



中华人民共和国卫生行业标准

WS/T 454—2014

从业人员预防性健康检查 沙门菌、志贺菌检验方法

Preventive health examination of employees—
Examination of Salmonella and Shigella

2014-03-15 发布

2014-10-01 实施

中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会 发布

目 次

前言	I
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 定义、术语和缩略语	1
4 原理	2
5 设备和材料	2
6 培养基和试剂	3
7 检验程序	3
8 操作步骤	4
附录 A (规范性附录) 沙门菌、志贺菌荧光 PCR 检测反应体系及注意事项	9
附录 B (规范性附录) 标本混合方案	11

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准起草单位：深圳市疾病预防控制中心、广州市疾病预防控制中心、中国疾病预防控制中心传染病预防控制所、河南省疾病预防控制中心、浙江省疾病预防控制中心、广西壮族自治区疾病预防控制中心、上海市疾病预防控制中心等。

本标准主要起草人：程锦泉、扈庆华、石晓路、王鸣、阚飙、夏胜利、张政、王鸣柳、陈敏、吴新伟、窦文祥等。

从业人员预防性健康检查 沙门菌、志贺菌检验方法

1 范围

本标准规定了粪便标本(肛拭子)中沙门菌和志贺菌的检验方法。

本标准适用于公共场所从业人员、食品生产和加工(食品生产)人员、食品流通和餐饮服务(食品经营)人员、饮用水生产、经营人员预防性健康检查项目中,粪便标本(肛拭子)的沙门菌和志贺菌检验。

其他相关行业从业人员,如从事医疗卫生用品生产、经营人员以及化妆品生产人员等,预防性健康检查项目中,粪便标本(肛拭子)的沙门菌和志贺菌检验可参照本标准执行。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB 4789.4—2010 食品微生物学检验 沙门菌检验

GB/T 4789.28—2003 食品卫生微生物学检验 染色法、培养基和试剂

WS/T 230—2002 临床诊断中聚合酶链反应(PCR)技术的应用

WS 280 伤寒和副伤寒诊断标准

WS 287 细菌性和阿米巴性痢疾诊断标准

3 定义、术语和缩略语

3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

从业人员预防性健康检查 preventive health examination of employees

对公共场所从业人员、从事食品生产和加工(食品生产)人员、食品流通和餐饮服务(食品经营)人员,饮用水生产、经营人员,医疗卫生用品生产、经营人员以及化妆品生产人员等。按国家有关卫生法律、法规规定所进行的从业前、从业期间的健康检查。

3.1.2

实时荧光 PCR real-time PCR

实时荧光聚合酶链反应。

3.1.3

Ct 值 cycle threshold

每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时,所经历的循环数。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

DNA:脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic Acid)

FAM:6-羧基荧光素(6-carboxyfluorescein)

HEX:六氯-6-甲基荧光素(Hexachlorofluorescein)

LDC:赖氨酸脱羧酶(Lysine Decarboxylase)

MAC:麦康凯琼脂(MacConkey Agar)

NB:营养肉汤(Nutrient Broth)

NP-40:乙基苯基聚乙二醇(Nonidet P-40)

SC:亚硒酸盐胱氨酸(Selenite Cystine)

Taq 酶:Taq DNA 聚合酶(Taq DNA polymerase)

TSI:三糖铁琼脂(Triple Sugar Iron Agar)

UNG 酶:尿嘧啶 DNA 糖基酶(Uracil DNA glycosylase)

XLD:木糖-赖氨酸-胆酸盐琼脂(Xylose-Lysine-Desoxycholate)

4 原理

4.1 筛查试验

依据核酸体外扩增基本原理,针对沙门菌和志贺菌特异靶基因序列设计引物、荧光标记探针,在 PCR 反应过程中,当荧光信号达到并超过所设定的阈值时,利用荧光信号强度与 PCR 产物量的正相关关系,即可对 PCR 结果进行分析和判定。

对标本的模板 DNA 进行实时荧光 PCR 扩增,根据其 C_t 值及扩增曲线进行标本结果报告,当 PCR 结果呈阴性时直接报告阴性结果;当 PCR 结果呈阳性时,进一步对阳性标本做确诊实验。从而实现从业人员健康检查粪便标本中的沙门菌和志贺菌的快速筛查。

