Veterinary Microbiology 136 (2009) 403–407

Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetmic

环境改良产品（普境安）的体外有效性评价：用两种不同的方法检测其对胞内劳森氏菌的功效

Suphot Wattanaphansak [a], Randall S. Singer [a], Richard E. Isaacson [a], John Deen [b], Bradley R. Gramm [c], Connie J. Gebhart [a,*]

[a] 明尼苏达大学兽医医学学院，兽医与生物医药科学专业，圣保罗，明尼苏达 555108，美国

[b] 明尼苏达大学兽医医学学院，兽医人口医学专业，圣保罗，明尼苏达 555108，美国

[c] Phibro 动物健康，布卢明顿，伊利诺伊 61704，美国

文章信息

文章历史：
于 2008 年 8 月 30 日收到
从 2008 年 12 月 1 日收到修订版
于 2008 年 12 月 2 日接受

关键词：
增生性肠病
胞内劳森氏菌
环境改良产品功效

摘要

本研究的目的是确定一种化学和重金属混合的消毒剂（普境安）的体外药效，用改良的组织培养和直接计数法对两个胞内劳森氏菌菌株进行试验。作为一种粉末，1g、0.5g 或 0.25 g 的普境安被应用于细菌溶液扩散到无菌培养皿中。作为一种水溶液，普境安的浓度为 1%、4%、8%、16%和 32%。在这两种应用中，胞内劳森氏菌均暴露于普境安，分别为

* 对应作者：兽医医学学院，兽医与生物医药科学专业，205 兽医科学大楼，1971 联邦大街，圣保罗，明尼苏达 55108，美国。电话：+1 612 624 3444；传真：+1 612 625 5203。
邮箱：gebha001@umn.edu (C.J. Gebhart)

0378-1135/$——查看前页©2008 Elsevier B.V. 版权所有

doi:10.1016/j.vetmic.2008.12.002
0.5 小时、1 小时、2 小时和 4 小时。结果表明，两种菌株对普境安的敏感性相似。经改良后的组织培养实验表明，在对所有浓度的普境安粉末进行了 0.5 小时的照射后，细胞培养基中没有检测到胞内劳森氏菌。此外，在 4%的水溶液浓度中，可存活细菌的数量明显减少，而在暴露 0.5 小时后 8%的浓度下没有检测到胞内劳森氏菌。使用直接计数法检测暴露 0.5 小时后，活菌的数量不到 1%。在暴露于水的形式后，16%的浓度杀灭的存活细菌的数量比对照组多了 99%。我们的结果表明，在暴露 30 分钟后，普境安在粉状和悬浮液中都可以灭活超过 99%的胞内劳森氏菌。此外，两种试验方法均可用于检测环境改良产品对胞内劳森氏菌生存能力的影响。

©2008 Elsevier B.V. 版权所有

1. 简介

关于环境改良产品对胞内劳森氏菌的有效性的数据有限，这是一种革兰氏阴性的细胞内细菌，导致增殖性肠病（PE）（Lawson 和 Gebhart，2000）。这主要是由于很难找到有效的方法来检测环境改良产品对强制性细胞内细菌的功效。一项研究使用常规的组织培养方法来检测，暴露于一些环境改良产品后胞内劳森氏菌的生存状态（Collins 等人，2000）。这种方法既耗时又无法区分可存活的或不可存活的细菌比例。近年来，在 96 孔组织培养板中培养细菌的非碘化组织培养方法已被开发用于血清学诊断（Guedes 等人，2002）和对胞内劳森氏菌的体外抗菌活性的检测（Wattanaphansak 等人，2009）。这种方法允许在同一时间对大量化合物进行检测。另外，在混合细菌种群中胞内劳森氏菌的生存能力可以用直接计数法和特异性荧光染色法直接检测（Wattanaphansak 等人，2005）。这两项研究都表明，可以用细菌生存能力作为指标来评估环境改良产品对胞内劳森氏菌的有效性。

