

幼儿开始添加辅食,此时辅食添加不当,或者婴儿未适应人工喂养造成喂养量等均可引起维生素 D 的不足; $>12\sim 36$ 月龄幼儿维生素 D 水平稍低的原因可能是幼儿大多已经能都行走,能量消耗大,营养相对不足,而此时家长可能觉得幼儿已经长大,开始放松对幼儿营养的关注等; $>3\sim 6$ 岁儿童已经能自主进食,基本已经养成了规律的饮食习惯,同时活动能力加强,能进行较多户外活动,因此其维生素 D 水平又开始回升。

人体获得维生素 D 的主要途径之一为阳光照射下的皮肤合成。不同季节采样检测的维生素 D 水平存在差异,冬春季平均水平稍低于夏秋季。冬春季温度较低,日照时间短,日照强度低,儿童户外活动较少,且裸露的皮肤少,不能有效地接受太阳光的照射,使体内维生素 D 的合成减少。

综上所述,深圳市盐田区学龄前儿童血清维生素 D 水平虽较其他地区稍高,但仍有一定的缺乏率,应对 $6\sim 36$ 月龄的儿童加强监测,继续加强公共卫生服务,建立完善的儿童保健管理体系,积极开展相关科普知识,规范、合理地补充维生素 D。

参考文献

[1] Peterlik M, Grant WB, Cross HS. Calcium, vitamin D and cancer[J]. *Anticancer Res*, 2009, 29(9):3687-3698.
[2] Robinson-Cohen C, Hoofnagle AN, Ix JH, et al. Racial differences in the association of serum 25-hydroxyvitamin D concentration with coronary heart disease events[J]. *JAMA*, 2013, 310(2):179-188.
[3] Caprio M, Infante M, Calanchini M, et al. Vitamin D; not just the bone. Evidence for beneficial pleiotropic extra-skeletal effects[J]. *Eat Weight Disord*, 2017, 22(1):27-

41.

[4] Holick MF. Vitamin D status; measurement, interpretation, and clinical application[J]. *Ann Epidemiol*, 2009, 19(2):73-78.
[5] 陈虹,邓晓燕,叶郁辉,等. 深圳市 3 岁以下儿童维生素 D 缺乏阳性率月龄分布特点及对儿童健康管理的启示[J]. *中国全科医学*, 2016, 19(8):958-961.
[6] 王昭蓉. 对南通地区 $0\sim 3$ 岁婴幼儿 25-羟维生素 D 检测结果的分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2016, 37(3):346-348.
[7] 侯书宁. 学龄前儿童维生素 D 水平的影响因素分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2016, 37(6):756-757.
[8] 李杰,高改兰,李维娜,等. 宝鸡地区 $0\sim 3$ 岁城乡儿童维生素 D 水平调查研究[J]. *宁夏医学杂志*, 2015, 37(5):453-454.
[9] 周琰,潘柏申. 维生素 D 检测标准化进程[J]. *检验医学*, 2016, 31(1):71-75.
[10] Meunier C, Mont  r  mal J, Faure P, et al. Four years of LC-MS/MS method for quantification of 25-hydroxyvitamin D(D2+D3) for clinical practice[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2015, 989(1):54-61.
[11] 宋斌斌,秦嘉倩,彭颖斐,等. 液相色谱-串联质谱法检测血清 25-羟基维生素 D 的方法建立和性能评价[J]. *检验医学*, 2015, 30(5):416-421.
[12] 吴康敏. 儿童维生素 D、钙营养合理补充[J]. *中国实用儿科学杂志*, 2012, 27(3):165-169.

