

· 论 著 ·

大肠杆菌 O157:H7 实验感染动物排菌动态检测

孙茂华¹, 孟祥升², 夏兴霞², 赵攀登², 张雪寒², 何孔旺², 王永山²

[摘要] **目的** 检验大肠杆菌 O157:H7 胶体金免疫层析检测试纸条在感染动物排菌中的应用效果。**方法** 将牛和小鼠采用灌胃攻毒方式实验感染大肠杆菌 O157:H7, 用大肠杆菌 O157:H7 胶体金免疫层析检测试纸条与细菌鉴别培养基分别培养检测感染动物粪便中的 O157:H7 的排菌量和持续时间。**结果** 牛在感染大肠杆菌 O157:H7 后的第 2 天开始从粪便排菌, 第 4~6 天达到峰值, 排菌时间可持续 28 d; 小鼠在感染 O157:H7 后的第 4 小时开始从粪便排菌, 第 6 小时达到峰值, 排菌时间可持续 15 d。**结论** 大肠杆菌 O157:H7 胶体金免疫层析检测试纸条与细菌鉴别培养基培养计数的检测结果一致, 试纸条更简便、快捷、直观, 在 1~5 min 内可得出检测结果。

[关键词] 胶体金免疫层析检测试纸条; 肠出血性大肠杆菌 O157:H7; 牛; 鼠; 粪便; 检测

[中图分类号] R378.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-271X(2012)01-0005-04

Detection of the faeces of animals inoculated with *E. coli* O157:H7

SUN Mao-hua¹, MENG Xiang-sheng², XIA Xing-xia², ZHAO Pan-deng², ZHANG Xue-han², HE Kong-wang², WANG Yong-shan². 1. Outpatient Clinic, Joint Logistics Department of Nanjing Military Area Command, Nanjing, Jiangsu 210002, China; 2. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/ National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Nanjing, Jiangsu 210014, China

[Abstract] **Objective** To investigate the application of the gold immunochromatographic strip for the detection of animals inoculated with *E. coli* O157:H7. **Methods** The cattle and mice were inoculated intragastrically with *E. coli* O157:H7, and their faeces were detected by using the gold immunochromatographic strip and counting colony. **Results** *E. coli* O157:H7 in faeces could be detected on day 2 after inoculation in inoculated cattle by using immunochromatographic strip of *E. coli* O157:H7 and the method of plate culture count with differential medium of *E. coli* O157:H7 and the peak levels of O157:H7 in faeces were attained during the forth to sixth day after inoculation and then it dropped down gradually up to day 28 following inoculation. The O157:H7 in faeces could be detected on hour 4 after inoculation in inoculated mice by using IC strip of *E. coli* O157:H7 and the method of plate culture count with differential medium of *E. coli* O157:H7 and the peak levels of O157:H7 in faeces were attained during the sixth hour after inoculation and then it dropped down gradually up to day 15 following inoculation. **Conclusion** The gold immunochromatographic strip for the detection of *E. coli* O157:H7 is convenient and rapid for the clinical diagnosis and field investigation of *E. coli* O157:H7 infection or/and contamination.

[Key words] gold immunochromatographic strip; *E. coli* O157:H7; cattle; mouse; faeces; detection

肠出血性大肠杆菌 O157:H7 感染具有暴发流行趋势、强烈的致病性与致死性以及抗生素治疗可能会加剧病情等特点。人感染 O157:H7 后, 出现急性腹泻、出血性结肠炎 (HC), 并在 5%~10% 的病例中引发溶血性尿毒综合征 (HUS) 及血栓性血小

板减少紫癜 (TTP) 等严重并发症, 严重者可导致死亡^[1]。1982 年该菌首先在美国发现, 此后在世界各地散发或流行, 1996 年在日本大阪地区流行, 患者逾万、死亡 11 人; 2001 年在中国江苏、安徽等地发生了多次食源性感染 O157:H7 事件, 导致 177 人死亡。O157:H7 已成为全球性的公共卫生和食品安全问题^[2-4]。

人主要是经食源性或与带菌动物接触感染 O157:H7, 带菌动物的粪便是污染环境、食品以及水源的主要来源。从腹泻患者、畜禽粪便、市售肉类以及猪、鸽、牛、鸡、鸭等动物中均有分离出 O157:H7 的

