

研究报告

圈养林麝铜绿假单胞菌的分离鉴定及耐药性和病原特性分析

郝立新¹ 陈珍容¹ 宋宏宇¹ 任露¹ 文继峰¹ 黄杰¹ 杨锐¹ 杨光友¹ 王洪永² 颜其贵^{1*}

(1. 四川农业大学动物医学院 四川 成都 611130)

(2. 四川夹金山逢春养殖科技有限公司 四川 宝兴 625700)

摘要:【背景】铜绿假单胞菌感染所致的化脓性疾病是困扰林麝驯养的重要因素，是一类较难防治的细菌性疾病，目前尚无疫苗可用来预防该病。【目的】研究林麝源铜绿假单胞菌的感染现状和分子流行病学规律。【方法】对 2014 年 10 月至 2015 年 10 月四川宝兴和陕西镇坪两个林麝养殖中心发病林麝中铜绿假单胞菌进行分离鉴定，并对其耐药情况进行分析，利用脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型技术研究分离菌的 PFGE 指纹图谱，探究其流行病学趋势，并对部分菌株的致病性进行分析。【结果】分离得到 60 株铜绿假单胞菌，其中 34 株来自镇坪，26 株来自宝兴。耐药结果表明：60 株林麝源铜绿假单胞菌对 17 种抗菌药物呈现不同程度耐药性，不同地区和不同样本源间分离的铜绿假单胞菌对 17 种抗菌药物的耐药性总体趋于一致，多重耐药情况严重，以 5 耐、6 耐为主。分型结果显示：60 株铜绿假单胞菌 PFGE 图谱的相似性为 49.1%–100%。经聚类分析得到 A–O 共 15 种基因簇，其中优势基因簇为 C、E、G、J。致病性结果表明，流行菌株的致病力强弱依次为：动物源菌株>环境源菌株，且主要流行菌株(基因簇 E、F、J)的致病力大于其余菌群。【结论】铜绿假单胞菌在两地区具有水平传播的途径，本研究可为跨地区林麝化脓性炎症的防控提供理论依据。

关键词: 林麝，铜绿假单胞菌，分离鉴定，耐药性，致病性，分型

Isolation, identification and drug-resistance, pathogeny characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* from captive forest musk deer

XI Li-Xin¹ CHEN Zhen-Rong¹ SONG Hong-Yu¹ REN Lu¹ WEN Ji-Feng¹ HUANG Jie¹
YANG Rui¹ YANG Guang-You¹ WANG Hong-Yong² YAN Qi-Gui^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China)

(2. Sichuan JiaJinShan FengChun Breeding Technology Co. Ltd., Baoxing, Sichuan 625700, China)

Abstract: [Background] The suppurative disease, a bacterial infection caused by *Pseudomonas aeruginosa* and relatively difficult to prevent, has been a difficult problem in the domestication and breeding of forest musk deer. Currently, no vaccine is available. [Objective] To study the status of

Foundation item: Science and Technology Support Project of Sichuan Province (2014SZ0132)

*Corresponding author: E-mail: yanqigui@126.com

Received: March 30, 2017; **Accepted:** June 21, 2017; **Published online** (www.cnki.net): August 31, 2017

基金项目: 四川省科技支撑计划(2014SZ0132)

*通信作者: E-mail: yanqigui@126.com

收稿日期: 2017-03-30; 接受日期: 2017-06-21; 网络首发日期(www.cnki.net): 2017-08-31

infection and molecular epidemiology of *P. aeruginosa*. [Methods] *P. aeruginosa* strains were isolated from two forest musk breeding centers in Zhenping County, Shaanxi Province and Baoxing County, Sichuan Province from October 2014 to October 2015, as well as their drug resistance was tested by traditional bacteriological methods. The fingerprint data bank of all strains was established by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) typing, PFGE data were analyzed by BioNumerice software to reveal the prevalence pattern, and the pathogenicity of some isolates was analyzed. [Results] In total 60 *P. aeruginosa* strains were isolated, of which 34 were isolated from Zhenping, and 26 were isolated from Baoxing. The isolated *P. aeruginosa* strains were resistant to 17 antimicrobial agents at different levels, and the isolates from different area or different samples exhibited similar resistance phenotype. Multi-resistance was observed among the *P. aeruginosa* isolates, most of them exhibited multidrug-resistance to 5 and 6 antimicrobial agents. PFGE spectrum similarity of the 60 strains was between 49.1% and 100%, and A to O 15 PFGE types were obtained through cluster analysis, C, E, G, J were the dominant types. The virulence experiment on mice (LD₅₀) suggested that the strains from animals were far more virulent than those isolated from the environmental, and the dominant bacterial type (E, F, J gene type) were more virulent than other strains. [Conclusion] There was horizontal transmission path with *P. aeruginosa* in different areas. The data provide a basis for prevention and treatment of suppurative inflammation in the captive musk deer.

