

# 湖南省岳阳市鸡源性大肠杆菌血清型鉴定

李先磊, 吕点点, 刘立超, 何计峰 (湖南理工学院化学化工系, 湖南岳阳 414006)

**摘要** 从湖南省岳阳市周边 8 个养鸡场收集病料, 从中分离出 169 株大肠埃希氏菌; 血清型鉴定结果表明, 岳阳市周边鸡源性大肠杆菌的主要血清型为:  $O_{78}$  (41 株)、 $O_1$  (35 株)、 $O_2$  (22 株)、 $O_{35}$  (16 株), 共占总待检菌株的 67.4%, 占定型菌株的 80.9%。

**关键词** 岳阳; 鸡源性大肠杆菌; 血清型

**中图分类号** S831.7 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)26-12574-01

## Identification on Serotype of Avian *Escherichia Coli* in Yueyang City of Hunan Province

LI Xian-lei et al (Chemical Department, Hunan College of Science and Technology, Yueyang, Hunan 414006)

**Abstract** 169 strains of *Escherichia coli* was separated from the samples that collected from 8 chicken farms around Yueyang City. The serotype identification results showed that the main serotype of *avian escherichia coli* around Yueyang City was  $O_{78}$  (41 strains),  $O_1$  (35 strains),  $O_2$  (22 strains),  $O_{35}$  (16 strains), they accounted 67.4% of the total strains and 80.9% of the identified strains.

**Key words** Yueyang; *Avian escherichia coli*; Serotype

随着人们生活水平的提高, 人们对肉、蛋、奶类食品的品质要求越来越高, 而目前畜、禽养殖过程中经常出现大规模的传染性疾病。其中, 大肠杆菌引起的鸡肠道疾病已成为肉鸡养殖业面临的重大问题<sup>[1]</sup>。笔者对岳阳市周边养鸡场大肠杆菌病的流行情况和病原菌的血清型进行了调查和分离鉴定, 以期了解该区致病性大肠杆菌的分布情况, 为治疗和预防鸡大肠杆菌病提供帮助。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 病料。**从岳阳市周边 17 个乡镇、35 个自然村的中、小型养鸡场选取发病肉鸡, 采集其肝脏、气囊、脾、心血、心包等病料。

**1.1.2 培养基及试剂。**伊红美兰琼脂(EMB)培养基, 普通肉汤, 普通琼脂, 蛋白胨水, 葡萄糖蛋白胨水。V-P(甲乙液)、MR 试剂等; 大肠杆菌 O 抗原诊断血清(购自天津生物芯片技术有限公司); 微量发酵管(购自上海医学化验所)。

### 1.2 方法

**1.2.1 病原菌分离。**采用涂布培养法将病料无菌接种到 EMB 培养基上, 37℃ 培养 24 h, 挑取紫红色菌落接种到普通营养肉汤培养基和普通琼脂培养基上, 37℃ 培养 24 h。在挑取菌落转接的同时进行革兰氏染色, 用光学显微镜观察, 确定菌落的形态特征<sup>[2-3]</sup>。

**1.2.2 生化鉴定。**根据《伯杰氏细菌鉴定手册》(第 8 版)所列项目进行生化检测<sup>[3-5]</sup>。

**1.2.3 致病力试验。**选取 7 日龄健康雏鸡, 腹腔接种培养液 0.2 ml/只 ( $0.85 \times 10^9$  CFU), 每种培养液接种 3 只, 另设对照组, 饲喂 3 d 后取鸡肝和脾进行细菌分离<sup>[4]</sup>。

**1.2.4 血清型鉴定。**将纯培养的大肠杆菌分别接种到普通琼脂和普通肉汤中(各 1 试管), 37℃ 培养 24 h, 斜面培养物用 0.5% 石碳酸生理盐水洗下后与普通肉汤一起经 103 kPa 处理 2 h, 然后用于玻片凝集, 肉汤培养物用于试管凝集, 根据凝集结果进行血清型判定<sup>[1-2, 6]</sup>。

## 2 结果与分析

**2.1 分离情况** 从 194 个病料中共分离出 169 株大肠杆菌, 分离率为 87.1%。

**2.2 分离菌种的特性** 分离菌在培养基上呈现出典型的大肠杆菌菌落形态, 边缘整齐、圆形隆起、紫红色且光照略显绿色; 营养肉汤培养基呈浑浊态, 有少量白色沉淀产生, 伴有轻微臭味; 革兰氏染色呈阴性, 短杆菌, 单个存在, 局部有少量菌体堆积。