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划 (2007BAD40B01)

作者简介: 孙茂华 (1954-), 男, 山东郯城人, 本科, 副主任医师, 从事医疗工作

作者单位: 1. 210002 江苏南京, 南京军区联勤部门门诊部; 2. 210014 江苏南京, 江苏省农业科学院兽医研究所

通讯作者: 王永山, E-mail: wangys63@126.com; wangyongshan2001@yahoo.com.cn

报道^[5-6]。反刍动物是主要的储存宿主,受感染动物通常不表现临床症状,但可经粪便排菌,因此是 O157:H7 的危险传染源^[7]。鼠与人类生活关系密切,鼠类可以通过其排泄物污染人类的食物、食具以及生活环境,造成疾病的传播^[8]。目前,我们对自然感染 O157:H7 动物的排菌情况还知之甚少,是 O157:H7 防控研究中的薄弱环节。

本实验以牛和小鼠为 O157:H7 感染动物模型,评价大肠杆菌 O157:H7 胶体金免疫层析检测试纸条^[9-10]在 O157:H7 带菌动物监测中的应用前景。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 大肠杆菌 O157:H7 检测试纸条与山梨醇麦康凯琼脂培养基(为 O157:H7 的鉴别培养基,含 100 $\mu\text{g/ml}$ 卡那霉素、50 $\mu\text{g/ml}$ 新生霉素、40 $\mu\text{g/ml}$ 万古霉素和 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 亚碲酸盐)均由江苏省农业科学院兽医研究所生物兽药实验室研制^[4]。具有卡那霉素、新生霉素、万古霉素和亚碲酸盐四种抗性的大肠杆菌国际代表菌株 O157:H7 EDL933 株由江苏省农业科学院兽医研究所提供。该菌株在山梨醇麦康凯琼脂培养基上的菌落特征为:菌落透明、光滑湿润。

1.2 实验动物与分组 荷斯坦奶牛 12 头,雌性,(10 \pm 2)周龄,普通级,购自南京卫岗奶牛场。随机分成四个组,每组 3 头,实验前检测粪便 O157:H7 为阴性。ICR 小鼠 20 只,雄性,6 周龄,清洁级,购自扬州大学实验动物中心。随机分成四个组,每组 5 只。实验前检测粪便 O157:H7 为阴性。实验动物许可证号:SYXK(苏)2010-0005。

1.3 菌液制备 将冻存于-80℃的 O157:H7 EDL933 菌种划线于山梨醇麦康凯平板,37℃过夜培养,次日挑取单菌落接种于 5 ml 的 LB 培养基中,37℃培养 8 h。取 O157:H7 EDL933 纯培养物,划线接种于 LB 琼脂平板上,37℃培养 18~24 h,用生理盐水将菌苔洗脱下来。取少量菌苔洗脱液做 10 倍比连续稀释,每个稀释度取 1 ml 菌液与 10~15 ml 溶化后冷却至 45℃左右的 LB 琼脂培养基混匀,倒入培养皿(直径 90 mm)中,水平放置,待琼脂凝固后,于 37℃温箱中培养,计数菌落,计算菌液中的细菌含量[菌落数/ml,(CFU/ml)]。

1.4 动物感染 所有实验动物在感染前 3 d 饮用 5 g/L 链霉素溶液,检测肠道粪便菌数 CFU/g 少于 10³时,断水断食 12 h,然后采用灌胃途径感染动物。灌胃 12 h 后恢复饮食、饮水(0.5 g/L 链霉素溶液)。

奶牛实验组:三个感染组,O157:H7 的灌服剂

量 CFU/头分别为 10⁸、10¹⁰、10¹²;一个对照组,只灌服生理盐水。

ICR 小鼠实验组:三个感染组,O157:H7 的灌服剂量 CFU/只分别为 10⁶、10⁸、10¹⁰;一个对照组,只灌服生理盐水。

感染后,观察实验动物的精神、行为、食欲、粪便等临床症状。收集粪便,检测 O157:H7 排出状况。连续观察至粪便中无 O157:H7 检出。

1.5 粪便收集与处理 动物感染 O157:H7 后,分别于 2、4、6、12 和 24 h 后收集粪便,之后每天收集一次。取牛粪便 1 g(鼠粪便 0.2 g),悬于生理盐水中,获得 10% (W/V) 的样品悬液,震荡混合均匀,800 r/min 离心 5 min(离心半径 8 cm),收集上清,然后 5000 r/min 离心 3 min(离心半径 8 cm),弃上清,1 ml 生理盐水重悬菌体沉淀,检测菌液。

