

沙门氏菌传统血清凝集分型和分子血清分型试剂盒方法比较

周燕霞, 任岩, 王青龙, 曹悦, 胡凤月, 张熙雅, 巩有博, 张跃川,
耿建强, 蔡雪凤*

(北京市食品安全监控和风险评估中心(北京市食品检验所), 国家食品质量安全检验监督中心, 北京 100094)

摘要: **目的** 验证沙门氏菌血清分型试剂盒的适用性, 考核本实验室传统沙门氏菌血清分型技术, 扩充沙门氏菌的分型方法, 寻找更有效、更快捷的沙门氏菌分型方法。**方法** 保存的样品菌株库中随意挑选 33 株沙门氏菌和 6 株标准菌株, 首先确证为沙门氏菌, 然后分别采用传统的玻片血清凝集方法和分子血清分型试剂盒对其进行分型, 最后采用 16S rRNA 系统发育树对试验菌株进行聚类分析。**结果** 2 种分型手段的匹配率高达 94.9%, 其中 YP 281 *Salmonella havana* 和 YP 639 *Salmonella liverpool* 没有匹配到, 这 2 株菌在试剂盒数据库中不存在, 但本实验利用传统血清分型手段可以对这 2 株菌进行准确分型, 其中 YP 281 是本实验室对 GB 4789.4-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》表 B.1 外成功分型的沙门氏菌。**结论** 本实验室传统血清凝集分型技术合格。沙门分子血清分型试剂盒具有较好的适用性, 能更快速、更方便对沙门氏菌进行分型。

关键词: 沙门氏菌; 血清分型; 传统玻片血清凝集分型; 沙门分子血清分型试剂盒

Comparison of traditional serum agglutination and molecular serum separation kit for *Salmonella*

ZHOU Yan-Xia, REN Yan, WANG Qing-Long, CAO Yue, HU Feng-Yue, ZHANG Xi-Ya,
GONG You-Bo, ZHANG Yue-Chuan, Geng Jian-Qiang, CAI Xue-Feng*

(Beijing Food Safety Monitoring and Risk Assessment Center (Beijing Food Inspection Institute),
National Food Quality and Safety Inspection and Supervision Center, Beijing 100094, China)

ABSTRACT: Objective To verify the applicability of *Salmonella* serotyping kit, examine the traditional *Salmonella* serotyping technology in our laboratory, expand the methods of *Salmonella* serotyping, and find more effective and faster methods of *Salmonella* serotyping. **Methods** Totally 33 strains of *Salmonella* and 6 standard strains were randomly selected from the sample library, which were first confirmed as *Salmonella*, and then classified by traditional slide serum agglutination method and molecular serotyping kit respectively. Finally, the 16S rRNA phylogenetic tree was used for cluster analysis of the test strains. **Results** The matching rate of the 2 types of methods was as high as 94.9%, and YP 281 *Salmonella Havana* and YP 639 *Salmonella Liverpool* did not match. A total of 2 strains did not exist in the kit database, but this experiment could use traditional serotyping methods to accurately classify these 2 strains. Among them, YP 281 was the *Salmonella* successfully classified by our laboratory outside table

*通讯作者: 蔡雪凤, 工程师, 主要研究方向为食品微生物学检测。E-mail: shengwushi2017@126.com

*Corresponding author: CAI Xue-Feng, Engineer, Beijing Food Safety Monitoring and Risk Assessment Center (Beijing Food Inspection Institute), No. 17, Fengde East Road, Yongfeng Industrial Base, Haidian District, Beijing 100094, China. E-mail: shengwushi2017@126.com

B.1 of GB 4789.4-2016 *National food safety standard-Food microbiological test-Salmonella test*. **Conclusion** The laboratory's traditional serum agglutination typing technology is qualified. The *Salmonella* molecular serotyping kit has good applicability and can be used to classify *Salmonella* more quickly and conveniently.

KEY WORDS: *Salmonella*; serotype; traditional slide serum agglutination; *Salmonella* molecular serum kit

1 引言

沙门氏菌(*Salmonella*)是一种常见的食源性致病菌,由其引起的食物中毒事件已位列世界首位,引起了各国的高度重视^[1]。1987年,Leon和Michel根据沙门氏菌基因的相似性,将沙门氏菌分为肠炎沙门氏菌种(*Salmonella enterica*, *S. enterica*)和邦戈尔沙门氏菌种(*Salmonella bongori*, *S. bongori*)2种,*S. enterica*基本包括了所有兽医和人类医学的2500多种血清型^[2]。目前在我国报道已有300多种血清型^[3-5]。沙门血清型的研究对流行病学具有重要的价值。

沙门的血清型由其自身存在的3种抗原决定的,分别是脂多糖组成的O抗原,主要分布在菌体;蛋白质组成的H抗原,主要分布在鞭毛或菌毛;和聚-N-乙酰-D-半乳糖胺糖醛酸组成的Vi抗原,主要分布在荚膜^[6-9]。通过这些抗原与特异性血清发生凝集反应来对沙门氏菌进行鉴定分型^[10]。

Kauffmann与White一直对沙门氏菌抗原与特异性血清反应进行研究,1934年国际微生物学会沙门菌小组成立并公布制定了考夫曼-怀特表(Kauffmann-White-scheme, K-W表)^[11]。此表中传统的玻片血清凝集分型方法是目前为止沙门分型主要手段,包括GB 4789.4-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》^[12]。

除此方法外,还有其他的沙门分型方法,其中分子PCR血清分型方法是目前的一种新型分型手段,其利用编码抗原的特异性基因靶点建立的一种分型方法。编码O抗原的基因主要是*rfb*的基因簇,编码2个H抗原的基因分别是*fliC*和*fliB*,其中*rfbX*所编码的氨基酸序列和*fliC*、*fliB*编码抗原中心区域在不同的沙门氏菌间存在很大差异^[13-15]。

