论著

文章编号:1000-5404(2009)06-0502-04

中国海域分离的嗤氏艾肯菌致病性和抗生素敏感性研究

郭建巍,马 骢,郝秀红,付凯飞,蒋学兵,马学斌,刘 敏,王珍光,张雅芳,王 芳,王海东 (海军总医院检验科,北京 100037)

摘 要:目的 就中国海域分离的嗤氏艾肯菌对小鼠的毒力及伤口感染情况进行研究,并进行抗生素敏感性实验。**方法** 昆明小鼠腹腔注射嗤氏艾肯菌悬液,观察一般状态、白细胞计数和血培养。第5天脱颈处死后解剖取脏器甲醛固定,石蜡包埋、制片,HE染色,光镜观察;昆明小鼠致伤后浸泡在含嗤氏艾肯菌的人工海水中45~60 min,打捞后分笼于层流柜中饲养。于致伤浸泡后不同时间做白细胞计数及血培养,并观察一般状态和伤口炎性反应,定时取伤肢分泌物做细菌培养;实验完毕后伤肢甲醛固定,石蜡包埋、制片,HE染色,光镜检查;用K-B法做嗤氏艾肯菌对各种抗生素药物敏感性实验。**结果** 小鼠注射嗤氏艾肯菌液后,白细胞升高,感染12 h后20%小鼠心和肝脏有细菌生长。小鼠感染嗤氏艾肯菌后,病变部位以肺、肝及肾脏为重,病变性质主要是造成血液循环障碍,引起不同程度的充血、出血及血停滞现象。致伤小鼠经含嗤氏艾肯菌的海水浸泡后,6、12、24、48、72 h伤肢培养均为阳性,感染后48 h时20%小鼠肠组织细菌培养阳性,其余时间点和其他组织细菌培养均为阴性。伤肢组织可见肌纤维排列疏松、紊乱、断裂,横纹肌间较多炎细胞浸润。嗤氏艾肯菌对复方新诺明、哌拉西林、美洛培南、磺胺的敏感性仅为67%,对其他抗生素均表现为敏感。**结论** 中国海域分离的嗤氏艾肯菌具有致病力,嗤氏艾肯菌对复方新诺明、哌拉西林、美洛培南、磺胺的敏感性较低,对其他抗生素均表现为敏感。

关键词: 中国海域;嗤氏艾肯菌;致病性;抗生素

中图法分类号: R372;R378;R446.5 **文献标识码:** A

Pathogenicity and antibiotic sensitivity of *Eikenella corrodens* isolated from maritime space of China

GUO Jian-wei, MA Cong, HAO Xiu-hong, FU Kai-fei, JIANG Xue-bing, MA Xue-bin, LIU Min, WANG Zhen-guang, ZHANG Ya-fang, WANG Fang, WANG Hai-dong (Department of Laboratory Medicine, General Hospital of Navy, Beijing 100037, China)

Abstract: Objective To study the toxicity, wound infection ability and antibiotic sensitivity of *Eikenella corrodens* isolated from maritime space of China. **Methods** Kunming mice were intraperitoneally injected with *Eikenella corrodens* suspension, and their general status was observed and leukocyte count and blood culture were preformed. On the fifth day after infection, mice were sacrificed and their organs were treated with formalin fixation, paraffin imbedding, HE staining and observed under light microscope. In toxicity experiment, the vulnerated limbs of Kunming mice were soaked in artificial sea water containing 2.0×10^6CFU/ml *Eikenella corrodens* for 45 to 60 min, then they were raised in laminar flow cabinet, and their leukocyte count, blood culture and general status were surveyed at different time points after soaking, and their organs were tested too. The antibiotic susceptibility of *Eikenella corrodens* was tested by traditional K-B methods. **Results** After injected with *Eikenella corrodens*, the leukocytes of mouse were increased, and the liver and heart of 20% mice were *Eikenella corrodens* positive 12 h after infection. The diseased regions of lung, liver and kidney were more serious than other organs, and appeared hyperemia, hemorrhage and stasis because of dysaemia. Injured limb cultures of Kunming mice 6, 12, 24, 48, 72 h after soaking were all positive. In addition, the intestine cultures from 20% mice were positive 48 h after the injured limb was soaked. Loose arrangement, disorder, interruption of muscle fiber and inflammatory cell infiltration between striped muscles were also observed from injured limb. **Conclusion** Eikenella corrodens isolated from maritime space of China were virulent. Except for lower sensibility

