

禽大肠杆菌耐药标记弱毒菌株 O_2 (Nor^r, Chl^s) 和 O_{78} (Chl^r, Nor^s) 的培育*

黄青云 陈金顶 任 涛 罗贤忠 欧守杼

(华南农业大学动物医学系, 广州, 510642)

摘要 选择最常见的禽致病性大肠杆菌 O_2 和 O_{78} 菌株, 分别以常用的抗菌药物氟哌酸和氯霉素诱导, 培育成遗传性稳定的耐药标记弱毒菌株 O_2 (Nor^r, Chl^s) 和 O_{78} (Chl^r, Nor^s), 为进一步运用原生质体融合技术培育 O_2 和 O_{78} 融合双价耐药弱毒菌株打下了基础。

关键词 大肠杆菌; 耐药菌株; 弱毒菌株

中图分类号 S 852. 612

禽大肠杆菌病是养禽业的一种重要细菌病, 造成很大经济损失。因禽致病性大肠杆菌血清型多, 养禽生产中普遍使用抗菌药, 对该病的免疫预防, 国内外一直采用最常见的禽致病性大肠杆菌 O_3 、 O_{78} 等菌株研制的灭活苗, 或以它们的菌毛抗原、荚膜抗原研究多价亚单位苗 (卡尔尼克, 1991; 林维庆, 1995; 黄淑坚等, 1996)。这些疫苗安全有效, 但只能使免疫禽只产生有限的体液免疫, 且成本较高。为了进一步提高免疫预防效果、降低成本, 研究禽大肠杆菌弱毒菌苗, 尤其是多价耐药弱毒菌苗很有必要。

细菌原生质体融合技术是定向选育具有双亲菌株优良特性新菌种的一种新的基因重组技术, 该技术首先必须对选定的两个亲本菌株进行遗传稳定的标记, 以备进行原生质体融合及融合子的筛选 (丁友平等, 1990; 陈代杰等, 1995)。为应用原生质体融合技术培育禽大肠杆菌融合双价耐药弱毒菌株打好基础, 本研究选择最常见的禽致病性大肠杆菌 O_2 和 O_{78} 菌株, 分别以常用的氟哌酸 (Norfloxacin, Nor.) 和氯霉素 (Chlormphenicol, Chl.) 进行了耐药标记和毒力致弱研究。

1 材料与方法

1.1 细菌

禽致病性大肠杆菌 O_2 菌株, 由黄青云从病鸡、病鸭中分离, 经中监所鉴定。 O_{78} 菌株, 由中监所提供。

1.2 药物

氟哌酸 (Nor.) 粉, 纯度 98. 9%; 氯霉素 (Chl.) 粉, 纯度 99. 2%。均由华南农业大学动物医学系药理研究室惠赠。

1996- 07- 18收稿 黄青云, 男, 50岁, 副教授

* 广东省自然科学基金资助项目 (1993~ 1996)

1.3 抗菌血清

O₂血清(凝集价为1:1280)、O₇₈血清(1:5120),由中监所提供

1.4 小白鼠(25~30 g)

广州军事医学研究所提供

1.5 鸡

1d龄AA鸡,由南海种鸡场提供,严格防疫条件下饲养,10d龄开始试验。

1.6 细菌的药物诱导标记及致弱

分别称取一定量的Nor.和Chl.,前者用少许醋酸,后者用少许异丙醇,微热溶解后加灭菌盐水配成适当浓度作母液,用针头过滤器过滤后分装,4℃贮存,使用一周。以常规测定法,测得Nor.在肉汤中对O₂菌株的MIC为0.5 mg/L,Chl.对O₇₈菌株的MIC为3 mg/L。

O₂菌株在含Nor. 0.4 mg/L的肉汤中,O₇₈菌株则从含Chl. 2 mg/L的肉汤中培养开始,采用逐级提高药物浓度的方法诱导培养,使细菌不断提高耐药性。细菌在每一药物浓度中适应3~5代,每代培养物均经含同样浓度药物的麦康凯平板培养和革兰氏染色监视,并不断用小白鼠接种观察耐药标记菌株的毒力减弱情况。到O₂菌株耐受Nor. 4 mg/L时,对小鼠的毒力已降低10倍,O₇₈菌株耐受Chl. 20 mg/L时,毒力已降低15倍。继续诱导培养能耐受Nor. 32 mg/L的O₂(Nor^r, Chl^f)和能耐受Chl. 80 mg/L的O₇₈(Chl^r, Nor^s)菌株时,分别经不含药的肉汤和麦康凯培养基交替连续培养5代,接回含药物培养基,证实耐药性已遗传稳定后,进行各种特性的鉴定。

