·实验技术及其应用·

多重荧光 PCR 和基于全基因组测序的沙门菌血清分型方法比较研究

黄伟峰，雷高鹏，黄玉兰，张林，肖桃，刘丽，吕虹，赵雯霞，杨小蓉
四川省疾病预防控制中心，四川 成都 610041

摘要：目的 分析比较多重荧光聚合酶链式反应（polymerase chain reaction，PCR）和基于全基因组测序的沙门菌血清分型方法，评估每种方法的分型能力和应用场景。**方法** 对四川省覆盖 96 个血清型的 242 株沙门菌进行全基因组测序，利用 SeqSero2 以及 SISTR 预测血清型，进行一致性比较分析。并运用多重荧光 PCR 对每种血清型进行鉴定，评估其准确性及适用性。**结果** 三种方法检测 96 种沙门菌血清型，SeqSero2 与 SISTR 的完全符合率均为 87.50%（84/96），显著高于多重荧光 PCR 的 52.08%（50/96）。242 株沙门菌株中 SeqSero2 和 SISTR 鉴定的不符合率分别为 2.48%（6/242）、7.85%（19/242）。多重荧光 PCR 方法仅能准确区分常见血清型；SeqSero2 方法不符合主要原因为 *O* 抗原基因缺失或错误，部分符合主要原因为 *H* 抗原等位基因相似性干扰，以及不能区分 *C2* 血清群中仅 *O6* 不同的部分血清型；SISTR 方法不符合主要原因是 cgMLST 聚类误判、*O* 抗原基因缺失以及不能区分单相变异菌株。**结论** 基于基因组测序的血清型预测方法具有较高准确度，在许多应用场景中可替代传统血清凝集试验进行沙门菌血清分型。多重荧光 PCR 方法虽有局限性，符合率低于基因组测序方法，但其检测时限短，能准确区分常见血清型，可应用于应急快速检测。

关键词：沙门菌；血清分型；全基因组测序；多重荧光 PCR
中图分类号：R378.2 **文献标志码**：A **文章编号**：1003-8507（2026）11-2068-06
DOI：10.20043/j.cnki.MPM.202511316

Comparative study on Salmonella serotyping based on multiplex qPCR and whole-genome sequencing

HUANG Wei-feng, LEI Gao-peng, HUANG Yu-lan, ZHANG Lin, XIAO Tao, LIU Li, LV Hong, ZHAO Wen-xia, YANG Xiao-rong
Sichuan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Chengdu, Sichuan 610041, China

Abstract: Objective To analyze and compare the Salmonella serotyping methods based on multiplex quantitative polymerase chain reaction (multiplex qPCR) and whole-genome sequencing (WGS), and to evaluate the serotyping capability and application scenarios of each method. **Methods** A total of 242 Salmonella strains isolated in our province, covering 96 serotypes, were subjected to whole-genome sequencing. The serotypes of these strains were predicted using SeqSero2 and SISTR, followed by a concordance analysis of the results. Meanwhile, multiplex qPCR was employed for the identification of each serotype, so as to assess the accuracy and applicability of this method. **Results** Three methods were used to detect 96 Salmonella serovars. The overall concordance rates of SeqSero2 and SISTR were both 87.50% (84/96), which were significantly higher than that of multiplex qPCR (52.08%, 50/96). For the 242 Salmonella strains, the discordance rates of SeqSero2 and SISTR were 2.48% (6/242) and 7.85% (19/242), respectively. The multiplex qPCR method could only accurately distinguish common serotypes. The main reasons for the discordance of the SeqSero2 method included the deletion or error of O antigen genes. The main reasons for partial concordance were the interference from the similarity of H antigen alleles and the inability to distinguish some serovars in the C2 serogroup that differ only in the O6 antigen. The main reasons for the discordance of the SISTR method were cgMLST cluster misclassification, O antigen gene deletion, and the inability to distinguish monophasic variant strains. **Conclusion** The WGS-based serotyping method exhibits high accuracy and can replace the traditional serum agglutination test for Salmonella serotyping in numerous application scenarios. Although the multiplex qPCR method has limitations with a lower concordance rate than WGS-based methods, it features a short detection time and can accurately identify common serotypes, thus being suitable for emergency rapid detection.

