

## 猪亚利桑那菌的毒素鉴定及其对 小白鼠致病作用的病理学观察

史怀平, 史新娥, 田小艳, 张 明

(西北农林科技大学动物科技学院, 陕西杨凌 712100)

**摘 要:** 将猪亚利桑那菌培养后离心、冷冻, 以小白鼠为试验动物进行细菌毒素鉴定, 结果确定猪亚利桑那菌仅有内毒素; 用鲎试剂测得其细菌内毒素含量大约为 0.125 EU/mL。取 10 只健康小白鼠观察猪亚利桑那菌对动物的致病性。小白鼠临床症状明显, 眼内有脓性分泌物; 病理组织切片结果发现, 肝细胞界限不清, 胞核大小差异较大, 脾脏内有大面积出血区; 肾小管上皮细胞肿胀, 部分胞核消失; 心肌纤维肿胀、断裂; 由此可见猪亚利桑那菌对小白鼠有很强的致病性。

**关键词:** 猪亚利桑那菌; 毒素鉴定; 鲎试剂; 病理学

中图分类号: S858.28

文献标识码: A

文章编号: 1004-1389(2007)06-0026-04

## Toxin Identifying of Swine Arizona Bacteria and Its Pathologic Observation to Mice

SHI Huai-ping, SHI Xin-e, TIAN Xiao-yan and ZHANG Ming

(College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** Mice identified the toxin of Swine Arizona bacteria that were centrifugalized and freezed. The result showed that Swine Arizona bacteria only had endotoxin. The endotoxin content, which was measured by using LAL, was 0.125 EU/mL. Again 10 mice were used to do the test whether or not Swine Arizona bacteria had pathogenic to animals. Mice, whose eyes were purulent secretions, had obvious pathologic change clinically. The results of pathologic tissue slices were as follows. Liver cells had unclear dividing lines and their nucleoli very different in size. Spleen lied in big bleeding patch. Renal tubule endothelial cells swelled and some nucleoli disappeared. Some heart muscle fibers swelled or ruptured. The above showed that Arizona bacteria had great pathogenicity to mice.

**Key words:** Swine arizona bacteria; Toxin identifying; LAL; Pathology

亚利桑那菌病曾叫阿利桑那菌病或副大肠杆菌病, 是由亚利桑那副大肠杆菌引起的一种传染病<sup>[1]</sup>。该病主要经食物传播, 亦可通过直接接触或污染用具传播。起病多急骤但亦可缓慢起病, 可有多种临床类型。热型呈不规则型、弛张型或间歇型, 高热持续 1~3 周不等。若有并发症, 则发热可见更长时间, 甚至可达数月之久。败血症型常见于仔猪<sup>[2]</sup>。

亚利桑那菌属 G<sup>-</sup> 杆菌, 具有内毒素。内毒

素是 G<sup>-</sup> 杆菌细胞壁结构中的脂多糖 (Lipopolysaccharide LPS), 这些成分只有在细菌死亡裂解后才释放到菌体外。LPS 由 3 部分组成, 最外层为特异性多糖, 即菌体多糖 (O 抗原), 与细菌的侵袭力有关; 中间是核心多糖; 内层是类脂 A, 对宿主具有多种毒害作用而无种属特异性。目前较常用的内毒素的检测方法多为鲎试验 (Limulusamebocyte lysate test, LAL) 测定法。自 1968 年检测内毒素水平的 LAL 方法建立以来, 逐渐

收稿日期: 2007-03-30 修回日期: 2007-06-15

基金项目: 西北农林科技大学校青年基金 (04ZM010)。

作者简介: 史怀平 (1974—), 男, 陕西宝鸡人, 讲师, 主要从事动物学教学及细菌研究工作。

得到临床和药检部门的重视,并随着试验方法的不断改进和完善,内毒素的测定已向更高更灵敏的定量方面发展<sup>[3]</sup>。鲎(一种海洋生物)血淋巴液中有一种多功能的白色变形细胞,其表面含有活性颗粒,当遇到微量细菌内毒素,颗粒就会脱落,细胞裂解而形成凝胶的凝固物,通过检测凝胶的形成来检测内毒素。

本试验从细菌内毒素测定和动物病理变化等方面进行了探索与研究,其结果将对于认识猪亚利桑那菌的致病性及临床防治猪亚利桑那菌病具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 培养基 营养肉汤、营养琼脂、麦康凯琼脂等,均按常规方法制备<sup>[4]</sup>。

