

• 论 著 •

# 沙门菌核酸检测试剂盒评价

陈赛阁, 付盼, 何磊燕, 张蕾, 王爱敏, 李春玲, 王传清<sup>△</sup>

复旦大学附属儿科医院细菌室, 上海 201102

**摘要:**目的 评价某沙门菌核酸检测试剂盒的性能。方法 研究所需 196 例临床粪便标本来源于复旦大学附属儿科医院细菌室, 以细菌室培养结果为沙门菌检测阳性“金标准”, 将试剂盒检测结果与培养结果进行对比研究, 通过分析灵敏度、特异度、精密度、约登指数、Kappa 值、受试者工作特征曲线(ROC 曲线)的曲线下面积(AUC)及交叉反应和抗干扰能力评价沙门菌核酸检测试剂盒的性能。结果 该沙门菌核酸检测试剂盒诊断灵敏度为 89.33%, 诊断特异度为 95.04%, CV 值为 10.11%, 精密度良好, 约登指数为 84.37%, Kappa 值为 0.85, AUC 为 0.93。与细菌培养的结果对比显示, 此试剂盒检测结果与培养结果有极好的一致性。交叉反应结果显示此试剂盒不会与轮状病毒、诺如病毒发生交叉反应。抗干扰能力结果显示 Cary-Blair 氏运送培养基不会干扰该试剂盒的检测。结论 沙门菌核酸检测试剂盒对检测肠道沙门菌感染有较高的病原学检测价值, 其操作简便, 可作为肠道沙门菌感染快速检测以及流行病学调查方法学补充。

**关键词:**沙门菌; 核酸检测; 方法学

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.04.022

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2021)04-0481-04

文献标志码:A

## Evaluation of Salmonella nucleic acid detection kit

CHEN Saige, FU Pan, HE Leiyan, ZHANG Lei, WANG Aimin, LI Chunling, WANG Chuanqing<sup>△</sup>

Department of Bacteria, Affiliated Children's Hospital of Fudan University, Shanghai, 201102, China

**Abstract:** **Objective** To evaluate the performance of the Salmonella nucleic acid detection kit. **Methods** A total of 196 clinical stool samples required for the study were obtained from the bacteria room of the Pediatric Hospital Affiliated to Fudan University. The performance of the Salmonella nucleic acid detection kit was evaluated by sensitivity, specificity, precision, Youden index, Kappa value, AUC of the ROC curve, cross reaction and anti-interference ability. **Results** The diagnostic sensitivity of the Salmonella nucleic acid detection kit was 89.33%, the diagnostic specificity was 95.04%, the CV value was 10.11%, the precision was good, the Youden index was 84.37%, the Kappa value was 0.85, and the AUC of the ROC curve was 0.93. The test results of this kit are in good consistency with the culture results. The cross-reaction results show that this kit will not cross-react with rotavirus and norovirus. The anti-interference ability results show that Cary-Blair's transport medium does not interfere with the detection of this kit. **Conclusion** The Salmonella nucleic acid detection kit has high pathogenic value for detecting Salmonella intestinal infection, and its operation is simple and convenient, and it can be used as a supplement to the rapid detection of Salmonella infection and the method of epidemiological investigation.

**Key words:** Salmonella; nucleic acid detection; methodology

感染性腹泻是指各种细菌、病毒、真菌、寄生虫感染引起肠道炎症所致的急、慢性腹泻, 是全球最常见的一类疾病, 相关调查显示, 中国感染性腹泻的年发病率约为 0.9 次/人, 5 岁以下儿童年发病率则为 2.1 次/人<sup>[1]</sup>, 因此加强对小儿感染性腹泻的防控显得尤为重要。另有研究表明沙门菌是小儿感染性腹泻的主要病原菌<sup>[2]</sup>。沙门菌是一种革兰阴性肠杆菌, 也是肠杆菌科中最主要的食源性致病菌, 蛋、家禽和肉类产品是沙门菌的主要传播媒介<sup>[3]</sup>。目前, 主要

