

## 两株鱼源琼氏不动杆菌的分离、鉴定和耐药特性分析

毛芝娟\*, 毛甬州, 汪建萍

(浙江万里学院生物与环境学院, 浙江 宁波 315100)

**摘要:** 为探明史氏鲟感染性疾病的病原, 并为生产中防治该病提供依据, 本实验自患病鱼分离到 2 株细菌 SX01 和 SX02, 对 2 分离株开展了人工感染实验、形态学和理化特性检测及分子生物学鉴定, 并用 PCR 法检测了部分耐药基因。研究表明, 分离株对异育银鲫具有一定的致病力, 96 h 的半数致死浓度  $LD_{50}$  为  $1.02 \times 10^9$  cells/mL; 革兰氏染色阴性, 球杆状, 氧化酶实验、动力阴性, 接触酶阳性, 形态学和理化特性符合不动杆菌属的特征; 其 16S rRNA 基因序列与已发表的琼氏不动杆菌完全同源, RNA 聚合酶  $\beta$  亚单位编码基因 *rpoB* 序列与琼氏不动杆菌相应序列同源性达 99% 以上, 确认 2 分离株为琼氏不动杆菌; 自分离株中检测到了广谱性  $\beta$ -内酰胺酶编码基因 *TEM-1* 和氨基糖苷类乙酰转移酶基因 *Aac(3) II*, 解释了该菌对 2 类抗生素药物的耐受性, 提示了该菌可能来源于临床菌的污染, 养殖行业和食品卫生中必须引起重视。

**关键词:** 琼氏不动杆菌; 致病性; 鉴定; 耐药基因

**中图分类号:** Q 938.8; S 965

**文献标志码:** A

不动杆菌属种类是重要的鱼类病原菌, 其中鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*) 能够感染鳊鱼 (*Siniperca chuasti*)、异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 和斑点叉尾鲷 (*Ictalurus punctatus*) 等<sup>[1-3]</sup>, 琼氏不动杆菌 (*A. junni*) 危害锦鲤 (*Cyprinus carpio* L.) 和石鲮 (*Kareius bicoloratus* L.) 等<sup>[4-6]</sup>。不动杆菌同时也是一种重要的临床病原, 与金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 一起并称为易引起院内感染的 3 大病原菌。不动杆菌的致病机制包括对宿主细胞的粘附侵袭<sup>[7-9]</sup>、形成生物膜<sup>[10]</sup>, 及对多种临床抗生素药物耐受等, 这也是导致院内继发感染的重要原因<sup>[11]</sup>。

鱼类中对致病性不动杆菌的报道目前主要集中在鲍曼不动杆菌, 对琼氏不动杆菌致病性的报道尚较少。已经发现, 这种菌可与其它病原菌一起, 加强对石鲮的毒性<sup>[5-6]</sup>, 其单独致病机理尚不

明确。2011 年 10 月, 宁波市宁海县一养殖场史氏鲟 (*Acipenser schrenckii*) 暴发病情, 病鱼体表褪色, 肛门红肿, 腹腔肿大, 有大量血性腹水, 日死亡率达 3% 以上。本实验自患病鱼体内分离到数株可疑菌株, 经人工感染确定了病原性, 并进一步通过理化和分子生物学方法鉴定了种类, 检测和克隆了其耐药基因, 为生产实践中防治该菌的感染奠定了部分基础。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 实验鱼

患病史氏鲟由宁海县某养殖场提供, 病鱼体质量 150 ~ 200 g。

人工感染采用健康异育银鲫, 购自市场, 平均体质量 (200 ± 50) g。以 200 L 塑料水族箱加曝气自来水充气暂养。实验期间水温 20 ~ 22 °C。

#### 1.2 实验菌株

自病鱼肝脏分离的 2 菌株 SX01 和 SX02 用

收稿日期: 2013-05-02 修回日期: 2013-07-17

资助项目: 浙江省科技厅重点科技创新团队项目 (2012R10025)