Keywords: Salmonella; Serotyping; Whole-genome sequencing (WGS); Multiplex qPCR

基金项目：海南省科技厅卫生健康科技创新联合青年项目计划（WSJK2024QN083）
作者简介：黄伟峰（1987—），男，硕士，副主任技师，研究方向：微生物检验；雷高鹏（1982—），男，博士，主任技师，研究方向：微生物检验；黄伟峰与雷高鹏为共同第一作者
通信作者：杨小蓉，E-mail：yangyangxr@163.com

沙门菌是全球重要的食源性病原，血清型是其重要表型之一，与其致病性、耐药性、宿主适应性等均有相关性，血清分型是流行病学调查、疫情溯源和公共卫生监测的基础[1]。依据怀特－考夫曼抗原表（White–Kauffmann–Le Minor scheme, WKL）的传统玻片凝集血清学分型[2]，已在全球范围内广泛应用，但该方法存在耗时长、操作繁琐、成本高昂、对实验室检测人员技术经验要求高等问题。近年来，许多实验室利用新技术来鉴别沙门菌血清型，包括微生物质谱[3-4]、聚合酶链式反应（polymerase chain reaction，PCR）及荧光 PCR[5-8]、基因芯片[9]和全基因组测序[10]（whole-genome sequencing，WGS）。多重荧光 PCR 血清分型[11]是基于沙门菌不同血清型特有的基因序列差异，如*rfb* 基因簇以确定 *O* 抗原，*fliC* 和 *fljB* 确定 *H*1 和 *H*2 抗原，通过设计特异性引物扩增目标片段进行鉴定。随着 WGS 技术的发展，已逐渐应用于沙门菌血清型的预测。SeqSero[12]是 2015 年推出的一款从 WGS 数据预测沙门菌血清型的软件工具，其核心原理在于通过识别与 *O* 和 *H* 抗原相关的特异性基因序列，根据 WKL 方案实现血清型的快速预测。SeqSero2[13]是 2019 年基于 SeqSero 基础上，新增了用于鉴定沙门菌的种、亚种以及某些血清型的序列标记，开发了靶向组装方法，还引入基于 k-mer 的算法，不仅加快了血清型预测速度，还提升了对基因组组装的预测准确性。SISTR[14]基于沙门菌基因组拼接草图序列，使用 *O* 和 *H* 抗原的遗传决定簇数据库以及 330 位点 cgMLST，同时整合了多种基于基因组序列的分子分型方法，实现了对沙门菌血清型的准确预测。本研究分别运用 WGS 方法和多重荧光 PCR 方法对沙门菌进行了血清分型，并进行比较分析，评估可靠性，为不同场景下沙门菌血清分型的选择提供借鉴和参考。

1　材料与方法

1.1　菌株来源　四川省食品风险监测和食源性疾病监测等项目分离获得的 96 种血清型沙门菌，每种血清型随机选取 3 株（部分血清型 4～6 株），不足 3 株的血清型全选，总计 242 株。所有菌株均进行 WGS 分析，且通过玻片凝集确定血清型[15]。

1.2　试剂与仪器　血琼脂平板（郑州安图）、营养肉汤（青岛海博）、三糖铁培养基（广州环凯）、沙门菌诊断血清（中创汇科）、细菌 DNA 提取试剂盒（南京诺唯赞）、沙门菌血清（*O*、*H*）基因分型试剂盒（荧光 PCR 法）（天津一知）；荧光 PCR 仪（上海宏石）等。

1.3　方法

1.3.1　多重荧光 PCR 血清分型　96 种血清型随机各选取 1 个菌株。挑取纯培养菌落至 100 μl TE 吹打混匀菌体，100 ℃水浴加热 10 min，13 000 rpm 离心 2 min，吸取上清液，即为提取的 DNA 模板。参照多重荧光 PCR 血清分型检测试剂盒说明书，进行核酸扩增及后续分析。

1.3.2　WGS 及血清型预测　242 株沙门菌离心收集过夜培养物，用 DNA 提取试剂盒进行基因组提取，送至诺禾致源公司采用华大 MGISEQ-2000 平台进行测序。核酸浓度及质控标准为：核酸浓度不低于 5ng/μl、总量不低于 100ng，无严重 RNA 污染、无明显降解。测序参数为：测序策略为 PE150（双端测序，单向读长 150bp）；原始数据量（碱基数）≥1.5G，Q20 高质量数据量≥1G，Q30 比例≥85%；基因组 10×覆盖度≥95%，基因区覆盖度≥98%，平均覆盖深度≥100×；拼接后数据 SCAFFOLD 数量＜100 个，Contig 数量＜200 个。使用 Trimmomatic v0.39 对下机的原始数据进行测序接头去除及低质量数据过滤，使用 SPAdes v3.15.5 对过滤后的数据进行拼接后，上传至 SeqSero2 网站（http://www.denglab.info/SeqSero2）和 SISTR 网站（https://lfz.corefacility.ca/sistr-app/），在线预测菌株血清型。

