

李贵萧,朱宗涛,康燕青,等. 鸡大肠杆菌的血清抗性与致病性检验[J]. 江苏农业科学,2015,43(11):301-303.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.095

鸡大肠杆菌的血清抗性与致病性检验

李贵萧,朱宗涛,康燕青,李筱筱,李淑壮,樊琛,郑焕芹

(聊城大学农学院,山东聊城 252059)

摘要:将不同来源的 60 株菌株进行致病性试验及血清补体抗性检测,探讨补体抗性与鸡大肠埃希菌致病力的相互关系。结果表明,大肠杆菌在血清中的存活能力与其致病力间相关系数为 0.259, P 值 = 0.046 < 0.05,即大肠杆菌的补体抗性与其致病力显著相关。

关键词:鸡;大肠杆菌;致病性;血清补体;抗性

中图分类号: S858.31 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)11-0301-02

鸡大肠杆菌病是由大肠杆菌中的某些致病性菌株引起的鸡感染性疾病的总称,是养鸡生产中常见的一种传染病,该病可增加其他病原体感染机会,对养殖及食品安全有较大影响^[1-3]。为了解典型大肠杆菌的特性,了解大肠杆菌血清抗性与致病性的关系,对 60 株菌进行血清补体抗性试验,并结合鸡胚致死率探索鸡大肠杆菌的致病力及其补体抗性的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 BL21、TG1 为感受态细菌;SL1、SL3、SD2、SD3、SD4、SD5、SD6、SD7、SD8、SD10、SD11、SD12、SD13、SD14、SD15、SD17、SD18、SD19、SD20、SD21、SD22、SD23、SD24、SD25、SD26、SD27、SD28、SD29、SD30、SD31、SD32、SD33、SD34、SD35,共 34 株,采自于山东地区健康鸡粪便,聊城大学食品安全教研室保存;cvcc1551、cvcc1553、cvcc1562、cvcc1568、O1、O78,购于中国兽药药品监察所;O2、新大、田大、北京 1、北京 3、贵州分别为来自北京市、贵州省、黑龙江省 3 个发病鸡场分离的强毒株,由东北农业大学预防兽医教研室保存;E1、E4、E5、E7、E8、E9、E10、E11、E14、E18、E21、E27 从外观健康的不同雏鸡粪便中分离鉴定获得,由东北农业大学预防兽医教研室保存。

1.1.2 试剂 伊红美蓝培养基、麦康凯培养基、LB 普通营养肉汤培养基、普通营养琼脂、生化试验鉴定管、各种生物化学试剂,均购自青岛海博生物技术有限公司。

1.1.3 试验动物 11 日龄鸡胚购于山东省聊城市阳谷县。

1.2 方法

1.2.1 细菌的活化 挑取活化的菌种接种于伊红美蓝培养基于 37℃ 恒温箱培养 24 h 后,挑取紫黑色带绿色金属光泽的菌落,连续 2 次接种于麦康凯琼脂平板,继续培养

24 h^[4-6]。选纯红色菌落,以无菌操作进行抹片、革兰氏染色镜检,进行 IMViC 生化鉴定试验,确定后于 LB 普通营养肉汤进行纯扩增培养 24 h^[7-11],记录试验结果,纯培养物置于 4℃ 冰箱备用。

1.2.2 细菌的致病性试验 用接种环挑取平板上的单菌落,在普通营养肉汤中 37℃ 摇床培养 10~12 h。取 1 mL 的菌液 4 000 r/min 离心 2 min,弃去上清液,再用生理盐水洗 2 次,倍比稀释。取 0.1 mL 稀释液经尿囊腔注射 11 日龄 SPF 鸡胚,100~300 CFU/只,每组 10 只,同时取 0.1 mL 稀释液涂板,做细菌计数。对照组注射生理盐水,共注射 10 只。于恒温培养箱 37℃ 培养,每日检蛋,记录每日死亡数,至第 4 天,记录胚胎的死亡率。

1.2.3 血清制备 无菌操作取鸡血于已灭菌的离心管中,37℃ 放置 1~2 h,再于 4℃ 静置 3~4 h,3 000 r/min 离心 20 min,取上清液于 -20℃ 保存^[8-9]。