(收稿日期:2017-01-16 修回日期:2017-03-09)

• 临床研究 •

RT-PCR 检测口岸食品和公共场所从业人员沙门氏菌的应用评价

罗卫红¹, 曹刚¹, 田斌^{2△}

(1. 长沙县疾病预防控制中心, 长沙 410100; 2. 湖南省长沙市疾病预防控制中心 410003)

摘要:目的 评价实时荧光聚合酶链反应(RT-PCR)检测口岸食品和公共场所从业人员沙门氏菌的应用价值。方法 对 54 679 例口岸食品和公共场所从业体检人员的肛拭子标本分别进行分离培养后的菌型鉴定及血清凝集试验和 RT-PCR 检测,以分离培养的初检结果及再检测结果作为金标准计算 RT-PCR 方法的检验效能指标。结果 RT-PCR 共检出阳性结果 127 份,阳性检出率为 0.23%。与金标准相比,其检测灵敏度为 98.40%(123/125),特异度为 99.99%(54 550/54 554),一致性检验发现 RT-PCR 与金标准一致性较好,Kappa 值为 0.976。结论 RT-PCR 检测口岸食品和公共场所从业人员沙门氏菌感染具有较高的灵敏度和特异性,但仍需考虑检测过程中增菌的时长和标本混合程序可能会在一定程度上影响其检测结果。

关键词:沙门氏菌; 从业人员; 肛拭子; 培养; 聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.09.048

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)09-1273-03

沙门氏菌分布广泛,菌型繁多,对人类、动物都有致病力,所致疾病统称为沙门氏菌感染,此感染常见并多发,属乙类传染病。其传播途径为粪-口传播,在我国内陆地区由沙门氏菌所致的食物中毒占首位,沿海地区则以副溶血弧菌居多。根据我国相关的法律法规规定,口岸食品和公共场所从业人员必须进行沙门氏菌检测^[1]。目前,针对沙门氏菌检测的方法多为传统的培养鉴定,得出检测结果的时间需要 4~5 d,随着分子生

物学检测方法的快速发展,应用分子生物学的方法对口岸食品和公共场所从业人员沙门氏菌进行检测已经成为研究的热点领域。本研究旨在评价实时荧光聚合酶链反应(RT-PCR)检测口岸食品和公共场所从业人员沙门氏菌的效果,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 2015 年 8 月 1 日至 2016 年 7 月 31 日,单位

△ 通信作者, E-mail: t. b2002@163. com.

体检中心所采集的口岸食品和公共场所从业人员肛门拭子 54 679 份。

1.2 仪器与试剂 ABI 7500 Real time PCR 仪, 苏州天隆 NP968-S 核酸提取仪、BD Phoenix-100 全自动细菌鉴定系统等。沙门-志贺氏菌增菌液(BPW)、SS 琼脂、木糖赖氨酸脱氧胆盐(XLD)琼脂、三糖铁(TSI)琼脂等购自杭州微生物制剂有限公司, 细菌鉴定耗材购自 BD 公司, 诊断血清购自泰国 S&A 公司。沙门氏菌核酸提取及扩增试剂均购自苏州天隆生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 肛门拭子采样方法参照标准进行^[2], 将采集的肛门拭子放入沙门-志贺氏菌增菌液(BPW)中室温运送至实验室。

1.3.2 RT-PCR 方法 用移液器分别吸取 10 份经 37 ℃ 培养 3~12 h 的充分混匀增菌液体 50 μL 于 1.5 mL 离心管中。然后将含有 500 μL 混合增菌液的离心管 10 000 r/min 离心 5 min 后弃上清液 300 μL 后充分混匀, 再按照试剂盒使用说明书提取核酸并扩增检测。若扩增出现阳性结果, 将该组的 10 份样品分别进行第二轮扩增, 以确定哪一份标本是阳性。完成核酸检测的样本取样后立即将增菌试管继续放入 37 ℃ 培养箱培养, 待分离培养。

1.3.3 分离培养方法 将培养 18~24 h 的上述增菌液充分混匀, 接种环挑取后分区划线接种到 SS 琼脂和 XLD 琼脂 37 ℃ 过夜, 接种环挑取可疑菌落接种到 TSI 平板纯化 24 h, 然后采用全自动细菌鉴定仪进行鉴定。仪器鉴定为沙门氏菌的菌株进行血清凝集试验, 分血清型。

