

ICS 11.020

CCS C 04

团 体 标 准

T/CPMA XXX—2022

病原微生物菌（毒）种分离和鉴定方法

施万菌

Isolation and identification of pathogenic microorganisms—*Shewanella* spp.

（征求意见稿）



王多春

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持文件一并附上。

202×-×-× 发布

202×-×-× 实施

中华预防医学会 发布

目 次

前 言..... II

引 言..... III

1 范围..... 1

2 规范性引用文件..... 1

3 术语和定义..... 1

4 缩略语..... 2

5 设备和材料..... 2

6 培养基和试剂..... 2

7 分离和鉴定程序..... 3

8 操作步骤..... 4

附录 A（资料性）施万菌病原学和感染特点..... 7

附录 B（规范性）培养基和试剂..... 8

附录 C（资料性）施万菌种水平的鉴定（MLSA 法） 11

参考文献..... 11

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中华预防医学会归口。

本文件起草单位：中国疾病预防控制中心传染病预防控制所、马鞍山市疾病预防控制中心、中国疾病预防控制中心、中日友好医院、北京市顺义区疾病预防控制中心。

本文件主要起草人：王多春、汪永禄、魏强、鲁炳怀、李颖、朱明、姜孟楠、代航、蔡红艳、肖悦、高鹤、白雪梅。

引 言

施万菌属 (*Shewanella* spp.)，在分类学上属于变形菌门； γ -变形菌纲；交替单胞菌目；施万菌科。是危害人类健康的机会致病菌。自 1985 年被正式命名至今已陆续报道了超过 70 个种。随着施万菌引起感染病例数的增加，感染所致疾病对公共卫生和人类健康构成了较严重的威胁。作为一种新发病原菌，目前仍缺乏标准的施万菌分离和鉴定方法。传统鉴定方法基于细菌形态、培养特性及生理生化结果，对于种间表型特征比较相似的施万菌属并不适用。现有商品化细菌鉴定系统数据库中，由于纳入施万菌种类非常有限，也远不能满足施万菌的鉴定要求，易造成误检和漏检。

目前国内外尚无施万菌分离、鉴定方面的相关标准。本文件在参考国内外研究进展的基础上，经系统性实验优化后，建立了施万菌分离、表型及生化初筛、属特异的核酸检测，以及对施万菌在种水平上准确鉴定的分子生物学方法。

病原微生物菌（毒）种分离和鉴定方法

施万菌

1 范围

本文件规定了施万菌的分离和鉴定方法。

本文件适用于全国各级病原微生物菌（毒）种保藏机构，以及涉及人间传染的施万菌研究、教学、检测、诊断等相关活动的机构。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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。

T/CPMA 011 病原微生物菌（毒）种保藏数据描述通则

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

病原微生物 pathogenic microorganisms

可以侵犯人、动物，引起其感染甚至传染病的微生物。

注：包括细菌、病毒、真菌、立克次体等。

[来源：中华人民共和国生物安全法（2020年10月17日）第八十五条（六），有修改]

3.2

菌（毒）种 microorganism strains

可培养的，人间传染的病毒、细菌、真菌、立克次体等具有保存价值的，经鉴定、分类并给予固定编号的微生物。

[来源：T/CPMA 011 病原微生物菌（毒）种保藏数据描述通则，有修改]

3.3

施万菌属 *Shewanella* spp.

革兰染色阴性菌、具有单极鞭毛、兼性厌氧，主要生化特征为氧化酶、过氧化氢酶阳性，可产H₂S，广泛分布于海洋环境和水生生物中，可造成海产品、禽畜肉制品腐败，是水生动物和人类的机会致病菌，在人体可导致皮肤和软组织感染、菌血症、肝胆疾病、中耳炎和其他感染。

注：详细资料参见附录 A。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

bp：碱基对（Base pair）

MLSA：多位点序列分析（Multilocus Sequence Analysis）

PCR：聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction）

5 设备和材料

- 5.1 冰箱：4℃~8℃，-20℃，-80℃。
- 5.2 恒温培养箱：36℃±1℃。
- 5.3 离心机：离心力≥20000 g。
- 5.4 天平：感量 0.001 g。
- 5.5 显微镜：10 倍~100 倍，有相差功能。
- 5.6 培养皿：直径 90 mm 或 60 mm。
- 5.7 pH 计或 pH 比色管或精密 pH 试纸。
- 5.8 震荡器。
- 5.9 全自动微生物生化鉴定系统。
- 5.10 飞行时间质谱仪。
- 5.11 微量移液器：量程 10 μL、200 μL 和 1000 μL。
- 5.12 无菌刻度移液管：10 mL。
- 5.13 无菌离心管：1.5 mL、15 mL 和 50 mL。
- 5.14 无菌吸头：10 μL、200 μL 和 1000 μL。
- 5.15 无菌 PCR 管：0.2 mL。
- 5.16 基因扩增仪。
- 5.17 水平电泳仪：包括电源、电泳槽、胶槽和梳子。
- 5.18 凝胶成像系统。

6 培养基和试剂

- 6.1 施万菌增菌液：配制方法按照附录 B.1。
- 6.2 硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖（TCBS）琼脂：配制方法按照附录 B.2。
- 6.3 营养琼脂：配制方法按照附录 B.3。
- 6.4 三糖铁琼脂（TSI）：配制方法按照附录 B.4。
- 6.5 革兰染色液：配制方法按照附录 B.5.1~B.5.3。
- 6.6 氧化酶试剂：配制方法按照附录 B.6。
- 6.7 属特异性 PCR 引物：合成方法按照表 1。
- 6.8 灭菌去离子水。
- 6.9 0.85 %灭菌生理盐水。
- 6.10 10×PCR 反应缓冲液。
- 6.11 25 mmol/L MgCl₂。
- 6.12 dNTPs:dATP、dTTP、dGTP、dCTP 每种浓度为 2.5 mmol/L。
- 6.13 5 U/L *Taq* 酶。