4.2 确诊试验

PCR 筛查试验结果为阳性时,依据 8.5 确诊试验进行细菌培养和鉴定,包括生化和血清学鉴定,当确诊试验鉴定结果为阳性时报告阳性,为阴性时报告阴性。

5 设备和材料

- 5.1 实时荧光 PCR 仪。
- 5.2 生物安全柜。
- 5.3 高速离心机(离心速度 12 000 r/min 以上)。
- 5.4 漩涡混匀器。
- 5.5 恒温培养箱。
- 5.6 冰箱:2℃~8℃和-20℃。
- 5.7 电子天平:感量 1 mg。
- 5.8 pH 计或 pH 比色管或精密 pH 试纸。
- 5.9 微量可调移液器和配套带滤芯吸头:2.5 μL,10 μL,100 μL,200 μL,1 000 μL。
- 5.10 恒温金属浴/水浴锅:25℃~100℃。
- 5.11 采样管:密闭式,内径≥1.2 cm,高度≥10 cm。
- 5.12 采样拭子:长度≥10 cm。
- 5.13 试管架。
- 5.14 无菌吸管:1 mL(具 0.01 mL 刻度)、10 mL(具 0.1 mL 刻度)或微量移液器及吸头。
- 5.15 无菌培养皿:直径 90 mm。
- 5.16 无菌试管:3 mm×50 mm。
- 5.17 废液缸。

6 培养基和试剂

- 6.1 营养肉汤(NB)增菌液或其他有效增菌液:按 GB/T 4789.28—2003 中 4.8 规定。
- 6.2 木糖赖氨酸脱氧胆酸(XLD)琼脂:按 GB 4789.4—2010 中 A.6 规定。
- 6.3 沙门菌显色培养基。
- 6.4 麦康凯琼脂(MAC):按 GB/T 4789.28—2003 中 4.24 规定。
- 6.5 三糖铁琼脂(TSI):按 GB/T 4789.28—2003 中 4.26、4.27 规定。
- 6.6 亚硒酸盐胱氨酸(SC)增菌液:按 GB 4789.4—2010 中 A.3 规定。
- 6.7 葡萄糖半固体发酵管:按 GB/T 4789.28—2003 中 4.31 规定。
- 6.8 糖发酵管:按 GB/T 4789.28—2003 中 3.2 规定。
- 6.9 赖氨酸脱羧酶试验培养基(LDC):按 GB/T 4789.4—2010 中 A.11 规定。
- 6.10 5%乳糖发酵管:按 GB/T 4789.28—2003 中 4.32 规定。
- 6.11 靛基质试剂:按 GB/T 4789.28—2003 中 3.13.3 规定。
- 6.12 沙门菌属诊断血清。
- 6.13 志贺菌属诊断血清。
- 6.14 除特别说明外,PCR 所用试剂为分析纯。所有试剂均用无 DNA 酶污染的容器分装。
- 6.15 DNA 提取液:Tris-EDTA 缓冲液(0.01 mol/L,pH 8.0)、0.01% NP40。
- 6.16 实时荧光 PCR 检测试剂:沙门菌、志贺菌荧光 PCR 检测靶基因、反应体系及注意事项见附录 A。

