

大肠杆菌对仔兔小肠形态学影响 及其治疗方法的比较

刘莲莲, 马卫明*, 丁厚康, 曹永芝, 于小婷

(山东农业大学 动物科技学院 山东 泰安 271018)

摘要: 为了研究大肠杆菌对仔兔小肠形态学影响, 比较不同治疗方法的效果。将 40 只仔兔随机平均分为 4 组。经腹腔注射菌液后检测不同时期内毒素含量, 并观察和比较小肠形态学结构的变化。结果表明, 腹腔注射菌液后可形成毒血症, 兔大肠杆菌的发病率与内毒素呈正相关; 随着肠绒毛长度和粘膜厚度的恢复, 病兔逐渐恢复正常。乳酸菌素在大肠杆菌引起兔腹泻的治疗中能有效恢复肠壁厚度和绒毛长度, 在疾病恢复期治疗效果好于庆大霉素。

关键词: 兔大肠杆菌; 小肠形态学; 内毒素; 治疗比较

中图分类号: S829.11 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2012)01-0124-05

Effect of *E. coli* on Structure of Small Intestine in Rabbits and Comparison of Treatment Methods

LIU Lian-lian, MA Wei-ming*, DING Hou-kang, CAO Yong-zhi, YU Xiao-ting

(College of Animal Science and Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract: In order to study the effect of *E. coli* on structure of small intestine in rabbits and compare curative methods, forty rabbits were randomly divided into four groups. At different times endotoxin was detected and the structure changes of small intestine were observed and compared after injection of *E. coli* by abdominal cavity. The results showed that intraperitoneal injection of bacilli could cause toxemia. With the increase of the intestinal villi length and mucosa thickness rabbit recovered gradually. Lactolin could effectively restore the intestinal villi length and mucosa thickness, its effect on the lactolin group was better than that of gentamicin on the gentamicin group.

Key words: diarrhoea rabbits caused by *E. coli*; structure of small intestine; endotoxemia; comparison of treatment

兔大肠杆菌病又名粘液性肠炎, 是由某些血清型的致病性大肠杆菌及其毒素引起的一种暴发性、死亡率很高的仔兔肠道性传染病^[1]。该病以下痢、流涎为特征, 常引起其它疾病的并发和继发^[2]。在一些地区的种兔场该病十分严重, 发病率达 5% ~ 80%, 死亡率 6% ~ 50%^[3-4]。在病原多为溶血性大肠杆菌, 革兰氏阴性, 无芽孢, 一般具有鞭毛。大肠杆菌一般分为肠毒性大肠杆菌(ETEC)、非肠毒性大肠杆菌(EPEC)和侵袭性大肠杆菌(EIEC)。国内外研究表明, 只有非肠毒性大肠杆菌所致的家兔肠

收稿日期: 2011-10-08 修回日期: 2011-11-30

基金项目: 山东省优秀中青年科学家奖励基金(2005BS06001)

作者简介: 刘莲莲(1986—), 女, 硕士生, 主要从事动物疾病防治研究, E-mail: liulianlian0317@163.com; * 通讯作者: 马卫明, 副教授, 硕士生导师, E-mail: mawm@sdau.edu.cn。

