



从临床肺炎死亡树鼩中分离到致病性大肠埃希菌

高家红, 仝品芬, 孙晓梅, 江勤芳, 代解杰

(中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所, 云南省重大传染病疫苗研发重点实验室, 昆明 650118)

【摘要】 目的 对6例1月内因肺炎死亡的树鼩采样进行病原菌分离培养鉴定分析。方法 解剖死亡树鼩, 利用无菌刀片切开肺组织, 用无菌接种环插入肺内采样接种于营养琼脂培养基, 另取两份样品进行细菌涂片革兰氏染色和抗酸染色。培养出来的细菌进行进一步分离和菌落生长情况的观察, 并经革兰氏染色、抗酸染色、氧化酶试验、生化编码鉴定和9种药敏试验, 初步确定树鼩肺部感染的致病菌及其药敏情况。结果 样本革兰氏染色见到大量阴性杆菌, 抗酸染色结果显示为非结核分枝杆菌, 大小约为 $0.2 \mu\text{m} \times 2 \sim 6 \mu\text{m}$ 。营养琼脂培养6例样品中均仅见1株旺盛生长的细菌, 进一步分离培养经革兰氏染色为阴性杆菌, 抗酸染色为非结核分枝杆菌, 大小和染色结果与样本涂片相同, 经鉴定为致病性大肠埃希菌。药敏试验表明该菌对头孢哌酮, 呋喃妥因, 氨苄西林, 阿米卡星, 氧氟沙星, 诺氟沙星, 磺胺甲噁唑/甲氧苄定高度敏感; 对庆大霉素和青霉素G为低度敏感。结论 6例树鼩死亡原因均为细菌性肺炎, 病原菌初步鉴定为致病性大肠埃希菌。药敏实验筛选出的药物可为临床治疗树鼩该类病例用药提供指导。

【关键词】 树鼩; 致病性大肠埃希菌; 药敏试验

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)09-0081-03

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.009.018

Isolating Enteropathogenic *E. coli* from Clinical Pneumonia in Dead Tree Shrews

GAO Jia-hong, TONG Pin-feng, SUN Xiao-mei, JIANG Qin-fang, DAI Jie-jie

(Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medicine Sciences(CAMS) & Peking Union Medical College(PUMC), Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research & Development on Severe Infectious Diseases, Kunming 650118, China)

【Abstract】 Objective To isolate, culture and identify the pathogenic bacterium from 6 cases of bacterial pneumonia within 1 month in tree shrews. **Methods** We Dissected the dead tree shrew, cut open the lung tissue with sterile blade to insert focus of infection in the lung with inoculating loop to get samples for inoculating on nutrient agar and another two samples for bacterial smear with Gram staining and acid-fast staining. The bacterium obtained was isolated and cultivated for bacterial growth observation, then the pathogenic bacterium of tree shrew and its antibiotic susceptibilities was initially identified by Gram staining, acid-fast staining, oxidase test, biochemical encoding identification system and 9-kind antibiotic susceptibility test. **Results** A amount of negative bacteria were observed from samples with Gram staining. Acid-fast staining appears it was nontuberculous mycobacterium about size $0.2 \mu\text{m} \times 2 \sim 6 \mu\text{m}$. Only 1 strain strong bacterium was observed in every 6 case on nutrient agar plate, it was verified as Gram-negative bacterium and nontuberculous mycobacterium, its size and staining results were the same as samples. It was identified as enteropathogenic

[基金项目]“十一五”国家科技支撑计划项目(2009BAI83B02,2011BAI15B01)。云南省科技基础条件平台建设计划项目(2006PT07-2)。

[作者简介]高家红(1968-),男,硕士,助理研究员,研究方向:实验动物学。Email:gjh@imbcams.com.cn。

[通讯作者]代解杰(1961-),男,研究员。E-mail:djj@imbcams.com.cn。

E. coli. Antibiotic susceptibility test shows it is highly susceptibility to cefoperazone, furantoin, ampicillin, amikacin, ofloxacin, norfloxacin, sulfonamide methoxybenzylidine and low susceptibility to gentamicin and penicilin. **Conclusion** We conclude that Bacterial pneumonia is the cause of these 6 tree shrew death cases, the enteropathogenic *E. coli* was initially identified as the reason. Drugs selected by antibiotic susceptibility could instruct clinical treatment like these cases in tree shrews.

