自然菌的杀灭率 $\geq 90\%$ 。

(3) 消毒后物体表面上人工污染的大肠杆菌杀灭率 $\geq 99.9\%$ 。

(4) 饮用水消毒后水样中大肠菌群下降至 0/100mL；污水消毒后大肠菌群 ≤ 500 个/L；连续 3 次采样未检出霍乱弧菌。

通过检验，若符合以上全部要求者，可判为消毒处理合格。

(三) 消毒效果的流行病学评价

消毒结束后，在一个潜伏期内（5 天），未发生霍乱，则可判定为上次消毒合格；若在一个潜伏期内再次发生霍乱，则需进一步调查发病原因，考虑是否是消毒不合格引起。

第四节 防制效果评价与疫点、疫区解除

一、防制效果评价

评价防制措施的实施效果，可从措施内容、各项措施的实施过程、取得效果和社会经济效益、调查与检验质量控制等方面进行科学评价，以提高效率、增进效益、总结经验、改进措施、更好地指导工作。防制效果评价并不仅仅在事件结束后才进行，在控制措施实施的过程中，不断结合疫情分析结果，及时评价控制效果和调整措施。

防控措施的效果评价应设计、制订评价方案，有计划地调查收集数据、资料进行评价。

（一）评价方案的制订

在开展预防控制措施前均应设计和制订评价方案，预先调查、收集预防控制措施前的资料，包括监测点资料与流行病学调查资料，有计划地开展预防控制前后相关指标的比对评价。评价方案可以评价一项措施、也可以评价多项综合措施。

（二）评价内容与指标

评价内容可包括所有预防控制、监测检测工作，可选择相对应的特异和敏感指标开展评价，这些指标包括实施过程好坏的指标（过程性指标）和实施效果如何的指标（结果性指标）；根据不同需要，可选择开展以下内容和指标。

1. 治本措施如水改、粪管、污水排放等对霍乱等腹泻病发病率的影响，同时可结合水改、粪管率等过程性指标评价。
2. 腹泻病监测可用腹泻病人的发病率（罹患率）、就诊率和腹泻病人的粪检率、检出率、阳性率等进行评价。
3. 病例诊治效果可用病死率、病人各类临床型比例等指标评价
4. 传染源管理效果从疫情报告率、疫情报告时限、传染源管理及时率、病人隔离率、续发传播等指标评价；
5. 暴发疫情、疫点处理效果；可用暴发疫情起数、病例数，二代发病率、疫点处理率等评价；
6. 从消毒药配制、使用量、方法等过程指标、消毒前后指标比较评价消毒效果；
7. 用应接种对象的疫苗接种率、保护率评价疫苗接种效果；
8. 用投入的卫生资源和减少发病的效益进行社会效益与经济效益评价。

（三）评价结果的应用

通过上述科学的、有客观数据的评价可以肯定经济有效的控制措施、对无效或难以实施的措施进行剔除，或在资源有限的情况下确定优先措施。同时可以发现预防控制过程中存在的问题，有针对性的进行改正，使今后的控制措施更加完善。

二、疫点、疫区的解除

（一）疫点的解除

当疫点内采取的措施均已落实，密切接触者经过粪检和医学观察期，无续发病人或带菌者出现时可予以解除；若有新病人和带菌者出现，则继续做好疫点内各项工作，达到上述要求时再行解除。如无粪检条件，自疫点处理后 5 天内再无新病例出现时亦可解除。

（二）疫区的解除

疫区的解除应对疫情控制程度、控制效果进行综合评价后，在最后一例病例出现后一个最长潜伏期后无新病例发生，确定无再传播和扩散后方可解除。疫情解除后，为了防止再次发生，继续做好以下几项工作，即：加强腹泻病监测，卫生宣传教育、“三管一灭”、重点人群检索等常规工作。此外，霍乱监测可与其他腹泻病的监测结合进行。疫情解除后腹泻病监测时间的长短，可根据流行病学特征而定。

第四章 实验室检测分析

尽快确定疫情和及时发现传染源，对扑灭霍乱疫情极为重要。病人的早期发现，首先依靠临床诊断和流行病学指征，并立即进行病原学检测。迅速准确的检验诊断可为及时采取各项防疫措施提供可靠的依据。对于典型症状病人或高度怀疑的病人，根据临床诊断、在没有获得病原学诊断前，即可采取必要的紧急措施。但轻型病人和带菌者不经检验诊断则很难予以确诊，而这些隐蔽的传染源，在霍乱感染中所占比例很大，能造成疫情的扩散和难以消除。作为我国法定报告管理的甲类传染病，需要实验室常备诊断试剂，临床医生应具备高度的诊断排查意识，通过临床诊断鉴别和实验室检测，在霍乱的预防控制中，做到早期发现、及时诊断、就地扑灭、防止蔓延。

第一节 实验室工作体系和检测报告程序

一、实验室体系组织分工

根据目前我国疾控体系的分级，将霍乱防控工作中的实验室体系分成三级：县级、地（市）级和省级。各级实验室在霍乱常规监测、专项监测以及霍乱疫情应对中的任务大致如下：

（一）县级实验室

由县疾控中心协调组织，在县医院及县以下的区或乡专职人员、乡村医生，担任标本的采集、送检。具备霍乱弧菌实验室分离诊断能力的县级医院，可同时承担菌株分离任务，分离到的菌株应报送县级疾控中心实验室。县级疾控中心实验室对收到的标本进行 01 群和 0139 群霍乱弧菌的培养和鉴定，依据菌落形态及

凝集试验，尽快提出初步报告。将分离的菌株送到上级实验室进行鉴定，有条件的实验室亦可自行鉴定。

（二）地（市）或重点县实验室

地（市）疾控中心组织标本收集、送检和检验工作。对县级实验室上送的菌株进行复核鉴定，并对确认菌株进行系统生化试验、毒力检测和药敏试验。具备开展 PFGE 等分子分型工作的实验室，应对确定的菌株立即进行 PFGE 分析，并将 PFGE 分型电子数据上传省疾控中心的 PulseNet China 实验室监测网络的区域中心实验室。地（市）疾控中心组织培训和指导本地区基层检验工作的技术力量，配合流行病学调查，对积累的资料进行分析。

（三）省、自治区、直辖市级实验室

由省、自治区、直辖市疾控中心组织协调，负责辖区内检验人员的培训工作和技术指导，各地（市）县分离菌株的核查和保存工作，对收到的菌株未进行 PFGE 实验的，应立即进行分子分型和比对分析，同时将数据立即上传 PulseNet China 中心实验室数据库。组织或参加本省的霍乱疫情调查、专项监测等。

（四）国家疾控中心实验室

国家级实验室负责全国霍乱监测网络的运行、质量管理，报送菌株的复核鉴定及其保藏工作，负责 PFGE 等分子分型数据分析、汇总、比对结果的通报等，以及组织或参加必要的霍乱疫情调查、专项监测等。

根据我国病原微生物实验室生物安全管理条例的规定，霍乱弧菌相关的实验室检测工作均可在二级生物安全实验室（BSL-II）中进行。

二、霍乱弧菌的检验与报告程序

霍乱的检验诊断是从检测标本中分离病原体、检测到病原体特异性抗原或核酸。在病例诊断中，粪便是最主要的标本，其次包括肛拭子、呕吐物等。在疫情分析中，生熟食品、水体、怀疑污染的物品等均可作为采集标本。标本的规范采

集和运输是分离培养霍乱弧菌或以其他方法检测的先决条件。对于典型病例的腹泻标本，可以直接使用选择性培养基进行分离培养，其他标本、以及病例腹泻标本，均需进行增菌后分离培养或用其他方法检测。对培养菌落需要进行霍乱弧菌的确认或排除，包括对可疑菌落进行诊断血清（或诊断单克隆抗体）的凝集试验、必要的生化试验、甚至系统生化鉴定。要明确分离株的血清群、生物型、血清型，同时，要进行是否产霍乱毒素的鉴定，包括使用一些免疫学方法、或检测分离株中是否携带霍乱毒素基因。对分离菌株的报告，要包括以上这些要素。菌株报告表的参考模板见附表4“实验室检验结果报告单（样单）”。菌株送上一级疾控中心实验室的登记表格可参照附表5“霍乱菌株上送、移交登记表（样表）”。

对于病人，获得菌株是霍乱感染的确诊条件，另外目前已有一些简易和快速的检测方法，可以作为辅助诊断或者为分离培养提供提示，但不能用这些辅助检测方法替代分离培养，因此在辅助方法呈阳性或可疑阳性后，应立即对标本进行分离培养。即便辅助检测方法为阴性，在仍然怀疑霍乱弧菌感染时，仍需要对标本进行增菌和霍乱弧菌的分离培养与菌落鉴定。需要注意辅助检测方法的灵敏性和适用范围。

对于食品、水体、环境等的标本，需要进行增菌后使用选择性培养基进行霍乱弧菌的分离培养、或以增菌液作为辅助检测方法的标本，例如核酸扩增检测等，能够提高检测效率。

对获得的菌株，需要进行核酸指纹图谱的分子分型检测，这能够在疫情分析和溯源中发挥重要作用。对来自病例的菌株，还需进行耐药检测，以尽早发现可能的耐药问题。

不同实验室通过配备不同的诊断试剂、检测设备以及通过人员能力培训，可达到不同的检测水平。一般县区级疾控中心实验室和医疗机构临床实验室对首发病例菌株需尽快直接送省疾控中心实验室做复核、进一步鉴定及毒力、分子分型

等其它相关检测。对其后分离菌株尽快送地市级疾控中心进行复核鉴定、毒力检测、药敏试验等检测，并报告结果至省级疾控中心，另外需送省级疾控中心实验室尽快进行分子分型检测。在获得分子分型图谱后，实验室应尽快将菌株相关信息及图谱通过病原菌分子分型监测网络 PulseNet China 的信息系统递交和进行全国监测数据的比对。

霍乱弧菌的实验室检测流程见图 2。

标本采集是否规范，能从很大程度上影响检验工作的质量。标本采集应由受过专门培训的人员来执行，同时注意生物安全防护，防止样品污染、交叉污染和自身感染。标本应有唯一编号作为唯一性标识。标本在采集后应立即放入冷藏箱中，注意勿使标本局部冷冻，并尽快送往实验室进行分离培养。

送检标本时应填写“标本送检单”（样单见附表 2 和 3），写明姓名、住址、联系方式、发病时间、采集时间、临床诊断等，为环境和食品标本等时，也需要记录采集时间、地点、种类等相关信息。标本管/袋或瓶上标记样品编号。因病人标本含有病原体，标本装入试管或小瓶时，注意勿污染容器口外壁，必须妥善包装以防破碎、渗漏等，放在坚固的送检箱内由专人送往检验室，运送过程中注意安全。送检箱每次用后须经消毒处理。

（二）标本种类及其采样方法

病人标本应尽可能采集粪便。根据调查需要以及标本的可及性，如下标本也作为检材：病人呕吐物、尸体肠内容物、粪便污染衣物及相关物体表面如地面、水体、食品、水生动物、苍蝇等，但根据实际情况，也不限于这些标本。标本转运培养基配方见附件 3 “常用的标本保存液和细菌培养基”。

1. 病人粪便

粪便标本的采集应尽可能在发病早期（能采集到的最早期）。即便病人已使用抗生素，为尽可能获得霍乱病原学诊断，也需在能采集的最早期采集标本。用采集粪便标本（包括水样便）的器材采取新鲜粪便，避免采便量过少，一般要求水样便采取 1mL ~ 3mL，放入无菌带螺旋盖的试管中，拧紧管盖；成形便采取指甲大小的粪量，装入灭菌小瓶中，盖好瓶盖。

如病人不能自然排出大便、可使用肛拭或肛门采便管采集。用棉拭子（用于 PCR 检测的标本，不要使用棉拭子而应使用灭菌人造纤维拭子或塑料棒采集）或

肛门采便管先在灭菌生理盐水中蘸湿后（棉拭子贴管壁挤出多余的液体），由肛门插入直肠内 3cm~5cm（幼儿约 2cm~3cm）处，旋转 360°，自肛管内壁表面拭取采集。应注意棉拭子大小是否适宜、光滑、结实且不易脱落。然后立即置于冷藏箱内，送往实验室。肛拭子标本如不能在 2h 内送达实验室，应插入 Cary-Blair 运送培养基运送，注意培养基应埋住粪便拭子，手接触的部分在管口折断弃去。

粪便标本如果运送时间不超过 24h，还可将其放在碱性蛋白胨水中室温运送。标本与碱性蛋白胨水的比例为 8mL~10mL 碱性蛋白胨水可加入 1mL~3mL 液体便或指甲大小的成形便。过多的粪便量会降低保存液的 pH 值。如果没有合适采便器材以及没有运送培养基时，可用无菌吸水纸条浸于液体粪便中，然后将吸水纸条密封于塑料袋中，放入冷藏箱中运往实验室。

2. 病人呕吐物

用无菌压舌板或棉拭子挑取少量呕吐物作为检材，放入灭菌塑料管、自封塑料袋或灭菌带盖瓶中，密封。立即置于冷藏箱内，送往实验室。

3. 水体

包括河口水、江河水、沟渠水、池塘水、湖水、井水、港湾海水、乡镇自来水厂源水、医院污水排放口、下水道排放口、海水产品养殖水、海水产品交易市场的出水口等。需要时也可采集水体的底泥作为检材。

水样标本的采集方法有多种，各实验室应根据现场流行病学调查需要及实验室自身检测条件，如有无过滤器等，作相应的选择。

(1) 盐水瓶法：以灭菌的 500mL 盐水瓶采取水样至少 450mL，但不能让水样充满整个瓶子，应留有一定的空气。一般在可疑污染的河流、池塘岸边的 30cm 深度以内的表层水采取水样。连续采取多份水样时，注意防止水样间相互污染。采取的水样应尽快送到实验室。不能在一天内送检者，应在采水点即将浓

缩蛋白胨水加至水样中，即 50 mL 十倍浓缩碱性蛋白胨水加入 450mL 水样中，摇匀，室温下运送至实验室。

(2) Moore 纱布集菌法：该方法尤其适用于河流等流动水水样的采集，但对于静止水无优势。城市生活污水的采集也可采用此法，采集时，应将采样装置放在各主要管道、渠道出口处。取 120cm × 15cm 纱布块（见图 3），沿纱布长度方向折叠几次，在中心系一钓鱼绳（长 1m 以上），为防止绳子被固定在树枝或其它物体上时被磨断，可以在绳子的末端系上一段金属细丝（见图 3）。用容器或耐高压灭菌的包装纸包好，高压蒸汽灭菌备用。采样时，将纱布放在采水点的水中，然后将金属丝固定于岸边的树枝或其他物体上，放置 24h ~ 48h 后，将带着水（约 55ml）的纱布放入灭菌瓶中，置于冷藏箱后送到实验室。如果是采集医院污水排放口、下水道排放口、海产品和肉联加工的出厂水等水样时，应将纱布放在各个污水管道系统入口处，并仔细评估采样点周围可能抑制霍乱弧菌分离培养的各种因素。对于有倾倒腐败垃圾的污水系统进行采样时，应将纱布放在倾倒口的上游，以免有毒废弃物的污染，影响后续的霍乱病原体分离。水样采集后不能在 4h 内送检者，应在采水点即将带水纱布加至蛋白胨水中，摇匀，室温下运送至实验室。带水纱布与碱性蛋白胨水的体积之比应为 10% ~ 20%。如不能在采样点将样品加入碱性蛋白胨水中，则在样品到达实验室后应立即加入碱性蛋白胨水中及进行后续增菌。

(3) Spira 纱布集菌法：用于过滤并采集大体积水样。取容量 500mL 的塑料瓶，在其底部割出一个直径 2cm 的洞（见图 4。洞的大小很关键，如果太大，水样过滤时会将纱布从孔中拉出来；如果太小又会引起水样过滤太慢）。将 120 cm × 180 cm 大小的纱布一层一层叠起来，折成 30cm 宽，放入带孔的塑料瓶中。既要使纱布相对比较结实又要使其仍有可压缩性，要能过滤大约瓶子体积的三分之二的水，而且要使水经过纱布过滤后流出去而不是从纱布旁边直接流出去。

包好高压蒸汽灭菌后备用。将水样从瓶子的顶部注入并使其从底部流出。无菌操作取出纱布，放入盛有 100mL 十倍浓缩碱性蛋白胨水的三角烧瓶或广口瓶中，补加水样至 1L，混匀，室温下尽快送往实验室。



图 3. Moore 纱布，用于采集下水道水和污水。



图 4. Spira 纱布法过滤、采集大体积水样。

4. 食品

针对不同的可疑食品，采集整体或部分标本，带至实验室。注意采集过程中不同食品及不同部位不能交叉污染。

5. 海水产品

选取活海水产品或涂抹拭子，置于塑料袋内(拭子标本可按粪便拭子保存运输方法处置)，尽快送往实验室。如在一箱甲鱼中可采取数只甲鱼的体表作为一个标本送检，这比只做一只甲鱼体内检查其阳性检出机会可能更多。霍乱监测时，海水产品常作为重点采集监测的对象。注意采集过程中不同食品及不同部位不能交叉污染。

6. 物体表面标本

用灭菌棉拭蘸以碱性蛋白胨水涂擦沾染粪便的衣物表面、食物操作台、砧板等等相关物体或怀疑污染物体表面，放入到碱性蛋白胨水中，密封，常温下运往实验室。

7. 苍蝇标本

在每个采样点以 10~15 只苍蝇作为一份标本放入自封袋或试管中，密封，置于冷藏箱中送实验室。

二、标本的增菌和分离培养

霍乱弧菌的实验室分离是将病人或其他如食品、水体、物品涂抹等标本在选择性培养基上进行直接培养、或经过增菌后再做培养。粪便、呕吐物等标本可直接进行分离培养或增菌后培养，水和食品等标本需进行过滤、沉淀、剪碎、稀释等处理，然后进行增菌和分离培养。对可疑菌落，以血清学特性为主，结合形态学和生化学性状进行鉴定。后续根据流行病学调查需要，进行霍乱弧菌的毒力检测、分子分型以及耐药性检测等。所用培养基配方见附件 3 “常用的标本保存液和细菌培养基”。

(一) 增菌和分离培养基

霍乱弧菌的增菌一般选用碱性蛋白胨水。霍乱弧菌的选择性分离培养基有强、弱之分，强选择性的分离培养基主要包括 TCBS 琼脂、庆大霉素琼脂、4 号琼脂等；弱选择性分离培养基主要是碱性琼脂、碱性胆盐琼脂。TCBS 是 WHO 推荐并在全球应用较为广泛的分离霍乱弧菌、副溶血弧菌的强选择性培养基；庆大霉素琼脂、4 号琼脂则是我国科学工作者研制的用于分离霍乱弧菌的强选择性培养基。霍乱弧菌在不同琼脂培养基上菌落形态不同。

应注意不同厂家、批次培养基的分离培养能力差异。实验室应按照质量管理体系的规定，对新购置的培养基进行质量评价后使用。包括对选择的质量控制菌株的增殖能力、抑制生长能力（尤其是选择性培养基）、对非霍乱弧菌的肠道细菌生长抑制能力（对选择性培养基）等。

（二）粪便标本的直接分离培养和增菌

1. 直接分离培养

在固体培养基上进行分离培养是获得霍乱弧菌纯培养物的最基本途径。当标本来自急性期、排水样便或稀便的病人时，可以不用增菌液进行前增菌，直接使用选择性平板进行分离培养。并且可在采样的同时、取其粘液絮片或用棉拭子直接在选择性培养基上划线分离培养。接种到选择性平板上的标本量要大，分区划线时区与区之间接种可不燃烧或更换接种环。应注意事项如下：

（1）接种在原始部位后，应注意用接种环划线以确保分离单个菌落。

（2）必须在平皿培养基一侧背面（而不是盖子）标上属于该样品的唯一的实验编号，并与原写于该处的样品采样编号加以区分。

（3）直接分离培养可节省增菌的时间。但进行直接分离的标本，为提高检出可能性，须同时进行增菌后分离培养，以防止因标本菌量较少导致漏检漏诊。

2. 增菌后分离培养

病例粪便、呕吐物、尤其对来自恢复期病人以及可疑的无症状者的标本，必须用增菌液增菌和随后的选择性培养基分离。增菌液普遍使用碱性蛋白胨水，随后的选择性分离强选择性培养基有 TCBS 琼脂、庆大霉素琼脂、4 号琼脂等，弱选择性平板有碱性琼脂和碱性胆盐琼脂等。

保存于保存液或半固体运送培养基的粪便或呕吐物标本，以灭菌吸管吸取 1ml 接种到碱性蛋白胨水中；以采样棉签采集的标本、可直接将采样棉签置于碱性蛋白胨水中，37℃培养 6h~8h。用碱性蛋白胨水运送的样品在接种到固体培养基前应先将其转种到一支新的碱性蛋白胨水中，在 37℃增菌 6h~8h，然后进行后续选择性培养基的分离。另外，增菌培养物还可用于快速辅助诊断试验，包括基于胶体金或上转发光的免疫层析试验、提取核酸进行核酸扩增检测等。

3. 注意事项

(1) 在进行本步骤操作时，应检查用于分离培养的选择性培养基是否准备充分，包括数量是否足够，新制备培养基平板是否经过水分蒸发等。

(2) 增菌培养并不强求一定是 6h~8h，应注意观察增菌液出现明显的细菌生长现象，即可进行分离培养。增菌时间也可适当延长，但原始样品增菌培养超过 20h 时，样品中的大肠杆菌等可能大量繁殖，给霍乱弧菌分离带来影响较大，应考虑使用强选择性培养基分离培养。

(3) 关于二次增菌：当估计样品中目标菌含量较少时，如带菌状况调查、恢复期病人检测、或使用了较大量或较长时间的抗生素，为提高检出率，可进行二次增菌。其方法是从一次增菌的 6h~8h 培养物中，吸取 0.1mL~0.2mL 表层培养物，接种到新鲜碱性蛋白胨水中，再次置 37℃培养 6h~8h 后，进行选择培养基的划线分离。

(三) 水体标本的增菌

水体（以及其他标本包括食品、海水产品、物品涂抹标本等）含菌量较小，并存在影响分离培养的因素，需要进行前处理，并进行增菌以及后续选择性培养基分离。必要时还可进行二次增菌。42℃增菌对霍乱弧菌选择性分离也有一定优势，可以抑制一些竞争性微生物的生长，尤其是在该温度下生长不好的非霍乱弧菌的其它弧菌，有条件的实验室还可做平行样，分别置于 37℃和 42℃增菌。增菌液转种于强选择性平板进行分离培养，同时也可用增菌液进行多种快速辅助诊断试验，包括免疫层析试验、提取核酸进行核酸扩增检测等。

1. 水体标本的增菌

根据水的来源和洁净度及水样采集方法的不同，前处理也不尽相同，各实验室可结合自身实验条件选择下列方法进行前处理和增菌培养。通常水样量越大分离到霍乱的机率越大，另外加大样品采集数量、是另一种增大分离率的方法。条件许可或检测需要时，可制备平行样品，分别置于 37℃和 42℃增菌。以下方法可供选择，这些方法除了本身采集标本体积、处理方法的灵敏度的差异，还需要注意实际水体中是否含有霍乱弧菌以及含的菌量，因此需认真控制实验过程的质量，以使标本中真正含有霍乱弧菌时、尽可能分离到。

（1）水标本的直接增菌培养法：采集 450mL 水样，加入 50mL 十倍浓度碱性蛋白胨水于 37℃培养 6h 以上（或过夜增菌）。对于海水或河口水标本，一种替代方法是，将 10mL 水样加入 90mL 标准碱性蛋白胨水中，即用标准浓度碱性蛋白胨水将水样制成 10^{-1} 和 10^{-2} 稀释度，混匀，置于 37℃培养 6h 以上（或过夜增菌），但需注意此时直接用于增菌培养的水样体积较小。有条件时或检测需要时，还可再制备平行样培养，放在 42℃增菌 6h ~ 8h。

（2）水标本的吸附沉淀增菌法：取水样 450mL，先加入 10% 无菌碳酸钠溶液 2mL 及 10% 硫酸亚铁溶液 1.7mL，混匀，静置 50min，倾去上清液，取沉淀物约 40mL ~ 50mL，置 50 mL ~ 100mL 二倍碱性蛋白胨水中，混匀，37℃培养 6h ~ 8h

后接种至 TCBS 或其它选择性培养基。条件允许或需要时，可做平行样在 42℃ 增菌。如果是海水和河口水，取 50mL 沉淀物用碱性蛋白胨水进行系列稀释，使成 10^{-1} 、 10^{-2} 和 10^{-3} 。将三个稀释度菌悬液均置于 37℃ 培养 6h 以上（或过夜增菌）后接种至 TCBS 或其它选择性平板。如果条件允许，制备平行样，放入 42℃ 增菌培养。

（3）水标本的滤膜增菌法：将泥沙等杂质较少的被检水样 300mL（或更大量的水样），注入已灭菌的滤膜（0.45 μ m）滤器中抽滤后，将滤膜取下，置于 100mL 碱性蛋白胨水中，37℃ 培养 6h 以上（或过夜增菌）后接种至 TCBS 或其它选择性平板。如果条件允许，制备平行样，放入 42℃ 增菌培养。若水样来自海水或河口水，将抽滤后的滤膜取下，置于 100mL 带有无菌玻璃珠的碱性蛋白胨水中，充分振摇以洗下滤膜上吸附的细菌。吸取 10 mL 菌悬液加入 90mL 碱性蛋白胨水中，使成 10^{-1} ，如此再制成 10^{-2} 和 10^{-3} 。将三个稀释度菌悬液均置于 37℃ 培养 6h 以上（或过夜增菌）后接种至 TCBS 琼脂或其它选择性平板。如果条件允许，制备平行样，放入 42℃ 增菌培养。

（4）水标本 Moore 纱布集菌增菌法：转到实验室的标本，将纱布置入 300mL ~ 500mL 碱性蛋白胨水中。亦可再加 1% 亚碲酸钾 1 滴和 1000 单位/mL 青霉素 3 滴，混匀，37℃ 培养 6h 以上（或过夜增菌）后进行分离培养。

（5）水标本 Spira 纱布集菌增菌法：该法在采水现场即已将水样加入碱性蛋白胨水中，所以实验室在收到标本后，直接将其放入 37℃ 培养 6h 以上（或过夜增菌）后进行分离培养。

（四）食品和水产品标本的增菌

1. 食品标本的增菌

在灭菌容器中将标本剪碎或磨碎后，无菌操作称取 25g 标本，加入 225mL 碱性蛋白胨水中（相当于十倍稀释浓度），充分混匀，再分别以碱性蛋白胨水十倍

稀释制成 10^{-2} 和 10^{-3} 浓度。将三个稀释度的标本分别置于 $35^{\circ}\text{C} \sim 37^{\circ}\text{C}$ 增菌培养 6h 以上（或过夜增菌）。必要时可将每个稀释度做成平行样，分别放入 37°C 和 42°C 增菌培养 6h ~ 8 h。为防止有的食品在培养过程中培养基变得很酸影响细菌生长，可将首次增菌用的碱性蛋白胨水提高 pH 至 9.2；需要二次增菌时，仍用 pH8.6 的碱性蛋白胨水。

