

# 全国霍乱监测方案（2012年版）

## 一、背景

霍乱是由霍乱弧菌引起的一种急性肠道传染病，以发病急、传播快、波及范围广为特征，是《中华人民共和国传染病防治法》规定的甲类传染病之一。《国内交通卫生检疫条例》也将其列为检疫传染病。

目前全球依然处于霍乱的第7次世界大流行中。近十年来，每年报告至世界卫生组织的霍乱病例数在14万~31万例之间，主要在非洲、中南美洲和亚洲。我国自1961年以来出现3次较大范围跨年度的霍乱流行，从2002年开始总体处于低发水平，但局部地区暴发疫情时有发生，以食源性感染为主，特别是因海、水产品污染霍乱弧菌而引起的暴发占有较大比例，除了O1群El Tor型菌株的流行，O139群霍乱弧菌也持续引起散发以及暴发。此外，还发现数起边境输入性霍乱疫情。霍乱不仅对人民健康带来危害，而且造成一定的社会影响和经济损失。

在当前低发病率的情况下，为及时发现霍乱疫情，做好疫情的监测、预警、溯源及控制，现对2005年制订的《全国霍乱监测方案》的内容及要求进行调整，以适应当前我国霍乱流行和防治工作的需要。本方案强调霍乱病例及暴发疫情的及时发现、细致调查，以及流行病学调查关键信息及危险因素监测结果的收集和利用，加强边境重点地区腹泻病例的主动搜索，掌握边境地区霍乱及其他致泻性弧菌引起的腹泻病例的发病情况、病原构成及临床特征的掌握，以指导霍乱及其他致泻性弧菌引起的腹泻的防治工作的顺利开展。

## 二、监测目的

（一）及时发现霍乱病例，早期识别暴发疫情，加强流行病学调查与处置工作，防止疫情扩散。了解引起霍乱流行的危险因素，为

制定针对性的公共卫生防控措施提供依据。

(二) 掌握我国霍乱疫情菌株的生物学特征和耐药性变化，监测菌型变迁。

(三) 掌握所监测我国沿海地区腹泻病例中致泻性弧菌的构成与变化，以指导霍乱弧菌及其他致泻性弧菌导致的腹泻病的综合防治。

### 三、监测相关定义

#### (一) 监测病例

1. 现行《霍乱诊断标准》中规定的霍乱疑似病例、临床诊断病例和确诊病例以及带菌者均为监测病例。

2. 腹泻病例：指每日排便 $\geq 3$ 次，且具有大便性状异常的病例。

#### (二) 霍乱暴发

在一周内，局部地区发生 3 例及 3 例以上有流行病学关联的霍乱病例及/或带菌者。

### 四、全国常规监测

#### (一) 霍乱病例的法定报告

##### 1. 病例的发现

各地医疗机构应做好腹泻病人的就诊登记，对有霍乱疑似症状的病人应及时进行标本（粪便、肛拭子或呕吐物）的采集和检测；检测方法除使用传统的分离培养外，还可采用胶体金试纸条、制动试验、PCR 等方法作为初筛。无检测能力的基层医疗单位，可采集标本送至辖区疾病预防控制中心进行检测。

霍乱多发地区的，各级各类医疗机构，在霍乱流行季节（5—10月）须按照卫生部有关规定设立规范的感染科（肠道门诊），并按要求做好腹泻病人的就诊专册登记，逢泻必登，逢疑必检，即对每一例霍乱疑似病例应采集粪便或/和呕吐物等标本进行病原菌分离培养，即逢泻必登，逢疑必检；在霍乱多发地区，以县为单位每年

对腹泻病人的病原菌分离检索率不低于腹泻病人总数的 10%。

## **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，应于 2 小时内填写《传染病报告卡》，并通过传染病疫情网络直报系统“疾病监测信息报告管理系统”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，当地疾病预防控制机构接到报告并核实后，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**

县区级疾病预防控制机构在接到辖区内霍乱病例报告后，应立即对病例和带菌者进行详细的个案调查，参照使用《霍乱防治手册》中的个案调查表，收集病例临床表现、流行病学史、病原学检测等信息，核实诊断，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，调查结束后 2 天内应填写《霍乱病例个案调查信息一览表》（附表 1），通过霍乱专报系统或指定的专用邮箱进行上报。

### **（二）暴发监测**

#### **1. 暴发的发现**

医务人员在短时间内发现有与霍乱病例症状相似的多例病例时，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及时对疫情进行分析，发现有聚集性时，要调查核实；实验室人员发现分子分型型别一致的多个菌株，要及时告知流行病学专业人员，以便进行调查核实。

