

出國報告（出國類別：會議）

第 13 屆 Aeromonas 及 Plesiomonas 國際 研討會

服務機關：成大醫院

姓名職稱：教授兼主治醫師

派赴國家：波蘭

出國期間：2023.6.17-2023.6.26

報告日期：2023.8.11

摘要

此次第 13 屆產氣單胞菌(*Aeromonas*)及臨單胞菌(*Plesiomonas*)國際研討會於波蘭樂斯拉夫 Wroclaw 舉辦，會議日期為 2023 年 6 月 21 日至 23 日。筆者陳柏齡醫師 6 月 17 日提早由桃園國際機場出發，直飛德國法蘭克福，再經由該地轉飛波蘭樂斯拉夫，6 月 18 日抵達該地。

台南地區為產氣單胞菌盛行區域，本院在相關微生物學及致病機轉研究頗具名聲，因此主辦單位邀請筆者陳柏齡醫師參加並發表專題演講，會議舉辦地點為位於該市的 Hirsfeld 研究所(Hirsfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy)，講題為：達卡產氣單胞菌感染回顧：臨床感染及致病機轉(Review of *Aeromonas dhakensis* infection: clinical infections and pathogenesis)，是針對該菌種細菌感染完整的回顧，與會者皆給予演講者非常正面的回響。在三天的研討會過程中，與來自世界各國的微生物專機切磋討論，並尋求進一步跨國合作的機會，會議結束後隔日(6 月 24 日)，主辦單位安排與會者參觀鄰近該市的 KSIAZ 古堡，藉由親身遊覽，了解波蘭的歷史與體驗當地的風土民情。筆者於 6 月 25 日經由波蘭飛抵法蘭克福，經由該地於 6 月 26 日返回台灣。

目次

一、目的	P.1
二、過程	P.2
三、心得	P.14
四、建議	P.15

一、目的

產氣單胞菌(*Aeromonas*)及臨單胞菌(*Plesiomonas*)國際研討會，是每三年舉辦一次的國際研討會，歐洲和美洲國家依慣例輪流主辦，此次於波蘭樂斯拉夫 Wroclaw 舉辦，會議日期為 2023 年 6 月 21 日至 23 日。此一國際研討會聚集了研究世界上研究此兩種細菌的專家，互相分享最新的研究成果，並增加彼此交流合作的機會。筆者藉由參與此次會議，近一步提升成大醫院及台灣在相關領域的能見度，並促進將來國際相關研究者的交流和合作機會。

台南地區為產氣單胞菌盛行區域，臨床感染報告案例及分離菌株數目全球最多，成大醫院在相關微生物學及致病機轉研究頗具名聲，產器單胞菌是筆者的研究主題之一，在十年間發表了數十篇關於產氣單胞菌的微生物以及臨床感染論文，為此一領域的專家，因此獲邀擔任研討會的 **keynote speaker**。發表一小時的專題演講，講題為：達卡產氣單胞菌感染回顧：臨床感染及致病機轉(Review of *Aeromonas dhakensis* infection: clinical infections and pathogenesis)。

二、過程

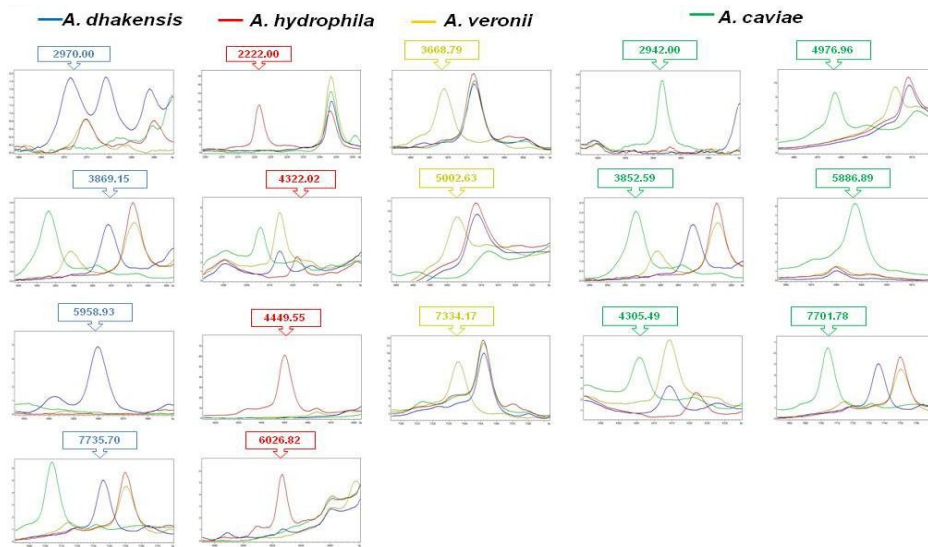
這次會議的主辦者 Marta Kaszowska 教授很早即邀請筆者與會並發表演說，其實此次會議應該是在 2020 年就該舉行，但因新冠肺炎全球疫情而耽擱，主辦單位於 2022 年底便與筆者約定，參加 2023 年 6 月的第 13 屆會議，並擔任會議最後一天的 keynote speaker。

筆者於 6 月 17 日由桃園國際機場出發，直飛德國法蘭克福，再經由該地轉飛波蘭樂斯拉夫，6 月 18 日抵達該地。會議期間住宿地點為 CAMPANILE WROCLAW CENTRUM 旅館。會議中筆者擔任第二天會議 Section III 的座長，並於第三天擔任會議的 keynote speaker，講題為達卡產氣單胞菌感染回顧：臨床感染及致病機轉(Review of *Aeromonas dhakensis* infection: clinical infections and pathogenesis)，演講內容摘要如下：