2. 海水产品（水生动物）标本的增菌

以无菌操作剪取适当部分进行增菌分离。贝壳类可取壳内软组织，剪碎后，连同壳内液体一起搅拌混匀。取 25g 此混合物加入 225mL 碱性蛋白胨水中（ 10^{-1} 浓度），再用碱性蛋白胨水制备 10^{-2} 和 10^{-3} 两个稀释度，三个稀释度标本均置于 37°C 培养 6h 以上（或过夜增菌）。有条件的实验室可以做平行样，分别放在 37°C 和 42°C 培养。鱼类则剖取腮部和肠内容物，用碱性蛋白胨水（pH9.2）制备成 10^{-1} 、 10^{-2} 和 10^{-3} 三个稀释度，均置于 37°C 培养 6h 以上（或过夜增菌）。有条件的实验室可以做平行样，分别放在 37°C 和 42°C 培养。因为牡蛎肉的某些成份对于 01 群霍乱弧菌增菌有抑制性，因此一次只能处理少量牡蛎样品（10 ~ 12 只），并且要尽快稀释，这样既能稀释其它微生物还能削弱牡蛎肉的杀菌作用。有条件的实验室可以做平行样，分别放在 37°C 和 42°C 培养 6h 以上（或过夜增菌）。 42°C 增菌可以大大增加分离霍乱弧菌的机率，尤其对于牡蛎样品，更是推荐应用。

（五）其他标本的增菌

1. 物体表面涂抹标本的增菌

将拭子置于 10mL 碱性蛋白胨水，置于 37°C 增菌培养 6h 以上（或过夜增菌）。必要时可制备平行样、分别放入 37°C 和 42°C 增菌培养 6h 以上（或过夜增菌）。

2. 苍蝇标本的增菌

无菌操作研磨苍蝇标本，按标本与碱性蛋白胨水增菌液 1: 10 的比例稀释成 10^{-1} 浓度，浸泡一段时间后，充分混匀，再依次稀释成 10^{-2} 和 10^{-3} ，将三个稀释

度的标本分别置于 37℃增菌培养 6h 以上（或过夜增菌）。需要时可将每个稀释度做成平行样，分别放入 37℃和 42℃增菌培养 6h 以上（或过夜增菌）。

（六）增菌液的选择性分离培养

样品经增菌培养后，增菌液有时可见较明显的絮状生长物，或在表层可见菌膜生长，但也可能未见明显细菌生长现象。以灭菌接种环从增菌液表层（此处霍乱弧菌生长最茂盛）取一接种环培养物，分区划线接种于选择性培养基平板，置 37℃培养 18h~24h，挑取可疑菌落（见后“菌落特征”部分）进行菌株鉴定。培养时要注意及时观察菌落生长情况，霍乱弧菌在选择性培养基上培养 10h~12h 可生长出细小的菌落，16h 菌落直径可达 2mm，足以进行菌株鉴定。有时在强选择性培养基上生长较为缓慢，可将培养时间适当延长。如没有选择性培养基储备时，可考虑用麦康凯琼脂甚至营养琼脂进行分离培养。

分离的注意事项如下：

1. 分离培养基的选择取决于样品中非目标菌的含量及实验人员的技能水平两方面。估计样品中非目标菌的含量比例较高时，应尽可能使用强选择性培养基；而实验人员对霍乱弧菌菌落特征认识不足，则建议同时分离强、弱选择性培养基。目前国内外在原始样品的分离培养上倾向于使用强选择性培养基为主。

2. 不同选择性的培养基划线接种的菌量应有所区别，强选择性培养基的接种量一般要一大滴，而弱选择性培养基接种量较之适当减少。

3. 在培养基平板上划线接种，要确保培养出单菌落，对操作人员有技能要求。一般使用传统的分区划线方法容易获得单个菌落。单个菌落过少容易造成漏检或难于开展纯培养，而过度密集的单菌落也给菌落的筛选带来难度。根据经验，接种环先在原始部位涂抹，然后，使接种环环面垂直于平板，环棒与平板表面形成约 30 度角，轻轻划线容易分离到较多的单个菌落。具有熟练操作技能的

人员采用恰当的划线方法一般可以在一个 9cm 平板上分离出 50 个~100 个合适的单菌落。

4. 应强调每个平板仅用于分离一份样品，不能一个培养平板分离二份或以上的样品，这既防止交叉污染、也确保获得足够多的单个菌落。

5. 在霍乱病原学监测与应急检验中，每份样品都应进行分离培养。

三、自培养物中鉴定霍乱弧菌

分离培养物的鉴定是选取其中单个菌落，通过一系列生化实验和血清凝集试验对获得的菌株进行类别鉴定的过程。疑似霍乱弧菌菌落的选取至关重要。在进行霍乱弧菌鉴定时，为防止漏检现象的发生，每份标本至少选取 5 个以上的单个菌落开展鉴定工作，对于不熟练的检验人员，应选取更多的菌落。对一些特殊病例有时也需要选取更多菌落、以考虑是否出现了新菌型。

（一）霍乱弧菌菌落特征

霍乱弧菌在不同的分离培养基上菌落的形态有差异，熟识菌落的特征是开展菌株鉴定的基础。

在营养琼脂及碱性琼脂上霍乱弧菌生长良好，培养 4h~6h 即可在原始部位可见菌苔生长，8h~12h 划线部位可见单个的细小菌落生长；16h~20h 菌落直径可达 2mm 以上；菌落呈圆形、边缘整齐、无色透明或半透明、表面光滑湿润、扁平或稍隆起形如水滴状（在营养琼脂上这一特征尤其明显）。

在强选择性培养基上霍乱弧菌生长较碱性琼脂慢，培养时间可适当延长至 18h~24h。在庆大霉素琼脂上，菌落生长特征与碱性琼脂基本相似，因培养基上含有亚碲酸钾而在菌落颜色上偏向于略带灰色的半透明为主；随着培养时间的延长，灰色现象越明显，可出现菌落中央明显的灰黑色，而边缘呈略带灰色的半透明状。在 4 号琼脂上，菌落生长特征与庆大霉素琼脂基本类似（图 5）。以上述几种培养基生长的菌落做玻片凝集试验容易形成悬液，凝集良好。在 TCBS 培养

基上，生长 18h~24h 的菌落直径可达 2mm 以上，因发酵蔗糖并在显色指示剂作用下而使菌落颜色为黄色（图 5），是一种边缘整齐且为稍微半透明而中央不透明的黄色圆形菌落，其表面亦呈光滑湿润，扁平或稍隆起，易与不发酵蔗糖的副溶血弧菌的蓝绿色菌落区别。值得注意的是，TCBS 平板上生长的菌落较粘，进行玻片凝集试验时不易形成悬液，需将可疑菌落转种到营养琼脂或碱性琼脂平板上纯培养后、再进行凝集试验。另外，注意不同厂家和批次培养基的质量。

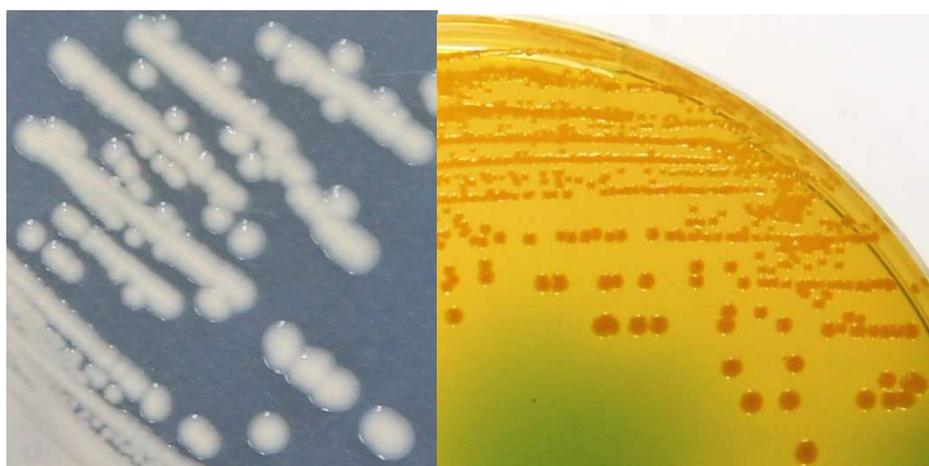


图 5. 霍乱弧菌在庆大霉素琼脂（左）和 TCBS 培养基（右）上的形态。

（二）霍乱弧菌的鉴定

霍乱弧菌的鉴定包括形态学、生化特征、诊断血清凝集等过程。为便捷、快速获得标本的培养检测结果，通常霍乱弧菌的鉴定是先以诊断血清（或诊断用单克隆抗体）凝集进行筛查，再对出现凝集的菌株以一些基础生化进行复查，作出判定。如基础生化符合霍乱弧菌的特性，一般无须再进行形态学检验。但当出现异常或无法解析的结果时，则应予以细菌学更细致的系统鉴定。

1. 诊断血清鉴定

（1）玻片凝集试验

用于玻片凝集的诊断血清的效价，一般应为 1:40~1:50（不低于 1:32，不高于 1:64）。即根据血清原效价作适当稀释，使其效价成为 1:40~1:50，如原效

价为 1:1280, 可制成 1:50 效价的血清, 即稀释 1:25 ($1280 \times 1/50 = 25.6$) 倍使用。

将稀释诊断血清滴加在洁净的玻璃片或平皿内, 再以接种针或接种环取可疑菌落放在血清液滴近旁, 磨匀, 然后混入血清内制成均匀悬液。很快 (一般不超过十秒钟) 出现肉眼可见的明显凝集者为阳性。凝集的菌落应同时与生理盐水混匀作对照, 检查有无自然凝集。将凝集的菌落接种普通琼脂斜面或平板上, 培养 6h ~ 8h 后准备做进一步的鉴定, 如菌落还有足够的剩余, 亦可用来做单价血清的玻璃凝集, 以确定血清型。

如果所用分离培养基为 TCBS, 必须将可疑菌落转种到营养琼脂或碱性琼脂平板上, 然后才能进行玻片凝集试验, 因 TCBS 上的菌落在诊断血清中难以乳化。鉴于标本中可能存在 01 群或 0139 群霍乱弧菌 (甚至一些环境和食品标本中两者均有), 为减少工作量及避免遗漏, 推荐使用 01 群和 0139 群混合的霍乱两价诊断血清, 检出阳性时再用单价血清进一步鉴定。

霍乱诊断血清中同时有针对 01 群的小川血清型和稻叶血清型的诊断血清 (或单克隆抗体)。01 群霍乱弧菌的进一步血清分型, 在流行病学调查上有其实际意义。分型方法是用小川型和稻叶型单价血清或单克隆抗体作玻片凝集试验, 与小川型血清凝集、但与稻叶型血清不凝集者为小川型, 反之为稻叶型。在两个单价血清中都有同等强度的明显凝集者为彦岛型。小川型菌株有时在稻叶型单价血清中出现弱凝集, 这并非彦岛型, 而是小川型含有少量 C 抗原成分的缘故。因此每次用玻片凝集试验对菌株进行血清分型时, 应分别同时与小川型和稻叶型血清进行凝集试验, 凝集反应最强、最快的被用于确定为相应血清型。必要时以两个单价血清的试管凝集来确定彦岛型。0139 群霍乱弧菌目前并无再分型, 故作血清凝集试验, 仅采用本菌的 O 血清群特异诊断血清。

另外，当分离菌落与 01 群诊断血清弱凝集或凝集缓慢、但与小川型或稻叶型血清不凝集时，不能判为 01 群血清型。小川型和稻叶型血清亦不应该与在 01 群诊断血清中不凝集的菌株进行血清分型试验。

有的标本可能存在非 01/非 0139 群霍乱弧菌，由非 01/非 0139 群霍乱弧菌导致的腹泻病例也有报道。因此，有可疑菌落但不与 01/0139 群诊断血清凝集时，应挑选可疑菌落进行系统生化鉴定。这对首批病人进行检验时尤应注意。有时从恢复期病人分离出菌落典型但不凝集的弧菌，这时应以霍乱粗糙型血清作玻片凝集，检查是否为本菌的粗糙型。

平皿分离未获分散的单个菌落，而在密集部位仍有可疑菌落时，应将该部分再做分离或经增菌后再做分离。

(2) 试管凝集试验

对一次流行的首批病例菌株和一些需要进一步鉴定的特殊菌株（如凝集不良，或在两型单价血清中均有良好凝集等），应做试管凝集。方法是将霍乱弧菌 01 群或 0139 群诊断血清，用生理盐水自 1:20 开始对倍连续稀释，每管各含 0.5ml 稀释血清。然后将被检菌的 16h~18h 琼脂培养物，制成 0.2% 福尔马林生理盐水悬液（相当于标准比浊管浓度，每 mL 约含 18 亿菌体），取 0.5mL 加至各管，摇匀，置 37℃ 3h 观察初步结果，然后放室温或 37℃ 过夜，观察最后结果。通常以肉眼看出（++）凝集的血清最高稀释倍数作为凝集滴度，生理盐水对照不应有自然凝集。凝集滴度达到或超过血清原效价的一半，均有诊断意义。达不到一半的也不轻易排除，应检查使用的血清和菌液是否合格或使用单克隆抗体做复查。必要时采用凝集素吸收试验等血清学方法，以检查是否为“低凝弧菌”，即与 01 群或 0139 群霍乱弧菌有低度交叉凝集的非 01/非 0139 群霍乱弧菌。

2. 形态学和生化鉴定

(1) 形态学和动力检查

除不同分离培养基上不同的可疑菌落形态外,可对菌落按常规方法进行革兰染色,01群与0139群霍乱弧菌为革兰阴性。用普通半固体琼脂穿刺培养检查动力,37℃培养18h~20h,霍乱弧菌沿穿刺线扩散生长,使培养基呈现混浊,为动力阳性。典型病例的新鲜粪便标本中,在显微镜下可见快速穿梭移动的细菌。

(2) 系统生化试验

通过系统生化试验来鉴定菌株是否为弧菌,目前有多种方法,如手工的和机械化的生化试验,并且有商业化的生化试剂,如生物梅里埃公司提供的ID32和API-20E以及VITEK2细菌鉴定仪等都可以很好地鉴定弧菌属。各实验室可以根据自身实验条件进行选择。

(3) 氧化酶试验

作为弧菌菌落的简易辅助鉴定方法有其一定意义。用普通琼脂或其它无碳水化合物成份的非选择性琼脂上的新鲜菌苔进行氧化酶试验。该试验有助于弧菌属与肠杆菌科细菌的区分,前者大部分为阳性(其中仅麦氏弧菌与产气弧菌氧化酶阴性),01群及0139群霍乱弧菌的氧化酶试验均为阳性;后者为阴性。

进行氧化酶试验时,用铂金环(不能用含镍铬铁合金的接种环,也可用牙签、其它木制品等)从无碳水化合物成份的非选择性琼脂上取新鲜培养物,涂抹在滤纸上,取2~3滴氧化酶试剂(1%盐酸四甲基对苯二胺)滴加在菌苔上,20秒钟内出现深紫色为阳性,超过20秒钟不应判为阳性。同时还要设立阴、阳性对照。

(4) 粘丝试验

该试验有助于筛选掉非弧菌,尤其是气单胞菌。霍乱弧菌该试验呈阳性反应,而其它弧菌为阳性或弱阳性反应,气单胞菌通常为阴性。

在玻片或平皿上滴一大滴0.5%去氧胆酸钠水溶液,再从普通琼脂或其它非选择性琼脂上取一接种环18h~24h培养物,放在溶液旁研磨混匀,再与溶液混

合制成浓厚悬液。阳性者很快（一分钟内）由混变清并变得很粘稠，用接种环挑取时，可以拉出细丝来。阴性者呈均匀悬液状态，与蒸馏水对照相同。

（5）霍乱弧菌与有关细菌的鉴别

从腹泻病人分离的细菌，有时在菌落形态上类似弧菌，但在霍乱弧菌 01 群、0139 群和粗糙型诊断血清中并不凝集或仅有可疑凝集，为进一步作出鉴定，特别是作出非 01/非 0139 群霍乱弧菌的鉴定时，应与弧菌科中某些氧化酶试验阳性的类似细菌相鉴别（表 1）。

0/129(二氨基二异丙基喋啶磷酸盐)敏感试验:使用平皿法测定菌株对 0/129 的敏感性。在含 0.5%氯化钠的普通琼脂平皿接种待检菌,放上每片分别含 10 μg、150 μg 0/129 磷酸盐的药敏纸片, 37℃培养过夜。凡药敏纸片周围出现抑菌圈者记录为敏感。01 群霍乱弧菌对 10 μg 0/129 敏感, 但 0139 群霍乱弧菌大都具抗性。在含 150 μg 0/129 时, 副溶血弧菌和河弧菌敏感, 而气单胞菌表现为抗性。

除部分副溶血弧菌外, 多数弧菌粘丝试验阳性, 邻单胞菌和多数气单胞菌为阴性, 该试验对确定弧菌有帮助。气单胞菌中有的菌株发酵葡萄糖产酸产气, 但不产气的菌株与非 01 群霍乱弧菌更难区别, 这要靠氨基酸分解试验来区别。邻单胞菌的特点是发酵肌醇, 不发酵蔗糖、甘露糖和阿拉伯糖。近年来, 在东南亚、欧洲、美洲和非洲的一些国家, 从腹泻病人或疑似霍乱病人大便中分离出一群弧菌, 如河弧菌(曾命名为 F 群弧菌, EF6 群弧菌)、拟态弧菌、麦氏弧菌、霍利斯弧菌等。河弧菌与气单胞菌可利用 6%氯化钠蛋白胨水中生长与否加以鉴别。河弧菌为葡萄糖不产气株, 主要从腹泻病人分离; 弗尼斯弧菌为葡萄糖产气株, 大多从外环境中分离。

表 1. 霍乱弧菌及其他致病性弧菌与弧菌科有关细菌的鉴别

| 项 目 | 霍乱弧菌 | 拟态弧菌 | 副溶血弧菌 | 创伤弧菌 | 溶藻弧菌 | 河弧菌 | 弗尼斯弧菌 | 海鱼弧菌 | 霍利斯弧菌 | 麦氏弧菌 | 辛辛那提弧菌 | 鲨鱼弧菌 | 气单胞菌 | 邻单胞菌 |
|--------------|------|------|-------|------|------|-----|-------|------|--------|------|--------|------|------|------|
| 最适生长温度 | 37 | 37 | 37 | 37 | 37 | 37 | 37 | 25 | 25, 36 | 37 | 25, 35 | 37 | 28 | 37 |
| 氧化酶 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + |
| 粘丝试验 | + | + | +/- | + | + | + | + | +/- | + | + | +/- | + | - | - |
| 硝酸盐还原 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 靛基质 | + | + | + | + | + | - | - | - | +/- | +/- | - | + | +/- | + |
| V-P 试验 | + | - | - | - | +/- | - | - | + | - | - | + | +/- | +/- | - |
| 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 | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | +/- | + | - |
| 0% NaCl 胨水 | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 3% NaCl 胨水 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 6% NaCl 胨水 | +/- | +/- | + | +/- | + | +/- | + | + | +/- | + | + | + | - | - |
| 8% NaCl 胨水 | - | - | + | - | + | - | +/- | - | - | +/- | - | - | - | - |
| 10% NaCl 胨水 | - | - | - | - | +/- | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 0/129-10 μg | S* | S | R | S | R | R | R | S | R | S | R | R | R | R/S |
| 0/129-150 μg | S* | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | R | S |

注: + 阳性反应, - 阴性反应, +/-或-/+ 不定反应, S 敏感, R 抗性, *: 0139 群霍乱弧菌为抗性

(三) 01 群霍乱弧菌的生物型鉴定

01 群霍乱弧菌包括了古典生物型和埃尔托生物型。虽然, 古典生物型霍乱弧菌感染病例在第七次霍乱全球大流行中、在我国极为罕见, 但由于古典生物型在其地方性流行区(印度次大陆)仍然存在, 因此, 鉴别古典生物型和埃尔托生物型仍具有流行病学意义。另外, 近年来东南亚报道一些埃尔托型菌株还表现出复杂的表型变异, 即同时具备古典生物型和埃尔托生物型的表型鉴别特征、以及在染色体上携带古典型 CTX Φ , 称为杂合(hybrid)的埃尔托型菌株。我国也存在这类变异的埃尔托型菌株。

古典生物型和埃尔托生物型的鉴别主要依赖于第IV组霍乱弧菌噬菌体($10^6/\text{ml}$)裂解试验、多粘菌素 B 敏感试验、鸡血球凝集试验、V-P 试验和溶血试验五项(表 2)。由于埃尔托型霍乱弧菌出现大量非溶血性菌株, 溶血试验已不能作为区别两个生物型的主要方法, 目前, 主要依靠第IV组霍乱噬菌体常规稀释液($10^6/\text{ml}$)的裂解试验来做鉴别, 必要时辅以多粘菌素 B 敏感试验和鸡血球凝集试验, V-P 试验和溶血试验仅作参考。从表 2 可见, 每种试验都有例外情况, 根据几项试验综合判断较为可靠。

表 2. 01 群霍乱弧菌生物分型鉴别试验

| 鉴别试验 | 古典生物型 | 埃尔托生物型 |
|--|-------|--------|
| 1. 第IV组霍乱弧菌噬菌体($10^6/\text{ml}$)裂解试验 | + | -(+) |
| 2. 多粘菌素 B 敏感试验 | + | -(+) |
| 3. 鸡血球凝集试验 | -(+) | +(-) |
| 4. V-P 试验 | - | +(-) |
| 5. 溶血试验 | - | +, - |

注: 括号内为少数菌株结果

1. 第IV组霍乱噬菌体裂解试验

第IV组霍乱噬菌体常规稀释液($10^6/\text{mL}$)一般只能裂解霍乱弧菌古典型, 而不裂解埃尔托型(少数例外)。第IV组霍乱噬菌体原液($10^9/\text{mL}$)对霍乱弧菌古

典型和埃尔托型都能裂解，对古典型菌属增殖性裂解，对埃尔托型菌多属于外因裂解（致死作用）。然而这种现象仍具有明显特异性。因此，这项试验具有辅助鉴定意义。一旦发现不被第IV组噬菌体原液裂解的埃尔托型霍乱弧菌菌株，需要核查其是否为 01 群霍乱弧菌。本项试验可与噬菌体-生物分型在同一平皿上进行，噬菌体-生物分型方法见后。

2. 多粘菌素 B 敏感试验

将 1.5% 普通琼脂加热溶化，待冷却至 50℃ 左右，按每 mL 培养基加入 50 单位多粘菌素 B，摇匀后倾注平皿，凝固后备用。在平皿背面用玻璃笔划出若干方格，9cm 直径平皿可检查 16~20 个菌株。取被检菌 2h~3h 肉汤培养物 1 接种环滴在培养基表面，待干后放 37℃ 培养过夜，观察结果。霍乱弧菌古典型为敏感型，不生长或生长不足 10 个菌落；埃尔托型（以及 0139 群）霍乱弧菌不敏感，多数菌株长出均匀菌苔。也可用多粘菌素 B 纸片（50 单位）按药敏试验常规法进行。

3. 鸡血球凝集试验

在清洁平皿内划出方格，用直径 4mm 接种环取一滴生理盐水，滴在每个方格内，取被检菌 18h 琼脂培养物少许，在生理盐水中制成浓厚菌悬液。再用接种环各加一滴经洗涤三次的 2.5% 鸡血球生理盐水悬液，充分摇匀，肉眼观察结果。一分钟内出现血球凝集者为阳性，血球呈均匀分散状态者为阴性。霍乱弧菌埃尔托型为阳性，古典型一般为阴性。

4. V-P 试验

将被检菌接种于葡萄糖磷酸盐蛋白胨水，37℃ 培养 2d~3d。然后取出 1mL 培养物加 5% α -萘酚乙醇溶液 0.6mL，振荡 5sec，加入 40% 氢氧化钾液 0.2mL，再振荡 5sec，去掉棉塞放室温，一般在 2min~5min 即出现浅红色，以 1h 内出

现红色反应者为阳性。阴性者在试剂加入后逐渐出现浅褐色。霍乱弧菌古典型 V-P 试验为阴性，而埃尔托型（以及 0139 群）多为阳性。

5. 溶血试验

取新鲜培养的被检菌肉汤 1mL，1%绵羊红血球 1mL（使用前用生理盐水洗三次，最后一次离心速度为 2000rpm/min，离心 10min），混匀后放 37℃，2h 观察初步结果，再放 4℃冰箱过夜观察最后结果。应设置已知溶血株、不溶血株和肉汤管作对照。达半数血球溶解者为溶血阳性。可疑溶血者需作复查。为证明为不耐热溶血素，可将被检菌的培养物加热 56℃ 30min 后再作溶血试验，0139 群霍乱弧菌的溶血试验为阴性。

（四）霍乱弧菌产毒素的检测

引起霍乱全球大流行或局部地区暴发流行的霍乱弧菌菌株，均为产生霍乱毒素的菌株，因此不论从病人标本还是食品、水体、其他环境标本等，若检测出霍乱弧菌后，鉴定分离株是否产霍乱毒素有重要的公共卫生意义，至少在省级疾控中心实验室必须进行是否为产毒株的鉴定。不产生霍乱毒素的菌株，通常不致病或仅引起腹泻散发病例或局限性的暴发（如聚餐导致集中出现多个病例），也按照一般性腹泻处理。另外，从腹泻病例标本中检测到不产毒（不带毒素基因）的霍乱弧菌菌株，也需保存和记录，近年来不断有报道非产毒的 01 群、0139 群、甚至非 01/非 0139 群菌株引起的腹泻病例。

目前检测分离到的霍乱弧菌是否为产毒株，可通过检测产生的毒素、或检测菌株染色体上是否携带霍乱毒素基因进行鉴定。直接检测霍乱毒素的方法还较少常规使用，目前有例如 Oxiod 公司测定霍乱毒素和产毒性大肠杆菌热不稳定毒素（LT）的反向被动血凝试剂盒（VET-RPLA）可获得。对于霍乱毒素基因的检测，应用较多，见后 PCR 方法的介绍。一些方法如 GM1-ELISA 以及新研究方法，目前

还缺乏标准化、或者缺乏商业化的试剂盒。另外也要注意直接检测毒素的方法、会与产毒性大肠杆菌 LT 毒素出现交叉反应。

四、快速简易的辅助检测方法

简易快速的检测方法，适于在基层实验室和现场开展快速判断，但其作用仍为辅助诊断或检测，并且要注意这些方法检测的灵敏度限制。在这些方法检测为阳性或疑似阳性、以及即便是阴性但仍怀疑存在霍乱弧菌时，需立即对标本进行霍乱弧菌的分离。

（一）制动试验

1. 原理：急性期霍乱病人的粪便中含大量霍乱弧菌。本法的依据原理是霍乱弧菌具有活泼动力，当加入相应抗血清时，可以中止其运动。

2. 方法和结果观察：将急性病例的水样便二滴分别滴在玻片上，直接镜检（推荐使用暗视野或相差显微镜）。如果存在霍乱弧菌，一般可见具有流星状运动的细菌。当分别加入一滴霍乱弧菌 01 群诊断血清或 0139 群诊断血清后，如果观察到细菌运动停止，凝集成块，则判断制动试验阳性。标本应立即进行菌株分离。

根据这种特殊动力和制动试验，可在几分钟之内做出初步诊断。免疫诊断血清推荐使用不加防腐剂的。使用浓度一般为 1：64 血清效价。在做细菌培养的同时，进行此项检查，可对 50%~80% 的阳性标本提早做出初步诊断。

（二）基于胶体金的免疫层析检测

1. 原理：是以膜作为免疫反应固相载体的检测技术（Membrane-Based Immunoassay），在酶联免疫吸附、单克隆抗体制备、体外蛋白表达、胶体金制备等技术的基础之上发展完善，是一项快速体外诊断方法。在膜上，液体带动样品中抗原进行泳动，在遇到抗体后凝集沉淀，并通过胶体金形成的沉淀线肉眼观察结果。