1.7 O₂(Nor^r, Chl^f)和 O₇₈(Chl^r, Nor^s)标记菌株的遗传稳定性鉴定

1.7.1 耐药性鉴定 将两耐药标记菌株分别接种于普通肉汤,含药肉汤,常规麦康凯平板和含药麦康凯平板中,37℃培养24~72 h,观察大肠杆菌生长情况。

1.7.2 生化鉴定 从各麦康凯平板培养物中随机挑两个菌落,称为O_{2a}(Nor^r, Chl^f)、O_{2b}(Nor^r, Chl^f)和O_{78a}(Chl^r, Nor^s)、O_{78b}(Chl^r, Nor^s),分别接种16种生化培养基作鉴定。

1.7.3 血清学鉴定 以121℃处理菌液2 h的方法,分别制备O₂、O₇₈、O₂(Nor^r, Chl^f)和O₇₈(Chl^r, Nor^s)的菌体抗原,用O₂、O₇₈抗血清作平板凝集试验。

1.7.4 对数生长期测定 用紫外-可见分光光度仪每隔1~2 h连续检测各菌株肉汤培养物的OD(640)值,观察它们的对数生长期。

1.8 O₂(Nor^r, Chl^f)和 O₇₈(Chl^r, Nor^s)菌株对小鸡安全性及安全稳定性试验

将10d龄AA鸡分组,分别对肌肉接种两菌株不同剂量的肉汤培养物,观察12 d,记录精神、食欲、发病、死亡、剖检及大肠杆菌分离情况,统计出安全性。

按毒力复壮的常规方法,分别将两株菌的普通肉汤培养物连续通过10~25d龄AA鸡7代,每菌株每代各用2只鸡,每只肌注11.6~12.4亿菌,观察24 h,扑杀,从肝脏分离耐药菌。以第7代试验鸡分离的耐药菌肉汤培养物,各肌注10d龄AA鸡6只,O₂(Nor^r, Chl^f)组每只11.85亿菌,O₇₈(Chl^r, Nor^s)组每只13.1亿菌,连续观察10 d,扑杀、剖检。

2 结果

2.1 O₂(Nor^r, Chl^f)和 O₇₈(Chl^r, Nor^s)菌株的耐药性

O₂(Nor^r, Chl^f)能耐受Nor. 32 mg/L,对Chl.敏感;O₇₈(Chl^r, Nor^s)能耐受Chl. 80 mg/L,对Nor.敏感。Nor.和Chl.同时存在时并无相互干扰作用(见表1)。

表 1 O₂(Nor^r, Chl^r)和 O₇₈(Chl^r, Nor^s)菌株在培养基中耐药生长情况¹⁾

菌株	普通肉汤	含药肉汤 /mg·L ⁻¹				麦康凯	含药麦康凯 /mg·L ⁻¹	
		Nor. 32	Chl. 80	Nor. 32,	Chl. 80		Nor. 8	Chl. 20
O ₂	+	-	-	-	-	+	-	-
O ₂ (Nor ^r , Chl ^r)	+	+	-	-	-	+	+	-
O ₇₈	+	-	-	-	-	+	-	-
O ₇₈ (Chl ^r , Nor ^s)	+	-	+	-	-	+	-	+

1) + 表示生长, - 表示不生长

2.2 O₂(Nor^r, Chl^r)、O₇₈(Chl^r, Nor^s)菌株的生化特性

O_{2a}(Nor^r, Chl^r)和 O_{78a}(Chl^r, Nor^s)的 16种生化特性完全保持与 O₃、O₇₈一样,被选定为标记菌株。O_{2b}(Nor^r, Chl^r)和 O_{78b}(Chl^r, Nor^s)的个别生化反应减弱或变化(见表 2)。