1.3.3　准确度（符合率）判定标准　以血清凝集试验结果作为金标准，其他分子血清分型结果与之比对。同一血清型所有菌株的分子血清分型结果与凝集试验结果完全一致时，为完全符合。同一血清型的分子血清分型结果中有 1 株菌不一致时，即为不符合。分子血清分型得出多种可能血清型时，但包含凝集试验血清型时为部分符合，不包含则为不符合。

1.3.4　统计学分析　应用 SPSS 30.0 软件进行统计学分析。采用 Pearson χ^2 检验对 3 种方法×3 种符合类型（完全符合 / 部分符合 / 不符合）进行分析，检验水准 α=0.05。

2　结　果

2.1　SeqSero2、SISTR 以及多重荧光 PCR 检测血清型结果比较　结果显示，三种检测方法的符合率分布存在极显著统计学差异（χ^2=47.21，P＜0.001）。SeqSero2 与 SISTR 的完全符合率均为 87.50%（84/96），显著高于多重荧光 PCR 的 52.08%（50/96）；而多重荧光 PCR 的不符合率为 28.13%（27/96），显著高于 SeqSero 的 5.21%（5/96）和 SISTR 的 12.50%（12/96）。SeqSero2 与多重荧光 PCR、SISTR 与多重荧光 PCR 的符合率分布均存在极显著统计学差异（χ^2=29.12、32.05，P 均＜0.001）；而 SeqSero2 与 SISTR 的符合率有统计学差异（χ^2=9.92，P＜0.01），说明虽然 SeqSero2 检测沙门菌血清型的符合率与 SISTR 相近，但不符合率显著低于 SISTR。见表 1。

表 1　SeqSero2、SISTR 以及多重荧光 PCR 预测血清型结果比较[*n*=96,*n*(%)]

Table 1　Comparison of serotyping results from SeqSero2, SISTR, and multiplex qPCR [*n*=96, *n*(%)]

鉴定方法	完全符合	部分符合	不符合
SeqSero2	84(87.50)	7(7.29)	5(5.21)
SISTR	84(87.50)	0(0)	12(12.50)
多重荧光 PCR	50(52.08)	19(19.79)	27(28.13)

2.2　SeqSero2 预测部分符合和不符合血清型结果分析　5 个血清型（6 个菌株）SeqSero2 预测不符合，菌株不符合率分别为 2.48%(6/242)，原因均为 *O* 抗原基因缺失或预测错误。且 5 个血清型都有预测符合 / 预测不符合的菌株，分别为：Indiana(4/2)、Infantis(3/1)、Typhimurium(3/1)、Weltevreden(3/1)、*IV* 43:z4,*z*23:–(2/1)。

7 个血清型（14 个菌株）SeqSero2 预测部分不符合，主要原因有：*C*2 血清群中仅 *O*6 不同的部分血清型不能准确分辨，SeqSero2 结果均为两个相近的血清型，如 Albany、Goldcoast、Molade、Chincol；血清抗原式相似但生化特征不一样的血清型不能准确分辨，如 Choleraesuis；一些血清型的部分菌株缺失特异性基因，也可能得到两个相近的血清型，如 Enteritidis 缺失肠炎沙门菌的特异性 *sdf*–I 基因预测为 Gallinarum，Poona 的 *O*22 相关抗原基因缺失预测为 Farmsen。见表 2。

