

产 ESBLs 大肠杆菌感染大鼠实验模型的建立与评价

吴峥嵘 何 明 李 渊

摘 要 **目的** 建立产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)大肠杆菌感染的 SD 大鼠败血症实验模型,为研究耐药菌感染的发病机制及药物治疗提供基础。**方法** 采用尾静脉注射法对 SD 大鼠进行产 ESBLs 大肠杆菌感染,确定半数致死浓度,观察感染后大鼠一般状态、血培养、白细胞计数、病理切片观察重要脏器病理改变。**结果** 模型组大鼠均出现不同程度的感染症状,血培养阳性,体温升高、体重下降、白细胞升高,与空白对照组相比,差异具有统计学意义($P < 0.05$),病理切片发现模型组各脏器出现炎症、细胞水肿和淤血等病理变化。**结论** 表明了 SD 大鼠对产 ESBLs 大肠杆菌易感,并产生以体温升高、体重下降、白细胞升高,各重要脏器炎症病理改变为特征的感染表现。

关键词 产 ESBLs 大肠杆菌 SD 大鼠 感染动物模型

Establishment and Evaluation on Infected Rats Model of ESBLs - producing *Escherichia Coli*. Wu Zhengrong, He Ming, Li Yuan. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China

Abstract Objective To establish ESBLs - producing *Escherichia coli* infected SD rats model and make a theoretical basis for the study of the pathogenesis of drug - resistant bacterial infection and drug treatment. **Methods** The SD rats was infected with ESBLs producing *E. coli* by injecting into tail vein to produce infected animal, determined the media lethal dose, observed and noted common state, grown bacterial cultures, taken count of leucocyte and pathological changes of vital organs. **Results** The infected animal appeared varying degrees symptoms of infection, such as fever, weight loss and leukocytosis. The result of bacterial cultures was positive, and as compared with the control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The pathology found that the organ of model group animals appeared inflammation, cell edema and congestion and other pathological changes. **Conclusion** The SD rats was susceptible to ESBLs producing *E. coli*, and appeared performance of infection such as fever, weight loss, leukocytosis, inflammatory pathological changes in vital organs after infection.

Key words ESBLs - producing *E. coli*; SD rats; Infected animal model

近年来由产 ESBLs 菌株引起的感染在世界范围内逐渐升高。2009 年 CHINET 监测结果显示大肠杆菌占临床致病菌的 25.8%,其中产 ESBLs 大肠杆菌株占 56.5%,给临床选药带来很大压力^[1]。因此建立产 ESBLs 大肠杆菌感染动物模型具有重要的意义。目前,通过尾静脉注射法建立大鼠败血症动物模型的相关报道较少;本研究拟探讨大鼠尾静脉注射败血症模型的造模条件及模型评价,旨在为进一步研究产 ESBLs 大肠杆菌的感染机制及药物治疗提供参考依据。

材料与方法

1. 实验菌株:ESBLs 阳性的大肠杆菌来源于北京中医药大学东方医院临床送检的痰标本,大肠杆菌 ESBLs 筛查、确认按照(CLSI/NCCLS)标准判断。质控菌:大肠杆菌

ATCC25922,购自卫生部临床检验中心。(2)实验动物:健康清洁级雌性 SD 大鼠,体重 150 ± 10 g。购自北京海定兴旺实验动物养殖场[许可证号为:SCXK-(军)2007004]。动物购进后适应性饲养 3 天用于正式实验。

2. 方法:(1)半数致死浓度的确定:60 只大鼠,按体重随机分成 6 组,每组 10 只,设 6 个浓度组: 1×10^{10} CFU/ml、 1×10^9 CFU/ml、 5×10^8 CFU/ml、 2.5×10^8 CFU/ml、 1.2×10^8 CFU/ml、 0.5×10^8 CFU/ml。每只大鼠予上述不同浓度的菌悬液 1.0ml 尾静脉注射。注射前后用 75% 乙醇仔细消毒针口周围,防止伤口感染。感染后将大鼠放入动物房继续观察 5 天,记录各组死亡情况,Bliss 法计算半数致死浓度及 95% 可信区间^[2]。(2)动物分组及造模:健康清洁级雌性 SD 大鼠 30 只,随机分为两组,正常对照组 10 只,败血症模型组 20 只。根据以上实验确定感染浓度,以尾静脉注射法建立感染动物模型。对照组用无菌生理盐水 1.0ml 尾静脉注射。(3)观察内容:每日观察记录大鼠一般情况、体温、体重及死亡数目,共 5 天。于感染后 1h 及实验第 6 天断尾取血各取检血培养及白细胞计数。实验中感染死亡的大鼠及感染 5 天后存活的大鼠处死,进行病理切片观察重要脏器改变(肝、肺、肾)。

基金项目:北京市自然科学基金资助项目(7082053)

作者单位:100078 北京中医药大学东方医院

通讯作者:何明,电子信箱:hmg5011@163.com

3. 统计学方法:所有数值变量以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,应用 SPSS 13.0 统计软件,进行两样本均数比较的 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 半数致死浓度的确定:各组动物感染细菌浓度及死亡率如表 1 所示,根据以上结果,选取 95% 可信区间内便于计数浓度,即 2.5×10^8 CFU/ml 为最终感染动物浓度。