普境安（Stormollen，Tureby，Storstrom，丹麦），干粉质地的环境改良产品主要由磷酸化合物（85%）、硫酸铜（2.5%）、硫酸亚铁（2.1%）、活性氯（0.25%）、perica 油（0.05%））和硅酸铝（10.1%）组成，用于养殖场来减少环境中微生物的数量，吸收水份，减少氨的产生。目前还没有胞内劳森氏菌对普境安的敏感性的报告。因此，本研究的目的是评估用改良的组织培养法和直接计数法检测环境改良产品对胞内劳森氏菌的功效，并使用两种方法确定普境安对胞内劳森氏菌的杀菌活性。

2. 原料与方法

2.1. 微生物菌株与试剂

在 1991 年和 2000 年分别从美国被增生性出血性肠病感染的猪只中分离出来的胞内劳森氏菌 VPB4 和 PHE / MN-01（Guedes 和 Gebhart,，2003a），使用于整个研究，并单独配备和检测了两次。两次都如前所述生长、保留和收获了（Guedes 和 Gebhart，2003b；Wattanaphansak 等人，2005)。胞内劳森氏菌的最终浓度如前所述，用直接计数染色程序确定的（Guedes 和 Gebhart，2003b）。

2.2. 环境改良产品和检测过程

用于检测的普境安制剂为两种形式的，一种为干粉质地、一种是水溶液。作为干粉质地，普境安在三种最终浓度下进行了检测，分别是 2X、1X 和 0.5X 的推荐剂量（X=标签上的推荐剂量）。将 300μL 大约含有 10^8 /mL 胞内劳森氏菌的细菌溶液添加到 10cm×10cm 的方形无菌培养皿中。然后将 1g、0.5 g 或 0.25 g 的普境安干粉均匀涂抹在培养皿的整个表面上。这些产生的最终浓度分别为 100g/ m^2、50g/m^2、25g/m^2。

作为水溶液，普境安在细胞培养基（DMEM）中的最终浓度分别为 1%、4%、8%、16%和 32%。混合悬浊液，将每一种浓度的 8mL 等分两份，每一份加入 300μL 10^8 /mL 的胞内劳森氏菌。

在两种试验中，胞内劳森氏菌均在室温下暴露于普境安 0.5 小时、1 小时、2 小时、4 小时。每一个时间点的对照组是 DMEM 中活的胞内劳森氏菌而不暴露于普境安，和灭活的胞内劳森氏菌暴露于异丙醇 30 分钟。培养后，培养皿中的粉末用 8mL DMEM 洗净，悬浊液立即转移至 15mL 的试管。在两个试验中，从粉末中分离细菌是用悬架通过 5μm 过滤器进入微型离心机试管，并以 10000 rpm 的速度离心 3 分钟。颗粒用无菌蒸馏水洗两次，用直接计数法将其中一半再次与 2mL 无菌蒸馏水一起制成悬浊液。在改良组织培养法中，将另外一半再次与 2mL 胞内劳森氏菌培养液起制成悬浊液，用于感染 1 天大的 McCoy 细胞。

2.3. 细菌生存分析

使用直接计数和改良的组织培养方法评估在暴露于环境改良产品后存活的胞内劳森氏菌的百分比。如前面研究所述，直接计数法是使用 Live/Dead® BacLight™ 染色法进行的（Wattanaphansak 等人，2005）。在本研究中，只计算染色于 SYTO-9 的活菌的绿色荧光细胞。按照先前的描述，以改良的组织培养方法确定胞内劳森氏菌的生存能力（Wattanaphansak 等人，2009）。普境安的有效性是通过评估严重感染的细胞数量（HICs）来决定的，这些细胞被定义为在接触普境安后受活的胞内劳森氏菌感染的细胞的相对数量。这些数字被用作活体胞内劳森氏菌的指示器。