**2.3 生化检测结果** 利用 V-P 试剂、MR 试剂等对分离菌株进行检测, 均符合大肠杆菌生化特性。

**2.4 致病性结果** 接种雏鸡绝大多数在 24~48 h 内死亡, 表现出肝周炎、腹膜炎、败血症等症状, 全部回收到细菌; 对照鸡生长正常, 没有获得致病菌。同时, 鸡死亡越早, 分离到的细菌在培养基上的光泽越明显。

**2.5 血清型鉴定结果** 由表 1 可知, 大肠杆菌的主要血清型为  $O_{78}$ 、 $O_1$ 、 $O_2$  和  $O_{35}$  (占整个定型菌株的 80.85%), 为调查区大肠杆菌的主要血清型。

表 1 169 株大肠杆菌的血清型鉴定结果

Table 1 The serotype identification results of 169 strains of *Escherichia coli*

血清型 Serotype	菌株数 Strain numbers	占供鉴定菌株 的比例//% Proportion of the total strains	占定型菌株的 比例//% Proportion of the identified strains
$O_{78}$	41	24.26	29.08
$O_1$	35	20.71	24.82
$O_2$	22	13.02	15.60
$O_{35}$	16	9.47	11.35
$O_{68}$ 、 $O_{35}$ 、 $O_5$ 、 $O_{14}$ 、 $O_{107}$ 、 $O_{86}$ 、 $O_{26}$ 、 $O_7$ 、 $O_8$ 、 $O_{119}$ 、 $O_{114}$ 、 $O_{160}$	27	15.98	19.15
未鉴定 Unidentified	28	16.58	-

## 3 结论与讨论

病原菌分离结果表明, 岳阳市周边地区大肠杆菌病在鸡体内流行较广泛, 鸡发病较普遍。

致病性分析结果表明, 所分离到的菌株均具有较强的致病性, 其中  $O_{78}$  和  $O_1$  型的致病性最强, 分离的细菌培养后菌落形态最明显。

**基金项目** 湖南理工学院科研项目(2008Y43)。

**作者简介** 李先磊(1979-), 男, 山西临汾人, 讲师, 从事微生物药物研制工作。

**收稿日期** 2009-05-07

(下转第 12591 页)

表 7 NaCl 对鳙鲮凝集素活性的影响

Table 7 The effect of NaCl treatment on the hemagglutinating activity of GANL

NaCl 浓度 // mol/L	血凝活性
NaCl concentration	Hemagglutinating activity
0 (对照) Control	2 <sup>10</sup>
0.25	2 <sup>10</sup>
0.50	2 <sup>10</sup>
1.00	2 <sup>10</sup>
1.50	2 <sup>10</sup>
2.00	2 <sup>10</sup>

2.4 微藻细胞凝集作用 从表 8 可以看出,在测定的 3 种微藻中,鳙鲮凝集素仅对淡水微藻雨生红球藻表现出专一的凝集作用,且此凝集作用与细胞浓度有关,当细胞浓度少于  $6.25 \times 10^4$  个/ml 时鳙鲮凝集素对其不能产生凝集作用。

表 8 鳙鲮凝集素对微藻的凝集作用

Table 8 Agglutination on microalgae by GANL

藻种	细胞密度	最低凝集素浓度
Algal species	$\times 10^4$ 个/ml	$\mu\text{g/ml}$
	Cell density	MAC
绿色巴夫藻 <i>Pavlova viridis</i> (海生)	186.5	-
杜氏盐藻 <i>Dunaliella salina</i> (海生)	75.3	-
雨生红球藻 <i>Haemotococcus pluvialis</i>	20.8	125

注:“-”表示不凝集;下表同。

Notes:“-” stands for negative agglutination. The same as follows.

2.5 细胞及酵母凝集作用 从表 9 可以看出,鳙鲮凝集素不能凝集革兰氏阳性细菌及酵母菌细胞,也未能凝集所有的革兰氏阴性细胞,但能够凝集 2 种鱼类病原弧菌,且表现出较高的凝集能力。

表 9 鳙鲮凝集素对微藻的凝集作用

Table 9 Agglutination on microorganism by GANL  $\mu\text{g/ml}$ 

微生物种类	最低凝集素浓度	
	Minimum agglutinating concentration	
	热处理	未热处理
Microbial species	Heat inactivated microbial cell	Native microbial cell
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	-	-
苏云金芽孢杆菌 <i>Bacillus thuringiensis</i>	-	-
大肠埃希氏菌 <i>Escherichia coli</i>	-	-
鳃弧菌 <i>Vibrio anguillarum</i>	62.5	125
哈维氏弧菌 <i>Vibrio harveyi</i>	62.5	62.5
啤酒酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-

(上接第 12574 页)

血清型鉴定结果表明,岳阳市周边地区大肠杆菌的主要血清型为 O<sub>78</sub>、O<sub>1</sub>,分别占供鉴定菌株总数的 24.26% 和 20.71%,绝大多数养鸡场采集的病料中均能分离出该菌;O<sub>2</sub> 和 O<sub>35</sub> 血清型分别占总数的 13.02% 和 9.47%,其他血清型占总数的 15.98%。