通过传统培养法即标本增菌、分离培养、生化及血清学鉴定试验检测临床标本, 此方法准确且可靠性高, 但它操作复杂、检测周期长, 所需试剂繁多, 具有一定的局限性<sup>[4]</sup>。由于沙门菌传染性强, 易引起暴发或者流行, 个别重症患者病情进展快, 尤其是儿童, 易发生死亡, 因此沙门菌的检测需要向快速检测技术转变<sup>[5]</sup>。沙门菌和志贺菌检测试剂盒(PCR-荧光探针法)基于 PCR 原理以及 Taqman 荧光探针技术, 采用三色荧光 PCR 在全封闭的扩增体系中检测沙门菌和

作者简介:陈赛阁,女,技师,主要从事临床微生物检测及耐药机制相关研究。 <sup>△</sup> 通信作者, E-mail:chuanqing523@163.com。

本文引用格式:陈赛阁,付盼,何磊燕,等.沙门菌核酸检测试剂盒评价[J].国际检验医学杂志,2021,42(4):481-483.

志贺菌的特异性基因片段,从而实现对本体的多重、快速检测;在体系中检测内参基因,对待测标本核酸的提取及扩增进行全程监控,可以防止假阴性的出现;同时使用尿嘧啶 DNA 糖基化酶(UDG 酶)和脱氧尿苷三磷酸(dUTP),避免扩增产物污染。本研究对此产品的多项性能指标进行了评价,旨在评估产品质量和有效性。

## 1 材料与方法

**1.1 标本来源** 将 2018 年 5 月至 2018 年 11 月于本院门诊就诊且临床诊断为感染性腹泻的患者标本纳入研究。感染性腹泻诊断标准参照《诸福棠实用儿科学》相关章节<sup>[6]</sup>。剔除无法进行溯源的病例标本、非本院来源的病例标本、重复病例的标本。

**1.2 仪器与试剂** 木糖-赖氨酸-脱氧胆酸(XLD)平板、亚硒酸盐磺绿(SBG)沙门菌增菌液、沙门菌显色平板(CAS 平板)、Cary-Blair 氏运送培养基均购自上海科玛嘉微生物技术有限公司;克氏双糖和肠道发酵管(Ⅱ)为本实验室自配,ABI7500 型实时荧光定量 PCR 仪为美国应用生物系统公司产品,核酸提取试剂盒、沙门菌和志贺菌核酸检测试剂盒为上海速创诊断产品有限公司的产品。

## 1.2 方法

**1.2.1 肠道沙门菌、志贺菌培养及鉴定** 挑取 Cary-Blair 氏运送培养基中的脓血、黏液样粪便,或直肠拭子,接种于 XLD 平板上,将平板于 35℃ 培养 18~24 h 后观察菌落。同时将沾有标本的棉签在 SBG 增菌液中洗脱,增菌液于 35℃ 培养 18~24 h 后观察有无颜色变化,将过夜后变色浑浊的增菌液转种 XLD 平板,于 35℃ 培养 18~24 h 后观察菌落。沙门菌:挑取 XLD 平板上中央带有黑心的 2 个以上菌落,接种于克氏双糖和肠道发酵管(Ⅱ)和 CAS 平板,35℃ 孵育 18~24 h 后观察其生化反应和 CAS 平板上颜色变化;对疑为沙门菌的进行沙门菌血清凝集试验,若 A-F 多价血清呈阳性,根据 O 抗原、H 抗原凝集结果确定沙门菌名称。志贺菌:挑取 XLD 平板上无色透明的 2 个以上菌落,接种于克氏双糖和肠道发酵管(Ⅱ)和 CAS 平板,35℃ 孵育 18~24 h 后观察其生化反应和 CAS 平板上颜色变化;对疑为志贺菌的,进行志贺血清凝集试验,若 4 种多价血清呈阳性,根据单价血清凝集结果确定志贺菌名称。