表 2　SeqSero2 预测部分符合及不符合血清型

Table 2　Partially concordant and discordant serotypes predicted by SeqSero2

血清型	抗原式	菌株数	符合菌株数	部分符合菌株数	不符合菌株数	部分符合或不符合情况
Indiana	[1],4,12:*z*:1,7	6	4	0	2	*O* 抗原基因缺失：预测结果为 *I* –:*z*:1,7
Albany	8,[20]:*z*4,*z*24:–	4	0	4	0	Albany or Duesseldorf(6,8:*z*4,*z*24:–)
Enteritidis	[1],9,12:*g*,m:–	4	3	1	0	Enteritidis or Gallinarum([1],9,12:–:–)
Infantis	6,7,[14]:*r*:1,5	4	3	0	1	*O* 抗原基因缺失：预测结果为 *I* –:*r*:1,5
Poona	[1],13,22:*z*:1,6	4	3	1	0	Poona or Farmsen(13,23:*z*:1,6)
Typhimurium	[1],4,[5],12:*i*:1,2	4	3	0	1	*O* 抗原基因缺失：预测结果为 *I* –:*i*:1,2
Weltevreden	3,10[15]:*r*:*z*6	4	3	0	1	*O* 抗原基因错误：Sokode(9,46:*r*:*z*6)
Goldcoast	6,8:*r*:*l*,*w*	3	0	3	0	Goldcoast or Brikama(8,[20]:*r*,[*i*]:*l*,*w*)
IV 43:z4,*z*23:–	43:*z*4,*z*23:–	3	2	0	1	*O* 抗原基因缺失：预测结果为 *IV* –:*z*4,*z*23:–
Molade	8,[20]:*z*10:*z*6	3	0	3	0	Molade or Wippra(6,8:*z*10:*z*6)
Chincol	6,8:*g*,*m*,[*s*]:[*e*,*n*,*x*]	1	0	1	0	Chincol or Emek(8,20:*g*,*m*,*s*:–)
Choleraesuis	6,7:*c*:1,5	1	0	1	0	Choleraesuis or Paratyphi C(6,7,[*Vi*]:*c*:1,5) or Typhisuis (6,7:*c*:1,5)
总计		41	21	14	6	

2.3　SISTR 预测不符合血清型结果分析　表 3 显示，SISTR 预测不符合菌株分属 12 个血清型的 19 株菌，不符合率为 7.85%(19/242)。SISTR 预测不符合主要原因为 cgMLST 聚类误判，可以分为：(1)数据库的集群代表性不足，主要为一些少见血清型，如只有唯一菌株的 7 个少见血清型 Chicago、Goettingen、Kingston、Kintambo、Lagos、Mississippi、Regent；(2) 遗传特征相近血清型的 cgMLST 相似度接近，如 Havana(3 株)、Fanti(3 株)、Orion(2 株)，以及单相变异的血清型，如 *I* 4,[5],12:*i*:–(3 株)。另一个原因为抗原基因缺失或碎片化，4 株 Senftenberg 中有 1 株被错误预测为 Westhampton。

表 3　SISTR 预测不符合血清型

Table 3　Discordant serotypes predicted by SISTR

血清型	抗原式	菌株数	符合菌株数	不符合菌株数	预测错误情况(菌株数)
Senftenberg	1,3,19:*g*,[*s*],*t*:–	4	3	1	Westhampton 3,10[15][15,34]:*g*,*s*,*t*:–(1)
Havana	[1],13,23:*f*,*g*,[*s*]:–	3	0	3	Cubana [1],13,23:*z*29:–(2),Agoueve 13,22:*z*29:–(1)
I 4,[5],*12*:*i*:–	*I* 4,[5],*12*:*i*:–	3	0	3	Typhimurium[1],4,[5],12:*i*:1,2(3)
Fanti	13,23:*z*38:–	3	0	3	Havana [1],13,23:*f*,*g*,[*s*]:–(3)
Orion	3,10[15][15,34]:*y*:1,5	2	0	2	Uganda 3,10[15]:*l*,*z*13:1,5(2)
Chicago	28:*r*,[*i*]:1,5	1	0	1	Nima 28:*y*:1,5(1)
Goettingen	9,12:*l*,*v*:*e*,*n*,*z15*	1	0	1	Sandiego 4,[5],12:*e*,*h*:*e*,*n*,*z*15(1)
Kingston	[1],4,12,[27]:*g*,*s*,*t*:[1,2]	1	0	1	Senftenberg 1,3,19:*g*,[*s*],*t*:–(1)
Kintambo	[1],13,23:*m*,*t*:–	1	0	1	Larochelle 6,7:*e*,*h*:1,2(1)
Lagos	[1],4,[5],12:*i*:1,5	1	0	1	Bovismorbificans 6,8,[20]:*r*,[*i*]:1,5(1)
Mississippi	[1],13,23:*b*:1,5	1	0	1	Saintpaul [1],4,[5],12:*e*,*h*:1,2(1)
Regent	3,10:*f*,*g*,[*s*]:[1,6]	1	0	1	London 3,10[15]:*l*,*v*:1,6(1)
总计		22	3	19	