某公司根据沙门氏菌种编码O、H1、H2抗原的*rfb*和*fliC*、*fliB*基因差异的特异性进行高通量筛选,选取12段具有代表性的基因,设计相关的引物探针,利用实时荧光PCR(real time PCR, RT-PCR)技术,研发出沙门血清分型试剂盒,此试剂盒可以在2h内对沙门氏菌进行分型。

本研究选用此试剂盒和传统的玻片血清凝集分型方法做比较。对沙门氏菌血清分型试剂盒的适用性进行验证和对本实验室传统沙门氏菌血清分型技术进行考核,扩充沙门氏菌的分型方法,寻找更有效、更快捷、更准确的沙门氏菌分型方法。为沙门分型寻找更便捷的方法提供实验依据。

2 材料与方法

2.1 菌株

本实验室在2008~2017年间按照GB 4789.4-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》方法从检验食品和比对样品中分离鉴定得到大量的样品菌株,从这些菌株中随意挑选沙门氏菌33株,并选取6株自美国模式培养物集存库(American type culture collection, ATCC)购买的沙门氏菌的标准菌株。菌株信息见表1,其中1~6号为标准菌株,7~32号为食品样品分离菌株,33~39号为比对样品分离菌株。

表1 菌株信息
Table 1 Strains information

序号	菌株编号	序号	菌株编号
1	BZ66(ATCC7001)	21	YP116
2	BZ68(ATCC13076)	22	YP140
3	BZ69(ATCC9270)	23	YP142
4	BZ90(ATCC13076)	24	YP164
5	BZ91(ATCC H9812)	25	YP199
6	BZ93(ATCC14028)	26	YP221
7	YP 281	27	YP222
8	YP017	28	YP279
9	YP038	29	YP283
10	YP044	30	YP311
11	YP045	31	YP312
12	YP047	32	YP313
13	YP048	33	YP498
14	YP052	34	YP637
15	YP078	35	YP638
16	YP081	36	YP639
17	YP082	37	YP640
18	YP083	38	YP681
19	YP084	39	YP682
20	YP090	-	-

2.2 主要试剂

血琼脂平板、三糖铁培养基(triple sugar iron agar, TSI)和赖氨酸脱羧酶培养基(北京陆桥技术有限公司);沙门分型血清(丹麦 SSI 公司);沙门分子血清试剂盒(北京某生物科技有限公司);核酸分离试剂盒、引物、探针(上海 Invitrogen 公司)。

2.3 主要仪器

VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定及药敏分析系统、VITEK Colorimeter 比浊仪(法国 Bio Merieux 公司);Veriti® Thermal Cycler PCR 仪、Quant Studio™ 7 Flex Real-Time PCR 仪(美国 ABI 公司);KB240 恒温培养箱(德国 Binder 公司)。

2.4 方法

2.4.1 菌株活化及生化试验

将分离保存-80℃的6株标准菌株和33株样品菌株于血琼脂平板划线,36℃培养18~24h。然后按照GB 4789.4-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》方法接种 TSI 琼脂和赖氨酸脱羧酶培养基^[12],同时接种血琼脂平板和营养琼脂斜面36℃培养24h。同时利用麦氏比浊仪调节菌浓度0.5~0.8 MCF 之间,进行 VITECK2 Compact 鉴定。

2.4.2 菌株确认

每个菌株挑取一个单菌落于装有200 μL 裂解液的1.5 mL 离心管中,100℃煮10 min,冷却后13300 r/min 离心5 min。吸取上清。按照SN/T1870-2016《食品中致病菌检测方法 实时 PCR 法》进行 RT-PCR 检测^[16]。

2.4.3 传统玻片血清凝集分型鉴定

将接种于血琼脂平板的沙门氏菌进行 O 抗原鉴定,并

同时接种 Swarm 琼脂平板36℃培养24h进行H1相抗原鉴定^[12],然后血清诱导进行H2相抗原鉴定,其中标准菌株按照盲样进行操作。整个操作过程符合标准 GB 4789.4-2016 操作规程。

2.4.4 试剂盒分子血清学分型鉴定

将500 μL 5% Chelex-100 树脂溶液于营养琼脂斜面,将斜面全部菌体制成菌悬液于1.5 mL 离心管,100℃煮10 min,冷却后10000 r/min 离心5 min,吸取上清。按照试剂盒说明书进行 RT-PCR 分型鉴定,并对所得结果进行搜索,选择对应菌株信息,其中标准菌株按照盲样进行操作。

2.4.5 分型沙门氏菌聚类分析

对所有菌株进行 DNA 提取,并进行16S rRNA 扩增,产物送生工生物公司测序,测序结果用 MEGA(molecular evolutionary genetics analysis) version 6^[17]进行 NJ(neighbor-joining)系统发育树构建,引导方法如下;利用1000次重复抽样来获得可靠分枝水平^[18]。外群菌株选用 BZ038(ATCC 17028)副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)。

3 结果与分析

3.1 生化鉴定及 SN/T 1870.2016 标准鉴定结果

TSI 和赖氨酸脱羧酶实验结果见图1和图2,按照国家标准4789.4-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》进行统计分析见表2结果显示全部为可疑沙门氏菌。VITECK2 Compact 鉴定均为 *Salmonella* group, 概率87%以上。经过 RT-PCR SN/T 1870.2016 标准鉴定结果均有明显的扩增曲线, Ct 值均小于35,属于沙门氏菌,结果见表3。

