

血平板 - 纸桥法在沙门氏菌血清分型中的应用探究

涂晓波^{1,2}, 马淑棉^{1,2}, 金晓蕾^{1,2}, 匡燕云^{1,2}, 刘慧玲^{1,2}, 牛娜^{1,2},

赵芳^{1,2}, 吕敬章^{1,2}, 林燕奎^{1,2}

1. 深圳海关食品检验检疫技术中心, 广东 深圳 518000; 2. 深圳市检验检疫科学研究院

摘要:目的 综合分析血平板 - 纸桥法进行 H 抗原诱导和鉴定的影响因素, 探究其机理, 以促进该方法在沙门氏菌血清分型中的应用。方法 通过比较不同纸桥材质对 H 抗原诱导和鉴定的影响, 采用扫描电镜对不同纸桥材质表面进行扫描, 探究其影响机理, 并结合环境湿度和生理盐水用量等因素, 优化沙门氏菌血清分型的血平板 - 纸桥法实验条件。采用优化后的方法与 GB 4789.4 标准的简易平板法, 对 40 株沙门氏菌进行血清型鉴定进行比较。结果 CN110 和 CN95 硝酸纤维素膜的哑光面与普通滤纸的过桥效果相近, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 而过滤滤膜效果显著低于普通滤纸 ($P < 0.05$)。沙门氏菌在更高湿度下蔓延效果更好, 80% 湿度下与 50%、20% 组的结果相比存在显著差异 ($P < 0.0167$)。随着生理盐水量增加, 蔓延效果显著提升 ($P < 0.001$), 最优量是 15 μL 。使用两种方法对 40 株食源性沙门氏菌进行鉴定, 本研究方法能一次性准确鉴定沙门氏菌血清型, 而简易平板法需 1 至 3 次诱导。结论 本研究优化的血平板 - 纸桥法操作简便且诱导效果显著, 适合于沙门氏菌血清型的鉴定。此方法可作为沙门氏菌血清分型方法的有效补充, 提高食源性疾病的溯源效率和准确性。

关键词: 血平板 - 纸桥法; 沙门氏菌; 血清分型

中图分类号: R - 33 文献标志码: A 文章编号: 1003 - 8507(2024)22 - 4184 - 07

DOI: 10.20043/j.cnki.MPM.202403536

Study on the application of blood plate - paper bridge method in Salmonella serotyping

TU Xiao-bo*, MA Shu-mian, JIN Xiao-lei, KUANG Yan-yun, LIU Hui-ling, NIU Na,

ZHAO Fang, LV Jing-zhang, LIN Yan-kui

* Food Inspection and Quarantine Technology Center of Shenzhen Customs District, Shenzhen, Guangdong 518000, China

Abstract: **Objective** To comprehensively analyze the influencing factors of the blood plate - paper bridge method for H antigen induction and identification, and to investigate its mechanism in order to promote the application of this method in Salmonella serotyping. **Methods** The experimental conditions of the blood plate - paper bridge method for Salmonella serotyping were optimized by comparing the effects of different paper bridge materials on the induction and identification of H antigen, scanning the surface of different paper bridge materials by scanning electron microscope to explore the mechanism of the effects, and combining the factors of environmental humidity and saline dosage. The optimized method was compared with the simple plate method of GB 4789.4 standard for serotyping 40 strains of Salmonella. **Results** The matte surface of CN110 and CN95 nitrocellulose membranes had similar bridging effect with ordinary filter paper, and the difference was not statistically significant ($P > 0.05$), while the effect of filter membrane was significantly lower than that of ordinary filter paper ($P < 0.05$). Salmonella spread better at higher humidity, and there was a significant difference between the results at 80% humidity compared with those of the 50% and 20% groups ($P < 0.0167$). The spreading effect was significantly improved with increasing amount of saline ($P < 0.001$), and the optimal amount was 15 μL . Forty foodborne Salmonella strains were identified using the two methods, and the method in this study was able to accurately identify Salmonella serotypes in one go, whereas the simple plate method required one to three inductions. **Conclusion** The blood plate - paper bridge method optimized in this study is easy to operate and has a significant induction effect, which is suitable for the identification of Salmonella serotypes. This method can be used as an effective complement to Salmonella serotyping methods to improve the efficiency and accuracy of foodborne disease traceability.