2.4　多重荧光 PCR 不符合与部分符合血清型结果分析　多重荧光 PCR 血清分型结果不符合的 27 个血清型中，有 21 个不在试剂盒鉴定范围；其中 16 个未得出鉴定结果，5 个得出错误鉴定结果，即将 *I* 4:*b*:–鉴定为 Limete、将 Oranienburg 鉴定为 Montevideo、将 Chincol 鉴定为 Emek、将 Kintambo 鉴定为 Havana/Agbeni、将 Cannstatt 鉴定为 Senftenberg/Dessau。有 6 个在鉴定目录内，但结果不符合；其中 5 个未得出鉴定结果，分别为：Pomona、Regent、Amoutive、Orion、Liverpool；1 个鉴定结果错误，将 Kingston 鉴定为 Derby。Typhimurium、*I* 4,[5],12:*i*:–、Enteritidis、London、Derby、Rissen 等常见血清型的鉴定结果完全符合。

多重荧光 PCR 血清分型有 19 株菌结果部分符合。主要表现为 *O* 抗原仅 *O*6 不同不能区分，如 Albany/Duesseldorf、Goldcoast/Brikama、Muenchen/Virginia、Newport/Bardo、Litchfield/Pakistan、Hadar/Istanbul、Molade/Wippra 等。A 群 *O*2 和 D1 群 *O*9 不能区分，如 Paratyphi A 与 Sendai、Miami。*H* 二项抗原 *H*2 的 *e,n,z*15 和 *e,n,x* 不能区分，如 Mikawasima/Hartford、Hadar/Glostrup、Sandiego/Chester。*H* 一项抗原 *H*1 的含有“*l*”抗原的不能区分，如 *l,v* 和 *l,w* 不同的 Litchfield/Fayed；*l,v* 和 *l,z*13 不同的 Uganda/Sinstorf 和 Goettingen/Napoli。*H* 一项抗原 *H*1 的含有“*g*”抗原的不能区分，如 *g,m,s* 和 *g,s,t* 不同的 Amsterdam/Westhampton；*g,m,*[*s*],[*t*]和 *f,g,*[*s*]不同的 Agbeni/Havana 等。

3　讨　论

虽然传统玻片凝集方法一直是沙门菌血清分型的金标准，但该方法不但存在耗时长[16]、操作繁琐，而且对于一些特殊的菌株无法进行鉴定：菌株自凝、交叉凝集、抗原不表达等情况，导致无法用免疫学的方法鉴定[17-18]。另外由于实验室检测人员技术和经验、血清质量等原因，以及 *H* 抗原二相诱导难度大、单相变异株出现等因素，使准确判定沙门菌血清成为各实验室面临的难题。

随着 WGS 测序成本不断降低，以及沙门菌血清分型准确率的不断提高，越来越多的实验室使用该方法代替传统血清凝集实验。本研究中，SeqSero2 预测 242 株沙门菌血清型，其中 91.74%符合，5.79%为部分符合，与徐秦等人[19]的总体符合率 97.81%、张璐等人[20]的符合率 97.6%基本一致。SeqSero2 预测部分符合的主要原因为 *C*2 血清群中存在几对血清型，仅通过有无 *O*6 抗原来区分，但 *O*6 抗原的遗传决定因子序列差异微小且表达不稳定，导致 k-mer 匹配或靶向组装难以可靠区分，SeqSero2 将这类血清型合并处理得到两个血清型结果。日常工作中遇到此类血清型，只需补做玻片凝集实验确认 *O*6 是否凝集即可正确判定。另一个原因是某些抗原式相近或一致的血清型，基因层面无法区分，只能通过生化实验来区分，如 Paratyphi C、Choleraesuis 和 Typhisuis。SeqSero2 预测不符合的主要原因为 *O* 抗原基因缺失或部分缺失，如一株 Weltevreden（3,10[15]:*r*:*z*6）预测错误为 Sokode（9,46:*r*:z6），通过与其他 Weltevreden 菌株进行比对，发现此株缺失 *O*-3,10_*wzx* 基因，而其他菌株同时携带 *O*-3,10_*wzx* 基因和 *O*-9,46_*wzy* 基因，导致误判为 Sokode，最终结合玻片凝集才正确鉴定其抗原表型。而导致 *O* 抗原基因缺失的原因，Laura Uelze 等人[21]认为建库试剂存在序列偏好性，导致 *O* 抗原的 *rfb* 基因簇片段化程度较高，使相关基因的小片段从基因组文库中被去除，或在组装过程中被拆分到两个 contig 中，从而影响识别。因此进行 WGS 时，可采取以下措施避免 *rfb* 基因簇片段化：提取 DNA 时避免降解，确保基因组片段完整；选择低 GC 偏好的文库制备试剂盒；优化测序参数；使用长读长测序平台。

