

斐济人类粪便标本中弯曲菌检测

Aruna Devi^a, Jenny Wilkinson^a, Timothy Mahony^b和Thiru Vanniasinkam^a

通讯作者: Thiru Vanniasinkam (e-mail: tvanniasinkam@csu.edu.au)。

背景: 发达国家的弯曲菌研究数据较为健全, 但发展中国家少有弯曲菌的相关研究。本研究对斐济两个主要病原实验室进行人类粪便标本弯曲菌检测。

方法: 2012年12月至2013年2月以及2013年6至7月, 在位于斐济中部的苏瓦和西部的劳托卡的2个主要医院病原实验室共收集408份腹泻粪便标本。采用PCR法检测标本中是否有弯曲菌。

结果: 经PCR检测, 241份(59.1%)标本中含有弯曲菌, 21.6%的弯曲菌阳性腹泻病例为5岁以下儿童。

讨论: 斐济2个主要实验室的腹泻标本中, 59.1%检出弯曲菌。其他国家曾经报道过5岁以下儿童占弯曲菌阳性腹泻病例的比例较高, 这可能与家长更愿意带孩子就医有关。应开展进一步研究, 确定导致斐济腹泻病流行的弯曲菌优势菌种。

弯曲菌(*Campylobacter* spp.)在发达国家和发展中国家均为腹泻病致病菌, 并且在家禽、牛、猪、羊、鸵鸟、贝类等可作为食物的动物中和猫、狗等宠物中普遍存在^[1]。弯曲菌感染病例的临床症状与其他肠道感染类似, 尽管通常具有自限性, 但一些重症病例的病程可能会持续5至7天^[2]。

由于尚未建立弯曲菌感染监测项目, 许多发展中国家缺少弯曲菌的研究数据。有报告称, 发展中国家的弯曲菌感染多发生在5岁以下儿童中, 且常被认为是儿科疾病^[3]。基于目前的研究结果, 发达国家和发展中国家一般人群的弯曲菌感染率约为90/10万^[3]。

腹泻病在斐济属于法定报告传染病。2011年斐济卫生部共接到22 753例腹泻病病例报告, 其中281例为出血性腹泻病病例^[4]。404例归为沙门菌感染导致的肠热病, 其余病例未报告病原信息。有研究表明发展中国家的胃肠道疾病广泛流行^[5]。太平洋地区各国的公共卫生系统千差万别, 许多国家地理位置偏僻且经济资源有限^[6], 因此, 一些传染病包括食源性疾病既未纳入法定报告传染病, 也未开展实验室监测。斐济的多数病原实验室对所采集的粪便标本仅开展常规的寄生虫、病毒和细菌(例如沙门菌和志贺菌, 但不包括弯曲菌)检测。

本研究用PCR法对斐济两个主要病原实验室的人类粪便标本进行弯曲菌(*Campylobacter*)检测。

材料与方法

本研究通过查尔斯特大学人类伦理委员会和斐济卫生部国家研究伦理委员会的审批。

标本采集

2012年12月中旬至2013年2月底以及2013年6至7月, 在位于斐济中部的苏瓦和西部的劳托卡的2个主要医院病原实验室共收集408份腹泻病粪便标本, 其中208份来自苏瓦, 200份来自劳托卡。年龄和性别信息从实验室粪便标本登记中手工抄录; 因受时间和访问限制, 未能获取到所有标本的相关信息。

标本采集后放入无菌容器, 置于冰中被运送至斐济国立大学的实验室进行PCR检测。2个医院实验室在完成常规微生物检测后即将标本提供给本研究使用, 收到标本后, 苏瓦医院实验室在4–6小时内、劳托卡医院实验室在8–10小时内将其送至斐济国立大学。

DNA提取

用Norgen粪便DNA试剂盒(加拿大Norgen Biotek公司)自粪便标本中提取总DNA。取200 μ l粪便标本置于2ml的Eppendorf管中, 70 $^{\circ}$ C加热10分钟。按照产品说明书进行DNA提取。DNA的最终洗脱体积为100 μ l。提取后的DNA在–20 $^{\circ}$ C冰箱保存待检。