通信作者: 毛芝娟, E-mail: mzzjane@hotmail.com

于本实验。

### 1.3 人工感染和半数致死浓度实验

人工感染和半数致死浓度实验中,实验鱼每组 10 尾,分别以  $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$  和  $10^9$  cells/mL 浓度的菌悬液腹腔注射,每尾注射 0.2 mL。对照组则注射相同剂量的灭菌 PBS。每日观察和统计实验鱼受攻击后 10 d 内的发病和死亡情况。自濒死发病鱼肝、肾、脾和腹水中重新分离病菌并进行形态和生理生化鉴定。半数致死浓度的计算通过统计分析学软件 SPSS 17.0 的机率分析 (Probit Analysis) 进行。

### 1.4 菌株的分类鉴定

菌株的形态和理化特性鉴定及胞外产物活性检测 以常规形态学和生理生化测试法进行初步分类,所有测试均进行 2 次重复。微量生化鉴定管购自杭州天和微生物试剂有限公司。

溶血活性检测采用常规血平板法,将分离株点种于羊血琼脂平板(杭州微生物试剂有限公司),28 °C 培养 24 h,观察菌落周围出现明显溶血圈者为阳性。胞外产物的酶活性检测:分别配制含脱脂奶粉(1.0%)、淀粉(0.2%)、卵黄(每 100 mL 培养基加入 50% 的无菌卵黄盐水悬液 15 mL)及尿素(2.0%)的 LB (Luria-Bertani) 平板,将分离株划线或点种于含上述底物的 LB 平板,每菌株做 3 个平行,置 28 °C 培养 24 ~ 48 h,若奶粉平板出现透明溶解圈为阳性;淀粉平板则向菌落滴加数滴卢哥氏碘液,周围出现透明溶解圈则为阳性;尿素平板出现透明圈和颜色变红则为阳性;上述平板阳性结果分别指示菌株产生胞外蛋白酶、淀粉酶、磷脂酶和尿素酶。

分离株的分子生物学鉴定 取 1.5 mL 各分离菌株的过夜培养物,5 000 × g,离心 5 min,收集菌体;以无菌水离心洗涤 2 次;收集菌细胞沉淀,以 100 μL TZ 缓冲液(2% Triton X-100,2.5 g/L  $\text{NaN}_3$ ,12.5 mmol/L Tris-HCl,pH 8.0)重新悬浮,沸水浴 10 min,冰浴 5 min,1 000 × g 离心 10 min,收集上清液,即为细菌基因组 DNA,备作 PCR 模板用。16S rDNA PCR 引物采用革兰氏阴性菌通用引物,P1:5' AGAGTTTGATCCTGG-CTCAG3'和 P2:5' GGTTACCTTGTTACGACT3',目的片段长度约为 1 500 bp。RNA 聚合酶 β 亚

单位编码基因 *rpoB* 在同种细菌中较为保守,但不同株间又有一定的特异性,其鉴别能力高于 16S rRNA 基因,常用作种类鉴定的靶基因<sup>[12-14]</sup>。本实验中 *rpoB* ORF 引物根据已发表的不动杆菌属序列经比对后在保守区设计 2 对引物,分别为 P3:5'-ATGGCATACTCATATACCGAAA-3',P4:5'-GGTTTGTTCAGCACGAAGTGTAG-3',及 P5:5'-AGGCTGTTTCCTACACTTCGT-3',P6:5' AG-TACCATTTCAGTTCA3',目的片段分别长约 2 000 bp。PCR 反应程序为:94 °C 预变性 4 min,94 °C 变性 45 s,退火温度分别为 53、55 和 56 °C,时间 30 s,72 °C 延伸 2 min,循环 30 次,72 °C 终末延伸 5 min。16S rRNA 基因 PCR 产物经胶回收试剂盒(上海生工生物工程有限公司,简称生工,上海)回收后送生工公司测序;*rpoB* 靶基因序列经 PCR 获得目的片段后经 TA 克隆至 pMD18-T 载体,同样测序后所得序列拼接完整,递交到 GenBank,在 NCBI 网站经 BLASTN 进行在线序列比对。

选取相似性最高的代表序列,以 MEGA 5.0,采用邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建系统发育树,分析分离株与其它相近菌株的亲缘性关系。