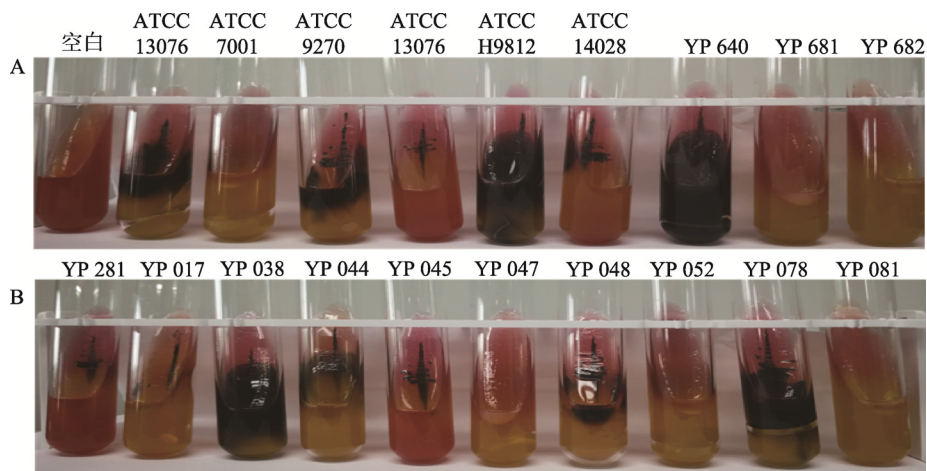
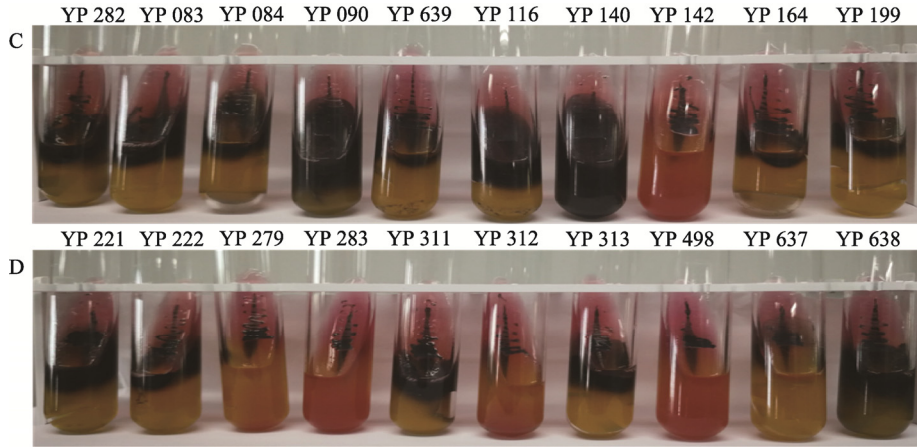


图1 菌株 TSI 试验结果

Fig.1 Results of TSI test of strains



续图 1 菌株 TSI 试验结果
Fig.1 Results of TSI test of strains

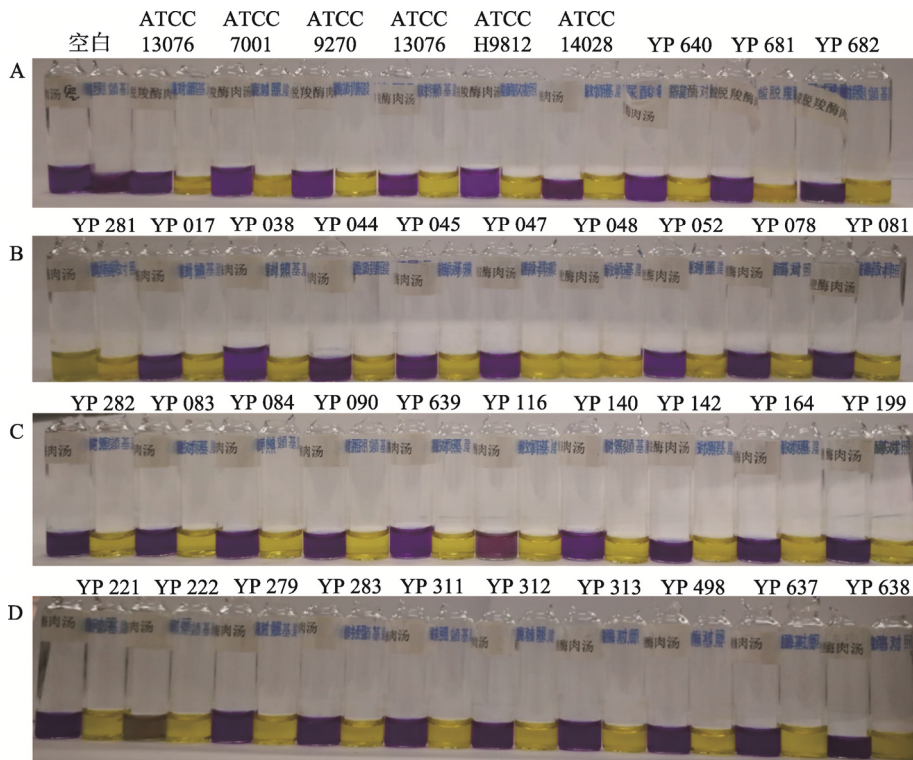


图 2 菌株赖氨酸脱羧酶试验结果
Fig.2 Results of lysine decarboxylase test of strains

表 2 菌株生化试验结果
Table 2 Results of biochemical test of strains

序号	编号	斜面	底层	产气	产硫化氢	赖氨酸脱羧酶	结果
1	BZ66(ATCC 7001)	K	A	+	-	+	可疑沙门氏菌属
2	BZ68(ATCC 13076)	K	A	+	+	+	可疑沙门氏菌属
3	BZ69(ATCC 9270)	K	A	+	+	+	可疑沙门氏菌属
4	BZ90(ATCC 13076)	K	A	-	+	+	可疑沙门氏菌属
5	BZ91(ATCC H9812)	K	A	+	+	+	可疑沙门氏菌属