1.2.4 菌株血清抗性检测 用接种环挑取平板上的单菌落,在 LB 液体培养基中 37℃ 培养至对数期。取 500 μL 菌液 4 000 r/min 离心 2 min,弃掉上清液,用 0.06 mol/L 的 NaCl 洗 1 次,重悬于 0.9% 的生理盐水,倍比稀释 2 次。再将 0.1 mL 细菌悬液与 0.4 mL 血清相混合,37℃ 温育 2 h,分别于 0、2 h 取样平板计数。平行 2 次取平均值,计算培养 0、2 h 活菌数的对数差值,通过统计学分析,判定菌株的血清抗性强弱^[5-6]。

2 结果与分析

2.1 细菌的活化

试验中 58 株自然菌在伊红美蓝琼脂上形成紫黑色带金属光泽的菌落;麦康凯琼脂上为表面光滑湿润中央轻微隆起、边缘整齐菌落;在营养琼脂上形成圆形微凸起、表面光滑湿润、边缘整齐、半透明灰白色菌落;肉汤中培养呈现混浊,轻摇呈絮状物存在,部分菌株可在肉汤表面形成菌环;M-R 试验、吡啶试验呈阳性,枸橼酸盐、V-P 试验呈阴性,符合大肠杆菌的特征。

2.2 菌株血清抗性检测结果

经 SPSS 软件分析 60 株菌培养 0、2 h 活菌数的对数差值,得补体抗性在 90% 的置信区间为 [-2.120 5,

收稿日期:2014-11-18

基金项目:国家自然科学基金青年项目(编号:31302128)。

作者简介:李贵萧(1991—),女,山东德州人,主要从事食品营养与卫生方面的研究。

通信作者:樊琛。E-mail:fanchen7810@126.com。

-1.538 9],大于上限(-1.538 9)的即具有血清抗性的共 22 株,介于上限(-1.538 9)与下限(-2.120 5)之间的即血清抗性处于中间态的共 12 株,小于下限的即血清敏感菌株共 26 株(表 1)。

2.3 菌株致病性试验结果

经 SPSS 软件分析,60 株菌的致死率在 90% 的置信区间 [0.095 5,0.194 5],大于上限(0.194 5)的共 32 株菌,即具有高致病性的菌株共 32 株,在上限(0.194 5)和下限(0.095 5)之间的共 13 株,即中等致病性菌株的共 10 株,下限(0.095 5)以下的共有 15 株,即无致病性/低致病性的菌株共 15 株(表 1)。

由表 1 可见,60 株菌的补体抗性在 90% 的置信区间为 [-2.120 5,-1.538 9],大于上限的共 22 株菌,即具有血清抗性的共 22 株,其 Δlg 的平均值为 -0.319 0,相应菌株的致死率的平均值为 34%。在上限(-1.538 9)和下限(-2.120 5)之间的共 12 株,即血清抗性处于中间态的共 12 株,其 Δlg 的平均值为 -1.844 7,相应菌株的致死率的平均值为 23%。在下限(-2.120 5)的共有 26 株,即血清敏感的共 26 株,其 Δlg 的平均值为 -2.870 2,相应菌株的致死率的平均值为 18%。结果表明,血清抗性菌株的平均致死率高于血清敏感性菌株的平均致死率。

经 SPSS 软件分析可知,60 株大肠杆菌在血清中的存活能力与其致病力间相关系数为 0.259, $P=0.046<0.05$,即大肠杆菌的补体抗性与其致病力显著相关。

