

·论 著·

云南战区部队驻地腹泻患者中首次检出温和气单胞菌

李刚山¹,王惠萱²,王意银¹,张超雄¹,朱姝媛³,朱琼媛⁴,覃敏¹,赵丽芝⁵,周丽华⁶,邱薇¹,范泉水^{1*}

摘要:目的 对从腹泻患者粪便中分离出的温和气单胞菌进行鉴定,并做毒素原性及致病性研究和建立药敏谱。方法 碱性蛋白胨水增菌,接种碱性琼脂和TCBS平板分离培养,使用弧菌科细菌生化编码系统(第二代GYZ-9V系列)和API-20E生化编码系列对分离菌株进行鉴定,电子显微镜观察形态。毒素原性研究用溶血试验检测溶血素,小白鼠腹腔注射测定致病性,药敏试验采用纸片扩散法。结果 从587例腹泻患者粪便标本分离出9株温和气单胞菌,毒素原性检测具有溶血素,致病性测定,该菌株毒力较强。所做的18种抗生素药敏试验,对13种敏感,2中度敏感,3种耐药。结论 云南战区部队驻地存在温和气单胞菌感染,毒力试验证实,该分离菌是具有较强毒力的菌株,能使小白鼠发病死亡。药敏试验为部队驻地治疗此菌感染时的临床用药提供重要参考。

关键词: 腹泻;温和气单胞菌;毒素原性;致病性;药敏谱

中图分类号:R378.99 文献标识码:A 文章编号:1009-9727(2012)11-1317-03

First detection of *Aeromonas sobria* from diarrheal army soldiers in Yunnan garrison. LI Gang-shan, WANG Hui-xuan, WANG Yi-yin, et al. (Chengdu Military Garrison Center for Disease Control and Prevention, Kunming 650032, Yunnan, P. R. China)

Abstract: Objective To differentiate the *Aeromonas sobria* isolated from diarrheal patients and the toxigenicity and pathogenicity of *Aeromonas sobria*. Methods Alkaline peptone was used for enrichment and cultured on alkaline agar and TCBS plate, then differentiated with vibriobacterial biochemical identification coding tube system (second generation GYZ-9v) and API-20E biochemical coding identification tube system. Kirby bauer method was used for drug resistance test. Results Nine *Aeromonas sobria* strains were isolated from 587 diarrheal patients and hemolysin was also detected by toxigenicity test. The pathogenicity of *Aeromonas sobria* was strong. The sensitivity of *Aeromonas sobria* to 18 antibiotics were tested and *Aeromonas sobria* were resistant to three antibiotics, relative sensitive to 2 antibiotics and sensitive to other 13 ones. Conclusion There is *Aeromonas sobria* contamination in Yunnan Military Garrison and some of them possesses relatively strong pathogenicity that could lead to the death of mice. Attention be paid to clinical treatment of *Aeromonas sobria* infection as they are resistant to several antibiotics.

Key words: Diarrhea; *Aeromonas sobria*; Toxigenicity; Pathogenicity; Drug resistance

温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*, *A. sobria*)属于气单胞菌属(*Aeromonas*),该菌属包括嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*),豚鼠气单胞菌(*Aeromonas caviae*),维罗那气单胞菌(*Aeromonas veronii*),舒伯特气单胞菌(*Aeromonas schubertii*)等30余种^[1],*A. sobria*是气单胞菌属的一个种,本菌是鱼类和冷血动物的致病菌,也是引起人类急性胃肠道感染和食物中毒的重要病原菌之一,已成为严重的公共卫生问题^[2],为了解*A. sobria*引起腹泻感染情况,2011年1月~2012年6月,我们对云南战区部队驻地进行感染性腹泻病原菌监测,采集腹泻患者粪便标本587份,进行多种肠道致病菌分离的同时,从中检出9株*A. sobria*,对其进行形态特征、生化特性、毒素原性和致病性研究,现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 云南战区部队驻地腹泻患者新鲜粪便标本。

1.1.2 培养基 碱性蛋白胨水、碱性琼脂、TCBS、血琼脂平板、克氏双糖和鉴定用生化编码管(第二代GYZ-9V系列)购自杭州天和微生物试剂有限公司;API-20E生化编码系列,法国梅里埃公司产品,在有效期内使用。

1.2 方法

1.2.1 分离鉴定 采集的腹泻患者粪便标本接种碱性胨水,37℃增菌6~8h,接种碱性琼脂和TCBS平板,37℃培养18~24h观察菌落形态、动力,做氧化酶、葡萄糖O-F管发酵试验。对氧化酶阳性,葡萄糖O-F

基金项目 国家 十二五 科技重大专项研究课题(No.2013ZX10004-203-001-003)

作者单位 1.成都军区疾病预防控制中心,云南 昆明 650032 2.成都军区昆明总医院,云南 昆明 650032 3.成都军区第三门诊部,云南 昆明 650032 4.云南省第二人民医院,云南 昆明 650031 5.昆明市第一人民医院,云南 昆明 650000 6.云南省林业医院,云南 昆明 650224