该研究采用最常见的 24 种血清型进行检测,从 169 株细菌中确定了 141 株细菌的血清型。初步确定岳阳市周边地区致病性大肠杆菌的主要血清型为 O<sub>78</sub>、O<sub>1</sub>、O<sub>2</sub> 和 O<sub>35</sub> 型(占整个菌株的 67.44%,占定型菌株的 80.85%),这为相关

### 3 结论与讨论

鱼类凝集素往往具有复杂的高级结构,分子量较大,一般由多个亚基组成。如草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)卵凝集素是由 5 个亚基组成的分子量为 205 kDa 的蛋白质<sup>[3]</sup>;颈带鳊(*Leiognathus nuchalis*)体表黏液凝集素具有串联重复结构<sup>[8]</sup>;大西洋鲑(*Salmo salar*)血清 C 型凝集素是一种寡聚体<sup>[9]</sup>。环境条件必然对具有复杂结构的鱼类凝集素活性产生影响,因此,研究凝集素在各种环境条件下的稳定性具有重要的意义。该研究结果表明,鳙鲮凝集素的活性对降解及化学修饰非常敏感,去垢剂及还原剂也严重影响其活性,说明高级结构的稳定对其活性是必要的。在试验设定的浓度范围内,鳙鲮凝集素对分离纯化及活性测定中常用的试剂,如 DMSO、TFA 及 NaCl 是稳定的。

细胞凝集是凝集的基本生物活性,也是凝集素发挥其他生物学活性的基础,作用机理是具有多价糖结合位点的凝集素与细胞表面的凝集素受体结合从而导致免疫反应,促进细胞有丝分裂、致毒作用,使细胞表面成分再分布等生物学反应,甚至会导致细胞凝集<sup>[11]</sup>。微藻及微生物细胞凝集试验表明,鳙鲮凝集素对微藻细胞、细菌及酵母菌细胞的凝集作用同样显示出一定的专一性。鳙鲮凝集素仅能专一地凝集活的热失活的鱼类病原菌及淡水微藻,推测鳙鲮凝集素可能在鳙鲮鱼先天免疫系统中起重要的作用,鳙鲮凝集素的免疫活性及对肿瘤细胞的作用有待于进一步研究。

### 参考文献

- [1] 孙册,朱政,莫庆汉,等.凝集素[M].北京:科学出版社,1986.
- [2] LIENER I E, SHARON N, GOLDSTEIN I J. The lectins: Properties, functions, and applications in biology and medicine [M]. Orlando: Academic Press, 1986: 1-600.
- [3] JUNG W K, PARK P J, KIM S K. Purification and characterization of a new lectin from the hard roe of skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis* [J]. Int J Biochem Cell B, 2003, 35: 255-265.
- [4] 郑台,余萍,刘艳如,等.坛紫菜凝集素的糖结合专一性和细胞凝集作用[J].武汉植物学杂志,2002,20(2):137-140.
- [5] 邱保胜,刘其芳.雨生红球藻培养基的改良[J].水生生物学报,1999,23(4):391-394.
- [6] 赵素芬,孙会强.绿色巴夫藻培养条件的研究[J].水产科学,2004,23(2):9-11.
- [7] 孙灵毅.盐生杜氏藻的培养技术与应用[J].水产科技情报,2000,27(3):120.
- [8] OKAMOTO M, TSUTSUI S, TASUMI S, et al. Tandem repeat L-rhamnose-binding lectin from the skin mucus of ponyfish, *Leiognathus nuchalis* [J]. Biochem Bioph Res Co, 2005, 333: 463-469.
- [9] STRATTON L, WU S, RICHARDS R C, et al. Oligomerisation and carbohydrate binding in an Atlantic salmon serum C-type lectin consistent with non-self recognition [J]. Fish Shellfish Immun, 2004, 17: 315-323.

疫苗的研究和生产提供了参考。

### 参考文献

- [1] 霍龙飞,毕丁红.湖北省鸡源致病性大肠杆菌某些生物学特性的研究[J].中国畜禽传染病,1995(1):23-26.
- [2] 夏业才,潘松年.禽大肠杆菌病的研究——鸡致病性大肠杆菌的血清型鉴定[J].中国兽药杂志,1991(4):1-23.
- [3] 曹军平,姜小勇,麦倍华,等.鸡眼炎型大肠杆菌分离鉴定与药敏试验[J].中国动物检疫,2006(9):36-37.
- [4] 周继宏,朱国强,庄国宏,等.鸡致病性大肠杆菌的分离鉴定[J].中国家禽,1997(7):5-6.
- [5] 廖延雄.兽医微生物学实验诊断手册[M].北京:中国农业出版社,1995.
- [6] 柯岩,周燕竹,沈海中,等.大肠杆菌核心型血清学检测方法的建立[J].中华微生物学和免疫学杂志,2000(6):594-597.