6.14 琼脂糖。

6.15 5×TBE 电泳缓冲液：配制方法按照附录 B.7。

6.16 DNA 分子量标准 (DNA Marker)：范围 100 bp~2000 bp。

7 分离和鉴定程序

分离和鉴定程序见图 1。

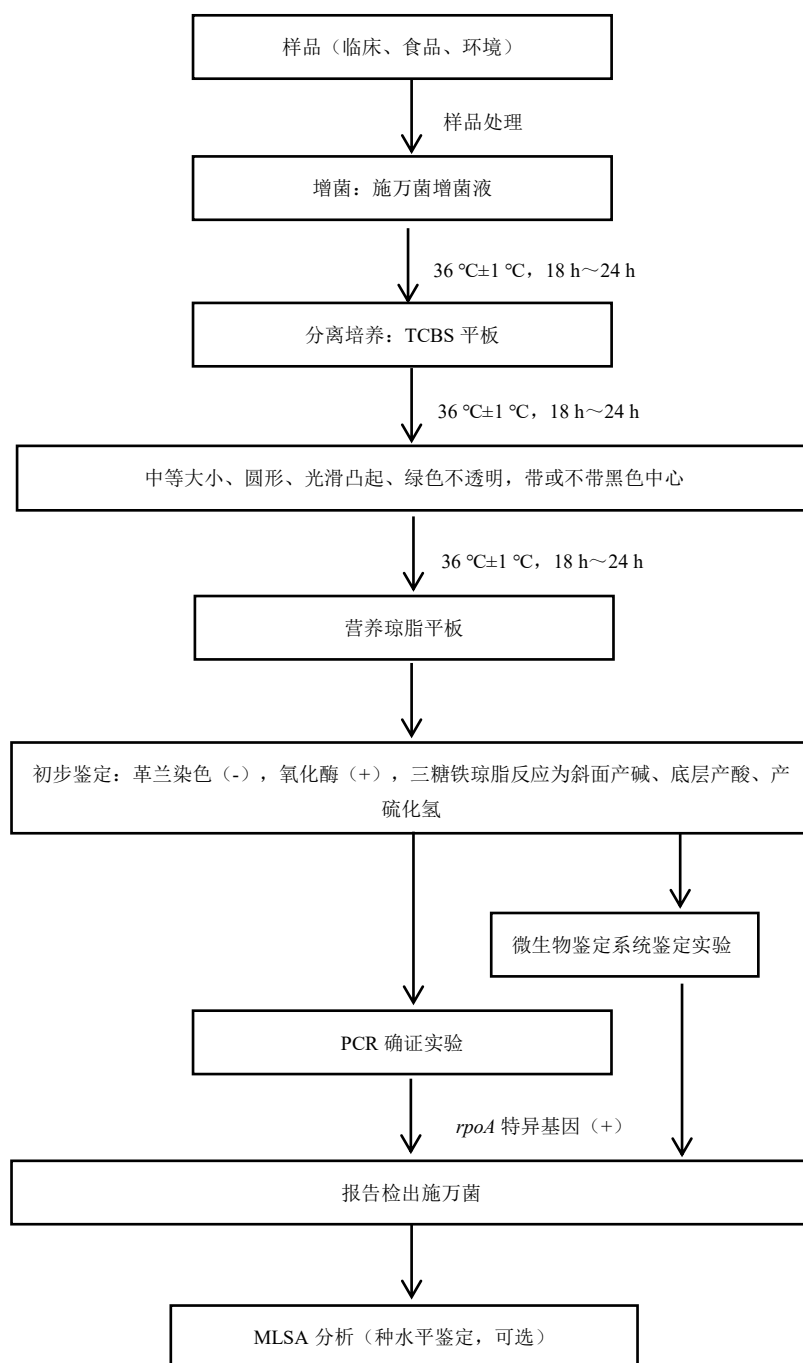


图 1 施万菌分离鉴定流程图

8 操作步骤

8.1 样品类型和处理

8.1.1 样品类型

8.1.1.1 临床样品：包括粪便、尿液、呕吐物、痰液、脑脊液、肛拭子、皮肤化脓性病灶等。

8.1.1.2 食品样品：包括乳制品、肉制品、水产制品、即食蛋制品、粮食制品、即食豆制品、即食果蔬制品等预包装食品。

8.1.1.3 环境样品：包括水体、市场各水产或肉类档口、各超市生鲜类柜台和餐厅厨房的环境，包括案板、器具物表、餐具、储存冰箱或冷库内表面、污水、工作人员手部等多点涂抹样品。

8.1.2 样品处理

8.1.2.1 临床样品：以无菌操作称取待检样品 0.5 g (mL) [不足 0.5 g (mL) 取其全部]，加入装有 10 mL 施万菌增菌液的试管中，震荡混匀。

8.1.2.2 食品样品：以无菌操作取食品样品 25 g (mL) [不足 25 g (mL) 取其全部]，加入装有 225 mL 施万菌增菌液的均质袋，或放入盛有 225 mL 施万菌增菌液的无菌锥形瓶中，用拍击式均质器均质 1 min ~2 min，震荡混匀。