1.3.4 金标准的确定 对两种检测方法结果不一致的标本进行再检测。具体程序如下: (1) 对于 RT-PCR 检测阳性分离培养阴性的标本再次进入分离培养程序, 有可疑菌落挑取可疑菌落进行全自动细菌鉴定和血清凝集试验, 无可疑菌落出现的样本则挑取多个菌落分别进行血清凝集试验, 血清凝集阳性的菌落再进行全自动细菌鉴定仪鉴定。(2) 对于培养阳性而 RT-PCR 阴性的标本则直接挑取血清凝集试验阳性的菌落提取核酸进行 RT-PCR 检测, 然后以分离培养的初检结果合并 RT-PCR 初检阳性分离培养阴性的标本再次分离培养和检测的结果为金标准。

1.3.5 质量控制 分离培养和菌型鉴定均按标准提供的方法检测^[2], 全自动细菌鉴定按仪器和试剂盒使用说明操作。RT-PCR 检测按试剂盒使用说明操作, 每批检测均设阴阳对照, 所用试剂在效期内使用。

1.4 统计学处理 将检测结果录入 SPSS18.0 软件包进行统计描述和分析, 计数资料采用数和构成比描述, 配对样本计数资料的交叉比较采用 McNemar χ^2 检验, 两种方法的一致性分析采用 Kappa 检验。当 $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 培养鉴定检测结果 54 679 份标本经过分离培养、鉴定和血清试验共检出沙门氏菌 114 株, 阳性检出率为 0.21%, 检出的 114 株沙门氏菌共属 20 个血清型, 另有 2 株未能分型, 所鉴定沙门氏菌血清型和构成比详见表 1。

2.2 RT-PCR 检测结果及与分离培养检测的交叉比较 RT-PCR 共检出阳性结果 127 份, 阳性检出率为 0.23%。将 RT-PCR 检测结果与分离培养结果进行交叉比较, 结果见表 2。经 McNemar χ^2 检验, 似然比 $\chi^2 = 1\,498.121, P < 0.005$ 。127 例

RT-PCR 检测结果为阳性的标本中有 15 例分离培养结果阴性, 另外有 2 例分离培养结果为阳性的标本 RT-PCR 检测结果为阴性。

表 1 培养鉴定检测结果					
血清型	菌株数 (n)	构成比 (%)	血清型	菌株数 (n)	构成比 (%)
鼠伤寒沙门菌	54	47.37	罗森沙门菌	2	1.75
肠炎沙门菌	12	10.53	自贡沙门菌	1	0.88
斯坦利沙门菌	7	6.14	赫尔沙门菌	1	0.88
阿贡纳沙门菌	6	5.26	阿富拉沙门菌	1	0.88
德尔比沙门菌	5	4.39	瓦伊勒沙门菌	1	0.88
汤卜逊沙门菌	5	4.39	利文斯通沙门菌	1	0.88
山夫登堡沙门菌	4	3.51	印第安纳沙门菌	1	0.88
新加坡沙门菌	3	2.63	加里玛沙门菌	1	0.88
阿拉莫沙门菌	2	1.75	盖勒特沙门菌	1	0.88
猪伤寒沙门菌	2	1.75	未分型	2	1.75
舒卜拉沙门菌	2	1.75	合计	114	100.00

表 2 RT-PCR 与分离培养方法的交叉比较(n)			
RT-PCR	分离培养		合计
	阳性(+)	阴性(-)	
阳性(+)	112	15	127
阴性(-)	2	54 550	54 552
合计	114	54 565	54 679

2.3 两种检测方法不一致结果标本的再检测 将 17 份两种检测方法结果不一致的标本进行再检测。15 份 RT-PCR 阳性而分离培养阴性的标本中有 11 份经过再次分离培养检出沙门氏菌, 仍有 4 份标本未能检出沙门氏菌。2 份培养阳性而 RT-PCR 阴性的标本经再检测均为阳性。

