

乳胶凝集检测技术用于沙门菌快速筛选的研究

杨宁¹ 张汉斌² 卢勉飞¹ 蔡芷荷¹ 吴清平³

1. 广东环凯微生物科技有限公司, 广东 广州 510663; 2. 广州市天河区疾病预防控制中心, 广东 广州 510000;

3. 广东省微生物研究所, 广东 广州 510070

摘要: 目的 评价乳胶凝集试剂盒对粪便标本中沙门菌可疑菌落的筛选性能。方法 按照 WS 271—2007《感染性腹泻诊断标准》的方法, 从临床粪便标本中分离出 104 株可疑菌落, 然后分别用沙门菌乳胶凝集试剂盒和三糖铁培养基进行初筛, 最后用 API 20E 细菌鉴定条进行确认, 分别从灵敏度及特异性方面对乳胶凝集试剂盒和三糖铁的性能进行评价。结果 沙门菌乳胶凝集试剂盒筛查粪便标本分离的可疑菌落, 灵敏度达到 97.14%; 特异度达到 97.10%, 远优于三糖铁测定的特异度(15.94%)。结论 沙门菌乳胶凝集试验具有非常高的灵敏度及特异度, 可以筛掉绝大多数的阴性菌落, 而且对于目标菌落的识别率很高, 是一种非常有效的快速筛选方法, 值得推广应用。

关键词: 乳胶凝集检测技术; 乳胶凝集检测试剂盒; 沙门菌; 健康体检

中图分类号: R446.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-8685(2017)11-1552-03

Study on the application of latex agglutination test in the rapid detection of *Salmonella* in healthy physical examination

YANG Ning*, ZHANG Han-bin, LU Mian-fei, CAI Zhi-he, WU Qing-ping

* Guangdong Huankai Microbial Science and Technology Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong 510663, China

Abstract: Objective To evaluate the screening performance of latex agglutination test kit for the detection of suspicious colonies of *Salmonella* from stool samples. **Methods** 104 suspected strains were isolated from clinical specimens according to WS 271—2007 *Diagnostic Criteria for Infectious Diarrhea*, and then *Salmonella* latex agglutination kit and Triple sugar iron medium were used for primary screening, finally, API 20E bacterial identification strip was used to confirm. The performances of latex agglutination kits and triple sugar iron medium were evaluated in terms of sensitivity and specificity. **Results** *Salmonella* latex agglutination kit was adopted to screen suspicious colonies isolated from fecal specimens, with sensitivity as 97.14%. The specificity of the *Salmonella* latex agglutination kit reached 97.10%, which was better than that of the triple sugar iron(15.94%). **Conclusion** *Salmonella* latex agglutination test has high sensitivity and specificity, which can screen out most of the negative colonies. It has a high recognition rate for target colonies, it is a very effective rapid screening method, and it is worthy of popularization and application.

Key Words: Latex agglutination test technology; Latex agglutination test kit; *Salmonella*; Health examination diagnosis

传统的沙门菌检验步骤包括前增菌、选择性增菌、选择性分离、生化鉴定、血清学鉴定等程序, 整个流程需要 5 d~7 d 或更长的时间, 费时费力。如何提高沙门菌检测的速度、减轻工作量是检验人员关注的问题。如果在筛选可疑菌落时能尽量缩小范围, 提高筛选的准确度, 就能提高检测的速度, 减轻工作量。因此, 检验人员迫切需要一种快速、准确率高的筛选方法来确定可疑菌落。目前, 乳胶凝集试验在国外是一种比较成熟、效果好、准确率高的快速筛选方法, 已

有不少相关报道^[1-7]。

乳胶凝集法是采用人工大分子乳胶颗粒标记抗体, 从而使之与待测抗原发生肉眼可见的凝集反应, 以达到检出目标病原微生物的方法^[8]。按照 HKM 公司说明书, 该法鉴定可疑菌落的实验时间只需 2 min。这种方法的特点是方便快捷, 不需要任何仪器设备, 便于在基层推广使用^[9]。在欧美国家, 该法已被广泛用于动植物检疫、临床检验、食品卫生检验。

应成玉等^[10]采用自制乳胶凝集试剂的方法检测成品饲料中的沙门菌, 取得非常良好的效果, 认为乳胶凝集试验具有特异性强、可用于现场检测等优点, 是检测沙门菌的可靠方法。中国医学科学院卫生研究所食品卫生研究室、天津卫生检疫所等单位采用自制乳胶凝集试剂的方法^[11]检测成品食品中的沙门菌, 认为乳胶凝集试验具有快速、简便、特异性与敏感