**1.2.2 沙门菌的血清学检测** 首先用可疑菌与沙门菌 O 多价血清 Vi 抗原(A-F)进行凝集,若呈明显凝集,提示被检菌株可能属于 A-F 6 个 O 群范围之内,可根据本省 O 因子检出频率的顺序,按 O<sub>4</sub>、O<sub>9</sub>、O<sub>7</sub>、O<sub>8</sub>、O<sub>10</sub>、O<sub>19</sub>、O<sub>2</sub>、O<sub>11</sub> 的顺序进行凝集。再用 H 因子血清第一相(特定相)定型,最后用 H 因子第二相(非特异型)辅助定型。若生化反应符合沙门菌的表型,但 A-F 多价血清不凝集(有可能是伤寒和丙型副伤寒),首先考虑是否存在表面抗原(Vi 抗原),

因为 Vi 抗原能阻断 O 抗原与相应的抗体发生凝集,加热可将其破坏。此时应将细菌制成菌悬液,放入沸水中加热 15~30 min,冷却后再做凝集试验。若去除 Vi 抗原后仍不凝集,此时应考虑 Vi 抗原是否为 A-F 以外菌群,应送专业实验室进行鉴定。

## 1.2.3 肠道沙门菌、志贺菌 PCR-荧光探针法检测

(1)试剂准备:从(-20±5)℃ 取出试剂盒,试剂盒中主要包括沙门志贺 PCR 反应液、沙门志贺酶混合液、沙门志贺内标物、沙门志贺阴性对照(0.9%氯化钠溶液)和阳性对照(含灭活的沙门菌和志贺菌)。将各试剂于室温下溶解,充分混匀并短暂离心后使用。取 N 个(N=阴性对照数+阳性对照数+待检测样本数)PCR 反应管,每管按照要求依次加入沙门志贺 PCR 反应液 19 μL 和沙门志贺酶混合液 1 μL,总体积 20 μL,用于 1 份标本的检测。(2)标本处理:挑取米粒大小粪便,放置于含有 1 mL 生理盐水的离心管中,用强力振荡器高速振荡 2 min,取 200 μL 转移至一新的离心管中,12 000 r/min 离心 2 min 后弃上清液,同时取 200 μL 阴性对照和阳性对照,12 000 r/min 离心 2 min 后弃上清液;往各标本以及阴性对照、阳性对照的沉淀中加入 200 μL 核酸提取液(使用前充分振荡混匀)、10 μL 沙门志贺内标物以及 1 管提取固形物,用强力振荡器高速涡旋振荡 5 min;瞬时离心,100℃ 干浴 5 min,然后 12 000 r/min 离心 2 min,取 5 μL 上清液用于 PCR 扩增。(3)加样:在准备好试剂的 PCR 反应管中分别加入待测标本、阴性对照和阳性对照上清液各 5 μL,盖紧管盖后,瞬时低速离心。(4)PCR 扩增:根据标本类型设置标本编号、阴性对照和阳性对照,每个标本选择沙门菌检测通道(FAM),志贺菌检测通道(ROX)和内参检测通道(JOE)3 个通道。反应条件设定:UDG 酶处理 37℃ 5 min;预变性 95℃ 5 min;95℃ 10 s,60℃ 45 s,共 40 个循环。进行扩增检测,待检测结束后,记录结果。

**1.2.4 精密度分析** 对同 1 份标本重复检测 5 次,计算不同检测孔位中的 Ct 值的平均值( $\bar{x}$ )、标准差(s),进而计算变异系数(CV)。

**1.2.5 交叉反应** 取一定浓度轮状病毒或诺如病毒病原体加入标本保存液中,与常规标本一样处理,重复 3 次。

**1.2.6 抗干扰能力** 本试验根据临床需求,评估标本运送培养基对检测结果的影响。试验组为弱阳性标本;对照组加入等量的运送培养基,与常规标本一样处理;重复测定 3 次。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS20.0 软件进行统计分析,得出受试者工作特征曲线(ROC 曲线)的曲线下面积(AUC),计算诊断灵敏度、特异度、约登指数、Kappa 值。

## 2 结果

**2.1 入组患者基本信息** 共随机入组 196 例患者,

留取其粪便标本共 196 例,其中女 86 例、男 110 例,年龄 0~16 岁,中位年龄为 2 岁。196 例粪便标本中沙门菌或志贺菌培养阳性 75 例(本院志贺菌阳性极少,试验期间未收集到志贺菌阳性标本,因此此试验中阳性标本均为沙门菌阳性),沙门菌和志贺菌培养阴性 121 例。

