

向勇, 李庆钵, 刘鹏, 等. 七彩山鸡养殖场铜绿假单胞菌的耐药性、多位点序列分型及遗传进化分析 [J]. 华南农业大学学报, 2022, 43(2): 11-18.
XIANG Yong, LI Qingbo, LIU Peng, et al. Analyses of drug resistance, multi-locus sequence typing and genetic evolution of *Pseudomonas aeruginosa* in pheasant farms[J]. Journal of South China Agricultural University, 2022, 43(2): 11-18.

七彩山鸡养殖场铜绿假单胞菌的耐药性、多位点序列分型及遗传进化分析

向 勇¹, 李庆钵¹, 刘 鹏¹, 黎丽珍¹, 姜 增¹, 陈小燕¹, 曹伟胜^{1,2}

(1 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642; 2 岭南现代农业科学与技术广东省实验室/农业农村部人兽共患病重点实验室/广东省动物源性人兽共患病预防与控制重点实验室/人兽共患病控制剂国家地方联合工程实验室/农业部兽用疫苗创制重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】探究广东省七彩山鸡养殖场中铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* 的流行特点、耐药性、多位点序列分型 (Multi-locus sequence typing, MLST) 及遗传进化背景, 为临床合理用药提供参考。【方法】从广东省 3 个规模化七彩山鸡养殖场收集孵化死胚及周围环境样本进行铜绿假单胞菌的分离鉴定, 采用 K-B 纸片扩散法测试其对 22 种抗菌药物的敏感性, 利用 MLST 分析铜绿假单胞菌分离株的分子流行特点。将各 ST 型的 7 个管家基因序列按顺序拼接, 用 MEGA7 软件对拼接好的序列进行遗传进化分析。【结果】在采集的 514 份样本 (死胚样本 405 份、环境样本 109 份) 中共分离到铜绿假单胞菌 145 株 (分离率 28.2%), 其中, 24 株来源于环境样本 (分离率 22.0%, 24/109), 121 株来源于死胚样本 (分离率 29.9%, 121/405)。145 株铜绿假单胞菌除对氨基西林、卡那霉素和萘啶酸天然耐药外, 对复方新诺明、氯霉素和四环素的耐药性较强, 耐药率分别为 100%、80.0% 和 77.2%, 其次为头孢噻肟 (耐药率 23.4%)。除天然耐药外, 多重耐药的铜绿假单胞菌占比达 73.1%(106/145), 且对亚胺培南也显现出耐药性。MLST 结果显示, 89 株耐药谱较广的铜绿假单胞菌可分为 18 个 ST 型, 其中, 6 个 ST 型是本研究新发现的。铜绿假单胞菌死胚分离株的优势 ST 型是 ST-260, 环境分离株以 ST-2100 和 ST-3202 为主。遗传进化分析表明, 环境和死胚样品中的铜绿假单胞菌具有较高的相似性。【结论】本研究调查的 3 个七彩山鸡养殖场的死胚及周围环境中均存在不同程度的铜绿假单胞菌感染或污染, 且分离株具有较强的耐药性; 建议在养殖过程中不仅要加强饲养管理、提高生物安全意识, 还应根据药敏试验结果合理选择抗菌药。

关键词: 七彩山鸡; 铜绿假单胞菌; 耐药性; 多位点序列分型; 遗传进化
中图分类号: S858.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2022)02-0011-08

Analyses of drug resistance, multi-locus sequence typing and genetic evolution of *Pseudomonas aeruginosa* in pheasant farms

XIANG Yong¹, LI Qingbo¹, LIU Peng¹, LI Lizhen¹, JIANG Zeng¹, CHEN Xiaoyan¹, CAO Weisheng^{1,2}
(1 College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2 Guangdong Laboratory for Lingnan Modern Agriculture Science and Technology/Key Laboratory of Zoonosis of Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Key Laboratory of Zoonosis Prevention and Control of Guangdong Province/National and Regional Joint Engineering Laboratory for Medicament of Zoonosis Prevention and Control/Key Laboratory of Animal Vaccine Development, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou 510642, China)

收稿日期: 2021-05-14 网络首发时间: 2022-01-04 11:44:48
网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20220101.1616.002.html>
作者简介: 向 勇, 博士研究生, 主要从事预防兽医学传染病方向研究, E-mail: xiangyongcq@163.com; 通信作者: 曹伟胜, 教授, 博士, 主要从事家禽重要传染病防控和净化研究, E-mail: caoscauvet@163.com
基金项目: 广东省家禽产业技术体系项目 (2020KJ128); 国家肉鸡产业技术体系项目 (CARS-41-G16)