作者简介 李刚山(1953~)男,副主任医师,主要从事微生物检验研究。

*通讯作者 E-mail:fqs168@126.com

管为发酵型的细菌,接种双糖铁琼脂斜面培养基,37℃培养18~24h后观察其反应,并从斜面上刮取菌苔接种弧菌科细菌生化编码管(第二代GYZ-9V系列)进行鉴定,用API-20E生化编码系列进行复核。

1.2.2 电子显微镜检查 将分离菌接种普通肉汤培养基,37℃培养18h,2%磷钨酸($P^{H}6.4$)负染制样,用日立-2型电镜观察菌体形态。

1.2.3 毒素原性检测 用溶血试验,将纯分离菌点种5%羊血平板上,37℃培养18~24h观察溶血结果,菌落周围形成 β 溶血环者即判断该菌具有溶血素。

1.2.4 致病性测定 取纯培养的*A.sobria*接种肉汤,37℃培养18~24h,每株菌液接种3只昆明种健康小白鼠(购自昆明医学院实验动物试验中心,每只体重15~18g。雌雄兼用,随机分成每组3只),每只小白鼠腹腔内注射0.5ml观察小白鼠发病情况,对照组同法注射无菌肉汤,观察5d。

1.2.5 药敏试验 采用WHO推荐的改良Kirby-Bauer(K-B)氏法,用标准大肠艾希菌ATCC25922作为质控菌株。药敏纸片系北京天坛生物技术开发公司产品,在有效期内使用。

2 结果

2.1 菌体形态 分离的9株*A.sobria*均具有圆端的革兰阴性无芽胞的短杆菌,在暗视野下有穿梭样动力,在电子显微镜下可见单极鞭毛,见图1。



图1 温和气单胞菌分离株菌体形态($\times 20000$)

Fig 1 Morphology of *A. sobria* isolate ($\times 20000$)

2.2 培养特性 该菌于37℃培养18~24h,在碱性琼脂平板上菌落形态为圆形,乳白色、略透明、边齐、光滑、湿润、微隆、直径约2mm之菌落,在TCBS琼脂平板上为黄色,菌落大小为1.5~2mm左右。

2.3 生化反应特性 该分离菌氧化酶阳性,葡萄糖

○-F管为发酵型,肌醇阴性,七叶苷阴性,能液化明胶,有动力,IMViC试验++--。生化编码管系统鉴定:赖氨酸+,精氨酸+,鸟氨酸-,葡萄糖产气,蔗糖+,甘露糖+,水杨苷-,6%NaCl蛋白胨水中不生长,枸橼酸盐-。生化编码为670,查弧菌科细菌生化编码册(第二代GYZ-9V系列)结果是*A.sobria*。

2.4 毒素原性检测 在羊血琼脂平板上呈灰白色菌落,表面光滑,湿润稍隆起,直径约2mm,菌落周围形成透明的 β 溶血环。

2.5 致病力测定 9株分离菌肉汤培养物分别腹腔注射小白鼠后,显示有较强的致病力,均在24h左右发病,48h内相继死亡,死前双眼半闭、竖毛、运动迟缓、食欲不振、腹胀紧贴罐底,继之震颤,躯体强直而死亡。解剖后发现内脏器官充血,腹水较多,肠壁及肠系膜大量充血,腹腔有气体。取心血、腹水和肠内容物培养,仍获原感染菌。注射无菌肉汤的对照组观察5d,小白鼠无不良反应。

2.6 药敏试验 对分离的*A.sobria*分别做了18种抗生素药物敏感试验,对其中13种敏感,2种中度敏感,3种耐药,见表1。

3 讨论

*A.sobria*是气单胞菌属中的细菌之一,该菌广泛分布于淡水中,可导致人类和动物感染。临床上主要表现为急性肠炎,其患者临床表现不一,有的腹泻、恶心、呕吐,有的腹痛(多为隐痛、左下腹及脐周)、低热、稀水样便,少数病例大便带血、里急后重似痢疾^[2,4]。我们首次从云南战区部队驻地腹泻病人粪便标本中分离出9株*A.sobria*,其患者临床症状与资料报道相似。气单胞菌有30多种,其生化反应比较复杂,为了能尽快做出鉴别,我们先按常规法做氧化酶试验,凡氧化酶试验阳性者做甘露醇、肌醇发酵试验,37℃培养18~24h后,甘露醇阳性、肌醇阴性,可初步定为气单胞菌,然后接种弧菌科细菌生化编码管(第二代GYZ-9V系列)进行系统鉴定,并用API-20E生化编码系列复核,鉴定结果均为*A.sobria*,但应用法国梅里埃公司生产的API-20E生化编码系列价格较贵,而使用国内的生化编码管(第二代GYZ-9V系列)价廉,简单、方便、快捷,结果可信,适用于基层实验室对气单胞菌的鉴定。