8.1.2.3 环境样品：环境物体表面，使用灭菌干燥棉拭子于 10 mL 施万菌增菌液内浸润后，在物体表面的适当部位来回均匀涂抹进行样品采集，再用灭菌剪刀剪去棉签手接触部分，将棉拭子放入增菌液试管中，震荡混匀。环境水体样品量取样品 50 mL，加入装有 450 mL 施万菌增菌液的无菌锥形瓶中，震荡混匀。

8.2 增菌

将样品匀液置于恒温生化培养箱，36 °C ± 1 °C 培养 18 h ~24 h。

8.3 分离培养

用无菌接种环取增菌液，划线接种 TCBS 琼脂平板，于恒温培养箱 36°C ± 1°C 培养 18 h ~24 h。施万菌在 TCBS 琼脂培养基上疑似菌落为中等大小、圆形、光滑凸起、绿色不透明，带或不带黑色中心。挑取 3 个或以上可疑菌落，划线接种营养琼脂平板，于恒温培养箱 36°C ± 1 °C 培养 18 h ~24 h。

8.4 初步鉴定

8.4.1 氧化酶实验

取一条滤纸，沾取营养琼脂上的菌落少许。然后加一滴二盐酸四甲基对苯二胺试剂，仅使滤纸湿润，不可过湿，在 10 s 内，菌落呈玫瑰红色然后到深紫色者为氧化酶阳性。60 s 以上出现红色者，按阴性处理。施万菌为氧化酶阳性。

8.4.2 涂片和革兰染色镜检

8.4.2.1 涂片：以灭菌接种环取一滴盐水放于清洁玻片上，然后挑取少许细菌与盐水混匀，均匀涂布。

8.4.2.2 干燥：将标本涂好后，使自然干燥，或在火焰上略烘，但防止过热。

8.4.2.3 固定：将已干燥标本在火焰上来回通过 3~4 次，可使细菌固定在玻片上。

8.4.2.4 染色：在涂片上加结晶紫染液 1 min 后，用自来水冲洗，将水沥净。加碘液作用 1 min 后，水洗沥净。用 95 % 的酒精，约 10 s ~30 s，水洗。加稀释复红染 30 s，水洗，用滤纸吸干。

8.4.2.5 观察结果：涂片干燥后，加香柏油镜检。革兰阳性菌呈紫色，革兰阴性菌呈红色。施万菌为革兰阴性，呈杆状，无芽胞，有鞭毛。

8.4.3 三糖铁琼脂（TSI）实验：以接种针挑取营养琼脂上的单个菌落，先穿刺接种到 TSI 深层，距管底 3 mm~5 mm 为止，再从原路退回，在斜面自下而上划线，于恒温培养箱 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18 h~24 h 观察结果。产生黑色沉淀即表明产生了 H_2S ；发酵乳糖或蔗糖的细菌使整个培养基呈现黄色；只能利用葡萄糖的细菌则斜面变红，底部仍保持黄色。施万菌在 TSI 中的反应为斜面产碱、底层产酸、产硫化氢。

8.5 微生物系统鉴定实验

挑取疑似纯菌落，按照微生物鉴定系统的要求进行操作，鉴定结果为施万菌（*Shewanella*）或该属的某个种，如海藻施万菌（*Shewanella algae*）、腐败施万菌（*Shewanella putrefaciens*）时，为施万菌微生物鉴定系统实验阳性。微生物鉴定系统包括全自动生化鉴定仪和飞行时间质谱仪。

8.6 PCR 确证实验

8.6.1 核酸模板制备

使用 1 μL 接种环刮取营养琼脂上培养 18 h~24 h 的菌落，悬浮在 200 μL 0.85% 灭菌生理盐水中，充分打散制成菌悬液，于 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴或者金属浴维持 10 min；冰浴冷却后，13000 r/min 离心 3 min，收集上清液作为 PCR 检测的模板；所有处理后的 DNA 模板直接用于 PCR 反应或暂存于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 并当天进行 PCR 反应；否则，应在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下保存备用（1 周内）。也可用细菌基因组提取试剂盒提取细菌 DNA，操作方法按照细菌基因组提取试剂盒说明书进行。每次 PCR 反应使用国家病原微生物菌（毒）种保藏中心（CHPC）的标准株 CHPC 1.2562 作为阳性对照。同时，使用气单胞菌 CHPC 1.261 或等效标准菌株作为阴性对照，以灭菌去离子水作为空白对照，控制 PCR 体系污染。

8.6.2 PCR 反应体系

使用去离子水将合成的施万菌属特异性引物（见表 1）干粉稀释成 100 $\mu\text{mol/L}$ 储存液。继续配制成 10 \times 引物工作液 2 $\mu\text{mol/L}$ ，PCR 反应体系中引物的终浓度为 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 。将 10 \times 引物工作液、10 \times PCR 反应缓冲液、25 mmol/L MgCl_2 、2.5 mmol/L dNTPs、灭菌去离子水从 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出，融化并平衡至室温，使用前混匀；5 U/ μL *Taq* 酶在加样前从 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出。每个样品按照表 2 的加液量配制 25 μL 反应体系。

表 1 施万菌 PCR 实验用引物

基因名	引物名称	序列（5'→3'）	扩增序列长度（bp）	退火温度（ $^{\circ}\text{C}$ ）
<i>rpoA</i>	<i>rpoA</i> -27-F	GCGTCTCGTWRAHATHGAG	933	54
	<i>rpoA</i> -27-R	GGWGGCCARTTYTCNARA		