### 1.5 分离株对抗生素耐药基因的克隆

先期实验中以常规纸片法初筛 2 分离株对临床常用抗生素的敏感特性,包括青霉素类、头孢类、氨基糖苷类、大环类酯类和氟喹诺酮类等 23 种,结果表明分离株对抗生素类药物的敏感特性基本一致,对青霉素类和多数第一、第二代头孢类及氨基糖苷类抗生素耐药,可能存在相应耐药基因。参照肖燕等<sup>[15]</sup>、王冬国等<sup>[16]</sup>及赵仲农等<sup>[17]</sup>设计引物序列如表 1,包括超广谱 β-内酰胺酶基因 *TEM*、*SHV*、*IMP*、*VIM* 和 *OXA-23*,金属 β-内酰胺酶基因 *IMP* 和 *VIM*、头孢菌素酶 AmpC 基因 *DHA*、*MIR* 和 *FOX*,氨基糖苷类乙酰转移酶基因 *Aac(3) I*、*Aac(3) II*、*Aac(6') II* 和 *Aac(6') I*,氨基糖苷类核苷转移酶 *Ant(2'') I* 和 *Ant(3'') I*。PCR 反应程序同菌株的分类鉴定,根据引物序列和目的片段长度调整退火温度和延伸时间。经 PCR 获得目的 DNA 片段后经 TA 克隆至 pMD18-T 载体,测序与比对方法同菌株的分类鉴定。

表 1 分离株  $\beta$ -内酰胺类和氨基糖苷类耐药基因检测 PCR 引物  
Tab. 1 Primers for PCR amplification of drug-resistance genes of the isolated strains

基因名称 gene name	引物序列(5'→3') sequence of the primers	预期长度/bp expected length	基因名称 gene name	引物序列(5'→3') sequence of the primers	预期长度/bp expected length
TEM	AGGAAGAGT AT GATT CAACA CTCGTCGT TTGGT ATGGC	535	FOX	AACATCGGGTATCAGGGAGATG CAAAGCGCGTAACCGGATTGG	190
SHV	GGTT ATGCGTT AT ATTCGCC GGTT AGCGT TGCCAGTGCTC	867	Aac(3)I	AC CTAC TCCC AACATC AGCC AT AT AGA TCT CACT ACGCGC	169
IMP	CGGCC(G/T)CAG GAG(A/C)G(G/T)CT TT AACCAGT TT TGC(C/T)TT AC(C/T)AT	587	Aac(3)II	AC TGT GAT GGGAT ACGCGTC C TCC GT CAGCGTT T CAGC TA	237
VIM	ATT CCGGT CGG(A/G)GAGGT CCG GAGCAAGTCTAGACCGCCCG	633	Aac(6')I	T AT GAGT GGCT AAAT CGA C CCGCTT T CTC GT AGCA	394
OXA-23	GAT GT GTCATAGTATT CGT CG TCACAACAATAAAAGCACT G	1 067	Aac(6')II	T T CATGT CCGCGAGC ACCCC GACT CT TC CGC CATCGCT CT	178
DHA	AAC TTTCACAGGTGTGCTGGGT CGTACGCATACTGGCTTTGC	405	Ant(3'')I	T GATT T GC TGGTT ACGGTGAC C GCT AT GT T CTC TT GCTT T TG	284
MIR	TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG C TTCCACTGCGGCTGCCAGT T	302	Ant(2'')I	GAGCGAAATC TGCCGCT CT GG C TGT TACAAC GGACT GGCC GC	320

## 2 结果

### 2.1 鲟鱼病症及分离菌形态观察

发病鲟体表发白,腹部肿胀,肛门基部发红,解剖可见肝脏发白,脾、肾未见明显异常,腹腔中有很多红色液体(图 1)。



图 1 患病史氏鲟症状  
Fig. 1 Symptoms of diseased  
*A. schrenckii*

### 2.2 分离菌对异育银鲫的人工感染结果

自患病鲟鱼肝脏中分离到 2 菌株 SX01 和 SX02,以此 2 菌株制备活菌悬液人工攻击异育银鲫,观察感染后实验鱼的发病和死亡情况,结果如表 2 所示。可见,2 分离株显示出了较强的毒力,  $1.0 \times 10^9$  cells/mL 的攻击浓度均表现了 100% 的死亡率。死亡基本发生在攻击后 3~7 d 内,濒死鱼体表充血,腹腔膨大有红色腹水,与自然发病鲟鱼的症状相似;同期对照组鱼存活良好,无发病和死亡情况。经 SPSS 17.0 计算得出, SX01 对异育银鲫 96、120 h 内的半数致死浓度  $LD_{50}$  分别为  $1.02 \times 10^9$  和  $1.20 \times 10^8$  cells/mL。