7 检验程序

从业人员预防性健康检查沙门菌、志贺菌检验程序见图 1。

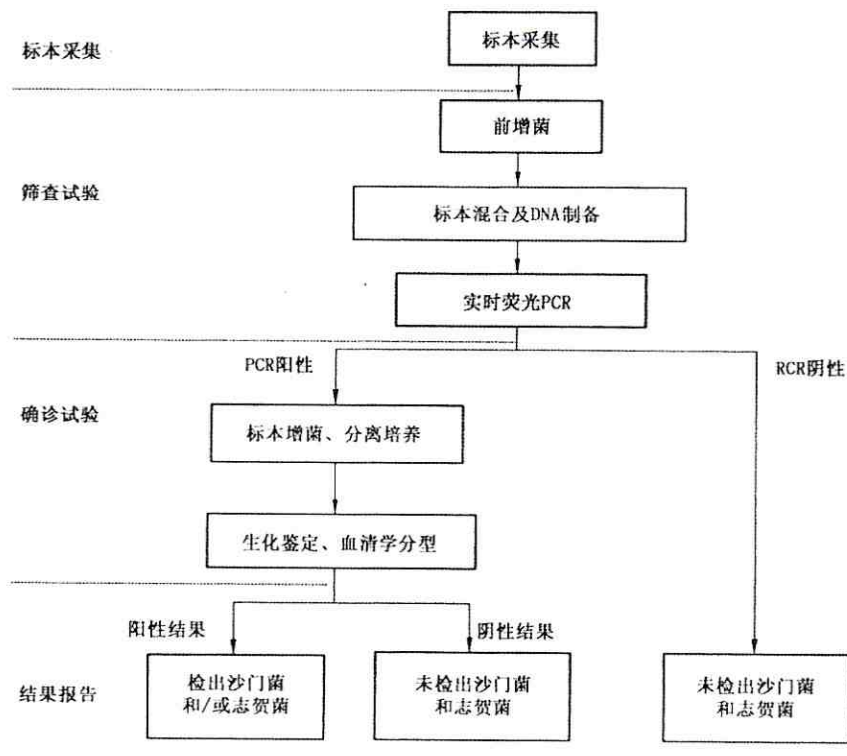


图 1 从业人员预防性健康检查沙门菌、志贺菌检验程序

8 操作步骤

8.1 标本采集、保存及运输

8.1.1 标本采集

用灭菌的采样拭子,由肛门插入直肠内 3 cm~5 cm 处,旋转 360°采集,放入盛有增菌液的采样管内,旋紧管盖,编号备用。

8.1.2 标本的保存和运输

采集的标本放入密闭的采样管内,尽快运送到实验室,在 2℃~8℃条件下保存不超过 1 d。

8.2 标本的前处理

8.2.1 前增菌

采集的肛拭子标本,需要在营养肉汤中于 36℃±1℃增菌培养 3 h~6 h。

8.2.2 标本混合

可根据标本数量进行适当混合,再进行实时荧光 PCR 检测。标本混合具体方法见附录 B。

8.2.3 模板 DNA 的制备

取混合后的标本,12 000 r/min 离心 5 min,弃尽上清;加入 50 μL~100 μL DNA 提取液,悬浮沉淀后 100℃加热处理 5 min,12 000 r/min 离心 2 min,取 5 μL 上清液,作为模板 DNA 用于实时荧光 PCR 检测(制备好的裂解液需立即进行实时荧光 PCR 检测)。

8.3 筛查试验(实时荧光 PCR)

8.3.1 试剂配制

按照附录 A 的反应体系在试剂配制区配制沙门菌、志贺菌荧光 PCR 检测反应体系。实时荧光 PCR 快速检测过程防污染方法和措施按照 WS/T 230—2002 第 6 章进行。

8.3.2 分装体系

制取的 n 管标本加上阳性对照和阴性对照各一管,按附录 A 体系要求分装反应液(20 μL)。

8.3.3 加样

在标本处理区取 $n+2$ 管(为待检混合管管数 n + 一管阳性对照 + 一管阴性对照)分装好反应液的 PCR 反应管。先瞬间离心 10 s,再将对应编号的 PCR 反应管加入 5 μL 上清液,盖紧管盖,瞬间离心 10 s。

8.3.4 荧光 PCR 检测

在核酸扩增区进行。将 8.3.2 中离心后的 PCR 反应管放入实时荧光 PCR 仪内,记录标本摆放顺序,进行核酸扩增和检测。

反应体系为 25 μL:其中 PCR 反应液(含有特异性引物、dNTP、探针及反应所需各种离子)

19.64 μL , UNG 酶 0.06 μL (1 U/ μL), Taq 酶 0.3 μL (5 U/ μL), 模板 DNA 5 μL 。

荧光 PCR 检测的反应参数设置为:

第一阶段, UNG 酶处理 50 $^{\circ}\text{C}$ /2 min, 1 个循环;

第二阶段, 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ /3 min, 1 个循环;

第三阶段, 95 $^{\circ}\text{C}$ /5 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ /60 s, 40 个循环。在该阶段的 55 $^{\circ}\text{C}$ /60 s 采集 FAM 和 HEX 荧光信号。

8.4 结果判断

8.4.1 结果分析条件设定

直接读取检测结果。阈值设定原则根据仪器噪声情况进行调整, 以阈值线刚好超过正常阴性样品扩增曲线的最高点为准, 不同仪器可根据仪器噪声情况进行调整。

8.4.2 质控标准

8.4.2.1 阴性对照: $\text{Ct} > 36$ 或无 Ct 值, 曲线为直线或轻微斜线, 无明显指数增长期。

8.4.2.2 阳性对照: $\text{Ct} \leq 22$, 曲线有明显指数扩增期。

如果阴性对照和阳性对照的荧光 PCR 检测结果不能满足以上条件, 此次实验视为无效。

8.4.3 结果判定和报告

8.4.3.1 FAM 通道和(或)HEX 通道 Ct 值 > 36 或无 Ct 值, 可判定标本检测结果为沙门菌和(或)志贺菌阴性, 可直接报告未检出沙门菌和(或)志贺菌。

8.4.3.2 FAM 通道和(或)HEX 通道 Ct 值 ≤ 33 , 有明显指数增长期, 可判定该标本检测结果为沙门菌和(或)志贺菌阳性。

8.4.3.3 FAM 通道和(或)HEX 通道 $33 < \text{Ct}$ 值 ≤ 36 , 建议标本重新做荧光 PCR 检测。如果重新检测结果的 Ct 值 ≤ 36 , 曲线有明显指数增长期, 则判定为沙门菌和(或)志贺菌阳性, 否则判定为沙门菌和(或)志贺菌阴性。

8.4.4 PCR 阳性混合标本确认

对 PCR 结果为阳性的混合标本, 依据 8.5 确诊试验做进一步的确认。

8.5 确诊试验

8.5.1 增菌

混合标本 PCR 检测结果为沙门菌阳性时, 将混合标本所对应的单管阳性标本挑出, 于 SC 增菌液中 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h。

混合标本 PCR 检测结果为志贺菌阳性时, 将混合标本所对应的单管阳性标本挑出, 无需增菌, 直接分离培养。

8.5.2 分离培养

沙门菌: 取 SC 增菌液 1 环, 划线接种于沙门菌显色培养基或 XLD 琼脂平板。于 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h, 观察平板上生长的菌落形态特征(见表 1)。

表 1 沙门菌属在沙门菌显色培养基和 XLD 琼脂平板上的菌落特征

选择性琼脂平板	沙 门 菌
沙门菌显色培养基	紫色或紫红色,光滑,湿润,边缘整齐,圆形
XLD 琼脂	菌落呈粉红色,带或不带黑色中心,有些菌株可呈现大的带光泽的黑色中心,或呈现全部黑色的菌落;有些菌株为黄色菌落,带或不带黑色中心

志贺菌:取前增菌液 1 环,划线接种于 MAC 或 XLD 琼脂平板;于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h,志贺菌呈现不发酵乳糖的菌落(见表 2)。

表 2 志贺菌属在 MAC 和 XLD 琼脂平板上的菌落特征

选择性琼脂平板	志 贺 菌
MAC 琼脂	形成圆形、隆起、无色、透明、直径 2 mm~3 mm、表面光滑、湿润、边缘整齐的菌落。宋内氏志贺菌菌落较大,不透明,培养时间稍长易形成淡粉红色、扁平的粗糙菌落
XLD 琼脂	红色透明状、表面光滑、湿润、隆起、边缘整齐的菌落

8.5.3 生化试验

8.5.3.1 沙门菌

自沙门菌显色培养基或 XLD 平板上分别挑取 3 个~5 个可疑菌落,接种三糖铁琼脂和赖氨酸脱羧酶试验培养基,于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h,必要时可延长到 48 h,反应结果见表 3。