2. 实验方法: 取约 0.5g 粪便样本或 0.3mL 新鲜粪便于稀释液中, 用滴管反复吹打, 备用; 取出检测卡, 在非样本端标记样本号; 将检测卡平置于台面, 用滴管吸取稀释液瓶内的样品液, 向检测卡的样品孔内滴加样品液 (约 150 μ L), 从滴加样品开始计时, 10min 观察结果。

3. 结果判定: 出现两条紫红色线条, C 线 (质控线) 和 T 线 (检测线) 皆显色, 判断为阳性结果; 仅在 C 线出现紫红色线条, 判断为阴性结果; 无任何线条出现或仅有 T 线显色而 C 线不显色, 判为实验无效, 应重新测试。

4. 注意事项: 应注意检测方法的灵敏度和适用范围。较多报道发现在标本中含 10^5 CFU/mL 及以上浓度霍乱弧菌时, 可用该方法检出。因此, 必要时可将标本经增菌后进行检测, 能协助进行快速判断。阳性标本需立即进行分离培养。即便结果为阴性, 但仍怀疑病例感染霍乱弧菌或需鉴定其他标本中含有霍乱弧菌, 也需要对标本进行霍乱弧菌的增菌和分离培养。

(三) 基于上转发光的免疫层析检测

1. 原理: 上转发光免疫层析技术原理是在以上转发光材料 (Up-Converting Phosphor, UCP) 代替胶体金免疫层析试纸中的胶体金作为示踪物。上转发光技术 (Up-Converting Phosphor Technology, UPT) 实现了 UCP 颗粒作为示踪物的生物应用, 即对 UCP 颗粒进行一系列的表面修饰与活化后, 将其作为示踪物与多种生物活性分子共价结合, 在红外光的照射下以其独特的上转发光指示生物活性分子之间高敏感特异性的识别。其基础也是基于样本中霍乱弧菌抗原与抗体的特异结合。

2. 实验方法: 对于病例粪便样本, 取约 0.5g 或 1mL 新鲜粪便, 加于 1mL 样品预处理液中, 混匀备用; 对于其他标本或病例粪便标本, 进行碱性蛋白胨水增菌作为待检样品。将 10 μ L 预处理后的待测样品加入 90 μ L 样品处理液中, 混匀备用; 取 100 μ L 稀释后的待测样品加入 UPT 免疫层析试纸加样孔中, 静置反应

15min; 将 UPT 免疫层析试纸插入 UPT 生物传感器, 点击“测量”键获得定量结果。

3. 结果判定: 定性判定时, 测量后的 T/C 值大于判定值判定为阳性; 测量后的 T/C 值小于判定值判定为阴性结果。定量判定时, Y 后的数值为定量结果, 其含义为预处理后的样品中细菌浓度为 10^Y CFU/mL。

4. 注意事项: 应注意检测方法的灵敏度和适用范围。检测发现该方法具有与胶体金检测相当或更灵敏的检测敏感性。检测阳性标本应立即进行霍乱弧菌分离。另即便检测判断为阴性, 仍需要确认时, 需立即进行霍乱弧菌的增菌分离培养。

五、基于核酸扩增的检测

核酸扩增检测具有高灵敏度高特异性的特点, 针对霍乱弧菌特异基因设计特异引物进行扩增检测。从扩增检测形式上, 又可分为常规 PCR 以及荧光实时 PCR。目前多使用霍乱毒素基因 *ctxAB*、外膜蛋白基因 *ompW* 等作为检测靶基因, 另外, 针对 O1 群/O139 群脂多糖合成基因, 也设定为检测靶基因, 以快速检测标本中是否含有 O1 群/O139 群霍乱弧菌。

可以直接对标本、标本增菌液以及分离的菌株中提取核酸作为模板, 进行 PCR 扩增检测。需注意粪便以及一些食品标本中, 含有较多的 PCR 抑制因素, 造成检测灵敏度下降。对这些标本先进行增菌, 自增菌液中提取 DNA 作为模板, 能很好地提高 PCR 检测灵敏度。另外, 在进行大量标本筛查时, 如对大批食品或水体标本进行霍乱弧菌尤其产毒株的筛检, 可对样品增菌液进行核酸提取和扩增检测, 针对阳性以及可疑阳性标本、再进行分离培养, 可提高工作效率。但需注意实验室要对这一检测策略以及核酸扩增检测试剂进行评价。

目前对于霍乱弧菌病例的确认,仍以获得霍乱弧菌菌株为标准,核酸扩增检测为辅助检测方法、以及用于监测和研究。结果阳性或可疑阳性时,可立即对本标进行菌株分离。

(一) 霍乱毒素基因 *ctxAB* 的检测

1. 常规 PCR 检测霍乱毒素基因

(1) 引物: 可使用引物对 5'-ATT TTG AGG TGT TCC ATG TG-3' 和 5'-ATA AAG CAG TCA GGT GGT CT-3'。扩增产物全长 749bp。

(2) PCR 扩增反应体系: 在 0.5ml 微量离心管中按顺序加入以下各种成分: 纯水 12.8 μ L, 10 \times PCR 缓冲液 2 μ L, dNTPs 0.8 μ L (每种 dNTPs 终浓度为 0.2mmol/L), 引物 2 μ L (每种引物终浓度为 0.5 μ mol/L), Taq DNA 聚合酶 0.4 μ L (1.2U), 最后加入提取的模板 DNA 2 μ L。

(3) 扩增参数: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C, 30 sec, 56 $^{\circ}$ C, 40 sec, 72 $^{\circ}$ C, 1 min, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

(4) PCR 扩增结束后, 在样本管中加入溴酚蓝载样液, 通过 1.0%琼脂糖凝胶 (含 0.5 μ L/mL 溴化乙锭) 电泳, 并加相应的标准分子量 (Marker) 样品孔, 电泳结束后, 通过紫外灯观察结果, 并照相记录, 根据扩增产物的有无和片段大小判断。

2. TaqMan 探针实时 PCR 检测霍乱毒素基因

针对 *ctxAB* 基因的 TaqMan 探针实时 PCR 检测方法, 远高于普通 PCR 的灵敏度。

(1) 引物和探针: 可使用引物对 5'-CTT CCC TCC AAG CTC TAT GCT C-3' 和 5'-TAC ATC GTA ATA GGG GCT ACA GAG-3', 探针为 FAM-ACC TGC CAA TCC ATA ACC ATC TGC TGC TG-BHQ1。

(2) 反应体系: 实时 PCR 采用 20 μ L 反应体系, 每个反应中含 10 μ L 通用 PCR 反应混合物 (建议使用不同厂家产品时, 先进行测试)、或自行配制, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.4 μ L, 探针 (10 μ mol/L) 0.4 μ L, 去离子水 6.8 μ L, 提取的 DNA 模板 2 μ L。

(3) 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 30 sec, 95 $^{\circ}$ C 5 sec 和 60 $^{\circ}$ C 20 sec, 循环 40 次, 在退火阶段检测荧光。

(4) 结果判定: 在样品的检测中, 通常将荧光曲线的循环域值 (Ct) 小于 35 的样品判定为阳性 (但注意样品的纯度以及反应体系的扩增效率、仪器不同时, Ct 值可有差异), 而当 Ct 值大于 35 时, 可进行二次检测, 若二次检测的 Ct 值仍大于 35 时, 可视为疑似阳性。阳性和疑似阳性的标本均需进行菌株分离鉴定。

(二) 荧光 PCR 检测 01/0139 群霍乱弧菌 *rfb* 基因

该方法可直接从核酸的角度检测标本中是否含有 01 群或 0139 群霍乱弧菌。注意不能检测样本中是否有非 01/非 0139 群菌株。此处为 01 群和 0139 群霍乱弧菌双重 TaqMan 探针实时 PCR 检测体系, 靶基因为两者的脂多糖抗原的 *rfb* 基因片段。

1. 引物和探针: 针对 01 群脂多糖合成基因簇的引物对为 5'-GGA ATA ACT CAA GGC GAT GAA GTG-3' 和 5'-TAG AGA CTC ACC TTC GAT TTC AGC-3', 探针为 FAM-AAA CGG GTA ACG CAC CAC ACT GGA CT-BHQ1, 针对 0139 群脂多糖合成基因簇的引物对为 5'-CGA TGG CGT GTT CAT TAG AAG G-3' 和 5'-TCC CTT TCC ACC TCG GTA TTT C-3', 探针为 HEX-CGG CAA ACT GGC AGC AAA CTC AGC A-BHQ1。

2. 反应体系: 采用 20 μ L 反应体系, 每个反应中含 10 μ L 通用 PCR 反应混合物 (建议使用不同厂家产品时, 先进行测试), 01 *rfb* 基因上下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.4 μ L, 探针 (10 μ mol/L) 0.4 μ L; 0139 *rfb* 基因上下游引物 (10

$\mu\text{mol/L}$) 各 $0.4\ \mu\text{L}$, 探针 ($10\ \mu\text{mol/L}$) $0.4\ \mu\text{L}$, 去离子水 $5.6\ \mu\text{L}$, 提取的 DNA 模板 $2\ \mu\text{L}$ 。

3. 扩增条件: 95°C 30 sec, 95°C 5 sec 和 60°C 20 sec, 循环 40 次, 在退火阶段检测荧光。实验中需要加入阳性和阴性对照菌株的染色体 DNA。

4. 结果判定: 对于 01 群和 0139 群霍乱弧菌, 阳性结果可用不同颜色的荧光曲线加以区分。如果结果中有两种颜色的扩增荧光曲线, 则提示样品中同时含有 01 群和 0139 群霍乱弧菌。

在样品的检测中, 通常将荧光曲线的循环域值 (C_t) 小于 35 的样品判定为阳性 (但注意样品的纯度以及反应体系的扩增效率、仪器不同时, C_t 值可有差异), 而当 C_t 值大于 35 时, 可进行二次检测, 若二次检测的 C_t 值仍大于 35 时, 可视为疑似阳性。阳性和疑似阳性的标本均需进行菌株分离鉴定。

第三节 用于疫情调查分析的菌株分型

自病例和其他标本中检测出霍乱弧菌, 是对病例诊断、疫情确认和危险因素评估的基础。在疫情分析、流行病学调查分析、感染溯源等疫情处置和监测中, 还需要对分离的菌株进行进一步的分型, 包括基于核酸指纹图谱的分子分型以及噬菌体-生物分型等。这些数据可以协助判断不同病例和标本分离的菌株是否菌型一致, 提出可能存在共同暴露、存在暴发与播散、确认感染来源比如污染食品等, 另外可从较大范围和较长时间分析疫情菌株的变化规律, 是疫情调查和监测分析的重要实验室工具和信息。

一、分子分型

(一) 脉冲场凝胶电泳 (PFGE)

PFGE已用于多种致病菌的分子分型，以对不同来源分离株进行基于基因组水平的分子指纹图谱分析。该技术用于流行病学调查，主要基于以下原则：如果多个病例感染的菌株来自同一来源（如同种污染食品、同一偶然污染水体等），那么这些菌株的分子分型特征相同或非常相似，对这些菌株的分子分型图谱分析，有助于发现型别成簇，提示可能有共同来源，从而开展流行病学调查，发现暴发，查找来源，通过采取公共卫生措施减少发病和抑制流行。分子分型图谱也已被用于流行病学调查中的病例定义，比如对沙门菌感染，病例很多，但为溯源某种污染食品，可以在病例描述中加入“分离到具有某种分子分型图谱的菌株的病例”。

PFGE选用识别少见酶切位点的内切酶切割细菌染色体DNA，获得的DNA大片段在外加脉冲电场的低浓度琼脂糖凝胶中分离，产生数量有限的DNA条带。其原理是DNA分子在脉冲电场中随着电泳方向的改变不断改变其分子构像，挤过凝胶间隙。小的DNA分子比大的分子重新定向较快，在凝胶中移动快，从而使小分子DNA片段与大片段相分离、同时较大的DNA片段也能被有效分离，在凝胶上按染色体片段长度的不同而呈现出电泳带型。

在霍乱弧菌分型的实际应用中，PFGE显示了比其它分型方法更强的分辨力和流行病学调查能力。而且，由于PFGE是选用染色体DNA，在统一设定内切酶和实验条件下，产生的结果是可重复性好，因而不同实验室的PFGE结果具有可比性，这是PFGE分型方法优于其他众多分子分型方法之处。为了使PFGE结果能在实验室内进行比较，有很多实验室都针对流行病学研究的目的对PFGE的实验条件和操作方法进行优化和标准化。目前，一些公共卫生实验室使用的用于分析霍乱弧菌分离株的PFGE实验方案是由美国CDC联合一些实验室确定的PFGE实验方案。

美国CDC于1996年建立了以PFGE技术为核心的PulseNet，并且确定了多种细菌的PFGE标准实验方案，实现了不同地区实验室菌株分析和传染病实验室监测的

网络化和标准化。PFGE分型技术是目前霍乱流行病学调查中使用最普遍的分子分型方法，在近几年里，一些实验室采用此方法进行流行病学分析，显示了较高的实用价值。

我国也建立了病原细菌的分子分型实验室监测网络PulseNet China，对于霍乱弧菌，按照国际网络PulseNet International的标准化方案，采用*NotI*和*SfiI*两种内切酶。一般的监测中可采用*NotI*一种酶，但在重要监测、暴发调查（协查）、以及一般监测中的特别需要时，需完成两个酶的PFGE图谱。霍乱弧菌的PFGE操作标准化程序见附件4“霍乱弧菌PFGE标准操作方法”，是国际病原菌分子分型监测网络PulseNet International制订的霍乱弧菌PFGE标准方法。

（二）其他分子分型方法

包括多位点重复序列可变数目分型（MLVA）、多位点序列分型（MLST）等，目前有多篇文章报道，但没有标准化。MLVA用于霍乱弧菌分子分型和流行病学调查的作用还在评估中，目前的MLST分型主要用于细菌进化相关的定义和研究。

二、01群埃尔托型霍乱弧菌的噬菌体-生物分型

01群埃尔托生物型霍乱弧菌在1961年传入我国，中国医学科学院流研所（现中国疾病预防控制中心传染病所）的研究人员，利用从自然水体和病人粪便中分离出的弧菌噬菌体，筛选出五株噬菌体，于1966年建立了噬菌体分型方案，根据菌株被五株噬菌体裂解谱的不同，将埃尔托型霍乱弧菌分成32个型别。1975年进一步提出生物分型方案，即根据菌株的溶源性、对溶源噬菌体的敏感性、山梨醇发酵试验和溶血试验等四个生物学性状，将埃尔托型菌株分成12个生物型。噬菌体分型与生物分型相结合，形成了埃尔托菌株的噬菌体-生物分型方案，不仅增加了菌株的分型型别，并定义了“流行株”和“非流行株”两类菌株：具有独特噬菌体-生物型别的流行株的菌株主要分离自流行期间的病人、带菌者及其

污染的外环境，能引起流行或大流行；噬菌体-生物型别较分散的非流行株主要分离自疫区和非疫区的自然水中，一般不致病或仅引起散发腹泻病例。在我国霍乱防控史上，噬菌体-生物分型方案发挥了重要的作用。

（一）噬菌体-生物分型的流行病学作用

1. 按两类菌株的流行病学特点，采取区别对待的防疫对策：明确两类菌株后，重点对流行株采取霍乱的防疫措施，而非流行株则按一般感染性腹泻处理。

2. 分析预测流行趋势：噬菌体-生物分型将埃尔托霍乱弧菌区分为流行株与非流行株和若干型别。通过菌型监测，不但可掌握疫情中菌型的动态，且对预测流行趋势有参考价值。

3. 区分两类菌株在病原学上的作用：两类菌株差别显著，在病原诊断、流行病学调查和采取相应措施方面均需要明确区分。在病原分子生物学研究发现，绝大部分流行株均具有霍乱毒素基因 *ctxAB*，属于产毒株，而非流行株则仅少数有 *ctxAB* 基因，以不产毒株为主。在无法开展毒素基因检测的地区，噬菌体-生物分型可简单地提供了产毒株与非产毒株的佐证。

（二）噬菌体分型

根据 5 株国内分离的弧菌噬菌体（VP1~VP5）将 01 群埃尔托型霍乱弧菌分成 32 个噬菌体型（表 3）。对 5 株噬菌体全敏感的噬菌体 1 型菌株是最常见的流行菌株。2 型主要是 1 型的粗糙型，3~6 型也属流行株范畴。7 型以后（包括 7 型）属非流行株，对 5 株噬菌体全抵抗的是 32 型。非流行株仅引起散发病例，是一些疫区和非疫区自然水体中的常见菌型。具体操作见附件 5 “01 群埃尔托型霍乱弧菌噬菌体-生物分型操作方法”。

表 3. 01 群埃尔托生物学霍乱弧菌噬菌体分型表

| 噬菌体型 | 对分型噬菌体的敏感性 | | | | |
|------|------------|-----|-----|-----|-----|
| | VP1 | VP2 | VP3 | VP4 | VP5 |
| 1 | + | + | + | + | + |
| 2 | + | + | + | - | + |
| 3 | + | + | - | + | + |
| 4 | + | - | + | + | + |
| 5 | - | + | + | + | + |
| 6 | + | + | + | + | - |
| 7 | - | + | + | - | + |
| 8 | - | - | + | + | + |
| 9 | - | + | - | + | + |
| 10 | + | - | - | + | + |
| 11 | + | - | + | - | + |
| 12 | + | + | - | - | + |
| 13 | - | + | + | + | - |
| 14 | + | - | + | + | - |
| 15 | + | + | - | + | - |
| 16 | + | + | + | - | - |
| 17 | - | - | - | + | + |
| 18 | - | - | + | - | + |
| 19 | - | + | - | - | + |
| 20 | + | - | - | - | + |
| 21 | - | - | + | + | - |
| 22 | - | + | - | + | - |
| 23 | + | - | - | + | - |
| 24 | - | + | + | - | - |
| 25 | + | - | + | - | - |
| 26 | + | + | - | - | - |
| 27 | - | - | - | - | + |
| 28 | - | - | - | - | - |
| 29 | - | - | - | - | - |
| 30 | - | + | - | - | - |
| 31 | + | - | - | - | - |
| 32 | - | - | - | - | - |

注：“+”代表霍乱弧菌对分型噬菌体敏感，“-”代表霍乱弧菌对分型噬菌体不敏感。

(三) 生物分型

根据菌株的溶原性、对溶原噬菌体的敏感性、山梨醇发酵试验和溶血试验等4个生物学试验，将埃尔托型霍乱弧菌分成12个生物型（表4）。具体操作见附件5“01群埃尔托型霍乱弧菌噬菌体-生物分型操作方法”。

表4. 01群埃尔托生物型霍乱弧菌生物分型表

| 生物型 | 生物学性状 | | | |
|-----|-------|------------|---------|------|
| | 溶原性 | 对溶原噬菌体的敏感性 | 山梨醇发酵试验 | 溶血试验 |
| a | + | - | - | + |
| b | + | - | - | - |
| c | - | + | - | + |
| d | - | + | - | - |
| e | - | - | - | + |
| f | - | - | - | - |
| g | + | - | + | + |
| h | + | - | + | - |
| i | - | + | + | + |
| j | - | + | + | - |
| k | - | - | + | + |
| l | - | - | + | - |

注：“+”代表生物分型试验阳性，“-”代表生物分型试验阴性。

a~f生物型为流行株，g~l型为非流行株。目前流行株中以a~d型常见，非流行株中k、l型居多。a~f生物型为流行株，g~l型为非流行株。a、b、g、h型为溶原株，c、d、i、j型为复愈株，e、f、k、l型为非溶复株。两类菌株均有溶原株、复愈株和非溶复株。但流行株中a~d型常见，非流行株中k、l型居多。目前发现山梨醇发酵试验与霍乱弧菌流行株与非流行株两大类菌株有很好的平行关系，按照定义，流行株均为慢发酵株，非流行株均为快发酵株。另外，实验发现可用甘露醇替代山梨醇进行发酵实验，一是甘露醇使用的浓度可为

0.2%，二是在发酵实验过程中，使用甘露醇时不存在快发酵株发酵液颜色重新返回红色的现象，三是霍乱弧菌中存在利用甘露醇的系统，还没有发现利用山梨醇的系统。

（四）埃尔托型霍乱弧菌噬菌体-生物分型

是将噬菌体分型与生物分型结合起来。每个噬菌体型又可分为若干生物型，即噬菌体-生物型（如 1a、1d、8i、30k 等）。划分流行株与非流行株的标准见图 6。目前定义为噬菌体 1~6 型、生物型 a~f 的菌株为噬菌体-生物分型的“流行株”，其他型别的菌株定义为“非流行株”。常见的流行株为噬菌体 1~3 型、生物型 a~d 型；最常见的是 1a、1b 和 1d 型。噬菌体 7~32 型、生物型 g~l 为非流行株。另外，埃尔托型菌株的生物分型中，a、b、g、h 型为溶原株，c、d、i、j 型为复愈株，e、f、k、l 型为非溶复株。两类菌株均有溶原株、复愈株和非溶复株。但流行株中 a~d 型常见，非流行株中 k、l 型居多。

通过对 O1 群埃尔托生物型霍乱弧菌分离株的霍乱毒素基因检测，发现噬菌体-生物分型为“流行株”的菌株几乎均为产毒株（仅发现个别的菌株为不携带毒素基因的菌株，且基因组分析发现这些菌株与流行株非常相似），“非流行株”不携带霍乱毒素基因，为非产毒株。

| | a | b | c | d | e | f | g | h | i | j | k | l |
|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | | | | | | | | | | | | |
| 2 | | | | | | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | | | | | |
| 4 | | | | | | | | | | | | |
| 5 | | | | | | | | | | | | |
| 6 | | | | | | | | | | | | |
| 7 | | | | | | | | | | | | |
| 8 | | | | | | | | | | | | |
| 9 | | | | | | | | | | | | |
| 10 | | | | | | | | | | | | |
| 11 | | | | | | | | | | | | |
| 12 | | | | | | | | | | | | |
| 13 | | | | | | | | | | | | |
| 14 | | | | | | | | | | | | |
| 15 | | | | | | | | | | | | |
| 16 | | | | | | | | | | | | |
| 17 | | | | | | | | | | | | |
| 18 | | | | | | | | | | | | |
| 19 | | | | | | | | | | | | |
| 20 | | | | | | | | | | | | |
| 21 | | | | | | | | | | | | |
| 22 | | | | | | | | | | | | |
| 23 | | | | | | | | | | | | |
| 24 | | | | | | | | | | | | |
| 25 | | | | | | | | | | | | |
| 26 | | | | | | | | | | | | |
| 27 | | | | | | | | | | | | |
| 28 | | | | | | | | | | | | |
| 29 | | | | | | | | | | | | |
| 30 | | | | | | | | | | | | |
| 31 | | | | | | | | | | | | |
| 32 | | | | | | | | | | | | |

图 6. 01 群埃尔托生物型霍乱弧菌的噬菌体-生物分型表。

表中纵列数字为噬菌体型，横行英文字母为生物分型。噬菌体型和生物型组合成噬菌体-生物分型。噬菌体型 1~3 及生物型 a~d 的菌株（在方格表中粗线框部分）为至目前流行的常见流行株分型；噬菌体型 4~6 及生物型 e 和 f 的菌

株（方格表中较粗线框、除粗框内的部分）为至目前流行的不常见流行株分型；其余部分属于非流行株分型。

第四节 耐药性检测

测定细菌对药物的敏感程度，主要采用体外抗菌药物敏感试验，试验方法主要有定性测定的纸片琼脂扩散法（disk agar diffusion test, Kirby-Bauer test, 简称 K-B 法）、定量测定的稀释法（dilution test）和浓度梯度法（E-test）。纸片扩散法（K-B 法）是最为常用的方法，成本低，操作简单，重复性好，抗菌药物的选择有很大的灵活性。稀释法包括琼脂稀释法和肉汤稀释法，是一种可靠、标准化的方法，可直接定量测出药物对待检菌株的最低（或最小）抑菌浓度（minimal inhibitory concentration, MIC）。E-test 法结合扩散法和稀释法的原理和特点，操作简便如扩散法，但可以同稀释法一样获得待检菌对药物的 MIC。E-test 法成本高，使得使用受限。目前广泛采用 WHO 推荐的改良纸片扩散法。

一、纸片扩散法（K-B 法）

（一）基本原理

将含有定量抗菌药物的纸片贴在已接种待检菌的琼脂平板上，纸片中含的药物吸取琼脂中的水分溶解后会不断地向纸片周围区域扩散，形成递减的梯度浓度，在纸片周围抑菌浓度范围内待检菌的生长被抑制，从而产生透明的抑菌环。抑菌环的大小反映检测菌对测定药物的敏感程度，并与该药对待检菌的 MIC 值呈负相关，即抑菌环愈大，MIC 愈小。

（二）实验操作

1. 药敏试验纸片的选则：依据治疗肠道细菌性感染时常用抗菌药物的种类及便于各地区检出霍乱弧菌菌株对药物敏感性的比较，可参考选用下列药敏纸片：环丙沙星、诺氟沙星、吡哌酸、痢特灵、强力霉素、红霉素、新霉素、多粘菌素 B、氨苄青霉素、妥布霉素、氯霉素、庆大霉素、复方新诺明、四环素、链霉素、丁胺卡那霉素。

2. 培养基：称取适量水解酪蛋白琼脂（Mueller-Hinton, MH）粉加蒸馏水加热溶化，调 pH 至 7.4，15 lb 20min 高压灭菌后冷至 45℃ ~ 50℃，在水平试验台上制备平板。直径 9cm 的平皿，琼脂深度约为 4mm，大约需要 25mL。倾注平皿前应用 pH 计测 pH 值是否正确（pH 应为 7.3）。琼脂凝固后，直接使用的平皿应在约 37℃ 的培养箱内烘 30min；备用的平皿应储于培养基罐或塑料袋内，密封后置于 4℃ ~ 8℃ 冰箱，二周内有效。

3. 接种菌液制备：可选用下列二种方法之一配制接种物：

（1）增菌法：用接种环挑取形态相似待检菌落 3 个至 5 个，接种于 4mL ~ 5mL 的 MH 肉汤中，35℃ 孵育 2 h ~ 6h。增菌后的对数生长期菌液用生理盐水或 MH 肉汤校正浓度至 0.5 麦氏比浊标准，约含 1.0×10^8 CFU/mL ~ 2.0×10^8 CFU/mL。

（2）直接菌落悬液配制法：直接取培养 16h ~ 18h 的纯培养菌落用生理盐水或肉汤调配成 0.5 麦氏比浊标准的菌悬液。

参比比浊管：可选用比浊管或按以下方法配置：1.175% (W/V) $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.5mL，1% H_2SO_4 溶液 99.5mL。标准液应装于直径与细菌培养肉汤管一致的试管内，密封管口。置室温暗处可保存六个月。

4. 接种 MH 平板：用无菌棉拭蘸取培养液，挤压去多余的液体后在琼脂表面上划线，使线条布满平皿，以确保接种菌均匀分布，最后用拭子绕琼脂平面边缘划两周，盖上皿盖，让平皿在室温中放置数分钟；

5. 贴药敏纸片：待平板水分完全吸收后，用消毒镊子或纸片分配器将药敏纸片紧贴放于已接种的琼脂表面并轻压，各纸片中心相距不少于 24mm，离平皿边缘不少于 15mm。

6. 培养：平板倒置于 35℃培养箱，叠放不超过两个，培养 16h~18h 后读取结果。

7. 结果的读取和判定：用以毫米为单位的量具在直射光下测量抑菌圈直径，抑菌环的边缘以肉眼见不到细菌明显生长为限。结果判定按照 CLSI 出版的药敏试验指南的最新版本进行，参比菌株的敏感度在允许范围内测试菌株的结果才可报告，否则应采取措施，改进试验质量。