產氣單胞菌目前已知有 36 種菌種(species)，達卡產氣單胞菌(*Aeromonas dhakensis*)於 1993 年的孟加拉達卡市首次從腹瀉的小朋友分離出來，2003 年正式被確認為一全新的菌種。Aeromonas 全世界各大洲皆有分布，主要分布在熱帶及亞熱帶地區，東南亞尤其常見，澳洲也有不少的案例報告。達卡產氣單胞菌具有鞭毛結構，因此可以在環境中自由移動，適合的生長溫度為攝氏 28 至 42 度。

目前市面上的商用細菌鑑定系統，可以正確鑑定 Aeromonas 屬(genus)，但無法正確鑑定 Aeromonas 菌種(species)，基質輔助雷射脫附游離 Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)質譜儀理論上可以準確的鑑定產氣單胞菌菌種，但前提是須內建可供辨識的資料庫，但目前很多廠商的鑑別資料庫並無完整的資料可供辨識。分子生物鑑定法可以準確的鑑定產氣單胞菌菌種，例如全基因定序法(whole genome sequencing)，或是多重連接探針擴增技術(multiple ligation-dependent probe amplification, MLPA)。

我們過去的研究發現(下圖)，以質譜儀分析四種主要產氣單胞菌種(*A. dhakensis*、*A. hydrophila*、*A. cavaie*以及 *A. veronii*)，可以發現它們的頻譜皆不相同，一般生化反應不易區分的 *A. dhakensis* 和 *A. hydrophila*，可以利用質譜儀鑑別，因此若將相關資料鍵入資料庫中，質譜儀可以準確地鑑定臨床重要產氣單胞菌種。



P. L. Chen, T. F. Lee, C. J. Wu, S. H. Teng, L. J. Teng, W. C. Ko, et al. J Clin Microbiol 2014 Vol. 52 Issue 7 Pages 2625-8.

若以分子鑑定方法作為基準，分析文獻上發表的菌種，達卡產氣單胞菌排行第三位，佔所有分離菌株的 21.5%。

Species	Faeces	Wound	Blood	Respiratory Tract ^b	Urine	Peritoneal Dialysate	Bilis	Ascitic	Abscess	Other ^c Fluid	Total
<i>A. caviae</i>	446	43	147	11	12	11	11	2	3	4	690 (37.26)
<i>A. veronii</i>	231	49	125	12	1	1	6	7	1	2	435 (23.49)
<i>A. dhakensis</i> ^d	111	133	111	4	6	11	11	2	1	9	399 (21.54)
<i>A. hydrophila</i>	69	96	45	9	5	8	3	1	2	4	242 (13.07)
<i>A. media</i>	32	3	6		1						42 (2.27)
<i>A. trota</i>	2	2					1			1	6 (0.27)
<i>A. taiwanensis</i>	2	3	1			1					7 (0.32)
<i>A. salmonicida</i>	1	2							1		4 (0.21)
<i>A. jandaei</i>	3	2	1		1					1	8 (0.43)
<i>A. sanarellii</i>	1	4									5 (0.27)
<i>A. allosaccharophila</i>	2		1								3 (0.16)
<i>A. tecta</i>	2										2 (0.11)
<i>A. diversa</i>		2									2 (0.11)
<i>A. schubertii</i>		1	1								2 (0.11)
<i>A. bestiarum</i>	1	1	1	1							4 (0.21)
<i>A. popoffii</i>					1						1 (0.05)
<i>A. intestinalis</i> ^e	1										1 (0.05)
<i>A. enterica</i> ^e	1										1 (0.05)
Total	905	341	439	37	27	32	32	12	8	20	1852

A. Fernandez-Bravo and M. J. Figueras. Microorganisms 2020, 17;8(1):129.

台灣南部是達卡產氣單胞菌重要的流行地區，根據我們之前的調查顯示，產氣單胞菌株可以從市面販售的海鮮和臨床檢體分離出來，顯示台南居民可能有從污染的水產品感染的風險。而且以線蟲和細胞測試臨床和水產品的分離菌株，兩者的毒力相當，暗示居民若經由食物接觸到產氣單胞菌，可能會造成臨床感染。

目前文獻上有多種可以測試產氣單胞菌毒性的動物實驗模式，包括小鼠、鯰魚、毛足鬥魚、斑馬魚、黏菌以及線蟲。此外多種細胞也可用來測試產氣單胞菌的毒性，文獻中提及的細胞羅列如下表：

Cell line	Study	
HEp-2, Vero	Adhesion and cytotoxicity	<i>A. hydrophila</i> , <i>A. salmonicida</i> , <i>A. veronii</i> , <i>A. bestiarum</i> , <i>A. schuberti</i> , <i>A. eucrenophila</i> , <i>A. encheleia</i> , <i>A. jandaei</i> , <i>A. sobria</i> , <i>A. caviae</i> , <i>A. trota</i> , <i>A. media</i>
HEp-2, CHO	Cell-contact cytotoxicity	<i>A. hydrophila</i> , <i>A. caviae</i> , <i>A. veronii</i>
C2C12	Cytotoxicity	<i>A. hydrophila</i> , <i>A. dhakensis</i>
HEp-2	Adhesion, biofilm formation, and immune stimulation	<i>A. hydrophila</i>
HEp-2, Caco-2, T-84	Adhesion, invasion, and cytotoxicity	<i>A. hydrophila</i> , <i>A. caviae</i>
RAW 264.7	Role of mixed infections in Necrotizing fasciitis	<i>A. hydrophila</i>
Caco-2	Adhesion and cytopathic effect	<i>A. hydrophila</i> , <i>A. dhakensis</i> , <i>A. bestiarum</i> , <i>A. piscicola</i> , <i>A. salmonicida</i>
HepG2, WLR-68	Cytotoxicity effect of metalloprotease	<i>A. hydrophila</i>
Caco-2	Adhesion, invasion, and cytotoxicity	<i>A. salmonicida</i>
J744.1	Role of metallochaperone HypA	<i>A. hydrophila</i>
THP-1	Cell damage, immune response	<i>A. dhakensis</i> , <i>A. caviae</i> , <i>A. veronii</i> , <i>A. A. media</i> , <i>A. jandaei</i> , <i>A. piscicola</i>
RAW264.7	Role of mixed infections in Necrotizing fasciitis	<i>A. hydrophila</i>