续表 2

序号	编号	斜面	底层	产气	产硫化氢	赖氨酸脱羧酶	结果
6	BZ93(ATCC 14028)	K	A	+	+	+	可疑沙门氏菌属
7	YP017	K	A	+	+	+	可疑沙门氏菌属
8	YP038	K	A	+	+	+	可疑沙门氏菌属
9	YP044	K	A	+	+	+	可疑沙门氏菌属
10	YP045	K	A	-	+	+	可疑沙门氏菌属
11	YP047	K	A	+	-	+	可疑沙门氏菌属
12	YP048	K	A	+	+	+	可疑沙门氏菌属
13	YP052	K	A	-	-	+	可疑沙门氏菌属
14	YP078	K	A	+	+	+	可疑沙门氏菌属
15	YP081	K	A	-	-	+	可疑沙门氏菌属
16	YP082	K	A	+	+	+	可疑沙门氏菌属
17	YP083	K	A	+	+	+	可疑沙门氏菌属
18	YP084	K	A	+	+	-	可疑沙门氏菌属
19	YP090	K	A	+	+	+	可疑沙门氏菌属
20	YP116	K	A	+	+	+	可疑沙门氏菌属
21	YP140	K	A	+	+	+	可疑沙门氏菌属
22	YP142	K	A	-	+	+	可疑沙门氏菌属
23	YP164	K	A	+	+	+	可疑沙门氏菌属
24	YP199	K	A	+	+	+	可疑沙门氏菌属
25	YP221	K	A	+	+	+	可疑沙门氏菌属
26	YP222	K	A	+	+	+	可疑沙门氏菌属
27	YP279	K	A	+	+	+	可疑沙门氏菌属
28	YP281	K	A	-	+	-	可疑沙门氏菌属
29	YP283	K	A	-	+	+	可疑沙门氏菌属
30	YP311	K	A	+	+	+	可疑沙门氏菌属
31	YP312	K	A	-	+	+	可疑沙门氏菌属
32	YP313	K	A	+	+	+	可疑沙门氏菌属
33	YP498	K	A	-	+	+	可疑沙门氏菌属
34	YP637	K	A	+	+	+	可疑沙门氏菌属
35	YP638	K	A	+	+	+	可疑沙门氏菌属
36	YP639	K	A	+	+	+	可疑沙门氏菌属
37	YP640	K	A	+	+	+	可疑沙门氏菌属
38	YP681	K	A	+	-	+	可疑沙门氏菌属
39	YP682	K	A	-	-	+	可疑沙门氏菌属

注: K: 产碱; A: 产酸; +: 阳性; -: 阴性。

表 3 菌株 VITECK2 Compact 和 SN/T 1870.2016 行标鉴定结果
Table 3 VITECK2 Compact and SN/T 1870.2016 identification results of strains

序号	实验室编号	VITECK2 鉴定结果			SN/T 1870.2016 鉴定结果	
		鉴定结果	概率%	置信度	Ct 值	鉴定结果
1	BZ66(ATCC 7001)	<i>Salmonella</i> group	93	非常好的鉴定	18.2	<i>Salmonella</i>
2	BZ68(ATCC 13076)	<i>Salmonella</i> group	99	极好的鉴定	17.4	<i>Salmonella</i>
3	BZ69(ATCC 9270)	<i>Salmonella</i> group	98	极好的鉴定	18.2	<i>Salmonella</i>
4	BZ90(ATCC 13076)	<i>Salmonella</i> group	99	极好的鉴定	16.4	<i>Salmonella</i>
5	BZ91(ATCC H9812)	<i>Salmonella</i> group	98	极好的鉴定	15.8	<i>Salmonella</i>
6	BZ93(ATCC 14028)	<i>Salmonella</i> group	98	极好的鉴定	15.8	<i>Salmonella</i>
7	YP017	<i>Salmonella</i> group	98	极好的鉴定	15.5	<i>Salmonella</i>
8	YP038	<i>Salmonella</i> group	98	极好的鉴定	17.6	<i>Salmonella</i>
9	YP044	<i>Salmonella</i> group	87	可接受的鉴定	16.3	<i>Salmonella</i>
10	YP045	<i>Salmonella</i> group	98	极好的鉴定	16.6	<i>Salmonella</i>
11	YP047	<i>Salmonella</i> group	97	极好的鉴定	15.5	<i>Salmonella</i>
12	YP048	<i>Salmonella</i> group	94	非常好的鉴定	15.8	<i>Salmonella</i>
13	YP052	<i>Salmonella</i> group	97	极好的鉴定	15.2	<i>Salmonella</i>
14	YP078	<i>Salmonella</i> group	99	极好的鉴定	16.0	<i>Salmonella</i>
15	YP081	<i>Salmonella</i> group	95	非常好的鉴定	16.5	<i>Salmonella</i>
16	YP082	<i>Salmonella</i> group	98	极好的鉴定	16.1	<i>Salmonella</i>
17	YP083	<i>Salmonella</i> group	98	极好的鉴定	15.5	<i>Salmonella</i>
18	YP084	<i>Salmonella</i> group	98	极好的鉴定	15.2	<i>Salmonella</i>
19	YP090	<i>Salmonella</i> group	99	极好的鉴定	15.0	<i>Salmonella</i>
20	YP116	<i>Salmonella</i> group	95	非常好的鉴定	16.6	<i>Salmonella</i>
21	YP140	<i>Salmonella</i> group	98	极好的鉴定	15.2	<i>Salmonella</i>
22	YP142	<i>Salmonella</i> group	98	极好的鉴定	16.7	<i>Salmonella</i>
23	YP164	<i>Salmonella</i> group	99	极好的鉴定	16.6	<i>Salmonella</i>
24	YP199	<i>Salmonella</i> group	98	极好的鉴定	16.0	<i>Salmonella</i>
25	YP221	<i>Salmonella</i> group	98	极好的鉴定	16.8	<i>Salmonella</i>
26	YP222	<i>Salmonella</i> group	97	极好的鉴定	16.9	<i>Salmonella</i>
27	YP279	<i>Salmonella</i> group	99	极好的鉴定	16.4	<i>Salmonella</i>
28	YP281	<i>Salmonella</i> group	98	极好的鉴定	15.2	<i>Salmonella</i>
29	YP283	<i>Salmonella</i> group	99	极好的鉴定	15.9	<i>Salmonella</i>
30	YP311	<i>Salmonella</i> group	98	极好的鉴定	16.8	<i>Salmonella</i>
31	YP312	<i>Salmonella</i> group	98	极好的鉴定	16.4	<i>Salmonella</i>
32	YP313	<i>Salmonella</i> group	99	极好的鉴定	16.8	<i>Salmonella</i>
33	YP498	<i>Salmonella</i> group	96	极好的鉴定	16.0	<i>Salmonella</i>
34	YP637	<i>Salmonella</i> group	99	极好的鉴定	15.8	<i>Salmonella</i>
35	YP638	<i>Salmonella</i> group	95	非常好的鉴定	15.3	<i>Salmonella</i>
36	YP639	<i>Salmonella</i> group	98	极好的鉴定	16.9	<i>Salmonella</i>
37	YP640	<i>Salmonella</i> group	98	极好的鉴定	16.1	<i>Salmonella</i>
38	YP681	<i>Salmonella</i> group	96	极好的鉴定	19.2	<i>Salmonella</i>
39	YP682	<i>Salmonella</i> group	94	非常好的鉴定	17.7	<i>Salmonella</i>