自濒死鱼体内重新分离的菌株经形态、理化特性和分子生物学鉴定,与原攻毒菌株相同,表明实验鱼的死亡确为致病菌的人工感染所致。

表 2 分离菌株对异育银鲫的人工感染和半数致死浓度实验  
Tab. 2 The artificial challenge and  $LD_{50}$  test of the carp (*Carassais auratus gibelio*) against the isolated strains

组别 groups	菌悬液浓度/(cells/mL) concentration of bacteria	样本数/ pcs samples	攻毒后天数和死亡数量 days post i. p. injection and cumulative death of the fish										累积 死亡率/% mortality
			1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d	
SX01	$1.0 \times 10^9$	10	0	0	2	3	2	2	1	0	0	0	100
SX02	$1.0 \times 10^9$	10	0	0	2	3	3	2	0	0	0	0	100
SX01	$1.0 \times 10^8$	10	0	0	1	1	2	2	1	0	0	0	70
SX01	$1.0 \times 10^7$	10	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	30
SX01	$1.0 \times 10^6$	10	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	10
对照组	0.75% NaCl	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

### 2.3 分离株的形态、理化特性及胞外产物活性

对 2 毒力株进行了形态学观察、理化特性及胞外产物溶血和酶活性检测,结果如表 3。2 菌株基本特性相同,革兰氏染色阴性,短杆或球状,部分成对或短链排列,无动力;37 °C 生长,产生接触酶,氧化酶阴性,不产生吲哚和 H<sub>2</sub>S,符合不动杆菌属的基本特征<sup>[18]</sup>。2 分离株利用枸橼酸盐、丙

二酸盐和醋酸盐,不利用蔗糖、阿拉伯糖、木糖、乳糖等碳水化合物,无溶血性,不产蛋白酶、淀粉酶、卵磷脂酶和尿素酶等,与已报道的琼氏不动杆菌的特性基本相同<sup>[4]</sup>。综合形态学与理化特性鉴定的结果,可以初步判断 2 分离株为琼氏不动杆菌。

表 3 分离株的形态、生理生化特性及胞外产物活性

Tab.3 Morphological, physical and biochemical characteristics of isolated strains

项目 items	菌株 strain			项目 items	菌株 strain		
	SX01	SX02	junii <sup>[4]</sup>		SX01	SX02	junii <sup>[4]</sup>
鞭毛数目 No. of flagella	-	-	-	肌醇 inositol	-	-	-
革兰氏染色 Gram stain	-	-	-	枸橼酸盐 citrates	+	+	+
形态 morphology	短杆状	短杆状	短杆状	麦芽糖 maltose	-	-	-
动力 motility	-	-	-	甘露醇 mannitol	-	-	-
4 °C 生长 growth at 4 °C	-	-	-	乳糖 lactose	-	-	-
37 °C 生长 growth at 37 °C	+	+	+	木糖 xylose	-	-	-
葡萄糖氧化发酵实验 O/F test	-	-	-	山梨糖 sorbose	-	-	-
葡萄糖产气 gas from glucose	-	-	-	苦杏仁苷 amygdale amara	-	-	-
氧化酶 oxidase	-	-	-	蜜二糖 melibiose	-	-	-
接触酶 catalase	+	+	+	鼠李糖 rhamnose	-	-	-
精氨酸双水解酶 arginine dihydrolase	-	-	ND	β-半乳糖苷酶 ONPG	-	-	-
精氨酸脱氨酶 arginine decarboxylase	-	-	ND	明胶液化 gelatin	-	-	-
赖氨酸脱羧酶 lysine decarboxylase	-	-	ND	溶血性 hemolytic activity	-	-	-
鸟氨酸脱羧酶 ornithine decarboxylase	-	-	ND	产 H <sub>2</sub> S production of H <sub>2</sub> S	-	-	-
硝酸盐降解 nitrate reduction	-	-	-	丙二酸盐 molonate	+	+	+
DNA 酶 DNA Enzyme	-	-	-	醋酸盐 acetate	+	+	+
乙酰胺酶 acetamidase	-	-	-	0% NaCl 胨水 broth	+	+	+
MR 反应 MR test	-	-	-	1% NaCl 胨水 broth	+	+	+
VP 反应 VP test	-	-	-	6% NaCl 胨水 broth	-	-	-
吲哚反应 indole test	-	-	-	尿素酶 urease	-	-	-
蔗糖 sucrose	-	-	-	蛋白酶 proteinase	-	-	ND
甘露糖 mannose	-	-	-	淀粉酶 amylase	-	-	-
阿拉伯糖 arabinose	-	-	-	卵磷脂酶 lecithinase	-	-	+

