

《鸡肠炎沙门氏菌 PCR 诊断标准》编制说明

一、工作简况

(一) 任务来源

肠炎沙门氏菌是引起人类食物中毒的重要病原菌。蛋母鸡感染肠炎沙门氏菌后，会发生腹泻，此外肠炎沙门氏菌可侵入卵黄，威胁食品安全。

为提高蛋类食品安全，及时诊断、治疗肠炎沙门氏菌病，防止肠炎沙门氏菌在鸡群中的传播，特建立此标准。

MLSt PCR 分析将个血清型沙门菌分离株分为多个序列型(ST 型)。ST 序列型与血清型分型结果有明显的对应关系，单独使用或与血清分型联合应用可以作为肠炎沙门氏菌的诊断依据。标准计划号：20110221-T-326。

(二) 起草单位

略

(三) 主要工作过程

预研阶段：

本标准利用伦敦帝国学院网站提供的沙门菌属 7 对管家基因对沙门氏菌进行分型。引物合成后，针对鸡白痢沙门氏菌、肠炎沙门氏菌进行了敏感性检测，对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、粪肠球菌等细菌进行了特异性检测。结果表明，7 对沙门氏菌管家基因引物对鸡白痢沙门氏菌和肠炎沙门氏菌均可扩增出目的条带。而针对其他细菌只有部分引物可扩增出目的条带，或根本不能扩增出目的条带。

起草讨论阶段：

起草主要参考国内外已颁布的沙门氏菌检测标准和有关细菌的 PCR 诊断标准进行。

征求意见阶段：本标准征求了山东省动物疾病控制中心、南京农业大学、青岛出入境检验检疫局、青岛农业大学、山东省农业科学院家禽研究所等单位专家的意见。意见返回后，对各位专家提出的意见进行了认真的研究。依据接受的意见对初稿进行了修正。

审查阶段（未经审查的不写本部分）

秘书处电话通知需要重大修改

接秘书处修改通知后,已将细菌 DNA 提取、PCR 产物电泳等内容移到附录。删除了从组织提取细菌 DNA 的内容。

二、标准编制原则和确定标准主要内容的依据

(一) 标准的编写原则

本标准旨在建立和规范利用分子生物学技术,诊断肠炎沙门氏菌的方法。该方法必须能够区分肠炎沙门氏菌和鸡白痢沙门氏菌。

(二) 提出本标准的依据

目前已颁布的有关沙门氏菌的诊断标准,设计沙门氏菌 PCR 诊断的只有 GB/T 28642-2012 饲料中沙门氏菌的快速检测方法 聚合酶链式反应(PCR)法和 SN/T 4274-2015 国境口岸沙门氏菌、志贺氏菌、大肠杆菌 O157:H7 的三重荧光 PCR 检测方法。这两种方法不能区别肠炎沙门氏菌和鸡白痢沙门氏菌。

(三) 制定本标准的基础

山东农业大学在肠炎沙门氏菌流行病学调查和诊断技术方面已经做了大量的工作。从 2010 年起,便分离鉴定了一株肠炎沙门氏菌,并利用该菌制备了凝集抗原,在全国范围内进行了鸡群肠炎沙门氏菌抗体阳性率的血清学调查。2014 年山东农业科学院的刘永庆博士进行了肠炎沙门氏菌细菌学方面的调查。

(四) 实验内容

我们在山东农业大学动物科技学院动物研究平台,由不同年级的研究生利用 7 对看家基因,从可疑待检肠炎沙门氏菌染色体 DNA 扩增 PCR 产物。

将 PCR 扩增产物进行 DNA 序列测定,将所得序列与肠炎沙门氏菌序列比对, DNA 序列 100%吻合。

我们到山东农科院畜牧研究细菌室利用其菌种库中的菌种进行了验证。本标准建立的 MLST 方法全部可以从已鉴定保存的沙门氏菌扩增出目的片段。大肠杆菌等无关的细菌则不能扩增出片段。

(五) 实际应用效果

本试验先后从山东省不同地市采集不同动物源的样品,通过选择培养基、革兰氏染色和 16s rRNA 分离沙门菌,并做生化试验查看其生化特性。通过玻片凝集试验,确定分离株的血清型。通过鉴定总共分离获得了 78 株鸡源沙门菌、56 株鸭源沙门菌和 20 株猪源的沙门菌。所有动物源中被检测的沙门菌菌株有 154 株,其中血清型为肠炎沙门菌共有 110 株,占能分型菌株的 71.4%(110/154);血清型为鼠伤寒沙门菌的共有 32 株,占能分型菌株的 20.8%(32/154);血清型为山夫登堡沙门菌的共有 1 株,占能分型菌株的 0.65%(1/154);血清型为印第安纳沙门菌的共有 4 株,占能分型菌株的 2.6%(4/154);血清型为汤卜逊沙门菌的共有 2 株,占能分型菌株的 1.3%(2/154);血清型为阿格玛沙门菌的共有 1 株,占能分型菌株的 0.65%(1/154);血清型为德贝儿沙门菌的共有 4 株,占能分型菌株的 2.6%(4/154)。从整个动物源来看,肠炎型的沙门菌占据多数,其次为鼠伤寒沙门菌。

通过 MLST 技术, 鸡源检出 7 种 ST 型: ST11、ST19、ST26、ST128、ST14、ST17 和 New1, 鸭源检出 3 种 ST 型: ST11、ST19 和 New2, 猪源检出 3 种: ST34、ST40 和 ST3007, 整体来看, 分离菌的血清型和 ST 型数量比较接近, 二者分型能力相近。其中 ST11 全部为肠炎沙门氏菌。

三、主要试验或验证的分析、综述报告, 技术经济论证, 预期的经济效果

(一) 主要试验或验证的分析

我们检测了 50 株已经过常规方法诊断为肠炎沙门氏菌的地方分离株, 全部属于 ST11 型沙门氏菌的血清型。也就是说按照本标准的方法检测肠炎沙门氏菌, 与常规检测方法的准确性为 100%。

(二) 预期的经济效果

本标准可用于畜禽沙门氏菌病的诊断, 也可用于食品安全监测。

四、采用国际标准和国外先进标准的程度

目前, 国际标准仍然沿用生化和血清学鉴定的传统做法, 或是依据生化或免疫原理开发的仪器设备进行鉴定, 也有用核酸探针的。

五、与现行的法律、法规和强制性国家标准的关系

用本方法鉴定的阳性细菌, 经目前的国标方法检验 (GB 4789.4-2010 食品微生物学检验沙门氏菌检验), 全部为阳性。在本标准的制定过程中, 中国出入境检验检疫系统编制了利用 MLST 方法检测多种致病菌的行业标准 (SN/T 4525.2-2016 出口食品中致病菌的分子分型 MLST 方法)。但是该标准对沙门氏菌仅能鉴定到属水平, 而本标准可以鉴定到种。

[GB/T 28642-2012 饲料中沙门氏菌的快速检测方法聚合酶链式反应\(PCR\)法](#), 也是只鉴定到属水平。

六、重大分歧意见的处理经过和依据

收到秘书处修改意见后, 参考出入境检验检疫标准进行了重大修改。形成目前的审核版。

七、标准性质 (强制性, 推荐性) 的建议, 特别是对建议批为强制性标准的理由应充分说明

推荐

八、贯彻标准的要求和建议措施 (组织实施、技术措施、过渡办

法等)

在动物性食品卫生监督行业、兽医行业推荐使用。

九、废止现行有关标准的建议；

无

十、其他应予说明的事项。

无