2.4. 扫描电子显微镜（SEM）

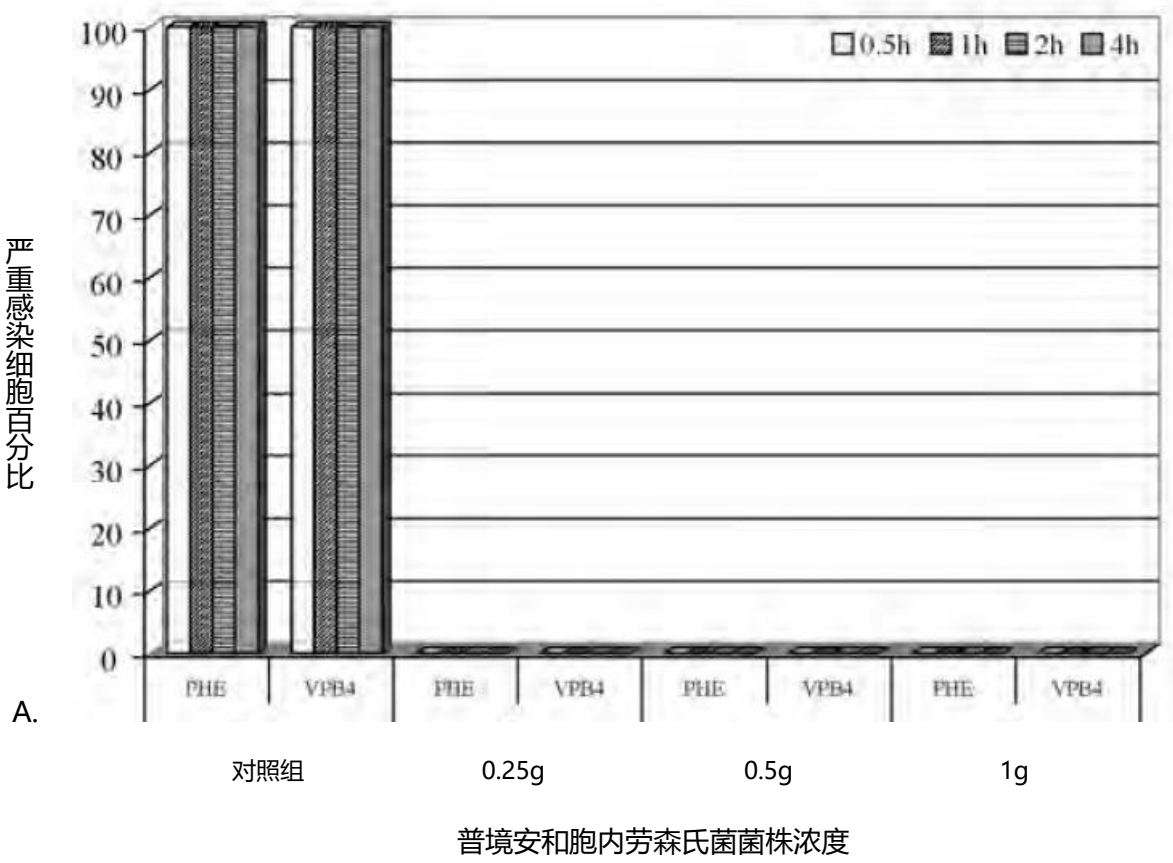
在 SEM 观察下，胞内劳森氏菌暴露于 0.5g 普境安粉末和 16%普境安悬浊液 30 分钟。然后，通过一个 5mm 的过滤器过滤细菌，用磷酸盐缓液（PBS）清洗两次。在室温下，样品在 PBS 中以 2.5%的戊二醛固定 1 小时。用 PBS 冲洗三次后，细菌细胞在 PBS 中以 1%

的四氧化锇固定，并再用 PBS 清洗三次。随着乙醇浓度的增加（25%、50%、75%、95%、100%），细菌细胞脱水，并在 Balzer Critical Point Dryer 010®中干燥。固定细菌表面镀上一层金钯薄膜，并使用 VPSEM-Hitachi S-3500N 扫描电子显微镜进行观察。