#### **2. 暴发的报告、调查和处理**

按照《中华人民共和国传染病防治法》，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、流行时，按照《国家突发公共卫生事件应急预案》规定级别的要求，

通过传染病疫情网络直报系统“突发公共卫生事件报告管理信息系统”进行报告。

各级疾病预防控制机构在暴发疫情调查处理过程中要加强主动搜索，及时发现带菌者。对暴发疫情中的个案进行调查，进行必要的流行病学分析，尽快发现传染来源、传播因素，评价扩散危险程度。采集腹泻病例标本、相关的食品标本、环境水体标本等，进行霍乱弧菌的分离，并对分离株的生物学特征、分子分型检测，收集相关信息。

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（病原体分离鉴定、毒力检测、药敏试验和分型等）、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，上传到“突发公共卫生事件报告管理信息系统”。将霍乱暴发调查关键信息汇总表（附表 2）通过霍乱专报系统或专用邮箱进行报告。

## **五、哨点监测**

### **（一）边境地区霍乱哨点监测**

#### **1. 监测点选择**

在发生输入性霍乱疫情风险较高的云南、广西、新疆、辽宁 4 个省（自治区），分别选取 2 个边境市（县）作为监测点，每个监测点选择 2 所医院开展霍乱监测。

#### **2. 监测内容**

##### **（1）腹泻病例检索**

按照全国常规监测的要求，做好腹泻病例的检索和登记工作。收集腹泻病人的基本信息。对近期出入境的就诊腹泻就诊病例，特别注意要确保病例登记信息的完整性，并进行采样采集标本（附表 3），以便对传染源进行追踪。每个监测点每月采集 $\geq 40$ 份及以上以稀便、水样便为主要症状的腹泻病例的粪便标本，每年采集 $\geq$ 至少

480 份腹泻病例粪便标本，即每个监测省每年采集 $\geq$ 至少 960 份样品标本。

### (2) 实验室检测

市/县监测点疾病预防控制机构对当天采集的粪便标本，进行霍乱弧菌的分离培养，有关检测流程见附件 1。实验室检测结果填写附表 4，检测结果要及时反馈给医疗机构。

### (3) 个案调查和处置

发现霍乱病例后，辖区县（区）级疾病预防控制机构及时进行流行病学调查处置。具体要求同全国霍乱常规监测。

## (二) 沿海地区致泻性弧菌哨点监测

### 1. 监测省份

选择我国沿海地区的辽宁、河北、山东、江苏、上海、浙江、广东、广西、海南等 9 个省份。

### 2. 监测点设置

上述 9 个监测省份，分别选择 1 个县（区）作为监测点，每个监测点选择 2 所医院作为监测哨点。

### 3. 监测方法

#### (1) 腹泻病例登记

哨点医院要做好腹泻病例的登记工作。在每年 5—10 月期间，每个监测点每月采集 $\geq$ 60 份腹泻病例粪便标本，即监测省份每年共采集 $\geq$ 360 份标本，相关信息填写附表 3。

#### (2) 实验室检测

监测点市/县（区）疾病预防控制中心对采集的粪便样本，进行包括霍乱弧菌、副溶血弧菌、拟态弧菌、河弧菌、气单胞菌和类志贺邻单胞菌共 6 种致泻性弧菌的分离培养，检测流程见附件 1。实验室检测结果填写附表 4，检测结果要及时反馈给医疗机构。

### **(三) 危险因素监测**

#### **1. 水产品监测**

(1) 监测省份 北京、江苏、上海、浙江、福建、广东、海南、湖北、湖南、安徽、江西、四川、重庆、贵州等 14 个省份。

(2) 监测点设置 以上各省选择 2 个县(区)作为监测点(上海 1 个县(区)),每个监测点选择 1~2 家水产品批发市场、餐馆 1~2 家,开展水产品的监测。

(3) 监测方法: 监测时间为 5—10 月,每月采集水产品 1 次,采样的种类主要为甲鱼、牛蛙、贝类、鱼类等,需记录详细的采集地点和销售地点,尽可能登记上一级批发和/或养殖地点。标本的采集方法包括整体取样、部分取样和涂抹取样,其中 1 个涂抹样品应至少包括水产品的腮部、肛门和体表 3 处的涂抹拭子。每个监测点每月采集 40 份标本,合计全年 240 份标本,每省共 480 份(上海 240 份),将检测结果填写水产品霍乱监测登记表(附表 5)。每月底前将结果报告至霍乱专报系统或专用邮箱。

