

肠侵袭性大肠杆菌感染野猪的诊断和药敏试验

何光志¹, 田维毅¹, 王平¹, 王文佳¹, 韩洁¹,
张太华², 熊文康², 崔小东², 文明^{3*}

(1. 贵阳中医学院, 贵州 贵阳 550002; 2. 思南县动物疾病预防控制中心, 贵州 思南 565100; 3. 贵州大学, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 无菌取病死野猪的心脏、肝脏、肺脏、脾脏及肾脏等组织病料, 进行细菌的分离培养与 PCR 鉴定, 分离出肠侵袭性大肠杆菌。结合临床症状、剖检病变和实验室诊断, 从而确诊野猪病死于肠侵袭性大肠杆菌感染。并对分离菌株进行药敏试验, 为野猪的肠侵袭性大肠杆菌感染疾病的诊断和防治提供参考。

关键词: 野猪; 大肠杆菌; 金黄色葡萄球菌; 分离鉴定; 诊治

中图分类号: S852.61+2; S858.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-2286(2010)01-0144-05

Diagnosis and Drug Sensitivity Test of Enteroinvasive *E. coli* in *Sus scrofa*

HE Guang-zhi¹, TIAN Wei-yi¹, WANG Ping¹, WANG Wen-jia¹, HAN Jie¹,
ZHANG Tai-hua², XIONG Wen-kang², CUI Xiao-dong², WEN Ming^{3*}

(1. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China; 2. The Prevention and Regulation Center of Animal Disease of Sinan, Sinan 565100, China; 3. Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: Heart, liver, lung, spleen and kidney were obtained from dead wild boars by sterile method, and the pathogenic bacteria were isolated, cultured and identified by PCR. According to the symptoms, pathological changes, laboratory diagnosis, it could be concluded that infection of *Enteroinvasive E. coli* was the cause of the disease of *Sus scrofa*. A susceptibility test was also performed. The study provides reference for the diagnosis and treatment of the infection of *Enteroinvasive E. coli* in *Sus scrofa*.

Key words: *Sus scrofa*; *Enteroinvasive E. coli*; isolation and identification; diagnosis and treatment

野猪 (*Sus scrofa*) 是国家三级保护动物, 已被列入国家林业局发布的《国家保护的有益的或者有重要经济、科学研究价值的陆生野生动物名录》。野猪作为家猪的祖先, 是重要的资源兽类之一。它广泛地分布于欧洲、亚洲及其东南部岛屿和北非^[1]。

2008 年 1 月 2 只野猪在野外发病经抢救无效而死亡, 笔者根据临床症状、剖检病变和实验室诊断, 首次确诊和报道野猪病死于肠侵袭性大肠杆菌 (*Enteroinvasive E. coli*) 感染的病例, 并对分离菌株进行

收稿日期: 2009-11-12 修回日期: 2009-12-11

基金项目: 贵州省农业攻关项目黔科合字(2009)2069号

作者简介: 何光志(1977-) 男, 博士, 讲师, 主要从事病原微生物学、分子寄生虫学及免疫学研究, E-mail: heguangzhi7711@sina.com; * 通讯作者: 文明, 教授, 博士, E-mail: wenming909@hotmail.com。

了药敏试验,从而为肠侵袭性大肠杆菌感染疾病的救治提供参考。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 培养基 糖发酵管及药敏片均购于杭州天和微生物试剂有限公司,其他培养基由本实验室制备。