2.5. 数据分析

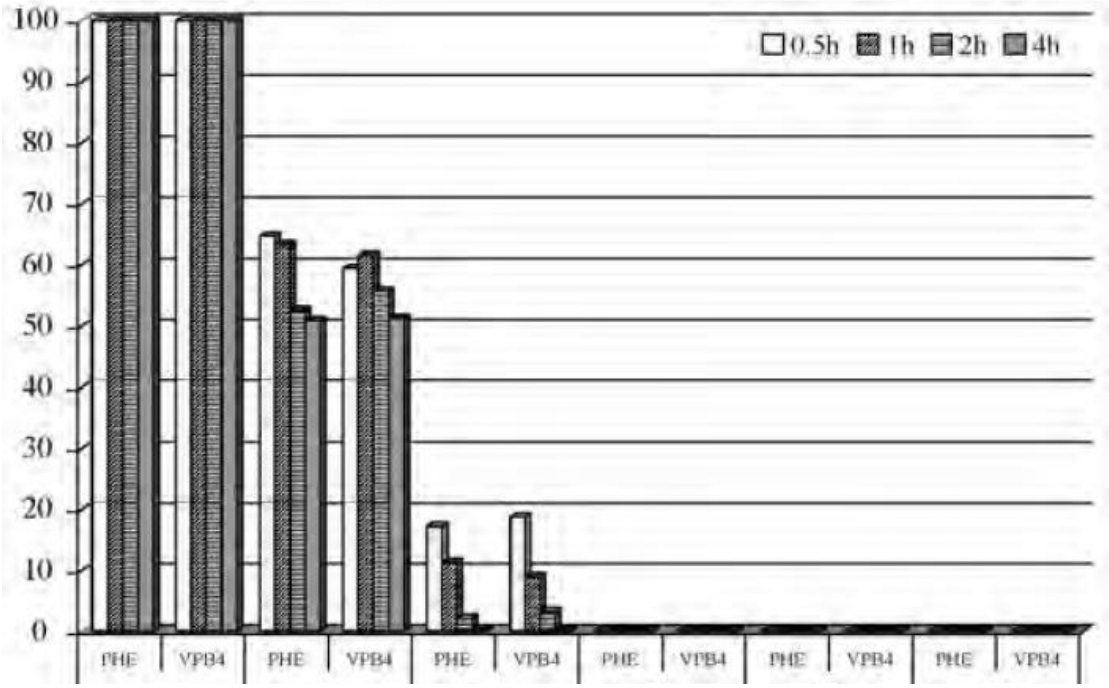
与对照组相比，在每个普境安试验组中 HIC 和绿色荧光细菌的数量均以百分比表示。通过使用 MedCalc® 9.1.0.1 软件对改良组织培养与直接计数方法的相关性进行了估算。

3. 结果



A.

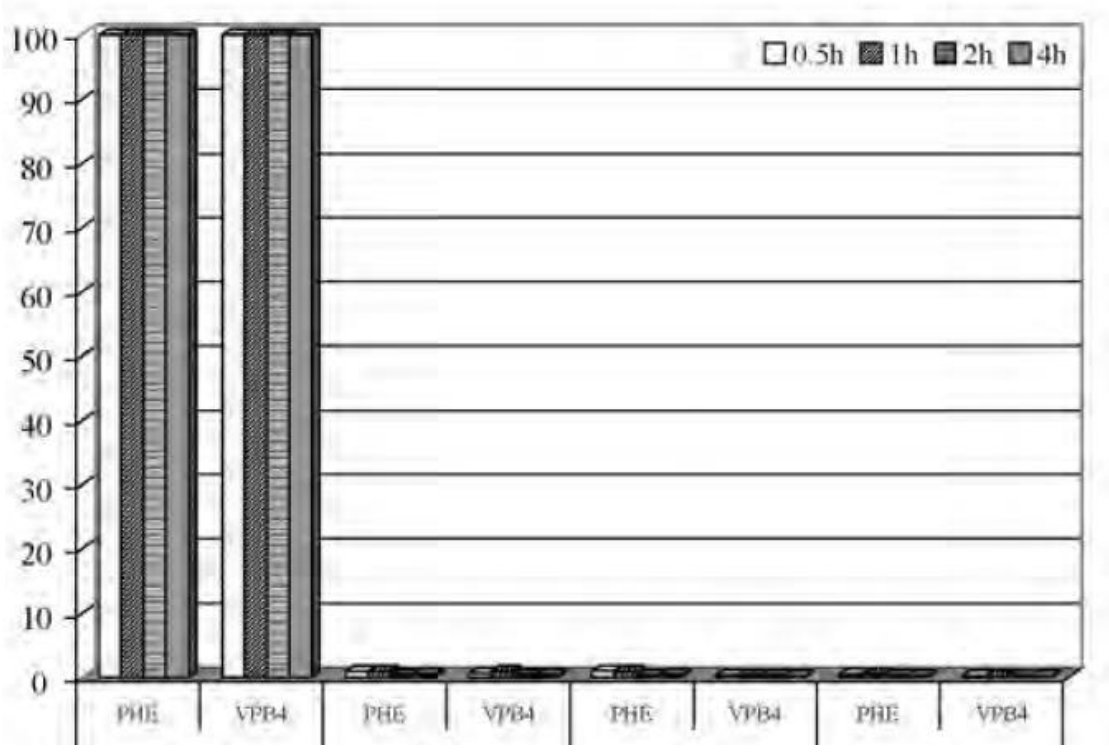
B.