1.1.2 苏木精染色剂 苏木素 6 g、无水酒精 300 mL、蒸馏水 300 mL、甘油 300 mL、冰醋酸 30 mL、钾明矾适量配制而成,低温保存<sup>[5]</sup>。

1.1.3 其他 猪亚利桑那菌菌种由西北农林科技大学禽病研究室提供。鲎试剂及鲎试验用水为厦门鲎试剂厂产品,批号为 14005。小白鼠,由第四军医大学动物试验中心提供。

### 1.2 方法

1.2.1 毒素鉴定 细菌培养及计数:将亚利桑那菌接种于营养肉汤,置于恒温箱中 37℃ 培养 24~48 h,之后对细菌肉汤培养物计数。

计数后细菌肉汤培养物的处理:将肉汤培养物移入无菌离心管中,4 000 r/min 离心 15 min,取上清保存;取几滴生理盐水稀释管底菌泥,收集菌泥,再次离心(4 000 r/min)10 min,收集菌泥,于-20℃ 冰箱中反复冻融 3 次,备用。

内外毒素鉴定试验:取健康试验用小白鼠 24 只,分为 4 组,每组 6 只;第一组分别腹腔注射菌液 0.7 mL、0.5 mL、0.3 mL;第二组分别腹腔注射肉汤培养物离心上清液 0.7 mL、0.5 mL、0.3 mL;第三组分别腹腔注射菌泥冻融物 0.7 mL、0.5 mL、0.3 mL;第四组分别腹腔注射普通肉汤 0.7 mL、0.5 mL、0.3 mL 做为对照。精心饲养,观察并记录发病与死亡情况。

内毒素含量的测定—鲎试验:分别选择灵敏度( $\lambda$ )为 0.25 EU/mL、0.125 EU/mL、0.063 EU/mL 的 0.1 mL 规格的鲎试剂进行细菌内毒素检查。

取分装有 0.1 mL 鲎试剂的 10×75 mm 试管或复溶后的 0.1 mL/支规格的鲎试剂原装瓶 8 支,其中 2 支作供试品管,2 支做阴性对照管,2 支作阳性对照管,2 支作供试品阳性对照管。每支供试品管加入 0.1 mL 供试品;阴性对照管加入 0.1 mL 检查用水;阳性对照管中加入 0.1 mL 浓度为  $\lambda$  的内毒素溶液,供试品阳性对照管中加入 0.1 mL 浓度为  $\lambda$  的内毒素的供试品。封闭管口,轻轻摇匀,垂直放入 37±1℃ 的恒温水浴锅中孵育 60±2 min。然后取出观察结果。

结果判断:将试管从恒温器中轻轻取出,缓慢倒转 180°时,管内的内容物呈坚实凝胶,不变形,不从管壁滑脱者为阳性,记录为(+);不呈凝胶或虽生成凝胶但不能保持完整并从管壁滑脱者为阴性,记录为(-)<sup>[6]</sup>。

1.2.2 动物试验 细菌致小白鼠的临床病理变化:取 10 只健康的试验用小白鼠,分为两组,每组 5 只,第一组腹腔注射肉汤培养物( $3.0 \times 10^8$  cfu/mL)0.7 mL,精心饲养,观察发病情况并记录结果。第二组作为对照。之后,解剖死亡小鼠,观察内脏器官病理变化。

病理组织学观察:采取病变小白鼠的心脏、肝脏、脾脏、肾脏等,用 10% 中性福尔马林液固定,常规石蜡包埋,连续切片,HE 染色,普通光学显微镜观察并纪录<sup>[7]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 毒素鉴定结果

2.1.1 细菌内外毒素的确定 细菌肉汤培养物浓度为  $3.0 \times 10^8$  cfu/mL。

12 h 后小白鼠开始发病死亡,之后死亡及异常结果见表 1。由表 1 可见,亚利桑那菌液体培养物和培养物离心后的沉淀冻融物均能致小白鼠死亡,而注射上清液的小白鼠无死亡现象发生,可见该菌仅有内毒素。

表 1 小白鼠死亡结果

Table 1 The results of mice death

| 组别<br>Group | 腹腔注射液体量/mL |     |     |
|-------------|------------|-----|-----|
|             | 0.7        | 0.5 | 0.3 |
| 第一组         | +          | +   | -   |
| 第二组         | ±          | -   | -   |
| 第三组         | +          | +   | +   |
| 第四组         | -          | -   | -   |