Abstract: 【Objective】 To investigate the epidemic characteristics, drug resistance, multi-locus sequence typing (MLST) and genetic evolution background of *Pseudomonas aeruginosa* in Guangdong Province, and provide a reference for clinical rational drug use. 【Method】 Samples from dead embryos of pheasant and their surrounding environment were collected for separation and identification of *P. aeruginosa*. The K-B paper disk diffusion method was used to analyze *P. aeruginosa* sensitivity to 22 kinds of antimicrobials. The MLST method was applied to analyze the molecular epidemiology of *P. aeruginosa* strains. Seven house-keeping genes of each ST type were spliced sequentially, and we used MEGA7 software to conduct genetic evolution analysis to the spliced sequence. 【Result】 A total of 145 *P. aeruginosa* strains (isolation rate 28.2%) were isolated from the collected 514 samples (405 dead embryo samples and 109 environment samples), including 24 strains from environmental samples (isolation rate 22.0%, 24/109) and 121 strains from dead embryos (isolation rate 29.9%, 121/405). Antibiotic drug sensitivity test showed that 145 strains of *P. aeruginosa* were naturally resistant to ampicillin, kanamycin and nalidixic acid, strongly resistant to complex sulfamethoxazole, chloramphenicol, tetracycline, followed by cefotaxime, with the drug resistance rates of 100%, 80.0%, 77.2% and 23.4% respectively. Except the natural drug resistance, the proportion of multiple drug resistant *P. aeruginosa* was up to 73.1% (106/145), and a certain proportion of *P. aeruginosa* strains which were resistant to imipenem appeared. MLST analysis showed that 89 *P. aeruginosa* strains with a broad spectrum of resistance were divided into 18 ST types, presenting high diversity. Among them, six ST types were the new types discovered in this study. The dead embryo isolates of *P. aeruginosa* were mainly ST-260, and the environmental sample isolates were mainly ST-2100 and ST-3202. Genetic evolution analysis showed that *P. aeruginosa* strains in environment were closely related to those in dead embryos. 【Conclusion】 There are different degrees of *P. aeruginosa* infection or contamination in dead embryos and surrounding environment of three pheasant farms, and the isolates have strong drug resistance. Therefore, it is recommended that we should not only strengthen the breeding management and raise the awareness of bio-safety in the process of breeding, but also use antibacterial drugs reasonably according to the results of the drug sensitivity test.

Key words: Pheasant; *Pseudomonas aeruginosa*; Antimicrobial resistance; Multi-locus sequence typing; Genetic evolution

七彩山鸡是一种野生禽类，又称野鸡、雉鸡，在食用和药用等多方面具有可观的经济价值，并已被列入《国家保护的有重要生态、科学、社会价值的陆生野生动物名录》。基于上述优势，广东省内七彩山鸡的养殖规模逐步扩大，每年向全国多个省份提供七彩山鸡种苗。

铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*，又被称为绿脓杆菌，可以在人、动物和环境循环传播，不仅影响养殖业的发展而且严重危害人类健康^[1-2]。随着养禽业规模的逐渐扩大，由铜绿假单胞菌导致的禽类疾病显著增多^[3-5]。铜绿假单胞菌严重的耐药性一直是医院临床高度关注并愈发棘手的问题^[6-8]，碳青霉烯类抗菌药如亚胺培南、美罗培南等是目前医院对抗铜绿假单胞菌的最后一道有效防线，铜绿假单胞菌也逐渐对这些药物产生耐药性^[9-10]。近年来，有学者从鸡、候鸟及其养殖环境中分离到严重耐药的铜绿假单胞菌^[11]，甚至有证据表明多重耐药

的铜绿假单胞菌菌株在人、动物、环境中传播，严重影响公共卫生安全^[12]。多位点序列分型 (Multi-locus sequence typing, MLST) 是通过对多个特定管家基因进行测序来分型的分子分型方法。医院内广泛流行的铜绿假单胞菌以 ST-235 和 ST-244 为主^[13-14]；Martins 等^[11]对从候鸟菌群中分离得到的产金属β-内酰胺酶的铜绿假单胞菌进行 MLST 分型，发现均属于 ST-277 型。目前铜绿假单胞菌在七彩山鸡中的流行情况及耐药性仍然不明，也缺乏相关的 MLST 分型数据。

本研究对广东省规模化的七彩山鸡养殖场进行铜绿假单胞菌的分离鉴定，了解其流行情况，并对分离的铜绿假单胞菌进行抗菌药物敏感性分析，为临床合理用药提供参考；同时，采用 MLST 方法对分离到的耐药谱较广的铜绿假单胞菌菌株进行分子流行病学分析，探讨耐药铜绿假单胞菌的遗传进化背景。

1 材料与方法

1.1 试验材料

LB 液体培养基、LB 固体培养基、MH 液体培养基、MH 固体培养基、铜绿假单胞菌 ATCC27853 以及大肠埃希菌 *Escherichia coli* ATCC25922 均购自广东环凯微生物科技有限公司。NAC 固体培养基、NAC 液体培养基、无菌均质袋均为青岛海博生物技术有限公司产品。rTaq PCR Premix 购自上海翌圣生物科技有限公司。药敏纸片为 OXOID 公司产品。SQ 组织 DNA 提取试剂盒为 OMEGA 公司产品。