Adapted from ref. of Fernandez-Bravo et al. *Microorganisms* **2020**, 8, 129. Fernandez-Bravo et al. *Front. Immunol.* 13:875689.

台南地區是全世界文獻上報告，產氣單胞菌感染密度最高的區域，以菌血症為例，台南地區的盛行率為每年每百萬人口 76 人感染，美國加州為 0.58 人，英格蘭和威爾斯地區為 1.5 人，法國地區為 0.66 人，澳洲地區則為 5.1 人。台灣產氣單胞菌臨

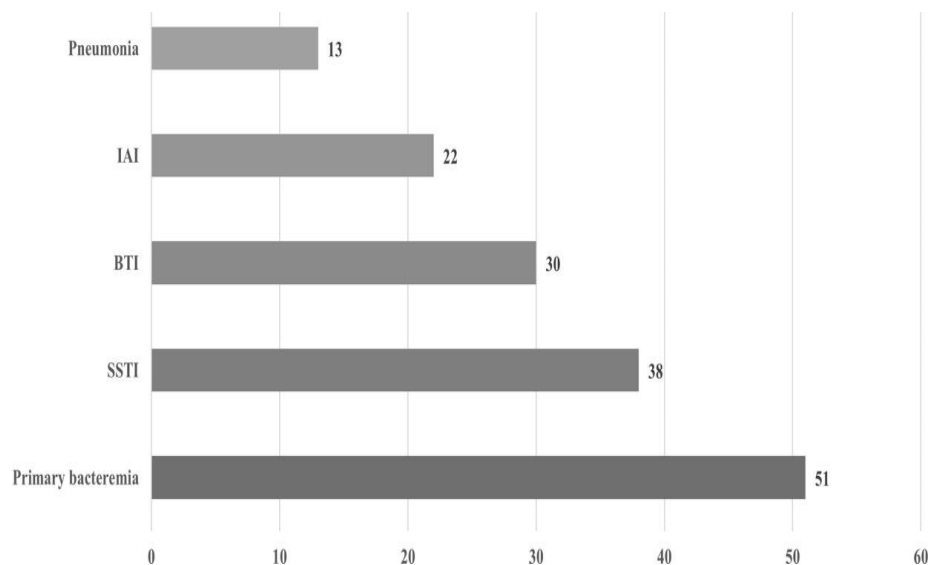
床感染在文獻報告的數目最多，包括敗血症、腹膜炎、尿道感染、膽道感染、軟組織感染和肺炎，相關文獻和作者整理如下表：

Year	Area	Infection site	Case no.	Author/ Reference
1995	Tainan	Blood	59	Ko WC et al. Clin Infect Dis. 1995;20:1298-304.
2000	Tainan	Blood	104	Ko WC et al. J Infect. 2000 ;40:267-73.
2007	Tainan	Blood	116	Wu CJ et al. J Infect. 2007 ;54:151-8.
2009	Tainan	spontaneous bacterial peritonitis	31	Wu CJ et al. J Formos Med Assoc. 2009 ;108:293-300.
2011	Taipei, Dalin, Hualien	Blood	154	Chuang et al. J Korean Med Sci. 2011;26:1415-20.
2012	Tainan	GU infection	19	Chao CM et al. J Infect. 2012;65:573-5.
2013	Tainan	Skin and soft- tissue infections	129	Chao CM et al. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012 8;32:543-7.
2013	Tainan	Biliary tract infection	91	Chao CM et al. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2013;32:245-51.
2013	Tainan	Pneumonia	84	Chao CM et al. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2013;32:1069-75.
2014	Tainan	Blood	91	Tang HJ et al. PLoS One. 2014 10;9:e91642.

