

临床嗜水气单胞菌耐药性及 Aer 气胞溶素基因研究*

侯 沪, 李爱敏, 唐曙明 (深圳市人民医院龙华分院, 广东深圳 518000)

摘要:目的 研究嗜水气单胞菌临床感染现状及其主要致病因子 Aer 气胞溶素基因的存在形式。方法 收集深圳市人民医院龙华分院 2012 年~2013 年间临床分离到的嗜水气单胞菌, VITEK 2 compact 对其进行鉴定与抗生素药物敏感性试验。数据录入 WHONET5.6 软件进行临床分布与耐药率分析。提取染色体与质粒基因组, 采用聚合酶链反应(PCR)法检测毒力基因 Aer 气胞溶素的存在形式。结果 临床共分离到 48 株嗜水气单胞菌, 分布于临床标本痰液 16 株、血液 11 株、分泌物 10 株、尿液 7 株与粪便 4 株。病区分布分散化, 无集中趋势。耐药率显示对氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦与头孢唑啉耐药率达 80% 以上, 而对阿米卡星、头孢吡肟、左旋氧氟沙星、哌拉西林/他唑巴坦与亚胺培南处于 10% 以下的低水平。43.7% 菌株携带 Aer 基因, 位于染色体基因组。结论 嗜水气单胞菌临床感染散发, 多数染色体基因组携带毒力因子 Aer 气胞溶素基因。对青霉素类, 一代头孢类耐药严重, 对广谱类药物保持敏感性。嗜水气单胞菌作为地区性重要条件致病菌, 防范其耐药菌株扩散具有一定意义。

关键词:嗜水气单胞菌; 耐药性; 气胞溶素基因 Aer

中图分类号: R378.99; Q781 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2015)02-049-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2015.02.015

Research on Clinical Resistance and Aerolysin Genes of *Aeromonas Hydrophila*

HOU HU, LI Ai-min, TANG Shu-ming

(People's Hospital of Shenzhen Longhua Branch, Guangdong Shenzhen 518000, China)

Abstract: **Objective** To study *Aeromonas hydrophila* infection and the clinical status of the major causative factor Aerolysin gene. **Methods** Clinical isolates of *Aeromonas hydrophila* was collected from 2012 to 2013 year in People's Hospital of Shenzhen Longhua Branch. Its identification and antibiotic susceptibility testing was analyzed by VITEK 2 compact. Clinical resistance rates and distribution was analyzed by WHONET5.6 software. Polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the Aerolysin gene form in chromosomes and plasmids extracted genome. **Results** The clinical total of 48 isolated *Aeromonas hydrophila*, distributed in 16 clinical samples of sputum, blood 11, 10 secretions, urine 7 and stool 4. Distribution in ward decentralized, the central tendency was not detected. Drug resistance rates to ampicillin, ampicillin/sulbactam and ceftazolin reached more than 80%, while amikacin, cefepime, levofloxacin, piperacillin/tazobactam and imipenem was low 10% or less. 43.7% strains carried the Aerolysin gene. 39.5% of Aerolysin gene was found on chromosome genome. **Conclusion** *Aeromonas hydrophila* clinical infection existed in dispersed form, most of which carried Aerolysin gene in chromosome genome. *Aeromonas hydrophila* had serious resistance to penicillins and first generation cephalosporin, but to broad-spectrum drugs maintaining high sensitivity. Precaution of *Aeromonas hydrophila*, as an important condition pathogenic bacteria, is some significant for preventing its proliferation of drug-resistant strains.

Keyword: *Aeromonas hydrophila*; drug resistance; aerolysin gene

嗜水气单胞菌作为气单胞菌属中最重要的一种, 可引起人类肠内、外感染, 尤其在夏季是腹泻感染的主要致病菌之一。肠内感染主要表现为腹泻、水样便, 严重者出现痢疾样脓血便。嗜水气单胞菌可以引起人类的肠外感染和肠内感染, 前者包括败血症、创伤、胆囊炎、眼、关节、肺部、腹腔内及全身性的感染等, 患者常有免疫功能低下; 后者主要表现为肠胃炎, 多发生于儿童、大于 60 岁的老人以及旅游者之间^[1,2]。本文着重研究本地区医院诊断为嗜水气单胞菌感染的病例, 分析其主要感染形式, 进一步研究其主要毒力基因 Aer 气胞溶素基因的