1.2 样品采集

从广东省 3 个规模化的七彩山鸡养殖场收集死胚及周围环境样本。对于死胚, 直接收集孵化房内 21 日龄仍未出壳且外壳完好的胚; 对于环境样本, 用无菌的棉拭子采集饲料、孵化机内灰尘、笼具器械灰尘、饮水等放入装有适量灭菌 NAC 液体培养基的 15 mL 离心管中。从样品采集至运送至实验室不超过 8 h。

1.3 铜绿假单胞菌的分离鉴定

用 75%(φ) 乙醇溶液将死胚外壳充分消毒 3 次, 无菌操作取出胚体并剪碎, 放入无菌均质袋; 加入适量无菌的 NAC 液体培养基, 37℃、120 r/min 培养 8 h; 取上述菌液以 1:10 的体积比接种到新的培养基内, 继续培养 12~16 h; 采用三线法划线于 NAC 固体培养基, 18~24 h 之后, 挑取绿色单菌落, 参考文献 [15] 进行铜绿假单胞菌特异性基因 *oprI* 的 PCR 扩增并送广州擎科生物有限公司测序。

1.4 药物敏感性试验

利用铜绿假单胞菌 ATCC27853 和大肠埃希菌 ATCC25922 作为质控菌株, 按照 K-B 纸片扩散法测试铜绿假单胞菌分离株对 22 种抗菌药物的敏感性试验, 并参照标准 [16] 对试验结果进行判定。抗菌药物如下: 氨苄西林 (Ampicillin)、复方新诺明 (Complex sulfamethoxazole)、萘啶酸 (Nalidixic acid)、卡那霉素 (Kanamycin)、四环素 (Tetracycline)、氯霉素 (Chloramphenicol)、哌拉西林 (Piperacillin)、头孢噻肟 (Cefotaxime)、头孢吡肟 (Cefepime)、头孢他啶 (Ceftazidime)、头孢哌酮 (Cefoperazone)、亚胺培南 (Imipenem)、美罗培南 (Meropenem)、氨曲南 (Aztreonam)、哌拉西林/他唑巴坦 (Piperacillin/tazobactam)、头孢哌酮/舒巴坦 (Cefoperazone/sulbactam)、妥布霉素 (Tobramycin)、阿米卡星 (Amikacin)、庆大霉素 (Gentamicin)、环丙沙星 (Ciprofloxacin)、左氧氟沙星 (Levofloxacin) 和多黏

菌素 B(Polymyxin B)。

1.5 多位点序列分型

参照试剂盒说明书提取铜绿假单胞菌的总 DNA, 参考文献 [17] 中的引物序列和 PCR 反应体系、扩增条件, 对铜绿假单胞菌的 7 个管家基因 (*acsA*、*aroE*、*guaA*、*mutL*、*nuoD*、*ppsA*、*trpE*) 进行 PCR 扩增并测序。将测序得到的基因序列上传至铜绿假单胞菌的 MLST 官网 (<https://pubmlst.org/paeruginosa/>), 得到各个管家基因序列对应的等位基因编号。7 个等位基因编号按照顺序依次排列形成 7 个数字组成的等位基因谱并得到相应的 ST 型。若 7 个等位基因编号不能与数据库中已有数据完全匹配, 则认为是新发现的 ST 型, 将该菌株的相关资料上传至数据库, 经确认后给出新的 ST 型编号。

1.6 遗传进化分析

将各 ST 型的 7 个管家基因序列按顺序拼接得到多个长度相同的序列, 用 MEGA7 软件对这些拼接好的序列进行遗传进化分析, 得到各 ST 型的遗传进化树。

2 结果与分析

2.1 样品采集数量

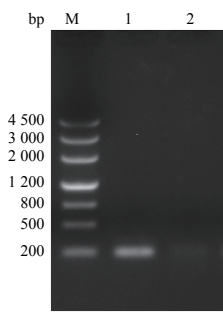
从广东省的 3 个规模化七彩山鸡养殖场收集到死胚样品共 405 份, 采集饲料、孵化机内污垢、笼具灰尘、器械灰尘、自来水等环境样品共 109 份。

2.2 铜绿假单胞菌的分离与鉴定

铜绿假单胞菌在选择性培养基 (NAC 固体培养基) 中呈现出圆形、表面光滑且湿润的绿色菌落 (图 1), 并散发出芳香气味。对特异性基因 *oprI* 进行 PCR 扩增, 扩增出 214 bp 左右的条带 (图 2)。结合测序结果确认为铜绿假单胞菌。本研究共分离鉴定出铜绿假单胞菌 145 株 (分离率 28.2%, 145/514), 其中环境样本分离出 24 株 (分离率 22.0%, 24/109), 死胚分离出 121 株 (分离率 29.9%, 121/405)(表 1)。



图 1 NAC 固体培养基上铜绿假单胞菌的形态特征
Fig. 1 Morphological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* on NAC solid medium



M: DNA marker, 1: 铜绿假单胞菌分离株, 2: 阴性对照
M: DNA marker, 1: *Pseudomonas aeruginosa* isolate, 2: Negative control