炎是最重要的^[5-12]。随着大型集约化养兔业的发展,病原性大肠杆菌对养兔业所造成的损失已日益明显。国内外对仔猪和肉仔鸡组织形态发育规律研究较多^[13-14],而对兔报道较少^[15]。绒毛和微绒毛是小肠最具特征的结构,是动物营养吸收的重要场所。绒毛和隐窝深度的比值常常可以说明肠上皮细胞更新代谢的程度。兔小肠绒毛长度随着日龄的增加而增大,腺窝深度增加,大肠杆菌等应激可使肠绒毛变短^[14]。但对于大肠杆菌引起的兔腹泻没有详细的小肠形态学数值,也没有对该病的治疗方案进行组织学比较。动物肠道内微生态平衡的紊乱导致了腹泻的发生^[16],当前对大肠杆菌病的治疗主要以抗生素为主,然而近年来由于抗生素滥用,耐药菌株不断出现,常用治疗药物的疗效越来越差。并且广谱抗菌药物的大量应用,经常引起肠道菌群的失调而引发本病,并有逐年上升的趋势。乳酸菌素是生物活性物质具有补充、调整或维持动物肠道内微生态平衡,增强机体的免疫机能和抗应激能力,从而对动物产生营养、免疫、刺激生长、生物拮抗等生理作用,达到提高生产性能、防治疾病以及促进健康的作用^[17]。研究大肠杆菌对仔兔机体的影响,比较抗生素与生物活性物质作用效果,对该病的发病机制研究和畜牧业生产有较大的理论和现实意义。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)由济南出入境检验检疫局提供(CICC 编号:23657),接种于高压灭菌的肉汤中,恒温培养箱培养 28 h,活菌数达到 2×10^9 个/mL;30~40 日龄新西兰兔购自山东鲁抗医药股份有限公司;硫酸庆大霉素(4 万单位/mL),乳酸菌素片(400 mg/片)购自泰安宏康药店;显色基质鲎试剂盒购自厦门市鲎试剂实验厂有限公司。

1.2 试验设计

40 只 30~40 日龄新西兰兔,体重 750~1 000 g,室温 22~24 °C 饲养,自由进食水,光照周期为 12 h/12 h,饲养环境安静,通风良好。预饲 1 周后随机分为 4 组,每组 10 只,第 1 组为正常对照组(G1),于试验当天腹腔注射生理盐水 2 mL;第 2 组为人工感染组(G2),腹腔注射大肠杆菌培养液 2 mL;第 3 组为庆大霉素治疗组(G3),腹腔注射大肠杆菌培养液 2 mL,出现症状后(注射菌液后第 2 天)肌注庆大霉素 0.5 mL(2u)/只,连续注射 3 d。第 4 组为乳酸菌素治疗组(G4),腹腔注射大肠杆菌培养液 2 mL,出现症状后(注射菌液后第 2 天)口服乳酸菌素 1 片(400 mg/片),连续 3 d。每组分别单室、单人饲养,逐日观察体温、精神状态、采食和粪便等临床症状;对死亡和出现临床症状的病例,收集粪便,分离致病菌。隔 1 d 用外科手术的方法取十二指肠和空肠,空肠固定于 $\varphi = 4\%$ 多聚甲醛中待检测,取完上述样品后解剖观察病理变化。

1.3 内毒素检测

对人工感染组和正常对照组于发病 1、3、5、7 d 分别经心脏采血。吸取无热原的血液抗凝剂 1 mL 于无热原试管中再用无热原注射器准确抽取血 1 mL 注入上述试管中,轻摇使混匀,置于冰水中,加盖,迅速低温离心 10 min(1 000 r/min),吸出上清液,按照显色基质鲎试剂盒使用说明做出标准曲线后测定样品中内毒素含量。

1.4 小肠形态学变化

采取空肠、十二指肠各一段,常规石蜡切片,HE 染色。每个肠管取 5 张切片,每张切片选取 5 个最长肠绒毛的长度、最深隐窝深度和最厚粘膜厚度,光镜下仔细观察和比较了各段肠粘膜形态结构的变化情况,并应用 Moditec 照相处理软件和病理图像分析系统,具体测量了各段肠的绒毛高度、隐窝深度和粘膜厚度。

2 结果分析

2.1 临床和病理变化

人工感染组(G2)兔注射菌后第 1 天精神沉郁,第 2 天食欲减退或废绝,出现腹泻;第 3 天出现 2 只死亡,第 7 天耐过兔基本恢复正常,临床症状消失。病初排黄色成型的稀软粪便,后期腹泻呈水样或粥样,灰褐色或黑色,有的粪中带血或混有粘膜;大部分下痢兔的后肢、肛门和尾部被毛被污染。G3 组于