表 1 大肠杆菌半数致死浓度 (CFU/ml)

组别	浓度	动物数 (只)	死亡数 (只)	死亡率 (%)
1	1×10^{10}	10	10	100
2	1×10^9	10	9	90
3	5×10^8	10	7	70
4	2.5×10^8	10	5	50
5	1.2×10^8	10	3	30
6	0.5×10^8	10	1	90
LD ₅₀		2.37×10^8		
95% 可信区间		$(2.05 \sim 2.74) \times 10^8$		

表 2 大鼠体温的动态变化 ($\bar{x} \pm s, ^\circ\text{C}$)

组别	1h	1 天	2 天	3 天	4 天	5 天
对照组	36.75 ± 0.39	36.57 ± 0.52	36.62 ± 0.41	36.78 ± 0.45	36.61 ± 0.36	36.50 ± 0.41
模型组	$38.16 \pm 0.30^*$	$38.46 \pm 0.35^*$	$38.00 \pm 0.36^*$	$37.59 \pm 0.27^*$	$37.34 \pm 0.23^*$	$37.17 \pm 0.41^*$

与同时对照组比较, * $P < 0.01$

表 3 各组大鼠体重的动态变化 ($\bar{x} \pm s, \text{g}$)

组别	1h	1 天	2 天	3 天	4 天	5 天
对照组	151.3 ± 5.4	152.5 ± 5.8	155.3 ± 4.8	156.6 ± 4.9	158.3 ± 4.5	160.3 ± 4.7
模型组	150.9 ± 5.7	$146.1 \pm 6.2^{**}$	$141.1 \pm 4.9^{***}$	$139.9.0 \pm 4.9^{***}$	$141.5 \pm 5.6^{***}$	$143.9 \pm 5.6^{***}$

与同时对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与本组 1h 比较, # $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

5. 大鼠白细胞的变化:感染后 1h 及 5 天后,模型组大鼠白细胞计数明显升高,与对照组相比具有明显统计学差异 ($P < 0.01$);模型组大鼠感染 5 天后白细胞计数与感染 1h 后相比有所降低,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$),结果见表 4。

表 4 各组大鼠白细胞计数的变化 ($\bar{x} \pm s, 10^9/\text{L}$)

组别	1h	5 天
对照组	13.49 ± 1.03	12.56 ± 1.21
模型组	$54.46 \pm 5.88^*$	$28.90 \pm 4.84^{*#}$

与同时对照组比较, * $P < 0.01$; 与本组 1h 比较, # $P < 0.01$

6. 病理变化:肉眼观察,模型组可见脓肿,器官炎性浸润、充血出血、肿胀明显,具体为:肺脏肿胀充血,多数可见大片鲜红色出斑灶;肝大、质硬,颜色不均,

2. 大鼠一般情况的变化:模型组大鼠感染 1h 后血培养结果全部阳性,经鉴定为 ESBLs 阳性的大肠杆菌。感染后均出现不同程度的感染症状,蜷缩少动、毛色晦暗杂乱、呼吸急促、进食减少、饮水增多、球结膜充血水肿多、口唇四肢发绀、四肢湿冷、大便质稀(多数呈黏液脓血便),感染 5h 后出现死亡,先后有 9 只大鼠死亡。

3. 大鼠体温的变化:每日定时测量肛温,感染后模型组大鼠体温明显升高,于感染后 1 天体温达到最高,存活大鼠于感染后 2 天体温开始逐渐下降,仍高于正常体温 ($P < 0.01$),结果见表 2。

4. 大鼠体重的变化:感染 1h 后两组大鼠体重无明显差异 ($P > 0.05$);感染 1 天后,模型组大鼠体重逐渐下降,与同时对照组及本组感染 1h 后比较,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),感染 4 天后,存活大鼠体重略有回升,仍低于同时对照组及本组感染 1h 后 ($P < 0.01$),结果见表 3。

多数可见暗红色坏死区;脾色暗红,脾大;肾脏颜色深红,包膜完整,少数可见出血点,此外腹腔可见血性积液,多数盲肠可见圆片状充血灶,并可见脓点。光镜下,模型组各脏器出现细胞炎症增生、细胞水肿、淤血、细胞变性坏死等病理变化,具体结果见图 1。

讨 论

目前产 ESBLs 大肠杆菌已分布全球各个角落,流行呈增长趋势,导致对 β -内酰胺类抗生素耐药的大肠杆菌遍及全世界。此种细菌引起的感染,青霉素类、头孢菌素类及氨基糖苷类、喹诺酮类和磺胺类抗菌药物的耐药基因,形成多重耐药菌株,给临床选药带来很大压力,如果控制不当,容易导致院内感染的暴发^[3]。因此,建立具有人类受体特征