#### **2. 水系监测**

(1) 监测省份 云南、广西和辽宁。

(2) 监测点设置 以上 3 省各选择 1 个边境口岸所在县(区)为监测点。

(3) 监测方法 采集时间为 5—10 月,在监测点的跨境水体、境外人员聚集地周围水体设立 10 个取水点,每个取水点分成相隔数米的 2 个取水位置,每个取水位置采集 1 份水样。即每个监测点采集数量为每月 20 份标本,每省共采集 120 份水样。监测结果填写水系监测结果登记表(附表 6)。

### **六、病原学分析**

县(区、市)级疾病预防控制中心在完成菌株血清型别等基本鉴定后,如不具备开展菌株耐药性、毒素基因检测、分子分型等病原

学检测的条件，应尽快将菌株送上级疾病预防控制中心检测。同时将与菌株相关的个案调查、临床表现、流行病学史、病原学检测等信息由调查机构在 1 周内通过霍乱专报系统或专用邮箱进行报告。

### （一）菌株的常规鉴定

对获得的所有霍乱弧菌菌株均由各级疾病预防控制中心进行 O1 或 O139 群血清学分群（型）；以县（区、市）为单位的首发病例的菌株需进行系统的生化鉴定、生物学分型、药敏试验等项目检测，有条件的疾病预防控制中心可进行噬菌体—生物分型鉴定；其余菌株的鉴定项目由各省疾病预防控制中心按实际情况确定。

其他致泻性弧菌菌株可进行生化初筛（KIA/MIU）、氧化酶和系统的生化鉴定。

### （二）霍乱毒素基因检测

各市级疾病预防控制中心负责全部菌株的毒素基因（CT）检测（按《霍乱防治手册》方法），不具备检测条件的可送往省级疾病预防控制中心检测。

### （三）菌株脉冲场凝胶电泳（PFGE）分析

霍乱弧菌和其它致泻性弧菌菌株的 PFGE 检测，由中国疾病预防控制中心或有条件的省疾病预防控制中心按 PulseNet China 要求的标准方法完成。省疾病预防控制中心负责选择代表性菌株开展菌株的 PFGE 分析。当出现霍乱病例时，省疾病预防控制中心尽快收集菌株并完成 PFGE，并将图谱上传至 PulseNet China 中心数据库。不能进行 PFGE 的省份，可将菌株送至中国疾病预防控制中心传染病所完成。

### （四）耐药性分析

各省由地市级或省疾病预防控制中心对分离菌株的耐药性进行分析，每季度选择一定数量的代表性菌株进行药敏试验。药物种类建议包括：多西环素、诺氟沙星、环丙沙星、复方新诺明、丁胺卡那霉

素、氨苄西林、阿奇霉素、头孢曲松、氯霉素、呋喃妥因、庆大霉素、阿米卡星等 12 种抗生素，其中阿奇霉素的判断标准可参考葡萄球菌的药敏标准。应用 Kirby-Bauer 纸片法进行检测，依照现行《霍乱防治手册》关于菌株药物敏感试验方法操作，分析记录和报告在附表 7 中。省级疾病预防控制中心对耐药性检测结果通过霍乱监测专报系统或专用邮箱报告。

### （五）菌株的管理

霍乱弧菌菌株管理应依据《中华人民共和国传染病防治法》、《中国医学微生物菌种保藏管理办法》及《病原微生物实验室生物安全管理条例》的规定与要求进行保存、运送和管理。各级医疗机构实验室分离的霍乱菌株，应送交辖区疾病预防控制中心进行复核。各疾病预防控制中心实验室应设立霍乱菌株登记本，记录菌株的来源与去向（包括上送及销毁等）。所有分离的霍乱弧菌菌株应送省级疾病预防控制中心保存。

对以下菌株，各省疾病预防控制中心应把当年收集保存的上述菌株送国家疾控中心霍乱弧菌专业保藏中心：（1）以县（区、市）为单位的散发病例菌株；（2）暴发疫情中的代表性菌株及与疫情相关的来自食品和水中的菌株；（3）检索 PulseNet China 分子分型数据库，为新的 PFGE 型别的菌株；（4）死亡病例的菌株；（5）国家疾控中心其他要求上送的菌株，并提供菌株来源信息；（6）各监测点分离的致泻性弧菌及气单胞菌和类志贺邻单胞菌，按照生物安全要求上送至省疾病预防控制中心。省疾病预防控制中心收到菌株后，对菌株做进一步复核鉴定，并按照生物安全要求，集中送至中国疾病预防控制中心传染病所。