第2天和第3天出现明显临床症状,第5天基本恢复正常,未见死亡。G4第2天开始出现明显症状,第4天出现1只死亡,第7天基本恢复正常。解剖死亡兔,胃底部粘膜充血,十二指肠、空肠、结肠和盲肠粘膜均有不同程度的充血、出血、水肿,肠壁变薄,个别兔出现纤维素性肝周炎。心脏、肾脏和肺部也有一定的病理变化。对死亡和出现临床症状的病例,收集粪便,分离致病菌显示是接种菌株。

2.2 内毒素检测

内毒素检测 G2 组于注射菌液后第1天开始检测出内毒素超过 G1 组,第3天达到高峰,第5天逐渐减弱,第7天回归到正常水平。做出标准曲线后,根据标准曲线得出内毒素含量。结果见图1。

2.3 粘膜厚度、绒毛长度和绒毛长度与隐窝深度比值变化

注入大肠杆菌后第3天 G2、G3、G4 十二指肠粘膜厚度、绒毛长度和绒毛长度与隐窝深度比值比 G1 显著减少 ($P < 0.05$), G3、G4 十二指肠粘膜厚度比 G2 显著增加 ($P < 0.05$); 第5天 G2、G3、G4 十二指肠粘膜厚度、绒毛长度和绒毛长度与隐窝深度比值比 G1 显著减少 ($P < 0.05$), G3、G4 十二指肠粘膜厚度绒毛长度和绒毛长度与隐窝深度比值比 G2 显著增加 ($P < 0.05$); 第7天 G2 十二指肠粘膜厚度、绒毛长度和绒毛长度与隐窝深度比值比 G1 显著减少 ($P < 0.05$), G3、G4 与 G1、G2 差异不显著 ($P > 0.05$)。空肠粘膜厚度、绒毛长度和绒毛长度与隐窝深度比值的的变化与十二指肠相似。

镜检结果显示健康兔肠道组织结构正常,绒毛排列整齐,肠腺轮廓清晰,腹泻兔微绒毛萎缩或崩解成碎片脱落,肠壁变薄,粘膜浅表中性白细胞浸润。十二指肠空肠粘膜厚度、绒毛长度和绒毛长度与隐窝深度比值变化见表1、表2。

表1 兔十二指肠粘膜厚度、绒毛长度的变化

Tab.1 The change of mucosa thickness and villus length in duodenum of rabbit ($\bar{x} \pm S, \mu\text{m}$)

	组别 Group	注射时间/d Injection time			
		1	3	5	7
粘膜厚度 Mucosa thickness	正常对照组 (G1)	642.54 ± 55.49	657.72 ± 71.45a	682.75 ± 34.83a	711.98 ± 13.61a
	人工感染组 (G2)	614.34 ± 34.77	502.78 ± 87.33b	517.40 ± 43.89b	537.54 ± 47.27b
	庆大霉素治疗组 (G3)	632.66 ± 27.43	535.18 ± 53.83bc	585.3 ± 172.44c	612.24 ± 97.41
	乳酸菌素治疗组 (G4)	613.45 ± 71.47	518.54 ± 56.18bc	576.66 ± 69.32bc	635.91 ± 26.47
绒毛长度 Villus length	正常对照组 (G1)	264.65 ± 37.23	293.37 ± 74.25a	298.56 ± 1.12a	314.85 ± 96.19a
	人工感染组 (G2)	255.46 ± 84.22	197.50 ± 74.13b	201.31 ± 41.57b	211.65 ± 84.22b
	庆大霉素治疗组 (G3)	253.263 ± 5.14	210.40 ± 3.22b	248.41 ± 100.38c	247.45 ± 45.22bc
	乳酸菌素治疗组 (G4)	248.19 ± 46.14	187.38 ± 65.24b	225.36 ± 38.35bc	285.42 ± 95.30ac
绒毛长度/隐窝深度 Villus length/Crypt depth	正常对照组 (G1)	3.24 ± 64.17	3.16 ± 64.97a	3.32 ± 3.86a	3.57 ± 85.14a
	人工感染组 (G2)	3.14 ± 82.49	1.82 ± 47.94b	1.93 ± 94.14b	2.15 ± 73.50b
	庆大霉素治疗组 (G3)	3.09 ± 13.65	1.79 ± 43.18b	2.97 ± 65.86ac	3.12 ± 46.19ac
	乳酸菌素治疗组 (G4)	3.11 ± 24.52	1.67 ± 73.64b	2.89 ± 35.91ac	3.22 ± 10.34ac

