

牦牛致病性大肠杆菌生物学特性研究

陈明勇 张冰 陈德威

曾群辉

(中国农业大学动物医学院)

(西藏农牧学院)

摘要 对牦牛致病性大肠杆菌的某些生物学特性进行了研究, 包括分离菌株血清学特性、溶血性、血凝性、菌毛的表达、对小鼠、兔的致病性及抗生素敏感性等。结果表明, 该菌株血清型属 O₁₄₈, 为国内外首次报道, 不产生溶血素; 对绵羊、豚鼠、马、鸡的红细胞表现强凝集, 而对猪、兔的红细胞不凝集, 血凝能被 D-甘露糖抑制, 表现为 M SHA; 在营养肉汤中经 37, 48 h 培养表达菌毛; 肌肉接种兔、腹腔接种小白鼠均具有高致病性。分离菌株对恩诺沙星、环丙沙星、阿莫西林、羧苄青霉素等高度敏感, 而对青霉素、四环素、土霉素、氯霉素等表现耐药性。

关键词 牦牛; 致病性大肠杆菌; 生物学特性

中图分类号 S825.61; S823.85

Some Biological Characteristics of a Pathogenic *Escherichia coli* Strain Isolated from Yak

Chen Mingyong Zhang Bing Chen Dewei

(College of Veterinary Medicine, CAU)

Zeng Qunhui

(Tibet Agricultural and Animal Husbandry College)

Abstract An *Escherichia coli* strain isolated from yak was studied with respect to some characteristics including serotype, hemolysin production, hemagglutination, fimbriae expression, pathogenicity for mice and rabbits, and antibiotics sensitivity as well. The results showed that the serotype of the strain was O₁₄₈, and was firstly reported in literature. No hemolysin was produced from the isolate. Mannose sensitive hemagglutination (M SHA) against erythrocytes from sheep, guinea-pig, horse, chicken were evident, whereas there was no M SHA against pig and rabbit erythrocyte. The strain expressed fimbriae when cultured at 37 for 48 hrs in NB and was high pathogenic for rabbits through muscular injection and mice through abdominal injection. The isolate was high sensitive to Enrofloxacin, Ciprofloxacin, Amoxicillin and Carbenicillin, but resistant to Penicillin, Tetracycline, Oxytetracycline and Chloramphenicol.

Key words yak; pathogenic *Escherichia coli*; biological characteristics

牦牛腹泻症是目前危害西藏地区牦牛生产的主要疾病之一, 它流行范围大, 发病率高, 致死力强, 临床上以高热、呼吸困难、排水样或血色粪便、进行性消瘦和死亡为特征, 以急性出血

收稿日期: 2000-12-08

农业部畜牧业高新技术及产业化项目(牧高新 99-03)和西藏自治区科委重点科技资助项目。

陈明勇, 北京圆明园西路 2 号中国农业大学(西校区), 100094

性肠炎为典型病理变化。通过流行病学调查、临床症状和病理变化观察、细菌学试验、血清学检查、动物回归试验等,证实致病性大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)是西藏地区牦牛腹泻症的主要病原^[1],这与其他学者的报道基本一致^[2,3]。然而,关于牦牛致病性大肠杆菌生物学特征的研究,国内外尚未见报道。本试验对西藏地区牦牛致病性大肠杆菌的某些生物学特性进行了探讨,目的在于揭示牦牛大肠杆菌病的致病机制,为该病的防治提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 菌株

从西藏那曲地区牦牛内脏中分离并经致病性试验、血清学试验初步鉴定和命名为优势菌株的 *E. coli* TD₁ 分离株作为试验菌株;标准菌株 C83902 由中国兽药监察所提供。

1.2 试验动物

昆明系小鼠(体重 17~22 g)、新西兰白兔购自中国兽药监察所。

1.3 培养基及试剂

普通琼脂平板、鲜血琼脂平板、营养肉汤(NB)等按廖延雄方法制备^[4];药敏纸片购自杭州微生物试剂厂,恩诺沙星、环丙沙星、阿莫西林药敏片为课题组自制;D-甘露糖购自上海试剂厂;大肠杆菌 O 型因子血清由中国兽药监察所提供。