对照组 1% 4% 8% 16% 32%

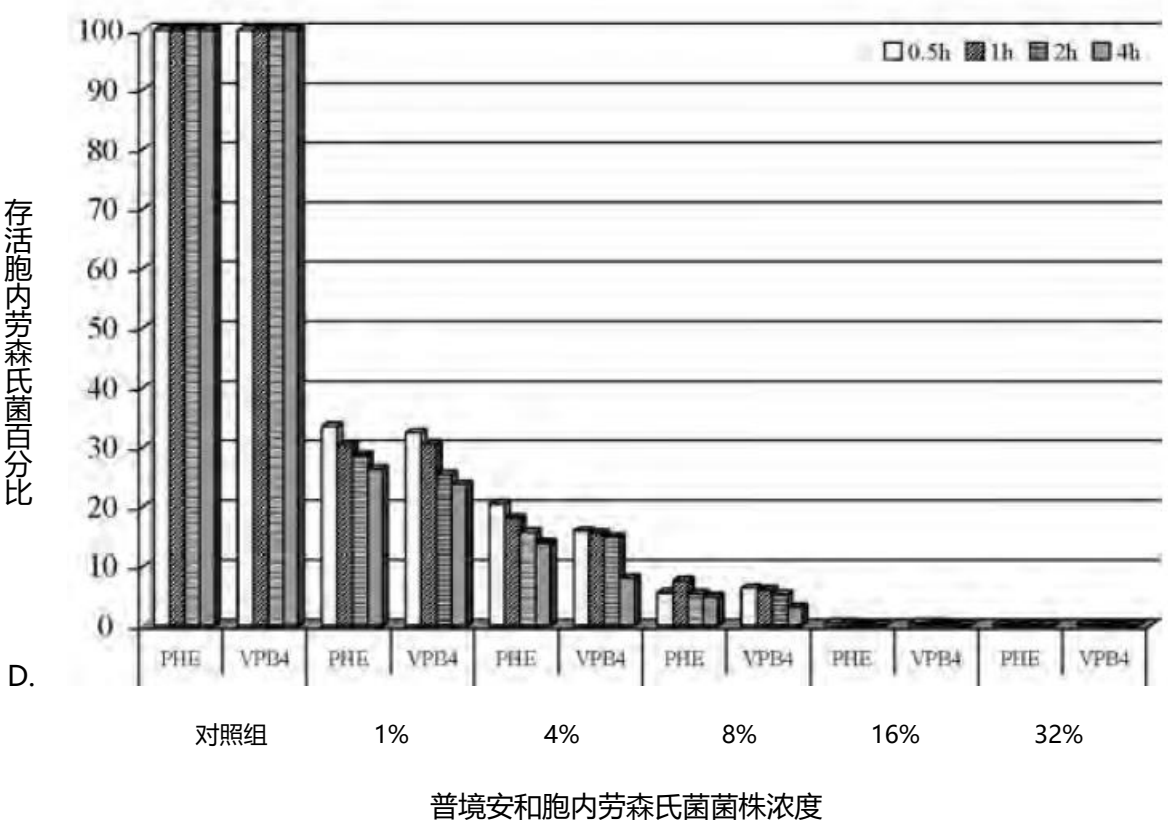
普境安和胞内劳森氏菌菌株浓度

C.



对照组 0.25g 0.5g 1g

普境安和胞内劳森氏菌菌株浓度



D.