【Key words】 Tree shrew(*tupaia belangeri chinensis*); Enteropathogenic *E. coli*; Antibiotic susceptibility test

树鼩(*Tupaia belangeri chinensis*, tree shrew)是一种在生物医学研究中很有价值的新型实验动物,近几十年来,树鼩已广泛应用于病毒、细菌、寄生虫、神经、内分泌、泌尿、肿瘤等方面的研究^[1]。

人工饲养状态下群养或交配饲养的成年树鼩常常因饲养条件不适、营养、发情等原因撕咬致伤致残,继而导致突然死亡。该类死亡树鼩常可见到明显的外伤,无腹泻症状,极易判断死因。单独关养的成年树鼩无任何外观表现异常而突然死亡的原因应进行调查分析,引起足够的重视。

本文对我中心 6 例单独关养的树鼩急性死亡病例进行解剖诊断,确诊为肺炎后用细菌学方法采样进行了培养、分离、鉴定和药敏试验,弄清了导致死亡的原因。

1 材料和方法

1.1 培养基和主要试剂

营养琼脂、S. S. 琼脂、三糖铁培养基、肠杆菌科细菌生化鉴定管、氧化酶试验试剂盒、革兰氏染色试剂盒均购自杭州天和微生物试剂有限公司,快速抗酸染色试剂盒购自迈克生物试剂有限公司,药敏纸片为北京天坛药物生物技术公司产品。

1.2 树鼩细菌采样涂片和培养

人工饲养的 6 只成年树鼩,均来自于中国医学科学院医学生物学研究所灵长类研究中心【SCXK(滇)2010-0003】【SYXK(滇)2010-0007】,单独饲养于室内不锈钢笼。平时饲喂由玉米粉、麦粉、奶粉、白糖、鸡蛋等配合经蒸熟成糕状的食物,辅食以饲喂苹果、面包虫为主。每日清洁一次饮水盒及料盒并清扫粪便。树鼩发病前饮食活动均正常,发病后活动性下降,通常厌食 1 d 后绝食,次日死亡。尸体解剖见外观无异常,肛周清洁无腹泻症状,剖见心脏、肝脏、脾脏、胰腺、肾脏、肾上腺、膀胱均正常,胃、大肠、小肠空无,双肺表面呈众多白色针尖样小结节,全肺充血浸润,急性肺炎典型症状明显。利用无菌刀片切开肺部结节部位,用无菌接种环插入肺内病灶采样接种于营养琼脂培养基,将平皿倒

置放入 37℃ 恒温培养箱中培养 18~24 h 观察结果。另采样两份于预先滴有 1 滴生理盐水的洁净载玻片上进行细菌涂片革兰氏染色和抗酸染色镜检。

1.3 细菌分离培养和染色

挑选营养琼脂培养皿中的典型菌落用三糖铁琼脂鉴别培养基作进一步的分离培养和产酸产气等培养特征鉴定。挑选分离培养得到的单个菌落涂片按革兰氏染色试剂盒和快速抗酸染色试剂盒使用说明书分别进行革兰氏染色和抗酸染色镜检。另外转种 S. S. 琼脂观察培养特性。

1.4 氧化酶试验

将洁净滤纸条置于干净平皿内,在超洁净操作台中用接种环在分离培养的中管里轻刮一滴环菌体均匀涂于湿润的滤纸上,用氧化酶试剂滴在滤纸条细菌培养物上,10 s 内观察结果。紫红色为阳性,无色或淡黄色为阴性(观察结果不明显时需进行重复实验)。

1.5 细菌生化鉴定

取生化编码鉴定管用砂轮将玻璃管上端划痕折断,然后用接种针取分离到的纯菌培养物接种(氨基酸及对照管需覆盖灭菌液体石蜡 1~2 滴),置灭菌平皿内或小试管架上放 35℃ 培养箱内,18~24 h 内观察生化反应结果。对照采用大肠埃希菌 ATCC25922。

15 种肠道杆菌生化编码鉴定管为:硫化氢、苯丙氨酸、葡萄糖酸盐、蛋白胨水、葡磷胨水、枸橼酸盐、尿素、半固体、赖氨酸、鸟氨酸、氨基酸对照、棉子糖、山梨醇、侧金盏花醇、木胶糖。

1.6 药敏试验

采用 K-B 纸片法进行^[2],本次所用药敏纸片如下:阿米卡星(AN30 μg/片)、青霉素 G(P10 μg/片)、头孢哌酮(CFP75 μg/片)、氨苄西林(AM10 μg/片)、呋喃妥因(FT300 μg/片)。庆大霉素(GM10 μg/片)、诺氟沙星(NOR10 μg/片)、氧氟沙星(OFL5 μg/片)、磺胺甲噁唑/甲氧苄定(SXT 23.75/125 μg/片)。对照采用大肠埃希菌 ATCC25922。

表 1 树鼩肺炎病原菌药敏试验结果
Tab.1 Susceptibility test results of pneumonia pathogenic bacterium in tree shrew

	药物名称 Drugs								
	头孢哌酮 CFP	庆大霉素 GM	氧氟沙星 OFL	诺氟沙星 NOR	青霉素 GP	氨苄西林 AM	阿米卡星 AN	呋喃妥因 FT	磺胺甲噁唑/甲氧 苄定 SXT
抑菌圈直径 mm (bacteriostasis diameter in mm)	36	6	25	30	8	21	23	20	23

