

人畜共患病——沙门氏菌的鉴定诊断

刘金兰

西南民族大学畜牧兽医学院，四川成都，610041；

摘要：沙门氏菌是一种常见的人畜共患肠道致病菌，是全球食源性疾病中最重要的病原体之一。本研究旨在采用简单方便的方法系统地开展沙门氏菌的鉴别诊断来阐明沙门氏菌的危害及其病原学特征。首先对小鼠进行攻毒并采集死亡小鼠的病变组织，通过病理学观察、细菌的分离培养、形态学观察、生化实验分析、凝集平板实验、PCR 扩增沙门氏菌侵袭蛋白 A (InA) 基因等方法对分离菌株的病原学特性进行分析。剖检结果显示，感染组小鼠的肝组织颜色变灰，小肠出现卡他性炎症等。培养实验显示，攻毒鼠肝脏样本在麦康凯培养基上形成了湿润灰白色菌落。经过多次纯化，最终得到了黑色的单菌落，经过革兰氏染色镜检后确定为革兰氏阴性短杆菌。生化实验结果编号为 42365，根据肠杆菌科细菌生化鉴定编码手册可判定为沙门氏菌，鉴定值为 32.7%。血清型鉴定结果显示实验组有明显的凝集颗粒，液体几乎透明，判定为阳性；对照组无凝集现象。PCR 扩增 *invA* 基因，测序鉴定 PCR 产物，结果显示扩增到 287 bp 的 *invA* 基因与沙门氏菌相符合。综上所述，本研究从攻毒小鼠肝脏内分离到的两株沙门氏菌，分期型鉴定均为沙门氏菌。

关键词：小鼠；沙门氏菌；分离鉴定

DOI：10.69979/3029-2808.25.08.016

引言

沙门氏菌 (*Salmonella*) 最初是由美国细菌学家 Salmon 和 Smith 于 1885 年发现，目前已报道 3000 多种血清型^[1]，按其抗原成分，可分为甲、乙、丙、丁、戊等基本菌组。沙门氏菌感染可导致胃肠道疾病，临床上多表现为败血症和肠炎，对人类健康造成严重威胁^[2]。畜禽食用含有一定数目沙门氏菌的饲料，可引起疾病或带菌，如猪霍乱、鸡白痢等^[3]。因此，沙门氏菌检测成为病原菌检测的重中之重。目前沙门氏菌传统的生化检测方法主要包括生化鉴定、预增菌、血清分型、选择性增菌及隔离和平板划线法等^[4]，其优点是技术成熟、结果准确性高，缺点是耗时较长。血清学鉴定也是基本方法之一，其突出缺点是由于细菌细胞表面抗原丢失或发生修饰，相同的沙门氏菌血清型其抗原性可能不同^[5]。现有的沙门氏菌免疫学检测方法包括免疫荧光法^[6]、试管凝集法^[7]、酶联免疫吸附法^[8]、免疫扩散^[9]等。常用的沙门氏菌分子生物学检测方法有实时定量 PCR^[10]、环介导等温扩增^[11]及重组酶聚合酶扩增 (RPA)^[12]等，与传统技术比较，分子生物学检测具备高灵敏性、高度特异性、时间短、自动化水平高等特征，常用于沙门氏菌的快速测定。

本研究旨在通过建立实验动物模型，剖检病理组织、

革兰氏染色、细菌培养及纯化，结合生化实验和分子生物学技术对沙门氏菌进行鉴定。这将为临床及实验室的沙门氏菌感染鉴别提供可靠的实验依据，有助于预防和控制沙门氏菌感染的传播，保障人畜公共卫生安全。

1 材料与方法

1.1 试验动物

清洁级健康 BALB/C 雌鼠若干购自成都达硕动物实验有限公司。

1.2 试剂与仪器

试剂：麦康凯培养基、SS 琼脂培养基、肠杆菌科细菌生化鉴定管、革兰氏染色试剂盒均购自杭州微生物试剂有限公司；沙门氏杆菌属诊断血清 A[~]F 购自宁波天润生物药业有限公司；TAE 溶液 (50X) 购自北京兰杰柯科技有限公司；2×Taq PCR Master Mix、DNA Maker 和细菌基因组 DNA 提取试剂盒均购自天根生化科技 (北京) 有限公司。