注:“+”. 阳性;“-”. 阴性;ND. 无数据

Notes:“+”. positive;“-”. negative;ND. not detected

### 2.4 分离菌株的 16S rRNA 基因及 rpoB 序列的 PCR 与测序比对结果

2 分离株 16S rDNA PCR 产物经测序后分别获得 1 401 bp 和 1 398 bp 的序列,经 BlastN 比对后发现,SX01 与 SX02 菌株序列相同,与已发现的多株琼氏不动杆菌的同源性达 100%,如 ATCC17908 株(HE651916.1),可以初步归为琼氏不动杆菌;拼接组装的 SX01 菌株 rpoB 编码序

列长 4 089 bp,与已发表不动杆菌属相应序列相似性达 99% 以上,其中与 *A. grimontii* (DQ207483,等同于琼氏不动杆菌<sup>[19]</sup>)及琼氏不动杆菌(DQ207486)相似性最高,均为 99%,在系统发育树上自动聚为一支(图 2),可以判断 2 分离株确为琼氏不动杆菌。SX01 菌株 16S rRNA 基因和 rpoB 基因序列在 GenBank 的登录号分别为 KC958580 和 JQ924568。

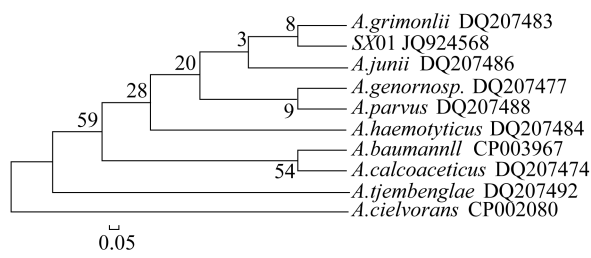


图2 分离株 SX01 *rpoB* 基因序列系统发育分析

节点处数值为自展置信,自展重复 1 000 次

Fig.2 Phylogenetic relationship among *Acinetorba* species based on analysis of *rpoB* gene sequence

The degree of confidence for each branch point was determined by bootstrap analysis(1 000 repetitions)

#### 2.4 分离株耐药基因的 PCR 检测和序列分析

对 SX01、SX02 2 菌株开展了  $\beta$ -内酰胺类抗生素和氨基糖苷类抗生素药物耐药基因的检测,结果如图 3 所示。可见,2 菌株基因组 DNA 中均含有广谱  $\beta$ -内酰胺酶基因 *TEM*,目的片段长约 500 bp,与预期相符,未检测到其他广谱性  $\beta$ -内酰胺基因和 AmpC 酶基因;同时含有乙酰胺转移酶 *Aac(3) II* 基因,长约 250 bp,目的片段符合预期长度,未检测到其他氨基糖苷类耐药基因。

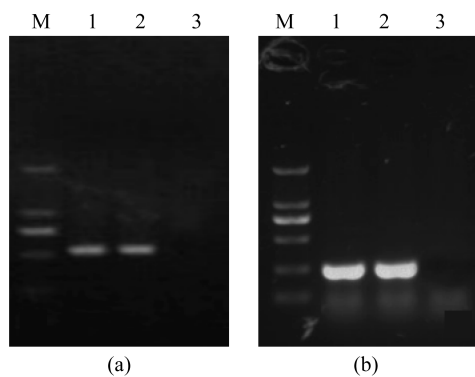


图3 不动杆菌分离株耐药基因的 PCR 检测

(a)  $\beta$ -内酰胺酶耐药基因 *TEM* PCR 检测结果;(b)氨基糖苷酶耐药基因 *Aac(3) II* 的 PCR 检测结果;M. DNA 分子量标记,从上至下分别 2 000、1 000、750、500、250 和 100 bp;泳道 1、2 分别为分离株 SX01 和 SX02,3 为阴性对照