同列中,小写字母相隔者表示差异极显著 ($P < 0.01$), 标有不同小写字母相邻者表示差异显著 ($P < 0.05$), 标有相同字母或未标字母者差异不显著 ($P > 0.05$)。

The difference between two data with superscript a and c respectively is extremely predominance ($P < 0.01$). The difference between two data with superscript a and b or b and c respectively is predominance ($P < 0.05$). The difference between two data with the same superscript and no superscript is not predominance ($P > 0.05$).

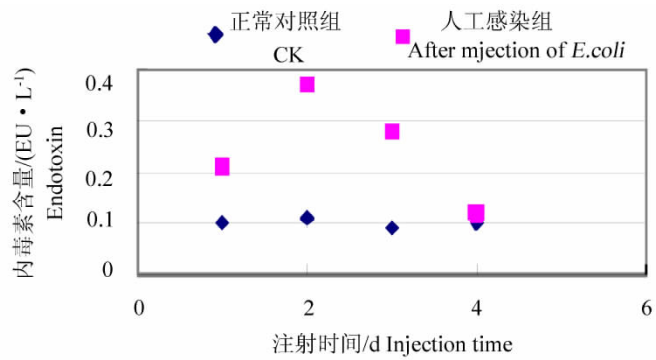


图1 注射大肠杆菌后,正常对照组和人工感染组内毒素变化情况 ($\bar{x} \pm S, \text{EU/L}$)

Fig.1 The change of endotoxins after injection of *E. coli*

表 2 兔空肠粘膜厚度、绒毛长度的变化

Tab. 2 The change of jejunum thickness and villus length in duodenum of rabbit ($\bar{x} \pm S, \mu\text{m}$)

	组别 Group	注射时间/d Injection time			
		1	3	5	7
粘膜厚度 Mucosa thickness	正常对照组(G1)	476.34 ± 27.37	496.59 ± 83.23a	513.16 ± 41.91a	530.48 ± 37.19a
	人工感染组(G2)	448.43 ± 83.21	307.24 ± 52.37b	442.58 ± 12.39b	476.26 ± 84.14b
	庆大霉素治疗组(G3)	452.24 ± 93.10	325.38 ± 37.92b	456.92 ± 29.40b	521.29 ± 25.19c
	乳酸菌素治疗组(G4)	468.39 ± 84.32	317.29 ± 482.21b	496.73 ± 83.12c	509.28 ± 38.20c
绒毛长度 Villus length	正常对照组(G1)	246.63 ± 48.34	276.71 ± 56.29a	287.23 ± 21.39a	310.38 ± 63.73a
	人工感染组(G2)	238.29 ± 5.12	200.47 ± 41.87b	224.83 ± 51.64b	254.76 ± 69.38b
	庆大霉素治疗组(G3)	235.77 ± 87.45	226.87 ± 37.98b	243.75 ± 47.09c	288.4 ± 87.27
	乳酸菌素治疗组(G4)	241.92 ± 85.74	219.76 ± 12.34b	257.87 ± 100.6c	307.41 ± 54.29c
绒毛长度/隐窝深度 Villus length/Crypt depth	正常对照组(G1)	3.11 ± 13.45	3.18 ± 32.59a	3.35 ± 84.20a	3.50 ± 73.10a
	人工感染组(G2)	2.47 ± 83.29	1.73 ± 54.20b	1.82 ± 20.49b	1.91 ± 10.24b
	庆大霉素治疗组(G3)	2.38 ± 31.42	1.84 ± 35.53b	1.92 ± 48.29b	2.14 ± 52.07b
	乳酸菌素治疗组(G4)	2.41 ± 21.11	1.79 ± 1.32b	1.85 ± 14.05b	2.43 ± 94.22c