### （六）菌株的信息报送

各省疾病预防控制中心实验室对所有分离菌株的鉴定分析数据，应在获得确认结果后立即通过霍乱专报系统报送或专用邮箱报送，



PFGE 分析结果立即通过 PulseNet China 信息网络输入数据库。次年 1 月底前报送“菌株实验室检测结果登记/汇总表”(见附表 4),并通过霍乱监测专报系统或专用邮箱报送。

## **七、监测系统的组成与职责**

监测系统由卫生部、省以下(含省)各级卫生行政部门、中国疾病预防控制中心、省以下(含省)各级疾病预防控制中心、医疗机构组成。

### **(一) 卫生部和省以下(含省)各级卫生行政部门**

卫生部领导全国霍乱监测工作,省以下(含省)各级卫生行政部门负责组织开展本辖区内霍乱监测工作,并提供所需监测经费,保证监测工作的顺利开展。

### **(二) 中国疾病预防控制中心**

1. 组织全国监测方案的起草、论证、修改、调整和完善,为全国霍乱监测提供技术指导。

2. 组织、确定全国监测点的布局,与国家级监测点所在省级疾病预防控制中心签订协议,明确具体任务和目标,为国家级监测点提供一定数额的监测经费补助。

3. 组织确定监测网络监测和检测方法的统一,组织对省级疾病预防控制中心和国家级监测点的专业技术人员培训。

4. 设计监测数据的收集流程、方式,负责全国监测数据的收集、整理,定期对监测系统的全部数据进行分析、反馈。每年对全国霍乱监测系统的工作进行年度总结。

5. 组织专家定期对全国霍乱监测系统进行检查、考核。

6. 每年组织召开全国霍乱监测工作年度总结研讨会。

### **(三) 省级疾病预防控制中心**

1. 根据国家监测方案,结合本省实际情况制定本省监测实施方案;协助国家疾病预防控制中心确定本省国家级监测点,建立和完善

本省的监测网络。

2. 负责本省监测专业技术人员培训工作。

3. 承担本省国家级监测点的管理和业务指导工作，参与国家疾病预防控制中心对国家级监测点监测工作的检查、考核。

4. 与本省国家级及省级监测点疾病预防控制机构签订协议，明确具体任务和目标，按其完成情况确定监测经费补助数额。

5. 完成国家监测方案中要求的菌株的收集与复核、病原学检测等监测任务。

6. 对全省监测资料进行收集、汇总和分析，按方案要求的时限上报中国疾病预防控制中心，并进行反馈。

7. 对监测点的监测工作进行质量控制。

#### **（四）地市级疾病预防控制中心**

根据国家监测方案的要求，协助省疾病预防控制中心完成本辖区监测点的监测任务和管理；负责辖区内县（区、市）级疾病预防控制中心及医院检验科相关人员的技术培训和指导；参与本辖区监测点的监测工作。

#### **（五）县级疾病预防控制中心**

按本监测方案要求，具体实施监测工作。完成疫情的监测与报告、外环境监测、个案调查、病原学监测、暴发疫情调查与监测等任务的基础资料收集工作，按规定的时限上报至省（市）疾病预防控制中心。负责病例标本的采集、检测、上送。

#### **（六）医疗机构**

医疗机构处于发现霍乱病例的最前沿，负责完成门（急）诊和住院病例的腹泻病人的登记和标本采集、病原体的分离培养、疫情报告和腹泻病人检索情况统计报告等工作，协助疾病预防控制机构开展病例个案调查，配合疾病预防控制机构完成本方案所要求的其它监测工作等。

## **八、数据统计分析**

### **（一）统计指标**

1. 每周、月、年发病数（例）、死亡数（例）、带菌数、发病率（/10万）、病死率（%）和死亡率（/10万）。
2. 病人年龄、性别、职业、时间分布。
3. 暴发疫情的流行特征及危险因素。
4. 每月监测点腹泻病例中霍乱和其它致泻性弧菌的构成比。
5. 每月水系和水产品监测样品检出率
6. 分离菌株的型别、毒素基因检测、脉冲场凝胶电泳分型等
7. 菌株的耐药谱。

### **（二）数据的报告和反馈**

监测工作每月 15 日报告上一月份哨点监测结果，监测汇总数据及监测工作总结报告于下一年度 1 月底前上报至中国疾病预防控制中心。中国疾病预防控制中心每月向各地反馈监测结果，并负责完成年度全国监测总结报告。

## **九、质量控制**

### **（一）方案的起草和论证**

卫生部组织全国相关专家起草监测方案，并广泛论证。

### **（二）培训**

1. 法定传染病报告、突发公共卫生事件报告培训 相关工作人员按照规范的程序和要求时限对发现的霍乱病例进行法定传染病报告、突发公共卫生事件报告，完善相关信息的网上填报。