本研究中 SISTR 预测不符合率为 7.85%（19/242）高于 SeqSero2 的 2.48%（6/242），与陈丹妮等人[22]的准确率 96.67%、Laura Uelze 等人[21]的准确率 94% 评估结果略有不同，可能是因为本研究中选用了更多的血清型（96 种），包含了 Havana、Cubana 等易混淆血清型以及罕见血清型沙门菌，由于这些血清型 cgMLST 集群分散，聚类分析时聚到其他相近血清型中。而 SISTR 采用 85%的 cgMLST 基因相似度作为聚类阈值血清型预测机制，当不同血清型的 cgMLST 相似度接近 85% 时，会被误判为同一集群。其次 SISTR 进行预测是基于组装的测序数据，这些数据因为前文提及的原因，产生低质量组装（N50＜50 000 bp）会导致 *rfb* 簇碎片化，SISTR 无法提取完整 *wzx*/*wzy* 序列，无法确定 *O* 抗原；同时组装质量差也会导致 cgMLST 核心基因断裂或缺失，使计算的相似度偏离真实值。因此，严格组装质量控制，尤其是采用长读长测序的完整基因组，可以提高 SISTR 预测准确性。此外，对于一些单相变异的血清型，如 *I* 4,[5],12:*i*:–，SISTR 基于 cgMLST 聚类方法，没有 SeqSero2 基于抗原基因方法的预测更可靠，这也是本研究中 SISTR 预测不符合率较高的重要原因。

本研究采用 12 个四重荧光 PCR 反应体系，理论上可检测 200 多种血清型。但对 96 种血清型检测的完全符合率为 52.08%，低于董晓根等人[23]报道的 85.26%（81/95），可能原因是本研究选用了更多血清型，且包含了更多的相近或者少见血清型，而导致不

能区分或错误鉴定。其最主要原因为这些相近血清型的抗原编码基因非常相似,PCR 存在交叉反应。虽然多重荧光 PCR 血清分型方法与 WGS 血清预测方法原理类似,都是基于菌株抗原基因进行判定,但由于多重荧光 PCR 方法的局限性, 检测的抗原基因数量有限,且无法区分相似度高的基因靶点,导致其检测的血清型种类和符合率都低于基因组测序方法。因此多重荧光 PCR 方法适用于应急快速检测和特定血清型的常规监测。

SeqSero2 和 SISTR 血清型预测方法准确度较高,两者结合可将准确率提升至 98%左右,在许多应用场景中可替代玻片凝集试验。但目前测序设备价格昂贵、测序流程难度大,以及细菌基因组生物信息学分析技术门槛高,制约了 WGS 血清分型在基层的应用和普及。多重荧光 PCR 血清分型技术及设备要求低,并且检测时间短,方便各级检验机构应用;但该方法具有局限性,只能准确鉴定常见血清型,仍不能完全替代传统方法。随着检测的血清型越来越丰富,不同实验室可根据自身需求建立适用于本地区的血清型检测方案。通过统计我省历年来沙门菌血清型分布,单相鼠伤寒、鼠伤寒、肠炎、伦敦、里森,5 种血清型占比达到 80%以上,因此可以针对本地区前 3 ~ 5 种血清型设计多重荧光 PCR 引物用于快速检测, 对 PCR 不能区分的,可以结合玻片凝集试验和 WGS 综合判定,从而能高效、快速、准确、低成本地对沙门菌进行血清分型。

利益冲突声明 本研究不存在任何利益冲突

参考文献

[1] 张文成,朱丽臻,李富强,等. 沙门氏菌血清型研究进展[J]. 齐鲁工业大学学报,2019,33(5):10-14.
Zhang WC, Zhu LZ, Li FQ, et al. Progress in serotype of salmonella [J]. Journal of Shandong Institute of Light Industry (Natural Science Edition), 2019, 33(5): 10-14.(In Chinese)

[2] Edwards, R P, Kauffmann, et al. A simplification of the Kauffmann-White schema [J]. American Journal of Clinical Pathology, 1952, 22 (7): 692-697.