基金项目: 食品安全国家标准立项计划 (spaq-2019-50)

作者简介: 涂晓波 (1988—), 男, 本科, 工程师, 研究方向: 食品安全检验

通信作者: 吕敬章, E-mail: ficswsw@163.com; 林燕奎, E-mail: 247580680@qq.com

Keywords: Blood plate – paper bridge method; Salmonella; Serotyping

沙门氏菌被认为是全球最重要的病原体之一^[1],主要通过摄入受污染食物或接触受感染动物而传播^[2],能引发食物中毒、胃肠炎、伤寒等多种疾病。在中国,沙门氏菌是导致食物中毒的主要病原体之一,涉及约 40% 的细菌性食物中毒案例^[3-4]。

沙门氏菌属属于肠杆菌科中的一个复杂菌属,其血清分型主要基于 White – Kauffman – Le Minor (WKLM) 表^[5]。到目前为止,WKLM 表已列出超过 2 000 种沙门氏菌血清型。血清分型是鉴定沙门氏菌的主要方法,通过与特异性抗体的凝集反应来识别沙门氏菌的 O 抗原和 H 抗原。O 抗原为脂多糖中的糖聚合物^[6],而 H 抗原是构成鞭毛的蛋白质亚单位^[7]。其中,H 抗原的确定耗时较长。沙门氏菌通常具有双相型,编码 H1 和 H2 两种 H 抗原基因^[8]。它们受协调性调控,任一时刻仅表达一种 H 抗原^[9],需通过位相诱导分别测定 H1 和 H2 抗原^[10-11]。单相分离株的血清分型需多次相位转换确认 H2 抗原不表达^[12]。目前,H 抗原的常用鉴定方法为 GB 4789.4 中的简易平板法^[13],但其有诱导效果差,生长控制困难和凝集反应受半固体琼脂干扰等缺点^[14]。血平板 – 纸桥法是一种新兴的分型方法,通过在血平板上制作凹槽,放置纸桥,在纸桥上滴加生理盐水或抗血清,诱导沙门氏菌的相位转换,完成分型鉴定。具有操作简便、快速高效和经济实用的优势,可应用于临床诊断和食品污染溯源等领域,已被 ISO 采纳^[15]。但是该方法受材质、湿度等因素影响,本研究首次对其影响因素进行综合分析,对其影响机制进行探究,提高分型效率和准确性,应对食源性疾病日益严峻的挑战。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 本研究所用的 40 株沙门氏菌菌株,包括 5 株采购于美国模式培养物集存库 (ATCC) 的标准菌株 (马流产沙门氏菌 ATCC 9842、鼠伤寒沙门氏菌 ATCC 14028、婴儿沙门氏菌 ATCC 51741、鸭沙门氏菌 ATCC 9270 及肠炎沙门氏菌 ATCC 13076);其余 35 株为近年来深圳海关食检中心从进出口食品中分离出的沙门氏菌菌株。

1.2 材料和仪器 氯化钠 (广州牌),Swarm 琼脂培养基 (北京陆桥),血琼脂平板 (北京陆桥),沙门氏菌属诊断血清 (丹麦 SSI);无菌刀片,无菌镊子,普通滤纸 (杭州双圈),CN95 及 CN110 硝酸纤维素膜 (深圳百穗康),0.22 μm 过滤滤膜 (德国 Merck);恒温恒湿培养箱 (德国宾得/KBWF240),电子天平 (梅特勒/ML4002T),高压灭菌锅 (日本 HIRAYAMA/HV – 85),

温湿度计 (德图仪表/608 – H1),热场发射扫描电镜 (捷克 FEI/Quanta 400F)。

1.3 实验方法

1.3.1 简易平板法 本方法依据 GB 4789.4 对沙门氏菌 H 抗原的鉴定方法进行。将菌株接种于 Swarm 琼脂中央,于 36 °C 下培养 24 h。之后,从其边缘部分取菌进行 H1 相血清型鉴定。然后在 Swarm 琼脂平板表面滴加 H1 相转相血清,待血清渗透入琼脂,在血清区域中心点接种待检菌株。再次于 36 °C 下培养 24 h,最后从蔓延生长的菌苔边缘取菌落进行 H2 相血清型鉴定。

1.3.2 血平板 – 纸桥法 使用无菌手术刀沿血平板中心线切去 0.6 cm 宽的琼脂条,使培养基被分割成两个无接触的区域 A 和 B。然后用无菌小镊子夹取 2 至 3 根“纸桥”,搭设在 A 和 B 两个区域之间,从而形成 2 ~ 3 条纸桥连接这两个区域。当待检菌株的 H1 相抗原未检出时,可以在纸桥上加入生理盐水,以促进抗原良好生长,随后进行鉴定。使用接种环取少量菌苔,轻轻涂抹在 A 区域纸桥边缘的血平板上,然后在 36 °C 下倒置培养 24 h。之后从 B 区域新生长的菌苔边缘取菌,以进行 H1 相的鉴定。在纸桥上滴加待检菌株 H1 相转相血清,再用接种环取少量菌苔轻轻涂抹于 A 区域纸桥边缘的血平板上,并在 36 °C 下倒置培养 24 h。之后在 B 区域的新生长菌苔边缘取菌,进行 H2 相的鉴定。