基金项目: 全军医药卫生科研基金重点项目(20051102);全军医学科研"十一五"计划专项课题(06Z007)

Supported by the Key Project of the Scientific Research Foundation for Medical Science and Public Health of PLA (20051102) and the Specific Scientific Research Project of the "Eleventh Five-Year Plan" for Medical Sci & Tech Research of PLA (06Z007)

作者简介: 郭建巍,男,甘肃省临夏市人,博士,副主任医师,主要从事微生物和免疫学诊断方面的研究。E-mail: jwkuo@sohu.com

收稿日期: 2008-09-09;**修回日期:** 2008-11-04

about 67% to Trimesulf, piperacillin, Meropenem and sulfanilamide, our isolated Eikenella corrodens displays good antibacterial activity to other antibiotics.

Key words: maritime space of China; Eikenella corrodens; pathogenicity; antibiotic

海军战士和沿海渔民在海上作业中经常会有伤口的破损,破损伤口受到海水的浸泡和海水中致病菌的作用,会引起伤口感染、组织坏死、代谢障碍等一系列损害。本研究对中国海域分离的嗜氏艾肯菌对小鼠的毒力及伤口感染进行研究,并进行抗生素敏感性实验,以了解嗜氏艾肯菌的毒力和致病性,为海水浸泡伤嗜氏艾肯菌感染制定有效的预防预案提供实验基础。

1　材料与方法

1.1　材料

实验细菌:中国海域分离的嗜氏艾肯菌、副溶血弧菌、大肠杆菌 ATCC25922,金黄色葡萄球菌 ATCC25923(本室保存)。实验动物: 健康二级昆明小白鼠 110 只,雄性,6 ~ 8 周龄,体质量 16 ~ 18 g(许可证号:京动许可 99001)。实验环境为海军总医院动物实验室,清洁级。

1.2　方法

1.2.1　细菌的活化和鉴定　　挑取单个菌落,接种普通血琼脂平板,连续传代 3 次后用 VITEK 公司的 GNI 卡鉴定,符合率为 99%。

1.2.2　毒力学实验　　按照随机数字表的方法将小鼠分为 5 组,每组 10 只。实验组:腹腔注射嗜氏艾肯菌悬液 10^6 CFU/ml 1ml;阳性对照组:腹腔分别注射不同的细菌(嗜氏艾肯菌、副溶血弧菌、大肠杆菌 ATCC25922、金黄色葡萄球菌 ATCC25923)悬液 10^6 CFU/ml 1 ml;阴性对照组注射 1 ml 生理盐水。注射后每 6 小时观察一般状态,每日测体质量、做白细胞计数和血培养。第 5 天脱颈处死后解剖取脏器(心、肝、肺、脾、肾、肠)于 10% 福尔马林中固定,石蜡包埋、制片,常规 HE 染色,光镜观察组织学改变。

1.2.3　动物感染模型制作　　在洁净工作台内操作。利用随机数字表的方法将小鼠分为 6 组($n = 10$):实验组(嗜氏艾肯菌组)、阳性对照组(副溶血弧菌、大肠杆菌组、金黄色葡萄球菌组)、无菌海水对照组、未浸泡组。固定致伤[1]后小鼠伤肢于固定器上,实验组和阳性对照组小鼠分别浸泡在含 2.0×10^6 CFU/ml 以上不同细菌的人工海水中,无菌海水对照组浸泡在不含细菌的无菌海水中,45 ~ 60 min 后,打捞出的小鼠放入过滤帽鼠笼中,分笼于层流柜中饲养。未浸泡组的伤肢不做任何处理。分别于致伤浸泡后 6、12、24、48、72 h,尾静脉取血 20 ~ 30 μl 做白细胞计数及血培养。观察精神萎靡、呼吸急促、全身震颤、弓背及竖毛现象和伤口炎性反应;定时用无菌棉拭子取炎性分泌物进行细菌培养。从受伤小鼠浸泡后算起,饲养 1 ~ 3 d 后脱颈处死并解剖,将伤肢固定,石蜡包埋、制片,常规 HE 染色,光镜检查。