注:“-”表示正常,“+”表示死亡,“±”表示发病。

2.1.2  堂试验  水浴加温 1 h, 试管内现象见表 2。从表 2 可以看出, 猪亚利桑那菌内毒素含量在 0.125 EU/mL 左右。

表 2  堂试验结果

Table 2  The results of LAL

| 组别<br>Group | 供试品管 |     | 阴性对照管 |     | 阳性对照管 |     | 供试品阳性对照管 |     |
|-------------|------|-----|-------|-----|-------|-----|----------|-----|
|             | I    | II  | I     | II  | I     | II  | I        | II  |
| 0.25 EU/mL  | (-)  | (-) | (-)   | (-) | (+)   | (+) | (+)      | (+) |
| 0.125 EU/mL | (+)  | (+) | (-)   | (-) | (+)   | (+) | (+)      | (+) |
| 0.063 EU/mL | (-)  | (-) | (-)   | (-) | (+)   | (+) | (+)      | (+) |

注: (+) 表示阳性, 缓慢倒转 180° 时, 管内的内容物呈坚实凝胶, 不变形, 不从管壁滑脱; (-) 表示阴性, 不呈凝胶或虽生成凝胶但不能保持完整并从管壁滑脱者为阴性。

2.2  细菌毒性鉴定结果

2.2.1  发病小白鼠临床症状  发病小白鼠精神沉郁, 运动障碍, 行动迟缓, 反应迟钝, 闭眼不食, 眼睛有脓性分泌物, 消瘦, 尾部粘有粪便, 最后衰竭而死亡。

2.2.2  死亡小白鼠剖检变化  心脏表面有针尖大出血点。肝脏肿大, 呈土黄色、质地松软, 表面有砖红色条纹, 切面有针尖大灰色坏死灶和出血点。胆囊肿大, 胆汁浓稠。脾肿大、表面有大小不等出血点。肺充血、出血, 有绿豆大灰白色坏死灶。咽喉部有黏液, 气管内有少量浆液性分泌物。胃内容物呈鲜绿色。十二指肠肠肠壁增厚, 肠内容物呈污绿色, 肠黏膜显著充血, 部分脱落, 盲肠内空虚且有气体。肠系膜淋巴结肿大, 部分出现干酪样坏死。肾脏颜色变淡, 轻度肿胀, 肾盂部有少量尿酸盐沉积。脑血管扩张、出血。

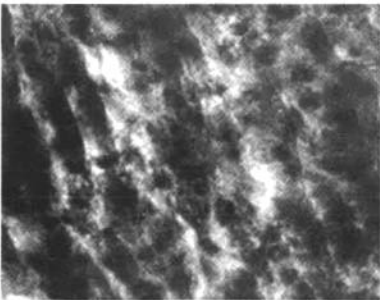


图 1  肝细胞索排列不整齐, 细胞界限不清, 胞核大小差异较大, 有的细胞核已溶解或消失 (H. E × 400)

Fig. 1  The lineage of liver cell funicular disorder, cell dividing lines unclear, cell nucleoli very different in size and some dissolved or disappeared (H. E × 400)

2.2.3  病理组织学观察  肝脏: 肝细胞索排列不整齐; 中央静脉扩张, 充血, 有的红细胞已经崩解;

肝窦隙中充斥有大量的红细胞, 枯否氏细胞增多; 肝细胞界限不清, 胞核大小差异较大, 有的细胞核溶解或消失 (图 1)。

脾脏: 脾脏内有大面积出血区, 红细胞大量溶解 (图 2); 吞噬细胞增多。

肾脏: 皮质部部分肾小球毛细血管扩张, 吞噬细胞增多; 肾小管上皮细胞肿胀, 细胞界限不清 (图 3); 有的肾小管上皮细胞坏死, 脱落于管腔, 上皮细胞与基底膜分离; 髓质部肾小管上皮细胞胞浆脱落, 细胞核浓缩聚集; 远曲小管上皮细胞肿胀使管腔狭窄甚至闭塞。

心脏: 心肌纤维肿胀, 断裂 (图 4); 细胞核大小差异较大。部分心肌细胞核浓缩、碎裂甚至消失; 吞噬细胞增多。

胃、小肠、胆囊壁均有出血现象。

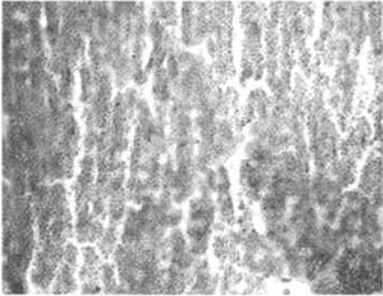


图 2  脾脏内有大面积出血区, 红细胞大量溶解 (H. E × 200)