基金项目: 广州市科技计划项目(201610010067)

作者简介: 杨宁(1975-) 男, 本科, 微生物工程师, 主要从事微生物检测产品的研发及应用推广工作。

通讯作者: 吴清平, E-mail: wuqp203@163.com;

13602818372@163.com

性较高的特点,适用于食品中沙门菌的检测。

本研究通过测试沙门菌乳胶凝集试剂在健康体检中沙门菌检测的运用,评价该方法对于沙门菌可疑菌落快速筛查的准确度,为检验人员使用该方法提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 标本 肛拭子从广州市天河区体检者中采集。

1.2 试剂 HKM 沙门菌乳胶凝集试剂盒(HKMSal, 批号: E0021M); SC 增菌液(批号: F1529Y); SS 琼脂平板(批号: F1761Y); 三糖铁培养基(TSI, 批号: F1533Y); TSA 平板(批号: F1746Y); API 20E 细菌鉴定条(批号: 1004085550)。

1.3 方法

1.3.1 可疑菌落分离 WS 271—2007 按照《感染性腹泻诊断标准》^[12]的操作流程,取体检者肛拭子放入 5 ml SC 增菌液中,进行选择性的增菌,取 1 标准环选择性增菌液划线于 SS 琼脂平板, (36 ± 1) °C 培养 24 h。

1.3.2 可疑菌落验证 从平板中挑取可疑菌落接种于 TSA 平板中,进行分离纯化。然后挑取单菌落分别同时进行以下实验:(1)沙门菌乳胶凝集试验;(2)按照 WS 271—2007 《感染性腹泻诊断标准》用 TSI 进行初筛;(3)用 API 20E 细菌鉴定条进行确认。

2 结果

2.1 乳胶凝集试剂的测定结果 本实验对 104 株可疑菌落进行试验,用 API 20E 最终确认阳性的有 35 株。乳胶凝集试验阳性的有 36 株,其中确证阳性的有 34 株,确证阴性的有 2 株,即出现 2 例假阳性。乳胶凝集试验阴性的有 68 株,其中确证阴性的有 67 株,确证阳性的有 1 株,即出现 1 例假阴性(表 1)。HKM 沙门菌乳胶凝集试剂盒的检测灵敏度为 97.14%,特异度为 97.10%。

表 1 可疑菌落用乳胶凝集试剂测定的结果(株)

| 类别 | 乳胶试验筛选阳性 | 乳胶试验筛选阴性 | API 20E |
|--------|----------|----------|---------|
| 确证阳性样品 | 34 | 1 | 35 |
| 确证阴性样品 | 2 | 67 | 69 |
| 合计 | 36 | 68 | 104 |

2.2 三糖铁的测定结果 104 株可疑菌落接种于三糖铁斜面,试验阳性的有 93 株,其中确证阳性的有 35 株,确证阴性的有 58 株,即出现 58 例假阳性。试验阴性的有 11 株,其中确证阴性的有 11 株(表 2)。实验结果表明,三糖铁用于沙门菌可疑菌落的筛选灵敏度可达到 100%,但是特异度较差,仅为 15.94%,不能起到过滤大部分阴性可疑菌落,减轻可疑菌落鉴定

工作量的目的。

表 2 可疑菌落用三糖铁测定的结果(株)

| 类别 | 三糖铁可疑阳性 | 三糖铁阴性 | API 20E |
|--------|---------|-------|---------|
| 确证阳性样品 | 35 | 0 | 35 |
| 确证阴性样品 | 58 | 11 | 69 |
| 合计 | 93 | 11 | 104 |

3 讨论

实验结果表明,沙门菌乳胶凝集试验具有非常高的灵敏度及特异性,可以筛掉绝大多数的阴性菌落,而且对于目标菌落的识别率很高,是一种非常有效的快速筛选方法。这个结果与英国 Hansen Wet al 用显色乳胶凝集试验检测腹泻患者粪便标本的结果相近^[13]。而三糖铁试验虽然灵敏度很高,但是特异度较低(假阳性率太高),而且培养时间较长,因此沙门菌乳胶凝集试验更加适合于健康体检等方面的沙门菌快速筛查。目前国内已有的文献报道多是应用于饲料和食品中沙门菌的检测^[14-15],健康体检方面暂时未见报道。