3 讨论

试验从健康鸡粪便中分离到 60 株大肠杆菌,对其中 58 株自然菌进行分离培养、生化鉴定,均符合大肠杆菌的结构特征,确定 58 株菌株均为大肠杆菌。致病力试验目前通常采用雏鸡致死试验及鸡胚致死试验,如常新耀等在鸡大肠杆菌的生化特性、致病性及药敏试验研究试验中,对试验组 10 日龄蛋鸡颈部皮下接种菌株培养物,每羽 0.1 mL,对照组腹腔接种相同剂量的灭菌生理盐水^[11];赖平安等在鸡大肠杆菌致病力与某些生物特性的相关性探讨试验中,每一菌株分别 0.5 mL/羽于颈部皮下接种 5 羽 1 日龄雏鸡,对照组于颈部皮下接种同等量的灭菌生理盐水^[12];刘静等在中国部分地区禽源性大肠杆菌分离株的致病性试验中,取 0.1 mL 的 LB 培养物于静行气管内注射 1 日龄罗曼商品代蛋鸡,对照组注射同剂量肉汤^[13],本试验采用尿囊腔注射 11 日龄 SPF 鸡胚,对照组注射同剂量生理盐水,结果显示,此方法可分析大肠杆菌致病力。对 60 株菌株进行致病性试验及血清抗性试验,结果表明,大肠杆菌在血清中的存活能力与其致病力间相关系数为 0.259, $P=0.046<0.05$,即大肠杆菌的补体抗性与其致病力显著相关。王晶钰等在鸡源大肠杆菌某些生物学特性与致病力相关性研究中表明大肠杆菌的致病力与血清型和溶血性无关,而与刚果红表型、盐凝集性和补体抗性呈明显正相关^[7]。陈祥等在禽源大肠杆菌的生物表型特性试验中,比较 243 个禽分离株的血清耐受和致病性的关系中,结果说明血清耐受与致病性呈现一定的规律性,血清耐受与致病力呈良好的相关性^[8]。牛明福等在多杀性巴氏杆菌的血清抗性 & 毒力比较研究中提到一些巴氏杆菌菌株和其他革兰氏阴性菌

表 1 菌株血清抗性与致病性试验结果

| 菌编号 | lg(0 h) | lg(2 h) | Δlg | 致死率(%) |
|----------|---------|---------|--------|--------|
| SD2 | 4.813 | 2.842 | -1.971 | 50 |
| SD3 | 4.447 | 2.785 | -1.662 | 10 |
| SD4 | 4.881 | 2.732 | -2.148 | 0 |
| SD5 | 4.991 | 1.740 | -3.251 | 30 |
| SD6 | 5.405 | 2.439 | -2.966 | 20 |
| SD7 | 5.423 | 3.013 | -2.410 | 10 |
| SD8 | 4.932 | 2.322 | -2.610 | 0 |
| SD10 | 4.857 | 2.342 | -2.515 | 10 |
| SD11 | 4.512 | 4.826 | 0.314 | 30 |
| SD12 | 4.398 | 1.954 | -2.444 | 10 |
| SD13 | 5.099 | 2.041 | -3.057 | 0 |
| SD14 | 4.607 | 4.217 | -0.390 | 0 |
| SD15 | 5.699 | 4.017 | -1.682 | 40 |
| SD17 | 5.035 | 2.574 | -2.461 | 10 |
| SD18 | 3.398 | 3.892 | 0.494 | 0 |
| SD19 | 4.699 | 4.813 | 0.114 | 20 |
| SD20 | 4.301 | 1.000 | -3.301 | 0 |
| SD21 | 4.653 | 3.011 | -1.642 | 10 |
| SD22 | 5.035 | 2.810 | -2.226 | 0 |
| SD23 | 3.653 | 2.866 | -0.787 | 0 |
| SD24 | 4.176 | 1.699 | -2.477 | 40 |
| SD25 | 4.301 | 2.332 | -1.969 | 10 |
| SD26 | 5.806 | 4.017 | -1.789 | 50 |
| SD27 | 4.839 | 2.322 | -2.517 | 30 |
| SD28 | 5.284 | 4.079 | -1.205 | 30 |
| SD29 | 5.334 | 2.638 | -2.696 | 30 |
| SD30 | 5.175 | 2.580 | -2.595 | 20 |
| SD31 | 5.312 | 2.146 | -3.166 | 20 |
| SD32 | 4.498 | 2.491 | -2.007 | 0 |
| SD33 | 4.740 | 3.422 | -1.318 | 10 |
| SD34 | 5.968 | 1.301 | -4.667 | 40 |
| SD35 | 4.477 | 1.778 | -2.699 | 10 |
| SL1 | 3.477 | 1.301 | -2.176 | 10 |
| SL3 | 4.732 | 1.740 | -2.992 | 0 |
| CVCC1551 | 4.550 | 4.875 | 0.325 | 80 |
| CVCC1553 | 5.353 | 4.875 | -0.478 | 70 |
| CVCC1562 | 6.114 | 5.093 | -1.021 | 50 |
| CVCC1568 | 3.653 | 4.932 | 1.279 | 40 |
| 新大 | 5.164 | 3.462 | -1.702 | 70 |
| 贵州 | 5.618 | 2.204 | -3.413 | 60 |
| 北京 1 | 5.519 | 5.362 | -0.157 | 60 |
| 田大 | 4.922 | 2.699 | -2.223 | 50 |
| 北京 3 | 5.027 | 3.720 | -1.307 | 50 |
| TG1 | 5.332 | 3.330 | -2.002 | 30 |
| O1 | 4.732 | 5.624 | 0.892 | 50 |
| O2 | 5.043 | 5.199 | 0.155 | 70 |
| O78 | 4.638 | 5.334 | 0.695 | 40 |
| E1 | 5.279 | 3.798 | -1.481 | 10 |
| E4 | 5.732 | 1.176 | -4.556 | 10 |
| E5 | 5.290 | 3.838 | -1.452 | 10 |
| E7 | 5.854 | 3.597 | -2.258 | 10 |
| E8 | 5.432 | 3.919 | -1.513 | 0 |
| E9 | 4.332 | 2.301 | -2.031 | 0 |
| E10 | 6.374 | 2.301 | -4.073 | 60 |
| E11 | 4.332 | 5.505 | 1.173 | 30 |
| E14 | 4.998 | 2.301 | -2.697 | 0 |
| E18 | 5.127 | 3.413 | -1.714 | 0 |
| E21 | 4.097 | 3.919 | -0.178 | 20 |
| E27 | 4.796 | 3.640 | -1.156 | 50 |
| BL21 | 4.919 | 2.954 | -1.965 | 0 |