2. 加强监测培训 省、市、县（区、市）疾病预防控制中心组织培训辖区内加强监测点的工作人员，提高现场调查、数据分析利用、采样检验等能力，人员培训合格率要求达 100%。

### （三）考核和评估

#### 1. 实验室考核

中国疾病预防控制中心及省级疾病预防控制中心对监测地区的实验室进行每年一次的实验室能力考核。

#### 2. 监测质量评估

中国疾病预防控制中心及省级疾病预防控制中心每年组织对各监测哨点医院的工作进行质量评估，对检测试剂质量进行评价，并将结果反馈给各相关单位。

### （四）督导

中国疾病预防控制中心及省级疾病预防控制中心对加强监测地区的监测工作进行督导检查，及时发现问题，提出解决方案。

#### 附件：

1. 致泻性弧菌检测标准操作程序（SOP）
2. 全国霍乱监测点分布

#### 附表：

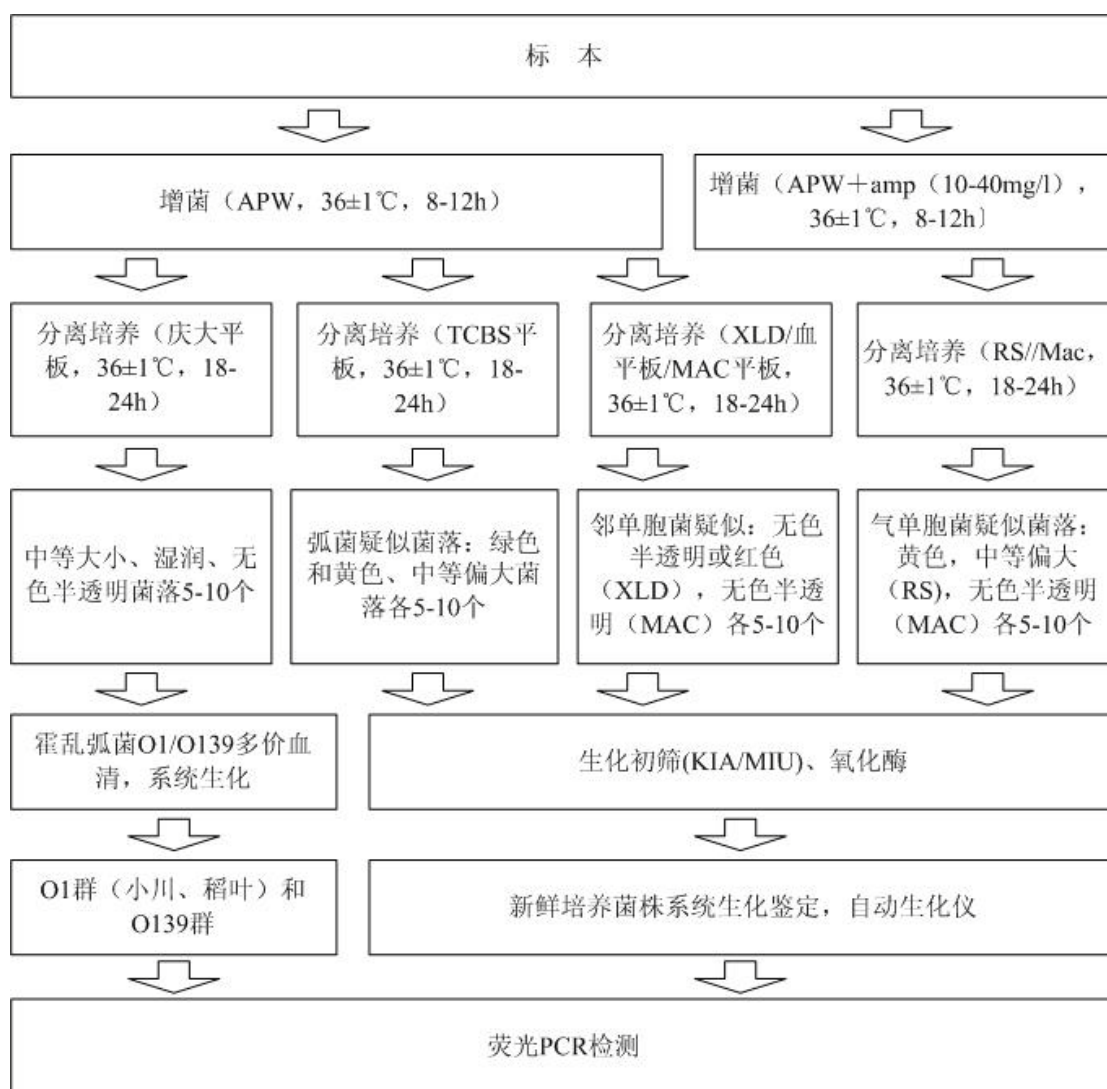
1. 霍乱病例个案调查信息一览表
2. 霍乱暴发调查关键信息汇总表
3. 腹泻病例采样登记表
4. 实验室检测结果登记/汇总表
5. 水产品监测结果登记表
6. 水系监测结果登记表
7. 菌株耐药性检测结果登记表