表 2 施万菌 PCR 体系配制表

试剂名称	加样体积/ μL
灭菌去离子水	9.6
10×PCR 反应缓冲液	2.5
25 mmol/L MgCl_2	2.5
2.5 mmol/L dNTPs	3.0
10×引物工作液（上游引物）	2.5
10×引物工作液（下游引物）	2.5
5 U/ μL Taq 酶	0.4
DNA 模板	2.0
总体积	25.0

8.6.3 PCR 扩增条件

94 °C 预变性 10 min，然后 94 °C 变性 30 s，54 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 60 s，进行 35 个循环，最后 72 °C 延伸 10 min。

8.6.4 扩增产物分析

PCR 扩增结束后，取 5 μL 产物上样于 1 % 琼脂糖凝胶中，在 120 V 电压下电泳 45 min，验证是否为单一条带并位于相应的片段大小位置上。

8.6.5 结果判定

rpoA 基因阳性者判定为施万菌。

8.6.6 种水平的鉴定（选做）

见附录 C （资料性附录）施万菌种水平的鉴定（MLSA 法）。

附录 A

(资料性)

施万菌病原学和感染特点

A.1 病原学

施万菌属 (*Shewanella*) 在分类学上属于交替单胞菌目施万菌科。自 1985 年被正式命名至今已陆续报道了超过 70 个种。常见的种有海藻施万菌 (*S. algae*)、腐败施万菌 (*S. putrificiens*)、厦门施万菌 (*S. xiamenensis*) 等。该菌属细菌为革兰阴性菌，其中大部分细菌属于非发酵菌，不同种施万菌在同一培养基上的菌落形态基本相同。作为海洋微生物，最初用海洋琼脂培养基 2216E 分离，形成圆形、凸起、光滑、中等大小的菌落。主要生化特征为氧化酶阳性，过氧化氢酶阳性，吲哚阴性，不发酵乳糖、分离到的菌株大多为产 H_2S 、尿素阴性、精氨酸水解酶阴性、赖氨酸脱羧酶阴性，单极性鞭毛运动，不能利用柠檬酸盐。由于种间表型特征几乎相同，区分不同菌种的生化指标有限，很难应用于施万菌种的检测鉴定。为快速从属水平甚至种水平鉴定施万菌，可以对施万菌进行管家基因的种属特异性检测，例如本团标中使用的管家基因 *rpoA* 的属特异性 PCR 检测方法，和基于六个管家基因的施万菌种水平的 MLSA 鉴定方法。

A.2 感染特点

施万菌感染在地理环境分布上，大多数病例所处位置为气候相对温暖的地区。由于水环境中相对丰富的施万菌，人类感染途径包括娱乐（潜水、海滩游玩）、职业性暴露（捕蟹、捕鱼）、食用海鲜、含有施万菌的海洋生物（海胆、鱼）所造成的穿刺伤口，或伤口直接暴露于水生环境中，由此增加了海洋获得性感染的风险。施万菌可在不愈合的伤口或慢性溃疡上定植、感染，或经血向更深的组织中进行潜行扩展而穿透创伤，可在人体脾脏、会阴和手指等多个部位导致脓肿溃疡。施万菌也可造成海产品、禽畜肉制品腐败，人类直接接触未煮熟的海产品和禽畜肉制品后，可引起中耳炎、软组织感染、肠胃炎等病症。

附录 B (规范性) 培养基和试剂

B.1 施万菌增菌液

蛋白胨	10.0 g
氯化钠	30.0 g
酵母粉	5.0 g
去离子水	1000 mL

将上述成分混合溶解后，校正 pH 至 7.2 ± 0.2 ，于 121°C 高压蒸汽灭菌 15 min。

B.2 硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖（TCBS）琼脂

酵母粉	5.0 g
蛋白胨	10.0 g
硫代硫酸钠	10.0 g
枸橼酸钠	10.0 g
牛胆粉	5.0 g
牛胆酸钠	3.0 g
蔗糖	20.0 g
氯化钠	10.0 g
柠檬酸铁	1.0 g
麝香草酚兰	0.04 g
琼脂	15.0 g
去离子水	1000 mL

将各成分溶于去离子水中，校正 pH 至 8.6 ± 0.2 ，加热煮沸至完全溶解，冷至 50°C 左右倾注平板备用。

B.3 营养琼脂

蛋白胨	10.0 g
氯化钠	10.0 g
牛肉膏	3.0 g
琼脂	15.0 g
去离子水	1000 mL

将上述成分混合溶解后，校正 pH 至 7.2 ± 0.2 ， 121°C 高压蒸汽灭菌 15 min。

B.4 三糖铁琼脂（TSI）

蛋白胨	20.0 g
牛肉浸膏	5.0 g
氯化钠	5.0 g

乳糖	10.0 g
蔗糖	10.0 g
葡萄糖	1.0 g
酚红	0.025 g
硫酸亚铁铵	0.2 g
硫代硫酸钠	0.2 g
琼脂	12.0 g
去离子水	1000 mL

除酚红和琼脂外，将其它成分加于 400 mL 去离子水中，搅拌均匀，静置约 10 min，加热使完全溶化，冷却至 25℃左右校正 pH 至 7.4 ± 0.2 。另将琼脂加于 600 mL 去离子水中，静置约 10 min，加热使完全溶化。将两液混合均匀，加入 5% 酚红水溶液 5 mL，混匀，分装小号试管，每管约 3 mL。于 121℃ 高压蒸汽灭菌 10 min 或 115℃ 高压蒸汽灭菌 15 min，制成高层斜面，冷却后呈桔红色，放 2℃~8℃ 条件下备用。