刘永宏, 亚克甫·玉苏普, 玉苏普·卡斯木, 等. 新疆鸡群感染 H9N2 亚型 AIV 诊断分析[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(11): 303–305.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.096

新疆鸡群感染 H9N2 亚型 AIV 诊断分析

刘永宏, 亚克甫·玉苏普, 玉苏普·卡斯木, 图拉妮萨·吐尔逊,

努尔古再丽·库尔班, 阿卜杜热扎克·塔希, 赵 丽

(塔里木大学动物科学学院/新疆生产建设兵团塔里木畜牧科技重点实验室, 新疆阿拉尔 843300)

摘要:为了证实新疆鸡群感染了 H9N2 亚型 AIV, 对 2 个鸡场 6 份疑似 H9N2 亚型 AIV 感染病鸡组织病料, 进行 H9N2 亚型 AIV HA 和 NA 基因部分片段扩增、测序及序列分析。结果表明, 新疆该鸡场感染了 H9N2 亚型 AIV。因此, 新疆地区养殖场应重视该病的预防和控制。

关键词:新疆; 禽流感; H9N2 亚型

中图分类号: S858.31 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)11-0303-03

流感病毒(influenza virus, IV)是正黏病毒科流感病毒属成员, 根据病毒粒子中 NP 和 M 蛋白的抗原差异, 分为甲(A)、乙(B)和丙(C)3 型, 其中 A 型流感病毒的抗原变异性最强, 常引起世界性大流行。A 型流感病毒基因组为 8 个分节段负链 RNA, 编码 12~13 种病毒蛋白。A 型流感病毒根据 2 种表面蛋白血凝素(hemagglutinin, HA)和神经氨酸酶(neuraminidase, NA)的抗原性特点分为不同的亚型, 已证明