1.2.4　药敏试验方法(K-B 法)　　制备 0.5 麦氏单位的菌悬液,密集涂布于 MH 琼脂平板上,放药敏纸片,35 ℃孵育 18 ~ 24 h,BOMIC 药敏检测仪扫描测定。

2　结果

2.1　毒力实验中注射菌液前后各项生理指标变化

2.1.1　一般状况　　实验前各组动物精神状态良好。注射细菌后,实验组、阳性对照组即刻出现腹部颤抖,精神萎靡,并持续至 24 h。阴性对照组于当日恢复至实验前状态,实验组和阳性对照组在注射后 6 h 发生呼吸急促、弓背、竖毛等现象,48 h 后动物精神状态好转,72 h 接近注射前水平。

2.1.2　动物体质量变化　　阳性对照组及实验组小鼠体质量与阴性对照组相比,均有不同程度降低。在观察时间内,副溶血弧菌和金黄色葡萄球菌体质量变化最大,大肠杆菌组次之,嗜氏艾肯菌组小鼠体质量变化最轻。在实验的 7 d 中,小鼠体质量有随时间延长而逐渐增长的趋势(图 1)。

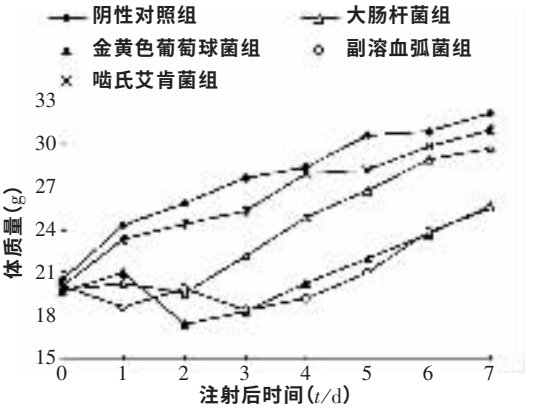
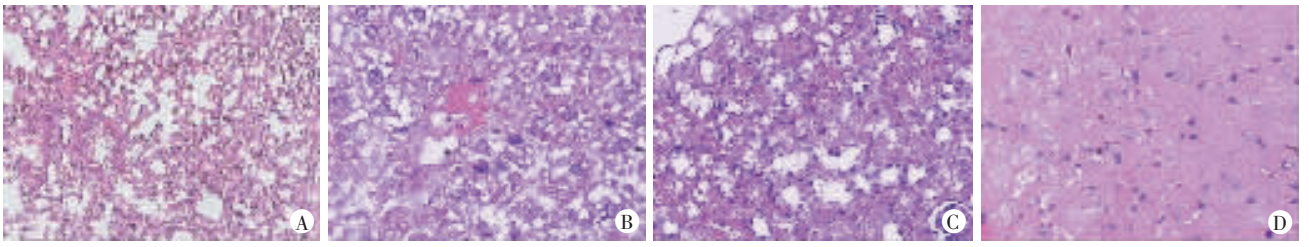


图 1　小鼠毒力实验体质量变化

2.1.3　白细胞水平改变　　注射细菌悬液后,小鼠白细胞水平均有增加,白细胞高峰出现时间由高到低依次为:副溶血弧菌组(4 d)、金葡菌组(2 d)、嗜氏艾肯菌组(4 d)和大肠杆菌组(2 d)。

2.1.4　血培养及脏器细菌培养结果　　嗜氏艾肯菌感染后 12 h,20% 小鼠心和肝脏有细菌生长,其余各组未培养出细菌;副溶血弧菌感染后 12 h 血培养为阳性,其余时间血培养均为阴性,肺、肾、肠及腹腔培养物阳性率均为 70%,心脏阳性率为 60%;大肠杆菌组感染后 12 h,20% 小鼠心、肝、肺、脾、肾、肠均有细菌生长;金黄色葡萄球菌感染后 12 h,20% 小鼠心和肝脏有细菌生长,其余各组未培养出细菌;阴性对照组未见细菌生长。