1.6 检测

1.6.1 试纸条检测 直接检测:分别取 200 μl 上述菌液,滴加到 O157:H7 检测试纸条测试端,平放 1~5 min,判定结果,无阳性反应者进行增菌检测。增菌检测:取上述菌液 100 μl ,加入到 3 ml 改良 EC 肉汤培养基中(含 20 $\mu\text{g/ml}$ 新生霉素),37℃振荡培养 9 h,取 200 μl 菌液用 O157:H7 试纸条检测。

1.6.2 鉴别培养基菌落计数 将检测菌液分别进行 10 倍比连续稀释,每个稀释度取 1 ml,与 10~15 ml 溶化后冷却至 45℃左右的 O157:H7 山梨醇麦康凯琼脂培养基混匀,倒入培养皿(直径 90 mm)中,水平放置,待琼脂凝固后,于 37℃温箱中培养,计数菌落,计算菌液中的细菌含量(CFU/g)。

2 结果

2.1 奶牛感染组 奶牛感染 O157:H7 后未见明显的异常,也没有出现腹泻症状。用大肠杆菌 O157:H7 检测试纸条和鉴别培养基菌落计数两种方法平行检测粪便处理物。牛在感染 O157:H7 后第 2 天开始从粪便排菌,第 4~6 天达到峰值,排菌时间最长持续 28 d。

感染牛粪便中 O157:H7 菌数与感染剂量呈正相关。10⁸ CFU 剂量组在第 4 天;10¹⁰ CFU 剂量组在第 2、4、6 天;CFU 10¹² 剂量组在第 2、4、6、8 天的粪便处理液用 O157:H7 检测试纸条直接检测为阳性。细菌培养计数均超过 10⁶ CFU/ml。

感染牛从粪便排出 O157:H7 的持续时间与感染剂量也呈正相关。10⁸ CFU 剂量组牛排菌时间可持续 10 d;10¹⁰ CFU 剂量组牛排菌时间可持续 16 d;而 10¹² CFU 剂量组牛排菌时间可持续 28 d。

用大肠杆菌 O157:H7 检测试纸条(直接检测、增菌检测)与细菌培养计数两种方法检测牛感染 O157:H7 后的粪便排菌量和持续时间,两种方法的检测结果一致,试纸条更简便、快捷、直观,在 1~5 min 内可得出检测结果。

三个实验组牛感染 O157:H7 后的粪便排菌动态如表 1 所示。

2.2 小鼠感染组 小鼠感染 O157:H7 后 1~3 d 内均表现出昏睡、厌食、被毛蓬松,但没有明显的腹泻症状,只有少数在攻毒后 2~3 d 内有稀便。临床症状与感染剂量有关,高剂量组比低剂量组临床症状重,低剂量组从第 3 天逐渐恢复体况,采食量逐渐增加,精神好转。用大肠杆菌 O157:H7 检测试纸条和鉴别培养基菌落计数两种方法平行检测粪便处理物。小鼠在感染 O157:H7 后 4 h 开始从粪便排菌,6 h 达到峰值,排菌时间最长可持续 15 d。

感染鼠粪便中 O157:H7 菌落数与感染剂量呈正相关。 10^6 CFU 剂量组在 6 h; 10^8 CFU 剂量组在 4、6、12 h; 10^{10} CFU 剂量组在 4、6、12、24 h 的粪便处理液用 O157:H7 检测试纸条直接检测为阳性。细菌培养计数均超过 10^6 CFU/ml。

感染鼠从粪便排出 O157:H7 的持续时间与感染剂量也呈正相关。 10^6 CFU 剂量组小鼠排菌时间可持续 8 d; 10^8 CFU 剂量组小鼠排菌时间可持续 10 d;而 10^{10} CFU 剂量组小鼠排菌时间可持续 15 d。