Keywords: Forest musk deer, *Pseudomonas aeruginosa*, Isolation and identification, Resistant, Pathogenicity, Cluster

林麝是一类生性独居的反刍动物, 野生资源主要分布在我国的西南地区^[1]。雄麝分泌的麝香具有珍贵的药用价值, 另外在工业上被用来制造香水。近年来, 由于野生麝类资源的不断减少, 麝类动物被列入国家一级保护动物名单^[2]。我国从 20 世纪 50 年代就已经开始进行人工养殖, 但是疾病一直是限制其发展壮大的重要原因。消化不良、肺炎、子宫炎、尿结石和化脓性疾病是林麝的常见病, 在实际生产中化脓性疾病是林麝的主要疾病之一, 对人工养殖有很大的威胁^[3]。据统计, 患化脓性疾病的林麝占病麝的 50% 以上, 而在因病死亡的林麝中, 与化脓有关的占死亡总数 50% 以上^[4]。

铜绿假单胞菌是重要的条件致病菌, 常常引起免疫低下, 使动物机体出现化脓性疾病。铜绿假单胞菌会通过感染动物或病死动物的排泄物、分泌物排出体外, 污染整个饲养环境, 从而造成该疾病的难防治和难治愈^[5]。为了有效地根除铜绿假单胞菌引发的化脓性疾病, 明确菌株间的亲缘关系是至关重要的一步。本实验对 2014 年 10 月至 2015 年 10 月四川宝兴和陕西镇坪两个林麝养殖场林麝铜绿假单胞菌感染情况进行调查, 利用脉冲场凝胶电泳 (Pulsed field gel electrophoresis, PFGE) 分型技术研究

60 株分离菌的 PFGE 指纹图谱, 探究其流行趋势, 以期在林麝化脓性疾病的防控方案提供科学的参考。

1 材料与方法

1.1 样本来源

采集 2014 年 10 月至 2015 年 10 月间宝兴和镇坪两个地区林麝养殖场中的空气、土壤、粪便、饮水、污水、卧台、鼻拭子、尿液、伤皮、伤口脓汁、血液、死亡病麝剖解脏器样本共计 124 份, 其中 64 份采集于宝兴, 60 份采集于镇坪。

1.2 菌株、培养基、主要试剂与抗菌药物

质控菌株: 大肠杆菌 ATCC25922、铜绿假单胞菌 ATCC27853、沙门氏菌 H9812 由四川农业大学动物医学院药学系实验室惠赠。M-H 肉汤培养基、NA 营养琼脂等细菌分离试剂购自青岛日水生物技术有限公司; DNA Marker、2×Taq PCR Master Mix、琼脂糖、限制性内切酶 *Spe* I 和 *Xba* I、溴化乙锭 (EB, 0.5 μg/mL) 均购自日本 TaKaRa 公司; 十二烷基肌氨酸钠、EDTA-Na₂ 等均购自博大万科实验器材有限公司; 哌拉西林、羧苄西林、头孢他啶、头孢吡肟、头孢哌酮、头孢曲松、头孢西丁、亚胺培南、安曲南、庆大霉素、丁胺卡那、四环素、多西环素、环

丙沙星、诺氟沙星、阿奇霉素、复方新诺明药敏纸片均购自杭州微生物试剂有限公司。

1.3 主要仪器

超净工作台, 苏净集团安泰有限公司; 低温高速离心机, 美国 Thermo 公司; PCR 仪、PFGE 凝胶电泳系统、脉冲场凝胶电泳仪、凝胶成像系统, 美国 Bio-Rad 公司。

1.4 实验小鼠

21 g 左右的 KM 小鼠购自成都达硕实验动物有限公司。

1.5 铜绿假单胞菌的分离鉴定

使用 16S rRNA 基因通用引物, 上、下游引物序列分别为 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'和 5'-ACGGCTACCTTGTACGACTT-3', 对具有特殊菌落形态的菌株进行 PCR 鉴定。PCR 反应体系 (25 μ L): 2 \times Taq PCR Master Mix 12.5 μ L, 上、下游引物 (0.5 μ mol/L) 各 1 μ L, ddH₂O 9.5 μ L, DNA 模板 1 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 53 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。同时设立阴性对照。PCR 扩增完成后, 取 7 μ L 产物经 1% 琼脂糖凝胶进行电泳分析, 目的条带纯化后送成都擎科梓熙生物技术有限公司测序。

1.6 药敏试验与数据统计分析

采用微量肉汤稀释法进行药敏试验, 具体操作参考文献[6]。使用 SPSS 19.0 软件对不同地区及不同样本源菌株的耐药率进行卡方检验, 并对多重耐药情况分析讨论。

1.7 PFGE 实验

PFGE 实验流程参照文献[7]适当修改后进行: 将分离菌株 37 $^{\circ}$ C、150 r/min 培养过夜至 2.0 麦氏比浊度, 包埋入 1% 的 SeaKem Gold 胶块中, 用蛋白酶 K 于 37 $^{\circ}$ C 消化过夜释放出基因组 DNA; 然后用 *Spe* I 限制性内切酶于 37 $^{\circ}$ C 消化 4 h, 沙门氏菌 H9812 作为标准 Marker 菌株用 *Xba* I 进行同步处理; 消化完成的小胶块包埋入电泳胶进行电泳, 电泳条件如表 1 所示, 电泳完成后用 EB 染液染色 30 min; 显色照相后用 BioNumerice 软件分析, 用非加权配对