图 2 *oprI* 基因 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PCR product for *oprI* gene

表 1 不同七彩山鸡养殖场中铜绿假单胞菌临床分离株的数量及分离率

Table 1 Quantity and isolation rate of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from different breeding poultry farms

养殖场 Poultry farm	样本类型 Sample type	样品采集数 Collected sample number	阳性样品数 Positive sample number	分离率/% Isolation rate
A	死胚 Dead embryo	222	85	38.3 (87/227)
	环境 Environment	5	2	
B	死胚 Dead embryo	96	24	21.2 (28/132)
	环境 Environment	36	4	
C	死胚 Dead embryo	87	12	19.4 (30/155)
	环境 Environment	68	18	
合计 Total		514	145	28.2 (145/514)

2.3 抗菌药物敏感性

共 22 种抗菌药物被用来测试分离鉴定出的 145 株铜绿假单胞菌菌株的药物敏感性, 结果 (表 2) 显示, 除对氨苄西林、卡那霉素和萘啶酸天然耐药外, 铜绿假单胞菌对复方新诺明、氯霉素、四环素的耐药性较强; 其次为头孢噻肟; 铜绿假单胞菌对亚胺培南、哌拉西林、头孢他啶、头孢哌酮和哌拉西林/他唑巴坦表现出较低的耐药率; 未检测到对美罗培南、阿米卡星、头孢哌酮/舒巴坦和多黏菌素 B 耐药的铜绿假单胞菌菌株。死胚和环境来源的铜绿假单胞菌总体耐药情况相似, 但环境样品分离株的耐药性要强于死胚分离株。耐药谱分析 (表 3) 显示, 所有分离菌株均表现出耐 4 种及以上抗菌药, 最广耐 15 种抗菌药, 其中 6 耐菌株最多。除天然耐药外, 耐 3 类及以上抗菌药的铜绿假单胞菌菌株占比为

表 2 死胚和环境样品中耐药铜绿假单胞菌菌株数量及占比¹⁾

Table 2 Number and proportion of drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain in dead embryo and environment samples

抗菌药 Antimicrobial	死胚 Dead embryo	环境 Environment	总计 Total
AMP	121(100.0)	24(100.0)	145(100.0)
NA	121(100.0)	24(100.0)	145(100.0)
K	121(100.0)	24(100.0)	145(100.0)
SXT	121(100.0)	24(100.0)	145(100.0)
C	92(76.0)	24(100.0)	116(80.0)
TE	90(74.4)	22(91.7)	112(77.2)
CTX	27(22.3)	7(29.2)	34(23.4)
LEV	7(5.8)	11(45.8)	18(12.4)
CIP	7(5.8)	9(37.5)	16(11.1)
TOB	7(5.8)	6(25.0)	13(9.0)
CN	8(6.6)	5(20.8)	13(9.0)
PRL	10(8.3)	—	10(6.9)
CFP	7(5.8)	3(12.5)	10(6.9)
ATM	7(5.8)	1(4.2)	8(5.5)
CAZ	5(4.1)	—	5(3.5)
FEP	4(3.3)	—	4(2.8)
TZP	3(1.9)	—	3(2.1)
IPM	1(0.8)	1(4.2)	2(1.4)
MER	—	—	—
AMI	—	—	—
CES	—	—	—
POB	—	—	—

1) AMP: 氨苄西林, SXT: 复方新诺明, NA: 萘啶酸, K: 卡那霉素, TE: 四环素, C: 氯霉素, PRL: 哌拉西林, CTX: 头孢噻肟, FEP: 头孢吡肟, CAZ: 头孢他啶, CFP: 头孢哌酮, IPM: 亚胺培南, ATM: 氨曲南, TZP: 哌拉西林/他唑巴坦, TOB: 妥布霉素, CN: 庆大霉素, CIP: 环丙沙星, LEV: 左氧氟沙星, IPM: 亚胺培南, MER: 美罗培南, AMI: 阿米卡星, CES: 头孢哌酮/舒巴坦, POB: 多黏菌素 B; 括号内数据为占比; “—” 表示未检测到耐药菌株

1) AMP: Ampicillin, SXT: Complex sulfamethoxazole, NA: Nalidixic acid, K: Kanamycin, TE: Tetracycline, C: Chloramphenicol, PRL: Piperacillin, CTX: Cefotaxime, FEP: Cefepime, CAZ: Ceftazidime, CFP: Cefoperazone, IPM: Imipenem, ATM: Aztreonam, TZP: Piperacillin/tazobactam, TOB: Tobramycin, CN: Gentamicin, CIP: Ciprofloxacin, LEV: Levofloxacin, IPM: Imipenem, MER: Meropenem, AMI: Amikacin, CES: Cefoperazone/sulbactam, POB: Polymyxin B; The data in brackets are proportions; “—” indicates no drug-resistant isolate

73.1%(106/145), 表现出多重耐药性。其中, 耐 3 类抗菌药的菌株数量最多, 占 44.8%(65/145); 其次为耐 4 类, 占 11.0%(16/145); 耐 5 类占 4.8%(7/145); 耐 7 类占 4.1%(6/145)。