8. 质量控制

(1) K-B 法使用的 MH 琼脂的质量须符合美国临床实验室标准化研究所 (CLSI, 以前称美国临床实验室标准委员会, NCCLS) 的标准。MH 琼脂中若含有胸腺嘧啶核苷或胸腺嘧啶可逆转磺胺类、甲氧苄啶的抗菌效应，造成假耐药现象 (使抑菌圈变小，模糊，甚至无抑菌圈)，影响对磺胺类、甲氧苄啶的药敏结果判定。可用复方新诺明对粪肠球菌 ATCC29212 或 ATCC33186 试验，若抑菌圈 $\geq 20\text{mm}$ ，边缘清楚，说明该 MH 培养基合格。

(2) 用标准的参比菌株与待测菌平行测定药敏，常用的参比菌株有金黄色葡萄球菌 (ATCC 25923)，大肠埃希氏菌 (ATCC 25922) 和铜绿色假单胞菌 (ATCC 27853)。参比菌株最好冷冻干燥保存，日常使用时保存于琼脂斜面，并储于 4℃ 冰箱，传代不宜超过 5 次。

(3) 药敏纸片的储存：药敏纸片的含药量及有效性尤为重要，库存的药敏纸片应储于 -20℃，不稳定药物最好在 -40℃ 以下保存，少量常用的纸片可放在普通冰箱的冰盒内，都必须密封瓶口。使用时从冰箱取出，置室温 1h，使温度平衡，再打开使用。

二、稀释法

(一) 基本原理

稀释法药敏试验用于定量测试抗菌药物对某一细菌的体外活性,分为琼脂稀释法和肉汤稀释法,肉汤稀释法又可分为常量肉汤稀释法和微量肉汤稀释法。试验时抗菌药物的浓度经过一系列的对比稀释,能抑制待测菌肉眼可见生长的最低药物浓度称为最小抑菌浓度(MIC)。

(二) 实验操作

1. 琼脂稀释法

(1) 抗生素贮存液的制备:药敏试验必须使用抗生素标准品或参考品,抗生素必须按照规定的温度和湿度等条件贮存,在保质期内使用。抗生素贮存液可分装无菌小瓶, -20°C 至 -60°C 贮存。制备抗生素储存液的溶剂和稀释液参见 CLSI 指导文件附表。

(2) 琼脂稀释平皿的制备:融化的 MH 琼脂冷却至 $48^{\circ}\text{C} \sim 50^{\circ}\text{C}$, 加入稀释的抗生素工作液到琼脂中混匀,在水平台面上制备平板,琼脂厚度 $4 \pm 0.5\text{mm}$ 。凝固后装入塑料袋密封 $4^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 贮存,五天内使用。不稳定药物如氨苄西林,甲氧西林,亚安培南和克拉维酸或其它已知不稳定的 β -内酰胺/ β -内酰胺酶抑制剂组合的抗微生物药的平板要临用新配。必须用质控菌株评价平皿的稳定性。

(3) 制备接种菌液:接种菌液的制备同 K-B 法,先制备得到 0.5 麦氏标准浓度的菌液 ($1.0 \times 10^8\text{CFU/mL} \sim 2.0 \times 10^8\text{CFU/mL}$),再用无菌肉汤或生理盐水 1:10 稀释,作为琼脂稀释法的接种液 (10^7CFU/mL)。

(4) 接种琼脂平皿:在平皿上作标记,确定接种点的方位。90mm 的平板可接种 30 个点。每个点接种 $2\mu\text{L}$ 菌液,接种菌量约为 10^4 CFU。配制好的菌液最好在 15min 内接种。首先接种不含抗生素的平板作为细菌生长对照,从最低浓度

的抗生素平板开始依次接种平皿，最后接种第二块不含抗生素的平板作为生长对照，以确认接种过程有无污染。

(5) 培养：接种好的平板应在室温下静置至接种点上的菌液被琼脂完全吸收，再将药敏平皿倒置，35℃孵育 16h~20h。

(6) 结果判读：结果阅读时，平板应置于黑色不反光的表面上，记录的 MIC 是完全抑制细菌生长的最低抗生素浓度，单个菌落或接种物所致的轻微的不清晰现象可忽略不计。如果在 MIC 判断终点附近有多个菌落，或者低浓度不长，高浓度生长；即跳管现象，就应该检查试验菌的纯度，有否污染菌生长，并尽可能重复试验。

(7) 质控：同时用大肠埃希菌 (ATCC 25922)、铜绿假单胞菌 (ATCC 27853)、金黄色葡萄球菌 (ATCC 29213) 和粪肠球菌 (ATCC 29212) 作为质控菌株进行琼脂稀释药敏试验。

(8) 琼脂稀释法药敏试验的优点：琼脂稀释法药敏试验比肉汤稀释法重复性好，可同时检测多种被检菌，可发现混合菌和污染菌，可观察菌落生长良好与否。

2. 常量肉汤稀释法

(1) 抗菌药物贮存液制备：抗菌药物贮存液浓度不应低于 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (如 1280 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 或 10 倍于最高测定浓度。溶解度低的抗菌药物可稍低于上述浓度。抗菌药物可直接购自厂商或相关机构。所需抗菌药物溶液量或粉剂量可公式进行计算。例如：需配制 100 mL 浓度为 1280 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的抗生素贮存液，所用抗生素为粉剂，其药物的有效力为 750 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。用分析天平精确称取抗生素粉剂的量为 182.6 mg。根据公式计算所需稀释剂用量为： $(182.6 \text{ mg} \times 750 \mu\text{g}/\text{mL}) / 1280 \mu\text{g}/\text{mL} = 107.0\text{mL}$ ，然后将 182.6 mg 抗生素粉剂溶解于 107.0mL 稀释剂中。制备抗

菌药物贮存液所用的溶剂和稀释剂按说明使用。配制好的抗菌药物贮存液应贮存于-60℃以下环境，保存期不超过6个月。

(2) 药敏试验用抗菌药物浓度范围：根据 CLSI 抗菌药物敏感性试验操作标准，药物浓度范围应包含耐药、中介和敏感分界点值，特殊情况例外。

(3) 培养基：CLSI 推荐使用 MH 肉汤，pH7.2~7.4。

(4) 接种物的制备：接种菌液的制备同 K-B 法，先制备得到 0.5 麦氏标准浓度的菌液 (1.0×10^8 CFU/mL ~ 2.0×10^8 CFU/mL)，用 MH 肉汤将上述菌悬液进行 1:100 稀释后备用。注意应在 15 分钟内接种完配制好的接种物，并取一份接种物在非选择性琼脂平板上传代培养，以检查接种物纯度。

(5) 稀释抗菌药物的制备及菌液接种：取无菌试管 (13mm × 100mm) 13 支，排成一排，除第 1 管加入 1.6mL MH 肉汤外，其余每管加入 MH 肉汤 1mL，在第 1 管加入抗菌药物原液 (如 1280 μg/mL) 0.4ml 混匀，然后吸取 1mL 至第 2 管，混匀后再吸取 1mL 至第 3 管，如此连续倍比稀释至第 11 管，并从第 11 管中吸取 1mL 弃去，第 12 管为不含药物的生长对照。此时各管药物浓度依次为 256、128、64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25 μg/mL。然后在每管内加入上述制备好的接种物各 1mL，使每管最终菌液浓度约为 5×10^5 CFU/mL。第 1 管至第 11 管药物浓度分别为 128、64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125 μg/mL。

(6) 孵育：将接种好的稀释管塞好塞子，置 35℃ 孵箱中孵育 16h~20h。

(7) 结果判断：在读取和报告所测试菌株的 MIC 前，应检查生长对照管的细菌生长情况是否良好，同时还应检查接种物的传代培养情况以确定其是否污染，质控菌株的 MIC 值是否处于质控范围。以肉眼观察，药物最低浓度管无细菌生长者，即为受试菌的 MIC。

3. 微量肉汤稀释法

(1) 抗菌药物和培养基制备：同常量肉汤稀释法。

(2) MIC 板制备: 无菌操作, 将倍比稀释后不同浓度的抗菌药物溶液分别加到灭菌的 96 孔聚苯乙烯板中, 第 1 至第 11 孔加药液, 每孔 $10\ \mu\text{L}$, 第 12 孔不加药作为生长对照, 冰冻干燥后密封, -20°C 以下保存备用。

(3) 接种物制备: 将用增菌法或直接菌悬液法制备的浓度相当于 0.5 麦氏比浊标准的菌悬液, 经 MH 肉汤 1:1000 稀释后, 向每孔中加 $100\ \mu\text{L}$, 密封后置 35°C 孵箱中, 孵育 16h~20h 判断结果。此时, 第 1 孔至第 11 孔药物浓度分别为 128、64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25、 $0.125\ \mu\text{g/mL}$ 。

(4) 结果判断: 以在小孔内完全抑制细菌生长的最低药物浓度为 MIC。当阳性对照孔 (即不含抗生素) 内细菌明显生长试验才有意义。当在微量肉汤稀释法出现单一的跳孔时, 应记录抑制细菌生长的最高药物浓度。如出现多处跳孔, 则不应报告结果, 需重复试验。通常对革兰阴性杆菌而言, 微量肉汤稀释法测得的 MIC 与常量肉汤稀释法测得的结果相同或低一个稀释度 (1 孔或 2 倍)。

三、浓度稀释法 (E-test 法)

(一) 基本原理

原理基本同扩散法, 即浓度呈连续梯度的抗菌药物从塑料试条中向琼脂中扩散, 在试条周围抑菌浓度范围内受试菌的生长被抑制, 从而形成透明的抑菌圈。E-test 综合了稀释法和扩散法的原理和特点, 同时还弥补了二者的一些不足, 可以像稀释法一样直接定量测出抗菌药物对受试菌的 MIC。

(二) 实验操作

1. 培养基、菌液制备和接种: 同 K-B 法。
2. 贴 E-test 试验条: E-test 试验条的刻度面朝上, 不能贴反, 一旦接触琼脂后不得再移动。直径 150mm 的平皿内可放置 6 根 E 试验试条, 90mm 者一般只能放置 1 根。

3. 孵育时间和温度：将平板反转放入 35℃培养箱，不可放在 CO₂环境中。平板在培养箱内叠放不得超过 2 个，否则会影响中间的平板，达不到培养温度而产生扩散的作用。平板培养 16h~18h 后取出读取结果。

4. 结果阅读：孵育后围绕试条可形成一个椭圆形的抑菌圈，在抑菌圈和试条的横切相交处试条上的读数刻度即是测定抗菌药物对受试菌的 MIC。阅读时应注意的问题见供应商的产品说明书。

第五节 实验室生物安全

霍乱属于肠道传染病，对实验室操作以及样品采集等方面的生物安全应按照肠道感染细菌性疾病的通用生物安全要求。另外，霍乱在我国属于传染病法规定的甲类报告管理传染病，在卫生部《人间传染的病原微生物名录》(2006 年)中，霍乱弧菌流行株危害程度为第二类，属于高致病性微生物级别(非流行株危害程度为第三类)，要求在生物安全 II 级实验室(BSL-2)操作病原体。

一、生物安全管理要求

(一) 实验室建设

疾控中心：建立 BSL-2 实验室开展霍乱弧菌的实验室检测。各级疾控中心在开展霍乱弧菌的实验室检测工作时，应按照《病原微生物实验室生物安全管理条例》(国务院令，2004)、《实验室生物安全通用要求》(GB 19489-2008)建立 BSL-2 级实验室开展标本的实验室检测。按照相应规定向当地卫生行政部门备案 BSL-2 级实验室及活动。

临床机构：临床检验实验室开展霍乱的检验过程中，应按照卫生部《医疗机构临床实验室管理办法》（2006），加强实验室生物安全管理，按要求装备生物安全操作设备和个人防护用品，并严格操作程序。

（二）菌种及样本保存

省级疾控中心和其他机构在进行霍乱弧菌的保藏时，应符合卫生部《人间传染的病原微生物菌（毒）种保藏机构管理办法》（2009）对保藏机构设置的规定，主要包括国家级和省级菌（毒）种保藏中心和保藏专业实验室。保藏机构设立与建设、保藏活动均应符合规定。

（三）现场调查和样本采集

对于霍乱疫情或疑似霍乱疫情的现场调查和样本采集过程中，必须注意生物安全防护，调查采样人员应咨询实验室人员，做好个人防护以及避免采集标本过程中的感染以及标本再污染其他物品和环节。

二、霍乱弧菌危害程度分类等级和主要危害

（一）病原体分类等级

根据卫生部《人间传染的病原微生物名录》（2006年）规定，在危害程度分类上，霍乱弧菌流行株按第二类管理，非流行株归第三类，需在BSL-2实验室实验室进行。在没有通过噬菌体-生物分型进行流行株/非流行株的实验区分时，根据目前大量检测，产毒株等同于流行株，非产毒株等同于非流行株。

（二）感染性物质

包括病人粪便、呕吐物、以及被霍乱弧菌污染的水、食物、海产品、其他物品等标本。霍乱弧菌培养物（包括培养菌液或培养菌落等）是实验室感染发生的主要危险。

（三）主要危害（途径）

1. 实验室感染

主要是实验室操作过程中没有佩带手套、以手接触含霍乱弧菌的标本、增菌液以及霍乱弧菌的培养物、实验动物以及霍乱弧菌培养物污染物品等,并且对手、污染面没有进行严格消毒。

2. 院内感染

可能造成院内感染和传播的情况,主要发生在对霍乱住院患者病房的物体表面、病人的排泄物、呕吐物、医疗污物等未做消毒处理、或消毒不彻底、以手接触这些物品后没有对手进行严格消毒时。

3. 疫情调查和样品采集

主要是在现场接触被霍乱弧菌污染的物品,而未进行必要的个人防护和严格洗手等程序。样品采集时没有戴防护手套,并且没有严格洗手程序。

三、防护措施

(一) 防护要求

1. 霍乱弧菌产毒株(流行株)按第二类管理,非产毒株(非流行株)归第三类,在实验活动中应按照BSL-2实验室操作活动要求进行。

2. 以活菌感染的动物实验,在动物生物安全二级实验室(ABSL-2)实验室进行。

3. 样本检测,包括样本的病原菌分离纯培养、药物敏感性实验、生化鉴定、免疫学实验、PCR核酸提取等涉及活病原时,需在BSL-2实验室进行;临床实验室的检验活动,按照卫生部《医疗机构临床实验室管理办法》(2006)中关于实验室安全管理的要求进行。

4. 含非活菌的实验,如不含活菌材料的分子生物学、免疫学等实验,可在BSL-1实验室进行。

5. 现场调查和样品采集过程中,应避免与怀疑霍乱弧菌污染的部分接触,必要时穿戴个人防护服和手套。尤其采集样品(包括病人、疑似病人或疑似带菌

者的标本、以及非病人的其他所有标本)过程中,因涉及对霍乱弧菌污染调查,因此对采集样品均按含有霍乱弧菌病原体处理,需带手套操作。操作中除采样装置中接触标本的位置,避免污染其他物品表面。

(二) 个人防护装备

实验时着实验室工作服装和防护手套,需要时(如处理大量活菌及感染性材料、较长时间操作时)戴口罩。操作过程中严格操作程序,保障实验操作不遗撒含菌材料、不污染台面。勤洗手,操作完毕离开实验室时需对手进行彻底消毒清洗。

四、实验操作和采样中意外事件应急处置原则

1. 划伤或刺伤

主要包括:立即采取措施挤压受伤部位,并对局部进行可靠消毒;应使用足量清水冲洗伤口;应按照规定安全撤离污染区域,进行包扎处理;事后应将事故报告相关部门备案。应采取措施进行医学观察,并使用环丙沙星、诺氟沙星、复方磺胺甲噁唑等抗生素进行治疗。

2. 离心管破裂

应针对不同种类离心机和离心桶采取不同的处理措施,主要包括:及时关闭离心机电源;保持足够的静置时间,让气溶胶充分沉降;做好充足的个人防护后进行消毒清理,包括消毒液擦拭、浸泡和高压灭菌(对离心管以及可高压的离心转头)等;遵循良好实验室操作规范处理现场;按照规定处理废物。

3. 皮肤粘膜接触感染性物质

主要包括:立即停止工作,按照规定撤离至指定处理区域;使用合适的消毒液对污染部位实行消毒;对污染部位进行充分的冲洗。应根据不同程度进行隔离观察和抗生素预防治疗,按照规定报告相关部门备案。

4. 确定或有证据怀疑吸入含霍乱弧菌的气溶胶

虽然霍乱弧菌经肠道感染，但在操作过程中，在确定或有证据怀疑吸入含霍乱弧菌的气溶胶（一些实验操作可产生含霍乱弧菌的气溶胶，如快速搅拌含菌液体、悬空滴加菌液等）时，应按规程立即撤离实验室，在指定区域进行隔离观察，并服用抗生素进行预防性治疗。

5. 生物安全柜内少量溅洒

主要包括：采取有效措施避免二次产生气溶胶，如含消毒液浸湿的实验室纸巾和毛巾覆盖溅洒面等。使用高效消毒剂进行消毒，消毒时应遵循由四周到中心的消毒顺序，并保持消毒剂足够的作用时间。根据需要可进行重复消毒。

不同意外事故的具体处理指南，参考《实验室生物安全通用要求》（GB19489-2008）中的附录 C。

五、废物处理

通过蒸汽压力灭菌、化学消毒法处理所有来自防护实验室的废物材料，包括液体废物和固体废物。

六、菌株运输

在霍乱监测、疫情调查等过程中涉及霍乱弧菌菌株或样本的运输，需按照卫生部《可感染人类的高致病性病原微生物菌（毒）种或样本运输管理规定》（2005）的相关规定，办理申办手续、包装、运输和接收。

霍乱弧菌菌株和标本运输分类和 UN 编号：所有涉及霍乱弧菌的标本和培养物均属于 A 类感染性物质，联合国编号（UN 编号）均为 UN2814。

包装要求：应采取 A 类感染性物质运输包装，具体包装要求符合 IATA 《危险品规则》中包装说明 602。

第五章 诊断与治疗

临床机构，包括综合和专科医院、卫生院、诊所诊室、等等，是诊断治疗腹泻病人的场所，通过病例报告、确诊、转诊、治疗等，在霍乱疫情发现和控制中发挥不可缺少的作用。同时，医疗机构收治霍乱病例，也需要做好病人排泄物和隔离区室的卫生消毒，同样在控制霍乱疫情中发挥重要的公共卫生作用。

第一节 临床表现

一、潜伏期

绝大多数为 1d ~ 2d，可短至数小时或长达 5d ~ 6d。

二、泻吐期

大多数病例起病急，无明显前驱期，多以剧烈腹泻开始，继以呕吐，少数先吐后泻，大多无腹痛，亦无里急后重，少数有腹部隐痛或腹部饱胀感，个别可有阵发性绞痛。每日大便数次或更多，少数重型患者粪便从肛门可直流而出，无法计数。排便后一般有腹部轻快感。大便性状初为稀便，后即为水样便，以黄水样或清水样为多见，少数为米泔样或洗肉水样（血性）。大便镜检无脓细胞。少数患者有恶心。呕吐呈喷射状，呕吐物初为食物残渣，继为水样，与大便性状相仿。一般无发热，少数可有低热。儿童发热较成人多见。此期可持续数小时至 2d ~ 3d 不等。

三、脱水期

由于严重泻吐引起水及电解质丧失，可产生以下临床表现。

（一）一般表现

神态不安，表情恐慌或淡漠，眼窝深陷，声音嘶哑，口渴，唇舌极干，皮肤皱缩、湿冷且弹性消失，指纹皱瘪，腹下陷呈舟状，体表温度下降。

（二）循环衰竭

由于中度或重度脱水，血容量显著下降及血液极度浓缩，因而导致循环衰竭。患者极度软弱无力，神志不清，血压下降，脉搏细弱而速，心音弱且心率快，严重患者脉搏消失，血压不能测出，呼吸浅促，皮肤口唇黏膜发绀。血液检查可有红细胞、血红蛋白、血浆蛋白及血浆比重等的增高，血液黏稠度增加，由于脱水及循环衰竭，使肾血流量减少及肾小球滤过压下降，因而出现少尿或无尿，尿比重增高（1.020 以上）。如每日尿量少于 400mL，则体内有机酸及氮素产物排泄受到障碍，因而血液中尿素氮或非蛋白氮、肌酐增高，二氧化碳结合力下降，产生肾前性高氮质血症。经液体疗法纠正脱水及循环衰竭后，尿量恢复正常，血液中尿素氮（或非蛋白氮）、肌酐即可下降。

（三）电解质平衡紊乱及代谢性酸中毒

严重泻吐丢失大量水分及电解质后，可产生血液电解质的严重丧失。患者粪便中钠及氯离子的浓度稍低于血浆，而钾及碳酸氢根离子则高于血浆，但粪便中阳离子的总和及阴离子总和与血浆相等，故脱水性质属等渗性。在输液前，由于血液浓缩，测定患者血浆钠、钾、氯的离子浓度常表现正常或接近正常水平，钾离子甚至可以升高，但实际上患者体内缺钠缺钾已很严重，如治疗中继续输入不含电解质的溶液，则可立即使血液稀释产生低血钠及低血钾症。缺钠可引起肌肉痉挛（以腓肠肌及腹直肌最常见）、低血压、脉压小、脉搏微弱。缺钾可引起低钾综合征，表现为全身肌肉张力减低，甚至肌肉麻痹，肌腱反射消失，鼓肠，心动过速，心音减弱，心律不齐，心电图异常（Q-T 时限延长，T 波平坦或倒置，出现 U 波等），缺钾还可引起肾脏损害。

由于碳酸氢根离子的大量丧失，产生代谢性酸中毒。尿少及循环衰竭又可使酸中毒加重。严重酸中毒时可出现神志不清，呼吸深长，血压下降。

四、恢复期

脱水纠正后，大多数病人症状消失，逐渐恢复正常，病程平均 3d ~ 7d，少数可长达 10 日以上（多为老年患者或有严重合并症者）。部分患者可出现发热性反应，以儿童为多，这可能是由于循环改善后大量肠毒素吸收所致。体温可升高至 38℃ ~ 39℃，一般持续 1d ~ 3d 后自行消退。少数严重休克患者，可并发急性肾功能衰竭，这是由于在脱水虚脱期中肾脏缺血，发生急性肾小管坏死所致。缺钾引起的肾小管上皮细胞退行性变性也可诱发急性肾功能衰竭。如脱水及循环衰竭纠正后，患者仍少尿（每日尿量少于 400mL）或无尿（每日少于 50mL），尿比重偏低（1.018 以下，常固定于 1.010），血浆尿素氮（或非蛋白氮）、肌酐仍逐日上升，代谢性酸中毒更加严重，则应考虑并发急性肾功能衰竭。

五、临床分型

根据病情程度可分为轻、中、重三型，一般重型少，轻型多。因此，轻型霍乱常易被人们所疏忽而漏诊，须加警惕。为了便于掌握病情，指导临床诊断治疗工作，根据脱水程度，参考精神状态、血压及尿量变化等，判断病情（见表 5）。

表 5. 霍乱病例临床病情分型

| 体征 | 轻度 | 中度 | 重度 |
|------|------------|-----------|-----------|
| 体重% | 5%以下 | 5%~10% | 10%以上 |
| 精神状态 | 好 | 呆滞 | 极度烦躁或静止不动 |
| 嗜哑 | 无 | 轻 | 嗜哑 |
| 皮肤 | 弹性略差，稍干 | 弹性差，干燥 | 弹性消失 |
| 发绀 | 无 | 存在 | 明显 |
| 眼窝 | 稍凹陷 | 明显下陷 | 深陷，目闭不紧 |
| 指纹 | 正常 | 皱瘪 | 干瘪 |
| 腓肠肌 | 无痉挛 | 痉挛 | 明显痉挛 |
| 脉搏 | 正常 | 细速 | 弱速、无脉 |
| 收缩压 | 正常 | 轻度下降 | 休克 |
| 尿量 | 稍减少 | 减少 | 无尿 |
| 血浆比重 | 1.025~1.03 | 1.03~1.04 | >1.04 |

根据临床表现常可将霍乱患者分为典型病例（中、重型）、非典型病例（轻型）及中毒型病例（干性霍乱），分述如下。

（一）典型病例

包括中、重型患者，其临床表现相似，后者脱水及循环衰竭较前者为重。

（二）非典型病例（轻型）

症状常不明显，起病较缓，大多数患者仅有轻度腹泻，极少数伴有呕吐，大便次数每日2次以上，但一般不超过10次，大便性状为软便、稀便或黄水样便，个别带黏液或呈血性，一般无发热、腹痛、里急后重。少数有腹部隐痛。个别有发热及腹部阵发性绞痛。儿童可有高热。绝大多数患者能照常进食及起床活动，腹泻次数较多者可有轻度脱水表现，但神志、血压、脉搏均正常。病程短，多于3d~5d内恢复。

（三）中毒型病例（干性霍乱）

是一种特殊的临床类型，起病后迅速进入休克状态，无泻吐或泻吐较轻，无脱水或仅轻度脱水，但有严重中毒性循环衰竭。这种类型极为罕见。

第二节 诊断及鉴别诊断

一、诊断

（一）诊断依据

依据患者的流行病学史、临床表现及实验室检测结果进行综合判断。流行病学史是指：生活在霍乱流行区、或5d内到过霍乱流行区、或发病前5d内有饮用生水或进食海（水）产品或其他不洁食物和饮料史；或具有与霍乱患者或带菌者有密切接触史或共同暴露史。

1. 带菌者：无霍乱临床表现、但从粪便或肛拭子标本经细菌培养分离到 01 群和/或 0139 群霍乱弧菌者。

2. 疑似病例：具备霍乱流行病学史及轻、中、重各型临床表现，但无病原学证据者，可以作为霍乱疑似病例。

3. 临床诊断病例：符合下列任意一项均可判断为临床诊断病例。

(1) 疑似病例临床标本霍乱弧菌快速检验阳性（制动试验、胶体金快速检测）、或霍乱毒素基因 PCR 检测阳性；

(2) 疑似病例生活用品或家居环境标本中检出 01 群和或 0139 群霍乱弧菌；

(3) 在一起确认的霍乱暴发疫情中，暴露人群中出现任一型霍乱临床表现者。

4. 确诊病例：符合下列任意一项均可判断为确诊病例。

(1) 具备任一型霍乱临床表现，并且粪便、呕吐物或肛拭子细菌培养分离到 01 群和或 0139 群霍乱弧菌；

(2) 在疫源检索中，粪便培养检出 01 群和/或 0139 群霍乱弧菌者，若在前后 5 天内出现腹泻症状者。

(二) 诊断工作要点

1. 询问病史：应尽可能详尽，主要包括下述内容。

(1) 发病日期及时间；

(2) 泻吐先后次序、次数、泻吐物性状及估计量；

(3) 尿量多少；

(4) 有无口渴、腓肠肌痉挛、腹痛（部位及性质）、里急后重等症状及其程度；

(5) 引起发病的可疑食物及其食用时间，同膳者有无同样发病；

(6) 个人生活习惯及卫生条件；

(7) 最近期间家庭中或邻近地区有无同样病人;

(8) 患病前曾否与霍乱患者接触, 时间多长? 何种方式?

(9) 最近曾否去过疫区? 何时? 何地?