**2.2 沙门菌血清型分布** 75 株沙门菌中鉴定到种占 86.70%,共监测到 9 种血清型,其中鼠伤寒沙门菌、肠炎沙门菌占 72.00%,见表 1。

表 1 75 株沙门菌血清型分布

| 沙门菌血清型   | n  | 比例(%)  |
|----------|----|--------|
| 鼠伤寒沙门菌   | 34 | 45.33  |
| 肠炎沙门菌    | 20 | 26.67  |
| B 组沙门菌   | 5  | 6.67   |
| C 组沙门菌   | 3  | 4.00   |
| 伦敦沙门菌    | 2  | 2.67   |
| 阿贡纳沙门菌   | 2  | 2.67   |
| 肯塔基沙门菌   | 2  | 2.67   |
| 沙门菌属     | 2  | 2.67   |
| 蒙得维得亚沙门菌 | 2  | 2.67   |
| 圣保罗沙门菌   | 1  | 1.33   |
| 德比沙门菌    | 1  | 1.33   |
| 斯坦利沙门菌   | 1  | 1.33   |
| 总计       | 75 | 100.00 |

**2.3 PCR-荧光探针法检测结果及效果评价** 粪便培养法阳性率为 38.26%(75/196),核酸检测试剂盒阳性率为 37.24%(73/196),两种方法符合率为 92.86%(182/196)。沙门菌核酸检测试剂盒诊断灵敏度为 89.33%,诊断特异度为 95.04%,约登指数为 84.37%,Kappa 值为 0.85,ROC 曲线下面积为 0.93,与培养结果有极好的一致性。见表 2。

表 2 试剂盒检测沙门菌与培养法的比较(n)

| 培养法 | 核酸检测试剂盒 |     | 总计  |
|-----|---------|-----|-----|
|     | 阳性      | 阴性  |     |
| 阳性  | 67      | 8   | 75  |
| 阴性  | 6       | 115 | 121 |
| 总计  | 73      | 123 | 196 |

**2.4 精密度分析结果** 试验结果显示 CV 值为 10.11%,精密度良好。

**2.5 交叉反应结果评价** 加入轮状病毒或诺如病毒病原体的样本检测结果为阴性,此试剂盒与轮状病毒和诺如病毒无交叉反应。

**2.6 抗干扰能力结果评价** 弱阳性样本检测仍为弱阳性结果,对照组结果为阴性,此结果显示此试剂盒抗干扰能力强,其检测结果不受运送培养基的影响。

**3 讨论**

沙门菌属分肠道沙门菌和邦戈沙门菌两种,肠道沙门菌有鞭毛,不产生芽孢,无荚膜,为兼性厌氧的革兰阴性肠道杆菌<sup>[7]</sup>。沙门菌也是引起我国食源性疾

病和食物中毒的主要病原菌之一<sup>[8]</sup>,每年我国大约有 3 亿人因感染沙门菌而患病,其引起的疾病达到我国食源性疾病总数的 70%~80%<sup>[9]</sup>。儿童细菌性腹泻是比较常见的一种消化道综合征,其发病原因与多种因素有关,其中最主要的是病原菌感染,主要临床症状为大便性状变化、大便次数增多等,腹泻严重时可能导致患儿营养不良,从而影响到患儿的生长发育甚至可引起死亡。在我国,多项研究表明引发儿童细菌性腹泻的最主要病原菌就是沙门菌属<sup>[10-12]</sup>。为此,建立快速、有效的检测方法对预防和控制沙门菌感染非常重要。