表 2 生化鉴定结果¹⁾

菌株	胨基质	枸橼酸盐	R M	P V	乳糖	硫化氢	硝酸盐还原	葡萄糖	丙二酸盐	蔗糖	甘露糖	棉子糖	G N O	尿素	赖氨酸	脱羧酶	氰化钾
O ₂	+	-	+	-	(+)	-	+	(+)	-	-	(+)	-	+	-	+	+	-
O ₇₈	+	-	+	-	(+)	-	+	(+)	-	-	(+)	-	+	-	+	+	-
O _{2a} (Nor ^r , Chl ^r)	+	-	+	-	(+)	-	+	(+)	-	-	(+)	-	+	-	+	+	-
O _{2b} (Nor ^r , Chl ^r)	-	-	+	-	(+)	-	+	(+)	-	-	(+)	-	+	±	+	+	-
O _{78a} (Chl ^r , Nor ^s)	+	-	+	-	(+)	-	+	(+)	-	-	(+)	-	+	-	+	+	-
O _{78b} (Chl ^r , Nor ^s)	+	-	±	-	(+)	-	+	(+)	-	-	(+)	-	+	±	+	+	-

1) + 表示阳性, - 表示阴性, (+)表示产酸产气, ± 表示可疑

2.3 O₂(Nor^r, Chl^r)、O₇₈(Chl^r, Nor^s)菌株的血清型

凝集反应结果,耐药标记菌株的菌体抗原型均未改变,也无交叉反应(见表 3)。

表 3 凝集试验情况¹⁾

菌株	O ₂	O ₂ (Nor ^r , Chl ^r)	O ₇₈	O ₇₈ (Chl ^r , Nor ^s)
盐水	-	-	-	-
O ₂ 血清	+	+	-	-
O ₇₈ 血清	-	-	+	+

1) + 表示凝集, - 表示不凝集

2.4 O₂(Nor^r, Chl^r)、O₇₈(Chl^r, Nor^s)菌株的对数生长期

从测得的 OD(640)值的变化规律表明两个耐药标记菌株与出发菌株的对数生长期一样,在 3~ 6 h 之间。

2.5 O₂(Nor^r, Chl^r)、O₇₈(Chl^r, Nor^s)菌株对小鸡的安全性及安全稳定性

接种十日龄 AA 小鸡试验结果,两个耐药标记菌株的毒力均已致弱至对小鸡安全(见表 4)。两株菌实际连续通过 AA 鸡 8 代,每代试验鸡的精神、食欲等均正常,扑杀剖检未见大肠

杆菌病变,表明已致弱的毒力是稳定的

表 4 安全试验情况

项 目	空白	肉汤	O ₂ 菌			O ₂ (Nor ^r ,Chl ^r)		O ₇₈ 菌	O ₇₈ (Chl ^r ,Nor ^s)
鸡 只 数	20	20	10	10	10	20	20	10	10
肌注菌数 /亿·只 ⁻¹		0.5 mL/只	2.45	5.9	11.8	7.125	14.25	12.15	15.16
大肠杆菌病鸡数	0	0	3	10	10	0	0	10	0
死 鸡 数	0	0	1	9	8	0	0	8	0
安 全 性			4/10	0/10	0/10	20/20	20/20	0/10	10/10

3 讨论

耐药培养试验、对数生长期测定、小鸡安全试验和安全稳定性及其他各项鉴定试验的结果综合表明,所培育的 O₂(Nor^r,Chl^r) O₇₈(Chl^r,Nor^s)菌株已成遗传稳定的耐药标记弱毒菌株,经初步免疫保护试验,它们的免疫原性也保持优良(另文)。这就为它们的原生质体融合、筛选和培育 O₃ O₇₈融合双价耐药弱毒株打下了基础

两株菌在耐药诱导培养过程中均显示如下规律:(1)开始一段时间,细菌耐药能力提高甚慢,到一定程度后则成倍递增。这有助于解释临床上用敏感药物治疗大肠杆菌病开始时药物很见效,但很快就发生耐药性的普遍现象。(2)细菌在一种药物培养基中开始时生长很缓慢(2~3 d),一些菌体变大或呈链状,随着传代增加,逐步恢复正常,符合细菌在不良环境繁殖的一般规律,稳定后的耐药菌株,虽然对数生长期与出发菌株仍一样,但在同等条件下繁殖菌数为出发菌株的61%~63%。(3)耐药菌株在肉汤中繁殖后,染色镜检,都出现成堆现象,其原因有待进一步研究。因此,数菌或接种时需特别注意吹打分散,以免出错

