

人源志贺氏菌对雏鸡的人工感染试验

朱忠珂¹, 薛 双², 陈 英³, 刘红英^{4*}, 陈 陆⁴, 王川庆⁴

(1. 黄淮学院 生物工程系, 河南 驻马店 463000; 2. 驻马店市动物疫病预防控制中心, 河南 驻马店 463000;
3. 河南省科学技术信息研究院, 河南 郑州 450003; 4. 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 为了弄清人源志贺氏菌是否可以传播给鸡, 从而为志贺氏菌在人—禽传播中的可能性提供科学依据, 用不同剂量的鸡源鲍氏志贺氏菌、人源鲍氏志贺氏菌和人源福氏志贺氏菌通过腹腔注射人工感染雏鸡。结果发现, 各试验组雏鸡均有不同程度的病变发生, 甚至出现死亡病例, 且从雏鸡体内分别回收得到原接种的 3 株细菌。这说明了鸡源志贺氏菌的可能来源及有发生人鸡互传的可能性。

关键词: 志贺氏菌; 人工感染; PCR 扩增

中图分类号: S858.31 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2012)07-0146-03

Experimental Infection of Chickens with *Shigella* Isolates from Human

ZHU Zhong-ke¹, XUE Shuang², CHEN Ying³, LIU Hong-ying^{4*},
CHEN Lu⁴, WANG Chuan-qing⁴

(1. Department of Biological Engineering, Huanghuai University, Zhumadian 463000, China;
2. Zhumadian Center of Animal Disease Control and Prevention, Zhumadian 463000, China;
3. Henan Institute of Science and Technology Information, Zhengzhou 450003, China;
4. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In order to investigate whether the human *Shigella* isolates can spread to chicken, the experimental chickens were artificially infected with different doses of chicken *Shigella boydii*, human *Shigella boydii* and human *Shigella flexneri* through the intraperitoneal injection. All the infected chickens showed different degrees of lesions and even death. The original bacteria were isolated from the corresponding chickling, indicating that the human *Shigella* has the possibility to spread to chicken.

Key words: *Shigella*; artificial infection; PCR amplification

志贺氏菌(*Shigellae*)是胃肠道感染的主要病原菌之一, 为革兰氏阴性兼性细胞内致病菌, 临床上可以引起人畜痢疾, 该病主要感染途径为消化道。据统计, 全世界每年痢疾的病例数超过 2 亿, 年死亡人数超过 65 万, 其中 99% 在发展中国家, 且发展中国家的该病例中 69% 是 5 岁以下的儿童, 对公共卫生与健康造成了巨大威胁^[1]。志贺氏菌除可感染人引起痢疾外, 还可造成多种动物感染、发病。在兽医临床上, 先后有志贺氏菌感染猕猴、食蟹猴、犊牛、仔猪、小鼠、豚鼠的报道, 也有从冻品家禽中检出志贺氏菌的报道^[2], 但 2004 年以前未发现志贺氏菌感染鸡并引起发病的报道。2004 年, 许兰菊等首次发现志贺氏菌

感染鸡的病例^[3], 而其来源却不明确, 鉴于此, 鸡源志贺氏菌这一特殊致病变型菌株的来源以及它能否引起人感染发病必然会引起人们的疑虑和担心。为了弄清人源志贺氏菌是否可以传播给鸡, 本试验用不同剂量的鸡源鲍氏志贺氏菌、人源鲍氏志贺氏菌和人源福氏志贺氏菌通过腹腔注射人工感染雏鸡, 以期弄清志贺氏菌在人与禽中传播的可能性提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 菌株及其培养

1.1.1 培养基 血琼脂平板购自郑州安图绿科生物工程有限公司, 生产批号: 20071002; 麦康凯平板

收稿日期: 2012-01-31

基金项目: 国家自然科学基金项目(30671555; 30972187)

作者简介: 朱忠珂(1977-), 男, 河南正阳人, 讲师, 博士, 主要从事畜禽营养与疫病防治工作。E-mail: zhzhongke@163.com

* 通讯作者: 刘红英(1976-), 女, 河南虞城人, 实验师, 博士, 主要从事动物传染病防治工作。E-mail: ndlhy@163.com

购自北京奥博星生物技术有限责任公司,生产批号:20061112;刚果红为天津市凯通化学试剂有限公司产品;大豆蛋白胨购自北京奥博星生物技术有限责任公司,生产批号:20050425;Tryptone 和 Yeast extract 为 OXOID 公司产品;超级新生牛血清购自郑州佰安生物工程有限公司,生产批号:200608005。