Fig. 2  Spleen lied in big bleeding patch, many red cells dissolved (H. E × 200)

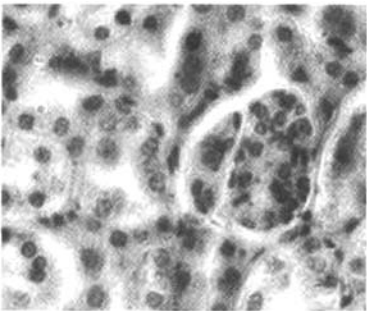


图 3  肾小球毛细血管扩张出血, 肾小管上皮细胞肿胀, 细胞界限不清, 部分细胞核溶解消失 (H. E × 400)

Fig. 3  Renal glomerulus' s capillary expanded and bled; renal tubule endothelial cells swelled, cell dividing lines unclear and some nucleoli disappeared (H. E × 400)

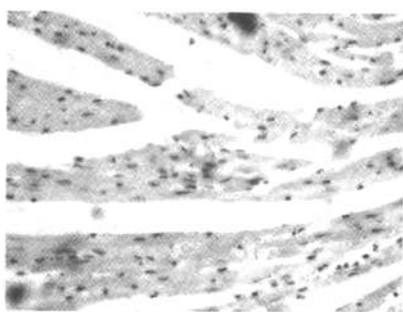


图 4 心肌纤维肿胀、断裂(H.E.  $\times 400$ )

Fig. 4 Heart muscle fibers swelled and ruptured H. E  $\times 400$

### 3 讨论

亚利桑那菌属  $G^-$  杆菌,是致病菌,对动物危害严重,尤其在禽类发病时损失惨重<sup>[1]</sup>。本试验鉴定了它的毒素,并进行了毒素定量测定,这对于研究及预防猪亚利桑那菌具有很重要的作用。由于亚利桑那菌在禽类发病频繁,因此对于禽亚利桑那菌研究目前很透彻。当在禽类如雏火鸡发病时显著病变是一侧或两侧眼球玻璃体存在渗出物<sup>[8]</sup>,本试验中猪亚利桑那菌使小白鼠分泌脓性物,说明两者在致病性上有此共性。另外,从组织

切片来看,猪亚利桑那菌对肝脏、脾脏、心脏和肾脏危害严重,可见猪亚利桑那菌对于小白鼠的致病力很强,并且在猪本身致病力也很强<sup>[9]</sup>,发病时损失很大,因此对于本病应当引起高度重视,应深入研究其对动物的致病性和预防措施,以减小在养猪业中所造成的经济损失。

#### 参考文献:

- [1] 许宝琴.雏鸡亚利桑那菌病研究近况[J].中国动物检疫,1997,14(2):34~35.
- [2] 贾文孝,李海英,侯京莉.鸭亚利桑那菌病的诊治[J].中国兽医科技,1997,27(1):33.
- [3] 张思敏.清开灵注射液治疗高脂血症 70 例[J].中国药房,2000,11:112.
- [4] 李六金,李健强.兽医微生物学实验实习指导[M].西安:陕西科技出版社,1999.
- [5] 薛登民,童德文,王淑娥.动物病理解剖学实验与实习指导[M].西北农林科技大学,2002.
- [6] 叶明,纪绿波.细菌内毒素及其检查法的研究[J].广东药学,2003,13(2):28~30.
- [7] 杨鸣琦,张黎,周宏超,等.豆类丝核菌次级代谢产物抗肿瘤作用的病理学观察[J].西北农业学报,2003,12(4):5~7.
- [8] Shivaprasad H L, Nagaraja K V, Pomeroy B S, et al. Arizonosis[A]. 禽病学[M]. 146~152.
- [9] 史怀平,杨增岐,张淑霞,等.猪亚利桑那菌的初步分离与鉴定[J].西北农林科技大学学报(自然版),2004,10:71~73.

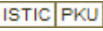
(上接第 25 页)

- [3] 蒿彩菊,杨鸣琦,朱小飞,等.明矾注射液的制备和稳定性研究[J].西北农业大学学报,2005,(2):60~62.
- [4] 陈奇主编.中药药理研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,1996.112~118.
- [5] 徐叔云,卞如瀛,陈修,等.药理实验方法学[M].北京:人

民卫生出版社,1982.