1.1.2 诊断血清 致病性大肠艾希氏菌诊断血清、产毒性大肠艾希氏菌诊断血清和侵袭性大肠艾希氏菌诊断血清购自广州市辉康生物科技有限公司。

1.1.3 猪瘟荧光抗体 购于兰州生物制品研究所。

1.1.4 引物设计 由上海英俊生物有限公司合成。

1.1.5 实验动物 10日龄健康小白鼠25只(大小均匀)购于贵阳中医学院实验动物中心。笔者记录现场观察的临床症状和剖解观察病变。

1.2 实验方法

1.2.1 免疫荧光抗体试验检测 取肝脏、脾脏、淋巴结触片加丙酮固定,滴加猪瘟荧光抗体,置于湿盒内37℃作用45min后,漂洗后晾干,用荧光显微镜检查。

1.2.2 细菌形态观察 无菌取病野猪的心脏、肝脏、肺脏、脾脏及肾脏等组织病料分别触片或涂片,进行革兰氏和美兰染色,油镜观察。

1.2.3 细菌分离培养 将上述病料分别接种于普通肉汤、普通营养琼脂和血液琼脂培养基上,37℃培养24h后观察,再挑取乳白色菌落在EMB37℃培养24h。

1.2.4 细菌生化试验 挑取在EMB平板上为紫黑色带金属光泽的菌落进行纯培养,穿刺接种于三糖铁斜面培养基,经37℃培养24h。将细菌纯培养物进行甲基红试验、靛基质试验、醋酸钠利用试验、葡萄糖铵利用试验、粘质酸盐产酸试验、V-P试验、枸橼酸盐试验、赖氨酸脱羧酶试验、硫化氢试验、尿素酶试验和动力试验,并将纯培养物分别接种于葡萄糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖和甘露醇等糖发酵管。

1.2.5 分离菌株DNA的提取及PCR鉴定 将分离菌株接种LB液体培养基37℃培养12h后,95℃10min,10000×g离心10min,取沉淀用酚/酚-氯仿(1:1)/氯仿-异戊醇(24:1)提取细菌总DNA,引用杨春梅等扩增志贺菌属和侵袭性大肠埃希菌侵袭性质粒抗原基因部分序列引物进行扩增^[2]。PCR扩增产物用UNIQ-10柱式DNA胶回收试剂盒回收产物。将目的片段与pMD18-T载体连接,然后转化感受态细胞,菌落PCR鉴定为阳性的克隆菌株送往上海英俊生物有限公司测序。

1.2.6 分离菌作玻片凝集试验 志贺菌诊断血清、致病性大肠艾希氏菌诊断血清、产毒性大肠艾希氏菌诊断血清和侵袭性大肠艾希氏菌诊断血清分别与分离杆菌作玻片凝集试验。

1.2.7 动物试验 将分离杆菌培养于营养肉汤中培养18h后,取培养液用灭菌生理盐水(pH7.4)稀释成10⁸CFU/mL经腹腔及肌肉注射0.1mL于小白鼠体内。

1.2.8 药敏试验 将分离两菌株培养于营养肉汤中18h,将培养物稀释成菌液浓度为3×10¹¹CFU/mL后,按常规纸片法进行常用抗菌药物的敏感性测定,37℃培养18~24h后观察结果,判定标准参照美国实验室标准委员会(NCCLS)药敏纸片扩散法法规。

2 结果与分析

2.1 临床症状及剖检病变

野猪发病以发热、腹泻和脓血便为主要症状。剖检可见肝脏中度肿大,肝脏右叶边缘形成坏死灶;肺脏出血和淤血水肿;胃和十二指肠出血,淤血水肿;大肠与小肠部分肠段有出血点和出血斑,小肠内壁段的粘膜坏死脱落,心包积液,血管内弥散性凝血和实质器官变性,其他器官未见异常。取野猪的肝脏、脾脏和淋巴结经过猪瘟荧光抗体染色,在荧光显微镜下观察细胞浆内有没有黄绿色荧光。

2.2 组织涂片染色镜检

无菌取病野猪的心脏、肝脏、肺脏、脾脏及肾脏等组织病料触片或涂片进行革兰氏染色、镜检,可见到革兰氏阴性小杆菌,菌体周围有荚膜,无芽孢、鞭毛。

2.3 菌落形态及培养特性

通过分离培养获得 2 种细菌 杆菌在普通营养琼脂平板上生长出乳白色、半透明、湿润、微凸起的圆形菌落 在普通肉汤中呈均匀混浊;在血液琼脂培养基上不溶血;在 EMB 平板上生长为中等大小 无色或淡红色、光滑湿润的菌落。