沙门菌乳胶凝集试剂是乳胶颗粒表面包被与沙门菌特异性抗原具有特异性的复合多价抗血清。与沙门菌悬液混合后,乳胶颗粒可迅速凝集,以检测有动力的沙门菌为主,涵盖部分无动力的沙门菌(如鸡沙门菌、鸡瘟沙门菌),HKM 沙门菌乳胶凝集试剂盒可检测 99% 以上有动力的沙门菌和特定的无动力沙门菌,从而避免了漏检大部分沙门菌。

使用沙门菌乳胶凝集试剂检测保存较长时间的肠杆菌科的培养物可引起非特异性凝集(假阳性)检测保存时间过长的沙门菌培养物可能出现假阴性结果。因此检测菌株应为新鲜培养物。虽然沙门菌乳胶凝集试剂盒的检出率高,但仍存在个别不能检出的情况。例如 1% 左右的不能检测有动力的沙门菌及部分无动力沙门菌,所以在用这种方法的同时,个别典型的可疑菌落如果出现不凝集的情况,应做进一步的判别。

有文献记载乳胶凝集试剂可直接用于选择性增菌液筛选,但在实际使用中发现,选择性增菌液的干扰物质比较多,出现错误结果的几率较大。建议先通过选择性平板分离可疑菌落,再用乳胶凝集试剂筛查,具有阴性预测值高和节省时间的优点。

参考文献

[1] Nugraha J, Marpaung FR, Tam FCH, et al. Microbiological culture simplified using anti-O12 monoclonal antibody in TUBEX test to detect *Salmonella* bacteria from blood culture broths of enteric fever patients[J]. PLoS ONE, 2012, 7(11): 49586-49593.

(下转第 1556 页)

布在 15 岁~65 岁,其中 15 岁~45 岁比例最高,可能与此年龄阶段人群在外活动及就餐机会较多有关。

CLSI 药敏试验判断标准中,沙门菌对第一、二代头孢菌素体外可显示抗菌活性,但体内治疗无效,临床治疗沙门菌感染应避免使用上述药物^[8]。有研究表明头孢类、喹诺酮类、青霉素类常用于沙门菌感染治疗^[9]。本院检出的沙门菌对头孢类抗生素耐药率都在 10.00% 以下,本院头孢类耐药率与广州市、温州地区以及深圳市的研究结果相似^[10-12]。但是喹诺酮类在甲型副伤寒和青霉素类在乙型副伤寒耐药率均在 20.00% 左右,可能与本地区居民近年来常用上述两类抗生素,以及肉食家禽饲养过程中喜欢在饲料中加入喹诺酮类抗生素有一定的关系。长期少量使用喹诺酮类抗生素,DNA 酶旋酶 *gyrA* 亚单位 83 位氨基酸由丝氨酸为丙氨酸所替代,该位点极性降低及空间构象改变使喹诺酮类抗生素产生耐药^[13]。本院检出的沙门菌中除 1 株鸡沙门菌对氨基糖苷类敏感外,其余沙门菌对此类抗生素耐药率都在 75.00% 以上,本院氨基糖苷类耐药比较严重,与侯君等的研究相似^[14]。应引起临床足够重视,同时氨基糖苷类由于其潜在的不良反应,特别是对于儿童有耳毒性副作用,不适于儿童患者治疗^[15]。因此,临床医生在使用此类抗生素时应该慎用。综上所述,三代、四代头孢类抗生素仍然是治疗沙门菌感染的首选药物,但是长期使用头孢类抗生素易产生沙门菌多重耐药菌株,所以临床治疗沙门菌感染过程中应选择联合用药。连续监测抗生素耐药性有助于临床制定合理的治疗方案,避免不合理用药。同时沙门菌的防治还需要养成良好的生活、卫生及饮食习惯,做到合理的防治结合。

参考文献

[1] 薛颖,郭荣显,钱珊珊,等. 沙门菌毒力导的研究进展[J]. 微

生物与感染杂志,2015,10(6): 381-389.

[2] Majowicz SE, Musto J, Scallan E, et al. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis[J]. Clin Infect Dis, 2010, 50(6): 882-889.

[3] 朱奇,陆斌兴,覃有泉,等. 沙门氏菌生物学研究进展[J]. 疾病监测与控制杂志,2015,7(9): 474-478.

[4] 陈玉娟,尹建雯,古文鹏,等. 云南省 2005-2012 年 91 株甲型副伤寒病原学特征分析[J]. 中国人兽共患病学报,2014,30(1): 49-57.

[5] 许云敏,杜艳,单斌,等. 2005-2014 年 CHINET 沙门菌属细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2016,16(3): 294-301.