表 3 沙门菌属在三糖铁琼脂和赖氨酸脱羧酶试验培养基内的反应结果

三糖铁琼脂				赖氨酸脱羧酶试验培养基	初步判断
斜面	底层	产气	硫化氢		
K	A	+(—)	+(—)	+	可疑沙门菌属
K	A	+(—)	+(—)	—	可疑沙门菌属
A	A	+(—)	+(—)	+	可疑沙门菌属(罕见)
A	A	+/-	+/-	—	非沙门菌
K	K	+/-	+/-	+/-	非沙门菌

注: K 表示产碱, A 表示产酸; + 表示阳性, — 表示阴性; +(—) 表示多数阳性(少数阴性); +/- 表示阳性或阴性。

8.5.3.2 志贺菌

8.5.3.2.1 自 MAC 或 XLD 平板上分别挑取 3~5 个可疑菌落,接种三糖铁琼脂和葡萄糖半固体各一管。于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h,分别观察结果。

8.5.3.2.2 下述培养物可以弃去:

- 在三糖铁琼脂斜面上呈蔓延生长的培养物;
- 在 18 h~24 h 内发酵乳糖、蔗糖的培养物;
- 不分解葡萄糖和只生长在半固体表面的培养物;

- 产气的培养物；
- 有动力的培养物；
- 产生硫化氢等培养物。

8.5.3.2.3 凡是乳糖、蔗糖不发酵，葡萄糖产酸不产气（福氏志贺菌 6 型可产生少量气体），无动力的菌株判为志贺菌属的培养物，可做血清学鉴定（8.5.4.2）和进一步生化试验（8.5.3.2.4）。

8.5.3.2.4 进一步生化试验：8.5.3.2.3 中判定为志贺菌属的培养物，应进一步做 5% 乳糖发酵，甘露醇、棉子糖、甘油和胨基质试验。志贺菌属四个生化群的培养物，应符合该群的生化特性。但福氏志贺菌 6 型的生化特性与 A 群或 C 群相似（见表 4）。

表 4 志贺菌属四个群的生化特性

生化群	5%乳糖	甘露醇	棉子糖	甘油	胨基质
A 群：痢疾志贺菌	—	—	—	(+)	—/+
B 群：福氏志贺菌	—	+	+	—	(+)
C 群：鲍氏志贺菌	—	+	—	(+)	—/+
D 群：宋内氏志贺菌	+/(+)	+	+	d	—
注：+ 表示阳性；— 表示阴性；—/+ 表示多数阴性，少数阳性；(+) 表示迟缓阳性；+/(+) 表示多数阳性，少数迟缓阳性；d 表示有不同生化型。					

8.5.3.3 菌株鉴定

根据以上沙门和志贺菌的初步生化反应结果，依据 WS 280 和 WS 287 做进一步菌株鉴定。

8.5.4 血清学分型

采用玻片凝集试验，同时用生理盐水做对照。在生理盐水中自凝者为粗糙型菌株，不能分型。

8.5.4.1 沙门菌血清分型

8.5.4.1.1 O 抗原检测

利用沙门菌 O 多价血清进行凝集试验，对于凝集阳性的多价血清，进一步使用其包含的 O 单因子血清进行凝集检测，多价血清均不凝集时（用 Vi 血清进行凝集）经煮沸，再与 O 血清进行凝集试验。

8.5.4.1.2 H 抗原检测

利用沙门菌 H 多价血清进行凝集试验，对于凝集阳性的多价血清，进一步使用其包含的 H 单因子血清进行凝集检测。对于 H 双相沙门菌有时需进行位相诱导试验，按 GB 4789.4—2010 中 5.5.4.2 执行。

8.5.4.1.3 菌型鉴定

根据血清学分型鉴定的结果，按 GB 4789.4—2010 附录 B 部分判定菌型。

8.5.4.2 志贺菌血清分型

8.5.4.2.1 先用四种志贺菌多价血清检查，如果由于 K 抗原的存在而不出现凝集，应将菌液煮沸后再检查；如果呈现凝集，则用 A1、A2、B 群多价和 D 群血清分别试验。如系 B 群福氏志贺菌，则用群和型因子血清分别检查。福氏志贺菌各型和亚型的型、群抗原见 WS 287。可先用群因子血清检查，再根据群因子血清出现凝集的结果，依次选用型因子血清检查。