Fig.3 PCR detection of drug-resistance genes of the isolated strains

(a) PCR detection of  $\beta$ -lactase coding gene *TEM*; (b) PCR detection of acetamide transferase gene *Aac(3) II*; M. DNA molecular marker, the fragments up to down indicate 2 000 bp, 1 000, 750, 500, 250 and 100 bp, respectively; lane 1, 2 indicates the DNA template from strain SX01 and SX02, respectively, lane 3 indicates the negative control sample

将分离株 *TEM* 与 *Aac(3) II* PCR 产物克隆到 T 载体后全长测序,分别获得长 531 和 237 bp 的序列,2 菌株相应基因序列完全相同,经 BlastN 比对后发现,与已发表的 *TEM-1* 和 *Aac(3) II* 基因的同源性在 99% 以上,确认 PCR 检测到的是相应耐药基因。2 基因在 GenBank 的登录号分别为 KC958581 和 KC958582。

### 3 讨论

细菌的种类鉴定中,除 16S rRNA 基因序列外,其它一些相对保守,但进化速度稍快的靶基因在种类鉴定中常有更好的表现,如 DNA 促旋酶  $\beta$  亚单位 *gyrB*<sup>[20]</sup> 和 RNA 聚合酶  $\beta$  亚单位 *rpoB* 基因等<sup>[12]</sup>。本实验中 2 分离株 16S rRNA 基因序列与已发表的多株琼氏不动杆菌序列完全同源,基本可推断是同种菌;与 16S rRNA 基因相比,*rpoB* 基因序列在同属不同种类中具有一定的特异性<sup>[12]</sup>,在不动杆菌属中,近缘种中该基因全序列的相似性低于 95%,同种的相似性则达 98% 以上<sup>[13]</sup>,本实验中 SX01 *rpoB* 基因与琼氏不动杆菌相应基因相似性在 99% 以上,进一步验证了分离株确为琼氏不动杆菌。

关于琼氏不动杆菌对鱼类的病原性,目前已有的报道并不多,陈翠珍等<sup>[4]</sup>自石鲮和锦鲤中分离到该菌,在混合感染的锦鲤中,虽然自病鱼肝脏中分离到该菌,但分离株未表现出对健康鲤的致病性;而在石鲮中,该菌继杀鲑气单胞菌之后,对病鱼造成继发感染;人工感染实验结果表明,分离株对健康石鲮和牙鲆具有致病作用<sup>[5]</sup>。本实验自患病史氏鲟分离到琼氏不动杆菌,考虑到实验鱼的易得性,采用了异育银鲫作为人工感染实验用鱼,菌株对异育银鲫具有致病性,96 h 的  $LD_{50}$  为  $1.02 \times 10^9$  cells/mL,表现了一定的毒力,与陈翠珍等<sup>[5]</sup>在石鲮和牙鲆中获得的结果相似,验证了该菌对鱼类的致病作用;但相对于鲍曼不动杆菌对鳊鱼、银鲫等的较强致病性 ( $LD_{100} \leq 6.0 \times 10^6$  cfu/mL)<sup>[1-2]</sup>,琼氏不动杆菌对鱼类的毒力稍弱。

陈翠珍等<sup>[4-6]</sup>从混合/继发感染中分离到琼氏不动杆菌,本实验中发病史氏鲟也表现了混合感染,因为同一尾病鱼腹水中同时检测到了寄生的球虫类原生动物和大量的不动杆菌。本实验分离菌在体外培养中不产生蛋白酶、磷脂酶、淀粉

