

鹿源李氏杆菌的分离鉴定^{*}

李元刚¹, 周学章², 任战军³

(1 宁夏大学 生命科学学院, 宁夏 银川 750021; 2 中国人民解放军军需大学, 吉林 长春 130000;

3 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 通过对患典型败血症死亡的梅花鹿组织进行细菌培养和分离得到3株细菌, 经细菌形态学、生化技术、动物试验和分子生物技术4方面的鉴定, 确诊该菌为李氏杆菌。药敏试验表明, 分离菌株对青霉素、磺胺类药物产生了较强的耐药性, 对庆大霉素、环丙杀星、克林霉素、链霉素中度敏感, 对头孢塞肟钠、丁胺卡那霉素高度敏感。

[关键词] 李氏杆菌; 分离; 鉴定; 治疗

[中图分类号] S858.252.61

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)08-0089-03

李氏杆菌病是一种人畜共患、危害较大的急性传染病, 该病会使单蹄动物易患败血症, 成年反刍动物易患脑膜炎, 幼龄反刍动物常伴有肝坏死的败血症, 啮齿动物及禽类患病的主要病变是肝、脾、心肌坏死、单核白细胞增多症; 也容易引起人的脑膜炎、败血症^[1-3]。近年来, 相继在东北一些鹿场发生了因败血症死亡的病例, 当地兽医疑视为鹿的流行性脑炎。本研究对患典型败血症死亡的梅花鹿组织进行了病原菌分离, 及细菌形态学、生化技术、动物试验和分子生物技术4方面的鉴定, 确诊该病为鹿李氏杆菌感染。现将有关研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 琼脂、蛋白胨分别购自OXOID公司; 去氧胆酸钠、L-精氨酸、马尿酸钠分别购自TaKaRa公司; 牛肉汤粉和微量糖发酵管购自杭州天和微生物试剂有限公司; 药敏试纸购自北京天坛药物生物技术开发公司。

1.1.2 试验动物 2月龄小白鼠(昆明系)由中国人民解放军军需大学实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 细菌分离及形态学鉴定 取患败血症死亡的梅花鹿的肺、肝、脾、肾、脑进行组织涂片, 革兰氏和瑞氏染色、镜检。将带有细菌的组织分别接种于普通琼脂平板、鲜血琼脂平板和牛肉汤培养基中, 37

培养24~72h, 挑选单一菌落纯培养后涂片, 革兰氏和瑞氏染色、镜检。

1.2.2 糖发酵试验 取纯培养菌, 按照说明书接种于微量糖发酵管, 37℃培养5d, 观察指示剂颜色变化。

1.2.3 V-P试验 方法参见文献[4]。

1.2.4 甲基红(MR)试验 按文献[4]的方法配制试剂, 将细菌接种在葡萄糖蛋白胨水中, 37℃培养3d, 滴加MR试剂观察指示剂颜色变化。

1.2.5 靛基质试验 将被检细菌接种于童汉氏蛋白胨水中, 于37℃培养3d, 沿试管壁滴加靛基质试剂1mL于培养基液面上即可观察。

1.2.6 马尿酸钠水解试验 按文献[4]的方法制备马尿酸钠肉汤, 接种分离菌, 37℃培养3d, 分别取培养物0.8mL, 加FeCl₃溶液0.2mL混匀, 静置15min, 根据产生沉淀情况进行判断。

1.2.7 美蓝还原试验 取脱脂奶粉配制美蓝牛乳培养基, 接种分离菌, 37℃培养4d, 观察蓝色变化, 再移植于鲜血琼脂平板培养24h, 检查有无细菌生长。

1.2.8 药敏试验 按直接琼脂扩散法进行检测^[4], 并按照美国临床检验委员会的“抗微生物药物敏感试验的执行标准”, 采用琼脂二倍稀释法测定分离菌对药物的最小抑菌浓度(MIC)^[5,6]。