2.4 生化特性

在 EMB 平板上挑取紫黑色带金属光泽的菌落进行纯培养物接种糖发酵管和其他生化试剂 结果如表 1。由表 1 看出,分离菌株能使三糖铁斜面和底部变黄产气,可发酵葡萄糖产酸产气,发酵甘露醇和麦芽糖,不分解蔗糖和乳糖;三糖铁试验、甲基红试验、靛基质试验、醋酸钠利用试验、葡萄糖铵利用试验和粘质酸盐产酸试验结果为阳性;V-P 试验、枸橼酸盐试验、赖氨酸脱羧酶试验、硫化氢试验和尿素酶试验为阴性,无运动性。

表 1 分离菌株生化特性
Tab.1 Biochemical characteristics of isolated bacilli strains from wild boars

葡萄糖 Glucose	乳糖 Lactose	麦芽糖 Maltose	蔗糖 Sucrose	甘露醇 Mannitol	甲基红试验 Indole test	靛基质试验 Methyl test	醋酸钠试验 Sodium acetate test
+	-	-	-	+	+	+	+
葡萄糖铵 试验 Glucose ammonium test	V-P	枸橼酸盐 Citrate test	赖氨酸脱羧酶 试验 Lysine decarboxylase test	硫化氢试验 Hydrogen sulfide test	尿素酶试验 Urease test	三糖铁试验 Triple sugar iron test	动力试验 Power
+	-	-	-	-	-	+	-

+ 表示反应为阳性; - 表示反应为阴性。

2.5 分离菌作玻片凝集试验

分离杆菌株与肠侵袭性大肠杆菌诊断血清发生明显的凝集现象(与其它血清不反应)。

2.6 PCR 鉴定

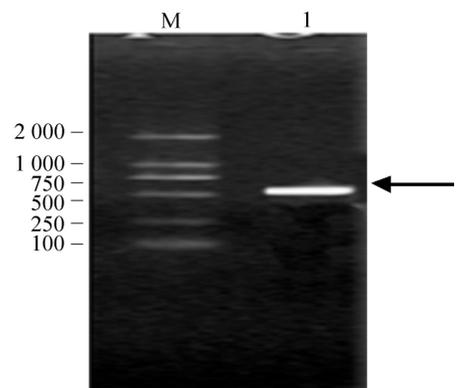
将 PCR 的扩增产物经 10 g/L 的琼脂糖凝胶上电泳检测,与标准的 DL2000Marker 相比较显示,扩增出大小在 500 ~ 750 bp 片段。结果见电泳图 1。将 PCR 扩增片段胶回收后,进行克隆,经菌落 PCR 鉴定为阳性的克隆菌株,送上海英俊生物有限公司进行测序,测序结果(用 SEiph 表示)与 Genbank 公布的 *Shigella boydii* (EU743832) 和 *Escherichia coli* (CP001064) 的侵袭性质粒抗原 H 部分序列进行比较,同源性均为 98.71% (图 2)。

2.7 动物试验

野猪分离杆菌接种 20 只小白鼠于 24 ~ 36 h 内死亡,而对照组动物全部健存。从死亡的小鼠的心脏、肝脏、脾脏、肺脏和肾脏等组织分离的细菌,经染色镜检、生化试验和血清型鉴定确定为接种菌。

2.8 药敏试验

从病野猪的组织中分离的杆菌株和球菌株,分别接种于 5 mL 营养肉汤中,37 °C 培养 18 h,将培养物原液稀释成菌液浓度为 3×10^{11} CFU/mL 后,按常规纸片法分别对两株细菌进行常用抗菌药物的敏感性测定。由表 2 看出,分离杆菌株对 AMP、CTX、SMZ 和 CIP 最敏感,对 AKN、GEN、NOR、DOX、NT、STR 和 PXB 次之,对 ERY 和 MDE 不敏感。



M: DL2000 Marker; 1: 分离菌株的扩增基因。

The amplified gene from Isolates.