仪器：光学显微镜购自奥林巴斯公司；电泳仪 (DY Y-6C 型)、紫外凝胶成像分析系统均购自北京六一仪器厂；基因扩增仪购自杭州博日科技有限公司。

1.3 培养基配置

称取 56 g 琼脂培养基粉末溶于 1000 mL 纯化水中，

加热至完全溶解，冷却至 50℃左右时，倾注平皿配置成 ss 培养基。称取 50 g 麦康凯琼脂培养基粉末溶于 1000 mL 纯化水中，煮沸至溶解，冷却至 50℃左右时，分装后经 121℃，15 分钟高压灭菌。

1.4 攻毒小鼠模型的建立

攻毒组 2 只 BALB/C 小鼠，对照组 1 只，攻毒前正常条件饲养小鼠 3d 以上，攻毒组每只腹腔注射鼠伤寒沙门氏菌 0.1mL，对照组小鼠腹腔注射生理盐水 0.1mL，攻毒后每天观察小鼠的临床症状和死亡情况，剖检濒死死亡小鼠，观察内脏病理变化。

1.5 细菌分离纯化

用接种环刮取小鼠肝脏组织，分别划线接种于 S S 平板和麦康凯平板，于 37℃恒温箱中培养 18 h-24 h，根据沙门氏杆菌标准菌落形态特征，判定并挑取可疑的单个菌落，接种到 SS 琼脂培养基上，置 37℃ 培养箱中培养 18~24 h，观察菌落形态，挑取无色透明或光滑凸起的菌落分离纯化三次，最后挑取单个可疑菌落进行

革兰氏染色，镜检。

1.6 平板凝集试验

移液枪挑取单个菌落溶于 1mL 纯净水中，配置成菌液，分别吸取 30 μL 的纯净水和待检菌液，滴于清洁玻璃板上，随后分别滴加同量的血清，使血清与抗原均匀混合，涂布成直径为 1~2cm 的液面，不断轻轻摇动玻璃板，2 分种后可观察结果。

1.7 生化试验

无菌条件下，按照肠杆菌科细菌生化鉴定管说明书对纯化好的可疑菌落纯培养物进行试验，参照《伯杰氏细菌鉴定手册》中的标准判定菌株。

1.8 PCR 鉴定

参照参考文献^[12]中的方法进行 PCR 鉴定。根据西南民族大学畜牧兽医学院提供的引物序列（见表 1），预计扩增片段大小为 287bp，移液枪挑取单个菌落溶于 20 μL 纯净水中配置成菌液，以其为模板进行 PCR 扩增。

表 1 引物信息

基因	引物序列 (5'→3')	退火温度 (°C)	目的片段长度(bp)
invA	F: CTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA R: TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	61.5	287bp

1.9 目的基因的 PCR 扩增

PCR 扩增体系（总体积为 20 μL）：模板 DNA 1 μL，上下游引物各 0.5 μL，Taq 酶 10 μL，ddH₂O 8 μL。PCR 扩增程序：94° C 预变性 5 分钟，94° C 变性 30s，61.5° C 退火 30 秒，72° C 延伸 18 秒，共 25 个循环，72° C 再延伸 8 分钟。取 10 μL PCR 扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果

2.1 临床症状

接毒 11 h 后，攻毒①号小鼠昏睡，②号小鼠精神沉郁，两只小鼠仍存在翻正反射；接毒 24 h 后，小鼠均死亡（图 1-A），对照组小鼠正常（见图 1-B）。



图 1 接毒后 24h

2.2 剖检结果

剖检病理组织发现，攻毒组小鼠肝脏变灰（图 2-A，图 2-B），小肠肿胀，直肠有出血点（图 3-A，图 3-B），对照组小鼠肝脏，肠道无明显异常颜色鲜红（图 2-C，图 3-C）。