B.5 革兰染液

B.5.1 结晶紫染色液

结晶紫	1.0 g
95%乙醇	20 mL
1%草酸铵水溶液	80 mL

将结晶紫完全溶解于乙醇中，然后与草酸铵水溶液混合。

B.5.2 革兰碘液

碘	1.0 g
碘化钾	2.0 g
去离子水	300 mL

将碘与碘化钾先行混合，加入去离子水少许，充分振摇，待完全溶解后，加去离子水定容至 300 mL。

B.5.3 沙黄复染液

沙黄	0.25 g
95%乙醇	10 mL
去离子水	90 mL

将沙黄溶解于乙醇中，然后用去离子水稀释。

B.6 氧化酶试剂

二盐酸四甲基对苯二胺	1.0 g
去离子水	100 mL

称取 1.0 g 二盐酸四甲基对苯二胺，加入去离子水少许，充分振摇，待完全溶解后，加去离子水定容至 100 mL。冰箱内避光保存，在 7 天之内使用。

B.7 5×TBE 电泳缓冲液

Tris 碱	54.0 g
硼酸	27.5 g
Na ₂ EDTA • 2H ₂ O	3.72 g
去离子水	1000 mL

将上述成分混合溶解，室温保存。琼脂糖凝胶电泳时使用浓度为 0.5×。

附录 C

(规范性)

施万菌种水平的鉴定 (MLSA 法)

C.1 核酸模板制备

按照 8.6.1 进行操作。

C.2 PCR 反应体系

管家基因的上下游引物见表 C.1。PCR 反应体系按照 8.6.2 进行操作。

表 C.1 施万菌 PCR 管家基因引物

管家基因	引物名称	序列 (5'→3')	扩增序列长度 (bp)	退火温度(°C)
<i>gyrA</i>	gyrA-164F	TGAAGAACGATTGGAACAA	664	56
	gyrA-827R	TTTTCAATCAAACGAGCTTT		
<i>gyrB</i>	UP-1	GAAGTCATCATGACCGTTCTGCA	1256	58
	UP-2r	AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCC		
<i>infB</i>	infB-1426F	ATGCCACAGACTATTGAAGC	830	56
	infB-2255R	GCATCAGCACGAACGTTAAA		
<i>recN</i>	recN-415F	AGTGAGCATCAACTGACC	863	54
	recN-1277R	GGTTGTAAAGGTTGCCCTGGGTT		
<i>rpoA</i>	<i>rpoA</i> -83F	TGGAGCCGCTTGAGCGTGTTT	751	56
	<i>rpoA</i> -833R	ATGTAATGAATCGCTTCGGC		
<i>topA</i>	topA-70F	GAATTCATCGTTAAGTCGAG	860	60
	topA-929R	CGCTGGGCCATCATCATGTT		

C.3 PCR 扩增条件

94 °C 预变性 10 min, 然后 94 °C 变性 30 s, 54~60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 进行 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。对于上述 6 对管家基因, PCR 扩增的退火温度见表 C1。

C.4 扩增产物分析

PCR 扩增结束后, 取 5 μL 产物于 1%琼脂糖凝胶中, 在 120 V 电压下电泳 45 min, 验证是否为单一条带并位于相应的片段大小位置上。剩余产物使用相应管家基因引物进行双向测序。

C.5 构建 MLSA 进化树

将测序获得的实验菌株 *gyrA*、*gyrB*、*infB*、*recN*、*rpoA* 和 *topA* 基因分别对应大肠杆菌 56-1455、247-744、337-1446、1519-2181、565-1200、139-756 和 106-768 的基因位点截齐, 然后将六个管家基因序列按 *gyrA*-*gyrB*-*infB*-*recN*-*rpoA*-*topA* 顺序依次串联。并以施万菌种模式菌株相应管家基因序列作为参

考（见表 C.2），参考序列的截齐与串联同实验菌株序列。汇总实验菌株与模式菌株六个基因的串联序列，利用 MEGA 软件，对六基因串联序列进行邻接法（Neighbour-Joining）系统进化树构建，替代模型选择 Kimura 两参数模型（Kimura's 2-parameter）；空位处理原则使用成对删除（pairwise deletion）选项；自展分析（bootstrap analysis）设定为 1000 次重复抽样，根据系统进化树聚类结果进行实验菌株种水平的鉴定。

表 C.2 施万菌管家基因参考序列在 GenBank 中的序列号

管家基因	GenBank 中模式菌株参考序列号
<i>gyrA</i>	MH090144 - MH090185
<i>gyrB</i>	MH090186 - MH090202
<i>infB</i>	MH090203 - MH090244
<i>recN</i>	MH090245 - MH090286
<i>rpoA</i>	MH090287 - MH090328
<i>topA</i>	MH090329 - MH090370