3.2 传统玻片血清凝集分型与分子血清试剂盒分型结果

对以上确定为沙门氏菌的菌株经过传统玻片血清凝集分型鉴定,按照 GB4789.4-2016 表 B.1 常见沙门氏菌抗原表对照,对 33+6 株沙门氏菌进行统计分析,同时对分子血清试剂盒分型结果分析,统计结果见表 4。6 株标准菌株结果符合购买信息,传统的玻片血清凝集分型和分子血清分型试剂盒匹配率高达 94.9%(37/39),其中 YP 281 和 YP 639 2 株沙门氏菌没有匹配成功,其中传统血清学分型结果分别是 *S. havana* 和 *S. liverpool*, 试剂盒分型结果分别是 *S. mbandaka* 和 *S. livingstone*, 通过上海市疾病预防控制中心对这 2 株菌鉴定后,YP 281 和 YP 639 确实是 *S. havana* 和 *S. liverpool*, 证明传统血清分型结果正确, *S. Havana* 和 *S. Liverpool* 这 2 株菌不在试剂盒的血清库范围内,是因为试剂公司没有设计这 2 株菌的特异性引物和探针。并且 YP 281 是 GB4789.4-2016 表 B.1 外的沙门氏菌。

3.3 聚类分析结果

通过 16 S rRNA 进化树聚类分析来看,见图 3,不同颜色代表不同菌株,同一种菌株的不同样品号很好的聚类在一个群里,对沙门血清分型的结果的准确性进行了验证。其中实验室传统玻片凝集新分型出的 YP 281 *S. havana* 和 YP 639 *S. liverpool* 与 *S. agona* 亲缘关系更近。

3.4 分析

目前 2 种方法各有优势,传统的玻片血清凝集分型方法可以对更多的沙门氏菌进行分型,但其操作复杂,耗时 2~3 d,血清交叉凝集,血清价格昂贵,某些品牌的血清可

能有假阳性或弱阳性,需要有可鉴定 2500 多种沙门血清型丰富经验的人员;并且操作人员的主观判断会对实验结果产生很大的影响。因此快速精准的沙门分型方法成为目前检测方法的发展趋势。

Hoorfar 等^[19]利用 RT-PCR 可以对肠炎沙门氏菌进行分型鉴定, Alvarez 等^[20]利用多重 PCR 对临床来源的沙门氏菌进行鉴定,方婷子等^[21]建立的快速多重 PCR 沙门分型方法,可以对 21 种沙门氏菌进行分型。但是这些研究分型种类少,普通多重 PCR 需要在 PCR 扩增后进行琼脂糖凝胶电泳,同时扩增产物需要进行测序和序列比对得出结果,同样耗时比较长,灵敏度比较低。

本研究利用的沙门血清分型试剂盒目前避免了以上缺点,设计多重 PCR 的引物探针,利用 RT-PCR 技术,仅需懂分子生物学知识的人员耗时 2 h 即可完成,操作简单

快速,灵敏度高,目前其选取 *rfb* 和 *fliC*、*fliB* 中 12 段代表性的基因仅能对 64 种沙门氏菌进行分型,也就是其数据库包含了 64 种沙门血清型,见表 5,覆盖了广东省疾病预防控制中心检测结果前 19 种的 89.74%。虽说鉴定种类得到了提升,但其数据库数量于 2500 多种沙门血清型而言还是远远不够,不在数据库中的菌株在搜库过程可能出现假阳性,比如 YP 281 和 YP 639 并不在其数据库内,搜库出现错误,经过权威的上海市疾病预防控制中心鉴定后,证实传统血清学的分型结果正确。该公司分子血清分型试剂盒还在进一步扩充数据库,对于 2500 种血清的扩充工作具有严峻的挑战性,在数据扩充完整之前,为确保结果的准确性,试剂盒的可使用性,就需要确保试剂盒中设计的引物探针特异性更强,确保鉴定结果的菌株在试剂盒的数据库中。