1.2.9 动物试验 将20只小鼠随机平均分成4组, 分别腹腔接种0.2mL 3株菌株的血清肉汤培养

* [收稿日期] 2003-12-10

[作者简介] 李元刚(1967-), 男, 宁夏银川人, 讲师, 硕士, 主要从事动物传染病与流行病学研究。E-mail: liyuang@nxu.edu.cn

物和血清肉汤。取死亡小鼠内脏接种于鲜血琼脂平板分离细菌,并进行革兰氏染色、镜检。

1.2.10 扩增李氏杆菌特异保守序列 hlyA 基因在李氏杆菌中是高度保守的^[7],因此,直接从病料中提取基因组DNA,设计引物扩增特异目的片段,从而进一步确诊是否为李氏杆菌感染。所用试剂 dNTP,MgCl₂,Buffer,Taq Plus 和引物均来源于上海生物公司。上游引物为:5'-GCGAATTC-TATGGGGTTCCGCAAAA GATGAA GTTC-3';下游引物为:5'-ATGGA TCCTTA GCCCA GATGGA GATA TTTCTA-3',由上海生物公司合成。反应体系为:10×Buffer 5 μL,dNTP 4 μL,MgCl₂ 2 μL,Taq Plus 1 μL,引物 2 μL,模板DNA 4 μL,水 32 μL。95 预变性 5 min,94 30 s,50 50 s,72 50 s,30 个循环。

2 结果与分析

2.1 分离菌培养及其形态特征

通过对患典型败血症死亡的梅花鹿组织进行细菌培养和分离得到 3 株细菌。病料直接进行涂片、染色镜检,可见革兰氏阳性的小杆菌,单个散在或成双排成 V 形。病料接种在鲜血琼脂平板上生长出淡灰色、透明、圆形、隆起、光滑、边缘整齐、露珠样小菌落,β溶血;在普通琼脂平板上菌落更小,生长缓慢;在牛肉汤培养基中出现混浊现象。这些菌落形似李氏杆菌^[1-4]。

2.2 分离菌生化特性

通过对分离菌进行生化试验,其生化特性与李氏杆菌反应一致,详见表 1。

表 1 分离菌株生化特性

Table 1 Biochemical property of the isolated bacteria strain

分离菌株 Strain	葡萄糖 Glucose	乳糖 Milk sugar	蔗糖 Cane sugar	甘露醇 Mannitol	菊糖 Chrysan- themum sugar	甲基红 MR	伏普试验 V-P	麦芽糖 Malt sugar	马尿酸钠 Hippuric acid Na	胆汁溶菌 Bile solu- bility test	美蓝 Methylene blue
1	+	+	+	—	—	+	+	+	+	—	—
2	+	+	+	—	—	+	+	+	+	—	—
3	+	+	+	—	—	+	+	+	+	—	—

注: +. 阳性; -. 阴性。

Note: +. Positive; —. Negative

2.3 药敏试验

选较常用的 7 种抗菌药物以琼脂扩散法检测,结果表明,3 株分离菌株对丁胺卡那霉素、头孢噻肟

钠高度敏感;对青霉素和磺胺类药物则产生较强的耐药性(表 2)。药物对细菌的最小抑菌浓度测定结果与琼脂扩散法检测结果相符(表 3)。

表 2 分离菌株药敏试验

Table 2 Sensitivity experimentent of the bacteria strain to medicament

分离菌株 Strain	青霉素 Penicil- lin G	磺胺嘧啶钠 Sulpha- dazine	磺胺对甲 基异恶唑 Sulfi- somazole	庆大霉素 Gentamicin sulfate	环丙沙星 Ciproflo- xalin hydro- chloride	克林霉素 Clinda- mycin	头孢噻肟钠 Cefotaxime sodium	链霉素 Strepto- mycin	丁胺卡那霉素 Amikacin sulfate
1	-	-	-	++	++	++	+++	++	+++
2	-	-	-	++	++	++	+++	++	+++
3	-	-	-	++	++	++	+++	++	+++

注: -. 耐药; ++. 中度敏感; +++ . 高度敏感。

Note: -. Drug resistance; ++. Medium sensibility; +++ . High sensibility.