表 1 PFGE 电泳参数设置

Table 1 The electrophoresis parameters of PFGE

参数 Parameters	数值 Value
初始转换时间 Initial switch time	5 s
最终转换时间 Final switch time	45 s
电压 Voltage	6 V
变相角度 Included angle	120 $^{\circ}$
电泳时间 Run time	18 h

算数平均法 (Unweighted pair group with arithmetic averages, UPGMA) 进行聚类分析, 构建聚类树。

1.8 流行菌株致病性比较分析

结合分型结果和样本来源选取 25 株铜绿假单胞菌, 分别无菌操作挑取单个菌落接种于 M-H 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、150 r/min 培养 12 h。活菌计数将菌液浓度调整为约 1.0×10^9 CFU/mL, 将菌液稀释 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 倍后注射小鼠腹腔, 每个浓度梯度各 6 只, 雌雄对半, 每只 0.3 mL。观察小鼠的临床表现, 记录小鼠死亡数, 解剖死亡小鼠观察脏器病理变化并进行铜绿假单胞菌再分离, 采用 SPSS 分析软件计算 LD₅₀。

2 结果与分析

2.1 铜绿假单胞菌的分离鉴定

共采集了 124 份样本, 除饮水、卧台、血液样本外, 其余样本类型均分离出有特殊菌落特征的菌株: 菌落都具有透明、表面光滑、有金属光泽且具有特殊的生姜香味等。分子生物学方法检测结果显示: 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 16S rRNA 基因的扩增片段大小约为 1 500 bp, 与目的片段大小一致。测序结果经 BLAST 比对分析, 结果显示所有分离菌株的 16S rRNA 基因部分序列与铜绿假单胞菌的一致性高达 99% 以上, 确定所有分离菌均为铜绿假单胞菌, 共计 60 株, 镇坪地区铜绿假单胞菌的总检出率为 56.67% (34/60), 宝兴地区铜绿假单胞菌的总检出率为 40.63% (26/64)。

2.2 铜绿假单胞菌的药物敏感性试验

60 株林麝源铜绿假单胞菌对 17 种抗菌药物呈现不同水平的耐药性, 详见表 2。其中对头孢曲松、

表 2 60 株铜绿假单胞菌对 17 种抗菌药物敏感性试验
Table 2 The results of susceptibility of *P. aeruginosa* isolates

抗菌药物 Antimicrobials		敏感 Sensitive		中介 Intermediary		耐药 Resistant	
药物分类 Classification	药物名称 Name	数量(个) Number	比例 Ratio (%)	数量(个) Number	比例 Ratio (%)	数量(个) Number	比例 Ratio (%)
青霉素类 Penicillins	PIP	59	98.33	0	0.00	1	1.67
	BAR	33	55.00	19	31.67	8	13.33
头孢类 Cephalosporins	CAZ	55	91.67	3	5.00	2	3.33
	FEP	60	100.00	0	0.00	0	0.00
	CFP	43	71.67	13	21.67	4	6.67
	CRO	12	20.00	9	15.00	39	65.00
碳青霉烯类 Carbapenems	CFX	44	73.33	0	0.00	16	26.67
	IPM	30	50.00	8	13.33	22	36.67
单环内酰胺类 Monocyclclactam	AZM	35	58.33	10	16.67	15	25.00
氨基糖苷类 Aminoglycosides	GEN	52	86.67	1	1.67	7	11.67
	AMK	56	93.33	2	3.33	2	3.33
四环素类 Tetracycline	TET	0	0.00	2	3.33	58	96.67
	DOX	0	0.00	1	1.67	59	98.33
喹诺酮类 Quinolones	CIP	60	100.00	0	0.00	0	0.00
大环内酯类 Macrolides	NOR	60	100.00	0	0.00	0	0.00
	AZI	11	18.33	2	3.33	47	78.33
磺胺类 Sulfonamides	SMZ	0	0.00	0	0.00	60	100.00

四环素、多西环素、阿奇霉素和磺胺异恶唑表现出极高水平耐药(65%–100%); 对头孢西丁, 氨曲南、亚胺培南表现出较低水平的耐药(25%–36.67%); 对羧苄西林、庆大霉素表现出低水平耐药(11.67%–13.33%); 同时检测出部分分离菌株对羧苄西林、头孢哌酮、头孢曲松、亚胺培南、氨曲南表现出耐药中介率, 表明这些菌株存在耐药水平升高风险。

60 株林麝源铜绿假单胞菌对 17 种抗菌药物的多重耐药分析详见图 1。从图 1 中可以看出, 所有菌株呈 3 及 3 耐以上的多重耐药。多重耐药菌株中以 6 耐(41.67%)为主。