2.1.5　光学显微镜检查　　嗜氏艾肯菌感染小鼠后,病变部位以肺、肝、肾脏为重,肝脏:体积增大,表面可见出血点及淤斑,镜下可见肝细胞细胞质浊肿、疏松、嗜酸变性、灶性坏死、枯否氏细胞增生;肾脏:肾小球血管充血、肾小管混浊变性,肾间质水肿;肺:因胸膜腔内多有充血,双肺体积受挤压而缩小,可见黑褐色血凝块附着其上,镜下可见肺微血管内皮肿胀、白细胞聚集,肺泡水肿、微血栓形成和灶状肺萎陷。病变性质主要是造成血液循环障碍,引起不同程度的充血、出血及血停滞现象,尚未见到血栓形成,而实质细胞的变性、坏死病变较轻,嗜氏艾肯菌组病理变化比副溶血弧菌组、金葡菌组、大肠杆菌组都要轻(图 2)。



A:肺组织学变化 可见肺泡间质增宽,间质血管充血(×400);B:肝组织学变化 中央静脉淤血,肝细胞排列疏松,高度气球样变,可见溶解、坏死(×200);C:肾组织学变化 可见肾小管细胞着色不均,呈嗜酸性变及空泡变性(×200);D:心组织学变化 可见心肌纤维排列紊乱,断裂,部分溶解坏死(×200)

图2 嗜氏艾肯菌毒力实验小鼠脏器组织学改变 (HE)

2.2 嗜氏艾肯菌海水浸泡伤感染小鼠实验结果

2.2.1 嗜氏艾肯菌海水浸泡伤感染小鼠存活状况的观察 副溶血孤菌组有20%的小鼠于24 h内死亡,其余各组均存活至72 h。

2.2.2 小鼠一般状况变化 嗜氏艾肯菌组海水浸泡伤感染后小鼠均有精神萎靡、呼吸急促、弓背、竖毛、喜蜷缩等现象,持续时间长达72 h。副溶血孤菌组症状较重,存活小鼠至第3天剖杀时尚未恢复正常,无菌海水对照组仅在浸泡后6 h之内,出现一时性的精神萎靡、轻微弓背、竖毛等现象,6 h后恢复正常。

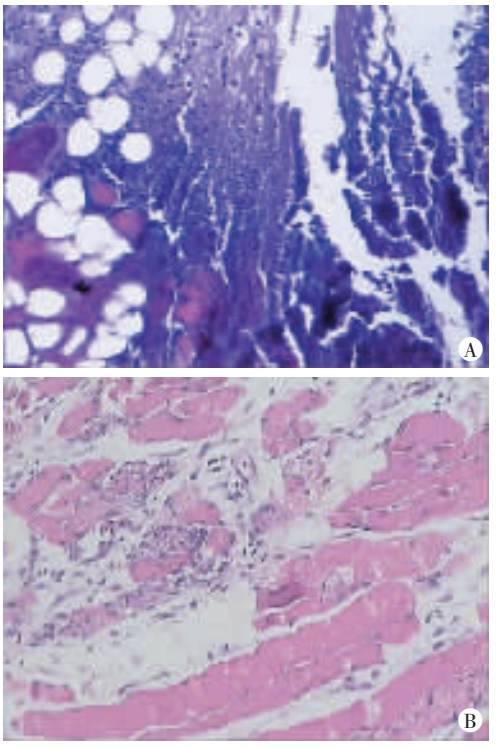
2.2.3 嗜氏艾肯菌海水浸泡伤感染小鼠小鼠体质量变化 与无菌海水对照组比较,实验组和阳性对照组小鼠体质量均于浸泡后1 d有不同程度降低,其降低程度由不明显到明显依次为:无菌海水组、大肠杆菌组、金黄色葡萄球菌组、嗜氏艾肯菌组、副溶血弧菌组。所有实验小鼠体质量均于浸泡后2 d后开始增加。

2.2.4 海水浸泡伤感染前后小鼠白细胞改变 与未浸泡组相比,无菌海水浸泡组小鼠白细胞在浸泡后6 h仅有轻度上升,随后恢复至对照水平;实验组和阳性对照组小鼠白细胞于致伤浸泡后均有不同程度升高,白细胞高峰及出现时间由高到低依次为:副溶血弧菌组(1 d)、金黄色葡萄球菌组(1 d)、嗜氏艾肯菌组(1 d)及大肠杆菌组(1 d)和无菌海水组(6 h)。