图 2 感染组与对照组小鼠剖检对比



图 3 肠道解剖对比图

2.3 分离培养与镜检

致病菌在 SS 培养基上生长出大片白色菌苔，单个菌落中间为黑色，周围透明，表面光滑湿润，边缘整齐（图 4-A）。在麦康凯培养基上的菌落为无色至浅橙色，透明或半透明，菌落中心有时为暗色（图 4-B）。进一步镜检发现致病菌呈短杆状，两端钝圆，单个或链状排列，革兰氏染色呈阴性（图 4-C）。

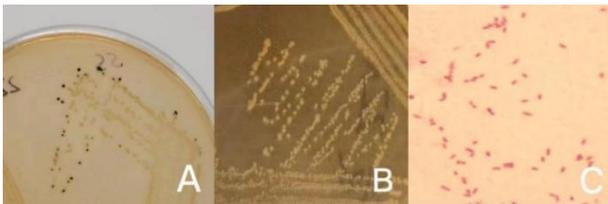


图 4 分离培养和镜检

2.4 生化鉴定

将样本加入试剂中，接种培养 24h 后（图 5），得到结果为：42365，根据肠杆菌科细菌生化鉴定编码手册可判定为猪霍乱沙门氏菌，鉴定值为 32.7%（表 2）。



图 5 生化实验反应结果

表 2 纯化可疑菌落纯培养物生化试验结果

试验	结果	单值	总值
硫化氢	+	4	4
苯丙氨酸	-	2	
葡萄糖酸盐	-	1	
靛基质	-	4	2
甲基红	+	2	
枸橼酸盐	-	1	
尿素	-	4	3
动力	+	2	
产气	+	1	
赖氨酸	+	4	6
鸟氨酸	+	2	
棉子糖	-	1	
山梨醇	+	4	5
侧金花醇	-	2	
木糖	+	1	

2.5 血清学鉴定

沙门菌属 O 多价血清 A-F 分别与攻毒组待检样品和对照组无菌水接触，攻毒组有明显的凝集颗粒，液体几乎透明，凝集试验阳性；对照组无凝集现象。



图 6 玻片凝集试验结果

2.6 PCR 鉴定

PCR 结果显示，2 个攻毒组均扩增出 287bp 左右的 *invA* 基因片段，与预期结果一致，表明分离菌为沙门氏菌。

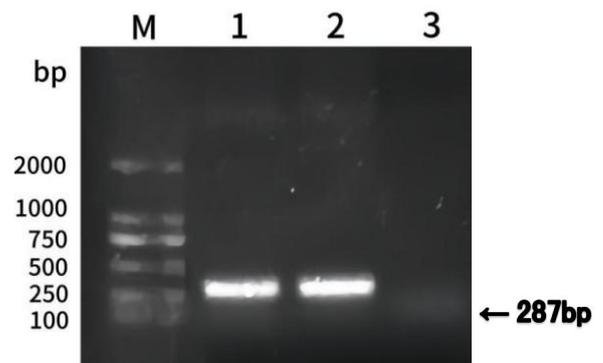


图 7 凝胶电泳结果

M: Marker; 1~2: 沙门菌阳性样本; 3: 阴性对照

3 讨论

沙门氏菌是常见的人畜共患病病原体，全球沙门氏菌引起的食源性疾病呈上升趋势，在欧美等国发展居首位或者第二位^[14]。我国曾发生多起沙门氏菌引起的食物中毒，主要菌型有鼠伤寒沙门氏菌；肠炎沙门氏菌；都柏林沙门氏菌；圣保罗沙门氏菌。不同动物感染沙门氏菌呈现不同症状：鸡感染鸡沙门氏菌后会导致急性死亡，但病理变化不明显，育成鸡感染沙门氏菌后明显特征是肝脏体积增大为正常鸡的 2 倍，由暗红色变为深紫色，肝脏上清晰可见的血凝块^[15]；断奶前后的仔猪感染后出现多处皮下水肿以及神经症状等，且发病紧急，常来不及治疗即死亡^[16]。人感染沙门氏菌主要是摄入了受污染的肉、乳、蛋等食物和饮水，通过毒力岛等机制对机体造成损害进而导致胃肠炎、副伤寒和伤寒等疾病，常见临床表现有发热、腹痛、腹泻、发烧、恶心、呕吐等，严重的会导致休克死亡，对人类健康造成了严重威胁^[17]。