国内专门开展气单胞菌的研究较少,该菌以往被视为毒力不强的条件致病菌,对其引起的疾病认识不足,因而忽略了它的致病性。据资料^[1]报道,气单胞菌的主要致病因子是肠毒素和溶血素。我们做的毒素原性检测试验,该分离菌具有溶血素,由于条件所限,未做肠毒素检测。为证明分离的*A.sobria*是否

表 1 温和气单胞菌分离株药敏试验结果
Table 1 Results of drug sensitivity test of *Aeromonas sobria*

抗 生 素 Antibiotics	含量 g/片 Content/tablet	敏感度 Sensitivity	抗 生 素 Antibiotics	含量 g/片 Content/tablet	敏感度 Sensitivity
庆大霉素 Gentamycin	10	S	头孢他啶 Ceftazidime	30	S
妥布霉素 Tobromycin	10	S	头噻孢吩 Cefolatin	30	S
奈替米星 Netilmicin	30	S	呋喃妥因 Furantoin	300	S
奈替米星 Netilmicin	10	S	磺胺甲恶唑/甲氧苄啶 SMZ/trimethoprim	23.75/1.25	S
阿米沙星 Amikacin	10	S	头孢唑啉 Cefazolin	30	MS
左氧氟沙星 Levofloxacin	5	S	环丙沙星 Ciprofloxacin	5	MS
头派孢酮 Cefoperazone	75	S	依诺沙星 Enoxacin	10	R
头噻孢肟 Cefotaxime	30	S	奈啶酸 Nalidixic Acid	30	R
头孢曲松 Ceftriaxone	30	S	氨苄西林 Ampicillin	10	R

注 S: 敏感 ;MS: 中度敏感 ;R 耐药。 Note: S: sensitive; MS: Medium sensitive; R: Resistance

毒力 通过小白鼠毒力试验 结果该菌有较强的致病力 与临床症状密切相关。对 *A. sobria* 的研究 很少有人用电子显微镜观察其菌体形态 我们使用了较先进的电镜对分离的 *A. sobria* 进行观察 有助于对该菌的分析研究。所做的药敏试验 筛选出敏感、中度敏感、耐药三类药敏谱 对指导云南战区部队驻地今后治疗 *A. sobria* 的感染具有重要参考价值。

参考文献：

[1] Wang XR. Microbiology and laboratory technique for preentivemedicine [M].(1st edition). People's Daily Publishing House, 2002, 353-354 (In Chinese)
(王秀茹. 预防医学微生物及检验技术[M].第1版.北京:人民日报出版社,2002,353-354)

[2] Zhong YG. Prevalence of *Aeromonas sobria* infection[J]. Med Inf,Chin J Prev Med, 2011(3):1233-1234 (In Chinese)
(钟有光.气单胞菌及其感染流行状况[J].医学信息,2011(3):1233-1234)
[3] Wang SJ, Yang J, Zhan ZQ, et al. Analysis of 766 food poisoning due to bacterial infection in China in 1994-2003[J]. Chin J Prev Med, 2006,6(7):180-184 (In Chinese)
(王世杰,杨杰,湛志强,等.1994-2003年我国766起细菌性食物中毒分析[J].中华预防医学杂志,2006,6(7):180-184)
[4] Cui WL, Huo WC. Dysentery diarrhea due to *Aeromonas sobria* infection[J]. Chin Modern Med, 2005,3(2):87(In Chinese)
(崔文丽,霍卫池.温和气单胞菌引起的痢疾样腹泻1例[J].中华当代医学,2005,3(2):87)

收稿日期 2012-06-22 编辑 符式刚

(上接第1312页)

prostanoids in the conjunctiva [J].Journal of the American Academy of Dermatology, 2006,54(4):705-706
[3] Ni CY,Liu LL,Zhu XJ. Research development about Pathogenesis of the skin itching[J].Intern J Dermatol Venereol.2008,34(5) 321-323.
(倪春雅,刘玲玲,朱学骏.皮肤源性瘙痒发生机制的研究进展[J].国际皮肤性病杂志,2008,34(5) 321-323)
[4] Stander S,Steinhof M,Schmelz M et al. Neurophysiology of pruri-tiscutaneous elicitation of itch[J].Arch Dermatol,2003,5(14) : 63-70.

[5] Rees J,Murray CS .Itching for progress[J].Clin Expl Der-matol,2005,30(5):471-473
[6] Wu JM,Wan SY. Clinical curative effect observation about 60 cases treating burn scars using Antipruritic ointment for cicatrix[J]. Guizhou Med J.2008 ,32(11)1008 - 1009.
(郭佳敏,万思源.疤痕止痒软化乳膏治疗烧伤后瘢痕60例临床疗效观察[J].贵州医药,2008 ,32(11) :1008 - 1009)

收稿日期 2012-05-31 编辑 吴中菲