2.4 多位点序列分型

从 145 株铜绿假单胞菌菌株中选取耐药谱较广的 89 株进行 MLST 分析, 结果 (表 4) 显示, 89 株

表 3 铜绿假单胞菌的耐药谱及对应菌株数量

Table 3 Drug resistance spectrum and strain quantity of *Pseudomonas aeruginosa*

耐药数	耐药谱 ¹⁾	菌株数量
Drug-resistant number	Drug resistance spectrum	Strain number
4	AMP+K+NA+SXT	14
5	AMP+K+TE+NA+SXT	7
	AMP+K+C+NA+SXT	18
6	AMP+K+TE+C+NA+SXT	59
	AMP+CTX+K+TE+NA+SXT	6
7	AMP+CTX+K+TE+C+NA+SXT	12
	AMP+PRL+CTX+CFP+K+NA+SXT	1
	AMP+K+TE+C+NA+LEV+SXT	3
8	AMP+K+TE+C+NA+CIP+LEV+SXT	5
	AMP+CTX+CFP+K+TE+C+NA+SXT	1
	AMP+CTX+ATM+K+TE+C+NA+SXT	1
9	AMP+PRL+K+TOB+CN+TE+C+NA+SXT	2
10	AMP+PRL+CTX+K+TOB+CN+TE+C+NA+SXT	1
	AMP+K+TOB+CN+TE+C+NA+CIP+LEV+SXT	2
	AMP+CTX+K+CN+TE+C+NA+CIP+LEV+SXT	1
	AMP+CTX+K+TOB+CN+TE+C+NA+CIP+SXT	1
	AMP+CFP+K+TOB+TE+C+NA+CIP+LEV+SXT	1
11	AMP+PRL+CTX+CAZ+CFP+ATM+K+TE+C+NA+SXT	1
	AMP+PRL+CTX+FEP+CAZ+CFP+ATM+K+TE+NA+SXT	1
	AMP+CTX+K+TOB+CN+TE+C+NA+CIP+LEV+SXT	3
13	AMP+PRL+CTX+FEP+CAZ+CFP+ATM+TZP+K+TE+C+NA+SXT	3
	AMP+CTX+IPM+ATM+K+TOB+CN+TE+C+NA+CIP+LEV+SXT	1
15	AMP+PRL+CTX+CFP+IPM+ATM+K+TOB+CN+TE+C+NA+CIP+LEV+SXT	1

1)AMP: 氨苄西林, SXT: 复方新诺明, NA: 萘啶酸, K: 卡那霉素, TE: 四环素, C: 氯霉素, PRL: 哌拉西林, CTX: 头孢噻肟, FEP: 头孢吡肟, CAZ: 头孢他啶, CFP: 头孢哌酮, IPM: 亚胺培南, ATM: 氨曲南, TZP: 哌拉西林/他唑巴坦, TOB: 妥布霉素, CN: 庆大霉素, CIP: 环丙沙星, LEV: 左氧氟沙星

1) AMP: Ampicillin, SXT: Complex sulfamethoxazole, NA: Nalidixic acid, K: Kanamycin, TE: Tetracycline, C: Chloramphenicol, PRL: Piperacillin, CTX: Cefotaxime, FEP: Cefepime, CAZ: Ceftazidime, CFP: Cefoperazone, IPM: Imipenem, ATM: Aztreonam, TZP: Piperacillin/tazobactam, TOB: Tobramycin, CN: Gentamicin, CIP: Ciprofloxacin, LEV: Levofloxacin

表 4 89 株铜绿假单胞菌菌株各 ST 型菌株数量及来源

Table 4 Quantity and source of each ST type in 89 *Pseudomonas aeruginosa* strains

ST 型 ¹⁾	菌株数量	来源	ST 型 ¹⁾	菌株数量	来源
ST type	Strain number	Source	ST type	Strain number	Source
ST-260	43	死胚 Dead embryo	ST-3203	1	地面积水 Excess surface water
ST-2100	15	死胚/孵化机	ST-876	1	孵化机污垢 Incubator filth
		Dead embryo/Incubator			
ST-3202	10	孵化机污垢 Incubator filth	ST-1336	1	饲料Fodder
ST-1971	5	死胚 Dead embryo	ST-2640	1	死胚 Dead embryo
ST-3200	2	死胚 Dead embryo	ST-898	1	笼架污垢 Cage shelf filth
ST-3201	2	饮水 Drinking water	ST-1965	1	死胚 Dead embryo
ST-3199	1	死胚 Dead embryo	ST-3204	1	地面积水 Excess surface water
ST-234	1	地面灰尘 Ground dust	ST-1054	1	机械部件污垢
					Mechanical component filth
ST-2552	1	笼架污垢 Cage shelf filth	ST-2670	1	地面灰尘 Ground dust