目前沙门菌的检测方法包括传统检测方法、免疫学检测方法、分子生物学方法等<sup>[13]</sup>。传统检测法通过对标本分步增菌以达到提高病原菌检出率的目的,主要步骤有标本增菌、分离培养、生化及血清学分型鉴定。此方法准确且可靠性高,但它操作复杂、检测周期长,鉴定至少需要 4 d<sup>[14]</sup>,所需试剂繁多,在敏感性、特异性和检测速度等方面有自身的局限性。免疫学检测方法一般是应用抗体或抗原与相应的抗原和抗体特异性结合的原理检测待测标本是否含有待测物质<sup>[15]</sup>。已经建立的沙门菌免疫学检测方法包括:酶联免疫吸附测定(ELISA)法、免疫荧光法、免疫层析技术等。这些检测方法具有操作简便、特异性高、检测成本低、分析容量大等优点,缺点是灵敏度低、不易定量,并且会出现假阳性、假阴性等问题。沙门菌分子生物学检测方法有 PCR、环介导等温扩增技术(LAMP)、核酸探针技术(NAP)、基因芯片技术等。这四种方法具有简便快速、灵敏度高、特异性强等优点,现已广泛应用于微生物检测等诸多领域。但是,由于这些方法技术含量高,对仪器和操作人员的要求较高,因此很难在基层广泛推广。

本试验使用的沙门菌核酸检测试剂盒与“金标准”培养法比较,无须标本增菌、分离培养、生化及血清学鉴定等步骤,只需挑取标本,用配套核酸提取试剂提取核酸,进行 PCR 扩增即可,1.5~2.0 h 即可判断是否有沙门菌感染。本试验结果显示,与“金标准”培养法相比,沙门菌核酸检测试剂盒诊断灵敏度为 89.33%,诊断特异度为 95.04%,精密度良好,约登指数为 84.00%,Kappa 值为 0.85,ROC 曲线下面积为 0.93,与培养结果有极好的一致性。与轮状病毒、诺如病毒不会发生交叉反应,Cary-Blair 氏运送培养基也不会干扰本试剂盒的检测。

但此试剂盒也存在着一定的局限性:不能对沙门菌进行血清分型鉴定;标本采集、转运或保存不当可能会导致假阴性结果;沙门菌、志贺菌待测靶序列的变异可能会导致假阴性结果;未经验证的其他干扰或 PCR 抑制因子可能会导致假阴性结果。实验室环境污染、试剂污染、标本交叉污染可能会出现假阳性结果。  
(下转第 488 页)

数较多,未对其他参数进行分析比对,因此需加强后续研究。

## 参考文献

- [1] CHEN A, TERUYA J. Global hemostasis testing thromboelastography: old technology, new applications [J]. Clin Lab Med, 2009, 29(2): 391-407.
- [2] CHOI Y S, SHIM J K, HONG S W, et al. Comparing the effects of 5% albumin and 6% hydroxyethyl starch 130/0.4 on coagulation and inflammatory response when used as priming solutions for cardiopulmonary bypass [J]. Minerva Anesthesiol, 2010, 76(8): 584-591.
- [3] 周湘红, 张海燕, 张俊, 等. TEG5000 血栓弹力图仪性能评价 [J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(15): 2573-2575.
- [4] 赵磊, 徐双, 贾枚, 等. TEG5000<sup>®</sup> 型血栓弹力图仪性能验证 [J]. 医疗卫生装备, 2015, 369(12): 94-96.
- [5] 张澍田, 王拥军. 消化道出血的诊断思路 [J]. 中国实用内科学杂志, 2008, 28(3): 161-164.
- [6] 李贵庆, 丁岩冰, 吴健, 等. 急性非静脉曲张上消化道出血临床特征分析 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2012, 21(9): 847-850.
- [7] National Committee for Clinical Laboratory. How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory: C28-A2 [S]. Wayne, PA: NCCLS, 2000.
- [8] REIKVAM H, STEIEN E, HAUGE B, et al. Thromboelastography [J]. Transfus Apher Sci, 2009, 40(2): 119-123.
- [9] KARON B S. Why is everyone so excited about thromboelastography (TEG) [J]. Clin Chim Acta, 2014, 436

(10): 143-148.