下圖是本院一位病人，在感染了登革熱後，併發達卡產器單胞菌壞死性筋膜炎和敗血症而死亡，病人死亡前出現典型的出血性水泡(A)，電腦斷層顯示肌肉已經開始壞死(B)。

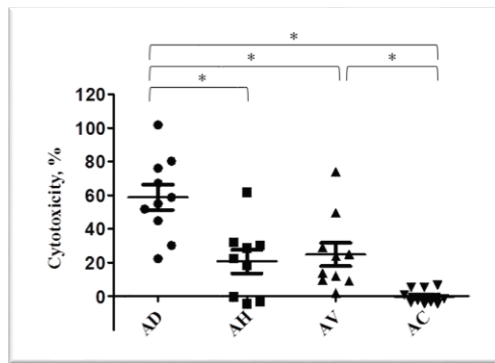


雖然我們已知產氣單胞菌可以造成臨床嚴重的感染，但它的致病機轉還不是很清楚，它的毒性可能是多原因的，包括它會產生多種毒素、可以適應各種不同的環境壓力、對於多種抗生素具有抗藥性，此外，免疫功能不佳病人一旦感染死亡率很高也是原因之一。成大研究團隊之前分析 151 位產氣單胞菌菌血症病人，達卡產氣單胞菌感染者 48 位，人數最多，而且死亡率 25.5% 最高，其中 30 位病人有肝硬化，比例高達 62.5%，由於達卡產氣單胞菌抗藥性高，因此只有 70.8% 感染者初期接受合適的經驗性抗生素治療。成大團隊接續分析 2016-2018 年產氣單胞菌感染者，發現比例最高者為維隆產氣單胞菌(*A. veronii*)，佔所有感染者比例為 31.1%，其次為豚產氣單胞菌(*A. caviae*)，比例為 24.8%，親水產氣單胞菌(*A. hydrophila*) 比例為 23.0%，達卡產氣單胞菌佔 16.7%。感染部位以菌血症比例最高，其次為軟組織感染(SSTI)，以及膽道感染(BTI)。

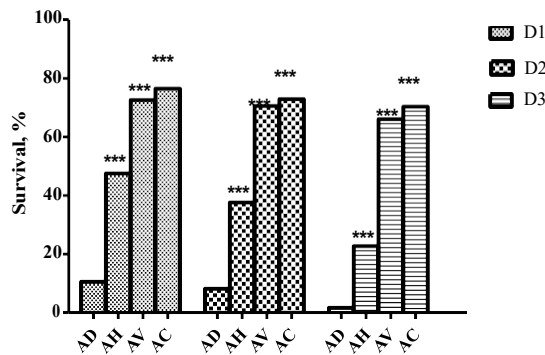


中國的研究也發現，達卡產氣單胞菌是最常見造成產氣單菌敗血症的菌種，在安徽省一家醫院所做的分析顯示，達卡產氣單胞菌所佔比例最高，達 44.8%，而且卡產氣單胞菌敗血症是所有達卡產氣單胞菌菌種造成敗血症，預後最差的，尤其是病人有肝硬化或未接受適當經驗性抗生素治療者。東北亞國家日本及南韓，也有相似的發現。

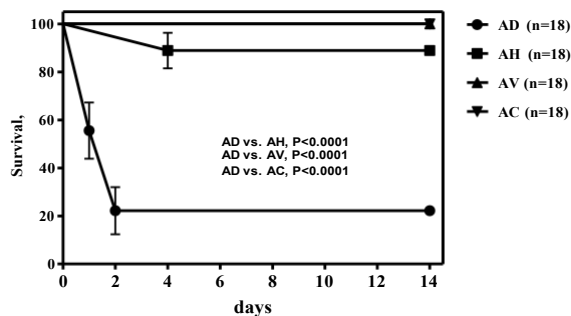
達卡產氣單胞菌帶有多重的毒力因子，例如第二型分泌系統(T2SS)分泌的毒素 Act 和 Aerolysin，第三型分泌系統(T3SS)所分泌的毒素 AexU，第六型分泌系統(T6SS)所分泌的毒素 Vgr、Hcp、VasH 以及 VasK。成大研究團隊過去利用小鼠肌纖維母細胞 C2C12(上圖)、線蟲感染模式(中圖)以及小鼠肌肉感染模式(下圖)，皆證明達卡產氣單胞菌的毒性比其他三種產氣單胞菌種強。



Chen PL et al. PLoS ONE 2014, 9:e111213.



Chen PL et al. PLoS ONE 2014, 9:e111213.

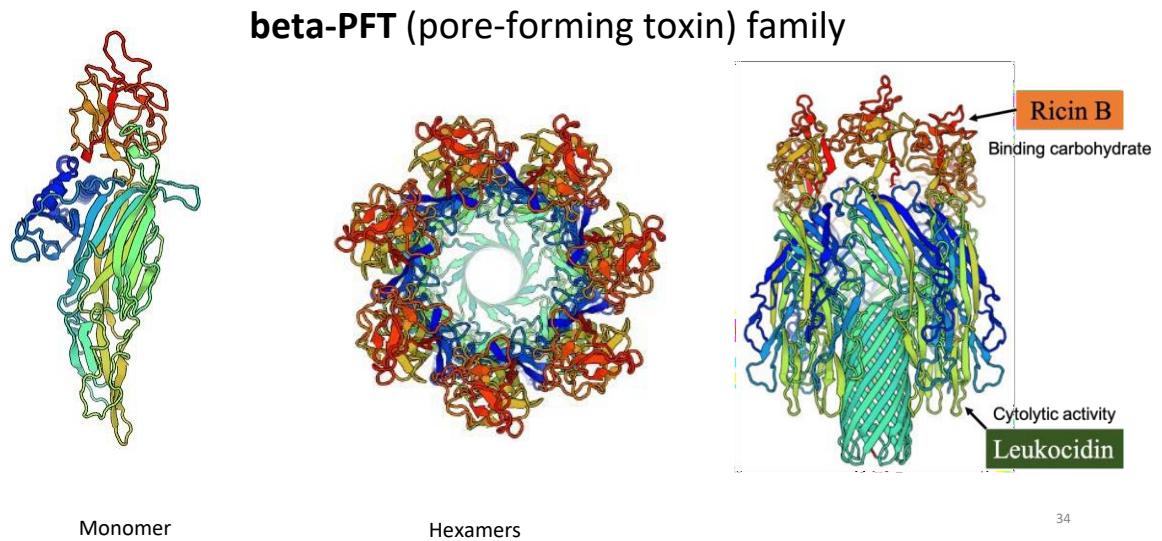


Chen PL et al. PLoS ONE 2014, 9:e111213.