## 附件 1

### 致泻性弧菌检测标准操作程序 (SOP)

本监测方案中需检测的致泻性弧菌包括霍乱弧菌、副溶血弧菌、拟态弧菌、河弧菌，单胞菌属与邻单胞菌属包括气单胞菌和类志贺邻单胞菌。

#### (一) 标本检测流程图



#### (二) 检测程序

##### 1 标本的处理

在装有标本的 Carry-Blair 培养基中，沾取一棉签标本，分别放入碱性蛋白胨水 (APW) 和含有氨苄霉素 (amp, 终浓度 10~40mg/L) 的 APW 中，37℃ 增菌培养 8~12 小时。

##### 2 分离培养

增菌培养后的菌液中，选择生长最茂盛的培养基表面或菌膜下表层，取一接

种环，APW 增菌液分别划线接种 TCBS、庆大琼脂和麦康凯（Mac）平板，含有氨苄霉素的 APW 增菌液划线接种 Mac 平板。37℃培养 12~18 小时后，从庆大琼脂上选择单菌落做霍乱弧菌血清凝集实验；从 TCBS 琼脂上选择单菌落，做其他弧菌的进一步鉴定实验；从 Mac 平板上选择单菌落做气单胞菌和类志贺邻单胞菌的进一步鉴定实验。

### 3 生化检测

从 TCBS 和麦康凯平板上挑取菌株先进行生化初筛（KIA/MIU）、粘丝实验和氧化酶实验鉴定，有条件者进行 API20NE 系统和自动生化仪鉴定，可参考使用操作说明。粘丝实验和氧化酶实验阳性者初步鉴定为弧菌。

### 4 血清学鉴定

主要针对霍乱弧菌，从庆大琼脂平板直接挑取 5~10 个湿润、无色透明或菌落中心带有灰黑点的可疑菌落，与 O1 群和 O139 群霍乱弧菌多价诊断血清作玻片凝集试验，如很快出现肉眼可见的明显凝集颗粒者即为阳性反应。同时用生理盐水作对照试验，以排除因自身凝集而导致的假阳性反应。与 O1 群诊断血清凝集者，随后用小川和稻叶单价血清分型。与 O1 群不凝集者再继续用 O139 群诊断血清作玻片凝集。

### 5 荧光 PCR 检测

#### 5.1 霍乱弧菌

##### 5.1.1 O1 和 O139 双重实时 PCR 检测

O1 和 O139 群霍乱弧菌双重 TaqMan 实时 PCR 的反应体系和反应条件为：采用 20 μL 反应体系，每个反应中含 10 μL 通用 PCR 反应混合物，O1 *rfb* 基因上下游引物（10 μmol/L）各 0.4 μL，探针（10 μmol/L）0.4 μL；O139 *rfb* 基因上下游引物（10 μmol/L）各 0.4 μL，探针（10 μmol/L）0.4 μL，去离子水 5.6 μL，DNA 模板 2 μL。O1 和 O139 双重实时 PCR 引物和探针序列见下表。循环条件为：95℃ 30s，95℃ 5s 和 60℃ 20s，循环 40 次，在退火阶段检测荧光。

**O1 和 O139 双重实时 PCR 引物和探针序列**

基因名称	核苷酸序列（5'~3'）	产物长度（bp）
O1 F	GGAATAACTCAAGGCGATGAAGTG	117
O1 R	TAGAGACTCACCTTCGATTTTCAGC	
O1 P	FAM- AAACGGGTAACGCACCACACTGGACT -BHQ1	
O139 F	CGATGGCGTGTTTCATTAGAAGG	104
O139R	TCCCTTTCCACCTCGGTATTTTC	
O139 P	HEX- CGGCAAACACTGGCAGCAAACACTCAGCA -BHQ1	