- [10] PARKER R J, ELEY K A, VON KIER S, et al. Functional fibrinogen to platelet ratio using thromboelastography as a predictive parameter for thrombotic complications following free tissue transfer surgery: a preliminary study [J]. Microsurgery, 2012, 32: 512-519.
- [11] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Method comparison and bias estimation using patient samples: EP9-A2 [S]. Wayne, PA: NCCLS, 2002.
- [12] SUBRAMANIAN A, ALBERT V, SAXENA R, et al. Establishing a normal reference range for thromboelastography in North Indian healthy volunteers [J]. Indian J Pathol Microbiol, 2014, 57(1): 43-50.
- [13] 任召祺, 段光华, 李俊祺, 等. 血栓弹力图测定结果的比对研究 [J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(17): 3329-3332.
- [14] 胡海亮, 杨鹏, 钟涛, 等. 两种血栓弹力图仪测定结果的比对研究 [J]. 北京医学, 2017, 39(6): 643-644.
- [15] 鲁双艳, 陈会欣, 刘娟, 等. 武汉某三甲医院确立血栓弹力图参考值范围的探讨 [J]. 临床血液学杂志, 2019, 32(6): 440-442.
- [16] 刘真真, 武文漫, 蔡晓红, 等. 上海地区健康人群血栓弹力图参考区间的建立 [J]. 中国输血杂志, 2019, 32(3): 232-236.
- [17] 黄珂钊, 周精, 刘超男, 等. 四川地区健康人群快速血栓弹力图参考区间的建立 [J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(16): 1941-1944.

(收稿日期: 2020-04-03 修回日期: 2020-09-17)

(上接第 483 页)

综上所述, 本研究中使用的沙门菌和志贺菌核酸检测试剂盒 (PCR-荧光探针法) 能准确检测沙门菌感染, 可作为诊断沙门菌感染以及流行病学调查的一种方法。

## 参考文献

- [1] 王琦琦, 么鸿雁, 胡跃华, 等. 中国 1990 年与 2010 年感染性腹泻的疾病负担及变化研究 [J]. 疾病监测, 2016, 31(3): 233-239.
- [2] 张海玉. 小儿感染性腹泻的病原菌分布特点及耐药性分析 [J]. 实用临床医药杂志, 2018, 22(23): 96-98.
- [3] YANG Q, WANG F, JONES K L, et al. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for the rapid, reliable, and robust detection of Salmonella in produce [J]. Food Microbiol, 2015, 46: 485-493.
- [4] 李迎晓, 焦凤超, 赵瑜, 等. 沙门菌 LAMP 检测方法的建立 [J]. 畜牧与兽医, 2017, 49(12): 111-114.
- [5] BRANDAO D, LIEBANA S, CAMPOY S, et al. Simultaneous electrochemical magneto genosensing of foodborne bacteria based on triple-tagging multiplex amplification [J]. Biosens Bioelectron, 2015, 74: 652-659.
- [6] 江载芳, 申昆玲, 沈莹. 诸福棠实用儿科学 [M]. 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 2015.

- [7] 尚红, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程 [M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2015.
- [8] 武运, 吴浩天, 宋生建, 等. 肠炎沙门氏菌和哈瓦那沙门氏菌的耐药性及耐药基因分析 [J]. 现代食品科技, 2017, 33(10): 37-44.
- [9] YIN M, YANG B, WU Y, et al. Prevalence and characterization of Salmonella enterica, serovar in retail meats in market place in Uighur, Xinjiang, China [J]. Food Control, 2016, 64(6): 165-172.
- [10] 方辉. 儿童腹泻耐药性分析及病原菌分布的观察 [J]. 名医, 2019, 10(4): 110.
- [11] 张仙云. 儿童细菌性腹泻的 260 例病原微生物检验结果分析 [J]. 黑龙江中医药, 2018, 47(5): 165-166.
- [12] 卓丽文. 儿科粪便培养菌群构成比及耐药性分析 [J]. 包头医学院学报, 2018, 34(8): 21-22.
- [13] 赵春阳, 江强世, 刘畅, 等. 沙门氏菌检测方法研究进展 [J]. 中国奶牛, 2018, 36(10): 27-31.
- [14] 王鑫, 闫磊, 曾庆祝. 沙门氏菌的检测技术与方法 [J]. 现代食品科技, 2007, 23(5): 82-85.
- [15] 章钢刚, 赖卫华. 食源性致病菌免疫学检测方法研究进展 [J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(9): 3414-3419.

(收稿日期: 2020-06-09 修回日期: 2020-11-19)