C.6 结果判定

实验菌株与某种施万菌 MLSA 进化树分支聚类为一簇，则该实验菌株判定为该种施万菌。

参考文献

- [1] Janda JM, Abbott SL. The genus *Shewanella*: from the briny depths below to human pathogen. Crit Rev Microbiol. 2014; 40(4):293-312.
 - [2] Fang Y, Wang Y, Liu Z, Dai H, Cai H, Li Z, Du Z, Wang X, Jing H, Wei Q, Kan B, Wang D. Multilocus Sequence Analysis, a Rapid and Accurate Tool for Taxonomic Classification, Evolutionary Relationship Determination, and Population Biology Studies of the Genus *Shewanella*. Appl Environ Microbiol. 2019;85(11):e03126-18.
 - [3] Zhang F, Fang Y, Pang F, Liang S, Lu X, Kan B, Xu J, Zhao J, Du Y, Wang D. Rare *Shewanella* spp. associated with pulmonary and bloodstream infections of cancer patients, China: a case report. BMC Infect Dis. 2018;18(1):454.
 - [4] Fang Y, Wang Y, Liu Z, Lu B, Dai H, Kan B, Wang D. *Shewanella carassii* sp. nov., isolated from surface swabs of crucian carp and faeces of a diarrhoea patient. Int J Syst Evol Microbiol. 2017; 67(12):5284-5289.
 - [5] 汪永禄, 王多春, 詹圣伟, 郑锦绣, 刘燕, 陶勇, 石志峰, 郝民, 于礼, 阚飙. 从食物中毒患者标本中分离鉴定海藻和腐败施万菌. 中华流行病学杂志, 2009; 30(8), 836-836.
 - [6] 蔡红艳, 方玉洁, 于可艺, 黄振洲, 代航, 王多春. 基于 16S rRNA 和 gyrB 基因的施万菌种水平鉴定分析. 疾病监测, 2021; 36(1):42-47.
 - [7] Wang D, Wang Y, Huang H, Lin J, Xiao D, Kan B. Identification of tetrodotoxin-producing *Shewanella* spp. from feces of food poisoning patients and food samples. Gut Pathog. 2013;5(1):15.
 - [8] Yu K, Huang Z, Li Y, Fu Q, Lin L, Wu S, Dai H, Cai H, Xiao Y, Lan R, Wang D. Establishment and Application of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry for Detection of *Shewanella* Genus. Front Microbiol. 2021;12:625821.
-

中华预防医学会

《病原微生物菌（毒）种分离和鉴定方法 施万菌》团体标准

编制说明

王多春



（一）任务来源。2019年12月，由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所牵头，组织中国疾病预防控制中心、马鞍山市疾病预防控制中心联合申报了《施万菌分离和鉴定方法》团体标准。根据2019年12月24日《中华预防医学会关于公示 2019年度第一批团体标准立项项目的通知》，经专家会审，《施万菌分离和鉴定方法》（以下简称团标）正式批准立项。

（二）协助单位。团标批准立项后，2020年4月，按照《中华预防医学会团体标准管理办法》等有关规定，由联合申报单位，即中国疾病预防控制中心传染病预防控制所，中国疾病预防控制中心、马鞍山市疾病预防控制中心成立团标起草小组。起草过程中，中日友好医院、北京市顺义区疾病预防控制中心也作为协助单位参加了本团标的起草工作。

（三）主要工作过程。

1、开展资料收集和调研。起草小组成立后，各成员分工协作，收集相关国内外资料，并对国内有关单位开展需求调研，为起草工作做好充分准备。

2、草拟团标初稿。根据申请内容及前期资料收集和调研情况，牵头单位成员于2020年8月草拟了团标初稿，以备起草小组讨论修改。

3、召开起草小组会议。经过认真准备，起草小组于2020年11月5日召开第一次工作研讨会，就团标起草背景、编制要求，以及编制内容与工作安排进行研讨。第一次研讨会后，起草组建立了会议纪要制度、会后工作推进机制等措施。此后，起草小组分别于2020年11月29日、2021年1月22日、2月7日、4月29日、6月8日、7月8日召开了三次起草组会议，并对有关意见进行梳理，形成会议纪要。

4、组织专家研讨过程稿。在2021年1月11日、3月25日、5月25日召开起草小组会议的同时，还邀请了有关专家，对团体“起草过程稿”进行论证，起草组认真听取专家意见，对有关意见进行梳理，并修改完善了团标，形成团标“征求意见稿”。

5、论证征求意见稿。在起草组讨论、专家研讨等会议基础上，起草组先后组织了三次征求意见稿论证会。论证会邀请了超过12位相关领域专家，近20人次、起草组成员所在单位之外的专家召开征求意见稿论证会。

2021年5月8日，在苏州召开了第一次征求意见稿论证会，邀请了10位相关领域专家，征求超过10份相关专家的意见。会上还邀请中华预防医学会卫生标准工作委员会冯岚秘书长，对团标的编写说明、如何体现编写过程，以及具体的编排、格式、顺序等内容，做了详细解读，并提出有建设性的建议。2021年7月4日，在北京召开了第三次征求意见稿论证会，邀请了7位相关领域专家，征求超过10份相关专家的意见。

除了组织专门的征求意见稿论证会，起草组还在与本团标内容有关的会议上，以各种方式征求相关专家的意见。发送“征求意见稿”单位数13个；收到“征求意见稿”后，回函单位：13个。没有回函的

单位数：0个。提出修改建议82条，其中采纳或部分采纳82条，未采纳0条。在上述征求意见稿论证会、数次相关会议的基础上，对所有专家提出的意见进行汇总，起草组修改形成团标上报“征求意见稿”。

（四）起草组成员及其所做的主要工作。

起草组成员主要来自中国疾病预防控制中心传染病预防控制所、中国疾病预防控制中心、马鞍山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王多春研究员作为团标起草负责人，承担起草、工作组织、研讨论证及修订工作，并负责文稿全面审核。中国疾控中心魏强研究员，组织协调各成员分工协助、主持召开会议研讨与论证。中国疾控中心姜孟楠副研究员、赵元元助理研究员整理专家意见并根据专家意见及时修改完善。

马鞍山市疾病预防控制中心汪永禄副主任医师、朱明主任医师，中日友好医院的鲁炳怀教授、北京市顺义区疾病预防控制中心的李颖副主任技师也承担了起草及修订工作。并对本团标中施万菌的分离和鉴定方法，组织三家检测单位进行了实验验证工作。