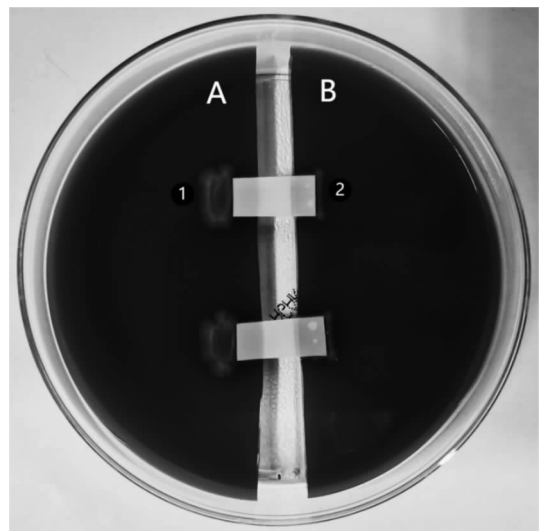


图 1 用于沙门氏菌相位反转的血平板 – 纸桥法

Fig. 1 Blood plate – paper bridge method for *Salmonella* phase inversion

如图 1 所示,血琼脂平板中间被移除了 0.6 cm

宽的条带,形成槽。细菌接种在纸桥左侧的 A 区,标示①所指示。孵育后,相位诱导表达出替代的鞭毛抗原,并向右端迁移。经过 24 h 孵育,可以在纸桥右侧的 B 区观察到细菌生长,用②指示。本研究中,以沙门氏菌从 A 区蔓延生长至 B 区判定为“阳性”,以沙门氏菌未从 A 区蔓延生长至 B 区判定为“阴性”。

1.3.3 不同纸桥材料对比 本试验选用普通滤纸、过滤滤膜、CN110 及 CN95 硝酸纤维素膜作为纸桥材料。实验菌株为马流产沙门菌 ATCC 9842 等 6 株标准菌株。不同材料的接触面各设置 5 次平行实验。依照 1.3.2 操作,对不同材料的试验结果进行比较。对于效果较好的纸桥材料,通过扫描电镜进行观察分析。

1.3.4 不同环境湿度对比 采用试验结果较好的纸桥材料,利用恒温恒湿培养箱设置 20%、50%、80% 相对湿度的环境,并设立相应的对照组进行比较试验。同时,使用湿度计确保各环境湿度准确无误。不同环境湿度各设置 5 次平行实验。依照 1.3.2 操作,将血平板置于不同相对湿度环境中,并在 36 °C 恒温条件

下倒置培养 24 h。

1.3.5 不同生理盐水量对比 依照 1.3.2 操作,在 A 和 B 区域搭建好纸桥后,在纸桥上分别滴加 5 μL 、10 μL 、15 μL 的生理盐水。不同生理盐水量各设置 5 次平行实验。同时设立未加生理盐水的空白对照,以观察不同盐水量对菌种过桥的影响。

1.3.6 血清型鉴定对比 对优化后的血平板-纸桥法和简易平板法进行比较,使用 5 株标准菌株、35 株分离株共计 40 株沙门氏菌(分属 WKLM 表中的 11 个群)进行血清分型鉴定,并对比两种方法的诱导次数和鉴定结果。

1.3.7 统计学分析 采用 SPSS 27.0 软件对数据资料进行分析,使用 χ^2 检验或 Fisher 精确检验对计数资料进行统计分析,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 不同纸桥材料对沙门氏菌的影响 不同纸桥材料对沙门氏菌影响的具体结果可参见表 1。

表 1 不同纸桥材料对沙门氏菌纸桥法的影响

Table 1 Effects of different paper bridge materials on *Salmonella* paper bridge method

材料	血平板接触面	沙门氏菌菌种									
		马流产沙门氏菌 ATCC 9842		鼠伤寒沙门氏菌 ATCC 14028		婴儿沙门氏菌 ATCC 51741		鸭沙门氏菌 ATCC 9270		肠炎沙门氏菌 ATCC13076	
		阳性数	阴性数	阳性数	阴性数	阳性数	阴性数	阳性数	阴性数	阳性数	阴性数
CN110	光面	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5
	哑光面	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0
CN95	光面	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5
	哑光面	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0
过滤滤膜	光面	0	5	2	3	0	5	2	3	4	1
	哑光面	1	4	5	0	2	3	5	0	5	0
普通滤纸	正面	5	0	5	0	4	1	4	1	5	0
	反面	5	0	5	0	5	0	4	1	5	0