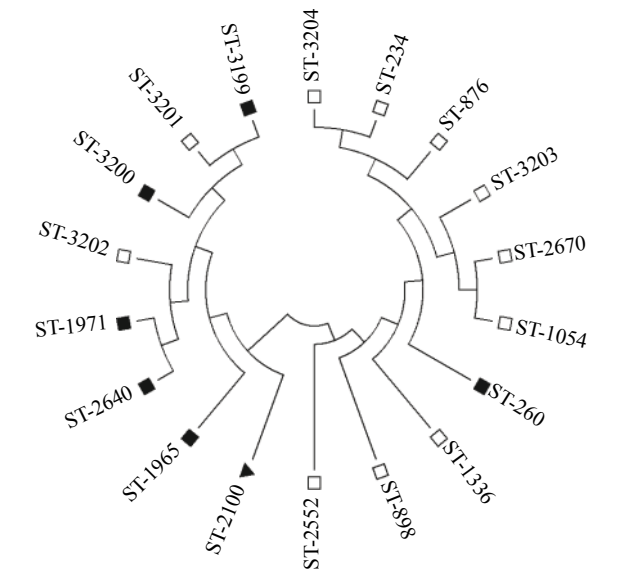
1)ST-3199、ST-3200、ST-3201、ST-3202、ST-3203、ST-3204为本研究新发现的ST型

1)ST-3199, ST-3200, ST-3201 and ST-3202, ST-3203 and ST-3204 are the ST types discovered in this research

菌株可分为 18 个 ST 型, 呈现高度多样性, 其中, 72 株属于原有数据库已包含的 12 种 ST 型。另外 17 株的 ST 型不包含在原数据库中, 经提交相关资料至数据库并由管理员确认后得到 6 个新的 ST 型, 分别为 ST-3199、ST-3200、ST-3201、ST-3202、ST-3203 和 ST-3204。死胚中分离到的铜绿假单胞菌以 ST-260 为优势 ST 型, 环境中分离到的铜绿假单胞菌菌株 ST 型以 ST-2100 和 ST-3202 为主。

2.5 遗传进化分析

由图 3 可见, 铜绿假单胞菌环境样品分离株与死胚分离株之间的亲缘关系比较紧密, 如环境样品(饮水)分离株 ST-3201 与死胚分离株 ST-3199 属于同一分支, ST-3202 与 ST-1971、ST-2640 属于同一大分支。



“■”: 铜绿假单胞菌死胚分离株所属的 ST 型; “□”: 铜绿假单胞菌环境样品分离株所属的 ST 型; “▲”: 2 种样品共有的 ST 型
“■”: ST type of *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from dead embryo; “□”: ST type of *P. aeruginosa* strain isolated from environment sample; “▲”: The common ST type of *P. aeruginosa* strain isolated from dead embryo and environment sample

图 3 死胚和环境样品中不同铜绿假单胞菌 ST 型的遗传进化分析

Fig. 3 Genetic evolution analysis of different *Pseudomonas aeruginosa* ST types isolated from dead embryo and environment samples

3 讨论与结论

3.1 讨论

铜绿假单胞菌是一种常见的、能引起人类和动物机会性感染的病原体。铜绿假单胞菌具有强大的代谢可塑性和多功能性, 能够感染或定殖广泛的生态位, 包括水生和土壤生境、动植物等^[18-19], 尤其危害免疫功能低下的患者^[20-21]。目前关于七彩山鸡中铜绿假单胞菌流行情况的报道较少, 缺乏该方面的

流行病学数据。本研究从 3 个规模化七彩山鸡养殖场共分离到 145 株铜绿假单胞菌, 分离率为 28.2%, 七彩山鸡死胚中有比较严重的铜绿假单胞菌感染, 周围环境样本也被铜绿假单胞菌污染。其中, A 场的死胚中铜绿假单胞菌的感染情况最为严重, 这可能是导致该养殖场种蛋出雏率较低的原因之一, 而环境样本如孵化机污垢中分离出的铜绿假单胞菌菌株与死胚分离株具有较近的亲缘关系也证明了该推断的合理性, 胚胎被孵化机内的铜绿假单胞菌污染, 并侵入蛋壳, 致其死亡。因此在家禽养殖过程中, 要加强饲养管理, 采取严格的生物安全措施, 防止铜绿假单胞菌污染种蛋, 避免损失。

铜绿假单胞菌外膜的低渗透性和主动外排系统的外排作用使其对很多抗生素产生固有耐药, 同时该菌还能通过产生 β -内酰胺酶、外排泵表达和生物被膜等多种机制产生获得性耐药^[22-23]。加之近年来临床上各种插管、导管、机械通气等侵袭性诊疗手段的应用, 免疫抑制剂的广泛应用和抗生素的不合理使用导致铜绿假单胞菌的耐药形势严峻, 出现了多重耐药铜绿假单胞菌, 且数量日益增加, 为临床的治疗带来了巨大的挑战, 并在全球范围内危害人类健康^[24-25]。无论铜绿假单胞菌的耐药机制如何, 多重耐药铜绿假单胞菌菌株引起的感染日益增多, 严重影响临床上的抗感染治疗, 因此常导致较高的死亡率^[1, 18]。