二、标准编制原则和确定标准主要内容

（一）编制原则。

1、权威性。本团标是《病原微生物菌（毒）种分离和鉴定方法 施万菌》，起草小组的牵头单位，中国疾控中心传染病所主要的主要研究对象之一是病原细菌，起草人所在部门为中国疾控中心传染病所菌（毒）种保藏细菌分中心，熟悉病原菌保藏的工作业务和相关技术。联合申报单位中国疾控中心是国家卫生健康委指定的国家级病原微生物菌（毒）种保藏中心。马鞍山市疾病预防控制中心长期从事施万菌现场分离检测工作。其中作为标准编写牵头单位的中国疾控中心传染病所，

通过对施万菌中国分离株的研究，获得一些研究成果：1. 首次从两起聚餐性食物中毒腹泻患者标本中分离到海藻施万菌和腐败施万菌，并证实其中一起食物中毒来源的海藻施万菌属于同一克隆群菌株，为该菌作为食物中毒的病原菌提供了线索，提示施万菌在我国存在着较大的食源性感染风险。2. 从聚餐性食物中毒腹泻患者标本中分离到的海藻施万菌和腐败施万菌培养悬液中，检测到河豚毒素（TTX），小鼠实验证实，该TTX有很强的河豚毒素生物活性，为TTX的微生物来源提供了线索。3. 发现和命名了施万菌属的一个新种，命名为卡拉西施万菌（*Shewanella carassii*），同时证实该新种存在于我国的不同区域，提示该新种分布的广泛性。4. 鉴定了两种由罕见施万菌导致的肺部感染和菌血症病例。确认其属于两种罕见的施万菌种（*S. haliotis* 和 *S. upenei*）。*S. haliotis*是首次在国内报道除海藻施万菌和腐败施万菌之外，与临床感染有关的施万菌种类，*S. upenei*更是在国际上首次报道与临床感染有关的施万菌种类。5. 在国际上首次建立了基于MLSA的施万菌种水平鉴定方法，该方法能够对目前已知的施万菌属在种水平上鉴定，同时，还能鉴定施万菌属可能出现的新种。

起草小组成员来自上述单位从事病原微生物疾控、临床、科研领域的权威团队和专家，代表了我国病原微生物保藏领域最高水平。

2、民主性。除起草小组来自各指定保藏机构外，起草过程中，起草小组广泛征求疾控、临床、科研、教学、诊断等涉及病原微生物工作的各领域单位与专家意见。通过调研各单位，听取各单位、各领域专家的需求与建议，为起草工作做好准备，并及时对团标过程稿修改完善。

3、实用性。团标起草坚持从实际出发，从涉及疾控、临床、科研、教学、诊断等涉及施万菌分离和鉴定工作需求出发，重点从目前困扰的问题，如传统的基于细菌形态、培养特性、及生理生化结果的鉴定方法，对于种间表型特征比较相似的施万菌属并不适用。现有的商品化细菌鉴定系统的数据库中，由于纳入的施万菌种类非常有限，也远远不能满足施万菌的鉴定要求，易造成误检和漏检。本团标解决了上述问题。

4、科学性。目前国内外尚无施万菌分离、鉴定方面的相关标准。起草小组广泛收集了国内外相关资料，在参考国外研究进展的基础上，经系统性实验优化后，提出了施万菌的分离、表型及生化初筛、属特异的核酸检测，以及对施万菌在种水平上准确鉴定的分子生物学方法。确保团标内容的科学性、严谨性。

（二）主要内容。

1、基本框架。团标包括了前言、范围、规范性引用文件、术语和定义、缩略语、培养基和试剂、分离和鉴定程序、操作步骤、附录、参考文献等主要部分。

2、主要内容。主要内容是施万菌的操作步骤，包括标本类型和处理、增菌、分离培养、初筛实验、微生物鉴定系统实验、PCR 确证实验、核酸模板制备、PCR 反应体系、PCR 扩增条件、增产物分析、结果判定。

3、资料性附录。包括附录A，（资料性）施万菌病原学；附录B，（规范性）培养基和试剂；附录C，（规范性）施万菌种水平的鉴定（MLSA法）。这些附录可更好的指导有关单位使用。

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

编制过程中，起草组利用马鞍山市疾控中心，马鞍山市临床检验中心等单位现场条件，进行测试验证，与一线工作人员不断沟通磨合，检测指标实际应用的实用性与效果。

通过编制“施万菌分离和鉴定方法”，对施万菌的分离培养和种水平快速分子鉴定方法进行规范化与统一化，制定明确有效的技术与程序，以及相应的质量控制。通过该标准的推行，能全面的监测施万菌在我国的感染及流行状况，并使施万菌感染病患者能得到早期诊断和及时准确的治疗。使得该标准中的监测与检测方法达到国际先进技术水平，同时也可保障在我国各地不同层级的疾控部门与临床检测机构中都可有效施行。

四、标准涉及的相关知识产权说明

本标准起草过程中，特别关注有关知识产权问题，注意有关引用和参考的知识产权保护。规范中所涉及的术语定于引自人民卫生出版社出版的《医学微生物学》《传染病学》教材等国家权威资料。我们研究团队在国内最早开展施万菌的分离和鉴定工作，我们已经收集到完整的施万菌属60个种的模式菌株，以此建立了施万菌的多序列位点分析（MLSA）方法，通过基因组、表型和进化的分析，我们建立的MLSA能够快速、准确地在种水平鉴定施万菌。通过MLSA标准序列，对我们分离到的近百株施万菌做了种水平的确定。团标中也引用了我们的下列文献：

1. Fang Y, Wang Y, Liu Z, Dai H, Cai H, Li Z, Du Z, Wang X, Jing H, Wei Q, Kan B, Wang D. Multilocus Sequence Analysis, a Rapid and Accurate Tool for Taxonomic Classification, Evolutionary Relationship Determination, and Population Biology Studies of the Genus *Shewanella*. Appl Environ Microbiol. 2019;85(11):e03126-18.