表 4 沙门氏菌分型结果
Table 4 Typing results of *Salmonella*

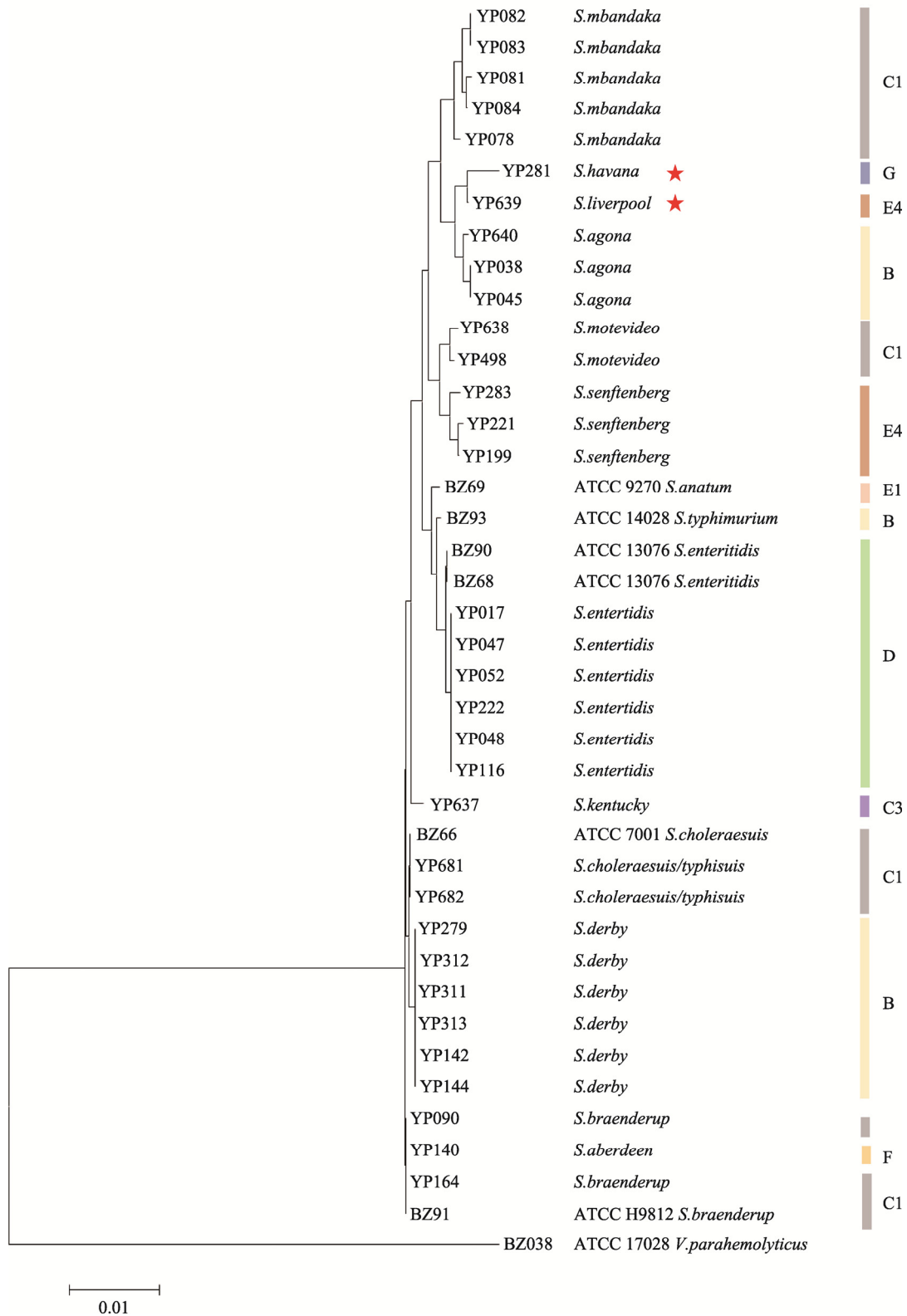
序号	菌株编号	丹麦 SSI 血清分型					血清学结果	试剂盒分型结果
		O 抗原	H 抗原		血清群			
			I 相	II 相				
1	BZ68	1,9,12	g,m	[1,7]	D	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. enteritidis</i>	
2	BZ66	6,7	c	1,5	C1	<i>S. choleraesuis</i>	<i>S. choleraesuis</i>	
3	BZ69	3, {10} {15} {15,34}	e,h	1,6	E1	<i>S. anatum</i>	<i>S. anatum</i>	
4	BZ90	1,9,12	g,m	[1,7]	D	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. enteritidis</i>	
5	BZ91	6,7,14	e,h	e,n,z15	C1	<i>S. braenderup</i>	<i>S. braenderup/Hvitvingfoss</i>	
6	BZ93	1,4, [5],12	i	1,2	B	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. typhimurium</i>	
7	YP017	1,9,12	g,m	[1,7]	D	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. enteritidis</i>	
8	YP038	1,4, [5],12	f,g,s	[1,2]	B	<i>S. agona</i>	<i>S. agona</i>	
9	YP044	1,4, [5],12	f,g	[1,2]	B	<i>S. derby</i>	<i>S. derby</i>	
10	YP045	1,4, [5],12	f,g,s	[1,2]	B	<i>S. agona</i>	<i>S. agona</i>	
11	YP047	1,9,12	g,m	[1,7]	D	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. enteritidis</i>	
12	YP048	1,9,12	g,m	[1,7]	D	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. enteritidis</i>	
13	YP052	1,9,12	g,m	[1,7]	D	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. enteritidis</i>	
14	YP078	6,7,14	z10	e,n,z15	C1	<i>S. mbandaka</i>	<i>S. mbandaka</i>	