[3] 刘兰,高晗,周培华,等. 不同血清分型沙门菌 MALDI-TOF MS 指纹图谱建立及应用[J]. 食品工业,2024,45(4):282-286.
Liu L, Gao H, Zhou PH, et al. Establishment and application of MALDI-TOF MS fingerprint of salmonella [J]. The Food Industry, 2024, 45(4): 282-286.(In Chinese)

[4] 王鲁彦,侯心娇,孙慧颖,等. 基于基质辅助激光解析电离飞行时间质谱技术的快速沙门菌血清型分型[J]. 中华流行病学杂志,2024,45(9):1266-1272.
Wang LY, Hou XJ, Sun HY, et al. Rapid serotyping of Salmonella based on matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Epidemiology, 2024, 45(9): 1266-1272.(In Chinese)

[5] 伊廷存,孟静,姚现琦,等. 沙门菌分子血清分型的鉴定方法与研究进展[J]. 中国食品卫生杂志,2023,35(1):142-147.
Yi TC, Meng J, Yao XQ, et al. Identification methods and research progress of molecular serotype of Salmonella [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2023, 35(1): 142-147.(In Chinese)

[6] Xiong D, Yuan L, Song L, et al.A new multiplex PCR for the accurate identification and differentiation of Salmonella enterica serovar Gallinarum biovars Pullorum and Gallinarum [J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 983942.

[7] Shang Y, Ye Q, Wu Q, et al. Novel multiplex PCR assays for rapid identification of Salmonella serogroups B,C1,C2,D,E,S.enteritidis, and S.typhimurium [J]. Analytical Methods, 2022, 14 (14): 1445-1453.

[8] 韩营营,段瑶,刁保卫,等. 利用实时荧光定量聚合酶链式反应快速检测鸭沙门菌[J]. 疾病监测,2019,34(4):307-311.
Han YY, Duan Y, Diao BW, et al. Application of real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction for rapid identification and detection of Salmonella Anatum [J]. Disease Surveillance, 2019, 34(4): 307-311.(In Chinese)

[9] Jean-Gilles beaubrun J, Ewing L, Jarvis K, et al. Comparison of a PCR serotyping assay, Check&Trace assay for Salmonella, and Luminex Salmonella serotyping assay for the characterization of Salmonella enterica identified from fresh and naturally contaminated cilantro[J]. Food Microbiology, 2014, 42: 181-187.

[10] Ibrahim GM, Morin PM. Salmonella serotyping using whole genome sequencing[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2993.

[11] Yang SM, Kim E, Kim D, et al. Rapid Real-Time polymerase chain reaction for salmonella serotyping based on novel unique gene markers by pangenome analysis [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12(9): 750379.

[12] Zhang SK, Yin YL, Jones MB, et al. Salmonella serotype determination utilizing high-throughput genome sequencing data[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2015, 53(5): 1685-1692.

[13] Zhang SK, den Bakker HC, Li ST, et al. SeqSero2: rapid and improved Salmonella serotype determination using whole-genome sequencing data [J]. Applied and Environment Microbiology, 2019, 85(23): e01746-1819.

[14] Yoshida CE, Kruczkiewicz P, Laing CR, et al. The salmonella in silico typing resource(SISTR):an open web-accessible tool for rapidly typing and subtyping draft salmonella genome assemblies [J]. PLOS One, 2016, 11(1): e147101.

[15] 中华人民共和国国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. GB 4789.4-2024 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:中国标准出版社,2024.
National Health Commission, State Administration for Market Regulation. GB 4789.4—2024 National Food Safety Standard - Microbiological Examination of Food: Testing for Salmonella [S]. Beijing: Standards Press of China, 2024.(In Chinese)

[16] Zuo HJ, Yang Y, Su MC,et al.Comparative genomic and antimicrobial resistance profiles of Salmonella strains isolated from pork and human sources in Sichuan, China [J]. Frontiers in Microbiology, 2025, 16: 1515576.

[17] 涂晓波,马淑棉,金晓蕾,等. 血平板 - 纸桥法在沙门氏菌血清分型中的应用探究 [J]. 现代预防医学,2024,51(22):

4184–4190.
Tu XB, Ma SM, Jin XL, et al. Study on the application of blood plate–paper bridge method in Salmonella serotyping [J]. Modern Preventive Medicine, 2024, 51(22): 4184–4190.(In Chinese)

[18] Gebremichael Y, Crandall J, Mukhopadhyay R, et al. Salmonella subpopulations identified from human specimens Express heterogenous phenotypes that are relevant to clinical diagnosis [J]. Microbiol Spectrum, 2023, 11: e01679–22.