2. Zhang F, Fang Y, Pang F, Liang S, Lu X, Kan B, Xu J, Zhao J, Du Y, Wang D. Rare *Shewanella* spp. associated with pulmonary and bloodstream infections of cancer patients, China: a case report. BMC Infect Dis. 2018;18(1):454.
3. Fang Y, Wang Y, Liu Z, Lu B, Dai H, Kan B, Wang D. *Shewanella carassii* sp. nov., isolated from surface swabs of crucian carp and faeces of a diarrhoea patient. Int J Syst Evol Microbiol. 2017; 67(12):5284-5289.
4. 汪永禄, 王多春, 詹圣伟, 郑锦绣, 刘燕, 陶勇, 石志峰, 郝民, 于礼, 阚飙. 从食物中毒患者标本中分离鉴定海藻和腐败施万菌. 中华流行病学杂志, 2009; 30(8), 836-836.
5. 蔡红艳, 方玉洁, 于可艺, 黄振洲, 代航, 王多春. 基于 16S rRNA 和 *gyrB* 基因的施万菌种水平鉴定分析. 疾病监测, 2021; 36(1):42-47.
6. Wang D, Wang Y, Huang H, Lin J, Xiao D, Kan B. Identification of tetrodotoxin-producing *Shewanella* spp. from feces of food poisoning patients and food samples. Gut Pathog. 2013;5(1):15.
7. Yu K, Huang Z, Li Y, Fu Q, Lin L, Wu S, Dai H, Cai H, Xiao Y, Lan R, Wang D. Establishment and Application of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry for Detection of *Shewanella* Genus. Front Microbiol. 2021;12:625821.

五、采用国际标准的程度与水平的简要说明

目前国内外尚无施万菌分离、鉴定方面的相关标准。起草小组广泛收集了国内外相关资料，在参考国外研究进展的基础上，经系统性实验优化后，提出了施万菌的分离、表型及生化初筛、属特异的核酸检测，以及对施万菌在种水平上准确鉴定的分子生物学方法。使得该标准中的监测与检测方法达到国际先进技术水平。

六、重大意见分歧的处理经过和依据

在标准起草过程中，起草组高度重视各单位和专家提出的有关意见，特别是一些重大分歧性意见。针对重大意见分歧，起草组秉持开放原则，充分听取各方代表意见，多次召开会议研讨，寻找各方共同接受内容，并逐渐达成共识，形成征求意见稿等重要阶段性材料。总

结有关重大意见分歧，主要表现在团标体例结构上、以及具体指标如何展开描述等内容上。随着工作发展需要，起草组将会不断调整增加指标，以适应并为实际工作提供技术支撑。

七、其他应予说明的事项

施万菌属 (*Shewanella*)，又称希瓦氏菌属，为革兰氏阴性、氧化酶阳性、产 H₂S 的兼性厌氧菌。广泛分布于水生环境及海洋生物中。自 1985 年施万菌属被正式命名后，至今已陆续报道了超过 70 个种。施万菌是人类的机会致病菌，对人类健康构成了严重威胁。腐败施万菌 (*S. putrefaciens*)、海藻施万菌 (*S. algae*)、鲍施万菌 (*S. haliotis*)、奥奈达施万菌 (*S. oneidensis*) 和厦门施万菌 (*S. xiamenensis*) 是近十年经常从患者中分离出来的种，并且证明与患者致病直接相关。常见的施万菌感染类型包括皮肤软组织感染、菌血症、脑膜炎和心内膜炎，以及食物中毒等。由于独特的生物学意义和潜在的致病性，使得施万菌得到越来越多的关注和重视。

近几年施万菌属菌种数量的激增，反映了该属物种的多样性在不断丰富，也说明了建立快速准确的菌种鉴定方法的重要性。但现有对于施万菌属菌种分离和种水平的鉴定方法尚未健全。传统的微生物鉴定方法是基于细菌形态、培养特征及生理生化结果来实现分类鉴定的。但大部分施万菌属于非发酵菌，种间表型特征几乎相同，能用于区分不同菌种的生化指标有限，很难应用于施万菌种的检测鉴定。现有的商品化细菌鉴定系统的数据库中，如Vitek微生物分析系统和API试剂条等，只包含腐败施万菌和海藻施万菌两种结果，使得生化测定远远不能满足施万菌种的鉴定要求。分子生物学方法对于施万菌种鉴定的标准还尚为模糊。随着基因组时代的到来，基因组测序技术日趋完善

和成熟，使得微生物基因组序列的测定越来越便捷。但是，样品基因组测序的成本高、耗时长、参考基因组序列少，不适用于临床和监测中大批量菌株快速准确定种的要求。

本团标的主要成员来自国家病原微生物资源库团队，作为病原微生物资源保藏体系的一个团体标准。将名称由《施万菌分离和鉴定方法》改为《病原微生物菌（毒）种分离和鉴定方法 施万菌》。拟通过编制《病原微生物菌（毒）种分离和鉴定方法 施万菌》，对施万菌的分离培养和种属水平快速分子鉴定方法进行规范化与统一化，制定明确有效的技术方法与程序，以及相应的质量控制。通过该标准的推行，从而能全面的监测施万菌在我国的感染及流行状况，并使施万菌感染病患者能得到早期诊断和及时准确的治疗。