本研究选取了常用的 22 种抗菌药进行药敏试验, 其中亚胺培南、哌拉西林、头孢吡肟、头孢他啶等都是医院临床治疗铜绿假单胞菌感染性疾病的一线药物, 但部分铜绿假单胞菌分离株也对其表现出了耐药现象, 即便其耐药率较低, 也应当引起重视, 特别是医院临床使用频率较高的抗感染药物如亚胺培南。在本研究所调查的养殖场中, 均未使用亚胺培南、哌拉西林、头孢吡肟、头孢他啶等医院临床使用的一线抗感染药物, 因此推测其耐药性的出现与全球范围内医院中多重耐药铜绿假单胞菌菌株的暴发流行有关。氨苄西林、卡那霉素、萘啶酸是养殖场常用的抗菌药, 但铜绿假单胞菌对其 100% 耐药, 发生铜绿假单胞菌感染后往往治疗效果不佳。铜绿假单胞菌对复方新诺明、四环素、氯霉素三者的耐药率也很高。因此养殖场要开展药物敏感试验, 根据药敏结果选择敏感的药物, 且应注意交替用药, 以防产生耐药性。值得注意的是, 铜绿假单胞菌分离株对国家禁用的兽药(四环素、氯霉素)表现出高耐药率, 一方面可能是早期使用所致; 另一方面可能是医院中铜绿假单胞菌泛耐药株的

全球流行传播导致的, 因为四环素和氯霉素在医院临床抗感染治疗中并没有被禁用。另外, 本研究耐药谱分析显示最广耐 15 种抗菌药, 除天然耐药外, 耐 3 类或 3 类以上抗菌药物的铜绿假单胞菌占比为 73.1%(106/145), 提示本研究采样的七彩山鸡养殖场中铜绿假单胞菌分离株的耐药情况同样不容乐观; 因此在使用抗菌药时, 除了要根据药敏试验结果合理运用外, 还应尽量避免长期依赖使用同一种或几种抗菌药物, 积极探索抗菌药的组合应用, 并开展新的抗感染药物的研发。

MLST 分析是通过直接测定菌株的多个管家基因的核苷酸序列来分型的分子分型方法, 常常用于细菌的群体遗传演化分析, 这种基于遗传学功能的分型比传统的免疫学试验更加准确可靠。本研究对 89 株耐药谱较广的铜绿假单胞菌分离株进行了 MLST 分析, 这些菌株可分为 18 个 ST 型, 以 ST-260 占比最多, 这与全球范围医院流行的 ST 型有所差异^[26-28], 但也在情理之中, 可能是种属差异导致流行特点有所区别。其中有 6 个 ST 型是本研究新发现的, 提示铜绿假单胞菌的进化速度较快。同时还发现来自饮水 (ST-3201) 和死胚 (ST-3199)、孵化机污垢 (ST-3202) 和死胚 (ST-1971) 的铜绿假单胞菌表现出较近的亲缘关系。这进一步证实了我们的推断, 即周边环境尤其是孵化机被铜绿假单胞菌污染对孵化率降低有一定的威胁。

3.2 结论

本研究调查的 3 个七彩山鸡养殖场中, 不仅死胚中存在不同程度的铜绿假单胞菌感染, 而且周围环境也存在相当比例的铜绿假单胞菌污染, 且分离株具有较强的耐药性。铜绿假单胞菌死胚分离株的优势 ST 型为 ST-260, 环境分离株以 ST-2100 和 ST-3202 为主, 且两者表现出较近的亲缘关系。因此建议做好生物安全措施, 及时对种蛋、孵化机及周边环境进行清洁和消毒, 并根据药敏试验结果选择有效的抗菌药并交替使用。

参考文献:

[1] FOLIC M M, DJORDJEVIC Z, FOLIC N, et al. Epidemiology and risk factors for healthcare-associated infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Journal of Chemotherapy*, 2020, 33(5): 294-301.

[2] GUPTA K K, DEVI D. Characteristics investigation on biofilm formation and biodegradation activities of *Pseudomonas aeruginosa* strain ISJ14 colonizing low density polyethylene (LDPE) surface[J]. *Heliyon*, 2020, 6(7): e04398.

[3] 孙理云, 孔瑞娜, 温广辉, 等. 健康肉鸡高比率携有多重

耐药铜绿假单胞菌[J]. *中国人兽共患病学报*, 2012, 28(2): 193-195.

[4] 李玲. 鸡铜绿假单胞菌的分离鉴定及生物学特性研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2013.

[5] HASSAN W H, IBRAHIM A M K, SHANY S A S, et al. Virulence and resistance determinants in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from pericarditis in diseased broiler chickens in Egypt[J]. *Journal of advanced veterinary and animal research*, 2020, 7(3): 452-463.

[6] SALEEM S, BOKHARI H. Resistance profile of genetically distinct clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates from public hospitals in central Pakistan[J]. *Journal of Infection and Public Health*, 2020, 13(4): 598-605.