存在形式, 为嗜水气单胞菌流行病学提供数据, 为控制和预防嗜水气单胞菌感染提供临床参考。

1 材料与方法

1.1 研究对象 2012 年 1 月~2013 年 12 月本地区综合医院诊断为嗜水气单胞菌病例, 临床分离培养到菌株 48 例。培养基购于上海科玛嘉生物公司。35℃ 隔水式恒温培养箱进行培养。标本类型包括痰液、血液、分泌物、尿液与粪便等。所有菌株培养后保存于细菌冻存管, 置于一 80℃ 超低温冰箱保存备用。

1.2 仪器与试剂

* 作者简介: 侯 沪(1979-), 女, 本科, 主管技师, 研究方向: 临床微生物检验, E-mail: cd_wan@163.com。

1.2.1 主要仪器:法国梅里埃 VITEK 2 compact 细菌鉴定仪,PCR 扩增仪,上海精宏 35℃ 隔水式恒温培养箱,海尔-80℃ 超低温冰箱,紫外线凝胶成像系统和电泳仪为美国 Bio-rad 公司。

1.2.2 主要试剂:所有培养基来自上海科玛嘉微生物,基因组提取试剂盒、PCR 试剂盒购自大连宝生物公司,法国梅里埃微生物 GN 鉴定卡和 AST-GN13 药敏卡,扩增引物由上海生工生物公司合成。

1.3 实验方法

1.3.1 鉴定与药敏:所分离菌株培养后经法国梅里埃 VITEK 2 compact 细菌鉴定为嗜水气单胞菌并进行抗生素药物敏感试验。所用试剂均为法国梅里埃产品。铜绿假单胞菌 ATCC 27853 与大肠埃希菌 ATCC 25922 作为标准菌株。临床资料与药敏数据输入 WHONET 5.6 软件进行管理与分析。

1.3.2 DNA 提取:按照宝生物工程有限公司的 MiniBEST Bacterial Genomic DNA Extraction Kit Ver. 5.0 提取细菌染色体基因组 DNA。按照 TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver. 4.0 提取质粒基因组 DNA。操作步骤严格按照说明书进行。提取产物保存于-20℃ 冰箱备用。

1.3.3 基因扩增检测:引物设计参考文献[3],上游引物:5'-CAAGAACAAGTTCAAGTGGCCA-3';下游引物:5'-ACGAAGGTGTGGTTCCAGT-3'。建立 25 μ l 反应体系:10 \times buffer(含 Mg^{2+}) 2.5 μ l,dNTP(2.5 mmol/L)2.0 μ l,TaqDNA 聚合酶(10 U/ μ l)0.15 μ l,上、下游引物(10 μ mol/L)各 1.0 μ l,所提取的 DNA 模板 2.0 μ l,无菌双蒸水 16.4 μ l。循环参数预变性 95℃ 5 min,变性 95℃ 30s,退火 56℃ 30s,延伸 72℃ 30s,共 40 个循环。取 5 μ l 反应产物与 1 μ l 含溴酚蓝的 Loadingbuffer 混匀,于加入 1%(W/V) 含 EB 的琼脂糖凝胶上进行电泳,同时加入 100 bp 的 DNAmaker,170v 电压电泳 30 min,凝胶成像系统进行检测分析。

2 结果

2.1 菌株临床分布 48 株菌具体病区分布较分散,门诊、各外科、内科与重症监护室等都有分布,无集中暴发感染趋势。标本主要来自呼吸道感染 33.3%(16/48)、血液感染 22.9%(11/48)、伤口感染 20.8%(10/48)、泌尿道感染 14.6%(7/48)与肠道感染 8.3%(4/48)等。门诊病人的感染多为肠道感染与伤口感染。

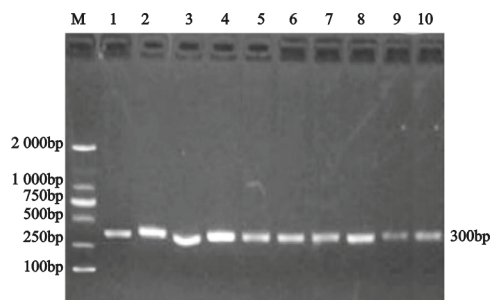
2.2 耐药率分析 WHONET5.6 统计软件分析抗生素耐药率结果见表 1。多数嗜水气单胞菌产 β -内酰胺酶,对氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦与头孢