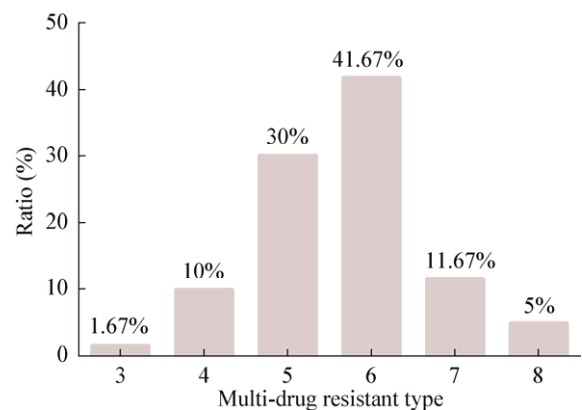


图 1 60 株铜绿假单胞菌对不同抗菌药物的多重耐药性
Figure 1 Multi-resistance of 60 *P. aeruginosa* to different antimicrobial agents

两个地区铜绿假单胞菌分离株耐药情况比较见图 2。由图 2 可知: 不同地区林麝养殖场内分离的铜绿假单胞菌对 17 种抗菌药物的耐药总体趋于一致, 但是部分抗菌药物耐药率存在较大差异。所有分离株对四环素、多西环素、阿奇霉素和磺胺异恶唑表现出极高水平耐药性(耐药率高于 65%), 对头孢西丁、氨曲南、亚胺培南表现出中等水平耐药(20%–40%), 对哌拉西林、头孢他啶、阿米卡星表现出低水平耐药性(低于 20%), 所有分离菌株对以上药物的耐药率无显著差异, 但是镇坪分离菌对头孢曲松、阿奇霉素的耐药率显著高于宝兴地区, 而宝兴分离菌对羧苄西林、头孢哌酮的耐药率显著高于镇坪地区。

把菌株来源划分为环境源、非环境源和死亡病源剖解脏器源三大类, 其中分离自空气、土壤、饮水、卧台样本源菌株划分为环境源, 粪便、尿液、伤皮、脓汁、鼻拭子样本源菌株划分为非环境源。不同源菌株耐药情况比较见图 3。由图 3 可知: 不同样本源铜绿假单胞菌对多西环素、磺胺异恶唑表现极高水平耐药(耐药率均高于 90%), 对头孢西丁表现中等水平耐药, 对羧苄西林、庆大霉素表现低水平耐药, 不同样本源的菌株对以上药物的耐药率无显著差异。值得注意的是, 仅脏器源菌株对头孢哌酮、氨曲南表现耐药, 非环境源菌株对哌拉西林单独表现耐药, 环境源菌株与脏器源菌株、环境源

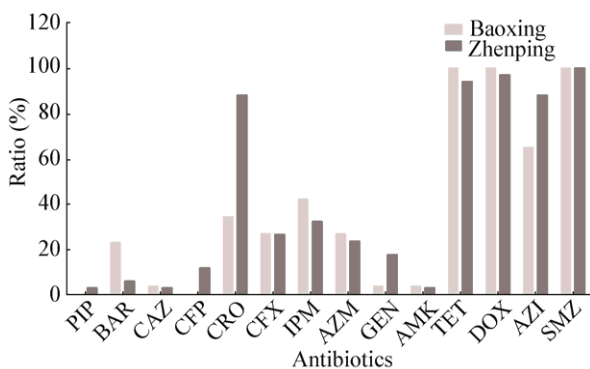


图 2 不同地区铜绿假单胞菌分离株耐药比较
Figure 2 The comparison of resistance rates of *P. aeruginosa* isolates from different area

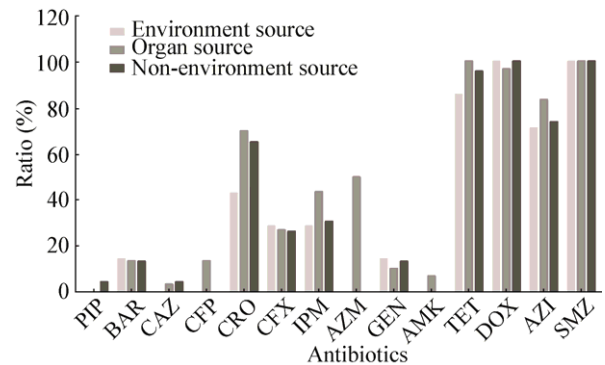


图 3 不同样本源铜绿假单胞菌耐药性比较
Figure 3 The comparison of resistance rates of *P. aeruginosa* isolates from different simples