图 1. 以改良的组织培养方法检测普境安作为干粉质地（A）和作为水溶液（B）对抑制胞内劳森氏菌的功效。以直接计数法检测普境安作为干粉质地（C）和作为水溶液（D）对抑制胞内劳森氏菌的功效。

结果（图 1 和图 2）表明，两株胞内劳森氏菌敏感性相似，不论是普境安干粉还是水溶液。改良的组织培养方法用于确定存活的数量，并且大多数活的对照孔内的 McCoy 细胞严重感染胞内劳森氏菌，这表明胞内劳森氏菌感染的比例接近 100%。相反，在暴露于 0.25g/cm^2、0.5g/cm^2、1g/cm^2 普境安 30 分钟后，没有检测到 HICs，这表明与存活的对照组相比 100%失活（图 1 A 和 2 B）。

当检测普境安水溶液时，HICs 的数量随着普境安浓度和暴露时间的增加而减少。在暴露于 1%浓度的普境安后，胞内劳森氏菌的存活率下降到约 65%。存活胞内劳森氏菌数量在 4%浓度的水溶液中明显减少，组织培养基中≥8%浓度 30 分钟后没有检测到胞内劳森氏菌 （图 1 B）。在这种情况下，干粉和水溶液形式的普境安均对胞内劳森氏菌有杀灭作用。

当使用直接计数法确定胞内劳森氏菌生存能力时，大约 95%的活的对照组细菌表现为 SYTO-9 的绿色荧光，表明存活的细菌具有完整的细胞膜。相反，一小部分混合细菌碘化丙啶红色荧光，表明死亡细菌细胞膜受损（图 2）。接触普境安粉末 30 分钟后，在所有检测的普境安粉末浓度中，存活细菌的数量逐渐下降到少于 1% （图 1 C）。相反地，观察到更多红色荧光细菌，这表明接触普境安后细菌结构可能会损坏或溶解。

当胞内劳森氏菌暴露于普境安水溶液时结果相似。胞内劳森氏菌的存活数量随着普境安水溶液浓度的升高而减少。在暴露于 1%普境安水溶液 30 分钟后，存活细菌的数量约为 30%，并且当浓度≥16%时，存活细菌的数量少于 1%，与对照组相比， 杀灭 99%以上的胞内劳森氏菌（图 1 D）。

在本研究中，从改良的组织培养方法得到的结果与直接计数法得到的结果相似。两种方法都有显著的正相关（r=0.76，p=0.001），表明两种方法都有很好的一致性。

图 2 C 显示了在暴露于普境安 30 分钟后，胞内劳森氏菌的形态表现。电子显微镜显示了在未处理的胞内劳森氏菌细胞中存在鞭毛成分，而细菌细胞壁似乎浑浊且完整。在暴露于 0.5g 普境安干粉 30 分钟后，细菌细胞壁变得更加透明，这说明细胞壁受损。暴露于 4%和 16%的普境安水溶液中发现了类似的细菌（图片未显示）。