用大肠杆菌 O157:H7 检测试纸条(直接检测、增菌检测)与细菌培养计数两种方法检测小鼠感染 O157:H7 后的粪便排菌量和持续时间,两种方法的

检测结果一致,试纸条更简便、快捷、直观,在 1~5 min 内可得出检测结果。

三个实验组小鼠感染 O157:H7 后的粪便排菌动态如表 2 所示。

3 讨论

大肠杆菌 O157:H7 主要生存在多种家畜、家禽,尤其是牛、羊等反刍动物体内,此外,从鹅、鸡、马、鹿、海鸥、绵羊、山羊、鸽子、鸭、兔、狗、猫的粪便中也可分离出 O157:H7。O157:H7 会引起幼龄动物腹泻,从而污染农畜产品。食源性以及与带菌动物接触是人感染 O157:H7 的主要途径,世界各地暴发流行的 O157:H7 的感染都是因食用被 O157:H7 污染的食物引起的。

牛是 O157:H7 的主要宿主,牛的饲养量巨大,是环境污染的重要源头,来源于牛的制品在民众生活中占有重要地位。而鼠与人类生活关系密切,有 人类居住的地方几乎都受到鼠害侵袭,鼠类可以通过其排泄物污染人类的食物、食具以及生活环境,而造成疾病的传播。因此,以牛和鼠为 O157:H7 感染动物模型,检测 O157:H7 的排菌状况,实际意义更强。

本实验参考 Wadolowski 和 Fujii 等^[11-12]的方法在感染前通过饮水给动物饲喂链霉素,排除肠道正常菌群,在动物消化道内为 O157:H7 驯化了一个定居和生长的环境,使 O157:H7 能在肠道中成为优势菌群。采用灌胃攻毒方式,使小鼠感染具有卡那霉素、新生霉素、万古霉素和亚砷酸盐四种抗性的

表 1 牛感染 O157:H7 后的粪便排菌动态

灌服剂量(CFU/头)	粪便收集时间(d)													
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28
10^8	1.1*	1.4	1.1	1.0	0.9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10^{10}	1.2	3.9	1.5	1.3	1.2	1.1	1.0	0.9	0	0	0	0	0	0
10^{12}	1.6	4.9	9.8	1.9	1.4	1.2	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
对照	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

注:“*”表示粪便含菌量 10^5 CFU/g

表 2 小鼠感染 O157:H7 后的粪便排菌动态

灌服剂量 (CFU/只)	粪便收集时间																		
	2 h	4 h	6 h	12 h	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d	11 d	12 d	13 d	14 d	15 d
10^6	0*	0.1	2.2	1.1	0.8	0.6	0.3	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0	0	0	0	0	0	0
10^8	0	1.5	2.6	1.2	0.9	0.9	0.7	0.6	0.6	0.5	0.4	0.3	0.1	0.1	0	0	0	0	0
10^{10}	0	5.2	8.3	6.7	1.3	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.4	0.3	0.3	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1
对照	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

注:“*”表示粪便含菌量 10^6 CFU/g

O157:H7,灌胃攻菌后继续给予小鼠 0.5 g/L 的链霉素溶液饮用。牛在感染 O157:H7 后 2 d 开始从粪便排菌,4 d 达到峰值,排菌时间最长可持续 28 d。小鼠在感染 O157:H7 后 4 h 开始从粪便排菌,6 h 达到峰值,排菌时间最长可持续 15 d。牛、鼠感染 O157:H7 后的排菌时间和持续时间存在差异,与这两种动物的消化道结构有关。大肠杆菌 O157:H7 胶体金免疫层析检测试纸条与 O157:H7 鉴别培养基细菌培养计数的检测结果一致,而试纸条更简便、快捷、直观,在 1~5 min 内可得出检测结果,便于 O157:H7 临床样品的快速检测以及在粪便、食品、环境污染物、水样等现场检测样品中的快速筛查。

【参考文献】

- [1] Tarr PI. Escherichia coli O157:H7: clinical, diagnostic and epidemiological aspects of human infection [J]. Clin Infect Dis, 1995, 20(1): 1-10.
- [2] WHO. Enterohaemorrhagic Escherichia coli infection Japan [J]. Wkly Epid Rec, 1996, 30: 229.
- [3] 李洪卫,景怀琦,逢波,等. 徐州市 2000 年肠出血性大肠埃希菌 O157:H7 感染性腹泻的调查 [J]. 中华流行病学杂志, 2004, 23(2): 119-122.
- [4] 倪大新,汪华,顾玲,等. 江苏省 1999 年大肠埃希菌 O157:H7 宿主动物带菌情况调查 [J]. 中华流行病学杂志, 2002, 3(2): 102-104.