1.1.2 菌株 鸡源鲍氏志贺氏菌为河南农业大学传染病实验室保存;人源鲍氏志贺氏菌、人源福氏志贺氏菌由河南省人民医院惠赠。

1.1.3 菌株的培养 将鸡源鲍氏志贺氏菌、人源鲍氏志贺氏菌、人源福氏志贺氏菌分别接种于 LB 液体培养基(含 5% 血清),恒温水浴摇床培养 14 h, 4 °C 保存备用。

1.2 试验鸡及其分组

1 日龄麻鸡购自郑州牧业工程高等专科学校孵化场,共 110 只,随机分为 11 组,每组 10 只。其中 10^{10} 个/mL 细菌处理 3 组,分别标记为鸡源鲍氏 1 组(Bj1)、人源鲍氏 1 组(Br1)、人源福氏 1 组(Fr1); 10^{11} 个/mL 细菌处理 3 组,分别标记为鸡源鲍氏 2 组(Bj2)、人源鲍氏 2 组(Br2)、人源福氏 2 组(Fr2); 10^{14} 个/mL 细菌处理 3 组,分别标记为鸡源鲍氏 3 组(Bj3)、人源鲍氏 3 组(Br3)、人源福氏 3 组(Fr3);培养基对照和空白对照(注射生理盐水)各 1 组。

1.3 鸡只的人工感染

1.3.1 菌株的稀释 取出培养好的菌液,用菌落计数法计算细菌密度,用培养液分别将细菌密度调整为: 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{14} 个/mL。培养基及生理盐水的注射剂量均为每只鸡 0.1 mL。

1.3.2 感染方法 均采用腹腔注射的方法。

1.4 感染鸡的临诊观察及采样

1.4.1 感染鸡的临诊观察 人工感染后连续观察 7 d,记录各组鸡的精神状态、食欲、粪便、发病及死亡情况。死亡鸡随时放入 -20 °C 冰箱中保存。

1.4.2 感染鸡的剖检及采样 人工感染后第 7 天将存活试验鸡全部剖杀,连同冻存的发病死亡鸡一起无菌采集肝、脾以及肠内容物做病原学检测。

1.5 发病鸡志贺氏菌的回收、鉴定

1.5.1 细菌的回收培养 将无菌采取的人工感染发病鸡和致死鸡的典型病料接种于全血平板、麦康凯平板,于 37 °C 条件下培养 24 h。挑可疑菌落接种于刚果红培养基,于 37 °C 条件下培养 24 h,4 °C 保存备用。

1.5.2 染色镜检 将分离到的典型菌落抹片,进行革兰氏染色、油镜观察。

1.5.3 细菌的 PCR 鉴定

1.5.3.1 试剂 PCR 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,Taq DNA 聚合酶、脱氧三磷

酸核苷(dNTP)均购自 TaKaRa 公司。

1.5.3.2 PCR 模板制备 将 1.5 mL 对数生长期细菌以 5 000 r/min 离心 1 min,弃上清,加 500 μ L TE 缓冲液混匀,加 30 μ L 10% 的 SDS、3 μ L 的蛋白酶 K 混匀,放入 37 °C 下作用 1 h,加 100 μ L 5 mol/L 的 NaCl 混匀,再加 80 μ L 的 CTAB/NaCl 混匀,65 °C 条件下作用 10 min,加入等体积酚/氯仿/异戊醇混合液混匀,12 000 r/min 离心 5 min,取上清,加 2.5 倍体积的无水乙醇和 1/10 体积的醋酸钠,放入 -20 °C 冰箱中作用 30 min。12 000 r/min 离心 10 min,弃上清,沉淀用 70% 的冷乙醇 12 000 r/min 离心洗涤 10 min,弃上清,风干沉淀,加 TE 缓冲液 30 μ L 溶解,-20 °C 条件下保存备用。