表 2 不同纸桥材料对沙门氏菌纸桥法效果的统计分析($n = 40$)

Table 2 Statistical analysis of the effects of different paper bridge materials on the paper bridge method for *Salmonella* ($n = 40$)

材料	阳性率(%)	χ^2 值 ^a	P 值 ^a
普通滤纸	94	/	/
CN110 哑光面	100	1.563	0.546
CN95 哑光面	100	1.563	0.546
过滤滤膜哑光面	72	6.981	0.013

注:a 以普通滤纸为对照组。

从表 1 结果来看,当 CN110 和 CN95 硝酸纤维素膜的哑光面接触血平板时,所有试验菌株均能蔓延生长过桥。马流产沙门菌和婴儿沙门菌在过滤滤膜上只有部分蔓延过桥。多数试验菌株能够通过普通滤

纸的正反面蔓延过桥。

选取效果较好的材料,和普通滤纸进行比较,根据样本数据,采用 Fisher 精确检验进行统计分析。表 2 结果显示,普通滤纸的阳性率为 94%,整体表现可靠。CN110 哑光面和 CN95 哑光面的阳性率为 100%,效果与普通滤纸相近,差异无统计学意义($P > 0.05$)。过滤滤膜哑光面的阳性率为 72%,低于普通滤纸,且差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 硝酸纤维素膜 CN110、CN95 和普通滤纸的扫描电镜观察 使用热场发射扫描电镜(捷克 FEI/Quanta 400F)在 10.5 mm 工作距离、2 000 倍放大、20.0 kV 电压和高真空模式等相同实验条件下对不同纸桥材料进行扫描的图像。图 2 显示,CN110 和 CN95 的哑光面材料表面是粗糙且多孔的,而光面则较为平滑;

滤纸的正面和背面呈现纤维状结构。

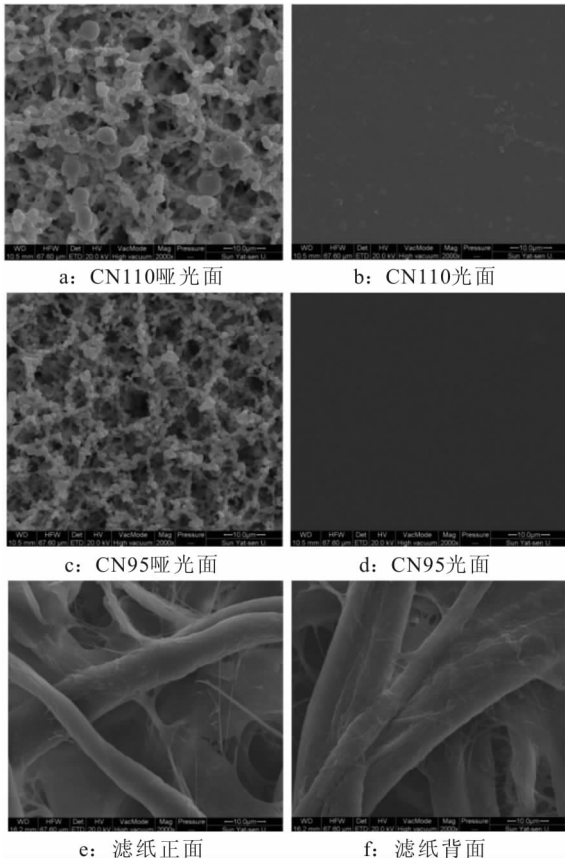


图 2 不同纸桥材料的 SEM 电镜下扫描图(2 000 ×)

Fig. 2 Images of different paper bridge materials under SEM electron microscopy(2 000 ×)

结合表 1 的结果可知,沙门氏菌经由 CN110 和 CN95 膜的哑光面及滤纸过桥的效果较好,但不通过其光面过桥。而 CN110 和 CN95 膜的哑光面均较为粗糙,CN95 的孔径比 CN110 膜更大。通过纸桥材料表面微观结构可以发现,材料的粗糙度、孔隙结构和纤维状层是关键因素。粗糙且多孔的表面更适合沙门氏菌的生长和蔓延,而平滑表面由于接触面积减少,不利于细菌的过桥。

2.3 不同环境湿度的结果 依据 2.1 的试验结果,本研究选用滤纸和 CN110 硝酸纤维素膜作为纸桥材料,依据 1.3.4 操作,结果见表 3。实验显示,滤纸在 20%、50%、80% 湿度下阳性率分别为 25%、70%、100%,CN110 膜在 20%、50%、80% 湿度下阳性率分别为 55%、70%、100%;显示滤纸在不同湿度下的结果差异有统计学意义 ($\chi^2 = 25.055, P < 0.001$),CN110 膜在不同湿度下的结果差异有统计学意义 ($\chi^2 = 11.200, P = 0.004 < 0.0167$);采用 Bonferroni 法进行两两比较,滤纸在不同湿度下结果均存在显著差异,CN110 膜在 80% 湿度下与 50%、20% 组的结果相比存在显著差异。综上,无论是滤纸还是 CN110 膜,方法的阳性率随相对湿度增加而显著增加。目前确定的最佳环境相对湿度为 80%。