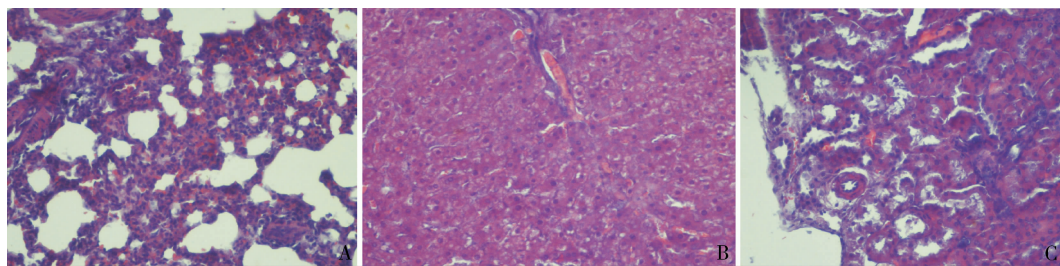


图 1 模型组的病理变化(HE, ×200)

A. 肺; B. 肝; C. 肾

动物模型对于研究耐药菌感染的发病机制及治疗药物筛选、观察药物疗效等具有重要的意义。

动物模型的建立一方面要有良好的稳定性、可重复性,最重要的是要能很好地模拟临床病理过程。目前感染动物模型主要包括全身感染动物模型及局部感染动物模型。而全身感染动物模型主要为败血症模型包括以下两类:①直接静脉或腹腔注射活体病原菌^[4];②破坏动物自身的保护机制,让细菌等肠内容物外漏、移位,例如 Huber - Lang 等^[5]建立的盲肠结扎穿孔模型。其中第 2 类主要重现了败血症的血流动力学和代谢分期,用于研究败血症的病理生理过程;而第 1 类主要用于揭露宿主对病原体反应的机制^[6]。其中小鼠腹腔感染模型主要应用于细菌感染的保护实验,其检测指标单一,不能全面反应药物作用,具有一定的局限性。与其相比静脉注射菌液的造模方法可以使菌悬液经血液直接进入循环系统,感染途径更为直接,由菌血症引发败血症,病情进展较为迅速,可以在短时间内得到组织器官病理变化等数据。其关键在于细菌接种量的确定,与细菌的品种、毒力、以及机体的免疫力、环境因素等密切相关。其中,细菌品种是重要影响因素^[7]。例如,刘滔滔等^[8]以尾静脉注射法建立金黄色葡萄球菌感染大鼠败血症模型,其选用浓度为 1×10^6 CFU/ml;而曹丽君等^[9]以静脉注射大肠杆菌建立败血症模型,其选用浓度为 $(0.3 \sim 0.6) \times 10^9$ CFU/ml。故本实验以 Bliss 法计算产 ESBLs 大肠杆菌感染 SD 大鼠半数致死浓度及其 95% 可信区间,确定了产 ESBLs 大肠杆菌感染 SD 大鼠的接种量,探讨了尾静脉注射菌液造模的可行性,建立更为全面的细菌感染动物模型。

实验结果显示:以半数致死量感染的模型组大鼠均出现不同程度的感染症状,血培养阳性,体温升高、体重下降、白细胞升高;感染大鼠解剖后可见重要脏器脓肿,器官炎性浸润、充血出血、肿胀明显,病理切片显示模型组肺、肝、肾等重要脏器均出现炎症、细胞水肿和淤血等病理变化。以上各检测项目均说明本次造模实验成功。由上述实验可见,尾静脉注射菌液建立细菌感染大鼠模型的方案简便、易行,可靠性强,感染成功率高,为深入研究耐药菌的耐药机制和抗耐药菌药物的防护方案做出了有益的探索。

参考文献

- 汪复,朱德妹,胡付品,等. 2009 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2010,10(5):325-334
- 黎七雄,汪晖,肖清秋,等. 半数致死量 Bliss 法的评价及计算[J]. 数理医药学杂志,1995,8(4):318-320
- 段建春,吕晓菊,赵燕,等. 产 ESBLs 肠杆菌科细菌对氨基糖苷类抗生素耐药机制研究[J]. 中国抗生素杂志,2005,30(9):555-558
- 王立燕,徐若男,韩根成,等. 实验性败血症小鼠模型的建立及评价[J]. 中国实验血液学杂志,2010,18(3):766-769
- Huber - Lang M, Sarma VJ, Lu KT, et al. Role of C5a in multiorgan failure during sepsis[J]. J Immunol, 2001, 166(2): 1193-1199
- 蔡金莲. 败血症的研究进展[J]. 中山大学研究生学刊,2008,29(3):1-6
- 高晓刚,陈德昌. 动物模型在脓毒症研究中的意义[J]. 中国急救医学,2006,26(10):685-686
- 刘滔滔,梁宁生,李艳,等. 大鼠细菌感染模型血中磷脂酶 A2 变化的研究[J]. 中华医院感染学杂志,2003,13(1):10-12
- 曹丽君,栗建辉,杜风琴,等. E. Coli 致实验兔血感染的建立及其肝胆超声与病理变化的研究[J]. 河北职工医学院学报,2007,24(1):10-11

(收稿:2011-11-07)

(修回:2011-11-28)