表 3 分离菌株的最小抑菌浓度

Table 3 Lowest resitant concentration of medicament to the isolated strain

分离菌株 Strain	青霉素 Penicil- lin G	磺胺嘧啶钠 Sulpha- dazine	磺胺对甲 基异恶唑 Sulfi- somazole	庆大霉素 Gentamicin sulfate	环丙沙星 Ciproflo- xalin hydro- chloride	氨苄青霉素 Ampicillin sodium	头孢噻肟钠 Cefotaxime sodium	阿奇霉素 Azithro- mycin	克林霉素 Clinda- mycin
1	5.0	1 024.0	1 024.0	5.0	4.0	16.0	0.25	0.80	1.5
2	5.5	1 024.0	1 024.0	5.0	4.5	16.0	0.25	0.80	1.0
3	5.5	1 024.0	1 024.0	5.0	5.0	16.0	0.25	0.80	1.0

2.4 动物试验

分离菌培养物腹腔接种小鼠, 48 h 内小鼠全部死亡, 且症状相似, 从死亡小鼠内分离到同样的典型菌落。对照组全部成活, 且细菌检验呈阳性。证明该致病菌是李氏杆菌, 且不存在变异。

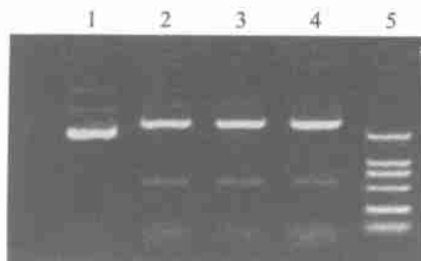


图1 酶切电泳结果

1. 重组质粒, 2~4 酶切结果, 5 Marker 2000

Fig 1 The electrophoresis result of the enzymolysis

1. Recombination plasmid; 2-4 The result of enzymolysis; 5 Marker 2000

2.5 李氏杆菌特异保守序列扩增结果

应用 PCR 方法扩增李氏杆菌特异保守序列, 出

现 512 bp 的目的片段。连接 PMD-18T 载体经过酶切鉴定正确, 见图 1。

3 讨论

通过对患典型败血症死亡的梅花鹿组织进行细菌培养和分离得到 3 株细菌, 经细菌形态学、生化技术、动物试验和分子生物技术 4 方面鉴定, 确诊为鹿源李氏杆菌。

该分离菌在临床上对鹿群表现出很强的毒力, 腹腔接种小鼠后 48 h 内全部致死。这一结果与该菌的 β 溶血作用有一定关系。因为 β 溶血性产生溶血毒素(李氏杆菌溶血素), 有溶解红细胞, 杀死白细胞和毒害心肌的作用, 与致病性有密切的关系, 是李氏杆菌的毒力因子之一。

药敏试验表明, 分离菌株对青霉素和磺胺类药物产生了较强的耐药性, 这与目前大量非科学应用这些药物有关。而李氏杆菌对头孢塞肟钠、丁胺卡那霉素高度敏感, 是因为该药在兽医临床上刚刚开始应用, 细菌尚未产生耐药性。

[参考文献]

- [1] 杨本升, 刘玉斌, 苟仕金, 等. 动物微生物学[M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 1995
- [2] 李右民, 宣华. 家畜传染病学[M]. 北京: 蓝天出版社, 1993
- [3] 马丽娟, 金顺丹, 韦旭斌. 鹿生产与疾病学[M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 1998
- [4] 韩文瑜, 何昭阳, 刘玉斌. 病原细菌检验技术[M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 1992
- [5] 美国临床检验委员会(NCCLS). 抗微生物药物敏感试验的执行标准[M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 1999
- [6] 倪语星, 洪秀华. 细菌耐药性监测与抗感染治疗[M]. 北京: 人民军医出版社, 2002
- [7] 姜永强. PCR 与微孔杂交结合检测单核细胞增多性李斯特氏菌[J]. 中华免疫学和微生物学, 1998, (1): 66-67.

Isolation and identification of listeriosis from cervus nippon temm inck

L IYuan-gang¹, ZHOU Xue-zhang², REN Zhan-jun³

(1 College of Life Science, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021, China;

2 Chinese Necessary Administration University, Changchun, Jilin 130000, China;

3 College of Animal Science and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Three bacteria strains with capsule were isolated from diseased and died Sika and were identified as Listeriosis by morphology, biochemical technology, animal test and molecular biology. The bacteria are resistant to clindamycin and Ciprofloxacin and high sensitive to ampicillin and Cefotaxime sodium.

Key words: listeriosis; isolation; identification; treatment