2. 体格检查: 主要检查内容如下。

(1) 一般状态: 如有无表情淡漠、烦躁不安、软弱、衰竭、嗜睡甚至昏迷等。

(2) 脱水程度及循环衰竭: 如皮肤是否无弹性, 有无口唇干燥、发绀, 眼窝、囟门凹陷, 指纹皱瘪, 音哑, 尿闭以及血压、脉搏、心音等情况。

(3) 其他: 包括各脏器检查以及有关酸中毒、急性肾功能衰竭等征象(详见合并症)。

3. 实验室检查: 按收治单位设备条件、病情轻重及治疗需要而定。

(1) 粪便培养霍乱弧菌: 每日 1 次。于停用抗菌药物后连续 2 次阴性为止。必要时同时作其他肠道致病菌培养。

(2) 血、尿、粪常规。

(3) 尿比重及酮体。

(4) 血液尿素氮(或非蛋白氮)、肌酐、二氧化碳结合力、血浆比重及蛋白定量、血钾、钠、氯、钙测定等。

(5) 心电图描记。

4. 诊断命名:

(1) 病名: 霍乱。

(2) 按病原不同可称为古典霍乱、埃尔托霍乱或 O139 霍乱, 临床分型及合并症。举例: 霍乱(埃尔托), 重型, 代谢性酸中毒。

二、鉴别诊断

急性感染性腹泻可分为肠毒素性、侵袭性及细胞毒性等三类。霍乱属于毒素介导性腹泻，其特点是霍乱弧菌不侵入肠黏膜组织，仅接触肠黏膜表面，通过肠毒素介导引起肠液及电解质分泌增加，临床多为水样便，甚少腹痛，可迅速产生脱水及电解质紊乱，一般全身中毒症状较少，粪便中亦无炎症细胞。须与其他病原微生物所引起的肠毒素性、侵袭性及细胞毒性腹泻疾病相鉴别。常见的鉴别诊断如下。

（一）急性胃肠炎

包括产肠毒素的副溶血性弧菌（致病性嗜盐菌）、O139 群以外的非 O1 群霍乱弧菌、金黄色葡萄球菌、变形杆菌、梭状杆菌等，均可引起食物中毒性感染。多数有食用不洁食物史，同餐者往往集体发病，起病急骤，早期常有发热和其他中毒症状。先有呕吐而后腹泻，排便前往往有肠鸣、阵发性腹部剧痛，大便不是米泔样，常为水样或类似痢疾样脓血便，个别重型患者大便可有清水样或洗肉水样（特别是副溶血性弧菌所致者），很少发生肌肉痉挛、虚脱和高氮质血症。

（二）急性细菌性痢疾

痢疾杆菌侵袭肠黏膜，引起肠黏膜炎症及溃疡，并由此排出炎性渗出物，临床上常见有发热，大便为黏液、脓血便，量少，有腹痛及里急后重。大便镜检有大量的脓细胞。也有以水泻为主、里急后重不明显的不典型患者。大便培养痢疾杆菌阳性。

（三）大肠杆菌性肠炎

1. 产肠毒素性大肠杆菌（ETEC）性肠炎，潜伏期 4h~24h，有发热、恶心呕吐及腹部绞痛，腹泻每日 10 次左右，黄水或清水样便，无脓血便，严重腹泻者亦可产生重度脱水，婴幼儿常因此而危及生命。

2. 肠致病性大肠杆菌（EPEC）性肠炎，大便为水样或蛋花汤样，重者也会有脱水及全身症状。

两者粪便培养均可获得相应的大肠杆菌。

（四）鼠伤寒沙门菌等常见沙门菌感染

侵犯各年龄组，六个月以内婴儿易罹患，新生儿发病尤为严重，多发生于5~8月份，可有发热、腹泻或败血症，腹泻每日2~20次，大便为稀水便，亦可有脓血便，常引起不同程度脱水，大便培养可获得鼠伤寒沙门氏菌。

（五）空肠弯曲菌肠炎

本菌可侵袭空肠及结肠引起病变。现已证实本菌亦可产生肠毒素而致病，潜伏期3d~5d，起病初期有发热或有乏力、头痛及肌痛等症状，继而腹痛腹泻，大便为水样、黏液状、胆汁样或呈血性。严重病例可有重度脱水及循环衰竭。个别患者还可表现为急腹症。一般典型病例不难与霍乱鉴别，大便培养可有弯曲菌阳性。

（六）耶尔森菌、气单胞菌及其他寄生虫性肠炎

区别较明显，但有时也需与之进行鉴别。

（七）病毒性肠炎

常见病原为人轮状病毒，侵犯各年龄组，多见于婴幼儿，好发于秋冬季，可呈流行性，部分患者同时伴有上呼吸道感染症状及发热，中毒症状轻，常为自限性，腹泻次数可不多，大便稀软或黄水样，多无腹痛，成人病后常有一至二周疲倦乏力。本病临床表现与轻型霍乱相似，但在流行中见不到与霍乱相似的中、重型病例，粪便培养霍乱弧菌阴性，轮状病毒检查阳性。其他如Norwalk病毒、腺病毒、冠状病毒、星状病毒等亦可引起腹泻，也需鉴别。

第三节 治疗

一、治疗原则

(一) 各级医疗单位, 应设立感染性疾病科、或肠道门诊(腹泻病门诊), 以便加强对霍乱病人的早期诊断, 减少交叉感染, 并对各种腹泻病人作相应的处理。

(二) 病人入院(临时隔离病房或指定的医院)后, 按甲类传染病隔离(确诊与疑似病例分开隔离), 危重病人应先在现场抢救, 等病情稳定后, 在医护人员陪同下送往指定的隔离病房。

(三) 预防脱水, 治疗脱水。

1. 轻型脱水病人, 以口服补液为主。
2. 中、重型脱水病人需立即进行输液抢救, 病情稳定后可改为口服补液。
3. 霍乱病人在治疗期间尽量鼓励其饮水、进食。婴幼儿应继续母乳喂养。
4. 本病极期, 暂停进食; 病情好转后, 先给流质饮食, 以后逐渐增加。
5. 给重度脱水病人适当的抗菌治疗, 可缩短腹泻时间, 减少排便量, 缩短病程。

二、治疗方法

(一) 补液疗法

霍乱最重要的治疗措施是及时足量的补液以纠正失水、酸中毒与电解质平衡失调, 使心肾功能改善。

1. 口服补液

口服补液疗法的适应对象是轻度和中度的霍乱患者以及经静脉补液纠正休克而情况改善的重症霍乱病人。研究显示 80% 的患者可通过口服补液治疗得到治

愈。世界卫生组织倡导使用口服补液盐 (ORS) 治疗霍乱，其效果已得到普遍的肯定。

使用方法是，治疗最初 6h，成人每小时口服 750mL，小儿 (20kg 以下) 每小时给 250mL。以后每 6 小时的口服补液量为前 6h 泻吐量的 1.5 倍。有人主张以含量为 4% (117mmol/L) 的蔗糖代替 ORS 中的葡萄糖，还有主张用 30g/L 的米粉代替 ORS 中的糖，使 ORS 的渗透压降低而吸收更好。甘氨酸具有独特的吸收途径，可明显增强钠和水的吸收。因此将甘氨酸 (111mmol/L) 加入 ORS 中可避免产生渗透性腹泻而起到增强 ORS 的作用。ORS 的配方有多种，常用的 ORS 简便配方是氯化钠 3.5g、枸橼酸钠 2.9g、氯化钾 1.5g、葡萄糖 20g 加水至 1000mL。

2. 输液治疗

由于补充液体和电解质是治疗本病的关键环节，因此对于口服补液有困难的患者静脉输液的剂量和速度尤为重要，应视病情轻重、脱水程度、血压、脉搏、尿量及血浆比重等而定。药液种类的选择，应以维持人体正常电解质与酸碱平衡为目的。根据上述肠液电解质的浓度， K^+ 和 HCO_3^- 的丢失较多，故静脉输液以 541 溶液 (即 1000mL 水内含氯化钠 5g，碳酸氢钠 4g，氯化钾 1g；内含 Na^+ 134mmol/L， Cl^- 99mmol/L， K^+ 13mmol/L， HCO_3^- 48mmol/L，与大便中丧失的电解质浓度相近为佳)，用时每 1000mL 中另加 50%葡萄糖 20mL，以防低血糖。为基层单位应用方便起见，可按 0.9%氯化钠 550mL，1.4%碳酸氢钠 300mL，10%氯化钾 10mL 加 10%葡萄糖 140mL 配制。因此，该溶液除补入适当的 Na^+ 、 Cl^- 外，并可补充一定数量的 K^+ 。现以此溶液为基础，提出轻、中、重三型静脉输液方法。在治疗中应严密观察病情变化，灵活掌握输液量、输液速度及电解质浓度。

(1) 成人静脉输液治疗方法

轻型：轻度脱水口服补液有困难可静脉补液治疗。总计 3000 mL/d ~ 4000mL/d。最初 2h，成人 5 mL/h ~ 10mL/h。小儿（20kg 以下）3 mL/h ~ 5mL/h。以后补充继续损失量和每天生理需要量（成人每天约 2000mL）。

中型：24 小时约需输入 4000mL ~ 8000mL。最初 2h 内快速静脉输入含糖 541 溶液或 2:1 电解质溶液（生理盐水 2 份加 1.4%碳酸氢钠 1 份或 1/6 mEq 乳酸钠 1 份，但应用后种液体时应注意 K⁺的补充）3000mL ~ 4000mL。待血压、脉搏恢复正常后，即可减慢输液速度为 5mL/min ~ 10ml/min，并继续用 541 溶液。原则上应于入院 8h ~ 12h 内补进入院前累计损失量及入院后的继续损失量和每天生理需要量（成人每天约 2000mL），以后即按排出多少补充多少的原则，给以口服补液。

重型：24h 内输液总量约为 8000mL ~ 12000mL 或更多。先给予含糖 541 溶液，由静脉推注 1000mL ~ 2 000mL，按 40mL/min ~ 80mL/min 甚至 100mL 速度进行，约需时 20min ~ 30min，以后按 20mL/min ~ 30mL/min 的速度通过两条静脉输液管快速滴注 2500mL ~ 3500mL 或更多，直至休克纠正为止。以后相应减慢速度，补足入院前后累计丢失量后即按每天生理需要量加上排出量的原则补液，若呕吐停止则可口服补液。

补钾与纠酸：只要腹泻仍存在即应补钾，故对严重腹泻脱水引起休克、少尿的患者也应早期应用含钾不甚高的 541 溶液。快速补液时如每小时超过 2000mL 则应密切注意心脏变化，如酸中毒严重则应酌情另加碳酸氢钠纠正之。

血管活性药物及激素的应用：一般不需应用。仅用于中毒性休克患者或重型患者经输液疗法，估计液体已补足，但血压仍低或测不出，可加用血管活性药物如 654-2、多巴胺及异丙基肾上腺素。

（2）儿童静脉输液治疗方法

轻型：通常用口服补液疗法。不能口服者，可用静脉输液，入院后 24h 输液量以 100mL/kg ~ 150mL/kg 计算，给生理盐水及 5%葡萄糖液，其比为 2:1，并注意补钾，输液速度为 1mL/min ~ 2mL/min。

中型及重型：需立即静脉输液，输液量在 6h ~ 7h 内按 100mL/kg 计算，其间分两个阶段进行。两个阶段输液完成后需重新评估累积丢失，继续静点或口服补液。

第一阶段静脉输液方案：按 20mL/kg 给予等张液计算，于 1h 内输入。

第二阶段静脉输液方案：按 80mL/kg 给予 2/3 张液或 1/2 张液计算。1 岁以内患儿于 6h 内输入，1 岁以上患儿于 5h 内输入。

补钾：低钾患儿按 100mg/kg/d ~ 300mg/kg/d 氯化钾计算，分 3 或 4 次口服或静点（浓度为 0.15% ~ 0.3%）。输液速度：4 岁以上儿童于最初 15min 内按 20mL/min ~ 30mL/min、婴幼儿以 10mL/min 的速度输入（必要时经股静脉或股动脉输入，或静脉切开输入），以后则按脱水及脉搏情况调整速度，待脱水、酸中毒纠正后，逐渐减慢至每分钟 20 ~ 30 滴左右（1ml ~ 2ml）维持之。呕吐停止后改用口服补液。

3. 输液观察要点

（1）入院后应随时测定体液继续丧失量（包括大小便及呕吐量），以便及时修改补液量。

（2）尿量是观察补液是否充足的最好指标，成人每小时平均尿量达到 40mL ~ 60mL。小儿每日尿量 400mL 以上时，表示补液已充足，再结合症状、血压、脉搏、浅静脉（主要是颈外静脉）的充盈度的改变作出判断。小儿寸脉（寸部桡动脉）清楚触及时，相当于血压开始回升；太溪穴脉（足内踝后动脉）清楚触及时为血压接近正常，此时应减慢输液速度。

(3) 输液须用大号针头。如浅静脉穿刺有困难，可作左锁骨下静脉穿刺或作股静脉穿刺（由操作者用手固定，经快速输液后，浅静脉恢复充盈再行穿刺），必要时作静脉切开。如速度不足，可连接空针及三通接头加压输入。大量快速输液时液体应加温至 38℃ 左右。

(4) 输液引起发热反应时，应立即暂停输液。寒战期可给镇静剂如苯巴比妥钠、非那根等。发热期用物理降温，小儿每日尿量 400mL 以上时，表示补液已充足，再结合症状、血压、脉搏、浅静脉（主要是颈外静脉）的充盈度的改变作出判断。小儿寸脉（寸部桡动脉）清楚触及时，相当于血压开始回升；太溪穴脉（足内踝后动脉）清楚触及时为血压接近正常，此时应减慢输液速度。

(5) 病人如有胸闷、烦躁不安、剧烈咳嗽、气急、发绀，为输液过快引起急性肺水肿的表现，应立即减慢速度或暂停输液，小儿、孕妇、老年人以及原有慢性心肺疾病患者更应注意。

(二) 抗菌药物治疗

抗菌药物作为补液疗法的辅助治疗，可缩短腹泻时间，减少排便量，缩短病程。抗菌药物的选择可根据各地菌株耐药情况而定。常用抗菌药物及其用法如下。

1. 喹诺酮类抗菌药：近年来，在喹诺酮类抗菌素中，由于左氧氟沙星、环丙沙星等副作用更轻的药物出现，目前已较少使用诺氟沙星治疗霍乱的常用药物。

(1) 左氧氟沙星：成人每日 2 次，每次 200mg，连服 3d。左氧氟沙星用于幼龄动物可致关节病变，故不宜用于 18 岁以下儿童及青少年。孕妇及哺乳期妇女忌用。

(2) 环丙沙星：成人 250mg，一日 2 次，口服。儿童、孕妇及哺乳期妇女禁用。

2. 多西环素：成人 100mg，饭后口服，一日 2 次，连服 3d。多西环素可沉积在牙齿和骨的钙质区，引起牙齿变色、牙釉质再生不良、抑制胎儿骨骼生长，孕妇及哺乳期妇女不宜应用，8 岁以下儿童禁用。

3. 庆大霉素：成人每次 120,000U，一日 2 次，口服。小儿按每次 8,000 ~ 10,000U/kg，一日 2 次，口服。庆大霉素肌肉注射有耳、肾毒性，儿童忌用，但口服很少吸收，毒副作用较少。

4. 黄连素：成人每日 3 次，每次 100mg ~ 300mg。小儿按 50mg/kg/d 计算，分 3 次服，连服 3d。

5. 三代头孢菌素：霍乱弧菌药敏研究表明，头孢曲松等三代头孢菌素敏感率近 100%，对儿童、老人及肾功能受损患者，可以静脉注射三代头孢菌素。

头孢曲松：成人静脉给药，1 ~ 2g/d，单次或分 2 次给药，最高剂量每日 4g。小儿按体重每 12h 25 mg/kg ~ 37.5mg/kg。严重肝肾功能受损患者适当调整剂量。

目前，也有人使用肠黏膜保护剂作为本病的辅助治疗。

（三）并发症的治疗

1. 代谢性酸中毒

应注意监测二氧化碳结合力，有条件监测血气分析变化。血浆二氧化碳结合力降低（正常值 23 ~ 31mmol/L，即 22 ~ 28mEq/L 或 50 ~ 65vol%），血浆 pH 减低。治疗要点如下：

（1）轻、中型患者按上述输液方法给予含糖 541 溶液或 2 : 1 溶液，一般可纠正，不须另加碱性药物。

（2）重型患者，须立即给予碱性药物注射。在估计患者体重后，可快速静脉滴入 5% 碳酸氢钠 5ml/kg 或 11.2% 乳酸钠 3ml/kg，上述剂量可提高血浆二氧化碳结合力 1.8mmol/L 左右（4 ~ 5mEq/L 或 10vol%）；患者情况若有初步改善，如神志好转、呼吸幅度减低和频率减慢、血压回升等，则继续按前述的输液计划

即可；如情况无改善，1h~2h 后再给上述用量的一半或全量，或根据血浆二氧化碳结合力测定结果计算用量。

2. 急性肾功能衰竭

诊断要点包括：少尿（ $<400\text{mL/d}$ ）或尿闭（ $<50\text{mL/d}$ ）；尿比重低于 1.018，多固定于 1.010。尿常规化验有蛋白，红、白细胞，管型等。尿钠排出增多，尿素排出减少。尿素（尿/血浆）比率低于 10:1 或甚至 1:1（正常值 50:1 至 100:1）。血浆尿素氮（或非蛋白氮）、肌酐不断升高，二氧化碳结合力下降，代谢性酸中毒严重。

治疗要点：及时正确的输液，迅速纠正休克是预防急性肾功能衰竭的关键。

（1）对症、支持治疗。

（2）透析疗法：如有严重高血容量表现如全身浮肿及肺水肿，血钾高过 7.5mEq/L 或心电图有高钾表现，严重酸中毒，二氧化碳结合力 6.74mmol/L ，且用碱性药物不能纠正，血浆非蛋白氮显著增高（ $>142\text{mmol/L}$ ）等情况，早期应用血液透析，效果较好。如无条件可进行腹膜透析。

3. 急性肺水肿及心力衰竭

诊断要点：胸闷、咳嗽、呼吸困难或端坐呼吸、发绀、咯粉红色泡沫状痰。颈静脉怒张，肺底或全肺湿性罗音，心率快，可有奔马律。

治疗要点：

（1）暂停输液或减慢输液速度。

（2）绝对卧床休息，半卧位，必要时给予镇静剂如吗啡 $5\text{mg} \sim 10\text{mg}$ 肌注，或安定（苯甲二氮卓） 5mg 或 10mg 肌注。

（3）含酒精的氧吸入（将氧通过装有 20%~30% 酒精的瓶子，每次 30min）。

（4）速尿 $20\text{mg} \sim 40\text{mg}$ ，2min 内静注。地塞米松 $5\text{mg} \sim 10\text{mg}$ 加 50% 葡萄糖 20mL 缓慢静注。

(5) 西地兰 0.4mg 加 25% ~ 50% 葡萄糖 20mL 缓慢静注 10min 以上, 必要时 2h ~ 4h 后再注射 0.2 mg ~ 0.4mg。

(6) 应用血管扩张剂。

4. 低钾综合征

诊断要点: 血钾低于 3.5mEq/L。

治疗要点: 中、重型病人按前述输液原则治疗, 一般能预防低钾综合征的产生, 如仍发生应酌情继续补钾。症状较轻且能口服者, 可每日给予氯化钾或枸橼酸钾 4 ~ 6g。如有肌肉麻痹、呼吸困难、神志不清、心音低钝、心律不齐、血压降低、鼓肠、反射消失等严重缺钾表现时, 可每日静脉滴注氯化钾 6g ~ 12g, 用 10% 葡萄糖或 5% 葡萄糖生理盐水稀释, 常用浓度为 2 g/L ~ 4g/L。

(四) 对症治疗

1. 肌痉挛: 补液后可消失, 亦可予以针刺治疗。

2. 腹泻剧烈: 对补液 12h 后仍腹泻严重且中毒症状加重者, 可酌给地塞米松 20mg ~ 40mg (小儿 10mg ~ 20mg) 加入液体内静滴。

3. 呕吐剧烈时, 可给灭吐灵或阿托品等。

4. 腹痛如系肠痉挛所致, 可用颠茄、阿托品或针刺治疗。

5. 高热, 可采用以下措施:

(1) 采用物理降温, 35% 酒精或冷水擦浴, 头部放冷水毛巾或冰袋。

(2) 可服用对乙酰氨基酚等退热药物。

(3) 高热不安或有抽搐, 如疑有继发性脑水肿, 宜先考虑用脱水剂, 并同时可给予氯丙嗪 (每次 1mg/kg)、10% 水合氯醛灌肠或安定肌注, 必要时 1h ~ 2h 后按半量重复注射一次。

(五) 中医辨证治疗

祖国医学对霍乱的病因病机一般认为是由于感受暑湿、邪阻中焦、秽浊撩乱胃肠，遂成洞泄呕吐。吐泻重则秽浊凝滞，脉络闭塞，阳气暴伤，阴液干枯，可因心阳衰竭而死亡。中医治疗原则为根据病情进行辨证施治。主要治法如下，供临床应用中参考。

1. 泻吐期

(1) 暑热证

主证：吐泻骤作，吐物有腐臭，烦躁不安，口渴欲饮，小便短赤，舌苔黄糙，脉象滑数。

治法：清热避秽法，方用《霍乱论》黄芩定乱汤加减。

成药：玉枢丹（紫金片），有呕吐者先服此丹 1.5g，服后呕吐稍止，再服汤药。

(2) 暑湿证

主证：突然泻吐，胸脘痞闷，渴不欲饮或喜热饮，体倦思睡，舌苔白腻，脉象缓。

治法：芳香化浊，温运中阳法，方用藿香正气散加减。

成药：藿香正气水（丸），每次 2 瓶（6g），日服 2 至 3 次。

2. 脱水虚脱期

(1) 气阴两虚证

主证：吐泻较剧，气阴两伤，皮肤潮红，干瘪微汗，身热口渴，腿腹抽筋，腹胀尿闭，脉象细数，舌质淡红，苔黄或白且燥。

治法：气阴双补、扶正驱邪法。方用生脉散加减或急救回阳汤。

(2) 心阳衰竭证（亡阳型）

主证：面色苍白，眼窝凹陷，声音嘶哑，形寒肢冷，冷汗淋漓，手足螺瘪，筋脉痉挛，脉象沉细，舌苔白腻。

治法：以温运中阳，活血祛淤法。方用《伤寒论》附子理中汤加减。

3. 反应期及恢复期

主证：乏力倦怠，胃纳不佳，精神不爽，午后微热，舌质偏红，苔薄黄糙，脉细。

治法：以清热扶正法。可用《温热经纬》清暑气汤加减。

三、出院标准

（一）患者入院后，大便细菌培养每日一次，停药后连续二次阴性时（如无粪便，可肛拭子采便）可以出院。

（二）患者症状消失，如无大便培养条件，自发病之日起，住院隔离已逾7d，可以出院。

（三）慢性带菌者，大便培养连续7d阴性，胆汁培养每周一次，连续两次阴性者可解除隔离，但尚需进行流行病学观察。

四、护理常规

（一）疑似或确诊患者入院后应立即分室严密隔离与消毒，并做好宣传教育工作，严格督促检查执行。还要消除病人紧张情绪，做到医护结合。及时送出传染病确诊、疑似或更正报告。

（二）新病人入院，立即严密观察病情，测血压、呼吸、脉搏及体温，如血压下降，脉搏细速，立即准备好输液用品，按医嘱即刻执行治疗。

（三）按病情及治疗需要，及时留取化验标本送至化验室（注意防止外环境污染）。

（四）入院后24h内，每4h测体温、脉搏、血压一次，第2d~3d每日一或二次，特殊情况者按医嘱执行。

（五）正确记录出入液量，在入院后第1d~3d，每个中、重型患者均需记录每日吐泻量、尿量及进水量。

(六) 输液过程中应注意下列事项:

1. 严格无菌操作, 经常巡视有无药液外溢、针头阻塞, 输液速度是否适宜。
2. 大量输液或快速输液的溶液, 应适当加温, 在输液过程中, 应经常观察脉搏及血压, 并注意患者有无不安、胸闷、心悸、气促等情况, 如脉搏突然加快, 每分钟脉率在 100 次以上伴有气促者, 应警惕急性肺水肿的发生。
3. 大量输液后, 病人循环有好转但诉四肢无力、鼓肠、脉搏不整者, 应考虑有无低钾综合征, 作补钾准备。

(七) 做好病人保暖工作, 保持病人皮肤及床铺清洁干燥。

(八) 昏迷病人应定期翻身, 注意口腔护理, 安设护架、床栏, 以防止意外及合并症发生(肺炎、褥疮等)。

(九) 做好药品及器械准备工作:

1. 对各类药品与器材, 应当分门别类定位存放, 并做好器械的清洗、整理及消毒等准备工作。达到使用方便, 有条不紊, 随时做好补充。
2. 药品: 注意有效使用期, 有无变质情况, 保藏妥善否。
3. 熟悉药品一般性能及给药方法, 用药前认真核对。

(十) 陪伴问题: 病人入院后禁止陪伴, 在护理人员指导下允许按时探视, 婴幼儿入院后在护理人员指导下, 按时喂奶。

第四节 隔离区室的卫生与消毒

医院对收治的霍乱病人进行隔离治疗, 需要防止病人排泄物、检测分离物及相关所有感染性材料的污染扩散。隔离区(室)的卫生处理, 要以所有感染性材料严格消毒、不扩散到医疗机构或者隔离区之外为原则, 严格执行各项消毒工作,

防止病人排泄物污染扩散，并防止工作人员和家属的感染。尤其是，避免病人排泄物排出到医院之外，导致霍乱弧菌进入市政管道和进一步污染环境。

一、隔离消毒工作的基本要求

1. 医疗机构收治霍乱病人的院内感染和防污染扩散控制，需按照卫生部《医院感染管理办法》（2006）、《医疗卫生机构医疗废物管理办法》（2003）、国务院《医疗废物管理条例》（2011 修订）的要求执行。

2. 医疗机构，做好收治霍乱病人的预案，尤其建立隔离区室的预案，在收治疑似或确诊霍乱病人时，立即建立起针对霍乱病人诊治的隔离区室。

3. 充分评价评估隔离区室以及工作流程中的医院感染、医源性感染以及污染扩散出隔离区室的所有危险因素，据此建立隔离分区、诊治工作以及消毒方案。

4. 根据医疗机构区域结构、房屋结构，合理布局隔离区室，以相对隔离、污染物流与人流相对独立为原则，应有二个或三个出入口，必要时设传递窗。

5. 隔离区内应划分清洁区、半污染区、污染区。

清洁区：包括更衣室、值班室、配膳室、库房等。清洁区应保持整洁无污染。发现有污染或污染可疑时应立即进行消毒处理。

半污染区：包括护理办公室、治疗室、走廊、病人出院卫生处理室、消毒室等。半污染区应每天用消毒液喷雾或洗擦一至二次。

污染区：包括病室、厕所、污染消毒室、入院卫生处理室等。设病人专用厕所。污染区内除做好经常性消毒工作外，应定期进行彻底消毒。

在各区交界处应设置洗手消毒水和擦脚垫。

6. 在灾区现场，如地震、洪涝灾区有原医疗机构被破坏不能使用的情况下，临时医疗点有霍乱病人或疑似病人需要治疗时，临时医疗点隔离病区室应距水源、码头、食堂等公共场所较远的房屋，必须与其他科室、宿舍物理隔开，隔离区室应有明显的标志。