大多数细菌的抗药性是由质粒 DNA决定的。对 O₂(Nor^r,Chl^r)和 O₇₈(Chl^r,Nor^s)菌株的耐药性遗传机理,作者正进行质粒分析等研究。

致谢 吴世洪,吴志军同志参加了部分试验工作,谨此致谢!

参 考 文 献

丁友昉,陈 宁编. 1990.普通微生物遗传学.天津:南开大学出版社,370~378
卡尔尼克 B W 主编. 1991.禽病学.第 9版.高福,刘文军主译.北京:北京农业大学出版社,126~132
陈代杰,朱宝泉. 1995.工业微生物菌种选育与发酵控制技术.上海:上海科技文献出版社,195~217
林维庆. 1995.禽大肠杆菌病.见:《广东省畜禽疫病》编委会主编.广东省畜禽疫病.广州:广东科技出版社,164~165
黄淑坚,林维庆. 1996.鸡大肠杆菌荚膜多糖-蛋白质抗原免疫原性的研究.华南农业大学学报,17(2):28~29

STUDIES ON DEVELOPMENT OF DRUG- TOLERANT AND ATTENUATED O₂(Nor^r, Ch^f) AND O₇₈(Ch^f, Nor^s) STRAINS OF *Escherichia coli* FROM POULTRY

Huang Qingyun Chen Jinding Ren Tao Luo Xianzhong Ou Shoushu
(Dept. of Vet. Med., South China Agr. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract

This paper reports the development process of drug- tolerant and attenuated *Escherichia coli* O₂(Nor^r, Ch^f) and O₇₈(Ch^f, Nor^s) strains. With *Escherichia coli* O₂ and O₇₈ which are the most important serotypes of *E. coli* in poultry colibacillosis as parent strains, drug resistant and attenuated O₂(Nor^r, Ch^f) and O₇₈(Ch^f, Nor^s) strains of *E. coli* were induced by Norfloxacin and Chloramphenicol which are two antibacterial drugs most frequently used in veterinary practice. The essential characteristics of *E. coli* O₂(Nor^r, Ch^f) and O₇₈(Ch^f, Nor^s) strains were examined. The results indicated that the drug- tolerance and the heredity of *E. coli* O₂(Nor^r, Ch^f) and O₇₈(Ch^f, Nor^s) strains were stable. This achievement might be a good beginning for further developing efficient and multivalent vaccines by using spheroplast fusion technique.

Key words *E. coli*; drug- tolerant strain; attenuated strain

(上接 84 页)

PROPAGATION OF AVIAN MYELOBLASTOSIS VIRUS AND ESTABLISHMENT OF HYBRIDOMA CELL LINES

Wang Pengjun Liu Fu'an
(Dept. of Veterinary Medicine, South China Agr. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract

One to three- day old susceptible chicks were experimentally infected with the BAI- A strain of Avian Myeloblastosis Virus (AMV) in passaged chicken plasma stored at - 20°C for six years, and the onset of disease was seen 15 to 45 days postinoculation. BALB/C mice 8- 10 weeks of age were immunized with AMV antigens purified from AMV- infected chicken plasma by differential and isopycnic centrifugation in a discontinuous sucrose gradient. B lymphocytes from mouse spleen were hybridized with SP2/O myeloma cells, and six hybridoma cell lines finally established after specific antibody detection and cell cloning. Indirect ELISA demonstrated that only two ascitic monoclonal antibodies (McAb) reacted positively with specific AMV antigen and showed no cross reaction with IBV, IBDV, EDSV- 76, ILTV and HVT viruses, retaining its specific antibody- secreting property. Furthermore, the application of AMV- McAb in diagnosis and eradication of avian leukosis from chicken flocks was discussed.

Key words avian myeloblastosis virus; group- specific antigen; monoclonal antibody; hybridoma