1.4 血清型鉴定

取 TD₁ 菌株 37℃ 培养 48 h 的 NB 培养物制成浓缩菌液,经 121℃ 高压处理 2 h,制成的 O 抗原与 O 因子血清进行试管凝集试验以鉴定其血清型。

1.5 溶血试验

将 TD₁ 菌株划线接种于 5% 绵羊鲜血琼脂平板,37℃ 培养 48 h,观察菌落周围有无溶血圈。

1.6 血凝试验

按常规方法使用 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.4 的 PBS 制备 2% 的绵羊、豚鼠、马、鸡、兔、猪 RBC 悬液,同时使用 0.5% 的 D-甘露糖配制 2% 的上述动物 RBC 悬液,按 Allan 方法进行 HA 试验^[5]。

1.7 菌毛的表达及电镜观察 取 TD₁ 菌株 37℃ 培养 48 h 的 NB 培养物 100 μL 加于铜网上,按常规方法负染,透射电镜观察菌体菌毛并照像。

1.8 致病性试验 以 TD₁ 菌株纯培养物接种 NB,37℃ 培养 48 h,以 0.2 mL/只(每 mL 约含 10^9 CFU)腹腔接种小鼠 4 只,同时以 1 mL/只(每 mL 约含 10^9 CFU)肌肉接种兔 4 只,以相同剂量营养肉汤按相同途径分别接种小鼠 4 只、兔 4 只作为对照组,接种后隔离饲养观察 72 h,及时剖解观察病死动物病变并从肝、脾、心血中分离回收攻毒菌。

1.9 抗菌药物敏感试验

按常规抗菌药物敏感纸片法对分离菌进行药敏试验。取 TD₁ 菌株液体培养物均匀涂布于普通琼脂培养基,稍干后将待测抗菌药物敏感纸片粘贴在合适的位置上,37℃ 培养 24 h,测定抑菌圈直径,判定其对抗菌药物敏感性。

2 结果

2.1 血清学特性

使用大肠埃希氏菌标准 O 型单因子血清对分离菌作试管凝集试验进行血清型鉴定, 结果 TD₁ 的血清型为 O₁₄₈。

2.2 溶血特性

TD₁ 菌株不产生溶血素。在 5% 绵羊鲜血琼脂平板上, 37℃ 培养 48 h, 分离菌周围无溶血圈, 不产生溶血现象。

2.3 血凝特性

TD₁ 菌株对几种动物红细胞的血凝试验结果见表 1。从表中可见, TD₁ 菌株血凝谱及血凝方式与参考菌株比较有一定差异, 所有血凝均能被 D-甘露糖抑制, 表现为甘露糖敏感性血凝(M SHA)。

表 1 TD₁ 对几种动物红细胞的血凝特性

菌株	绵羊		豚鼠		马		鸡		猪		兔	
	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
TD ₁	+	—	+	—	+	—	+	—	—	—	—	—
标准菌株 C83902	—	—	+	—	—	—	+	—	—	—	+	—

注: S——M SHA; R——甘露糖抗性血凝(MRHA); “+”——凝集; “—”——不凝集。

2.4 菌毛的表达

TD₁ 菌株在 NB 中经 37℃ 培养 48 h, 能表达大量细长而密集的菌毛, 见图 1。

2.5 致病性

TD₁ 菌株对小鼠和兔的致病性试验结果见表 2。从表中可看出, TD₁ 菌株腹腔接种小白鼠和肌肉接种兔均具有高致病性。从病死小鼠和兔肝、脾、心血中均能分离出攻毒菌, 而对照组小鼠和兔则全部健康存活。

2.6 抗生素敏感性

抗菌药物敏感试验结果见表 3。从表中可以看出, TD₁ 菌株对恩诺沙星、环丙沙星、阿莫西林、羧苄青霉素、氟哌酸、丁胺卡那霉素等高度敏感, 对先锋 V、庆大霉素、利福平等中度敏感, 对青霉素、四环素、土霉素、氯霉素等表现耐药性。