图 1 分离菌株 PCR 扩增产物电泳分析

Fig.1 Electrophoresis analysis of PCR amplified

```

EU743832 CCGGTCAGCCACCCTCTGAGGGTACTCATTCTCCAGCATCTCATATTTCTGCTCTTCTGC
CP001064 -----A-----C-----
SEiph-----A-----C-----
EU743832 CAGCGCCCAGCGGTCAGCTTCCGTACGCTTACAGTACAGCATGCCATGGTCCCCAGAGGGA
CP001064 -T-----T-----
SEiph  -A-----A-----
EU743832 GAACCAGTCCGTAAATTCATTCTCTTACGGCTTCTGACCATGGCTTCGGCAGTGCGGAG
CP001064 -----C-----
SEiph -----A-----
EU743832 GTCATTTGCTGTCACTCCCACACGCCATAGAAAACGCATTTCTTACGGCAGTGAGAGAG
CP001064 -----
SEiph -----
EU743832 CTGAAGTTTCTCTGCGAGCATGGTCTGGAAGGCCAGGTAGACTTCTATCTCATCCACAAA
CP001064 -----A-----
SEiph -----C-----
EU743832 ATGGAGAGTTCTGACTTTATCCCGGGCAATGTCCTCCAGAATTCGAGGCGGAACATTTTC
CP001064 -----C-----
SEiph -----T-----
EU743832 CCTGCCCAGGGAGAGCAGAGCGCCGGTATCATTATCGAAAAGGCCTTCTGATGCCTGATG
CP001064 -----G-----
SEiph -----C-----
EU743832 GACCAGGAGGGTTTTCCGGAGATTGTTCCATGTGAGCGCGACACGGTCTCACAGCTCTC
CP001064 -----G-----
SEiph -----C-----
EU743832 AGTGGCATCAGCAGCAACAGCGAAAGACTGCTGTCCAAGCTCCGCAGAGGCACTGAGTTT
CP001064 -----
SEiph -----
EU743832 TTCCAGCCATGCAGCGACCTGTTACCGAATCCGGAGGTATTGCCGTGCAGAGACGGTATC
CP001064 -----
SEiph -----
EU743832 GGAAAGCGGTC AAGGAACG
CP001064 -----C-----
SEiph -----G-----
    
```

图 2 扩增片段与 *Shigella boydii* 和 *Escherichia coli* 的侵袭性质粒抗原 H 部分序列同源性比较

Fig. 2 Comparison of the amplification nucleotide sequence with the nucleotide sequence of invasion plasmid antigen from *Shigella boydii* and *Enteroinvasive E. coli*

表 2 野猪分离的杆菌株药敏试验结果

Tab.2 The results of isolated bacilli strains sensitivity test from wild boars

抗生素 Antibiotics	直径/mm Diameter	抗生素 Antibiotics	直径/mm Diameter
氨苄青霉素 AMP	27.51	呋喃妥因 NT	17.52
头孢噻肟 CTX	28.25	复方新诺明 SMZ	25.58
丁胺卡那 AKN	17.32	链霉素 STR	12.56
庆大霉素 GEN	17.43	多粘菌素 BPXB	13.25
氟哌酸 NOR	18.62	红霉素 ERY	8.65
环丙沙星 CIP	25.98	甲硝唑 MDE	7.75
强力霉素 DOX	15.52		

3 讨论与小结

(1) 本实验分离杆菌革兰氏阴性小杆菌,菌体周围有荚膜,能使三糖铁斜面 and 底部变黄产气,可发

酵葡萄糖产酸产气,发酵甘露醇和麦芽糖,不分解蔗糖和乳糖,甲基红试验、靛基质试验、醋酸钠利用试验、葡萄糖铵利用试验和粘质酸盐产酸试验结果为阳性,V-P 试验、枸橼酸盐试验、赖氨酸脱羧酶试验、硫化氢试验和尿素酶试验为阴性,无运动性。这些生化特征符合大肠杆菌的生化特征^[3-4]。

采用 PCR 方法扩增片段在 500 ~ 750 bp,克隆测序结果与 Genbank 公布的 *Shigella boydii* (EU743832) 和 *Escherichia coli* (CP001064) 的侵袭性质粒抗原 H 部分序列进行比较,同源性均为 98.71%。取野猪的肝脏、脾脏和淋巴结经过猪瘟荧光抗体染色为阴性,说明野猪发病和死亡原因不是猪瘟引起的。