2.4 不同生理盐水量的试验结果 按照 1.3.5 的操作步骤进行实验,具体结果见表 4。在无生理盐水条件下,四种沙门氏菌均未蔓延过桥。滴加 5 μL 生理盐水时,总阳性率为 40%。滴加 10 μL 时,总阳性率

表 3 不同环境湿度对沙门氏菌纸桥法的影响

Table 3 Effects of different environmental humidity on *Salmonella* paper bridge method

材料	相对湿度 (%)	沙门氏菌菌种								合计	
		鼠伤寒沙门氏菌 ATCC 14028		阿巴特图巴沙门氏菌 ATCC 35640		肠炎沙门氏菌 ATCC 13076		山夫登堡沙门氏菌 (2020 国本级盲样)			
		阳性数	阴性数	阳性数	阴性数	阳性数	阴性数	阳性数	阴性数	阳性数	阴性数
滤纸	20	0	5	2	3	3	2	0	5	5	15
	50	4	1	4	1	4	1	2	3	14	6
	80	5	0	5	0	5	0	5	0	20	0
	χ^2 值	/		/		/		/		25.055	
	P 值	0.006 ^a		0.231 ^a		0.725 ^a		0.009 ^a		<0.001	
CN110	20	4	1	4	1	3	2	1	4	11	9
	50	2	3	4	1	4	1	4	1	14	6
	80	5	0	5	0	5	0	5	0	20	0
	χ^2 值	/		/		/		/		11.200	
	P 值	0.251 ^a		1.000 ^a		0.725 ^a		0.051 ^a		0.004	

注:a 指 fisher 确切概率。

为 70%。滴加 15 μL 时,所有菌株均过桥。结果显示,随着生理盐水量的增加,沙门氏菌纸桥法的阳性率显著增加 ($\chi^2 = 17.143, P < 0.001$),采用 Bonferroni 法进行两两比较,15 μL 组与 10 μL 组、5 μL 组的阳

性率相比存在显著差异。考虑到如果生理盐水量过大,游离水可能形成一个替代路径,将细菌输送至抗血清屏障,从而导致相位转换失败^[16]。因此,目前确定的最佳生理盐水量为 15 μL 。

表 4 不同生理盐水量对沙门氏菌纸桥法的影响

Table 4 Effects of different amounts of physiological saline on paper bridge method

生理盐水量 (μl)	沙门氏菌菌种									
	鼠伤寒沙门氏菌 ATCC 14028		阿巴特图巴沙门氏菌 ATCC 35640		肠炎沙门氏菌 ATCC 13076		山夫登堡沙门氏菌 (2020 国本级盲样)		合计	
	阳性数	阴性数	阳性数	阴性数	阳性数	阴性数	阳性数	阴性数	阳性数	阴性数
0(对照)	0	5	0	5	0	5	0	5	0	20
5	2	3	3	2	2	3	1	4	8	12
10	4	1	4	1	4	1	2	3	14	6
15	5	0	5	0	5	0	5	0	20	0
χ ² 值	/		/		/		/		17.143	
P 值	0.231 ^a		0.725 ^a		0.231 ^a		0.068 ^a		<0.001	

注:a 指 fisher 确切概率。

2.5 血清型鉴定比对试验 使用改进的血平板-纸桥法和简易平板法对 40 株沙门氏菌进行 H 抗原诱导和血清型鉴定。血平板-纸桥法一次诱导即可准确鉴定所有沙门氏菌的血清型。简易平板法需 2 次诱