[19] 徐秦,许海燕,王彧超,等. 全基因组测序技术鉴定沙门菌血清型的应用分析[J]. 首都公共卫生,2025,19(3):139–142.
Xu Q, Xu HY, Wang YC, et al. Application analysis of whole genome sequencing technology in the identification of Salmonella serotypes [J]. Capital Journal of Public Health, 2025, 19 (3): 139–142. (In Chinese)

[20] 张璐,沈青春,张纯萍,等. 全基因组测序技术对沙门氏菌血清型和耐药性的预测能力分析 [J]. 微生物学报,2021,61(12):4038–4047.
Zhang L, Shen QC, Zhang CP, et al. Predictive analysis of whole genome sequencing for Salmonella serotype and antimicrobial resistance phenotypes [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(12): 4038–4047.(In Chinese)

[21] Uelze L, Borowiak M, Deneke C, et al. Performance and accuracy of four Open–Source tools for in silico serotyping of salmonella spp. based on Whole–Genome Short–Read sequencing data [J]. Applied and Environment Microbiology, 2020, 86(5): e02265–19.

[22] 陈丹妮,韩营营,李杰,等. 基于基因组序列的 3 种沙门菌分子血清分型方法比较研究[J]. 疾病监测,2021,36(5):468–474.
Chen DN, Han YY, Li J, et al. Comprehensive assessment of three molecular serotyping methods of Salmonella based on genomic sequence [J]. Disease Surveillance, 2021, 36 (5): 468–474. (In Chinese)

[23] 董晓根,颜涛,石婧,等. 沙门菌玻片凝集血清分型与多重荧光 PCR 血清分型检测试剂盒方法比较 [J]. 疾病监测,2020,35(9):827–830.
Dong XG, Yan T, Shi J, et al. Comparison of salmonella serotyping methods of slide agglutination and multiple fluorescence PCR serotyping kit [J]. Disease Surveillance, 2020, 35 (9): 827–830.(In Chinese)

收稿日期:2025–11–22

(上接第 2067 页)

[15] Habimana JDD, Huang RQ, Muhoza B, et al. Mechanistic insights of CRISPR/Cas nucleases for programmable targeting and early–stage diagnosis: A review [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2022, 203: 114033.

[16] Dronina J, Samukaite–Bubniene U, Ramanavicius A. Towards application of CRISPR–Cas12a in the design of modern viral DNA detection tools (Review)[J]. Journal of Nanobiotechnology, 2022, 20 (1): 41.

[17] Yao Z, He K, Wang H, et al. Tuning the dynamic reaction balance of CRISPR/Cas12a and RPA in one pot:a key to Switch nucleic acid quantification[J]. ACS Sens, 2024, 9(7): 3511–3519.

[18] Zhao F, Hu YM, Fan ZL, et al. Rapid and sensitive one–tube detection of mpox virus using RPA–coupled CRISPR–Cas12 assay [J]. Cell Rep Methods, 2023, 3(10): 100620.

[19] Lin CH, Zhou J, Gao NN, et al. Establishing a pulmonary aspergillus fumigatus infection diagnostic platform based on RPA–CRISPR–Cas12a [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2024, 40(4): 116.

[20] 王雪琪, 何纳. CRISPR 检测技术应用于核酸现场即时检测系统综述[J]. 中华疾病控制杂志,2024,28(11):1344–1348, 1360.
Wang XQ, He N. Systematic review of CRISPR applied to point–of–care nucleic acid detection [J]. Chinese Journal of Disease Control & Prevention, 2024, 28(11): 1344–1348, 1360.(In Chinese)

[21] Qian WD, Wang XF, Huang J, et al. Sensitive and rapid RT–RPA–Cas12a–mediated detection method capable of human rhinovirus A and/or C species by targeting VP4 [J]. Virus Research, 2023, 323: 199001.

[22] Cheng M, Tan CW, Xiang B, et al. Chain hybridization–based CRISPR–lateral flow assay enables accurate gene visual detection[J]. Analytica Chimica Acta, 2023, 1270: 341437.

[23] Kang TJ, Lu JM, Yu T, et al. Advances in nucleic acid amplification techniques (NAATs): COVID–19 point–of–care diagnostics as an example[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2022, 206: 114109.

[24] Zhou X, Wang SW, Ma Y, et al. On–Site and visual detection of the H5 subtype avian influenza virus based on RT–RPA and CRISPR/Cas12a[J]. Viruses, 2024, 16(5): 753.

[25] Kang JS, Seo MR. Development of reverse–transcription loop–mediated isothermal amplification assays for point–of–care testing of human influenza virus subtypes H1N1 and H3N2 [J]. Genomics & Informatics, 2022, 20(4): e46.

收稿日期:2025–12–25