续表 4

序号	菌株编号	丹麦 SSI 血清分型					试剂盒分型结果
		O 抗原	H 抗原		血清群	血清学结果	
			I相	II相			
15	YP081	6,7,14	z10	e,n,z15	C1	<i>S. mbandaka</i>	<i>S. mbandaka</i>
16	YP082	6,7,14	z10	e,n,z15	C1	<i>S. mbandaka</i>	<i>S. mbandaka</i>
17	YP083	6,7,14	z10	e,n,z15	C1	<i>S. mbandaka</i>	<i>S. mbandaka</i>
18	YP084	6,7,14	z10	e,n,z15	C1	<i>S. mbandaka</i>	<i>S. mbandaka</i>
19	YP090	6,7,14	e,h	e,n,z15	C1	<i>S. braenderup</i>	<i>S. braenderup/hvittingfoss</i>
20	YP116	1,9,12	g,m	[1,7]	D	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. enteritidis</i>
21	YP140	11	i	1,2	F	<i>Aberdeen</i>	<i>Aberdeen</i>
22	YP142	1,4, [5],12	f,g	[1,2]	B	<i>S. derby</i>	<i>S. derby</i>
23	YP164	6,7,14	e,h	e,n,z15	C1	<i>S. braenderup</i>	<i>S. braenderup/hvittingfoss</i>
24	YP199	1,3,19	g, [s],t	—	E4	<i>S. senftenberg</i>	<i>S. senftenberg</i>
25	YP221	1,3,19	g, [s],t	—	E4	<i>S. senftenberg</i>	<i>S. senftenberg</i>
26	YP222	1,9,12	g,m	[1,7]	D	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. enteritidis</i>
7	YP279	1,4, [5],12	f,g	[1,2]	B	<i>S. derby</i>	<i>S. derby</i>
28	YP281	1,13,23	f,g,[s]	-	G	<i>S. havana</i>	<i>S. mbandaka</i>
29	YP283	1,3,19	g, [s],t	—	E4	<i>S. senftenberg</i>	<i>S. senftenberg</i>
30	YP311	1,4, [5],12	f,g	[1,2]	B	<i>S. derby</i>	<i>S. derby</i>
31	YP312	1,4, [5],12	f,g	[1,2]	B	<i>S. derby</i>	<i>S. derby</i>
32	YP313	1,4, [5],12	f,g	[1,2]	B	<i>S. derby</i>	<i>S. derby</i>
33	YP498	6,7,14	g,m,[p],s	[1,2,7]	C1	<i>S. motevideo</i>	<i>S. montevideo</i>
34	YP637	8,20	i	z6	C3	<i>S. kentucky</i>	<i>S. kentucky</i>
35	YP638	6,7,14	g,m,[p],s	[1,2,7]	C1	<i>S. motevideo</i>	<i>S. montevideo</i>
36	YP639	1,3,19	z	e,n,z15	E4	<i>S. liverpool</i>	<i>S. livingstone</i>
37	YP640	1,4, [5],12	f,g,s	[1,2]	B	<i>S. agona</i>	<i>S. agona</i>
38	YP681	6,7	c	1,5	C1	<i>S. choleraesuis/Typhisuis</i>	<i>S. choleraesuis</i>
39	YP682	6,7	c	1,5	C1	<i>S. choleraesuis/Typhisuis</i>	<i>S. choleraesuis</i>

表 5 沙门分子血清分型试剂盒数据库
Table 5 *Salmonella* serotyping kit database

序号	血清型	序号	血清型	序号	血清型	序号	血清型
1	<i>Agona</i>	17	<i>Anatum</i>	33	<i>Tennessee</i>	49	<i>Wipula</i>
2	<i>Bovismorbificans</i>	18	<i>Javiana</i>	34	<i>Lexington</i>	50	<i>Liverpool</i>
3	<i>Derby</i>	19	<i>Paratyphi A</i>	35	<i>Virchow</i>	51	<i>Choleraesuis</i>
4	<i>Dublin</i>	20	<i>Kentucky</i>	36	<i>Bareilly</i>	52	<i>Abortusequi</i>
5	<i>Enteritidis</i>	21	<i>Blockley</i>	37	<i>Albany</i>	53	<i>Orion</i>
6	<i>Infantis</i>	22	<i>Senftenberg</i>	38	<i>Poona</i>	54	<i>Litchfield</i>
7	<i>Mbandaka</i>	23	<i>Uppsala</i>	39	<i>Altona</i>	55	<i>Goldcoast</i>
8	<i>Montevideo</i>	24	<i>Saintpaul</i>	40	<i>Heidelberg</i>	56	<i>Livingstone</i>
9	<i>Newport</i>	25	<i>Westhampton</i>	41	<i>Altendorf</i>	57	<i>Abaetetuba</i>
10	<i>Ohio</i>	26	<i>Give</i>	42	<i>Plymouth</i>	58	<i>Corvallis</i>
11	<i>Paratyphi B</i>	27	<i>Essen</i>	43	<i>Keurmassar</i>	59	<i>Singapore</i>
12	<i>Stanley</i>	28	<i>Muenster</i>	44	<i>Rissen</i>	60	<i>Arizona</i>
13	<i>Thompson</i>	29	<i>London</i>	45	<i>Hvittingfoss</i>	61	<i>Aberdeen</i>
14	<i>Typhi</i>	30	<i>Hadar</i>	46	<i>Eko</i>	62	<i>Wandsworth</i>
15	<i>Typhimurium</i>	31	<i>Braenderup</i>	47	<i>Colindale</i>	63	<i>Potsdam</i>
16	<i>Indiana</i>	32	<i>Meleagridis</i>	48	<i>Wellington</i>	64	<i>Paratyphi C</i>