导才能鉴定出甲型副伤寒沙门菌等六种菌株,而婴儿沙门菌则需 3 次诱导。结果表明,血平板-纸桥法比简易平板法传代次数少、耗时短、结果更准确。

表 5 食品中检出沙门菌的血清型鉴定结果

Table 5 Identification results of serotypes of *Salmonella* detected in food

沙门氏菌血清型	拉丁名称	抗原结构	群组	诱导次数	
				血平板-纸桥法	简易平板法
甲型副伤寒	<i>S. Paratyphi A</i>	1,2,12 : a : 1,5	A	1	2
马流产	<i>S. Abortusequi</i>	4,12 : - : e,n,x	B	1	1
鼠伤寒	<i>S. Typhimurium</i>	1,4,12 : i : 1,2	B	1	1
乙型副伤寒	<i>S. Paratyphi B</i>	1,4,12 : b : 1,2	B	1	1
德尔卑	<i>S. Derby</i>	1,4,12 : f,g : 1,2	B	1	2
阿贡纳	<i>S. Agona</i>	1,4,12 : f,g,s : 1,2	B	1	1
蒙得维的亚	<i>S. Montevideo</i>	6,7,14 : g,m,s : 1,2,7	C1	1	1
纽波特	<i>S. Newport</i>	6,8,20 : e,h : 1,2	C2	1	1
肯塔基	<i>S. Kentucky</i>	8,20 : i : z6	C2	1	1
肠炎	<i>S. Enteritidis</i>	1,9,12 : g,m : 1,7	D	1	1
巴拿马	<i>S. Panama</i>	1,9,12 : l,v : 1,5	D	1	1
鸭	<i>S. Anatum</i>	3, {15,34} : e,h : 1,6	E1	1	1
阿巴特图巴	<i>S. Abaetetuba</i>	11 : k : 1,5	F	1	1
伦敦	<i>S. London</i>	3, {10} {15} : l,v : 1,6	E1	1	2
旺兹沃思	<i>S. Wandsworth</i>	39 : b : 1,2	Q	1	1
海德尔堡	<i>S. Heidelberg</i>	1,4,12 : r : 1,2	B	1	2
婴儿	<i>S. Infantis</i>	6,7,14 : r : 1,5	C1	1	3
圣保罗	<i>S. Saintpaul</i>	1,4,12 : e,h : 1,2	B	1	1
维尔肖	<i>S. Virchow</i>	6,7,14 : r : 1,2	C1	1	1
病牛	<i>S. Bovismorbificans</i>	6,8,20 : r : 1,5	C2	1	1
斯坦利	<i>S. Stanley</i>	1,4,12, : d : 1,2	B	1	1
乌干达	<i>S. Uganda</i>	3, {15} : l,z13 : 1,5	E1	1	1
阿顿道夫	<i>S. Altendorf</i>	4,12 : e : 1,7	B	1	1
普利茅斯	<i>S. Plymouth</i>	9,46 : d : z6	D2	1	1
韦太夫雷登	<i>S. Weltevreden</i>	3, {15} : r : z6	E1	1	1
科瓦利斯	<i>S. Corvallis</i>	8,20 : z4,z23 : z6	C3	1	2
火鸡	<i>S. Meleagridis</i>	3, {15,34} : e,h : l,w	E1	1	1
巴雷利	<i>S. Bareilly</i>	6,7,14 : y : 1,5	C1	1	1
黄金海岸	<i>S. Goldcoast</i>	6,8 : r : l,w	C2	1	1
布伦登卢普	<i>S. Braenderup</i>	6,7,14 : e,h : e,n,z15	C1	1	1
姆班达卡	<i>S. Mbandaka</i>	6,7,14 : z10 : e,n,z15	C1	1	1
利奇菲尔德	<i>S. Litchfield</i>	6,8 : l,v : 1,2	C2	1	1
波茨坦	<i>S. Potsdam</i>	6,7,14 : l,v : e,n,z15	C1	1	1
印地安纳	<i>S. Indiana</i>	1,4,12 : z : 1,7	B	1	1

(续表)

沙门氏菌血清型	拉丁名称	抗原结构	群组	诱导次数	
				血平板 - 纸桥法	简易平板法
明斯特	<i>S. Muenster</i>	3, 15, 34 : e, h : 1, 5	E1	1	1
塞罗	<i>S. Cerro</i>	6, 14, 18; z4, z23 : 1, 5	K	1	1
奥古斯坦堡	<i>S. Augustenborg</i>	6, 7, 14; i : 1, 2	C1	1	1
利文斯通	<i>S. Livingstone</i>	6, 7, 14; d : 1, w	C1	1	2
列克星敦	<i>S. Lexington</i>	3, 15, 34 : z10 : 1, 5	E1	1	1
巴尔多	<i>S. Bardo</i>	8 : e, h : 1, 2	C3	1	1

3 结论与讨论

沙门氏菌的感染是一个复杂的过程,首先通过特定的粘附素与肠上皮细胞表面受体结合,侵入细胞内部。在细胞内,通过形成包含体在宿主细胞内存活并增殖^[17]。沙门氏菌的鞭毛不仅为其提供运动性,还参与其趋化性和毒力的表达^[18]。鞭毛上的 H 抗原交替表达,即鞭毛 H 相变异,是沙门氏菌逃避宿主免疫识别的一种机制^[19]。因此,精确地诱导和鉴定 H 抗原对于沙门氏菌的血清分型至关重要。本研究中,血平板 - 纸桥法通过血平板提供了必要的营养成分,支持沙门氏菌的生长和鞭毛抗原的表达。通过在纸桥上滴加抗血清,来创建抗血清屏障,进一步诱导 H 抗原的表达。