##### 5.1.2 霍乱弧菌毒素基因（ctx）检测

*ctx* TaqMan 实时 PCR 反应条件为: 采用 20  $\mu$ L 反应体系, 每个反应中含 10  $\mu$ L 通用 PCR 反应混合物, 上下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 0.4  $\mu$ L, 探针 (10  $\mu$ mol/L) 0.4  $\mu$ L, 去离子水 6.8  $\mu$ L, DNA 模板 2  $\mu$ L。ctx 引物和探针的序列见下表。循环条件为: 95 $^{\circ}$ C 30s, 95 $^{\circ}$ C 5s 和 60 $^{\circ}$ C 20s, 循环 40 次, 在退火阶段检测荧光。

**ctx 引物和探针的序列**

基因名称	核苷酸序列 (5'~3')	产物长度 (bp)
CT1 F	CTTCCCTCCAAGCTCTATGCTC	114
CT1 R	TACATCGTAATAGGGGCTACAGAG	
CT1 P	FAM-ACCTGCCAATCCATAACCATCTGCTGCTG-BHQ1	

## 5.2 其它弧菌和嗜水气单胞菌 TaqMan 实时 PCR 检测

TaqMan 实时 PCR 反应条件为: 实时 PCR 采用 20  $\mu$ L 反应体系, 每个反应中含 10  $\mu$ L 通用 PCR 反应混合物, 上下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 0.4  $\mu$ L, 探针 (10  $\mu$ mol/L) 0.2  $\mu$ L, 去离子水 7.0  $\mu$ L, DNA 模板 2  $\mu$ L。TaqMan 实时 PCR 引物和探针序列见下表。循环条件为: 95 $^{\circ}$ C 30s, 95 $^{\circ}$ C 5s 和 60 $^{\circ}$ C 20s, 循环 40 次, 在退火阶段检测荧光。

**TaqMan 实时 PCR 引物和探针序列**

细菌名称	基因名称	核苷酸序列 (5'~3')	产物长度 (bp)
副溶血弧菌	ToxR F	CTGGTTGCCTTCTATTGAGCAG	147
	ToxR R	TTTCATACGAGTGGTTGCTGTC	
	ToxR P	FAM-CGCTACGTTAAGCACCATGCAGAAGACTC-BHQ1	
拟态弧菌	vmh F	GGTATGTGTTAAGGCGTAGTTCTG	106
	vmh R	GGTTCAAATCATCGAGCAAACCC	
	vmh P	HEX-CTTCTCGTGGGTTACCGTCGTCATCCTT-BHQ1	
河弧菌	toxR F	GACGCTTGGCAGTGTTCAAC	113
	toxR R	GTGCATTCCACCATATTTTCTTACG	
	toxR P	(FAM)TGTCAGCACGCCAATCAATCACCCG(Eclipse)	
创伤弧菌	VVH F	GATGTTTATGGTGAGAACGGTGAC	101
	VVH R	TCTTTATCTAGGCCCCAAACTTGG	
	VVH P	FAM-CTGCCGTGACAGCTCCAGCCGTAA-BHQ1	
溶藻弧菌	COL F	GTGGCTTACACGTTGGAATGATC	142
	COL R	TTTGGCAAGGTCTGTTTGGTTAC	
	COL P	HEX-CACAAATTGCTCGTTCCACTGCCACC-BHQ1	
嗜水气单胞	ahaF	GCCGTCGAAACCAACGTAGA	100
	ahaR	CAACACCTGGTCCGGTATCG	
	ahaP	FAM-CAGCAGAAACTTGCCACTCGGTCTTG-BHQ1	

### 5.3 邻单胞菌 SYBR Green I PCR 检测

SYBR Green I PCR 反应条件为：采用 20  $\mu\text{L}$  反应体系，每个反应中含 10  $\mu\text{L}$  通用 PCR 反应混合物，上下游引物（10  $\mu\text{mol/L}$ ）各 0.5  $\mu\text{L}$ ，去离子水 7.0  $\mu\text{L}$ ，DNA 模板 2  $\mu\text{L}$ 。SYBR Green I PCR 引物和探针序列见下表。循环条件为：95 $^{\circ}\text{C}$  30s，95 $^{\circ}\text{C}$  5s 和 60 $^{\circ}\text{C}$  20s，循环 40 次，在退火阶段检测荧光。