- [6] 李引乾,罗延红,蒿彩菊,等.药理学实验指导[M].陕西杨凌:西北农林科技大学出版社,1998.38~41.
- [7] 中国药典委员会.中华人民共和国药典(2000 版)二部[M].北京:农业出版社,2000.

察

作者：[史怀平](#)，[史新娥](#)，[田小艳](#)，[张明](#)，[SHI Huai-ping](#)，[SHI Xin-e](#)，[TIAN Xiao-yan](#)，[ZHANG Ming](#)  
作者单位：[西北农林科技大学动物科技学院, 陕西杨凌, 712100](#)  
刊名：[西北农业学报](#)   
英文刊名：[ACTA AGRICULTURAE BOREALI-OccIDENTALIS SINICA](#)  
年，卷(期)：2007, 16 (6)  
被引用次数：3次

参考文献(9条)

1. [许宝琴](#) [雏鸡亚利桑那菌病研究近况](#) 1997 (02)
2. [贾文孝](#); [李海英](#); [侯京莉](#) [鸭亚利桑那菌病的诊治](#) 1997 (01)
3. [张思敏](#) [清开灵注射液治疗高脂血症70例](#) 2000 (11)
4. [李六金](#); [李健强](#) [兽医微生物学实验实习指导](#) 1999
5. [薛登民](#); [童德文](#); [王淑娥](#) [动物病理解剖学实验与实习指导](#) 2002
6. [叶明](#), [纪绿波](#) [细菌内毒素及其检查法的研究](#) [期刊论文]-[广东药学](#) 2003 (2)
7. [杨鸣琦](#), [张黎](#), [周宏超](#), [路宏朝](#), [黄增荣](#) [豆类丝核菌次级代谢产物抗肿瘤作用的病理学观察](#) [期刊论文]-[西北农业学报](#) 2003 (4)
8. [Shivaprasad H L](#); [Nagaraja K V](#); [Pomeroy B S](#) [Arizonosis](#)
9. [史怀平](#), [杨增岐](#), [张淑霞](#), [刘芳宁](#), [李万](#) [猪亚利桑那菌的初步分离与鉴定](#) [期刊论文]-[西北农林科技大学学报 \(自然科学版\)](#) 2004 (10)

本文读者也读过(4条)

1. [陈旭升](#), [王祝鸣](#) [棉花黄萎病菌致萎毒素的分离纯化方法](#) [期刊论文]-[上海交通大学学报 \(农业科学版\)](#) 2002, 20 (2)
2. [林春花](#), [彭建华](#), [时涛](#), [刘先宝](#), [蔡吉苗](#), [黄贵修](#), [Lin Chunhua](#), [Peng Jianhua](#), [Shi Tao](#), [Liu Xianbao](#), [Cai Jimiao](#), [Huang Guixiu](#) [橡胶树多主棒孢病菌毒素的纯化](#) [期刊论文]-[热带作物学报](#) 2010, 31 (6)
3. [吴美金](#) [小麦赤霉病抗性的毒素鉴定和抗赤霉病突变体的诱导与筛选](#) [学位论文] 2008
4. [彭建华](#), [郑春耀](#), [潘美心](#), [李超萍](#), [蔡吉苗](#), [黄贵修](#), [Peng Jianhua](#), [Zheng Chunyao](#), [Pan Xianxin](#), [Li Chaoping](#), [Cai Jimiao](#), [Huang Guixiu](#) [橡胶树多主棒孢病菌强致病菌株的筛选及产毒条件优化](#) [期刊论文]-[热带作物学报](#) 2009, 30 (4)

引证文献(3条)

1. [史怀平](#), [王朝兴](#), [黄珍珍](#) [猪亚利桑那菌及其质粒的耐药性研究](#) [期刊论文]-[动物医学进展](#) 2008 (10)
2. [刘蒙达](#), [孙洪磊](#) [麻鸡瞎眼病的病原分离鉴定及病理组织学观察](#) [期刊论文]-[中国兽医杂志](#) 2010 (04)
3. [朱会林](#), [王德山](#) [一株鸭亚利桑那菌的分离与鉴定](#) [期刊论文]-[水禽世界](#) 2010 (03)

引用本文格式：[史怀平](#), [史新娥](#), [田小艳](#), [张明](#), [SHI Huai-ping](#), [SHI Xin-e](#), [TIAN Xiao-yan](#), [ZHANG Ming](#) [猪亚利桑那菌的毒素鉴定及其对小白鼠致病作用的病理学观察](#) [期刊论文]-[西北农业学报](#) 2007 (6)