^a 查尔斯特大学, 澳大利亚新南威尔士。

^b 昆士兰大学, 澳大利亚布里斯班。

投稿日期: 2014年5月2日; 发表日期: 2014年12月19日

doi: 10.5365/wpsar.2014.5.2.007

表1. 弯曲菌阳性标本相应病例的年龄和性别分布(n=199份*)

年龄组(岁)	检测标本数	合计		男		女	
		阳性数	阳性比例(%)	阳性数	阳性比例(%)	阳性数	阳性比例(%)
0-4	45	43	21.6	30	27.3	13	14.6
5-14	19	16	8.0	8	7.3	8	9.0
15-24	33	29	14.6	13	11.8	16	18.0
25-34	36	31	15.6	17	15.5	14	15.7
35-44	29	21	10.6	15	13.6	6	6.7
45-54	27	22	11.1	8	7.3	14	15.7
55-64	24	22	11.1	14	12.7	8	9.0
65-74	14	14	7.0	5	4.5	9	10.1
75岁及以上	2	1	0.5	0	0.0	1	1.1
合计		199	100.0	110	55.3	89	44.7

* 42个阳性标本的病例年龄和性别信息不详。

PCR检测弯曲菌

用既往研究所用引物16SrRNA特异基因片段C412F, 5'-GGATACACTTTTCGGAGC-3'和C1288R, 5'-CATTGTAGCACGTGTGTC-3'进行PCR扩增^[7]。每个PCR反应管(25 μ l)加入作为PCR反应缓冲液的GoTaq® Green Master Mix(美国Promega公司, 含有400 μ M dATP, 400 μ M dGTP, 400 μ M dCTP, 3mM MgCl₂)和每种引物各50 μ M。模板DNA(1 μ l)在PCR扩增仪(Eppendorf)上扩增35个循环, 扩增条件为: 94°C变性5分钟, 58°C退火30秒, 72°C延伸1分钟, 最后在72°C延伸5分钟^[7]。PCR扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳、溴乙锭染色后在紫外灯下进行观察。所有PCR试验均使用空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*) NCTC 11351作为阳性对照, 并设阴性对照。剔除阴性对照结果为阳性的试验结果。未对弯曲菌阳性标本做进一步的菌种鉴定。

结果

经PCR检测, 408份粪便标本(苏瓦标本208份、劳托卡标本200份)中的241份(59.1%)为弯曲菌阳性。苏瓦标本的阳性率($n=141$ 份; 67.8%)显著高于劳托卡($n=100$ 份; 50%; $P<0.008$)。

229个标本有年龄信息, 236个标本有性别信息(男性132人, 女性104人)。苏瓦和劳托卡病例的性别和年龄分布没有显著差异(P 值分别为0.982和0.357)。尽管男性病例标本中弯曲菌检出率较女性病例高(男性为55.3%, 女性为44.7%), 但二者的差异无统计学意义($P=0.125$)。0-4岁组病例标本的弯曲菌检出率最高(21.6%), 其次为15-34岁组(15%) (表1)。

讨论

本文报告了自2012年12月中旬到2013年2月以及2013年6-7月采集的斐济腹泻病例粪便标本中检出弯曲菌的研究结果。本研究中, 多数(59%)腹泻病例的临床粪便标本可检出弯曲菌。这一研究结果与在泰国的美国军事人员培训中的研究结果相似^[8]。

本研究中弯曲菌PCR确诊病例的年龄分布与其他发展中国家所开展的研究结果相似, 5岁以下儿童在病例中占较高比例^[5]。马拉维的一项研究发现, 21%的5岁以下腹泻病例为弯曲菌感染, 14%的无症状儿童可检出弯曲菌^[9]。儿童出现腹泻症状后, 家长更愿意带孩子就医, 因此, 儿童腹泻病例的粪便标本经常会被送至病原实验室进行检测。