**SYBR Green I PCR 引物和探针序列**

基因名称	引物 (5'~3')	产物长度 (bp)
PS23FW3	CTCCGAATACCGTAGAGTGCTATCC	284
PS23RV3	CTCCCCTAGCCCAATAACACCTAAA	

### 6 脉冲场凝胶电泳 (PFGE)

按照 PulseNet China 中的 PFGE 标准实验方案操作。

### 7 菌株的保存和上送：

室温保存密封处理的半固体培养基保菌菌种至少 2 套（穿刺接种后 36 $^{\circ}\text{C}$  培养过夜即可）或 30% 甘油肉汤冻存管 -70 $^{\circ}\text{C}$  保存菌株至少 2 套。按照方案要求定期上送。



## 附件 2

## 全国霍乱监测点分布

监测省	监测地区	监测点	工作内容
辽宁	丹东市	丹东东港市	边境霍乱哨点监测
	丹东市	丹东振兴区	边境霍乱哨点监测
	盘锦市	盘锦市	致泻性弧菌哨点监测
	丹东市	丹东市	水系监测
北京	丰台区	丰台区	水产品监测
	海淀区	海淀区	水产品监测
河北	唐山市	唐山市丰南区	致泻性弧菌哨点监测
山东	烟台市	烟台市莱州市	致泻性弧菌哨点监测
江苏	南通市	南通市	致泻性弧菌哨点监测
	海安县	海安县	水产品监测
	赣榆县	赣榆县	水产品监测
上海	虹口区	虹口区	水产品监测
	奉贤区	奉贤区	致泻性弧菌哨点监测
浙江	宁波市	宁波市慈溪市	致泻性弧菌哨点监测
	台州市	台州市温岭市	水产品监测
	绍兴市	绍兴市上虞县	水产品监测
福建	龙海市	龙海市	水产品监测
	福鼎市	福鼎市	水产品监测
广东	广州市越秀区	广州市越秀区	致泻性弧菌哨点监测
	广州市越秀区	广州市越秀区	水产品监测
	湛江市	湛江市霞山区	水产品监测
广西	凭祥市	凭祥市	边境霍乱哨点监测
	东兴市	东兴市	边境霍乱哨点监测
	北海市	北海市	致泻性弧菌哨点监测
	东兴市	东兴市	水系监测
海南	海口市	海口市	致泻性弧菌哨点监测
	三亚市	三亚市	水产品监测
	儋州市	儋州市	水产品监测
安徽	蚌埠市	蚌埠市龙子湖区	水产品监测
	淮北市	淮北市濉溪县	水产品监测
江西	南昌市	南昌市东湖区	水产品监测

监测省	监测地区	监测点	工作内容
	新余市	新余市	水产品监测
湖北	武汉市	武汉市	水产品监测
	咸宁市	咸宁市	水产品监测
湖南	常德市	常德市	水产品监测
	衡阳市	衡阳市	水产品监测
四川	成都市	成都市双流区	水产品监测
	绵阳市	绵阳涪城区	水产品监测
重庆	渝中区	渝中区	水产品监测
	璧山县	璧山县	水产品监测
贵州	贵阳市	贵阳市	水产品监测
	遵义市	遵义市	水产品监测
云南	德宏州	德宏州芒市	边境霍乱哨点监测
	临沧市	临沧市耿马县	边境霍乱哨点监测
	临沧市	德宏州芒市	水系监测
新疆	伊犁自治州	伊犁霍城市	边境霍乱哨点监测
	喀什地区	喀什地区塔什库尔干	边境霍乱哨点监测



附表 2

霍乱暴发调查关键信息汇总表

调查内容	结果	调查内容	结果
起止时间		报告日期	
核实诊断日期		发生地区	
居住地		聚餐地点	
农村	是 否	餐馆	是 否
城乡结合部	是 否	家庭、社区	是 否
城区	是 否	集体食堂	是 否
波及人数		其它	是 否
病例总数		可疑感染来源	
临床诊断病例数		甲鱼	是 否
确诊病例小计		牛蛙	是 否
小川型		贝类	是 否
稻叶型		其他鱼类	是 否
彦岛型		卤肉制品	是 否
O139 群		蔬菜类	是 否
带菌者小计		不洁饮用水	是 否
小川型		密切接触	是 否
稻叶型		可疑食物来源地或生产地	
彦岛型		可疑食物污染环节	
O139 群		生产/饲养	是 否
住院隔离治疗人数		加工环节	是 否
医学观察人数		销售环节	是 否
带菌者服药人数		水源污染原因	
聚餐规模		暴雨、台风	是 否
≤10 人	是 否	厕所渗透	是 否
11-20 人	是 否	自来水管破裂	是 否
≥21 人	是 否	水源未消毒	是 否

填表人：\_\_\_\_\_ 填表单位：\_\_\_\_\_ 填表日期：\_\_\_\_\_