[6] Fariba A, Ramazan R, Elaheh FS, et al. Investigation of class I integron in *salmonella* infantis and its association with drug resistance[J]. Jundishapur Microbiol, 2014, 7(5): e10019.

[7] 肖美芳,周义正,邱晓燕. 沙门菌耐喹诺酮类抗生素机制研究进展[J]. 中国卫生检验杂志,2015,25(15): 2639-2640.

[8] 张霆,郭志勤,王凤平,等. 72 株沙门菌血清型分布及药敏试验结果分析[J]. 中国感染与化疗杂志,2014,14(6): 532-534.

[9] 汪云霞,薛春玲,黄东平. 河源市 70 株沙门菌的血清型、药敏结果及多重耐药性分析[J]. 齐齐哈尔医学院学报,2015,36(31): 4378-4379.

[10] 周勇,张欣强,候水平,等. 广州市 76 株沙门菌的血清型分布及耐药性分析[J]. 现代预防医学,2014,41(2): 349-352.

[11] 朱传新,刁慧芬,郑文力,等. 温州地区沙门菌的耐药情况研究[J]. 中国卫生检验杂志,2016,26(2): 283-286.

[12] 贺连华,吴平芳,陈妙玲,等. 2010 年-2013 年深圳市食品中沙门菌血清分型及耐药分析[J]. 中国卫生检验杂志,2015,25(2): 289-294.

[13] 肖永红,王其南. 伤寒杆菌耐喹诺酮类机制分子生物基础研究[J]. 中华传染病杂志,2000,18(2): 106-109.

[14] 侯君,陈玉凤,栾明春,等. 2014 年大连市伤寒沙门菌耐药及分子分型研究[J]. 中国微生物学杂志,2016,28(4): 396-399.

[15] 王蓓,杨环,尚宏霞,等. 三级综合医院 69 株沙门菌分布特征及耐药性分析[J]. 海南医学,2016,27(3): 428-430.

收稿日期:2016-11-09

(上接第 1553 页)

[2] Kawano RL, Leano SA, Agdamag DM. Comparison of serological test kits for diagnosis of typhoid fever in the Philippines[J]. J Clin Microbiol, 2007, 1: 246-247.

[3] Ley B, Thriemer K, Ame SM, et al. Assessment and comparative analysis of a rapid diagnostic test (Tubex?) for the diagnosis of typhoid fever among hospitalized children in rural Tanzania[J]. BMC Infect Dis, 2011, 11(1): 147.

[4] McGowan KL, Rubenstein MT. Use of a rapid latex agglutination test to detect *Salmonella* and *Shigella* antigens from gram-negative enrichment broth[J]. Am J Clin Pathol, 1989, 92(5): 679-682.

[5] Thorns CJ, McLaren IM, Sojka MG. The use of latex particle agglutination to specifically detect *Salmonella* enteritidis[J]. Int J Food Microbiol, 1994, 21(1/2): 47-53.

[6] Tam FC, Ling TK, Wong KT, et al. The TUBEX test detects not only typhoid-specific antibodies but also soluble antigens and whole bacteria[J]. J Med Microbiol, 2008, 57(3): 316-323.

[7] Leea KM, Runyona M, Herman TJ, et al. Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety[J]. Food Control, 2015(47): 264-276.

[8] 封莉,黄继超,刘欣,等. 食源性致病菌快速检测技术研究进展[J]. 食品科学,2012,33(21): 332-339.

[9] 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.

[10] 应成玉,杨生栋,申什菊,等. 乳胶凝集试验检测成品饲料中的沙门氏菌[J]. 青海畜牧兽医杂志,2006,36(2): 14-15.

[11] 中国医学科学院卫生研究所食品卫生研究室,天津卫生检疫所. 乳胶凝集试验在检验食品中沙门氏菌的应用[J]. 医学研究通讯,1974(2): 34-36.

[12] 中华人民共和国卫生部. WS 271-2007 感染性腹泻诊断标准[S]. 北京:人民卫生出版社,2007.

[13] Hansena W, Freney J. Comparative evaluation of a latex agglutination test for the detection and presumptive serogroup identification of *Salmonella* spp[J]. J Microbiol Methods, 1993, 17(3): 227-232.

[14] 徐敬龙,王永兴,王海洲,等. 饲料中沙门氏菌的检测技术研究[J]. 饲料与养殖,2006(2): 28-29.

[15] 汤旭,阮红. 浅析食品中沙门氏菌的几种快速检验方法[J]. 疾病预防控制通报,2013,28(2): 88-90.

收稿日期:2017-01-18