2.2.5 海水浸泡伤感染前后小鼠细菌培养结果 实验小鼠经含不同细菌的海水浸泡后,副溶血弧菌组20%小鼠12 h血培养阳性,其余各组血培养阴性。副溶血弧菌组6、12 h伤肢分泌物及1~3 d剖杀取伤肢培养均为阳性,1 d后60%小鼠肺、心、肝、肾及肠分离培养出感染细菌;嗜氏艾肯菌组6、12 h伤肢分泌物及1~3 d活杀取材伤肢培养均为阳性,2 d时20%小鼠肠组织细菌培养阳性,其余时间段组织细菌培养均为阴性。所有分离细菌经全自动微生物分析仪鉴定和核酸指纹分析,均显示为相应的感染细菌,无菌海水浸泡组未见细菌生长。金黄色葡萄球菌组、大肠杆菌组6、12 h伤肢分泌物及1~3 d活杀取伤肢培养均为阳性,2 d时金黄色葡萄球菌组20%小鼠肺、心、肝、肾、肠组织细菌培养阳性,大肠杆菌组20%小鼠肠组织细菌培养阳性。

2.2.6 海水浸泡伤感染小鼠伤口外观情况 实验组和阳性对照组在浸泡后6 h伤口轻微红肿;12 h红肿加剧,并有脓性分泌物渗出;24 h后分泌物逐渐减少;72 h消肿并结痂,无分泌物渗出,红肿减轻,行走自如。不同细菌组间无明显差异。无菌海水浸泡组伤口无肿胀和脓性分泌物渗出,24 h结痂,行走自如。

2.2.7 海水浸泡伤感染小鼠伤肢组织病理学检查 实验组和阳性对照组小鼠剖杀后,伤肢皮下及横纹肌均有不同程度炎症反应,其病理变化严重程度依次为:副溶血弧菌组、金黄色葡萄球菌组、嗜氏艾肯菌组及大肠杆菌组。副溶血弧菌组:可见皮下及横纹肌内大量嗜中性粒细胞浸润,蜂窝织炎形成(图3A)。嗜氏艾肯菌组:伤肢组织可见肌纤维排列疏松、紊乱、断裂,横纹肌间较多炎细胞浸润(图3B)。



A:副溶血弧菌组;B:嗜氏艾肯菌组

图3 伤口感染小鼠组织学改变 (HE×200)

2.3 嗜氏艾肯菌对抗生素的敏感性实验结果

嗜氏艾肯菌对氨苄西林/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦、头孢他啶、头孢哌酮、头孢哌酮/舒巴坦、头孢吡肟、头孢噻肟、头孢曲松、亚胺配能、氨曲南、妥布霉素、阿米卡星、左旋氧氟沙星、

环丙沙星、氧氟沙星、四环素、氯霉素等抗生素均表现为敏感,对复方新诺明、哌拉西林、美洛培南、磺胺的敏感性只为 67%。

3　讨论

外伤合并海水浸泡是一种特殊类型的损伤,它完全不同于普通陆地损伤。创伤部位受到海水高盐、高钠、高渗透环境的浸泡,会引起细胞内脱水、代谢障碍、受损局部病变加重,再受到海水中致病菌的作用,将会引起伤口感染、组织坏死等一系列损害。

啮氏艾肯菌是人口腔中常见的人畜共患病病原体,主要引起口内和口外的感染,也是引起人牙周炎患者牙龈下牙斑的主要病原体,而且在许多其他感染如胸肺部的感染、伤口术后的感染、软组织脓肿以及败血症患者中,也分离到该细菌。近年来,已有该菌感染的多例报道[2-8]。

我们前期对中国海域细菌分布的调研结果显示啮氏艾肯菌占中国海洋中细菌排名的第 5 位,其分离率为 11.8%。海水作业中该菌的危害性不容忽视。但其致病性到底如何? 对抗生素的敏感性怎样? 是本研究要解决的重要问题。