7. 建立收治霍乱病人的隔离区室工作规章制度，建立隔离区室工作和消毒操作规程，建立医疗废弃物的消毒登记制度和表格，包括随时消毒和终末消毒。
8. 建立人员防护规程，制订意外接触污染物和怀疑污染物的处置预案与相应防护、处置物品、药品配备。
9. 明确医疗废弃物的消毒责任人和操作人员，并开展人员培训，包括卫生学、消毒知识、职业卫生防护培训等。
10. 备好所需的消毒灭菌药品和设备。按照疫点消毒和医院感染消毒的要求，配备消毒药品和设备。针对霍乱弧菌污染材料的消毒，参照第三章第三节“消毒处置”中关于病房、集中医疗点的终末消毒和随时消毒方法，以及附件1“消毒对象与消毒方法”和附件2“常用消毒剂及其选择”。
11. 隔离区室内清洁用具要分区分室专用。
12. 隔离区室指定内部医疗废弃物临时储存点，消毒与未消毒废弃物存储点严格分开，规定处理时间（即时处理和固定时间处理）和物流路线。
13. 病人吐泻物、生活用水、垃圾废物、检验室废弃物等，必须经严格消毒处理后才能向外排放、及作为医疗废弃物处理。禁止厕所冲水直接经下水道排入市政污水管道。病人用过的用具（衣服、被褥、饮食用具、医疗器械和盛病人吐泻物的容器等）每次用后，均应按照消毒→清洗→消毒的程序要求，严格处理后再行使用。
14. 检验培养基、检测试剂、不再使用的标本和菌种等，需经高压灭菌或化学消毒处理，然后作为医疗废弃物处理。
15. 运送医疗废弃物的重复使用的器具、运送工具，应在运送结束时立即进行消毒。

16. 医护人员要经常教育和指导病人遵守病室各项隔离消毒制度，病人住院期间应在指定范围内活动，不可私自外出，严格执行探望制度，不能陪伴病人。对于必要的探视，应由护理人员陪同和指导。

17. 病人出院时，应换穿清洁衣服（设备允许时可淋浴），换下来的衣服及病人带来的被褥、日用品（脸盆、毛巾、书报等），须经消毒处理后，才能交病人或家属带走。

18. 病人出院后，病床、床头柜等需经消毒处理。用过的被单、床单、枕套等，要全部更换，经消毒处理后再洗净备用。

19. 霍乱病人或疑似霍乱病人尸体的处理，参照第三章第三节“消毒处置”中关于霍乱病人或疑似病人尸体卫生消毒处置的方法。需要进行霍乱病人或疑似霍乱疑似病人尸体解剖查验的，工作和消毒防护按照卫生部《传染病病人或疑似传染病病人尸体解剖查验规定》（2005）进行。涉及尸体出入境，按照卫生部等九部（局）发布的《尸体出入境和尸体处理的管理规定》（2006）执行。

20. 建立自查制度，并接受卫生行政主管部门的监督管理。

二、工作人员的卫生要求

1. 参加隔离病区室的工作人员要相对固定。工作人员应熟悉传染病报告制度和各项隔离消毒制度，掌握相关消毒方法，掌握意外接触污染材料的处置程序和方法。

2. 病区工作人员应严格注意消化道隔离，定期进行体格检查和粪便细菌培养。哺乳期或妊娠期的工作人员不宜参加此项工作。

3. 工作人员进入病区应穿戴工作衣、鞋、帽，进入污染区护理、接触病人时要穿隔离衣、戴口罩，离开时脱去，并应消毒双手。

4. 非病区工作人员，如需进入病区，应得到允许，并严格遵守病区隔离消毒制度。

附表

附表1 霍乱病例个案调查表

该调查表为参考表格，需要通过询问病人、病人家属、医生、疾控人员以及其他相关人员后填写。实际调查中要求在病例接触史上进行详细调查，并且将食品来源等尽可能调查清楚。

地区国标编码□□□□□□□□

病例编码□□-□□□□

1. 一般情况

1.1 姓名_____（若为14岁以下儿童，家长姓名_____）

1.2 性别 （1）男 （2）女

1.3 年龄（岁、月）_____

 年龄为 （1）岁龄 （2）月龄

1.4 职业

 （1）幼托儿童 （2）散居儿童 （3）学生 （4）教师 （5）保育员

 （6）餐饮食品业 （7）商业服务 （8）医务人员 （9）工人 （10）民工

 （11）农民 （12）牧民 （13）渔（船）民 （14）干部职员 （15）离退休人员

 （16）家务及待业 （17）其他_____（注明） （18）不详

1.5 文化程度

 （1）学龄前儿童 （2）文盲 （3）小学 （4）初中 （5）高中

 （6）大学及以上 （7）不详

1.6 现住址_____

1.7 户口地_____

1.8 工作（学习）单位_____

1.9 联系人_____，联系电话（办）_____，（手机）_____

2. 发病情况

2.1 起病日期_____年_____月_____日_____时

2.2 发病地点_____

2.3 首诊时间_____年_____月_____日_____时

2.4 首诊单位_____

2.5 诊断医院_____

2.6 报告时间_____年_____月_____日_____时

- 2.7 是否住院 (1)是 (2)否
- 2.7.1 住院时间_____年_____月_____日_____时
- 2.7.2 出院时间_____年_____月_____日_____时
- 2.7.3 出院依据
- (1)临床症状消失 (2)两次粪检阴性 (3)自动出院 (4)其他_____
3. 临床资料
- 3.1 临床症状
- 3.1.1 感染类型 (1)病人 (2)带菌者
- 3.1.2 腹泻 (1)有 (2)无
- 3.1.3 每天最多腹泻次数_____
- 3.1.4 腹泻时粪便性状 (1)水样 (2)米泔样 (3)洗肉水样 (4)大块黏膜
- 3.1.5 腹泻方式 (1)里急后重 (2)通畅 (3)失禁 (4)绞痛
- 3.1.6 腹痛 (1)轻微钝痛 (2)较重钝痛 (3)绞痛 (4)无
- 3.1.7 呕吐 (1)先泻后吐 (2)先吐后泻 (3)无
- 3.1.8 发热 (1)有 (2)无 最高体温_____℃
- 3.1.9 腓肠肌疼痛 (1)有 (2)无
- 3.1.10 失水情况 (1)重度 (2)中度 (3)轻度 (4)无
- 3.1.11 临床类型 (1)重 (2)中 (3)轻
- 3.2 诊断依据
- 3.2.1 感染者发现方式
- (1)疫源检索 (2)腹泻病门诊 (3)乡镇级医院 (4)个体诊所
- (5)其他(注明)_____
- 3.2.2 确诊依据 (1)临床 (2)病原学
- 3.2.3 采样时间_____年_____月_____日_____时
- 3.2.4 送检时间_____年_____月_____日_____时
- 3.2.5 送样单位 _____
- 3.2.6 检验结果报告单位 _____
- 3.2.7 检验结果报告时间_____年_____月_____日_____时
- 3.2.8 检验结果
- (1)01群小川型 (2)01群稻叶型 (3)01群彦岛型 (4)0139群 (5)疑似霍乱弧菌
- 3.3 病人转归 (1)痊愈 (2)带菌 (3)死亡
4. 流行病学调查
- 4.1 传染源和传播途径的追溯(病前5天内)
- 4.1.1 外出史 (1)有 (2)无

- 4.1.1.1 去过何地_____
- 在该地有无下列活动
- 4.1.1.2 住宿 (1) 有, 在_____ (2) 无
- 4.1.1.3 用餐 (1) 有, 在_____ (2) 无
- 4.1.1.4 带回食品 (1) 有 食品名称_____ (2) 无
- 4.1.1.4 该地有无同样疾病 (1) 知道, 有 (2) 不清楚 (3) 该地未有报告
- 4.1.2 外人来家 (1) 有 (2) 无
- 4.1.2.1 来自何地_____
- 4.1.2.2 该地同样疾病 (1) 知道, 有 (2) 不清楚 (3) 该地未有报告
- 来后有无下列活动:
- 4.1.2.3 在家住宿 (1) 有 (2) 无
- 4.1.2.4 在家用餐 (1) 有 (2) 无
- 4.1.2.5 带来食品 (1) 有 食品名称_____ (2) 无
- 4.1.3 接触过同样病人 (1) 有 (2) 无
- 4.1.3.1 接触时间_____年_____月_____日_____时
- 4.1.3.2 接触地点_____
- 接触方式:
- 4.1.3.3 同吃 (1) 有 (2) 无
- 4.1.3.4 同住 (1) 有 (2) 无
- 4.1.3.5 护理 (1) 有 (2) 无
- 4.1.3.6 其他 (1) 有 (2) 无
- 4.2 饮食情况(病前5天内)
- 4.2.1 饮生水 (1) 有 (2) 无
- 所饮生水种类_____
- 4.2.2 生活用水水源类型 (1) 井水 (2) 河水 (3) 塘水 (4) 自来水 (5) 其他
- 4.2.3 吃生冷食品 (1) 有 (2) 无
- 4.2.4 生冷食品名称_____, 购买地点_____,
食用地点: _____
- 4.2.5 熟食 (1) 有 (2) 无
- 4.2.6 熟食品名称_____, 购买地点_____,
食用地点: _____
- 4.2.7 其他怀疑食品名称_____, 购买地点_____,
食用地点: _____
- 4.2.8 在外就餐史 (1) 有 (2) 无

4.2.9 就餐地点 (1) 排档 (2) 个体餐馆 (3) 宾馆餐厅 (4) 其他

就餐具体地点名称 _____,

就餐时间(开始) _____年_____月_____日_____时

4.2.10 同餐人数 _____人

5. 疫点处理

5.1 疾控中心接到报告时间 _____年_____月_____日_____时

5.2 疾控中心到达现场时间 _____年_____月_____日_____时

5.3 疫点 _____个

疫点具体地点(多个时均填写): _____

5.4 范围 _____户 _____个

5.5 解除时间 _____年_____月_____日_____时

5.6 终末消毒时间 _____年_____月_____日_____时

5.7 病人隔离 (1) 是 (2) 否

5.8 隔离地点 (1) 住院 (2) 在家

5.9 解除隔离时间 _____年_____月_____日_____时

5.10 病人粪检情况

| | 第一次 | 第二次 | 第三次 | 第四次 | 第五次 |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 时间 | | | | | |
| 结果 | | | | | |

6. 小结

调查者单位 _____

调查者 _____

审查者 _____

调查日期 _____

附表 2 霍乱病例/带菌者/接触者粪便标本送检单 (样单)

第 页

| 标本编号 | 患者姓名 | 性别 | 年龄 | 职业 | 现住址及联系电话 | 发病日期 | 是否服抗生素 | 主要临床症状 | | | | | 采样日期 (具体到“时”) | 采样方式 | | | | |
|------|------|----|----|----|----------|------|--------|--------|----|----|------|-------|------------------|------|------|-----|-----|------|
| | | | | | | | | 体温℃ | 腹痛 | 腹泻 | 恶心呕吐 | 其他 | | 粪便 | 粪便性状 | 肛拭子 | 呕吐物 | 物表涂抹 |
| | | | | | | | | | | | | 月 日 时 | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | 月 日 时 | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | 月 日 时 | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | 月 日 时 | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | 月 日 时 | | | | | | |

备注:

患者姓名: 5岁以下患儿加注家长姓名.

粪便性状: 1. 鲜血样便 2. 血便相混 3. 脓血便 4. 黑便 5. 粘液便 6. 米泔水样便
7. 水样便 8. 稀便 9. 正常便

填表人:

填表日期: 年 月 日

附表 3 环境标本采集送检单 (样单)

第 页

| 标本编号 | 标本名称 | 采样地点 | 采样日期 | 保存、运输条件 | 备注 |
|------|------|------|------|---------|----|
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |

送检单位:

送检人:

送检日期:

年 月 日

附表4 实验室检验结果报告单(样单)

第 页

| 检验编号 | 原编号 | 姓名 | 性别 | 年龄 | 地址 | 标本名称 | 采样日期 | 送检单位 | 收样日期 | 检测日期 | 血清群型 | | | | ctxAB | |
|------|-----|----|----|----|----|------|------|------|------|------|--------|--------|--------|-------|-------|----|
| | | | | | | | | | | | 01群小川型 | 01群稻叶型 | 01群彦岛型 | 0139群 | 阳性 | 阴性 |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |

填报单位:

填报人:

填报日期:

年 月 日

附表5 霍乱菌株上送、移交登记表(样表)

送检单位 _____

第

页

| 序号 | 菌种号 | 菌株型别 | 菌株来源 | 姓名 | 性别 | 年龄 | 地址 | 发病日期 | 采样日期 | 分离日期 | 鉴定记录 | | | 保存日期 | 保存基质与温度 | 备注 |
|----|-----|------|------|----|----|----|----|------|------|------|------|------|------|------|---------|----|
| | | | | | | | | | | | 血清型别 | 主要生化 | 药敏结果 | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |

菌株移交日期:

年 月 日

上送人:

接收人:

附件

附件 1 消毒对象与消毒方法

| 消毒对象 | 消毒方法 |
|--------------|---|
| 呕吐物 | 尽量用容器盛装，容器中事先放入 500mL 以上（约容器容积的 1/2）有效氯浓度为 10000mg/L 的含氯消毒液；直接吐在地面的呕吐物，先用快速凝固型消毒粉或漂白粉覆盖 10min 后清扫干净，放入废弃物收集袋中，再用有效氯浓度为 1000mg/L 的含氯消毒液擦拭地面。 |
| 排泄物 | 稀便与消毒剂以 10:1 比例加入漂白粉干粉（含有效氯 25%~32%），充分搅拌后作用 2h；成型粪便与消毒剂以 1:2 比例加入含有效氯 10000mg/L~20000mg/L 含氯消毒剂，充分搅拌后作用 2h；干燥排泄物处理前应适量加水稀释浸泡软化后，再按上法消毒。 |
| 盛装排泄物、呕吐物的容器 | 用含有效氯 1000mg/L 的消毒液浸泡 1h~2h。 |
| 生活污水 | 有效氯约 50mg/L，作用 1.5h，保持余氯大于 6.5mg/L。 |
| 污染地面和墙壁 | 泥土地面和墙壁刮去污染表土（另行消毒）后再用含有效氯 2000mg/L~5000mg/L 含氯消毒剂或 5000mg/L 过氧乙酸消毒；非泥土地面和墙壁用 1000mg/L~2000mg/L 有效氯或 2000mg/L 过氧乙酸消毒；其用量按性质不同而异，一般最低用量为 100mL/m ² ~200mL/m ² ，最高可用 1000mL/m ² ，以喷洒均匀、透湿、不流水为限。 |
| 厕所、便池 | 用 1000mg/L~2000mg/L 有效氯或 2000mg/L 过氧乙酸消毒。其用量按性质不同而异，一般最低用量为 100mL/m ² ~200mL/m ² ，最高可用 1000mL/m ² ，以喷洒均匀、透湿、不流水为限。 |
| 废弃物 | 交医疗废物处理站集中处置，或焚烧，或压力蒸汽灭菌，或有效氯 1000mg/L 喷雾至内外全部湿润后作用 2h。 |
| 生活用具 | 有效氯 500mg/L 擦拭作用 30min，或 0.3%过氧乙酸作用 10min，或 250mg/L 二氧化氯擦拭作用 10min。 |
| 手 | 速干手消毒剂，或含有效氯 250mg/L 的消毒液擦拭/浸泡作用 3min，或 0.2%过氧乙酸擦拭/浸泡作用 3min，或 150mg/L 二氧化氯擦拭/浸泡作用 3min；0.5%碘伏擦拭消毒。 |
| 体温表 | 75%酒精擦拭或浸泡。 |
| 病人衣物 床上用品 | 压力蒸汽灭菌；或环氧乙烷灭菌；或煮沸 20min；或含有效氯 250mg/L 浸泡作用 20min。 |

| | |
|--------|---|
| 食品、餐饮具 | 煮沸 20min; 或含氯消毒剂浸泡。 |
| 饮用水 | 按水质加有效氯, 作用 30min 后, 余氯应达 0.5mg/L。 |
| 医疗器械 | 压力蒸汽灭菌或环氧乙烷灭菌。 |
| 运输工具 | 可用 0.5% 过氧乙酸溶液或者 10000mg/L 有效氯含氯消毒剂溶液喷洒至表面湿润。对密闭空间可用 2%过氧乙酸进行气溶胶喷雾用量为 8mL/m ³ 。 |
| 饮用水 | <p>直接投加漂白粉消毒法:</p> <p>将所需量漂白粉放入碗中, 加少许冷水调成糊状, 再加适量水, 静置 10min。将上清液倒入井水中, 用取水桶上下振荡数次, 30min 后即可使用。一般要求余氯量为 0.5mg/L。井水消毒, 一般每天 2 次~3 次, 所需漂白粉量根据井水量、规定加氯量与漂白粉有效氯量进行计算。</p> <p>持续加漂白粉法:</p> <p>为减少对井水频繁进行加氯消毒, 并持续保持一定的余氯, 可用持续消毒法。持续法常用的工具有竹筒、无毒塑料袋、陶瓷罐或小口瓶, 可因地制宜选用。方法是在容器上面或旁边钻 4 个~6 个小孔, 孔的直径为 0.2cm~0.5cm。根据水量和水质情况加入漂白粉。一般竹筒装漂白粉 250g~300g, 塑料袋装 250g~500g。将加漂白粉容器口塞住或扎紧, 放入井内, 用浮筒悬在水中, 利用取水时的振荡, 使容器中的氯慢慢从小孔放出, 以保持井水中一定的余氯量。一次加药后可持续消毒一周左右。采用本法消毒, 应有专人负责定期投加药物, 测定水中余氯。由于用含氯消毒剂消毒饮用水易产生致癌的三氯甲烷, 故目前主张用二氧化氯代替氯消毒, 一般加入用量为 5mg/L~10mg/L。</p> <p>缸水处理:</p> <p>混凝沉淀时, 以一水缸装原水, 用明矾混凝沉淀。用一直径 3cm~4cm, 长 1m 左右的竹筒 (或其他替代物), 筒底四周钻数十个小孔, 竹筒装入明矾, 在缸水中搅动。通常用量为每 100kg 水加明矾 50g, 也可用其他混凝剂。</p> <p>静置沉淀约 1h 后, 取上清水至砂滤缸内过滤。砂滤缸中细砂以 0.5mm 粒径为宜, 粗砂直径宜为 0.8mm。细砂与粗砂层厚各为 15cm~20cm。每层用棕皮或其他材料隔开, 表层与底层都放置石子。砂滤缸使用一定时间后, 当滤速减慢或滤出水变浊时, 将滤材取出用清水洗净后重新装入可继续使用。</p> <p>将经洁治处理的水引入消毒缸中进行消毒。消毒时, 可使用含溴或氯消毒剂, 其用量随水的污染程度而定, 一般在 4mg/L~8mg/L, 作用 30min。使用消毒剂片剂时, 用量可按使用说明书投放。消毒后余溴 (氯) 在 0.3mg/L~0.5mg/L 者, 即可饮用。</p> |

附件 2 常用消毒剂及其选择

一、常用消毒剂

用于疫源地消毒的消毒剂应具备消毒剂批准文号，使用前应仔细阅读产品使用说明书，明确有效期、使用方法和注意事项。

(一) 含氯消毒剂

1. 漂白粉：漂白粉是一种混合物，代表分子式 CaOCl_2 ，主要成分是次氯酸钙，还有氢氧化钙、氯化钙、氧化钙。漂白粉为白色颗粒状粉末，有氯臭，溶于水，在光照、热、潮湿环境中极易分解。漂白粉含有效氯 25% 左右。

杀菌能力：革兰阳性和阴性细菌对含氯消毒剂均高度敏感，真菌和抗酸杆菌中度敏感；高浓度时，亲脂、亲水病毒及芽胞亦敏感。

剂型和使用方法：使用漂白粉前应测定有效氯的含量。有效氯含量用 % (W/W) 表示。用漂白粉配制水溶液时应先加少量水，调成糊状，然后边加水边搅拌成乳液，静置沉淀，取澄清液。漂白粉干粉可用于铺垫墓葬，地面和人、畜排泄物的消毒，其水溶液可用于餐具消毒、饮用水消毒、污水处理、粪便处理、用具擦拭消毒等。

影响因素有：a. 酸碱度：溶液 pH 越高，杀菌作用越弱；pH 升至 8 以上，可失去杀菌活性。b. 有机物：可消耗有效氯，明显影响含氯消毒剂的杀菌作用，尤其是消毒液浓度较低时，这种影响更为明显。c. 温度：每升高 10°C ，杀菌时间可缩短 50% ~ 60%。

注意事项：应依测定的有效氯含量，按测定浓度用药。要注意漂白粉对织物的漂白作用和对各类物品如金属制品的腐蚀作用，操作时应做好个人防护。应保存在密闭容器内，放在阴凉、干燥、通风处。

2. 次氯酸钙 (漂粉精): 分子式 $\text{Ca}(\text{OCl})_2$, 分子量 197.029, 白色粉末, 比漂白粉易溶于水且稳定, 含杂质少, 受潮易分解。有效氯含量为 80%~85%。影响因素、使用方法和注意事项与漂白粉相同。

3. 二氯异氰尿酸钠 (优氯净): 分子式为 $\text{C}_3\text{O}_3\text{N}_3\text{Cl}_2\text{N}_2$, 分子量为 219.95, 白色晶粉, 含有效氯 60%左右, 性质稳定, 即使贮存于高温高湿条件下, 有效氯也丧失极少。溶解度为 25%, 水溶液的稳定性较差, 在 20℃下, 3d 丧失有效氯 5%~7%, 7d 丧失 20%。当温度升至 30℃时, 1 周可丧失 50%。

杀菌能力: 二氯异氰尿酸钠杀菌谱广, 对细菌繁殖体、病毒、真菌孢子及细菌芽胞都有较强杀灭作用。

剂型和使用方法: 与漂白粉相同, 如水溶液可用于喷洒、浸泡、擦拭消毒, 干粉可用于人、畜排泄物和地面的消毒。

影响因素: a. 温度: 温度低时可降低二氯异氰尿酸钠的杀菌作用; b. 酸碱度: 酸性条件下的杀菌作用要比碱性条件下强; c. 有机物: 可降低二氯异氰尿酸钠的杀菌能力。

注意事项: 使用时应注意其腐蚀和漂白作用。操作时应做好个人防护。应保存在密闭容器内, 放在阴凉、干燥、通风处。

(二) 二溴海因

化学名为二溴二甲基乙内酰脲, 是一种释放有效溴的消毒剂, 加有助溶剂的国产二溴海因消毒剂有效溴含量 50%, 易溶于水, 使用时用去离子水配成所需浓度的消毒液, 可用于饮用水、餐(饮)具、果蔬和各种物体表面等的消毒。

杀菌能力: 能杀灭各种微生物, 包括细菌繁殖体、病毒、真菌、分枝杆菌和芽胞等。

应用: 对一般细菌繁殖体和病毒污染的物品, 用 100~200mg/L 二溴海因, 作用 30min, 对结核分枝杆菌和致病性芽胞菌污染的物品, 用 1000~2000mg/L

浓度，作用 30min。干扰物较多时应加大剂量。对污水消毒时，视水质污染情况而定，用量一般为 5~10mg/L，作用 30min。

影响因素与注意事项：

1. 二溴海因较不稳定，应用液应在使用时配制，并注意有效期，浸泡消毒时宜加盖。

2. 对金属有一定的腐蚀作用，必要时可添加少量防腐剂。

3. 有机物对其杀菌作用有一定影响，一些金属离子可影响消毒效果。

4. 用于果蔬消毒和餐（饮）具消毒时，在消毒完成后应用清水冲洗。

（三）二氧化氯

分子式为 ClO_2 ，性质极不稳定，常在临使用时生产或在二氧化氯稳定液中加入活化剂。二氧化氯的杀菌作用具有广谱、高效、速效等特点，用于饮用水消毒时，一般认为其不产生三卤化物，是一种较含氯消毒剂更安全的新型消毒剂。

杀菌能力：能杀灭各种微生物，包括细菌繁殖体、病毒、真菌、分枝杆菌和芽胞等。

应用：适用于医疗器械、餐（饮）具、饮用水及环境表面等消毒。常用消毒方法有浸泡、擦拭、喷洒等。对细菌繁殖体污染的物品进行消毒时，剂量为 100mg/L 作用 30min；对肝炎病毒和结核杆菌污染物品进行消毒时，剂量为 500mg/L 作用 30min；对细菌芽胞污染物品进行消毒时，剂量为 1000mg/L 作用 30min；对饮用水进行消毒时，剂量为 5mg/L 作用 5min。

影响因素和注意事项：（1）消毒效果易受有机物影响；（2）pH 值明显影响消毒效果，pH 值高时消毒能力下降；（3）二氧化氯活化液和稀释液不稳定，应现用现配；（4）对金属有腐蚀性，对织物有漂白作用，消毒完成后应及时清洗。

（四）臭氧

分子式为 O_3 ，是一种强氧化剂，在常温下为爆炸性气体，密度为 1.68，在水中的溶解度较低，约为 3%。臭氧具有杀菌迅速，消毒后无残留等优点，因此适用于饮用水、果蔬、餐（饮）具等的消毒。臭氧稳定性极差，在常温下可自行分解为氧，所以臭氧不能瓶装贮备，只能现场生产，立即使用。

杀菌能力：臭氧可杀灭细菌繁殖体、病毒、真菌等，并可破坏肉毒杆菌毒素。

应用：臭氧适用于饮用水、果蔬、餐（饮）具等的消毒，也可用于各种物品表面消毒和空气消毒。水消毒时一般加臭氧量 0.5 mg/L ~ 1.5mg/L，水中臭氧浓度在 0.1 mg/L ~ 0.5mg/L，维持 5 min ~ 10min。对于质量较差的水，加臭氧量可提高到 3 mg/L ~ 6mg/L。空气消毒时一般采用 30mg/m³ 的臭氧，作用 15 min ~ 30min。臭氧水用于果蔬、餐（饮）具和其他物体表面消毒时，臭氧浓度 > 12mg/L，作用时间 15 min ~ 20min。

影响因素和注意事项：

1. 多种因素可影响臭氧的杀菌作用，包括温度、相对湿度、有机物、pH 值、水的浑浊度、水的色度等。
2. 高浓度臭氧对人有毒，大气中允许浓度为 0.2mg/m³，工作场所允许浓度为 1.0mg/m³。
3. 臭氧为强氧化剂，对多种物品有损坏，浓度越高损害越重，可使铜片出现绿色锈斑；可使橡胶老化变色，弹性降低，以致变脆、断裂；可使织物漂白褪色。
4. 臭氧对物品表面上污染的微生物有杀灭作用，但作用缓慢。

（五）环氧乙烷

分子式为 C_2H_4O ，分子量为 44.05，沸点为 108℃，冰点为 -111.3℃，比空气重。液体环氧乙烷可与水任意比例混合，液体可溶解某些塑料。它的蒸汽压较大，对物品的穿透力强，高浓度环氧乙烷遇明火可发生爆炸。

杀菌能力：几乎各种微生物对环氧乙烷都敏感，而且细菌繁殖体和芽胞之间对环氧乙烷的敏感性差异很小，这是环氧乙烷作为灭菌剂的一个特点。

影响因素：环氧乙烷杀菌作用主要影响因素是温湿度、药物浓度和微生物的状态。

1. 温度和浓度的影响彼此相关，一般来说，45℃，450mg/L 已发挥药物的最大作用，但是实际应用中，还应考虑药物穿透包装材料时的吸收消耗，宜适当加大药物的用量，提高温度；

2. 湿度对环氧乙烷的杀菌作用有明显影响，一般以 RH 60~80%为宜；

3. 消毒对象对消毒效果亦有明显影响，有些材料可吸收大量环氧乙烷，对于大量吸收环氧乙烷的物品应相应加大剂量。

注意事项：环氧乙烷消毒过程中应注意防火防爆；要防止灭菌消毒袋、柜泄漏，以保证消毒过程中环氧乙烷的浓度并避免污染环境，同时控制温湿度；不适用于饮用水和食品消毒。

（六）过氧乙酸

分子式为 $C_2H_4O_3$ ，分子量为 76.0518，液体透明，弱酸性，易挥发，沸点 110℃。贮存过程中易分解，尤其有重金属离子或遇热时极易分解。高浓度和高温度可引起过氧乙酸爆炸，浓度在 20%以下一般无爆炸危险。