我們最有興趣的是達卡產氣單胞菌分泌的穿孔毒素(pore-forming toxin)Ahh1，Ahh1 毒素會由接觸到細胞表面後，單體(monomer)會形成七聚體(hexamers)，Ricin-B 是和細胞表面上的受體接合位置，Leukocidin 則是具有細胞毒性，會在細胞膜穿孔。下圖是利用 Swiss model 電腦預測軟體的 Ahh1 結構。

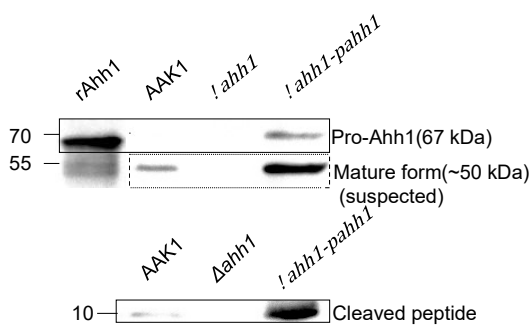
Structure of Ahh1 predicted by Swiss model

<https://swissmodel.expasy.org>

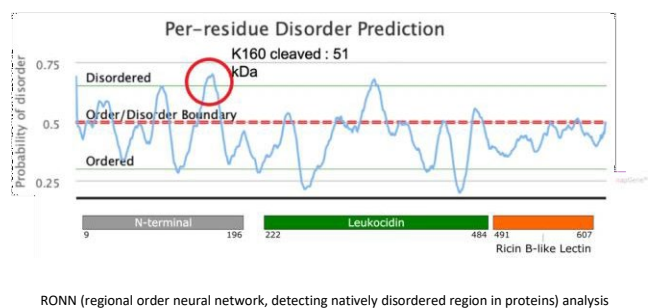


根據預測，Ahh1 穿孔毒素大小為 67kDa，在 N 端切割後形成 50kDa 大小的成熟毒素，我們所做的西方墨點實驗證實未被切割前的 Ahh1 毒素為 67kDa，被切割後的成熟 Ahh1 毒素為 50kDa。

Western blot of mature and cleaved Ahh1



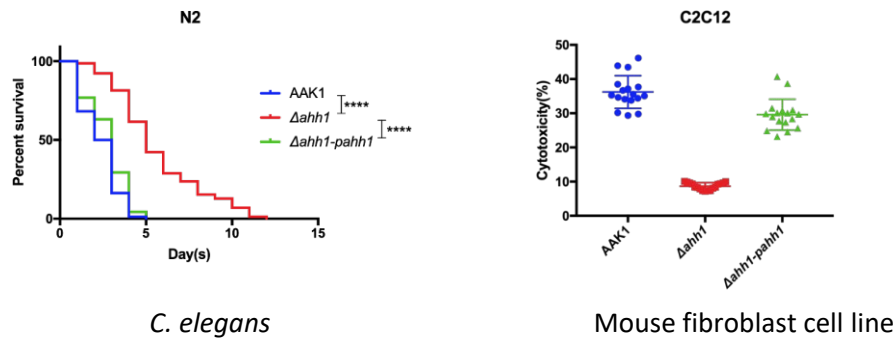
Predicted cleavage site of Ahh1



36
Unpublished data

我們利用線蟲及小鼠 C2C12 纖維母細胞進行菌株毒性試驗，結果顯示 *ahh1* 突變株的毒性減弱，減毒株回補 *ahh1* 表現質體後毒性回復。

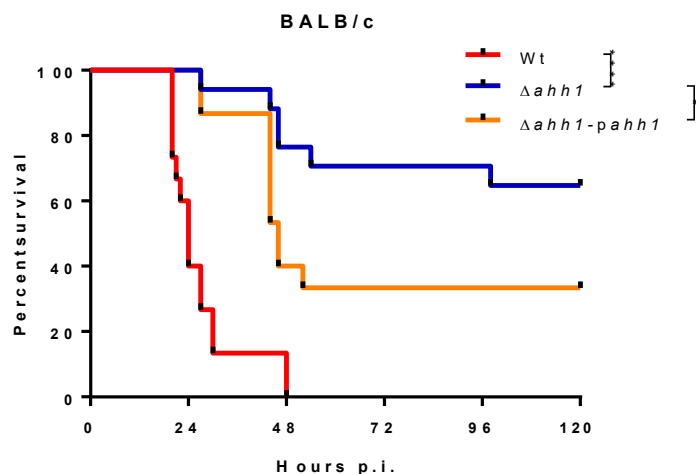
Ahh1 is crucial for the virulence of *A. dhakensis*



38
Unpublished data

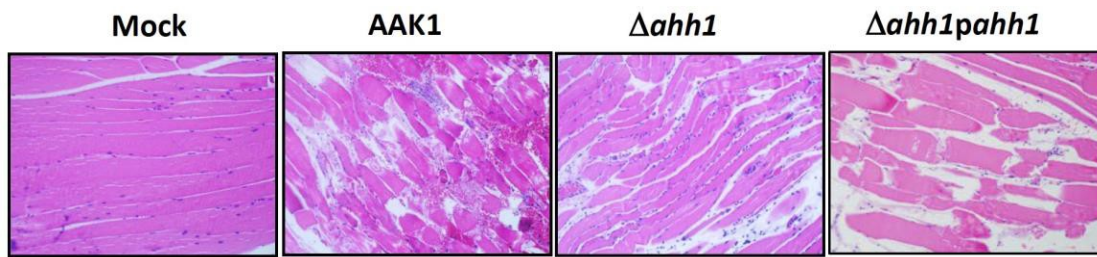
利用小鼠肌肉感染模式測試菌株毒性，所得結果也與線蟲和細胞結果相符。感染 *ahh1* 突變株的老鼠，存活率明顯高於野生株(wild type)，組織切片也顯示，*ahh1* 突變株所造成的發炎細胞浸潤輕微，與野生株和 *ahh1* 質體回補株相比，感染 *ahh1* 突變株的老鼠肌肉組織變形和斷裂情形同樣較輕微。