本课题组通过腹腔注射法使小鼠成功地感染了啮氏艾肯菌并建立了感染的动物模型。研究结果表明:将啮氏艾肯菌注入实验鼠腹腔,经过 12 ~ 96 h,细菌可从腹腔进入血液,并转移、落户到多个脏器,造成多脏器组织损伤,证实啮氏艾肯菌对小鼠具有致病毒力。病变部位以肺、肝及肾脏为重,病变性质主要是造成血液循环障碍,引起充血、出血及血停滞。啮氏艾肯菌致小鼠感染的能力低于副溶血弧菌和金黄色葡萄球菌,其致病力与大肠杆菌相当。

实验小鼠经啮氏艾肯菌致伤浸泡后,出现全身感染症状。感染伤口均分离出浸泡菌,感染最早在受伤浸泡后 6 h,可持续到 24 ~ 72 h。感染小鼠的脏器可见到炎症反应,以肺和肝脏表现较为明显,有脓肿灶形成。同时也发现,在受伤浸泡后 24 h 之内伤口感染浸泡菌的纯度高,无杂菌生长,致伤后 48、72 h,伤口分泌物浸泡菌的分离率下降,72 h 后分离培养出杂菌。提示海水浸泡合并啮氏艾肯菌感染的伤口感染如得不到及时控制,可合并其他细菌的混合感染。抗生素敏感性实验结果表明啮氏艾肯菌对大多数抗生素均有很好的敏感性,提示啮氏艾肯菌感染后早期使用合适的抗生素可完全有效控制此菌引起的感染。

参考文献:

[1] 郝秀红, 马　骢, 李　娜, 等. 小鼠创致伤后感染海洋细菌实验模型的建立[J]. 军医进修学院学报, 2005, 26(3): 208 - 210.

[2] Ozum U, Karadag O, Egilmez R, *et al*. A case of brain abscess due to Entamoeba species, Eikenella corrodens and Prevotella species[J]. Br J Neurosurg, 2008, 22(4): 596 - 598.

[3] Jeon S H, Han D C, Lee S G, *et al*. Eikenella corrodens cervical spinal epidural abscess induced by a fish bone[J]. J Korean Med Sci, 2007, 22(2): 380 - 382.

[4] Hombach M, Frey H R, Pfyffer G E. Urinary tract infection caused by Eikenella corrodens[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(2): 675.

[5] Zhiyong Z, Xiufang L, Jiajie L. Thigh abscess caused by Eikenella corrodens and Streptococcus intermedius: a case report[J]. J Infect, 2007, 54(1): e17 - e19.

[6] Chang C C, Huang S Y. Eikenella corrodens arthritis of the knee after a toothpick injury: report of one case[J]. Acta Paediatr Taiwan, 2005, 46(5): 318 - 320.

[7] Ovadia S, Lysyy L, Zubkov T. Eikinella corrodens wound infection in a diabetic foot: a brief report[J]. Int Wound J, 2005, 2(4): 322 - 324.

[8] Kostadinov S, Pinar H. Amniotic fluid infection syndrome and neonatal mortality caused by Eikenella corrodens[J]. Pediatr Dev Pathol, 2005, 8(4): 489 - 492.

(编辑　栾　嘉)

卞修武教授荣获 2008 年度振兴重庆争光贡献奖

2009 年 2 月 18 日,2008 振兴重庆争光贡献奖隆重举行颁奖典礼。我校卞修武教授因在科学研究领域取得突出成绩而获此殊荣。

卞修武教授从事病理学教学、科研和临床病理工作 22 年。获国家杰出青年科学基金资助,并先后主持国际合作项目(6 项)、国家重点科技(攻关)计划项目、973 计划前期专项、863 计划课题(2 项)、国家自然科学基金面上项目(6 项)和军队杰出人才基金、重庆市重大科技攻关等课题共 25 项。以第一(含共同第一)和通信作者发表论文 168 篇,其中 SCI 收录 24 篇。获重庆市自然科学一等奖 1 项、军队科技进步二等奖 2 项,申报和获得授权专利 7 件。2007 年入选"新世纪百千万人才工程"国家级人选,被解放军总后勤部评为"总后优秀教师",2008 年荣获中国科协"求是杰出青年奖(实用工程)",并被评为总后"科技银星"。卞修武教授现任第三军医大学西南医院病理学研究所所长,兼任中华医学会病理学分会常委、中国医师协会病理科医师分会常委、中国抗癌协会神经肿瘤专业委员会常委等学术职务,为《第三军医大学学报》第八届编委会常务委员。