斐济弯曲菌的感染来源尚不清楚。已发现低水平的食物处理技术和食品卫生为腹泻病的原因, 流行病学调查也发现饮用生牛奶^[9]和食用未煮熟或受污染的禽肉^[10]可导致弯曲菌感染。这可能都是斐济腹泻病流行的危险因素。

弯曲菌感染的确诊通常采用细菌培养的方法, 有时采用PCR法^[10]。PCR法的优点在于可以在临床标本中检测已死的弯曲菌, 这对在恶劣条件下储存的标本的检测来说很重要。目前, 斐济的病原实验室并未将弯曲菌检测作为腹泻标本的常规检测内容。就本文作者所知, 本研究是斐济第一个在腹泻标本中调查弯曲菌流行率的研究。

本研究发现斐济腹泻病例中弯曲菌流行率较高, 这一结果需要靠进一步的调查研究去证实。未来的研究应纳入健康人群, 以确定斐济一般人群的弯曲菌携

带率。对一般人群所携带的弯曲菌菌种的鉴定也很有必要。此外，确认弯曲菌阳性的腹泻病例标本中是否存在其他病原也很有价值。本研究未对弯曲菌和沙门菌或其他病原共同感染的情况做研究。

总之，本研究结果表明，弯曲菌感染在斐济较为普遍，这与其他发展中国家和发达国家的情况相似。

基金

本研究由澳大利亚查尔斯特大学COMPACT奖学金以及斐济国立大学医学、护理和卫生科学学院Aruna Devi博士生项目提供经费资助。

利益冲突

未申报。

致谢

感谢斐济卫生部批准本研究，感谢斐济国立大学医学院提供实验室设施，感谢苏瓦和劳托卡的病原实验室微生物部提供标本。

引用本文地址：

Devi A et al. Detection of *Campylobacter* in human faecal samples in Fiji. *Western Pacific Surveillance and Response Journal*, 2014, 5(4):30–33. doi:10.5365/wpsar.2014.5.2.007

参考文献：

1. Strachan NJC, Forbes KJ. The growing UK epidemic of human campylobacteriosis. *Lancet*, 2010, 376:665–667. doi:10.1016/S0140-6736(10)60708-8 pmid:20663545
2. Islam Z et al. Comparative population structure analysis of *Campylobacter jejuni* from human and poultry origin in Bangladesh. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2014, 33:2173–2181. doi:10.1007/s10096-014-2184-x pmid:24962195
3. Randremanana RV et al. *Campylobacter* infection in a cohort of rural children in Moramanga, Madagascar. *BMC Infectious Diseases*, 2014, 14:372. doi:10.1186/1471-2334-14-372 pmid:24996559
4. *Ministry of Health Annual Report 2011*. Suva, Ministry of Health, 2011 (<http://health.gov.fj>, accessed 3 December 2014).
5. Mshana SEJM et al. *Campylobacter* spp among children with acute diarrhea attending Mulago hospital in Kampala–Uganda. *African Health Sciences*, 2009, 9:201–205. pmid:20589152
6. Dunn JP et al. Laboratory-based *Salmonella* surveillance in Fiji, 2004–2005. *Pacific Health Dialog*, 2005, 12:53–59. pmid:18181494
7. Inglis GD, Kalischuk LD. Use of PCR for direct detection of *Campylobacter* species in bovine feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69:3435–3447. doi:10.1128/AEM.69.6.3435-3447.2003 pmid:12788747
8. Tribble DR et al. Diagnostic approach to acute diarrhoeal illness in a military population on training exercises in Thailand, a region of *campylobacter* hyperendemicity. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, 46:1418–1425. doi:10.1128/JCM.02168-07 pmid:18234869
9. Mason J et al. *Campylobacter* infection in children in Malawi is common and is frequently associated with enteric virus coinfections. *PLoS ONE*, 2013, 8:e59663. doi:10.1371/journal.pone.0059663 pmid:23555739
10. Newell DG et al. Food-borne diseases - the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 139 Suppl 1:S3–15. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.021 pmid:20153070