唑啉耐药率达 80% 以上。但其所产的酶分解头孢类的能力较弱,对二代、三代头孢类抗生素耐药率只有 20% 左右。而对阿米卡星、头孢吡肟、左旋氧氟沙星、哌拉西林/他唑巴坦与亚胺培南耐药率均处于 10% 以下的低水平。

表 1 嗜水气单胞菌的耐药率分析

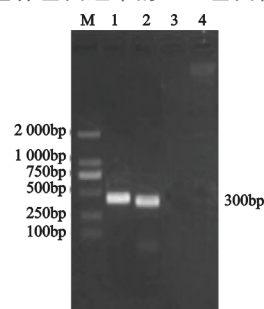
抗生素	耐药率(%)	抗生素	耐药率(%)
氨苄西林	93.5	头孢他啶	13.3
氨苄西林/舒巴坦	89.1	庆大霉素	13
头孢唑啉	82.2	阿米卡星	10.9
氨基曲南	25	头孢吡肟	8.7
头孢曲松	24.4	妥布霉素	8.7
头孢替坦	21.7	左旋氧氟沙星	6.5
复方新诺明	20	亚胺培南	4.4
环丙沙星	15.6	哌拉西林/他唑巴坦	2.2

2.3 Aer 基因检测 48 株菌株中有 19 株细菌染色体基因组中检测出 Aer 基因,其中仅有 2 株携带质粒基因组并从中检测出 Aer 基因。扩增出的片段长度大约 300 bp,见图 1,2。气胞溶素 Aer 基因主要位于嗜水气单胞菌染色体基因组,少数存在于质粒基因组。



(M:DNA marker;1~10:10 株代表菌株染色体基因组检测结果)

图 1 染色体基因组中的 Aer 基因检测电泳图



(M:DNA marker;1~2:两株质粒基因组检测结果;3~4:代表其它未检测出的菌株)

图 2 质粒基因组中的 Aer 基因检测电泳图

3 讨论 本地区嗜水气单胞菌在医院中呈分散分布趋势,尚不构成医院感染危险。感染部位多数为呼吸道、血液和伤口。患者中有一些患有基础疾病如慢性肝炎、肝硬化、冠心病、肿瘤等,会增加其感染嗜水气单胞菌的风险,特别是从事水产业人

员^[4]。腹泻是嗜水气单胞菌感染最常见的临床表现,儿童和旅游者是易感人群,嗜水气单胞菌检出率可达8%,占肠道致病菌35%。能引起水源性、食源性传播疾病,可作为水源食源污染细菌学指标。国外已将本菌纳入腹泻病原菌的检测范围,是食品卫生安全检验对象^[5]。其次,嗜水气单胞菌能引起皮肤伤口和软组织感染,常发生于烧伤、创伤部位。引起的败血症常见于肝炎、恶性肿瘤患者。还可引起呼吸道感染、腹膜炎、脑膜炎、骨髓炎及泌尿道感染等,均有引起死亡的报道^[6]。

本研究中嗜水气单胞菌多数能产 β -内酰胺酶,但其水解能力较弱,表现为对青霉素、氨苄西林、替卡西林、头孢唑啉等抗生素有着较高的耐药性,对单环类(氨基糖苷)、头霉素类(头孢替坦)、头孢菌素三代(头孢曲松、头孢他啶)及头孢菌素四代(头孢吡肟)抗生素的敏感率均保持在70%以上。碳青霉烯类(亚胺培南)和氨基糖苷类(庆大霉素、阿米卡星)对嗜水气单胞菌的敏感率达95%以上。对于临床上最常作为治疗腹泻的经验性用喹诺酮类药物(左旋氧氟沙星、环丙沙星)和磺胺类药物(复方新诺明),只有6.5%~20%的菌株出现了耐药现象。统计结果中没有100%敏感的抗生素,即使亚胺培南也有存在4.4%的耐药率。嗜水气单胞菌本身可存在诱导耐药机制或获得性耐药机制。广谱抗生素诱导其产生耐药性,与医疗环境中其它种类耐药性菌株接触也可能接受耐药基因质粒、整合子或遗传物质等,从而造成获得性耐药现象。