2.4 RT-PCR 的试验评价 以分离培养的初检结果和再检测结果为金标准评价 RT-PCR, 结果详见表 3。经 Kappa 检验分析显示, RT-PCR 与金标准之间的 Kappa 值为 0.976 ($P < 0.005$)。计算 RT-PCR 方法的灵敏度为 98.40% (123/125), 特异度为 99.99% (54 550/54 554), 约登指数为 0.983 9。

表 3 RT-PCR 与金标准检测结果的交叉比较(n)			
RT-PCR	分离培养		合计
	阳性(+)	阴性(-)	
阳性(+)	123	4	127
阴性(-)	2	54 550	54 552
合计	125	54 554	54 679

3 讨 论

沙门氏菌可引起人类伤寒、副伤寒、食物中毒、胃肠炎及局部感染, 甚至可引起败血症^[3]。对口岸食品和公共场所从业人员进行沙门氏菌检验不仅是相关法律法规赋予相关部门的职能, 更是预防由沙门氏菌感染所致疾病的散发或聚集性发病的有效手段^[1,4-5]。目前, 针对口岸食品和公共场所从业人员感染沙门氏菌的检测方法仍以培养鉴定和血清凝集试验为主, 但

该检测程序相对耗时,是口岸食品和公共场所从业人员体检工作中最为耗时的一个检测项目,通常至少需要 3 个工作日的时间,直接影响体检对象领取体检结果的周期^[5-7]。随着分子生物学的发展,针对沙门氏菌检测的 RT-PCR 方法使沙门氏菌的检测周期缩短成为现实,但该方法在体检机构的应用情况仍需要评价^[3,8-10]。

此次评价将标本同时进行培养鉴定和 RT-PCR 检测,以分离培养的初检结果和再检测结果为金标准评价 RT-PCR,结果显示 RT-PCR 与金标准之间的 Kappa 值为 0.976,灵敏度为 98.40%(123/125),特异度为 99.99%(54 550/54 554)。说明 RT-PCR 检测从业人员沙门氏菌感染具有较高的灵敏度和特异性。从检测结果分析,RT-PCR 不同于培养鉴定的结果,其阳性检出率(0.23%)高于培养鉴定方法(0.21%)。分析其原因在于常规的分离培养是挑取可疑菌落进行鉴定和血凝试验的,因此存在漏检的可能;另外沙门氏菌亚型较多,非典型菌落形态的出现也可能造成检测结果的偏差^[10-11]。但 RT-PCR 具有高灵敏度的特点,且检测的是所选取标本中所有的 DNA 模板。因此,产生漏检的可能性要远远低于常规的分离培养方法。其次,从初检结果不一致标本的再检测情况来看,RT-PCR 检测为阳性的标本中有 73.3%(11/15)的标本能够得到分离培养阳性的结果,而这 11 例体检者如果单采用培养鉴定的方法检测无疑将会被漏检。存在 2 例培养鉴定为阳性标本而 RT-PCR 初次检测阴性的标本,挑取培养阳性的菌落再次进行核酸扩增时又表现为阳性,这一结果说明了采用 RT-PCR 检测也存在漏检的情况。笔者考虑其可能原因有以下两个方面:第一,增菌的时间,由于采用 RT-PCR 检测的增菌时间最短的是 3 h,这样一个时间能否达到 RT-PCR 方法的最低检测限需要进一步研究;第二,由于采用的是混合 10 份标本联合检测的方法,那么这种混合从某种意义上来说是取样量减少或是降低了单位体积增菌液中的沙门氏菌的数量,有可能达不到 RT-PCR 方法的最低检测限^[12]。因此,仍需考虑现有程序中增菌的时长和标本混合检测的方法可能会在一定程度上影响其检测结果。

参考文献

[1] 田桢干, 阎俊, 陆晔, 等. LAMP 技术快速检测沙门氏菌方法的研究 •

法的建立及其应用[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2011, 34(5): 296-299.