Aeromonas dhakensis intramuscular infection mice model



39
Unpublished data

Histological findings of intramuscular infection in the mice model

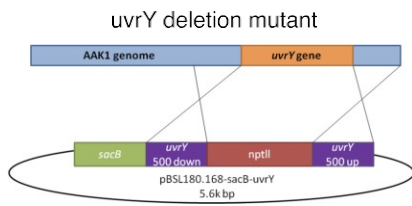


40
Unpublished data

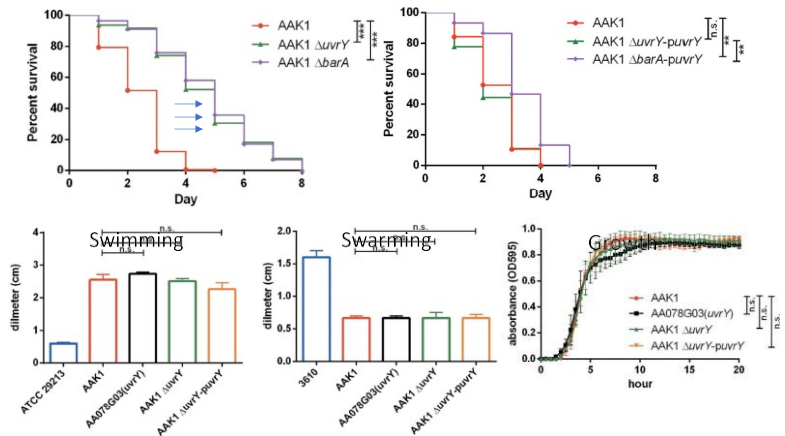
此外，成大研究團隊也利用線蟲感染模式作為篩選工具，篩選達卡產氣單胞菌跳躍子(Transposon)突變株，篩選出減毒的 *uvrY* 突變株。並進一步證實 *uvrY* 和 *BarA* 突變株對於線蟲的毒性減弱，*uvrY-BarA* 是雙分子調控系統(two-component system)，*uvrY* 會被 *BarA* 磷酸化而激化，*uvrY* 回補至 *BarA* 突變株後，毒性並沒有明顯的回復，暗示 *BarA* 可能調控產氣單胞菌的其他毒力因子，而且 *uvrY* 突變株並沒有因而減少本身游動(swimming)、泳動(swarming)以及生長的能力。

BarA-UvrY two-component system affects virulence of *A. dhakensis*

C. elegans survival assay



- uvrY complement of uvrY deletion mutant using pwf417
- barA deletion mutant
- uvrY complement of barA deletion mutant
- UvrY(D54A) complement of uvrY deletion mutant
- UvrY(D54E) complement of uvrY deletion mutant

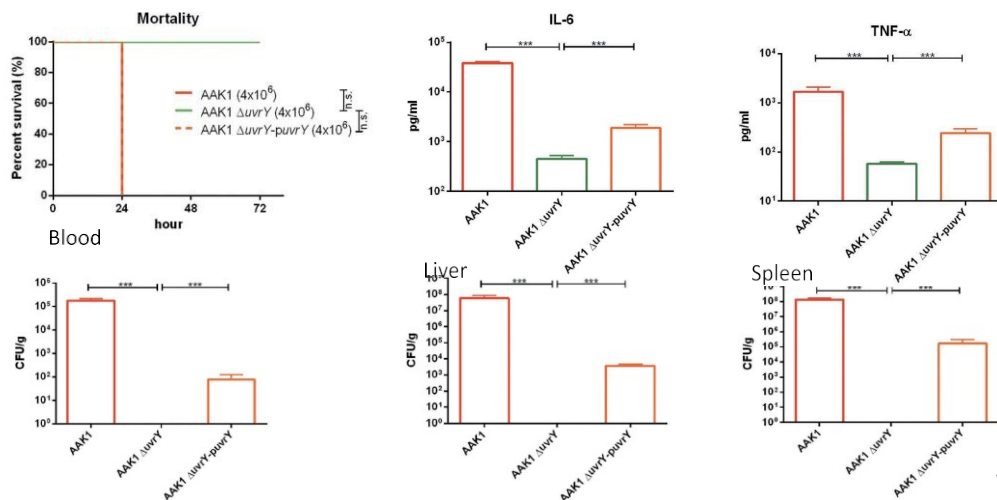


43
Chen YW et al. Virulence 2020, 11:1, 502-520

我們利用小鼠測試 uvrY 突變減毒株，得到一致的結果，uvrY 突變減毒株並沒有造成感染小鼠的死亡，與原始株和毒性回復株相比，不只死亡率相差大，感染後的發炎指數在減毒株感染的小鼠也明顯下降，證實 uvrY 控制了達卡產氣單胞菌毒性的表現。

Chen YW et al. Virulence 2020, 11:1, 502-520.