注: 不同的颜色代表不同的血清群, 根据颜色断层将 6 株标准菌株和 33 株样品菌株聚类到 15 种菌; ★代表玻片凝集和分子血清分型试剂盒没有匹配成功的 2 株菌。

图 3 聚类分析

Fig.3 Cluster analysis

4 结 论

本研究对 6 株沙门氏菌标准菌株和 33 株沙门样品菌株进传统的玻片血清凝集分型和分子血清分型试剂盒比较, 2 种方法结果的匹配率高达 94.9%(37/39), 说明本实验室传统的沙门血清分型技术考核合格, 并且 YP 281 是本实验室对 GB 4789.4-2016 表 B.1 外成功分型的沙门氏菌, 提升了本实验室的检验能力和实验室质控水平。沙门分子血清分型试剂盒 2 h 完成对沙门氏菌的分型, 具有比较好的适用性, 能更快速、更方便对沙门氏菌进行分型。

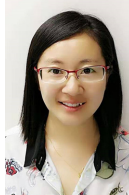
目前该公司分子血清分型试剂盒还在进一步扩充数据库, 分子 RT-PCR 沙门血清分型方法有望在沙门氏菌血清型鉴定中替代传统血清分型的方法。可以在沙门血清分型的技术上再创新高, 为沙门氏菌检测程序提供更好的检测依据, 提高检测效率。

参考文献

- [1] Allard M, Bell R, Ferreira CM, *et al.* Genomics of foodborne pathogens for microbial food safety [J]. *Curr Opin Biotech*, 2018, (49): 224–229.
- [2] 尹琬婷, 严志明. 食源性致病菌快速检测技术研究进展[J]. *食品安全导刊*, 2018, 215(24): 121.
Yin WT, Yan ZM. Research progress on rapid detection technology of foodborne pathogenic bacteria [J]. *China Food Saf Magaz*, 2018, 215(24): 121.
- [3] Hong Y, Duda KA, Cunneen MM, *et al.* The WbaK acetyltransferase of *Salmonella enterica* group E gives insights into O antigen evolution [J]. *Microbiol-Sgm*, 2013, 159(11): 2316–2322.
- [4] Hiriart Y, Serradell M, Martínez A, *et al.* Generation and selection of anti-flagellin monoclonal antibodies useful for serotyping *Salmonella enterica* [J]. *Springerplus*, 2013, 2(1): 640.
- [5] Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, *et al.* Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens [J]. *Emerg Infect Dis*, 2011, 17(1): 16–22.
- [6] Rietschel ET, Brade H, Holst O, *et al.* Pathology of septic shock [M]. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 1996.
- [7] Hölzer SU, Schlumberger MC, Jäckel D, *et al.* Effect of the o-antigen length of lipopolysaccharide on the functions of type iii secretion systems in *Salmonella enterica* [J]. *Infect Immun*, 2009, 77(12): 5458–5470.
- [8] Borah P, Porwollik S, Desai P, *et al.* A simplified multiplex PCR-based typing method for common *Salmonella enterica* serovars supported by online server-based detection system [J]. *Indian J Med Res*, 2017, 146(2): 272–280.
- [9] Chen J, Zhang L, Paoli GC, *et al.* A real-time PCR method for the detection of *Salmonella enterica* from food using a target sequence identified by comparative genomic analysis [J]. *Int J Food Microbiol*, 2010, 137(2): 168–174.
- [10] Ramachandran G, Tennant SM, Boyd MA, *et al.* Functional activity of antibodies directed towards flagellin proteins of non-typhoidal *Salmonella* [J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0151875.
- [11] Edwards PR, Kauffmann F. A simplification of the Kauffmann-White schema [J]. *Am J Clin Pathol*, 1952, 22(7): 692.
- [12] GB 4789.4-2016 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验[S].
GB 4789.4-2016 National food safety standards-Food microbiology test-*Salmonella* test [S].
- [13] Marolda CL. Wzx proteins involved in biosynthesis of O antigen function in association with the first sugar of the O-specific lipopolysaccharide subunit [J]. *Microbiology*, 2004, 150(12): 4095–4105.
- [14] Mcquiston JR, Parrenas R, Ortiz-Rivera M, *et al.* Sequencing and comparative analysis of flagellin genes *fliC*, *fliB*, and *flpA* from *Salmonella* [J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(5): 1923–1932.
- [15] Gogoi P, Borah, Probodh, *et al.* Efficacy of pulsed-field gel electrophoresis and repetitive element sequence-based PCR in typing of *Salmonella* isolates from Assam, India [J]. *J Clin Microbiol*, 2018, 56(5): 2043–2057.
- [16] SN/T 1870-2007 食品中致病菌检测方法 实时 PCR 法[S].
SN/T 1870-2007 Method for detecting pathogenic bacteria in food-real-time PCR [S].
- [17] Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. *Mol Biol Evol*, 2013, (197): 197.
- [18] Wei Z, Sun Z. Random local neighbor joining: A new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2008, 47(1): 117–128.
- [19] Hoorfar J, Ahrens P, Rådström P. Automated 5' nuclease PCR assay for identification of *Salmonella enterica* [J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(9): 3429–3435.
- [20] Alvarez J, Sota M, Ana-Belén V, *et al.* Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of *Salmonella* in human clinical samples [J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(4): 1734–1738.
- [21] 方婷子, 史贤明, 施春雷. 沙门氏菌血清型快速 PCR 鉴定方法的建立 [J]. *中国食品学报*, 2017, (2): 212–219.
Fang TZ, Shi XM, Shi CL. Establishment of rapid PCR identification method for *Salmonella* serotype [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2017, (2): 212–219.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



周燕霞, 硕士, 工程师, 主要研究方向为微生物学。

E-mail: zhouzhou0616@163.com



蔡雪凤, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品微生物学。

E-mail: shengwushi2017@126.com