- [5] Hancock D, Besser T, Lejeune J. The control of VTEC in the animal reservoir [J]. Int J Food Microbiol, 2001, 66(1-2): 71-78.
- [6] Ogden ID, Hepburn NF, MacRae M, et al. Long-term survival of Escherichia coli O157 on pasture following an outbreak associated with sheep at a scout camp [J]. Lett Appl Microbiol, 2002, 34(2): 100-104.
- [7] Meyer-Broseta S, Bastian SN, Arne PD, et al. Review of epidemiological survey on the prevalence of contamination of healthy cattle with Escherichia coli serogroup O157:H7 [J]. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2001, 203: 347-361.
- [8] 刘洁,夏兴霞,王永山,等. 大肠杆菌 O157:H7 抗体胶体金免疫层析检测试纸条的研制 [J]. 中国预防兽医学报, 2010, 32(5): 375-378.
- [9] 夏兴霞,刘洁,王永山,等. 动物源性人兽共患细菌病防控生物新制剂的研究 I. 分泌抗大肠杆菌 O157:H7 单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立 [J]. 江苏农业学报, 2009, 25(2): 291-295.
- [10] 夏兴霞,王永山,孟祥升,等. 大肠杆菌 O157:H7 单克隆抗体胶体金免疫层析检测试纸条的研制 [J]. 中国动物传染病学报, 2010, 18(4): 47-53.
- [11] Wadolkowski EA, Burris JA, O'Brien AD. Mouse model for colonization and disease caused by enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 [J]. Infect Immun, 1990, 58(8): 2438-2445.
- [12] Fujii J, Kita T, Yoshida S, et al. Direct evidence of neuron impairment by oral infection with verotoxin-producing Escherichia coli O157:H7 in mitomycin-treated mice [J]. Infect Immun, 1994, 62(8): 3447-3453.

(收稿日期: 2011-06-24; 修回日期: 2011-09-20)

(本文编辑: 张仲书; 英文编辑: 王建东)

· 短 篇 ·

56 例高龄社区获得性肺炎的临床分析

方红¹, 张兴虎²

【关键词】 老年; 高龄; 社区获得性肺炎

【中图分类号】 R563.1 【文献标志码】 B

【文章编号】 1672-271X(2012)01-0008-02

社区获得性肺炎(CAP)是门急诊常见病之一,本文对 56 例高龄 CAP 的诊治特点分析报告如下。

1 临床资料

1.1 一般资料 2003 年 6 月至 2011 年 5 月 56 例门急诊高龄 CAP,男 32 例,女 24 例,年龄 80~96 岁,平均 87 岁。合并慢性阻塞性肺疾病和肺心病 12 例,糖尿病 35 例,高血压 39 例,脑血管疾病 45 例,冠心病 38 例。

1.2 诊断标准 符合 CAP 的诊断标准^[1]。包括:①新近出现的咳嗽、咳痰,或原有呼吸道疾病症状加重,伴有脓痰,有时伴胸痛;②发热;③肺实变和(或)伴有啰音;④白细胞计数 $\geq 10 \times 10^9/L$ 或 $< 4 \times 10^9/L$;⑤X 线胸片示片状或斑片状阴影或间质性改变、胸腔积液;⑥除外肺结核、肺部肿瘤、非感染性肺间质性疾病、肺水肿、肺不张、肺栓塞、肺嗜酸性粒细胞浸润和肺血管炎等。

1.3 临床表现 本组均有呼吸加快(> 25 次/min)脉搏增快(> 90 次/min),肺内闻及干湿啰音者 50 例(89.3%),咳嗽 45 例(80.4%),低热 42 例(75.0%),胃纳差 31 例(55.4%),有恶心、呕吐及腹泻等消化道症状 10 例(17.9%),呼吸困难 8 例(14.3%),高热 8 例(14.3%),全身乏力为首发症状 4 例(7.1%),胸痛或痰血 3 例(5.4%),出现精神症状 3 例(5.4%)。

作者单位: 1. 210016 江苏南京,南京军区司令部门诊部;
2. 210002 江苏南京,南京军区南京总医院干部病房一科

(下转第 19 页)