本研究拓展了纸桥材料的选择范围,结果显示硝酸纤维素膜哑光面的效果与普通滤纸相近,硝酸纤维素膜光面和过滤滤膜的效果差于普通滤纸。通过观察表面微观结构,粗糙且多孔的表面更适合沙门氏菌的生长和蔓延。这与细菌的迁移行为受表面粗糙度、孔隙结构和化学性质(如疏水性或亲水性)等多种因素的影响有关。表面粗糙度增加会降低微生物与介质之间的排斥能垒,从而增加微生物的迁移能力。孔隙度和孔隙大小分布影响细菌的迁移路径和速度^[20]。

本研究中,最优环境相对湿度为 80%,最优生理盐水量为 15 μ L。这与沙门氏菌的迁移能力受鞭毛运动的影响有关。在干燥环境中,细菌的迁移能力会受到限制,因为缺乏足够的水分会影响鞭毛的正常功能。而在适量的水分条件下,有助于细菌的游动和扩散^[21]。

与简易平板法相比,血平板 - 纸桥法更为高效。简易平板法通常需要传代 1 至 3 次后才能进行血清分型。血平板 - 纸桥法可直接在血平板上进行诱导和血清分型,仅需少量抗血清便能有效诱导沙门氏菌的鞭毛抗原,一个血平板能检测 3 至 5 株分离株。考虑到血平板 - 纸桥法的特性和优点,基层实验室可以在 GB4789.4 血清学鉴定方法的基础上,利用血平板 - 纸桥法进一步诱导和鉴定 H 抗原不明确的沙门氏

菌株。这为准确鉴定沙门氏菌提供了一种可靠且快速的补充方法,对于食源性疾病快速诊断和溯源具有重要意义。

利益冲突声明 本研究不存在任何利益冲突

参考文献

- [1] Tauxe RV. Emerging foodborne pathogens [J]. International Journal of Food Microbiology, 2002, 78(1-2): 31-41.
- [2] Hoelzer K, Soyer Y, Rodriguez - Rivera LD, et al. The prevalence of multidrug resistance is higher among bovine than human *Salmonella enterica* serotype Newport, Typhimurium, and 4,5,12: i: - isolates in the United States but differs by serotype and geographic region [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(17): 5947-5959.
- [3] Wang M, Yang JJ, Gai ZT, et al. Comparison between digital PCR and real - time PCR in detection of *Salmonella typhimurium* in milk [J]. International Journal of Food Microbiology, 2018, 266: 251-256.
- [4] Xiao LL, Zhang ZH, Sun XH, et al. Development of a quantitative real - time PCR assay for viable *Salmonella* spp. without enrichment [J]. Food Control, 2015, 57: 185-189.
- [5] Grimont PAD, Weill FX. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars [M]. 9th ed. Paris: WHO collaborating centre for reference and research on *Salmonella*, 2007.
- [6] Seif Y, Monk JM, Machado H, et al. Systems biology and pangenome of salmonella O - Antigens [J]. mBio, 2019, 10(4): e01247-19.
- [7] Moore MM, Nucci MJ, Madson SM, et al. Evaluation of a bead - based *Salmonella* molecular serotyping method for *Salmonella* isolated from food and environmental samples [J]. Journal of Food Protection, 2019, 82(11): 1973-1987.
- [8] Mcquiston JR, Waters RJ, Dinsmore BA, et al. Molecular determination of H antigens of *Salmonella* by use of a microsphere - based liquid array [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2011, 49(2): 565-573.
- [9] Bonifield HR, Hughes KT. Flagellar phase variation in *Salmonella enterica* is mediated by a posttranscriptional control mechanism [J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(12): 3567-3574.
- [10] Wattiau P, Boland C, Bertrand S. Methodologies for *salmonella enterica* subsp. *enterica* subtyping: Gold standards and alternatives [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(22): 7877-7885.
- [11] Zheng ZB, Zheng W, Wang HQ, et al. Serotype determination of *Salmonella* by xTAG assay [J]. Journal of Microbiological Methods, 2017, 141: 101-107.