菌株与非环境源菌株对头孢曲松的耐药率分别存在显著差异(环境源 42.85%, 脏器源 70%, 非环境源 65.22%)。

2.3 PFGE 分型结果

根据 Tenover 等^[8]研究的 PFGE 解释标准: 相似度 $\geq 80\%$ 的指纹图谱为一类 PFGE 指纹型别, 即划分至同一基因簇, 60 株铜绿假单胞菌的聚类结果详见图 4。图 4 结果表明: 分类得到 A–O 共 15 种基因簇, PFGE 图谱的相似度为 49.1%–100%。其中优势基因簇为 C、E、G、J, 分别占 7/60 (11.67%)、7/60 (11.67%)、13/60 (21.67%)、7/60 (11.67%)。部分基因簇中有不同样本源的分离菌株, 但是它们具有相同的 PFGE 指纹图谱, 包括: B 基因簇中的 PA150624 和 PA150918; C 基因簇中的 PA150752、PA150753、PA150754 和 PA150758, PA150649 和 PA150750; D 基因簇中的 PA150646 和 PA150647; E 基因簇中的 PA140938 和 PA1150241, PA150243 和 PA150645; G 基因簇中的 PA150717 和 PA150919, PA150314 和 PA150623。另外, 菌株 PA150624 和 PA150918, PA150649 和 PA150750, PA150243 和 PA150645, PA150314 和 PA150623 均分离自不同地区, 但是具有相同的 PFGE 指纹图谱, 因此可初步推断铜绿假单胞菌在两地区间存在水平传播途径。

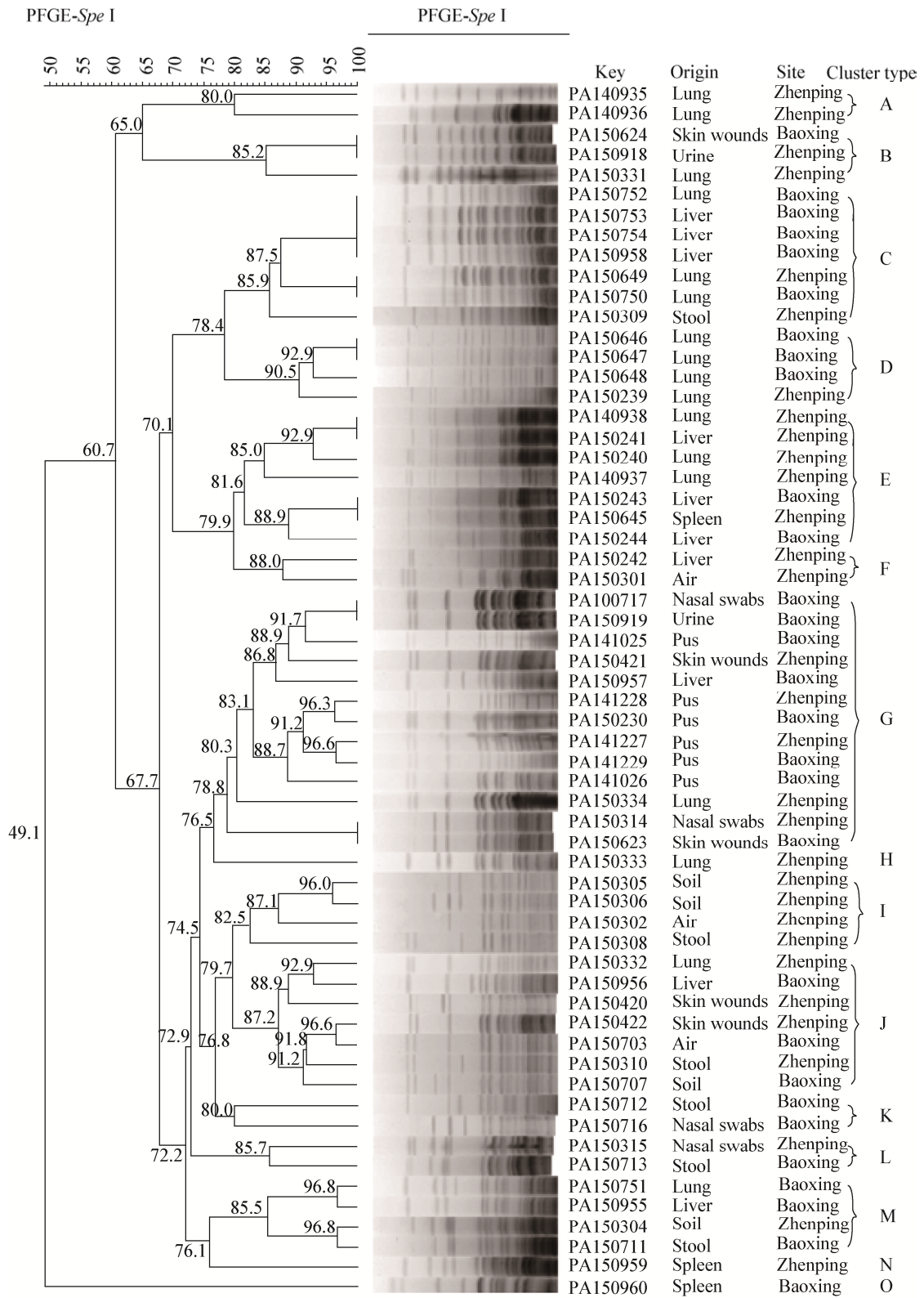


图 4 林麝源铜绿假单胞菌 PFGE 图谱聚类分析
 Figure 4 The PFGE typing of *P. aeruginosa* isolates of forest musk deer