杀菌能力：过氧乙酸可杀灭各种微生物，温度在 0℃ 以下时，仍可保持活性。其杀菌作用强弱的顺序依次为细菌繁殖体、真菌、病毒、结核杆菌（分枝杆菌）和细菌芽胞。

应用：0.1% 的过氧乙酸 1min~10min 可杀灭细菌繁殖体；0.5% 的过氧乙酸 5min 可杀灭结核杆菌和真菌，30min 可杀灭枯草杆菌芽胞。溶液可用于浸泡消毒餐（饮）具、便器、体温计及医务人员的手等。过氧乙酸气雾浓度达到 $1g/m^3$ 时，可杀灭物体表面的芽胞，可用于墙壁、地板、家具消毒。

影响因素:

1. 温度: 一般说来, 温度越高过氧乙酸的杀菌力越强, 但温度在 -20°C 时, 过氧乙酸仍有明显杀菌作用;
2. 湿度: 当过氧乙酸喷雾消毒时, 空气的相对湿度在 $20\% \sim 80\%$ 时, 湿度越大, 杀菌效果越好。当相对湿度低于 20% 时, 则杀菌作用较差;
3. 浓度和作用时间: 过氧乙酸的杀菌作用随浓度的增高、时间的延长而增强;
4. 有机物: 在用过氧乙酸消毒时, 有机物对细菌繁殖体的保护作用较芽胞为明显, 但是这种保护作用因菌种和有机物的种类及浓度的不同而有所差异。

注意事项:

1. 过氧乙酸性质不稳定, 其稀溶液极易分解。因此, 应于用前配制。配制的稀溶液应盛于塑料容器中, 避免接触金属离子。
2. 对多种金属和织物有强烈的腐蚀和漂白作用, 使用时应注意。接触高浓度过氧乙酸时, 工作人员应采取防护措施。
3. 物品用过氧乙酸消毒后, 应放置 $1 \sim 2\text{h}$, 待残留在物体表面上的过氧乙酸挥发、分解后使用。

(七) 碘伏

碘伏是碘与表面活性剂(如聚乙烯吡咯烷酮、聚乙氧基乙醇)的不定型结合物。由于表面活性剂起到碘的载体和助溶作用, 使碘伏溶液逐渐释放碘, 延长了碘的杀菌作用时间。碘伏具有广谱杀菌作用, 刺激性小, 毒性低, 无腐蚀性(除银、铝和二价合金)和性质稳定便于贮存等优点, 而且碘伏的颜色深浅与杀菌作用成正比, 便于判断其杀菌能力。

杀菌能力: 革兰阳性和阴性细菌对碘伏都高度敏感, 抗酸杆菌, 细菌芽胞、亲脂病毒及亲水病毒等也都敏感。

影响因素：碘伏在酸性和中性条件下杀菌效果最佳，软水或硬水均可用来配制碘伏溶液。有机物对其杀菌作用的影响明显比氯小，温度超过 40℃可使其成为碘蒸汽。

注意事项：

1. 稀释液不稳定，2d 后有效碘可降低 50%，因此宜在使用前配制；
2. 避免接触银、铝和二价合金；
3. 在用于皮肤消毒时，碘伏虽比游离碘溶液引起过敏反应的频率低、反应轻，但用于敏感组织仍需慎重。

（八）苯扎溴铵

分子式为 $C_{21}H_{38}NBr$ ，分子量为 384.46，具有芳香味，呈淡黄色胶状，易溶于水，具有表面活性作用，振摇可产生大量泡沫。

杀菌能力：对化脓性病原菌有良好杀灭作用，对革兰阳性细菌的杀灭作用要大于阴性细菌。

注意事项：

1. 苯扎溴铵与其他季铵盐类一样，极易被多种物体吸附，浸泡液的浓度可随消毒物品数量增多而逐渐降低，因此应及时更换消毒液；
2. 不得与肥皂或其他阴离子洗涤剂合用；
3. 不宜用于粪、尿、痰等消毒。

（九）氯己定

分子式为 $C_{22}H_{30}N_{10}Cl_{12} \cdot H_2Cl$ ，分子量为 578.4。氯己定是阳离子双缩胍，碱性，可与有机酸、无机酸形成盐类，如双醋酸氯己定、双盐酸氯己定和葡萄糖酸氯己定等，氯己定性稳定，难溶于水，盐酸盐基本上不溶于水而溶于醇，醋酸盐和葡萄糖酸的水中溶解度依次增加。

杀菌能力：氯己定对革兰阳性细菌的杀灭作用较革兰阴性细菌大。

影响因素与注意事项:

1. pH 在 5.5~8.0 范围内氯己定具有杀菌活性, 偏碱时活性较佳, pH 高于 8.0 时, 则出现游离碱基沉淀;
2. 阴离子去污剂、肥皂可与氯己定反应, 使其失活;
3. 有机物对氯己定杀菌活性有明显影响, 阴离子表面活性剂对其有拮抗作用, 所以不可与肥皂合用;
4. 氯己定不可用于芽胞、分枝杆菌及亲水病毒的消毒。

二、根据病原体污染的消毒对象确定的常用消毒剂

(一) 常用的物体表面消毒剂: 含氯类、含溴类和过氧化物类消毒剂等。

(二) 常用的空气消毒剂: 过氧化物类消毒剂 (如过氧乙酸、二氧化氯、过氧化氢、臭氧等)。

(三) 常用的生活饮用水和污水消毒剂: 含氯类、含溴类和过氧化物类消毒剂。

(四) 常用的餐饮具和果蔬消毒剂: 含氯类、含溴类和过氧化物类消毒剂。

(五) 常用的排泄物、分泌物及尸体消毒剂: 含氯类和过氧化物类消毒剂。

(六) 常用的手和皮肤消毒剂: 含碘类、双胍类、季铵盐类和醇类消毒剂。

三、根据环境保护要求确定的常用消毒剂

在确保消毒效果的情况下, 尽量选择过氧化物类消毒剂 (如过氧化氢、过氧乙酸、二氧化氯)、季铵盐类消毒剂等对环境影响较小的消毒产品。

附件 3 常用的标本保存液和细菌培养基

(一) Cary-Blair 培养基 (C-B 半固体保存培养基): 硫乙醇酸钠 1.5g, 磷酸氢二钠 1.1g, 氯化钠 5.0g, 琼脂 5.0g, 蒸馏水 991.0mL。加热溶化, 待冷至 50℃时加入新配制的 1% 氯化钙水溶液 9ml, 调 pH 至 8.4, 分装小瓶或试管。流动蒸汽灭菌 15 分钟。本培养基除保存弧菌之外, 还适于保存其他肠道致病菌。

(二) 碱性蛋白胨水 (APW): 蛋白胨 10g, 氯化钠 10g, 蒸馏水 1000mL。调整 pH 至 8.6, 分装试管, 每管 8 mL~10mL, 15 lb 20min 高压蒸汽灭菌。碱胨水对于霍乱弧菌既可作保存液, 又可作增菌液。

(三) TCBS 琼脂: 酵母膏 5g, 蛋白胨 10g, 蔗糖 20g, 硫代硫酸钠 10g, 柠檬酸钠 10g, 牛胆酸钠 3g, 牛胆汁粉 5g, 氯化钠 10g, 柠檬酸铁 1g, 溴麝香草酚蓝 (2%溶液) 20 mL, 草酚蓝 (1%溶液) 4 mL, 琼脂 15 g。将上述成份加蒸馏水至 1000mL, 混合, 使全部溶解, 校正 pH 为 8.6, 加热煮沸, 不需要高压灭菌, 倾注平皿 15 mL~20mL。

(四) 庆大霉素琼脂: 主要含有蛋白胨、氯化钠、牛肉膏、无水亚硫酸钠、柠檬酸钠、蔗糖、庆大霉素、多粘菌素 B 和亚碲酸钾等成分。使用本培养基时, 按说明称取制成品的干粉, 置蒸馏水中, 充分煮沸至完全融化, 待冷却至 60℃后倾注平皿备用。

(五) 4 号琼脂: 主要含有蛋白胨、氯化钠、牛肉膏、十二烷基硫酸钠、柠檬酸钠、无水亚硫酸钠、猪胆粉、雷佛奴尔、亚碲酸钾、庆大霉素、琼脂等成分。制备时, 除琼脂、亚碲酸钾、庆大霉素外, 其他成分均加热溶解, 校正 pH 至 8.0, 加入琼脂煮沸溶化, 待冷至 60℃时加入其他成分, 混匀倾倒平皿。

(六) 普通琼脂、碱性琼脂和碱性胆盐琼脂: 蛋白胨 10g, 氯化钠 5g, 牛肉膏 3g, 琼脂 20g, 蒸馏水 1000mL。加热溶化, 调整 pH 至 7.4~7.6, 加热滤过后分装三角烧瓶。15 1b 20min 高压消灭菌。

普通琼脂调整 pH 至 8.4 即为碱性琼脂, 再加入 0.5% 牛胆酸钠即为碱性胆盐琼脂。

(七) 半固体琼脂: 蛋白胨 10g, 氯化钠 5g, 牛肉膏 3g, 琼脂 4g, 蒸馏水 1000mL。加热溶化, 调整 pH 至 7.4, 分装 4mL~5mL 于 13mm×130mm 试管, 高压蒸汽 15 1b 灭菌 15min。一时用不完, 为防止干燥可将培养基放在塑料袋内置冰箱(4℃)保存。为保存菌种, 可在穿刺接种培养后用灭菌胶塞塞紧, 放置室温保存。

(八) 蛋白胨水、无盐胨水和高盐胨水: 蛋白胨 10g, 氯化钠 5g, 蒸馏水 1000mL。加热溶化, 调整 pH 至 7.4, 分装 2mL~3mL 于小试管中, 15 1b 15min 高压蒸汽灭菌。

1. 靛基质试验用的蛋白胨水选用含色氨酸丰富的蛋白胨制作。

2. 无盐胨水即不加氯化钠, 高盐胨水分别加 3%、6%、8% 和 10% 的氯化钠制成的蛋白胨水, 作盐耐受性试验用。

3. 糖发酵培养基: 在 100mL 蛋白胨水中加 1.6% 溴甲酚紫 (BCP) 酒精溶液 0.1mL, 再加 0.5% 的糖类, 分装小试管 (葡萄糖加倒管), 高压蒸汽 8 1b 灭菌 10min。

(九) 葡萄糖磷酸盐蛋白胨水 (V-P 试验用): 蛋白胨 0.7g, 葡萄糖 0.5g, 磷酸氢二钾 0.5g, 蒸馏水 100mL。加热溶化, 调整 pH 至 7.2, 分装于小试管中, 高压蒸汽 15 1b 灭菌 20min。

(十) 山梨醇发酵液: 蛋白胨 0.1g, 氯化钠 0.5g, 山梨醇 2.0g, 0.25% 酚红 1mL, 蒸馏水 100mL。将蛋白胨与氯化钠加于 100mL 蒸馏水中加热溶解。调整

pH 至 8.5 后，加 0.25% 酚红指示剂 1mL 和山梨醇 2.0g，溶解后分装于小试管，每管 3mL，高压蒸汽 81b 灭菌 20min。

0.25% 酚红指示剂配制：0.25g 酚红加 0.01mol/L 氢氧化钠 70.5ml，再加蒸馏水至 100ml。

甘露醇发酵液：在使用甘露醇发酵液替代山梨醇发酵液时，甘露醇为 0.2g，其余成分和配制方法同山梨醇发酵液。

(十一) 氧化酶试验试剂：1% 盐酸对氨基二甲基苯胺或盐酸二甲基对苯二胺水溶液。

(十二) 粘丝试验试剂：0.5% 去氧胆酸钠水溶液。

(十三) 氨基酸脱羧酶试验

1. 基础培养基：蛋白胨 5g、酵母浸膏 3g、葡萄糖 1g、蒸馏水 1000mL、1.6% 溴甲酚紫酒精溶液 1mL，调整 pH 至 6.8。

2. 制法：

(1) 在每 100mL 基础培养基内分别加入 L-赖氨酸、L-精氨酸或 L-鸟氨酸 0.5g；另一份 100mL 培养基不加氨基酸，作为对照。

(2) 加入氨基酸后再校正 pH 至 6.8，分装小管，每管 1mL，并于每管中加入一层液体石蜡，高压 15 1b 灭菌 20min。

附件 4 霍乱弧菌 PFGE 标准操作程序

生物安全要求：操作霍乱弧菌以及污染材料应在 BSL-2 实验室和二级生物安全水平操作，转移和操作活菌时更要注意。处理菌株需在生物安全柜中进行。接触培养物的所有塑料制品、玻璃制品均应进行高压灭菌处理。可重复使用的制胶

模具须在清洗前消毒；可丢弃的制胶模具及胶带和用来把凝胶块从样品孔中推出的小片，都被污染，应该用 10%漂白剂消毒 30 分钟以上，然后清洗和重复使用。

一、提前准备

从检测培养基上挑取单菌落，划种于含 5% 去纤维蛋白羊血的胰化大豆琼脂（TSA-SB）平板（或相当的培养基）上培养；用同一个接种针/环，穿刺或划种于小螺帽管中半固体培养基，以保证必要时重复检测同一个克隆。37℃ 培养 14h ~ 18h。

二、第一天

（一）制备细菌细胞悬液

1. 打开 56℃ 水浴箱和 54℃ 水浴摇床。

2. 用 TE 溶液配制 1% Seakem Gold 琼脂糖，放置于 56℃ 水浴箱备用。

注意：剩余的 1% Seakem Gold 琼脂糖可保存于室温，重复使用 1~2 次。

3. 在 Falcon 2054 管（12mm × 75mm，5mL）（或其他相当的离心管）上标记样品名称和空白对照；在 1.5mL 微量离心管上标记好对应样品的名称。

4. 在 Falcon 2054 管中分别加入约 1mL ~ 2mL 细胞悬浮液（CSB）。

注意：CSB 的最小体积取决于用来测细菌浓度的小管大小，和分光光度计、浊度计或色度计的具体要求。

5. 用 CSB 湿润接种环或无菌棉签，从培养皿上刮取适量细菌，轻旋棉签使菌均匀悬浊于 CSB 中并减少气溶胶形成。

6. 通过加入 CSB 稀释或增加菌量提高浓度，调整细胞悬液浓度至指定范围：

（1）分光光度计：610nm 波长，吸光度（光密度）1.35（范围 1.3~1.4）

（2）Dade Microscan Turbidity Meter:

0.48 ~ 0.52 (以 Falcon 2054 管测量)

0.68 ~ 0.72 (以 Falcon2057 管测量)

(3) bioMérieux Vitek colorimeter: 4.0 ~ 4.5 (以 Falcon2054 管测量)。

注意: 细胞悬浊液测量浓度后放置于室温。以上三种仪器对应参数值在 CDC 得到良好结果; 如果用不同仪器或管测量, 每个实验室需要建立相应的浓度值。

(二) 灌制凝胶块

1. 在模具上标记好对应样品的名称。

2. 取 400 μ L 细胞悬浊液于相应的 1.5mL 微量离心管中。若细胞悬浊液冷藏, 含细胞悬浊液的微量离心管以 37 $^{\circ}$ C 水浴中孵育 5min (若细胞悬浊液放于室温, 不必孵育)。

3. 从 37 $^{\circ}$ C 水浴箱中取出微量离心管, 每管加入 20 μ L 蛋白酶 K (20mg/mL), 混匀, 使其终浓度为 0.5mg/mL。蛋白酶 K 要置于冰上。

注意: 蛋白酶 K 溶液 (20mg/mL) 可直接购买, 或用灭菌超纯水 (试剂等级 1 级) 溶解蛋白酶 K 粉末制备储存液。使用前, 融化适量储存液, 放于冰上。已融化的蛋白酶 K 储存液一天工作结束后要丢弃。商业购买的蛋白酶 K 溶液按照供应商要求保存。

4. 在微量离心管中加入 400 μ L 的 1% Seakem Gold, 用枪头轻轻吸吹几次混匀, 混合时避免气泡产生。1% Seakem Gold 要一直放在 56 $^{\circ}$ C 水浴箱中。

5. 将混合物加入模具相应加样孔, 避免气泡产生, 在室温下凝固 10min ~ 15min, 或 4 $^{\circ}$ C 冰箱凝固 5min。此量混合物可灌注两个凝胶块。

注意: 如果用丢弃式模具, 用 200 μ L 细胞悬浊液, 10 μ L 蛋白酶 K (20mg/mL) 和 200 μ L 琼脂糖; 可灌注 4 个凝胶块。

(三) 凝胶块中细胞的裂解

注意：同一菌株的两个凝胶块(可重复使用制胶模具)或3~4个凝胶块(丢弃式制胶模具)可用同一个50mL管裂解。

1. 在50mL的聚丙烯螺帽管上做好标记。

2. 配制CLB/蛋白酶K混合液：每5mL细胞裂解液(CLB)加入25 μ L蛋白酶K(20mg/mL)，使其终浓度为0.1mg/mL，然后颠倒混匀。

注意：蛋白酶K要置于冰上，配制好的混合液也要置于冰上。

3. 每个管子加入5ml CLB/蛋白酶K混合液。

4. 把凝胶块移入相应螺帽管：若想使胶块平齐，可用刀片削去模具表面多余的部分。

对于可重复利用的模具：打开模具，用6mm宽小铲将胶块移入相应螺帽管中。

对于一次性模具：撕掉模具下面的胶带，用小铲将胶块捅进相应的螺帽管中。

注意：保证胶块在液面下而不在管壁上。切下的胶、模具、胶带、小铲等为污染物，需正确丢弃或消毒：制胶模具两部分、小铲和刀片可用70%异丙醇(IPA)或其他适用的消毒剂浸泡15min，然后清洗；丢弃式模具丢弃或用漂白剂消毒30min~60min，然后清洗、重复使用。

5. 将管子放在54 $^{\circ}$ C水浴摇床孵育1h，转速150rpm~170rpm。水浴液面高于CLB液面。

6. 将灭菌纯水和TE(试剂等级1级)放在50 $^{\circ}$ C水浴预热。

(四) 洗胶块

1. 调低水浴摇床的温度至50 $^{\circ}$ C。

2. 从水浴摇床中拿出螺帽管，盖上绿色滤帽。轻轻倒掉CLB。在实验台上轻磕管底使胶块落在管底。

注意：把管倒置在吸水纸上，使管内液体被尽量排除干净。随后的操作中也是如此。

3. 每管中加入 10mL ~ 15mL 预热的灭菌纯水，确保胶块在液面下而不在管壁或盖子上，放回 50℃ 水浴摇床中，摇 10min ~ 15min。

4. 倒掉水，用纯水再洗一次。50℃ 水浴预热 TE 缓冲液。

5. 倒掉水，加入 10mL ~ 15 mL 预热的 TE，在 50℃ 的水浴摇床中摇 10min ~ 15min。

6. 倒掉 TE，用 TE 再重复洗三次，每次 10min ~ 15min。

7. 倒掉最后一次的 TE，加入 5mL ~ 10mL TE，继续下一步的酶切或放在 4℃ 冰箱保存备用。

注意：要确保胶块在液面下而不在管壁或盖子上。如果同一天进行限制性酶切，为节约时间可在最后一次 TE 洗胶时完成下一部分的 1 ~ 3 步。

三、第二天

（一）凝胶块内DNA的酶切

注意：对于霍乱弧菌01和0139群菌株，一般首选限制性内切酶为 *NotI*，第二种酶为 *SfiI*。在对疫情及其分离菌株需要细致分析时，应做这两个酶的PFGE图谱。可用 *NotI*（或 *SfiI*）消化凝胶块的一小块或整个凝胶块（以丢弃式模具制备）。推荐使用一小块胶块，这样所用酶量较少，凝胶块的其他部分可以用于其它酶的分析。当用首选酶对两个或多个分离株分析得到相同带型时，需要确认这些分离株用其它酶分析是否也获得相同带型。

1. 在 1.5mL 微量离心管上标记好相应的样品名称；在 3 个（10 孔胶）或 4 个（15 孔胶）离心管上标记 H9812 标准株。

2. 酶切前稀释缓冲液：以灭菌超纯水按下表配制（以 TaKaRa 宝生物工程有
限公司内切酶为例）。

| 试剂 | $\mu\text{L}/\text{胶块}$ | $\mu\text{L}/10\text{胶块}$ | $\mu\text{L}/15\text{胶块}$ |
|--------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 灭菌纯水 | 140 | 1400 | 2100 |
| H 缓冲液 | 20 | 200 | 300 |
| BSA | 20 | 200 | 300 |
| Triton | 20 | 200 | 300 |
| 总体积 | 200 | 2000 | 3000 |

注意：缓冲液要置于冰上。

3. 在每个 1.5mL 微量离心管中加入 200 μL 稀释缓冲液。

4. 小心用小铲从 TE 中取出胶块，放在干净的培养皿上。

5. 用刀片切下 2mm~2.5mm 宽的胶块，放入含稀释缓冲液的 1.5mL 微量离心管中。确保胶块在液面下面。将剩余的胶块放回原来的 TE 中。

注意：所切下的胶块的形状和大小，取决于灌注电泳胶所用的梳子齿大小。PulseNet 推荐用大齿（10mm 宽）梳子，因为与小齿（5.5mm）梳子相比，前者灌注的电泳胶在用计算机分析泳道时准确性高。

6. 用同样的方法处理沙门菌参照菌株 H9812 的胶块，以 *Xba*I 酶切（酶切体系根据不同厂家内切酶推荐反应体系计算）

7. 将管子放在 37°C 水浴中孵育 5min~10min，或室温 10min~15min。

8. 在用稀释缓冲液孵育的过程中，按照以下的比例配制酶切缓冲液，混匀。

| 试剂 | $\mu\text{L}/\text{胶块}$ | $\mu\text{L}/10\text{胶块}$ | $\mu\text{L}/15\text{胶块}$ |
|-------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 灭菌纯水 | 137 | 1370 | 2055 |
| H 缓冲液 | 20 | 200 | 300 |
| BSA | 20 | 200 | 300 |

| | | | |
|-----------------------------|-----|------|------|
| Triton | 20 | 200 | 300 |
| <i>NotI</i> (10 U/ μ L) | 3 | 30 | 45 |
| 总体积 | 200 | 2000 | 3000 |

注意：将酶置于冰上，用后立即放在 -20°C 保存。

酶量可根据泳道上是否有不完全酶切的阴影进行调整 (*SfiI* 酶量为 50U)。

9. 用枪头吸出稀释缓冲液，避免损伤胶块。
10. 每管加入 $200\ \mu\text{L}$ 酶切缓冲液，轻轻在实验台上磕管子的底部，确保胶块在液面的下面。
11. 在 37°C 水浴中孵育至少 4h (*SfiI* 反应温度为 50°C)。

(二) 灌制电泳胶

1. 打开水浴箱，温度调至 $55^{\circ}\text{C} \sim 60^{\circ}\text{C}$ 。
2. 配制 2200mL 的 $0.5\times\text{TBE}$ 。
3. 用 $0.5\times\text{TBE}$ 配制 1% SeaKem Gold (SKG) 胶。
14cm 宽电泳胶框 (10~15 加样孔): 1.0g SKG 胶溶于 100mL $0.5\times\text{TBE}$ 中。
21cm 宽电泳胶框 (≥ 15 加样孔): 1.5g SKG 胶溶于 150mL $0.5\times\text{TBE}$ 中。
4. 熔化时，微波加热 60sec，混合；每隔 15sec ~ 30sec 重复一次，直到胶完全熔化。放在 $55^{\circ}\text{C} \sim 60^{\circ}\text{C}$ 水浴备用 (温度至少平衡 30 分钟以后使用)。
5. 从 37°C 水浴中取出酶切完的胶块，平衡到室温。
6. 用枪头吸出酶切混合液，避免损伤或吸出胶块。
7. 每管加入 $200\ \mu\text{L}$ $0.5\times\text{TBE}$ ，室温平衡 5min。
8. 安装胶槽，调整梳子高度，使梳子齿与胶槽的底面相接触。用水平仪调整胶槽使其水平。

9. 把梳子平放在胶槽上，把胶块加在梳子齿上。把参照菌株 H9812 加在第 1、5、10 个齿上（10 齿梳子）或第 1、5、10、15 个齿上（15 齿梳子）。

10. 用吸水纸的边缘吸去胶块附近多余的液体，在室温下风干约 3min。

11. 把梳子放入胶槽，确保所有的胶块在同一条直线上，并且胶块与胶槽的底面相接触。从胶槽的下部中央缓慢到入熔化的在 55℃ ~ 60℃ 平衡的 1% SKG。避免气泡的生成；如果有，用枪头消除。在室温下凝固 30min 左右。

12. 记录加样顺序。

（三）电泳条件

1. 确保电泳槽是水平的。如果不水平，调整槽底部的旋钮。注意：不要触碰电极。

2. 加入 2L ~ 2.2L 新配制的 0.5×TBE, 关上盖子（所用缓冲液量取决于管中是否有缓冲液残留，或电泳设备上次运行后是否用纯水冲洗过）。

3. 打开主机和泵的开关，确保泵设在 70（这时缓冲液的流速约 1L/min）和缓冲液在管道中正常循环。

4. 打开冷凝机，确保预设温度在 14℃（缓冲液达到该温度通常需要 20min 左右）。

5. 打开胶槽的旋钮，取出凝固好的胶，用吸水纸清除胶四周和底面多余的胶，小心的把胶放入电泳槽，关上盖子。

6. 设置电泳参数。

对于 CHEF Mapper 型系统:

Block 1: 2 s - 10 s, 13 hours

Block 2: 20 s - 25 s, 6 hours

（1）按 Chef Mapper 主机上的 Multi-State 键。

（2）提示 Program with Interrupts?

0 = No

注意：输入每个数值或命令后，要按 Enter 键。

(3) 提示 Block 1 Runtime?

输入 13 hours

(4) Block 1, State 1 (按下面数值输入空格内):

a. 6.0 volts

b. angle = 60.0

c. Initial switch time = 2 s

d. Final switch time = 10 s

e. Ramping factor, a = 0 (linear)

(5) 提示 Continue with another state (Vector)?

1 = Yes

(6) Block 1, State 2 (按下面数值输入空格内):

a. 6.0 volts

b. angle = - 60.0

Note: The angle for State 2 is Negative

c. Initial switch time = 2 s

d. Final switch time = 10 s

e. Ramping factor, a = 0 (linear)

(7) 提示 Continue with another state (Vector)?

0 = No

(8) 提示 Continue with another Block?

1 = Yes

(9) 提示 Block 2 Runtime?

6 hours

(10) 提示 Block 2, State 1 (按下面数值输入空格内):

a. 6.0 volts

b. angle = 60.0

c. Initial switch time = 20 s

d. Final switch time = 25 s

e. Ramping factor, a = 0 (linear)

(11) 提示 Continue with another state (Vector)?

1 = Yes

(12) Block 2, State 2 (按下面数值输入空格内):

a. 6.0 volts

b. angle = - 60.0

注意：State 2 中夹角为负值。

c. Initial switch time = 20 s

d. Final switch time = 25 s

e. Ramping factor, a = 0 (linear)

(13) 提示 Continue with another state (Vector)?

0 = No

(14) 提示 Continue with another Block?