酶等水解性酶类,也不产生溶血素等外毒素。在自然感染中,该菌可能通过特定的粘附素结合到受损的鱼体表面,从而进入到局部组织,由于感染鱼免疫系统业已受损,该菌可能逃过免疫监视和清除作用而扩展到全身,引发感染;人工感染中,则由于大量的细菌进入到鱼体,免疫系统来不及清除而扩散造成全身感染和致病。

不动杆菌属种类是水体和土壤中的常在菌,常通过医疗器械和院内环境的污染造成病人的感染<sup>[21]</sup>。本实验自史氏鲟体内分离到的琼氏不动杆菌,PCR检测到广谱性 $\beta$ -内酰胺酶TEM-1,未检测到MBLs和AmpC等分解谱更广的耐药酶基因,表明分离株对 $\beta$ -内酰胺类抗生素的抗性是由于产生TEM-1所致,这与预备实验中获得的药敏检测结果是一致的,分离株表现了对青霉素类、第一、二代头孢类抗生素药物的耐受性,而对第三代头孢菌素和碳青霉烯等敏感,TEM-1、2及SHV-1等广谱 $\beta$ -内酰胺酶的特性即是如此<sup>[22]</sup>。革兰氏阴性菌对氨基糖苷类抗生素的耐受一般是由于产生各种修饰酶钝化抗生素的活性部位所致,如乙酰转移酶、磷酸转移酶和核苷转移酶等,本实验在分离株中检测到了乙酰转移酶Aac(3)II,提示了分离株通过氨基糖苷乙酰化作用钝化抗生素产生耐受性。总的来说,分离株对 $\beta$ -内酰胺类和氨基糖苷类抗生素的耐药机制与已报道的不动杆菌临床分离株类似<sup>[23-24]</sup>,而且,发病池塘之前从未用过此类药物,提示了本次分离株极有可能来源于临床菌的污染。部分临床株可能在医院污水处理中存活下来,通过污水排放进入到养殖水体,耐药基因水平转移进入水体微生物,进而造成鱼类的感染。

多耐药性不动杆菌对养殖鱼类的感染不仅危害养殖业本身,同时,也可能导致人类的食源性感染,从而引发食品安全问题,必须引起相当的重视。养殖实践中必须提高警惕,对进水水源严加控制,不从受污染水体进水;设立蓄水池,进水需先进行沉淀、消毒后方能使用,从源头上控制病原的进入,才能有效预防感染的发生。同时,有必要深入开展该菌致病和感染机制的研究,为生产上控制该类疾病提供理论基础。

#### 参考文献:

- [1] 顾天钊,陆承平,陈怀青. 鲍氏不动杆菌—鳊鱼暴发性死亡的新病原[J]. 微生物学通报,1997,24

(2):83,104-106.

- [2] 陆文浩,陈辉,王习达,等. 异育银鲫致病性鲍曼不动杆菌的鉴定和系统发育分析[J]. 中国兽医学,2009,39(4):303-309.
- [3] 夏露. 鱼源鲍曼不动杆菌的分离与鉴定[D]. 武汉:华中农业大学水产学院,2009.
- [4] 陈翠珍,张晓君,房海,等. 锦鲤中琼氏不动杆菌的分离与鉴定[J]. 水生态学杂志,2009,2(1):86-90.
- [5] 陈翠珍,房海,张晓君. 石鲮病原琼氏不动杆菌形态型I的鉴定[J]. 微生物学通报,2005,32(3):34-39.
- [6] 陈翠珍,房海,张晓君,等. 琼氏不动杆菌形态型I的主要性状及系统发育分析[J]. 海洋水产研究,2005,26(4):32-37.
- [7] 汤雅殊,陆承平. 鲍氏不动杆菌鳊鱼分离株具有4型菌毛[J]. 南京农业大学学报,1997,20(4):114-116.
- [8] 顾天钊,陆承平,陈怀青. 鲍氏不动杆菌M F1株的粘附特性[J]. 南京农业大学学报,1999,22(3):65-68.
- [9] 顾天钊,陆承平,陈怀青. 鲍氏不动杆菌鳊鱼分离株的侵袭特性[J]. 中国兽医学报,2000,20(5):468-470.
- [10] 刘彩霞,乔增培,杨锦红,等. 医院感染鲍氏不动杆菌毒力相关因素的研究[J]. 中华医院感染学杂志,2011,21(23):4882-4884.
- [11] 陈解语,龚智峰. 耐药鲍曼不动杆菌感染的防治进展[J]. 中国临床新医学,2011,4(7):690-693.
- [12] Mollet C, Drancourt M, Raoult D. *RpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification [J]. *Molecular Microbiology*, 1997, 26(5):1005-1011.
- [13] La Scola B, Gundi V A, Khamis A, et al. Sequencing of the *rpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006, 44(3):827-832.
- [14] Gundi V A, Dijkshoorn L, Burignat S, et al. Validation of partial *rpoB* gene sequence analysis for the identification of clinically important and emerging *Acinetobacter* species [J]. *Microbiology*, 2009, 155(7):2333-2341.
- [15] 肖燕,姚怡,朱雪明,等. 鲍曼不动杆菌对 $\beta$ -内酰胺类抗生素的耐药性及耐药基因型研究[J]. 临床输血与检验,2008,10(3):230-233.
- [16] 王冬国,周铁丽. 质粒介导产AmpC酶大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌AmpC基因型检测与分析[J]. 中华医院感染学杂志,2007,17(7):782-785.