2.4 流行菌株的致病性研究

试验组小鼠在接种铜绿假单胞菌菌液 12 h 后均表现出不同程度的精神不振、食欲下降、畏寒等症状,并开始出现死亡现象。记录数据,采用 SPSS 软件计算 LD₅₀,结果详见表 3。由表 3 可知,流行菌株的致病力强弱依次为:动物源菌株>环境源菌株,且主要流行菌株(聚类组 E、F、J)的致病力略大于其余菌群。

3 讨论与结论

动物饲舍是其生存的重要场所,饲舍中存在着

多种传染病病原,对饲舍中的特殊病原微生物进行分离鉴定是寻找疾病传染源、阻止疾病传播的重要环节。铜绿假单胞菌是条件致病菌,机体免疫条件下下降时容易致病,目前从禽类^[9]、野生动物^[10]、家养动物^[11]等均有分离得到。本实验从不同地区圈养林麝养殖场内采集 124 份不同类型样本,分离得到 60 株铜绿假单胞菌。

目前,关于林麝源铜绿假单胞菌耐药性的报道较少,蒲攀^[12]报道的 3 株林麝源铜绿假单胞菌对环丙沙星、庆大霉素、阿米卡星、哌拉西林、头孢哌

表 3 25 株铜绿假单胞菌对小鼠 LD₅₀ 的测定

Table 3 The determination of 25 *P. aeruginosa* of LD₅₀

菌株编号 No. of strains	样本源 Sample source	聚类组 Cluster type	不同剂量组小鼠死亡数(只) The number of deaths mice in different doses					LD ₅₀ (CFU/mL)
			5.0×10 ⁹	5.0×10 ⁸	5.0×10 ⁷	5.0×10 ⁶	5.0×10 ⁵	
PA140935	肺脏 Lung	A	5/6	5/6	4/6	2/6	0/6	3.66×10 ⁷
PA150331	肺脏 Lung	B	6/6	4/6	3/6	2/6	0/6	5.00×10 ⁷
PA150753	肝脏 Liver	C	5/6	4/6	4/6	2/6	2/6	1.49×10 ⁷
PA150309	粪便 Stool	C	3/6	3/6	2/6	1/6	1/6	2.06×10 ⁸
PA150646	肺脏 Lung	D	4/6	4/6	4/6	3/6	2/6	7.83×10 ⁶
PA150239	肺脏 Lung	D	6/6	3/6	3/6	3/6	0/6	5.04×10 ⁷
PA150301	空气 Air	E	4/6	4/6	2/6	0/6	0/6	4.28×10 ⁸
PA150244	肝脏 Liver	E	6/6	6/6	5/6	2/6	0/6	3.29×10 ⁶
PA140937	肺脏 Lung	E	6/6	5/6	3/6	2/6	1/6	6.21×10 ⁶
PA140717	鼻拭子 Nasal swabs	F	4/6	3/6	3/6	2/6	0/6	2.54×10 ⁷
PA141229	脓汁 Pus	F	6/6	5/6	4/6	2/6	1/6	4.29×10 ⁶
PA150421	伤皮 Skin wounds	F	6/6	4/6	2/6	2/6	1/6	4.61×10 ⁷
PA150919	尿液 Urine	F	4/6	2/6	2/6	1/6	0/6	9.69×10 ⁷
PA150623	伤皮 Skin wounds	G	5/6	4/6	2/6	2/6	0/6	1.21×10 ⁸
PA150333	肺脏 Lung	H	6/6	4/6	4/6	2/6	0/6	3.50×10 ⁷
PA150302	空气 Air	I	4/6	4/6	2/6	1/6	0/6	3.14×10 ⁸
PA150956	肝脏 Liver	J	5/6	4/6	4/6	2/6	0/6	5.43×10 ⁶
PA150420	伤皮 Skin wounds	J	5/6	4/6	4/6	2/6	1/6	3.10×10 ⁷
PA150707	土壤 Soil	J	3/6	3/6	2/6	0/6	0/6	1.39×10 ⁹
PA150716	鼻拭子 Nasal swabs	K	4/6	3/6	3/6	0/6	0/6	4.67×10 ⁸
PA150713	粪便 Stool	L	3/6	3/6	1/6	1/6	0/6	1.99×10 ⁹
PA150304	土壤 Soil	M	2/6	2/6	1/6	0/6	0/6	1.09×10 ¹⁰
PA150751	肺脏 Lung	M	6/6	4/6	4/6	2/6	0/6	3.51×10 ⁷
PA150959	脾脏 Spleen	N	5/6	4/6	4/6	3/6	2/6	6.74×10 ⁶
PA150960	脾脏 Spleen	O	4/6	4/6	2/6	0/6	0/6	4.28×10 ⁸