0 = No

(15) 此时程序输入仪器记忆中，可输入另一命令。

(16) 按 Start Run 键，启始电泳。

对于 CHEF DR-III 型系统：

Block I:

Initial switch time: 2s

Final Switch time: 10s

Voltage: 6V

Included Angle: 120°

Run time: 13 h

BlockII:

Initial switch time: 20s

Final switch time: 25s

Voltage: 6V

Included Angle: 120°

Run time: 6 h

注意：以上所推荐电泳时间是以 CDC 仪器和试剂确定的。在不同实验室，电泳时间可能不同；调整电泳时间，使电泳胶中 H9812 最小片段距胶底端 1.0cm ~ 1.5cm。

7. 开始电泳，记录电泳初始电流（通常 120ma ~ 145ma）。

四、第三天

主要是拍摄电泳图像。

1. 电泳结束后，关闭仪器，关闭顺序：冷凝机 - 泵 - 主机。

2. 取出胶，放在盛放 400mL EB 溶液的托盘内，染色 20min~30min（此体积适用于约 14cm×24cm 的染色缸；大的容器要相应增加染色液体积）。

注意：EB 有毒，是致突变剂。目前 PulseNet China 选用 Gelred 代替。

3. 放掉电泳槽中的 TBE，用 2L 纯水清洗电泳槽，并倒掉液体。如果以后几天不使用电泳设备，打开泵，用纯水冲洗管道 5min~10min，然后放掉电泳槽和管道中的水。

4. 以 500mL 纯水脱色 60min~90min，如果可能，每 20min~30min 换一次纯水。

5. 用 Gel Doc XR、Gel Doc 2000 或其他设备拍摄图像。如果背景干扰分析，可进一步脱色 30min~60min。

6. 根据成像设备要求保存图像为 *.img 或 *.lsc 文件，转换成 *.tif 文件，用于 Bionumerics 软件分析。

注意：如果不在 24h~28h 内获得 PFGE 结果：

（1）凝胶块可能经过较长时间后降解（3h~16h）。

（2）用 TE 洗胶以除去凝胶块中的裂解液，此步骤可延长时间至 30min~45min，在较低温度（37℃或室温）进行。可以在第一天开始，第二天结束，凝胶块放在 TE 中冰箱过夜。

（3）限制性酶切时间可延长至 5h~16h。

（4）如果参照菌株 H9812 的最小片段未达到电泳胶底端以上 1.0cm~1.5cm，则电泳时间需要根据每个实验室的经验确定，以使最小片段达到要求边界。

五、图像的读取

电泳图像通常用 BIO-RAD 的 GEL DOC XR 或其它成像系统来获取。其它可以替代的成像设备,只要具有 CCD 相机,可以提供 IBM 兼容的未压缩的 TIFF 图像,且分辨力 $\geq 768 \times 640$ 像素,能够用 BioNumerics (Applied Maths, Inc.) 软件与 PulseNet 数据库中其它图像进行对比分析,也可以运用。

以下是使用 GEL DOC XR 系统时的概要说明。

(一) 开启 QUANTITY ONE 软件

1. 点击 QUANTITY ONE 按钮打开该软件。
2. 点击菜单 FILE→GEL DOC XR。注意: 需要 10sec ~ 20sec 打开窗口。
3. 打开抽屉,把胶放在台板上。胶已经经过 EB 或 Gelred 染色并经过充分脱色。用黑色胶框把胶放在合适的位置。关上抽屉门。

(二) 图像的获取

4. 按下 EPI-WHITE 按钮打开白光。
5. 把胶放在调准网格线内,使胶的加样孔和调准网格线的最上面一条蓝线对齐。
6. 保证调准网格线和过饱和按钮被选中。
7. 改变镜头的 ZOOM 以调整图像的大(顺时针)、小(逆时针),使图像占据整个窗口。如果需要,挪动胶在台板上的位置。胶的加样孔、下边界和左右边界在屏幕上都应该可以看到。
8. 如果需要,按 FOCUS 以调整相机的焦距。
注意: 焦距的调整只可以偶尔用之,不可用于每一块胶。可以用尺子帮助调整焦距。
9. 按下 EPI-WHITE 关掉白光,按下 TRANS UV 按钮打开透射紫外光。
10. 点击 AUTO EXPOSE 以确定大概的曝光时间。当图像出现在窗口时, AUTO EXPOSE 自动关闭而 MANUAL EXPOSE 被激活。

11. 点击 MANUAL EXPOSE 的 $\uparrow\downarrow$ 按钮，调整曝光时间。而调整饱和度时，点击箭头或 IRIS 以降低光量（如果图像过饱和，图像显现红色）。

注意：如果出现对话框“曝光可以在 0.03 ~ 360 秒之间波动”，则需通过改变相机的像素以调整饱和度。调整饱和度使样品条带没有红色很重要，因为这会影响 BIONUMERICS 软件对胶图像的分析。而胶加样孔的过饱和属于正常现象。

12. 当图像调整比较满意时，按下 FREEZE 按钮停止曝光过程。按下 UV 按钮关掉紫外光（如果开门时 UV 灯打开，它会自动关闭）。

（三）图像的输出

保存图像 (*.1sc): FILE \rightarrow SAVE。确保选择正确的路径。文件默认的名字包括日期、时间和用户。可以改变文件名。

打印文件: FILE \rightarrow PRINT \rightarrow VIDEO PRINT, 也可直接点击屏幕上的 PRINT 按钮。

转为*.TIFF 格式: FILE \rightarrow EXPORT TO TIFF IMAGE \rightarrow EXPORT, 选择保存路径。

关闭 QUANTITY ONE 程序: FILE \rightarrow EXIT。

（四）后续处理

取出胶放在染色盒内。用吸水纸擦掉台板表面多余的液体，用水或 70% 的异丙醇洗干净。

六、试剂储存液的配制

（一）1M Tris-HCl, pH 8.0

121.1 g Tris base 溶于 650mL ~ 700mL 纯水中，加入 80mL 6N HCl, 在室温下调 pH 至 8.0, 加水终体积至 1000mL, 高压灭菌。

或者，157.6g Tris-HCl 溶于 800 mL 纯水中，在室温下调 pH 至 8.0, 加水终体积至 1000mL, 高压灭菌。

（二）10N NaOH

400g NaOH 小心溶于 800mL 纯水中（因溶解过程中会产热），冷却到室温，加灭菌的纯水使终体积至 1000mL。

（三）0.5 M EDTA, pH 8.0

186.1g Na₂EDTA·2H₂O 溶于 800 mL 纯水中，加入 50mL 10N NaOH 调 pH 至 8.0，加水终体积至 1000mL，分成数份，高压灭菌。

（四）20% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS, 十二烷基硫酸钠)

将 20g SDS 小心加入装有 80mL 灭菌纯水的容器中，在 35℃ ~ 45℃ 轻轻混匀溶解，定容至 100mL。

（五）20mg/mL 蛋白酶 K 储存液

100mg 蛋白酶 K 粉末溶于 5mL 灭菌纯水中，混匀，分装在 1.5mL 离心管中，每管 500 μL ~ 600 μL，-20℃ 保存备用。

（六）10× Tris-Borate EDTA 缓冲液 (TBE), pH ~ 8.3

0.9 M Tris base (108g)

0.9 M Boric Acid (55g)

0.02 M EDTA, pH 8.0 (40M1, 0.5 M)

溶于 1000mL 灭菌的纯水中，高压灭菌

注意：如果缓冲液有沉淀生成必须丢弃。

（七）Ethidium Bromide (EB)

10 mg/mL EB 的储存液用纯水 1:10,000 稀释（即 100mL 水中加入 10 μL 储存液，500mL 水中加 50 μL 储存液）。稀释液在丢弃前可以染 5~6 块胶。储存在棕色瓶中的 EB 稀释液可以用 3~5 次。废弃的 EB 溶液应妥善处理。

（八）Gelred

可用无细胞毒性的核酸染料 Gelred 替代 EB。配制 500mL 染液的方法是：在 450mL 纯水中加入 50mL 的 1M NaCl 和 150 μL 的 Gelred 染料。

七、实验试剂

注意：用灭菌的玻璃制品、塑料制品和纯水来制备以下试剂。

(一) Tris:EDTA 缓冲液(TE), pH 8.0 (10mM Tris-HCl:1mM EDTA , pH 8.0)

10mL 1M Tris-HCl, pH 8.0

2mL 0.5M EDTA, pH 8.0

用灭菌的纯水稀释到 1000mL。

TE Buffer 用于:

(1) 溶解 1% SeaKem Gold。

(2) 细菌裂解后洗胶块。

(二) 细胞悬浮液 (CSB)

为 100mM Tris-HCl:100mM EDTA, pH 8.0。

10mL 1M Tris-HCl, pH 8.0

20mL 0.5M EDTA, pH 8.0

用灭菌的纯水稀释到 100mL。

(三) 细胞裂解液 (CLB)

为 50mM Tris-HCl:50 mM EDTA, pH 8.0 加 1% N-Lauroyl-Sarcosine, Sodium salt (Sarcosyl) 和 0.1mg/mL Proteinase K (用前再加入)。

25mL 1M Tris-HCl, pH 8.0

50mL 0.5M EDTA, pH 8.0

50mL 10% Sarcosyl 或 5g Sarcosyl

用灭菌的纯水稀释到 500mL, 每 5mL CLB 加入 25 μ L 蛋白酶 K 储存液 (20 mg/mL), 使其终浓度为 0.1mg/mL。

若直接用 Sarcosyl 粉末配制，加热溶液在 50℃ ~ 60℃ 保温 30min ~ 60min，或室温溶解约 2h，使充分溶解后调体积至终体积。

(四) 0.5×TBE 缓冲液

200ml 5×TBE 用纯水稀释到 2000mL，或

100ml 10×TBE 用纯水稀释到 2000mL

注意：用来稀释 5×TBE、10×TBE 的纯水可以不灭菌。

(五) SeaKem Gold (SKG) 琼脂糖

1. 凝胶块琼脂糖 (1% SeaKem Gold, 以 TE 配制):

(1) 称 0.50g (或 0.25g) SKG 于 250mL 螺帽瓶中。

(2) 加入 50mL (或 25mL) TE 缓冲液，轻旋转瓶以分散 SKG 胶。

(3) 取下瓶盖，用干净膜盖住瓶口，微波加热 30sec，轻轻混合；每隔 10sec 重复一次，直到胶完全熔化。

(4) 盖好瓶口，保温于 55℃ ~ 60℃ 水浴备用。

注意：SeaKem Gold 琼脂糖制 PFGE 凝胶块效果较好，用可重复制胶模具制备的凝胶块强度较大，裂解和洗胶时凝胶块损伤较少。完全熔化琼脂糖需要的时间和温度取决于所用微波，需要实验室经验确定。

2. 电泳胶 (1% SeaKem Gold, 以 0.5×TBE 配制):

(1) 称适量 SKG 胶于 500mL 螺帽瓶中。

(2) 加入适量 0.5×TBE，轻旋转瓶以分散 SKG 胶。

(3) 取下瓶盖，用干净膜盖住瓶口，微波加热 60sec，轻轻混合；每隔 15sec 重复一次，直到胶完全熔化。

(4) 盖好瓶口，保温于 55℃ ~ 60℃ 水浴备用。

14cm 宽电泳胶框 (10-15 加样孔): 1.0g SKG 胶溶于 100mL 0.5×TBE 中。

21cm 宽电泳胶框 (≥15 加样孔): 1.5g SKG 胶溶于 150mL 0.5×TBE 中。

八、器材与耗材

(一) 器材

1. 分光光度计或浊度仪, 如 Dade Microscan Turbidity Meter 或 bioMérieux Vitek Colorimeter: 用于调整细菌细胞悬浊液的浓度。

2. 微波炉: 用于融胶。

3. 水浴摇床: 用于裂解胶块中的细胞 (54℃), 以及用于使用水和 TE (50℃) 洗胶块

4. 56℃ 水浴箱: 用于平衡和保温熔化的胶。

5. 50℃ 水浴箱: 用于加热用于洗胶块的水和 TE, 胶块酶切。

6. 离心机。

7. 水浴箱: 至少两个, 一个平衡到 56℃, 另一个到 37℃。温度可调。

(二) 耗材

1. 无菌的 Falcon 2054 管 (12mm × 75mm) 或 Falcon 2057 管 (17mm × 100mm): 用于细胞悬浊液的制备。

2. 无菌聚酯纤维或棉签: 用于从琼脂平板上刮取细菌。

3. 无菌枪头或巴斯德吸管。

4. 无菌的 1.5mL 离心管: 用于混合细胞悬浊液和胶、酶切。

5. 无菌的 50mL 旋盖塑料离心管或 50mL Oak Ridge 离心管: 用于装胶块。

6. Green Screened Caps (Bio-Rad 170-3711): 用于洗胶块。

7. 10 孔模具 (可重复利用的, 2cm × 1cm × 1.5mm, Bio-Rad 170-3622)。

50 孔模具 (一次性, 1.5mm × 10mm × 5mm)。

8. 手术刀、平皿或类似物: 用于切胶块。

9. 无菌一次性平皿或大的玻璃载物片：用于切胶块。
10. 一端宽、一端窄的平铲（微量药铲）；胶铲（Bio-Rad 170-3643）。
11. 标准灌胶台（14cm × 13cm）：适用于10孔的梳子。
大灌胶台（21cm × 14cm, Bio-Rad 170-3704）：适用于15孔的梳子。
12. 10孔的梳子（14cm长、1.5mm厚, Bio-Rad 170-4326）或15孔的梳子（21cm长、1.5mm厚, Bio-Rad 170-3627）。
13. 水平台。
14. 盛放EB染液或Gelred染液的容器。
15. 70%异丙醇、5%~10%的漂白剂或其它合适的消毒剂。
16. 50mL~2000mL的各规格无菌烧瓶或瓶子。
17. 100mL~2000mL的各规格量筒。
18. 无菌的吸管（2mL~50mL规格）
19. 保护性手套（无石化粉的乳胶手套、聚乙烯手套或腈类手套）。
20. 耐热性手套。
21. 冰盒。

九、PFGE 记录表格

菌株 PFGE 实验记录表格

菌株上送单位:

PFGE 日期:

图像递交实验室名称:

报告结果日期:

菌株接收日期:

凝胶图像编号:

| | |
|----------------------------|---------------|
| Conditions | |
| Run Time 1 | 13 h |
| Initial Switch Time | 2 sec |
| Final Switch Time | 10 sec |
| Run Time 2 | 6 h |
| Initial Switch Time | 20 sec |
| Final Switch Time | 25 sec |
| Voltage Gradient | 6 V/cm |
| Included Angle | 120° |
| Ramping | linear |
| 起始电流 | ma |



| 泳道 | 菌株编号 | 内切酶 | 备注 |
|----|-------|-------------|----|
| 1 | H9812 | <i>XbaI</i> | |
| 2 | | | |
| 3 | | | |
| 4 | | | |
| 5 | H9812 | <i>XbaI</i> | |
| 6 | | | |
| 7 | | | |
| 8 | | | |
| 9 | | | |
| 10 | H9812 | <i>XbaI</i> | |
| 11 | | | |
| 12 | | | |
| 13 | | | |
| 14 | | | |
| 15 | H9812 | <i>XbaI</i> | |

PFGE 操作人:

联系人:

复核人:

联系电话:

附件 5 01 群埃尔托生物型霍乱弧菌噬菌体-生物分型实验

操作

一、噬菌体分型

(一) 分型噬菌体及其宿主菌

五株分型噬菌体主要来自病人和水体，用于增殖的菌株（01 群埃尔托型）及基本特征列于下：

| 噬菌体 | | | | 宿主菌 | | | |
|-----|------|------|------|-------|-----|-----|---------|
| 噬菌体 | 分离年代 | 分离地点 | 来源 | 菌号 | 菌种 | 血清型 | 噬菌体-生物型 |
| VP1 | 1964 | 广东汕头 | 井水 | N53 | NAG | | 20k |
| VP2 | 1962 | 浙江温州 | 河水 | 16017 | VC | 小川 | 1f |
| VP3 | 1962 | 福建 | 霍乱病人 | 2477 | ETV | 小川 | 1c |
| VP4 | 1962 | 广东 | 霍乱病人 | 919C | ETV | 小川 | 1c |
| VP5 | 1963 | 上海 | 江水 | 2477 | ETV | 小川 | 1c |

(二) 噬菌体分型测定（双层琼脂平皿法）：

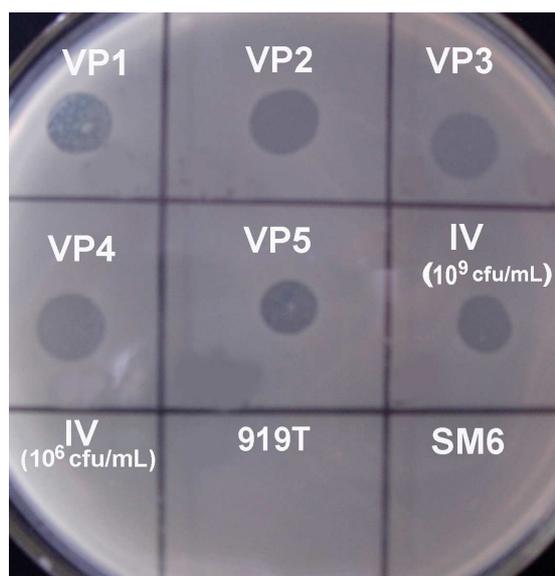
1. 被检菌的培养：挑取被检菌新鲜单菌落于 3mL LB 中，37℃ 200rpm 振荡培养 3h~4h。

2. 固体琼脂培养基平皿的准备：在固体琼脂培养基平皿底的背面，用记号笔划出 9 个方格，并分别作标记。第 1~5 格：VP1~VP5 分型噬菌体；第 6、7 格：第 IV 组霍乱噬菌体原液和常规稀释液；第 8、9 格：埃尔托型霍乱弧菌的溶原噬菌体两个代表株 919T 和 SM6（作为生物分型实验中的项目）。

3. 被检菌顶层琼脂平皿的制备：取被检菌培养物 200 μL 加至已溶化并冷至 50℃ 的半固体琼脂中，混匀后均匀倾注于固体琼脂平皿上；

4. 噬菌体滴皿及培养：被检菌顶层琼脂凝固后（约 3min），分别滴加 5 μ L 如下噬菌体及菌株：第 1~5 格滴加 VP1~VP5 五个分型噬菌体原液 ($10^8 \sim 10^{10}$ cfu/mL)，第 6、7 格滴加第 IV 组霍乱噬菌体原液 ($10^8 \sim 10^9$ cfu/mL) 及常规稀释液 (10^6 cfu/mL)。另外，第 8、9 格滴加埃尔托型霍乱弧菌的溶原噬菌体两个代表株 919T 和 SM6，作为生物分型实验中的“对溶原噬菌体敏感性的测定”项目；待滴液干后放 37 $^{\circ}$ C 倒置培养过夜，观察结果。

5. 结果判定：出现全裂解 (CL)、几乎全裂解 (ACL)、半全裂解 (SCL)、不透明裂解 (OL)、弱裂解 (WL) 或不同数量的噬斑者均为阳性，可疑裂解 (\pm) 与不裂解 (-) 者为阴性。见附图 1。



附图 1. 噬菌体分型裂解示意图。

根据 5 株国内分离的弧菌噬菌体 (VP1~VP5)，将埃尔托型霍乱弧菌分成 32 个噬菌体型 (分型表见第四章第三节“用于疫情调查分析的菌株分型”)。

二、生物分型

(一) 溶原性测定

某些埃尔托型霍乱弧菌溶原性菌株在繁殖过程中自发地释放噬菌体，用 16141SM6（霍乱弧菌埃尔托复愈型菌株，链霉素抗性）作为指示菌予以测定。

1. 指示菌和被检菌的制备：挑取 16141 SM6 菌株新鲜单菌落于 3mL LB 中，37℃，200rpm 振荡培养过夜，作为指示菌。被检菌的制备同指示菌。

2. 固体琼脂培养基平皿的准备：在固体琼脂培养基平皿底的背面，用记号笔划出 16~20 个方格，并注明被检菌号。

3. 指示菌顶层琼脂平皿的制备：取指示菌培养物 200 μL 加至已溶化并冷至 50℃ 的半固体琼脂中，并加入链霉素 2000 单位，混匀后均匀倾注于固体琼脂平皿上。

4. 被检菌的滴加及培养：指示菌顶层琼脂凝固后（约 3 min），分别滴加 5 μL 被检菌在指示菌平皿的每个小格内，待滴液干后放 37℃ 倒置培养过夜，观察结果；

5. 结果判定：出现不透明的磨玻璃样噬斑或裂解区，边缘有明显的、窄的、不圆整的裂解环者为阳性。

（二）对溶原噬菌体敏感性的测定

在噬菌体分型的平皿上，滴加埃尔托溶原噬菌体代表株（溶原性菌株的 18 h~20 h 肉汤培养物，经 56℃ 30 min 水浴杀菌后使用）。培养过夜后观察结果。出现不透明噬斑者为阳性，表明被检菌株对溶原噬菌体敏感，即为复愈型菌株，不出现噬斑者可能是溶原株，也可能是非溶复株。

（三）山梨醇发酵试验

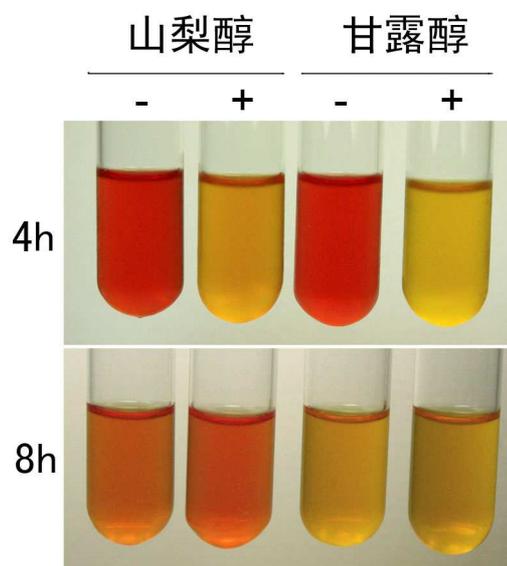
1. 被检菌的培养：挑取被检菌新鲜单菌落于 3 mL LB 中，37℃ 培养至 OD₆₀₀ 为 0.5（静止培养约 2h~3h）。

2. 取 0.1mL 被检菌培养物，加于山梨醇发酵管（3mL，pH 8.5），37℃ 静置培养，第 4 小时和第 8 小时观察结果。

3. 结果判定：第 4 小时发酵液变为黄色，为发酵实验阳性 (+)，该埃尔托型菌株为山梨醇快发酵；发酵液仍为红色或粉红色，判断为阴性 (-)；阴性菌株继续观察到第 8 小时时，一般会变为黄色或很浅的红色，判断该埃尔托型菌株为山梨醇慢发酵。见附图 2 山梨醇发酵部分。

需注意有些山梨醇发酵阳性(快发酵)菌株在第 3 小时就出现发酵液变黄色，在随后培养中会出现返红色或淡红色现象（见附图 2 山梨醇发酵部分），因此建议山梨醇发酵实验中在第 3 小时时观察一次结果，发酵液出现黄色，即可判断为阳性。

已发现用甘露醇代替山梨醇进行实验有更容易观察和判断的结果。此时发酵液中仅用甘露醇替换山梨醇即可，甘露醇浓度用 0.2% (100mL 发酵液中含甘露醇 0.2g)，为山梨醇浓度的十分之一，并且快发酵株不存在继续培养出现返红色的现象（见附图 2 甘露醇发酵部分）。



附图 2. 山梨醇（及甘露醇）发酵试验。

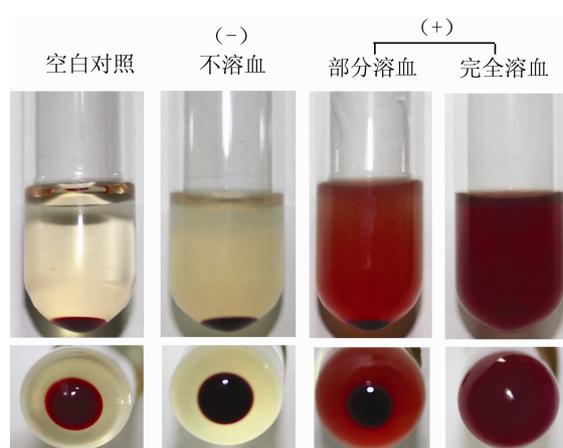
（四）溶血试验

1. 被检菌的制备：挑取被检菌新鲜单菌落于 3mL LB 中，37℃ 200rpm 振荡培养 3h ~ 4h；同时使用已知溶血株、不溶血株和肉汤管作对照。

2. 1% 绵羊红细胞的制备：生理盐水洗 3 次，最后一次离心速度为 2000 rpm/min。离心 10min。

3. 取 1mL 被检菌培养物，加入制备的 1% 绵羊红细胞 1mL，混匀后置 37℃，2h 观察初步结果，再放 4℃ 冰箱过夜观察最后结果。

4. 结果判定：可分为不溶血株（溶血阴性）和溶血株（溶血阳性），达半数血球溶解者即为溶血阳性，溶血株又分为部分溶血和完全溶血。（附图 3）。为证明是否为不耐热溶血素，可将被检菌培养物 56℃ 加热 30min 后再做溶血试验。



附图 3. 01 群埃尔托型霍乱弧菌溶血试验

上述噬菌体分型和生物分型试验，使用两皿（噬菌体分型皿和溶原性测定皿）和两管（山梨醇管和溶血试验管）来完成。

根据菌株的溶原性、对溶原噬菌体的敏感性、山梨醇发酵试验和溶血试验等 4 个生物学性状，将埃尔托型霍乱弧菌分成 12 个生物型（分型表见第四章第三节“用于疫情调查分析的菌株分型”）。

三、埃尔托型霍乱弧菌噬菌体-生物分型

将噬菌体分型与生物分型结合起来，即为 01 群埃尔托生物型霍乱弧菌被检菌株的噬菌体-生物分型。

参考文献

1. Guidelines for Cholera Control. World Health Organization. 1993. ISBN: 92 4 154449 X.
2. World Health Organization. Cholera, 2010. Weekly Epidemiological Record. 2011, 86, 325-340.
3. World Health Organization. Cholera, 2009. Weekly Epidemiological Record. 2010, 85, 117-128.
4. <http://idsc.nih.gov/iasr/27/311/dj3117.html>.
5. 魏承毓. 我国霍乱的流行特征和防控对策. 中国公共卫生. 2004. 20(7): 894-896.
6. Foodborne disease outbreak: Guidelines for investigation and control. World Health Organization. 2008. ISBN 978 92 4 154722 2.
7. Gregg MB 主编, 张顺祥主译. 现场流行病学病学. 第3版. 北京: 人民卫生出版社. 2011.
8. Bartels SA, Greenough PG, Tamar M, VanRooyen MJ. Investigation of a Cholera Outbreak in Ethiopia's Oromiya Region. Disaster Med Public Health Prep. 2010. 4(4): 312-317.
9. 郑慧贞, 李灵辉, 钟豪杰. 霍乱疫情现场调查处理. 华南预防医学. 2007. 33(1): 71-74.
10. 王陇德主编. 卫生应急工作手册. 2005版. 北京: 人民卫生出版社. 2005.
11. 周祖木主译. 紧急状态下传染病控制现场手册. 北京: 人民卫生出版社. 2006.

12. Farmer JJ, Janda M, Brenner FW, et al. Genus 1. *Vibrio*. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 2, The Proteobacteria, Part B. The Gammaproteobacteria. Springer, New York, 2005. pp 494–546.
13. WHO/CDS/CSR/EDC/99.8. Laboratory Methods for the Diagnosis of Epidemic Dysentery and Cholera. Centers for Disease Control and Prevention. 1999.
14. Faruque SM, Albert MJ and Mekalanos JJ. Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microb Mol Bio Rew.* 1998. 62 (4): 1301–1314.
15. Yu L, Zhou Y, Wang R, , et al. Multiple antibiotic resistance of *Vibrio cholerae* Serogroup 0139 in China from 1993 to 2009. *PLoS ONE* 7(6): e38633.