- [17] 赵仲农,钱小毛. 鲍氏不动杆菌  $\beta$ -内酰胺酶和氨基糖苷类修饰酶基因研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2006, 16(8): 858-861.
- [18] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, *et al.* Bergey's manual of determinative bacteriology [M]. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994.
- [19] Vanechoutte M, De Baere T, Nemec A, *et al.* Reclassification of *Acinetobacter grimontii* Carr *et al.* 2003 as a later synonym of *Acinetobacter junii* Bouvet and Grimont 1986 [J]. International Journal of System and Evolutionary Microbiology, 2008, 58(4): 937-940.
- [20] 李献梅,王小芬,杨洪岩,等. 促旋酶(*gyrase*)B 亚单位基因 *gyrB* 在鉴别细菌近缘种中的应用[J]. 微生物学报, 2008, 48(5): 701-706.
- [21] 冯银霞,王志军. 鲍曼不动杆菌的临床分布及耐药性分析[J]. 中国医学工程, 2011, 19(11): 78-79.
- [22] 马涛,徐文芳.  $\beta$ -内酰胺酶与细菌耐药性的研究进展[J]. 世界临床药物, 2000, 21(4): 199-201.
- [23] 侯盼飞,应春妹. 鲍曼不动杆菌对  $\beta$ -内酰胺类抗生素耐药机制的研究进展[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2010, 30(1): 98-103.
- [24] 王玮玮,王厚照. 多重耐药鲍曼不动杆菌耐药机制研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(21): 2487-2489.

## Isolation, identification and drug-resistance genes detection of *Acinetobacter junii* from fish

MAO Zhijuan<sup>\*</sup>, MAO Yongzhou, WANG Jianping

(Biological and Environmental College, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China)

**Abstract:** In this study, two bacteria strains SX01 and SX02 were isolated from diseased *Acipenser schrenckii* and the carps (*Carassais auratus gibelio*) were artificially challenged to test the pathogenicity of the strains. Morphology profiles were observed, physical and biochemical characteristics were tested, and molecular analysis was combined to identify the isolated strains, also antibiotics drug resistance genes were detected. The results showed, the strains were pathogenic to the carps, with the 96 h LD<sub>50</sub> = 1.02 × 10<sup>9</sup> cells/mL. The strains were Gram negative, short rods, nearly sphere, oxidation test and motility negative, catalase positive, showed the profiles of *Acinetobacter* genus. 16S rRNA gene sequence of the strains shared 100% identity with those published data of *A. junii* in GenBank, and *rpoB* sequence of SX01 showed 99% identity with those of *A. junii*, were well identified the strains to *A. junii*. A  $\beta$ -lactam enzyme coding gene *TEM-1* and acetamide transferase gene *Aac* (3) II were detected in the strains, suggesting possible clinical contamination. Enough attention must be paid to guard against the drug-resistant *A. junii* in aquaculture and food sanitation.

**Key words:** *Acinetobacter junii*; pathogenicity; species identification; drug-resistance genes

**Corresponding author:** MAO Zhijuan. E-mail: mzjjane@hotmail.com