酮、头孢他啶敏感,这与本实验结果相符,但对四环素中度敏感与本实验的极高水平耐药结果相差很大,可能是四环素类药物长期使用后产生了耐药性;赵克雷等^[13]报道的米亚罗地区分离的铜绿假单胞菌对阿米卡星表现出高水平耐药,与本实验结果差异较大,其余抗菌药物的耐药水平基本相符,可能与不同地区养殖场的用药习惯有关。本次药敏试验结果表明:不同地区分离的铜绿假单胞菌耐药表型趋于一致,这与两个养殖场所处的自然环境和抗生素的使用密切相关。有研究者认为环境的胁迫^[14]和抗生素的选择压力^[15]与细菌的耐药性有关,两个养殖场海拔、气候条件较为相似;另外,不同地区的兽医师在抗生素使用上可能进行过相同的培训指导,这可能是导致耐药性趋于一致的主要原因。60株铜绿假单胞菌对磺胺类、大环内酯类、四环素类抗菌药物耐药率高达70%以上,可能是抗生素的不合理使用与铜绿假单胞菌自身耐药机制共同作用导致;镇坪分离菌对头孢曲松和阿奇霉素的耐药率较高,经现场调查得知兽医师在治疗化脓性疾病时均首选头孢曲松和阿奇霉素配合用药,这可能是造成耐药的主要原因;脏器源菌株的总体耐药情况较环境源和非环境源菌株严重,可能是分离自剖解脏器源的菌株在病魔死亡之前都进行过相应的药物治疗,处在抗生素选择压力环境内而产生了耐药变异,环境源和非环境源菌株的选择性压力相对较小而不能产生耐药变异。

PFGE 是公认的用于铜绿假单胞菌及其他病原菌分子分型和溯源研究的“金标准”,具有重复性好、分辨力强和分辨率高等特点,已被广泛地应用于各种细菌的流行病学研究中^[16]。目前关于圈养林麝源铜绿假单胞菌的流行病学调查未见报道,本文对分离自林麝源的60株铜绿假单胞菌进行了PFGE分型分析,在PFGE图谱中相似度在80%以上的菌株可以判断与流行病相关。结合分离信息和聚类分析图谱可以看出,C基因簇和D基因簇中分别有多株分离菌一致性为100%,这可能是因为宝兴地区2015年夏季高温高湿季节暴发感染过一次铜绿假

单胞菌,而且病菌发生了变异;两地区的铜绿假单胞菌同源性整体较近,少数呈自发感染,部分菌株感染有流行病学相关性;两个地区分离株的同一个基因簇中,既有高度相似的亚型,也有相似度远的亚型,证明存在多来源铜绿假单胞菌感染或菌株发生突变;菌株PA150624和PA150918(B基因簇)、PA150649和PA150750(C基因簇)、PA150243和PA150645(E基因簇)、PA150314和PA150623(G基因簇)均分离自不同地区,但具有相同的PFGE指纹图谱,因此可初步推断铜绿假单胞菌在镇坪和宝兴两地具有水平传播的途径。另外,分型结果也能说明其耐药性趋于一致的原因。由于有菌株的水平传播,可能导致携带耐药基因的菌株在两个地区间传播或耐药基因发生转移,从而造成耐药性的表现趋于一致。

不定期的林麝调配和人员流动都可能携带铜绿假单胞菌,造成传染病的传播流行,因此对调配入厂的林麝必须严格控制,先隔离观察进行病原菌的监测,待其“安全”后方可合笼饲养;对于进场的交通工具和随行人员应该做好消毒工作,打断病菌传播途径。

从LD₅₀试验结果可以看出,脏器源菌株的LD₅₀均小于其他源菌株,而环境源菌株的LD₅₀最大,选取的25株铜绿假单胞菌流行菌株的致病力强弱依次为:动物源菌株>环境源菌株,这和白文丽^[17]的研究结果较为一致。这可能是因为铜绿假单胞菌是存在于环境中的条件致病菌,环境源菌株的毒力较弱,平时不会对林麝致病造成危害。但是当林麝体表、黏膜受损或者机体免疫力降低时,环境中的弱毒株侵入机体经过感染变成新的强毒株,体内的强毒株排泄、分泌到外界环境中,其毒力会再次减弱。定期监测病菌的流行病学规律,探究潜在的感染途径,对于提高林麝的生产性能和相关疾病的预防很有意义。

REFERENCES

- [1] Yan M, Yan QG, Yang GY. The mass diseases of captive musk deer[J]. Journal of Economic Animal, 2016, 20(2): 112-117 (in