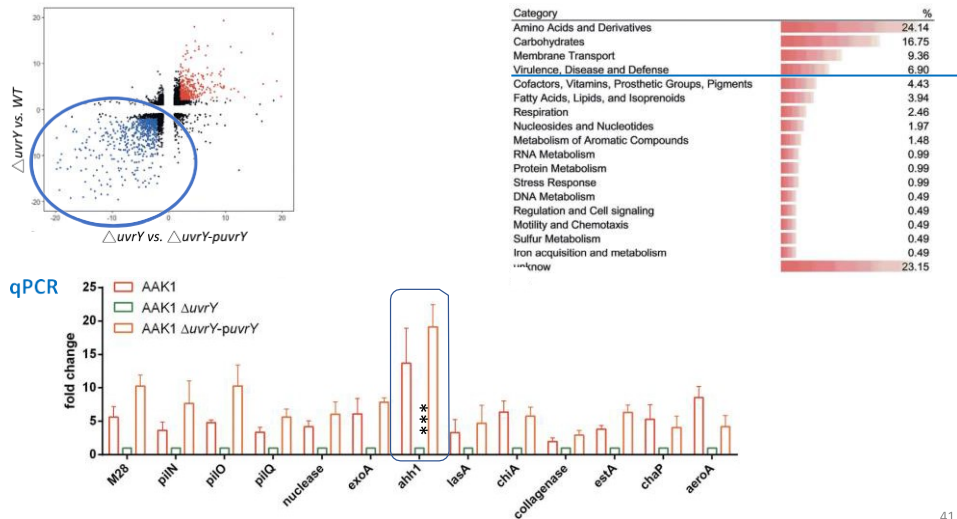
UvrY is required for *A. dhakensis* virulence in a mouse intraperitoneal infection model



44

我們也利用 transcriptome 分析，證實 uvrY 調控了不少的毒力因子，而其中之一就是 Ahh1 穿孔毒素。Ahh1 訊息 RNA 在 uvrY 突變株的表現明顯下降。

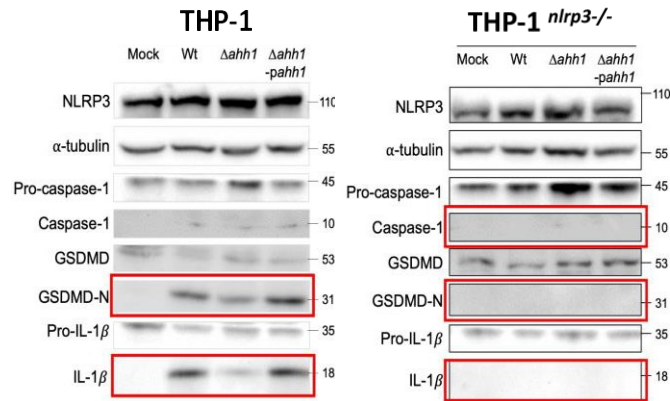
Virulence factors regulated by UvrY in *A. dhakensis*



41
Chen YW et al. Virulence 2020, 11:1, 502-520.

在此次特別演講中，我們也特別報告了近期的研究成果，聚焦在 Ahh1 毒素感染引起細胞反應的過程，達卡產氣單胞菌感染人類單核球細胞 THP-1 後，會引起 NLRP3 inflammasome(發炎體)的活化，引起下游 GSDMD 和 IL-1 β 的活化，進而引起細胞的死亡，但是 Ahh1 突變減毒株，NLRP3 inflammasome 活化及細胞死亡的程度會大幅下降。同樣地，THP-1 細胞的 NLRP3 突變株，受到達卡產氣單胞菌感染後，GSDMD 和 IL-1 β 的活化程度也會降低。

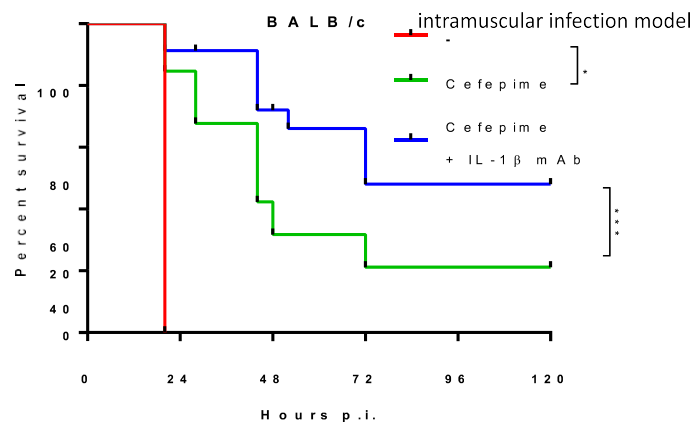
Ahh1 causes cell damage mediated by activating NLRP3 inflammasome



49
Unpublished data

若我們使用 IL-1 β 抗體合併抗生素 cefepime 治療達卡產氣單胞菌軟組織感染的小鼠，結果顯示，與單純使用抗生素治療，抗生素合併 IL-1 β 抗體療法可以提升小鼠感染後的存活率。

Combination treatment of antibiotic and IL-1 β antibody prolong the mice survival