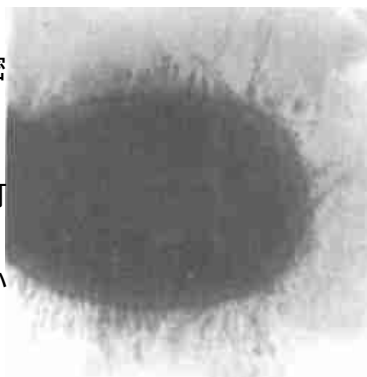


图 1 TD₁ 菌株表达的菌毛

表 2 TD₁ 对小鼠和兔的致病性

菌株	腹腔接种小鼠数量	72 h 死亡数量	致病性	肌肉接种兔数量	72 h 死亡数量	致病性
TD ₁	4	4	高	4	4	高
对照 标准菌株 C83902	4	4	高	4	4	高
营养肉汤(NB)	4	0	无	4	0	无

表 3 药敏试验结果

菌株	氟哌酸	丁胺卡那	先锋V	青霉素	庆大霉素	环丙沙星	利福平	阿莫西林	土霉素	四环素	恩诺沙星	氯霉素	羧苄青霉素
TD ₁	19	18	7	—	5	26	6	21	—	—	27	—	16

表中数字为抑菌圈直径/mm; “—”表示耐药。

3 讨论

大肠杆菌病是由病原性大肠杆菌引起的畜禽多种类型疾病的总称,病原性大肠杆菌一般以O₁₅₇抗原进行分型^[6]。到目前为止,国内外学者已经从不同种类的动物中分离出几十种血清型的大肠杆菌,然而关于牦牛病原性大肠杆菌则未见报道。血清学鉴定表明,我们从牦牛分离到的大肠杆菌 TD₁ 血清型为O₁₄₈,为国内外首次发现。

研究资料表明,呼吸道和消化道是致病性大肠杆菌侵入机体的主要途径,而细菌菌毛是细菌粘附呼吸道和消化道粘膜的重要致病因子,具有致病性的菌株,在体外一般能表达菌毛;同时细菌产生的菌毛与细菌的血凝性高度相关,并与其致病性有一定的联系^[7,8]。本试验结果表明,牦牛致病性大肠杆菌 TD₁ 菌株在营养肉汤中经 37℃ 培养 48 h,表达了丰富的菌毛,同时对绵羊、豚鼠、马、鸡的红细胞表现强凝集,进一步研究表明,TD₁ 菌株腹腔接种小鼠和肌肉接种兔均具有很高致病性。因此牦牛致病性大肠杆菌分离株的菌毛表达、血凝特性和致病性三者之间存在一定的相关关系。

随着抗菌药物在生产中大量和不规范的使用,使得抗菌药物耐药菌株不断增多,在生产中若不进行药敏试验来指导用药,极易影响药物的治疗效果,造成经济损失。本试验中,TD₁ 分离株对恩诺沙星、阿莫西林等 6 种药物高度敏感,在生产中可考虑优先使用。

参 考 文 献

- 1 曾群辉,陈明勇 牦牛致病性大肠埃希氏菌病的诊断 中国预防兽医学报, 2001, 23(2): 144, 145
- 2 吴国学,卢淮江 牦牛犊腹泻病因分析 中国兽医杂志, 1995, 21(7): 11~ 12
- 3 Lensch J. Infektiöse und parastiäre Erkrankungen beim Yak Praktische Tierarzt, 1996, 77(1): 41~ 43
- 4 廖延雄主编 兽医微生物实验诊断手册 北京: 中国农业出版社, 1995
- 5 Allan B J. Characterization of *Escherichia coli* isolated from case of avian colibacillosis Can J Vet Res, 1993, 57: 146~ 151
- 6 房海主编 大肠埃希氏菌 石家庄: 河北科学技术出版社, 1997
- 7 恽时锋,潘震寰,郑明珠,等 一株分离自肉雏鸡脑部大肠埃希氏菌的某些生物学特性 畜牧兽医学报, 1999, 30(1): 57~ 61
- 8 Yerushami Z. Adherence pili of avian strains of *Escherichia coli* O₇₈ Infection and Immunity, 1990, 58 (4): 1129~ 1131