- Chinese)
闫敏, 颜其贵, 杨光友. 圈养麝的群发性疾病[J]. 经济动物学报, 2016, 20(2): 112-117
- [2] Guan TL, Zeng B, Peng QK, et al. Microsatellite analysis of the genetic structure of captive forest musk deer populations and its implication for conservation[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2009, 37(3): 166-173
- [3] Luo Y, Kang JP, Cheng JG, et al. Physical and chemical properties of pneumonia and suppurative disease virus in musk deer[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2010, 38(28): 15649-15652 (in Chinese)
罗燕, 康纪平, 程建国, 等. 麝肺炎和化脓性疾病病毒的理化特性研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(28): 15649-15652
- [4] Liu ZB, Dai XY. Prevention and treatment of suppurative diseases of forest musk deer[J]. *Special Economic Animal and Plant*, 2006, 9(4): 43-44 (in Chinese)
刘肇邦, 代晓阳. 林麝化脓性疾病的防治[J]. 特种经济动植物, 2006, 9(4): 43-44
- [5] Qi J, Li LL, Du YJ, et al. The identification, typing, and antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from mink with hemorrhagic pneumonia[J]. *Veterinary Microbiology*, 2014, 170(3/4): 456-461
- [6] Xi LX, Wen CF, Zhao S, et al. Distribution-survey of *Pseudomonas aeruginosa* of captive forest musk deer and analysis of drug resistance[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2016, 28(11): 1847-1852 (in Chinese)
郝立新, 文彩芳, 赵珊, 等. 圈养林麝养殖场内铜绿假单胞菌的分布及其耐药性分析[J]. 浙江农业学报, 2016, 28(11): 1847-1852
- [7] Shaburova OV, Pleteneva EA, Hertveldt K, et al. Comparison of DNA sizes in a group of giant *Pseudomonas aeruginosa* phages by the PFGE method[J]. *Russian Journal of Genetics*, 2008, 44(5): 620-622
- [8] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections a review for healthcare epidemiologists[J]. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 1997, 18(6): 426-439
- [9] Jiang YX, Huang JH. Diagnosis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* of chicks[J]. *Livestock and Poultry Industry*, 2015(4): 80-81 (in Chinese)
江玉香, 黄建海. 雏鸡绿脓杆菌的诊治[J]. 畜禽业, 2015(4): 80-81
- [10] Razmyar J, Peighambari M, Zahraii T, et al. Canary alopecia associated with *Pseudomonas aeruginosa*[A]//Chinese Society of Animal Husbandry and Veterinary Medicine. The 15th World Poultry Disease Conference and Chinese Society of Animal Husbandry and Veterinary Medicine 2007 Annual Conference Proceedings[C]. Beijing: Chinese Society of Animal Husbandry and Veterinary Medicine. 2007: 1 (in Chinese)
Razmyar J, Peighambari M, Zahraii T, 等. 金丝雀脱毛症与铜绿假单胞菌相关[A]//中国畜牧兽医学会. 第 15 届世界禽病大会、中国畜牧兽医学会 2007 年学术年会论文集[C]. 北京: 中国畜牧兽医学会, 2007: 1
- [11] Zhang YX, Qiu L, Cao ZL, et al. Isolation and Identification of *Pseudomonas aeruginosa* in Dairy Cattle[J]. *Advances in Animal Medicine*, 2007, 28(12): 110-112 (in Chinese)
张耀相, 邱立, 曹振莲, 等. 奶牛铜绿假单胞菌的分离与鉴定[J]. 动物医学进展, 2007, 28(12): 110-112
- [12] Pu P. Isolation and identification of *Pseudomonas aeruginosa* in *Moschus berezovskii* and study on its virulence[D]. Chengdu: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2014 (in Chinese)
蒲攀. 林麝源铜绿假单胞菌的分离鉴定及毒力研究[D]. 成都: 四川农业大学硕士学位论文, 2014
- [13] Zhao KL, Li XX, Palahati P, et al. Isolation and identification on pathogens of musk deer abscess disease and antibiotic susceptibility assay[J]. *Sichuan Journal of Zoology*, 2011, 30(4): 522-526 (in Chinese)
赵克雷, 李旭鑫, 帕哈尔定·帕拉哈提, 等. 圈养林麝脓肿病原菌分离鉴定及药敏分析[J]. 四川动物, 2011, 30(4): 522-526
- [14] Yang L, Jelsbak L, Marvig RL, et al. Evolutionary dynamics of bacteria in a human host environment[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(18): 7481-7486
- [15] Li Y, Yang F. The resistance and fitness of bacteria[J]. *Chinese Journal of Infection and Chemotherapy*, 2010, 10(1): 76-80 (in Chinese)
李颖, 杨帆. 细菌的耐药性与适应性[J]. 中国感染与化疗杂志, 2010, 10(1): 76-80
- [16] Peters TM. Pulsed-field gel electrophoresis for molecular epidemiology of food pathogens[M]//Caugant DA. *Molecular Epidemiology of Microorganisms*. Totowa: Humana Press, 2009, 551: 59-70
- [17] Bai WL. On distribution of *Pseudomonas aeruginosa* and selection of antibiotics and disinfectants in from farm of *moschus berezovskii*[D]. Chengdu: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2015 (in Chinese)
白文丽. 林麝养殖场铜绿假单胞菌的分布调查及抗菌消毒药物的筛选[D]. 成都: 四川农业大学硕士学位论文, 2015