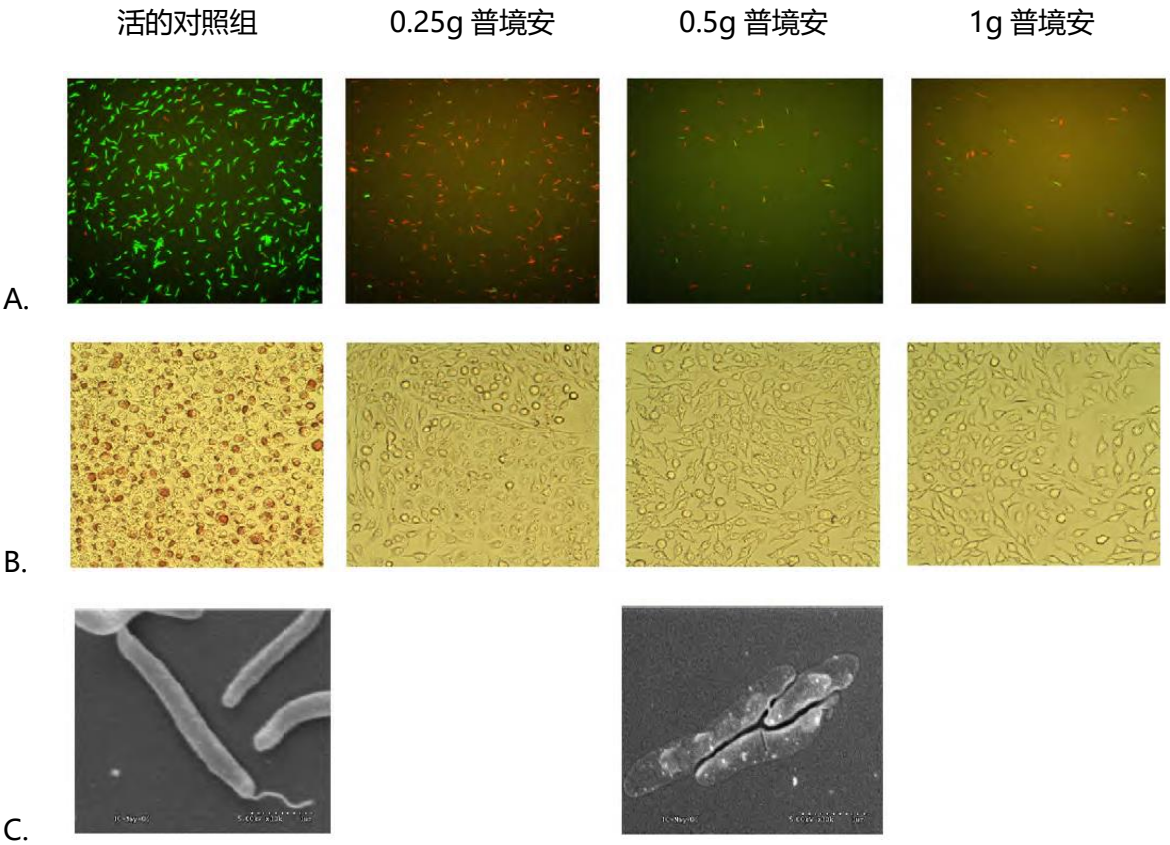


图 2　胞内劳森氏菌暴露于 0.25g、0.5g、1g 普境安粉末半小时。用直接计数法（A）和改良组织培养法(（A）对胞内劳森氏菌细胞的生存能力进行了检测。正常胞内劳森氏菌和暴露于 0.5 g 普境安后的扫描电子显微图（C）。

4.　讨论

在猪场设施中使用环境改良产品是抑制病毒、细菌和寄生虫感染的第一道防线。然而，环境改良产品对胞内劳森氏菌的功效是很难体外检测的。与其他细菌不同，胞内劳森氏菌是一种仅在肠细胞内繁殖的有机体。无细胞培养方法暂时没有成功建立，因此没有标准的

体外培养方法来评估环境改良产品抑制胞内劳森氏菌的功效。在本研究中，我们比较了两种系统，改良的组织培养法和直接计数法，用于评估普境安在杀灭胞内劳森氏菌的功效。

两种方法的结果表明，普境安粉末或水溶液形式均可使胞内劳森氏菌失活。胞内劳森氏菌的减少取决于剂量和暴露于普境安的时间。根据生产商，这种干粉物质是直接应用于圈舍地面上，浓度为 50g /m^2，这等于这项研究中的 0.5g/cm^2，能够减少环境中存活病菌微生物的数量。根据组织培养和直接计数法分析，暴露 30 分钟后，这种浓度可以杀死 100%或 > 99%的胞内劳森氏菌。虽然普境安的作用模式尚不完全清楚，但已经表明，当这些生物体暴露于普境安时，致病细菌和病毒的存活能力显著降低（Methling 等人，1997）。