[7] MAUNDERS E A, TRINIMAN R C, WESTERN J, et al. Global reprogramming of virulence and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* by a single nucleotide polymorphism in elongation factor, fusA1[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2020, 295(48): 16411-16426.

[8] 卢斌, 姚燕, 陆英, 等. 某二甲医院铜绿假单胞菌标本来源、病区分布及耐药性分析[J]. *浙江医学*, 2021, 43(6): 653-655.

[9] MERRADI M, KASSAH-LAOUAR A, AYACHI A, et al. Occurrence of VIM-4 metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in an Algerian hospital[J]. *Journal of Infection in Developing Countries*, 2019, 13(4): 284-290.

[10] JAHAN M I, RAHAMAN M M, HOSSAIN M A, et al. Occurrence of intI1-associated VIM-5 carbapenemase and co-existence of all four classes of beta-lactamase in carbapenem-resistant clinical *Pseudomonas aeruginosa* DMC-27b[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2020, 75(1): 86-91.

[11] MARTINS W M B S, NARCISO A C, CAYO R, et al. SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST277 clone recovered from microbiota of migratory birds[J]. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2018, 90(3): 221-227.

[12] FERNANDES M R, SELLERA F P, MOURA Q, et al. Zoonanthropotic transmission of drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, Brazil[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2018, 24(6): 1160-1162.

[13] TREEPONG P, KOS V N, GUYEUX C, et al. Global emergence of the widespread *Pseudomonas aeruginosa* ST235 clone[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2018, 24(3): 258-266.

[14] PEREZ-VAZQUEZ M, SOLA-CAMPOY P J, ZURITA A M, et al. Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Spain: Interregional dissemination of the high risk-clones ST175 and ST244 carrying blaVIM-2, blaVIM-1, blaIMP-8, blaVIM-20 and blaKPC-2[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2020, 56(1): 106026. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.106026.

[15] XIANG Y, YAN L, ZHENG X C, et al. Rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* by cross priming amplification[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2020, 19(10):

2523-2529.

[16] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 28th informational CLSI document: M100-S28[S]. 2018. www.clsi.org.

[17] CURRAN B, JONAS D, GRUNDMANN H, et al. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(12): 5644-5649.

[18] DAVIS T J, KARANJIA A V, BHEBHE C N, et al. *Pseudomonas aeruginosa* volatilome characteristics and adaptations in chronic cystic fibrosis lung infections[J]. *mSphere*, 2020, 5(5): e00843-20.

[19] DAME J A, BEYLIS N, NUTTALL J, et al. *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection at a tertiary referral hospital for children[J]. *BMC Infectious Diseases*, 2020, 20(1): 729. doi: 10.1186/s12879-020-05437-1.

[20] RAMOS M S, FURLAN J P R, GALLO I F L, et al. High level of resistance to antimicrobials and heavy metals in multidrug-resistant *Pseudomonas* sp. isolated from water sources[J]. *Current Microbiology*, 2020, 77(10): 2694-2701.

[21] JACKSON L, DEPAS W, MORRIS A J, et al. Visualization of *Pseudomonas aeruginosa* within the sputum of cystic fibrosis patients[J]. *Jove-Journal of Visualized Experiments*, 2020(161): e61631.

[22] 秦柯君, 曹献芹, 陈派强, 等. 铜绿假单胞菌临床分布及耐药机制研究[J]. *中国病原生物学杂志*, 2021, 16(2): 224-227.

[23] 杨婧, 陈丽华. 铜绿假单胞菌生物被膜与宿主免疫的关系[J]. *中国微生态学杂志*, 2017, 29(7): 861-865.

[24] 吴振安, 张亮. 铜绿假单胞菌的临床分布及耐药性分析[J]. *中国临床医生杂志*, 2021, 49(1): 55-57.

[25] 郑百慧, 龚春, 梅黎, 等. 呼吸与危重症医学病房分离的碳青霉烯耐药铜绿假单胞菌的分子流行病学[J]. *中华医院感染学杂志*, 2020, 30(17): 2610-2614.

[26] MOLINA-MORA J A, CHINCHILLA-MONTERO D, CHAVARRIA-AZOFEIFA M, et al. Transcriptomic determinants of the response of ST-111 *Pseudomonas aeruginosa* AG1 to ciprofloxacin identified by a top-down systems biology approach[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 13717. doi: 10.1038/s41598-020-70581-2.

[27] MULET X, FERNANDEZ-ESGUEVA M, NORTE C, et al. Validation of MALDI-TOF for the early detection of the ST175 high-risk clone of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical isolates belonging to a Spanish nationwide multi-center study[J]. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2021, 39(6): 279-282.

[28] BOTELHO J, GROSSO F, PEIXE L. Unravelling the genome of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate belonging to the high-risk clone ST235 reveals an integrative conjugative element housing a bla(GES-6) carbapenemase[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2018, 73(1): 77-83.

【责任编辑 李庆玲】