8.5.4.2.2 四种志贺菌多价血清不凝集的菌株,可用鲍氏多价 1、2、3 分别检查,并进一步用 1~15 各型因子血清检查。如果鲍氏多价血清不凝集,可用痢疾志贺菌 3~12 型多价血清及各型因子血清检查。

8.5.5 结果报告

根据确诊试验结果对实时荧光 PCR 阳性标本作出最终结果判定和菌型判定。

附 录 A
(规范性附录)

沙门菌、志贺菌荧光 PCR 检测反应体系及注意事项

A.1 沙门菌、志贺菌荧光 PCR 检测靶基因

分别针对沙门菌 *ssaR* 基因和志贺菌 *ipaH* 基因设计特异性引物和探针,引物和探针序列见表 A.1。

表 A.1 沙门菌、志贺菌特异性引物和探针

致病菌名称	引物名称	引物序列	探针名称	探针序列
沙门菌	Sa1	5'-CCGGGATAAAGTCAGAACTC-3'	P1	5'-FAM-AGGCCAGGTAGACTTC-TATCTCATCCAC-Eclipse-3'
	Sa2	5'-CAGTGGAGAGCTGAAGTTTC-3'		
志贺菌	Sh1	5'-GCTCATATTAATTCCGGCATTAC-3'	P2	5'-HEX-ATAAGTAATCCAATC-CGAAATGCCTGCGT-Eclipse-3'
	Sh2	5'-CAGGTCAATAGCCAGAAAGG-3'		

A.2 反应体系

沙门菌、志贺菌荧光 PCR 检测反应体系见表 A.2。

表 A.2 沙门菌、志贺菌荧光 PCR 检测反应体系

反应液组分	体积 μL
超纯水	10.39
10×PCR buffer	2.50
MgCl ₂ (25 mmol/L)	4.00
dNTPs (2.5 mmol/L each dNTP)	1.00
Sa1 (50 μmol/L)	0.40
Sa2 (50 μmol/L)	0.40
Sh1 (50 μmol/L)	0.40
Sh2 (50 μmol/L)	0.40
P1 (50 μmol/L)	0.03
P2 (50 μmol/L)	0.12
Taq 酶 (5 U/μL)	0.30
UNG 酶 (1 U/μL)	0.06
模板 DNA	5.00
合计	25.00

A.3 使用注意事项

A.3.1 为防止荧光干扰,应使用无粉手套进行操作。避免用手直接接触 PCR 反应管,勿在反应管上进行标记。

A.3.2 实验后 PCR 反应管应按照医疗废弃物进行处理,防止污染。

A.3.3 实时荧光 PCR 检测试剂如有其他特异性的沙门菌、志贺菌靶基因,也可以使用。

附 录 B
(规范性附录)
标本混合方案

B.1 操作方法

B.1.1 取 n 个灭菌后的 1.5 mL 离心管或合适容量筛选管作为混合管, n 为待检混合管管数, 分别编号, 并核实标本编号是否正确。

B.1.2 每份标本取 80 μ L, 分别依次加入到混合管中。根据实际情况, 将 5~10 份标本混合成 1 份混合标本。

B.1.3 混合完成后, 使用移液器反复抽吸 3~5 次或漩涡振荡器进行标本混匀。

B.2 注意事项

B.2.1 标本混合时, 采用不开盖直接滴取标本的采样管, 减少操作人员和环境污染。

B.2.2 如混合标本 PCR 检测为阴性, 判定混合标本所代表的全部标本为阴性。如混合标本 PCR 检测为沙门菌阳性, 则再对混合标本中的每一份标本进行 12 h~18 h 增菌后, 进行划线分离, 以确定具体阳性标本。如混合标本 PCR 检测为志贺菌阳性, 则对混合标本中的每一份标本直接进行划线分离, 以确定具体阳性标本。