- [12] Barco L, Lettini AA, Ramon E, et al. A rapid and sensitive method to identify and differentiate *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and *Salmonella enterica* serotype 4, [5], 12:i: - by combining traditional serotyping and multiplex polymerase chain reaction[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2011, 8(6): 741 - 743.
- [13] 国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. GB 4789.4 - 2016 食品安全国家标准 食品微生物检验 沙门氏菌检验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
The National Health and Family Planning Commission, the State Food and Drug Administration. GB 4789.4 - 2016 National standard for food safety food microbial test *Salmonella* test[S]. Beijing: Standards Press Of China, 2017. (In Chinese)
- [14] 王海燕, 宋曼丹, 赖蔚苙, 等. 血平板 - 滤纸条搭桥法在沙门菌血清分型中的应用[J]. 华南预防医学, 2011, 37(2): 75 - 77.
Wang HY, Song MD, Lai WD, et al. Application of blood plate - filter strip bridging in serotype of *salmonella* [J]. South China Journal of Preventive Medicine, 2011, 37(2): 75 - 77. (In Chinese)
- [15] International Organization for Standardization. ISO/TR 6579 - 3: 2014 Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella*: Part 3 Guidelines for serotyping of *Salmonella* spp[EB/OL]. [2024 - 10 - 10]. <https://www.iso.org/obp/ui/en/#iso:std:iso:tr:6579:-3:ed-1:vl:en>.
- [16] Chiou CS, Huang JF, Tsai LH, et al. A simple and low - cost paper - bridged method for *Salmonella* phase reversal [J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2006, 54(4): 315 - 317.
- [17] Haraga A, Ohlson MB, Miller SI. *Salmonellae* interplay with host cells[J]. Nature Reviews Microbiology, 2008, 6(1): 53 - 66.
- [18] Josenhans C, Suerbaum S. The role of motility as a virulence factor in bacteria [J]. International Journal of Medical Microbiology, 2002, 291(8): 605 - 614.
- [19] Wang H, Tang Z, Xue B, et al. *Salmonella* regulator STM0347 mediates flagellar phase variation via Hin invertase [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(15): 8481.
- [20] 石玉, 周慧娟, 曹凤婷, 等. 多孔介质中的微生物迁移行为与影响因素研究进展[J]. 微生物学通报, 2023, 50(4): 1639 - 1652.
Shi Y, Zhou HX, Cao FT, et al. Removal of microorganisms and influencing factors in porous media [J]. Microbiology, 2023, 50(4): 1639 - 1652. (In Chinese)
- [21] Liu WR, Cremer J, Li DJ, et al. An evolutionarily stable strategy to colonize spatially extended habitats [J]. Nature, 2019, 575(7784): 664 - 668.

收稿日期: 2024-03-29

(上接第 4183 页)

- [28] Da WD, Li XM, Qiao S, et al. Antiretroviral therapy and mental health among People living with HIV/AIDS in China [J]. Psychology Health & Medicine, 2020, 25(1): 45 - 52.
- [29] Martinez J, Chakraborty R. Psychosocial support for youth living with HIV[J]. Pediatrics, 2014, 133(3): 558 - 562.
- [30] 苗正淼, 陈奇虹, 刘苏瑶, 等. 童年创伤与神经质之间的关系: 基于性别的视角[J]. 中国临床心理学杂志, 2024, 32(2): 387 - 393, 399.
Miao ZM, Chen QH, Liu SY, et al. The relationship between childhood trauma and neuroticism: from the gender perspective [J]. Chinese Journal of Clinical Psychology, 2024, 32(2): 387 - 393, 399. (In Chinese)
- [31] Tabassum N, Nayak BS. Gender stereotypes and their impact on women's career progressions from a managerial perspective [J]. IIM Kozhikode Society & Management Review, 2021, 10(2): 192 - 208.
- [32] Mckenzie SK, Collings S, Jenkin G, et al. Masculinity, social connectedness, and mental health: men's diverse patterns of practice [J]. American Journal of Men's Health, 2018, 12(5): 1247 - 1261.
- [33] Hazari A. Conducting research: scientific methodological rigor in data collection [M]. Singapore: Springer Nature Singapore, 2023.
- [34] Lin LF, Chu HT. Quantifying publication bias in meta - analysis [J]. Biometrics, 2018, 74(3): 785 - 794.

收稿日期: 2024-08-15

读者 · 作者 · 编者

优先征集国家、省部级基金项目 及重点攻关项目论文启事

为了提高本刊的学术水平, 促进本刊发展, 特向各医学院校、医院、医学科研机构广泛征集国家、省部级自然科学基金资助项目和重点攻关项目的论文, 范围包括基础医学、预防医学和临床医学各专业的论著、调查报告、技术与方法等。对上述专业范围的基金项目或攻关项目产出的文稿须在首页下注明项目名称、项目编号, 并提交有关证明的复印件, 本刊一经审查合格, 将优先发表, 免收审稿费。

欢迎积极撰文, 踊跃投稿。