1.5.3.3 引物设计和 PCR 扩增 根据已发表的鲍氏志贺氏菌 *parC* 基因序列(GenBank 登陆号:CP000036),采用软件 Primer Premier 5.0 设计引物。*parC* 基因的扩增产物为 2 114 bp 片段。PCR 反应程序为:95 °C 预变性 5 min;95 °C 1 min,51 °C 1 min,72 °C 2 min,共 30 个循环数;72 °C 延伸 10 min,最后置于 4 °C 冰箱中。取 8 μ L PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳检查,其余置于 -20 °C 冰箱保存。并用凝胶成像仪拍照记录结果^[4-6]。

2 结果与分析

2.1 各组鸡的发病、死亡情况

攻毒后 6 h,Br3 组和 Fr3 组鸡开始发病,表现精神沉郁、鸣叫、伏卧、有神经症状(两脚不停蹬动,似骑自行车状)。攻毒后 4 d,Fr2 和 Fr3 组有部分鸡开始拉血样粪便,第 6 天基本好转,只有 Fr3 组有 2 只精神不振,无法站立;攻毒第 7 天,Fr3 组有 1 只精神不振,其余各组鸡均表现正常。攻毒后 12 h,Br3 组鸡开始死亡。7 d 共发病 21 只,死亡 13 只。其中 Br3 组鸡发病 6 只,死亡 5 只,Fr3 组发病 8 只,死亡 6 只。死亡时间高峰集中在第 2 天和第 3 天。培养基对照组和空白对照组 7 d 内表现均正常。

2.2 病理剖检变化

将各试验组病鸡、死鸡和正常鸡进行解剖观察,发现所有病鸡和死鸡均有不同程度的病变:皮下黄染,肝脏变性、黄染,脾脏肿大充血,胰脏肿大,肠道黄染、充血、出血,盲肠肿胀积液、充血,胆囊充盈肿胀。培养基对照组和空白对照组鸡无肉眼病变出现。

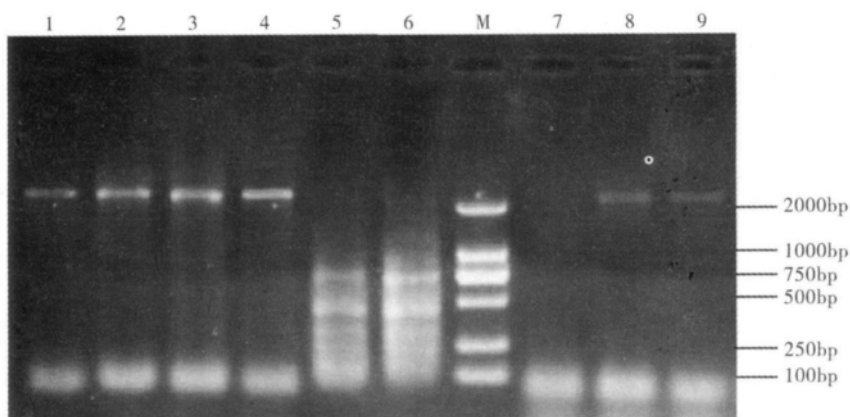
2.3 细菌回收与鉴定

2.3.1 细菌的回收 将 9 组发病鸡和病死鸡的全血平板、麦康凯平板培养物涂片染色和分离纯化后,有 7 组回收疑似原接种菌的细菌(Fr1、Fr2、Fr3、Br3、Br2、Br1、Bj3)。在全血平板上生长良好,在麦

康凯平板上形成无色透明、圆形、表面和边缘稍不光滑的中等大小菌落。染色镜检发现,细菌呈两端钝圆,散在排列的革兰氏阴性小杆菌。无芽孢,无荚膜。将纯化的 7 个菌株分别接种于刚果红培养基,

有 2 株细菌长出红色菌落(Fr2、Fr3)。

2.3.2 细菌的 PCR 鉴定结果 分离到的菌株经 PCR 扩增后有 6 组(Fr2、Fr3、Br1、Br2、Br3、Bj3)扩增出了约为 2 114 bp 的目的条带(图 1)。



M, Marker; 1. 人源鲍氏 1 组; 2. 人源鲍氏 2 组; 3. 人源鲍氏 3 组; 4. 鸡源鲍氏 3 组; 5. 鸡源鲍氏 2 组; 6. 鸡源鲍氏 1 组; 7. 人源福氏 1 组; 8. 人源福氏 2 组; 9. 人源福氏 3 组