同列中,小写字母相隔者表示差异极显著($P < 0.01$) 标有不同小写字母相邻者表示差异显著($P < 0.05$) 标有相同字母或未标字母者差异不显著($P > 0.05$)。

The difference between two data with superscript a and c respectively is extremely predominance($P < 0.01$). The difference between two data with superscript a and b or b and c respectively is predominance($P < 0.05$). The difference between two data with the same superscript and no superscript is not predominance($P > 0.05$).

3 讨 论

本实验腹腔注射菌液后第 3 天 G2 组从血浆中均检测出内毒素并超过 G1 组,证明其能形成毒血症,说明临床上常出现的仔兔大肠杆菌病例大量急性死亡现象与毒血症和败血症有很大关系。有研究表明,引起家兔腹泻的大肠杆菌主要为非产肠毒素的致病性大肠杆菌(EPEC) [5-12], 房海等 [18] 报道由兔源大肠杆菌所提取的内毒素能引起家兔明显腹泻,且致泻作用迅速。其机制是大肠杆菌内毒素作用于肠粘膜上皮细胞后,由于腺苷环化酶 Aclase 增多而导致腹泻,内毒素量过大时可引起中毒休克,吸收的内毒素可促进肠粘膜轻度至重度损害 [19]。本实验中内毒素消失后临床症状随即消失,肠道组织学也逐步恢复正常。这说明,兔大肠杆菌的发病与内毒素呈正相关,随着肠绒毛和粘膜厚度的恢复,病兔逐渐恢复正常。腹泻的发生与大量大肠杆菌使上皮细胞损害,微绒毛脱落有关,内毒素也对肠壁和肠绒毛产生损害作用,使腹泻加重。

小肠的正常结构与功能是营养物质被充分消化与吸收的基本保证,特别是小肠的肠粘膜厚度、绒毛长度、隐窝深度及绒毛表面积是衡量小肠消化吸收功能的重要指标 [20-21], 肠绒毛长度与细胞数量呈显著相关,绒毛短时,成熟的绒毛细胞减少,对养分的吸收能力降低。兔十二指肠、空肠生理和病理状态下各组的肠绒毛长度、肠粘膜厚度和肠绒毛长度与隐窝深度比值说明大肠杆菌引起的腹泻对小肠正常组织的形态学结果产生损害,引起酶水平和吸收能力下降,从而继发仔猪胃肠道微生物区系发生变化,腹泻兔肠内容物的排空、粘液的分泌流动、粘膜上皮细胞不断脱落、纤毛运动等生理机能不断清除相应部位的细菌,使细菌密集度降低,大肠杆菌等成为优势菌群,细菌分泌的肠毒素相应的增加,腹泻更加严重。大肠杆菌其致病性主要依靠其紧密地粘附于肠上皮细胞,导致微绒毛的损伤和柱状上皮细胞损害,造成细胞膜通透性增强,引起肠道炎症和腹泻,血液中白细胞增多,有大量炎性细胞侵害实质脏器和消化道。毒素和有害物质被吸收后,改变了肠道通透性,导致电解质从血液中渗入消化道 [22]。

目前防治家兔腹泻主要使用抗生素类化学药物及相应疫苗,同时加强饲养管理、调整饲料结构,取得了一定的效果,但也存在许多弊端。抗生素作为饲料添加剂,长期大量地被使用,能破坏消化道的正常微生物区系,不但不能提高畜禽生产性能,而且使动物机体产生抗药性。本实验表明,生物活性物质乳酸菌素在大肠杆菌引起兔腹泻的治疗中能恢复肠壁厚度和绒毛长度,在疾病恢复期好于庆大霉素的治疗效果,这为该病的临床治疗提供了理论支撑。