暴露于普境安粉末和水溶液两种形式后，在直接计数法中发现了一些存活的胞内劳森氏菌（<1%），而在用改良的组织培养法测量时，没有发现任何存活的细菌。在这种情况下，直接计数法中绿色标记的胞内劳森氏菌（相信是存活的）可能是存活但不可培养的状态。这种状态下，细菌通常在良好的条件下能存活并能恢复，但标准培养方法不能检测细菌。关于许多革兰氏阴性细菌能存活但不能培养已被研究报道（Xu 等人，1982；Roszak 等人，1984；Gupte 等人，2003；Tholozan 等人，1999）。然而却没有关于能存活但不能培养的胞内劳森氏菌的研究报道。此外，Millard 和 Roth（1997）发现极少或部分膜损伤的死亡细菌中，碘化丙啶显示在细菌细胞质中有限渗透和积累。因此，绿色荧光细菌是膜损伤最小化的死亡的胞内劳森氏菌，导致 SYTO-9 比碘化丙啶积累更多，这似乎是可信的。显然，暴露于两种形式的普境安后，细菌的浓度显著下降。虽然普境安的作用机制仍不清楚，可能是普境安破坏了细菌的细胞膜。使用 SEM 观察到胞内劳森氏菌的细胞膜异常，处理后的细菌膜的某些部分是明显和透明的。

5. 结论

综上所述，我们证明了在暴露于环境改良产品粉末后，改良的组织培养和直接计数方法对胞内劳森氏菌生存能力的检测结果类似。我们的研究结果表明，暴露于普境安在浓度为 0.25g/cm^2 粉末和浓度为 16%的水溶液 30 分钟后，超过 99%的胞内劳森氏菌菌株失活。

致谢

这项研究部分得到了来自动物健康 Phibro 的部分资助。作者要感谢 Benjawan Wijarn 和 Molly Freese 提供了出色的技术支持。

参考文献

Collins, A.M., Love, R.J., Pozo, J., Smith, S.H., McOrist, S., 2000. Studies on the ex vivo survival of Lawsonia intracellularis. Swine Health Prod. 8,211–215.

Guedes, R.M.C., Gebhart, C.J., Deen, J., Winkelman, N.L., 2002. Validation of an immunoperoxidase monolayer assay as a serologic test for porcine proliferative enteropathy. J. Vet. Diag. Invest. 14,528-530.

Guedes, R.M.C., Gebhart, C.J., 2003a. Preparation and characterization of polyclonal and monoclonal antibodies against Lawsonia intracellularis. J. Vet. Diag. Invest. 15,438–446.

Guedes, R.M.C., Gebhart, C.J., 2003b. On set and duration of fecal shedding,cell-mediated and humoral immunere sponses in pigs after challenge with a pathogenic isolate or attenuated vaccine strain o fLawsonia intracellularis. Vet. Microbiol. 91,135–145.

Gupte, A.R., DeRezende, C.L., Joseph, S.W., 2003. Induction and resuscitation of viable but nonculturable Salmonella enteric serovar typhimurium DT104. Appl. Environ. Microbiol. 69,6669–6675.

Lawson, G.H.K., Gebhart, C.J., 2000. Proliferative enteropathy. J. Comp. Pathol. 122,77–100.

Methling, W., Dibbert, R., Heinrich, H.W., 1997. Stalosan F-not a chemical disinfectant, but a very good hygiene substance. In: Proceedings of 9th International Congressin Animal Hygiene, Finland, p.387.

Millard, P., Roth, B., 1997. Fluorescence-based methods for microbial characterization and viability assessment. Biotechnol. Int. 1,291–296.

Roszak, D.B., Grimes, D.J., Colwell, R.R., 1984. Viable but nonrecoverable stage of Salmonella enteritidis in aquatic systems. Can. J. Microbiol. 30,334–338.

Tholozan, J.L., Cappelier, J.M., Tissier, J.P., Delattre, G., Federighi, M., 1999. Physiological characterization of viable-but-nonculturable Campylobacter jejuni cells. Appl. Environ. Microbiol. 65,1110–1116.

Wattanaphansak, S., Gebhart, C.J., Olin, M., Deen, J., 2005. Measurement of the viability of Lawsonia intracellularis. Can. J. Vet. Res. 69,265–271.

Wattanaphansak, S., Singer, R.S., Gebhart, C.J., 2009. Invitro antimicrobial activity against 10 North American and European Lawsonia intracellularis isolates. Vet. Microbiol. 134,305–310.

Xu, H.S., Roberts, N., Singleton, F.L., Attwell, R.W., Grimes, D.J., Colwell, R.R., 1982. Survival and viability of nonculturable Escherichia coli and Vibrio cholera in the estuarine and marine environment. Microb. Ecol. 8,313–323.