而本实验中攻毒小鼠呈现昏睡、精神萎靡等症状,剖检病变组织表现出的肝损伤与肠道出血症状,与人感染后的胃肠炎型病理特征高度相似。

本研究成功从攻毒小鼠肝脏中分离鉴定出沙门氏菌,从检测技术层面看,传统生化鉴定与分子生物学方法的结合显著提升了诊断效率:生化试验通过编码手册匹配实现初步判定,而PCR技术凭借对侵袭性基因的特异性扩增,直接从核酸层面确证病原,两者互补性在本研究中得到充分体现。值得注意的是,血清学鉴定虽呈现阳性凝集反应,但实际检测中需结合多方法综合判断,避免单一技术局限性。此外本研究也印证了动物模型在病原研究中的重要价值,未来可进一步向更多的人畜共患病拓展研究,对提升畜禽疫病监测能力及保障食品安全具有现实意义。

4 结论

本研究通过攻毒小鼠并采用常规生化检测方法鉴定诊断,验证了攻毒细菌为沙门氏菌,明确了其病原学特征,为沙门氏菌临床及实验室诊断提供了一定理论依据。

参考文献

[1]李丹.沙门氏菌检测技术研究进展[J].山东畜牧兽医,2022,43(12):90-92.
[2]曾晓芳.畜产品中沙门氏菌污染的检测与控制[J].四川畜牧兽医,2003,(04):28-29.
[3]陈焱,江文婷,郝燕娟,等.饲料中沙门氏菌的污染及防控[J].广东饲料,2020,29(09):41-42.
[4]叶梁银,咎川南.食品中沙门氏菌检测方法研究分析[J].化学工程与装备,2012,(11):181-182.
[5]吴有雪,吴美娇,田亚晨,等.沙门氏菌检测生物传感器研究进展[J].食品科学,2021,42(03):339-345.
[6]孙少迪,田堯,高艺玮,等.禽源沙门氏菌荧光定量PCR方法的构建及应用[J].湖南畜牧兽医,2024,(01):4

1-45.

[7]程艺,刘桂林,王冠玉,等.内蒙古呼伦贝尔地区马沙门氏菌病流行状况及防治[J].兽医导刊,2024,(03):27-29.
[8]张琳.微生物检测技术在食品检验中的应用[J].食品安全导刊,2025,(06):122-124.
[9]肖红.鼠伤寒沙门氏菌荧光定位报告菌株的构建及其在细胞的示踪应用[D].长江大学,2023.
[10]巩莉,刘秀红.食品微生物检测中PCR技术的应用[J].中国食品工业,2024,(05):83-85.
[11]刘培海,白庆华,王凯,等.环介导等温扩增技术及扩增产物分析方法的比较[J].食品研究与开发,2024,45(11):209-218.
[12]黄国梁,王倩玉,蔺国珍,等.3种沙门氏菌RPA检测方法的建立[J].黑龙江畜牧兽医,2022,(17):79-84.
[13]吴尚仪.基于核酸提取与等温扩增一体化生物传感器的沙门氏菌快速检测方法研究[D].沈阳农业大学,2023.
[14]刘素可,张彪,路娟娥,等.沙门氏菌在食品中的生存策略及其防控的研究进展[J].食品科学,2022,43(13):218-226.
[15]肖胜.鸡沙门氏菌病的诊断与防治[J].今日畜牧兽医,2024,40(02):83-85.
[16]蒋燕慧,胡磊,黄元杰.仔猪沙门氏菌病临床诊断及体会[J].畜牧兽医科技信息,2023(12):167-169.
[17]李长妹,宋春莲,张莹,等.云南省部分地区猪源沙门氏菌的耐药性和毒力基因检测[J].动物医学进展,2024,45(08):8-14.

作者简介:刘金兰(2000.11.23),女,汉族,四川德阳,本科,西南民族大学,研究方向:动物医学