参考文献:

- [1] 王照福, 章晓卫, 姚光光, 等. 养兔和兔病防治 [M]. 北京: 北京出版社, 1999: 245-247.
- [2] 蔡家利, 尹会方. 兔大肠杆菌病的诊断与防治 [J]. 中国养兔杂志, 2000(3): 7-9.
- [3] 昌红莲, 宋兴民. 兔大肠杆菌性腹泻的诊治 [J]. 中国养兔杂志, 2001, 37(3): 30-31.
- [4] 成进, 黄炯, 徐定法. 兔大肠杆菌病的病原鉴定和免疫预防 [J]. 中国兽医科技, 1990, 6: 29.
- [5] 房海. 人及动物病原细菌学 [M]. 石家庄: 河北科学技术出版社, 2002: 454-486.
- [6] 秦爱建. 非肠毒性大肠杆菌致家兔的肠道感染 [J]. 中国养兔杂志, 1989, 4: 28-29.
- [7] Joeha E, Peeters, Jierre Poh I, Lieve Okerman, et al. Pathogenic properties of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic commercial rabbits [J]. Chin Microbiol, 1984, 20(1): 34-39.
- [8] Marenda M, Milon A, Bauerfeind, et al. Enteropathogenic(EPEC-like) *Escherichia coli* negative for Shiga like toxins from weaned rabbits [J]. Revue - de - Medecine - Veterinaire, 1992, 143: 4, 333-340.
- [9] Blanco J E, Blanco M, Blanco J, et al. Serotypes, toxins and antibiotic resistance of *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeic and healthy rabbits in Spain [J]. Vet Microbiol, 1994, 38: 3, 193-201, 20.
- [10] Bole - Hribovsek V, Mehle j, Mrzel I, et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* in rabbits in Slovenia [J]. Abornik - Veterinarnaske - Fakultete - Univerza - Ljubljana, 1992, 29: 2, 235-245.
- [11] Licois D. Enteropathogenic *Escherichia coli* from rabbits [J]. Annalesde Recherches Veterinaire, 1992, 23: 27-48.
- [12] Penteadó A S, Ugrinovich L A, Blanco J, et al. Serobiotypes and virulence genes of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits in Brazil [J]. Vet Microbiol, 2002, 89(1): 41-51.
- [13] 安永义. 肉仔鸡消化道酶发育规律及外源酶添加效应研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 1997.
- [14] 杨全名. 仔猪消化道酶和组织器官生长发育规律的研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 1999.
- [15] 高振华, 杨秀女, 孟艳, 等. 獭兔小肠组织形态发育规律研究 [J]. 经济动物学报, 2008, 12(3): 160-164.
- [16] 牛钟相, 郭延奎. 健康兔与腹泻兔胃肠道正常微生物群超微观察 [J]. 畜牧兽医学报, 1995, 26(6): 565-568.
- [17] 贾付丽. 微生态制剂在畜禽养殖中的作用 [J]. 河南农业科学, 2003(1): 46-46.
- [18] 房海, 陈翠珍, 王廷富. 家兔大肠杆菌病的调查研究 [J]. 畜牧兽医学报, 1990, 21(4): 366-371.
- [19] 王廷富, 房海, 陈翠珍. 家兔感染大肠杆菌内毒素的病理形态学观察 [J]. 畜牧与兽医, 1992, 24(1): 30-31.
- [20] 李可洲, 李宁, 黎介寿, 等. 短链脂肪酸对大鼠移植小肠形态及功能的作用研究 [J]. 世界华人杂志, 2002, 10(6): 720-722.
- [21] 韩正康. 家畜营养生理学 [M]. 北京: 农业出版社, 1991: 16-17.
- [22] 董亚芳. 家兔腹泻病的探讨 [J]. 中国养兔杂志, 1985(1): 29-32.