通过分离菌与诊断血清作玻片凝集试验,分离杆菌株与肠侵袭性大肠杆菌诊断血清发生明显的凝集现象(与其它血清不发生凝集反应)。通过临床症状和病理变化观察,结合细菌分离、生化反应和 PCR 鉴定,确诊野猪发病和死亡原因为侵袭性大肠杆菌感染。

(2) 志贺菌和侵袭性大肠杆菌能使人或者动物引起痢疾样腹泻^[5],而且 EIEC 与志贺菌的抗血清有交叉反应,两菌属十分相似。包芳珍等认为侵袭性大肠杆菌不发酵乳糖,赖氨酸脱羧酶阴性,无动力。EIEC 与志贺菌的抗血清有交叉反应,两菌属十分相似,主要的鉴别试验是醋酸钠、葡萄糖铵利用试验和粘质酸盐产酸试验,大肠埃希菌三者均阳性,而志贺菌均阴性^[6-7]。*IpaH* 基因存在于所有志贺菌属和 EIEC 的质粒和染色体上,有大量的拷贝数,是侵袭力的特异标志。检出 *IpaH* 基因可以认为是由志贺菌属或 EIEC 引起的腹泻^[5]。

(3) 腹泻性疾病是世界范围内的一个重要的公共卫生问题。侵袭性大肠杆菌(Enteroinvasive *E. coli* EIEC)引起发病主要是由污染水和食物引起感染,可爆发流行,也可接触传播,形成散发^[8]。它不产生肠毒素,但它可以侵入肠粘膜上皮细胞,在细胞内繁殖引起细胞变性,进而在内毒素的作用下,损伤细胞。使肠上皮出现损伤,导致黏膜固有层出现炎症、溃疡、出血,临床上表现出细菌性痢疾症状^[9]。致细胞炎症或形成溃疡,即所谓的侵袭力,EIEC 的侵袭力也是由质粒所控制的。

(4) 病原菌对抗生素药物的敏感性在不同地区,不同场地的药敏情况可有很大不同,在用药时建议应通过药敏试验,筛选出敏感药物。本次实验分离的侵袭性大肠杆菌对分离杆菌株对分离杆菌株对 AMP、CTX、SMZ 和 CIP 最敏感,本试验为野猪的肠侵袭性大肠杆菌感染疾病的诊断和防治提供参考。

参考文献:

- [1] 孙博兴,赵志辉,郭淑艳. 野猪种源生态与杂交利用的研究进展[J]. 四川动物, 2009, 28(1): 153-156.
- [2] 杨春梅,王福元,刘小云,等. PCR 检测志贺菌和侵袭性大肠埃希菌的侵袭性质粒抗原 H 基因[J]. 临床检验杂志, 2001, 19(5): 280-282.
- [3] 张红见,韩志辉,李亚轩. 乌鸡大肠杆菌和葡萄球菌混合感染的病原分离与鉴定[J]. 青海大学学报:自然科学版, 2005, 23(2): 52-55.
- [4] 杨永刚,张鹏. 鸭大肠杆菌和葡萄球菌混合感染诊治[J]. 畜牧与兽医, 2006(5): 57-58.
- [5] 李向阳,李方去,杨锦红. *IpaH* 基因扩增诊断志贺菌和肠侵袭性大肠埃希菌[J]. 中华检验医学杂志, 2001, 24(3): 67.
- [6] 梅基铭. 肠侵袭性大肠杆菌及其临床检验[J]. 国际检验医学杂志, 1989, 5: 3-5.
- [7] 包芳珍,方叶珍,徐丹戈,等. 肠侵袭性大肠埃希菌检测方法进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(4): 757-758.
- [8] 杨正时. 国内所见肠侵袭性大肠杆菌血清型[J]. 中华流行病学杂志, 1988, 9(2): 84-87.
- [9] 徐景野,王仁元,许国章. 侵袭性大肠杆菌实验研究进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2000, 10(4): 507-509.