[2] 中华人民共和国卫生部. GB4789. 4-2010 食品安全国家标准食品微生物学检验 沙门氏菌检验[S]. 北京: 国家质检总局, 2010.

[3] 谭南, 汪伟山, 林爱心, 等. 6 417 例感染性腹泻患者沙门氏菌感染情况分析[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(15): 2049-2050.

[4] 付汉维, 熊建辉, 吴凯, 等. 深圳市饮食及服务从业人员肠道沙门氏菌带菌调查[J]. 公共卫生与预防医学, 2012, 23(6): 113-114.

[5] 李欣, 董雪, 刘娜, 等. 从业人员预防性健康体检沙门/志贺氏菌检验 PCR 方法快速筛查的应用[J]. 辽宁大学学报(自然科学版), 2014, 41(2): 172-175.

[6] 韩毅, 孙燕萍, 周虹, 等. 实时荧光定量 PCR 法与分离培养法检测食品从业人员沙门菌和志贺菌的比较研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2015, 27(2): 132-135.

[7] 史秀全. PCR 检测与鉴定沙门氏菌的研究进展[J]. 肉品卫生, 1998(9): 24-26.

[8] 刘晓晨, 徐品, 张默宇. 预防性体检便样中沙门氏菌的优化检测方法[J]. 口岸卫生控制, 2013, 18(3): 21-23.

[9] 汪武新, 韦炳扬, 刘海文, 等. 荧光 PCR 快速检测从业人员肠道致病菌结果分析[J]. 中国热带医学, 2011, 11(8): 971-972.

[10] 杨柳, 胡文忠, 姜爱丽, 等. 分子生物学方法检测沙门氏菌的研究进展[J]. 食品工业科技, 2016, 37(9): 372-375.

[11] 杨柳青, 欧新华, 贾华云, 等. 长沙市沙门菌表型特征及 PFGE 分子分型[J]. 实用预防医学, 2016, 23(1): 39-42.

[12] 吴桂芬, 罗可天, 姚伯宁, 等. 荧光 PCR 技术批量快速筛查肠道致病菌混合样本的研究[J]. 中外医疗, 2014, 7(21): 181-182.

(收稿日期: 2017-01-28 修回日期: 2017-03-21)

208 株血培养大肠埃希菌的药物敏感性分析

张 华

(首都医科大学大兴教学医院检验科, 北京 102600)

摘要:目的 对 208 株血培养大肠埃希菌的药物敏感性进行分析和探讨。方法 收集该院 2014 年 3 月至 2016 年 3 月期间血培养分离的 208 株大肠埃希菌, 采用 AST-GN13 药敏卡进行药敏试验, 并验证是否为产超广谱 β -内酰胺酶菌株, 并对药敏结果进行分析和总结。**结果** 208 株血培养分离大肠埃希菌中, 产超广谱 β -内酰胺酶菌株 72 株(34.61%), 非产超广谱 β -内酰胺酶菌 136 株(65.38%)。产超广谱 β -内酰胺酶大肠埃希菌对绝大部分的抗菌药物的耐药性高于不产超广谱 β -内酰胺酶菌株。**结论** 检测大肠埃希菌的药物敏感性分析对于临床筛选抗菌药物具有重要的意义。

关键词: 血培养; 大肠埃希菌; 耐药性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.09.049 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2017)09-1275-03

在临床上, 大肠埃希菌较为常见, 构成肠道杆菌的主要细菌之一, 它常见于人和动物的肠道, 在自然环境中也时而可见。

大肠埃希菌虽然是人类最主要的致病菌, 但是在正常条件下不会引发疾病^[1], 只有当肠外组织和器官发生病变时, 导致肠外