有 16 个 HA 亚型和 9 个 NA 亚型^[1-5]。HA 和 NA 基因可作为 RT-PCR 方法的靶序列基因, 用于 AIV 的亚型鉴别。

1966 年 Homme 等分离到第 1 株 H9N2 亚型 AIV^[6], 此后 H9N2 亚型 AIV 在世界各地广泛流行。1988 年, 香港在亚洲范围内第 1 次从陆禽中分离到 3 株 H9N2 亚型 AIV^[7]。1994 年陈伯伦等分离到中国第 1 株 H9N2 亚型 AIV^[8], 后来发现 H9N2 亚型 AIV 在我国各地普遍存在, 2009 年新疆报道从野生灰雁中分离到 H9N2 亚型 AIV^[9], 新疆也报道了个体养殖户麻花鸡感染 H9 亚型 AIV^[10]。H9N2 亚型 AI 多呈低致病性感染, 但由于分布广泛且呈蔓延之势, 有重组为强毒的可能性, 因此给养禽业造成的威胁不容忽视。本研究对新疆发病疑似 H9N2 亚型 AIV 感染鸡组织病料, 进行 RT-PCR 扩增 HA 和 NA 基因部分片段, 并测序确定其亚型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料 6 份病鸡组织病料, 来自 2013 年新疆地区 2

plasmid in an avian *Escherichia coli* isolate[J]. Avian Diseases, 2002, 46(2): 342–352.

[7] 王晶钰, 鱼艳荣, 张彦明, 等. 鸡源大肠杆菌某些生物学特性与致病力相关性研究[J]. 中国家禽, 1999, 21(11): 10–12.

[8] 陈 祥, 赵李祥, 高 崧, 等. 禽源大肠杆菌的生物表型特性[J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(10): 770–774.

[9] 牛明福, 皇甫和平. 多杀性巴氏杆菌的血清抗性及其毒力比较研究[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2003(1): 16–17.

[10] 邵华斌, 杨 峻, 黎秋华, 等. 湖北省鸡大肠杆菌病流行情况调查及病原分离鉴定[J]. 中国兽医科技, 1998, 28(9): 14–16.

[11] 常新耀, 谢红兵, 魏刚才, 等. 鸡大肠杆菌的生化特性·致病性及药敏试验研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(11): 4536–4538.

[12] 赖平安, 杜春辉. 鸡大肠杆菌致病力与某些生物特性的相关性探讨[J]. 中国兽医科技, 1992, 22(8): 27–30.

[13] 刘 静, 贺生中, 陈 祥, 等. 中国部分地区禽源性大肠杆菌分离株的致病性试验[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(11): 230–231.

收稿日期: 2014-11-03

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31460655); 华中农业大学塔里木大学科研联合基金(编号: HNTDLH1404); 新疆生产建设兵团塔里木畜牧科技重点实验室开放课题(编号: HS2014011); 新疆生产建设兵团博士资金(编号: 2012BB023); 塔里木大学高教研究项目(编号: TDGJ1409); 国家大学生创新创业训练计划(编号: 20140757023)。

作者简介: 刘永宏, 男, 内蒙古呼和浩特人, 博士, 研究方向为传染病与免疫病理学。E-mail: lyhdky@126.com。

通信作者: 赵 丽。

血清抵抗力与对动物的毒力有关^[9]。本试验结果显示, 大肠杆菌的补体抗性与其致病力具有相关性。

参考文献:

[1] 卡尔尼可. 禽病学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999: 158–171.

[2] 陈文静, 韩先干, 何 亮, 等. 鸭致病性大肠杆菌的分离鉴定及其生物学特性分析[J]. 中国动物传染病学报, 2010, 18(2): 34–40.

[3] 王双山, 张敬礼, 刘庆昌, 等. 豫鲁冀接壤地区肉鸡大肠杆菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 河南农业大学学报, 2004, 38(1): 119–122.

[4] 杨 滴, 王耀兵, 李冬梅, 等. 粪便中大肠埃希菌的分离鉴定[J]. 微生物学杂志, 2007, 27(3): 1–5.

[5] 樊 琛, 刘桂芹, 王 宇, 等. 鸡源致病性大肠杆菌 *iss* 基因原核表达产物的免疫保护作用[J]. 畜牧与兽医, 2010, 42(11): 84–86.

[6] Johnson T J, Giddings C W, Horne S M, et al. Location of in-creased serum survival gene and selected virulence traits on a conjugal R