图 1 鸡体分离株的 *parC* 基因 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果

3 结论与讨论

鸡志贺氏菌病是一种新发现的鸡传染病^[3],迄今为止,尚不明确其是否与人志贺氏菌病有关,是否在公共卫生学上有重要意义,这些都是人们高度关注的问题。由于无法用鸡志贺氏菌直接感染人,而用其感染其他灵长类动物又受到经费及其他试验条件限制,因此,用人源志贺氏菌感染鸡可以为人—鸡志贺氏菌之间的关系提供间接证据。

本研究分别将人源鲍氏志贺氏菌和人源福氏志贺氏菌及鸡源鲍氏志贺氏菌人工攻毒雏鸡,发现人源鲍氏志贺氏菌和人源福氏志贺氏菌均能引起雏鸡发病和死亡,且有拉血痢的典型症状出现,从而证实人源志贺氏菌可人工感染雏鸡并引起发病死亡。人源福氏志贺氏菌的 Fr2 组和 Fr3 组攻毒鸡出现拉血痢的症状,且分离菌株能在刚果红培养基上长出红色菌落,说明人源福氏志贺氏菌不仅可感染雏鸡,且在鸡体内不会丢失毒力大质粒,从而说明若人接触到该分离株则仍有可能造成感染。Fr1 组分离的菌株既没有在刚果红培养基上长出红色菌落,应用 PCR 方法也未扩出目的条带,说明该组没有分离到目的菌株^[7]。以往人们只知道志贺氏菌可以感染人引起痢疾,且无动物宿主。而本研究发现,此菌不但可以感染雏鸡引起发病和死亡,而且可从感染鸡体内分离到该致病菌。通过本研究基本可以阐明鸡源志贺氏菌的来源及可发生人鸡互传的可能性,从而为该病的防制和动物源性食品安全提供保障。

关于人志贺氏菌是否能感染鸡,目前尚无资料可

参考,所以在设计人工感染剂量时有一定困难,根据有关文献^[8-11]记载,本试验将大肠杆菌人工感染的剂量作为参考,结果试验鸡出现明显临床症状,并发生死亡。但是,更低剂量的菌液是否仍能致病还不清楚,有待今后进一步研究。

参考文献:

- [1] 杨霞,王川庆.志贺氏菌致病的分子机制及分子流行病学研究进展[J].河南农业科学,2006(7):101-104.
- [2] 杨永珍,许兰菊,张丹鹤,等.河南省部分地区鸡志贺氏菌病原分离鉴定及药敏试验[J].河南农业科学,2011,40(3):134-139.
- [3] 许兰菊,臧为民,康相涛,等.鸡志贺氏菌病的病原鉴定[J].畜牧兽医学报,2004,35(4):422-423.
- [4] 熊燕,江元山,陈智,等.志贺氏菌毒力相关基因的 PCR 检测分析[J].中国卫生检验杂志,2007,17(5):805-806,904.
- [5] 宋春花,张梅喜,郝园林,等.志贺氏菌敏感株与诱导耐多药株蛋白质组学分析[J].中国公共卫生,2007,23(3):318-320.
- [6] 靳会娟,任艳萍,卢星,等.济源市福氏志贺氏菌毒力基因分型与分析[J].中国卫生检验杂志,2007,17(3):508,546.
- [7] 孔春梅,刘小宝,穆祥,等.大肠杆菌热稳定肠毒素的攻毒最佳模型的确定[J].科学技术与工程,2006,17(6):2743-2745.
- [8] 张李俊,薛俊龙,王彩先,等.山西省鸡致病性大肠杆菌优势血清型消毒液的筛选试验[J].山西农业科学,2008,36(3):79-82.
- [9] 许兰菊,王川庆,胡功政,等.鸡志贺氏菌病在我国的发现及其病原特性研究[J].中国预防兽医学报,2004,26(4):281-286.
- [10] 薛俊龙,张李俊,王采先,等.鸡大肠杆菌多价复合佐剂灭活苗的研制[J].山西农业科学,2009,37(11):50-53,57.
- [11] 钱明珠,王申锋,李冉.开封地区鸡大肠杆菌的分离鉴定与耐药性分析[J].河南农业科学,2011,40(10):137-140.