嗜水气单胞菌所产生的外毒素是主要的致病因子。目前国际上公认其所产外毒素名称为气胞溶素(即Aer毒素)^[7]。Aer毒素是单个分子的多肽,具有溶血性、肠毒素毒性和细胞毒性。Aer毒素的肠毒性机制与霍乱毒素相似,Aer毒素结合到肠上皮细胞膜上的腺苷酸环化酶,导致细胞内ATP转化为鉴于Aer毒素对嗜水气单胞菌的致病性起重要作用^[8]。因而检测Aer毒素在嗜水气单胞菌感染的快速诊断、流行病学调查及公共卫生检测、检疫等方面具有重要意义。Aer基因存在多态性,其具体定位一直存在争议^[9,10]。本研究中48菌株有19株染色体基因组中检测出Aer基因,检出率39.5%。另2株质粒基因组中发现有Aer基因,检出率4.2%。说明本地区嗜水气单胞菌Aer基因主要存在于染色体基因组,少量可能存在于质粒基因组中。但染色体与质粒中的Aer基因是否同源,其它未检测到基因是否存在突变型或携带其它致病性毒力基因仍需要进一步研究。

参考文献:

[1] 葛楠楠,白永凤,陈晓,等.腹泻患者粪便来源的气

单胞菌分布与耐药性[J].中国老年学杂志,2013,33(21):5228-5230.

Ge QQ, Bai YF, Chen X, et al. *Aeromonas* distribution and drug resistance of patients with diarrhea faecal sources[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2013, 33(21):5228-5230.

[2] 费怡,孙乔,傅益飞,等.上海市浦东新区5岁以下儿童腹泻病原谱监测分析[J].上海预防医学,2013,25(11):602-605.

Fei Y, Sun Q, Fu YF, et al. Surveillance and analysis on diarrheal disease pathogen spectrum among children under 5 years old in Pudong New Area of Shanghai City[J]. Shanghai Journal of Preventive Medicine, 2013, 25(11):602-605.

[3] Wang G, Clark CG, Liu C, et al. Detection and characterization of the hemolysin genes in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* by multiplex PCR[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(3):1048-1054.

[4] 任超杰,扈会整,汪建军,等.医院感染嗜水气单胞菌的临床治疗分析[J].现代检验医学杂志,2014,29(4):128-129,131.

Ren CJ, Hu HZ, Wang JJ, et al. Clinical treatment analysis of *Aeromonas hydrophila* for hospital infection[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2014, 29(4):128-129,131.

[5] Nawaz M, Khan SA, Khan AA, et al. Detection and characterization of virulence genes and integrons in *Aeromonas veronii* isolated from catfish[J]. Food Microbiology, 2010, 27(3):327-331.

[6] 陈素明,鲍春梅,崔恩博,等.北京地区气单胞的流行状况及耐药性分析[J].中国抗生素杂志,2011,36(5):374-376, S2.

Chen SM, Bao CM, Cui EB, et al. Prevalence and antimicrobial resistance analysis of *Aeromonas* in Beijing[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2011, 36(5):374-376, S2.

[7] Yu HB, Zhang YL, Lan YL, et al. Identification and characterization of putative virulence of genes and gene clusters in *Aeromonas hydrophila* PPD134/91[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(8):4469-4477.

[8] 付乔芳,邱军强,胡鲲,等.嗜水气单胞菌毒力基因在传代过程中的稳定性研究[J].生物技术通报,2011(9):130-135.

Fu QF, Qiu JQ, Hu K, et al. Stability of virulence genes of *Aeromonas hydrophila* strains during subculture[J]. Biotechnology Bulletin, 2011(9):130-135.

[9] Han JE, Kim JH, Choresca BCH, et al. A small IncQ-type plasmid carrying the quinolone resistance (qnrS2) gene from *Aeromonas hydrophila*[J]. Lett Appl Microbiol, 2012, 54(4):374-376.

[10] 曲芬,崔恩博,鲍春梅,等.气单胞菌的耐药基因研究[J].中华医院感染学杂志,2005,15(3):249-252.

Qu F, Cui EB, Bao CM, et al. Resistant of genes of *Aeromonas*[J]. Chin J Nosocomiol, 2005, 15(3):249-252.

收稿日期:2014-10-07

修回日期:2015-01-20