2 结果

2.1 样品及其培养分离物革兰氏染色

样品及培养物涂片革兰氏染色在油镜下均见到大量杆状红色细菌,形态几乎完全相同,为革兰氏阴性杆菌,未见其它细菌(彩插 4 图 1)。

2.2 样品及其培养分离物抗酸染色

油镜下样品及培养物涂片抗酸染色均见到大量细长杆状蓝色细菌,无弯曲和分枝,抗酸染色为阴性,证实该菌为非结核分枝杆菌(彩插 4 图 2)。

2.3 细菌培养分离和鉴定

营养琼脂培养 6 例树鼩均仅见 1 株细菌生长,无其它细菌,该菌生长旺盛,菌落呈圆形凸起,半透明,表面光滑湿润,37℃ 培养 18 h 菌落直径大小约 0.5 cm。三糖铁培养基分离培养产酸产气,得到的细菌革兰氏染色为阴性杆菌,氧化酶试验均为阴性,抗酸染色为非结核分枝杆菌,大小约为 0.2 μm × 2 ~ 6 μm,接种 S. S. 琼脂生长迅速,粉红色菌落,呈云雾状,经细菌生化编码鉴定为致病性大肠埃希菌,符合率为 100%。

2.4 细菌药敏试验

细菌药敏试验测得的抑菌圈大小见表 1。从表中可看出该菌对所试药物均敏感,其中对头孢哌酮,呋喃妥因,氨苄西林,阿米卡星,氧氟沙星,诺氟沙星,磺胺甲噁唑/甲氧苄定高度敏感,对庆大霉素,青霉素 G 为低度敏感。

3 讨论

大肠埃希菌通常情况下对人体无害,但也有部分致病性发生改变的大肠埃希菌特殊血清型,可以导致消化道感染^[3]。在人类,大肠埃希菌引起细菌性肺炎感染的人群主要是新生儿、老年人和体弱多病者,其他人群较少见,且预后恶劣^[4,5]。在实验动物中,引起肺炎的致病细菌众多,但少见致病性大肠埃希菌感染的报道。一般情况下成年树鼩的死亡以咬死和腹泻较为常见,肺炎相对少见。虽然我们临床肺炎死亡的树鼩新鲜尸体肺脏分离到致病性大肠埃希菌,但同时潜在的联合致病因子或其他病原尚未针对性分离或排除,因此分离到的致

病性大肠埃希菌尽管从症状表现上看很有可能是树鼩致病致死的主要原因,但不一定是致病致死的唯一原因。尽管如此,值得重视的是本文病例的发生说明大肠埃希菌有可能导致成年树鼩急性细菌性肺炎而死亡。

本文病例分离培养检出的病原菌为致病性大肠埃希菌,该菌很容易通过饮食、环境接触而感染,而且只要生长条件适宜,繁殖十分迅猛。因此,我们日常饲养管理中应当注意树鼩巢箱、饮食的卫生、活动性和排便数量性状的观察记录,重视气温快速变化时采取及时保暖措施提高机体抗病能力。一旦存在病例发生,应引起足够重视,及时隔离治疗,加强饮食卫生,有效进行环境消毒,以防止在群体间迅速传播。

实验室内树鼩爆发间质性肺炎已有报告,特点是发病急,死亡率高,其病原为肺炎支原体^[6]。但其他类型的树鼩肺炎少有报道。由于在解剖中见到白色针尖状结节,因此我们怀疑有结核分枝杆菌的可能性,故而进行了抗酸染色进行鉴别,结果证明为非结核分枝杆菌。但对形成细小结节的原因尚不明确,由于直接涂片中都见到大量细菌,推测可能为细菌大量集聚所致。

本次药敏试验表明,导致树鼩死亡的菌株对所试药物均敏感,这为以后早期发现病例的治疗提供了实验依据和药物选择上的便利。

参考文献:

- [1] 秦雪, 伊瑶, 毕胜利, 等. 树鼩应用于疾病动物模型的研究进展[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2006, 20(2): 97-98.
- [2] 孔繁林编. 实用临床细菌鉴定, 第一版, 昆明: 云南科技出版社, 1997, 64.
- [3] 赵铠, 章以浩, 李河民主编. 2007. 医学生物制品学, 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1016-1024.
- [4] 胡小平. 老年人肺炎的临床特点及治疗(附 55 例报告)[J]. 赣南医学院学报, 2009, 29(4): 579-580.
- [5] 彭启灿, 卢文赛, 熊英, 等. 肺部革兰氏阴性菌感染的诊断和治疗[J]. 泸州医学院学报, 1990, 13(3): 217-219
- [6] 李媛, 杨春, 苏建家, 等. 实验室内树鼩爆发间质性肺炎的报告[J]. 四川动物, 2005, 01: 21-24.