50
Unpublished data

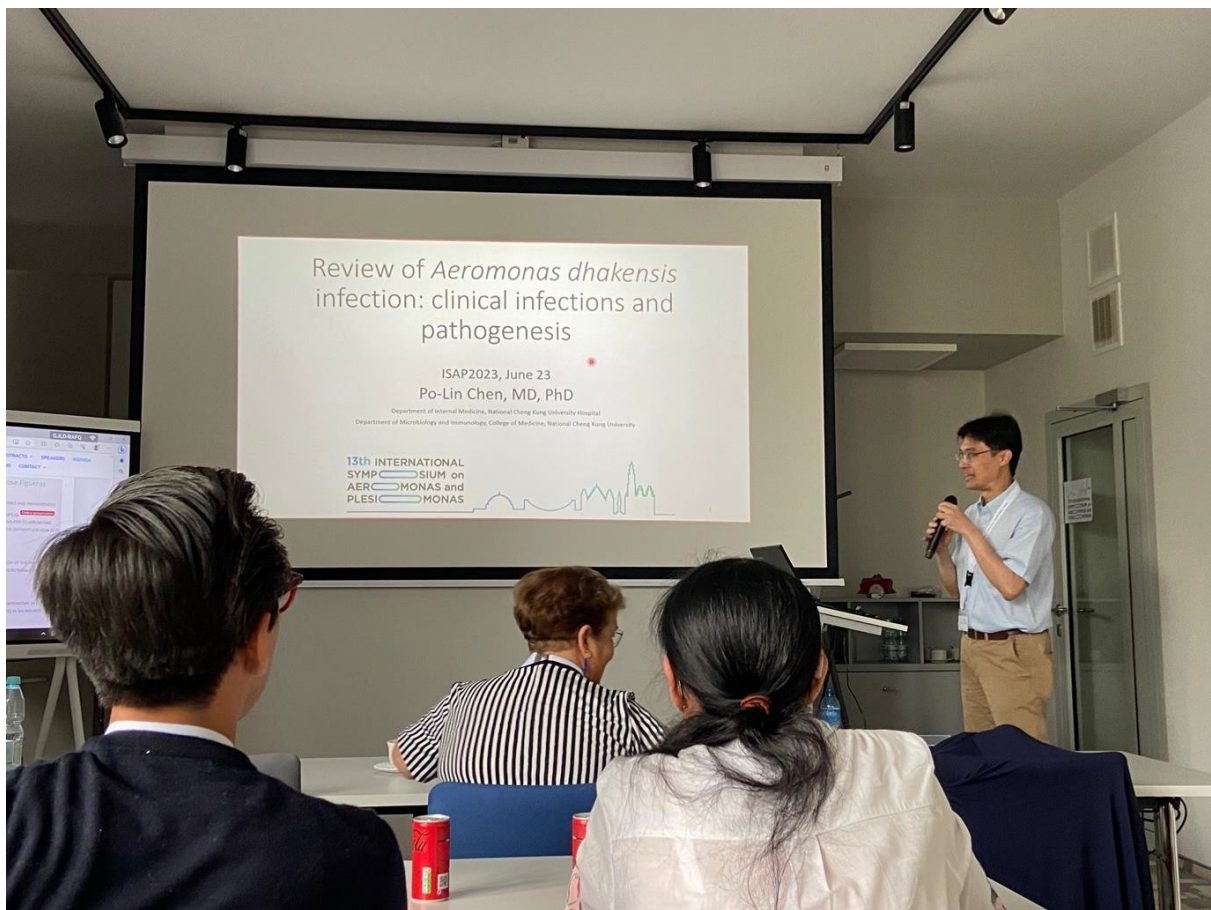
最後，在特別演講中提到產氣單胞菌的抗藥性，將近三成的親水產氣單胞菌、維隆產氣單胞菌和達卡產氣單胞菌對於 carbapenems 類藥物具有抗藥性，而且這三種菌種，幾乎都攜帶了 carbapenem 抗藥性基因 *cphA*，這不得讓我們慎重考慮，以

carbapenem 作為治療產氣單胞菌是否合適，若是嚴重的產氣單胞菌感染，不建議以 carbapenem 類藥物作為經驗性治療藥物，應該考慮其他的藥物，例如第四代頭孢菌素 cefepime、tigecycline 或是 fluoroquinolones。

三、心得

此次在波蘭舉行的產氣單胞菌(*Aeromonas*)及臨單胞菌(*Plesiomonas*)國際研討會，因為 COVID-19 疫情耽擱，睽違六年再度舉辦，和世界各國微生物學家再度聚首，會議中也新認識了許多投入此一研究領域的年輕科學家，世界上此一領域的微生物學家人數不多，但都很友善，並且樂於合作，我們將尋求合適的時機，開啟雙邊合作的機會。根據我的預測，由於全球暖化，各地溫度逐漸攀高，產氣單胞菌及臨單胞菌適合生長在溫度高的區域，相信將來不只在熱帶地區，溫帶地區的發生率也將逐漸升高，威脅當地民眾的健康，是一個值得重視的議題。

此次會議的舉行地點：Hirsfeld 研究所 (Hirsfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy)，是隸屬於波蘭科學院的獨立研究機構，位於波蘭第四大城樂斯拉夫，該市舊城區保留了傳統歐洲接到的樣貌，路面電車交通方便，費用便宜，筆者開會之虞，也利用餘暇參訪了該市舊城區，當地民眾友善，治安良好，人民素質高，交通井然有序，市區處處可見綠地，雖然現代化，但不會有壓迫感，是一個適合旅遊的城市。



照片中為筆者在會議中發表專題演講

四、建議

此次會議期間，各國的專家都希望將來能在亞洲地區的台灣舉辦會議，由於成大是世界研究產氣單胞菌重要機構之一，若能舉辦國際學術研討會將別具意義，並能增加成大在世界上的能見度，吸引更多的研究者前來交流。不過因為筆者身兼臨床、行政及研究業務，籌畫下屆會議分身乏術，因此予以婉拒，因此三年後會議將在美國威斯康辛舉辦，但研究產氣單胞菌最資深的西班牙 Figruas 教授，仍然希望將來台灣的學者能負責舉辦此一研討會，筆者也會多方徵詢意見，尋求各界的支持，將來時機成熟之際，能夠在台灣舉辦產氣單胞菌(*Aeromonas*)及臨單胞菌(*Plesiomonas*)國際研討會。