

文章编号:1674-7054(2013)02-0173-04

蟒蛇铜绿假单胞菌的分离鉴定及抗药性分析

曾纪锋¹, 林杰材¹, 李笑春¹, 郑继平¹, 廖世庄²

(1. 海南大学 农学院, 海南 海口 570228; 2. 海南东盛弘蟒蛇科技有限公司, 海南 文昌 571346)

摘要: 为了确认死于急性支气管炎、肺炎的蟒蛇致病病原, 对死亡蟒蛇的肝、肺组织及心血进行病原分离培养, 获得1株分离菌株, 并对其进行形态学、培养特性、生化特性测定及动物致病试验。结果表明, 分离菌株为铜绿假单胞菌, 是本病致病病原; 对分离菌株进行24种常用抗菌药物的药敏试验, 结果表明, 该菌株对氟苯尼考、妥布霉素、氯霉素和环丙沙星敏感, 对红霉素、氟哌酸、氨苄青霉素、头孢拉定、新霉素、复方新诺明、卡那霉素、罗红霉素、丁胺卡那霉素、氧氟沙星、阿莫西林、庆大霉素、四环素等多种抗菌药物产生耐药, 且呈多重耐药性。

关键词: 铜绿假单胞菌; 分离鉴定; 抗药性; 蟒蛇

中图分类号: R 378.991

文献标志码: A

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*), 又称绿脓杆菌, 属革兰氏阴性假单胞菌属(*Pseudomonas*)。该菌分布广泛, 土壤、水、人和动物体内肠道、体表粘膜、皮肤、被毛均有存在, 具有多种致病因子及较强的侵袭力, 能引起动物呼吸道炎症、化脓性肺炎、肠炎、子宫炎及肉芽肿等各种病变, 能感染众多的哺乳动物、禽类和爬行动物^[1]。近年来, 国内野生动物的驯养发展迅速, 但野生动物呼吸道疾病越来越普遍, 而病原病因较复杂。蛇类养殖是野生动物驯养发展最迅速的产业, 但在人工养殖的环境下, 蛇类最严重的疾病是呼吸道感染, 该病常引起蛇类大批死亡, 严重制约着国内养蛇业的发展。蛇类呼吸道感染病因复杂, 国内也罕见报道。笔者从因急性肺炎为主要病变致死的蟒蛇体内分离到1株病原细菌, 经生理生化特性测定, 鉴定为铜绿假单胞菌, 同时对分离菌株进行抗菌药物耐药性测定, 旨在为蛇类呼吸道感染的防治研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 病料 选择海南某蟒蛇养殖场出现的急性支气管炎、肺炎等呼吸道病变致死或濒死的蟒蛇, 无菌采集死蟒蛇的心血、肺及肝组织。

1.2 实验动物 1.5~2个月龄的健康幼蟒蛇。

1.3 培养基 营养琼脂平板、血液琼脂平板、麦康凯琼脂平板, 所用培养基均为广州环凯微生物科技有限公司产品, 使用时自行配制。

1.4 生化药品及试剂 氧化酶、触酶、葡萄糖、甘露醇、蔗糖、半乳糖、硝酸盐、脲酶等; 头孢噻肟、头孢拉定、环丙沙星、亚胺培南、氧氟沙星等药物的药敏试纸均为杭州天和微生物试剂有限公司产品。

1.5 病原的分离 取死亡或濒死蟒蛇的心血、肺、肝组织, 划线接种于血液琼脂平板、麦康凯琼脂平板和普通营养琼脂平板上, 在35℃下培养24h, 挑选典型菌落进行纯化。

1.6 革兰氏染色及鞭毛染色 取纯培养物按文献^[2]的方法进行革兰氏染色和鞭毛染色, 并置显微镜下

收稿日期: 2013-04-03

基金项目: 海南省自然科学基金项目(309003)

作者简介: 曾纪锋(1963-), 男, 海南琼山人, 海南大学农学院副教授。

通信作者: 林杰材, 海南大学农学院讲师. E-mail: hainanljc@sina.com

观察。

1.7 运动检查 将分离到的菌接种到肉汤培养基上,在 35 °C 下培养 16 h,取培养物作悬滴标本,置显微镜下观察。

1.8 生化试验 按文献[2]的方法对分离株纯培养物进行氧化酶、接触酶、O/F 试验,取纯培养物接种细菌生化微量反应管,在 35 °C 下培养 24 h,观察结果。

1.9 动物试验 分离菌株培养 24 h 后,用生理盐水将其稀释成菌落浓度为 9×10^8 /L 的菌液,肌肉注射健康 2 月龄幼蟒蛇 3 条,每条幼蟒蛇注射菌液 0.2 mL;同时用 3 条幼蟒蛇作对照,每条肌注生理盐水 0.2 mL。每天观察 1 次,记录其发病情况。对发病死亡的幼蛇进行剖检,记录病理变化,无菌取心血、肺、肝组织接种于营养琼脂平板进行分离培养。

1.10 药敏试验 采用 Kirby-Bauer 纸片扩散法进行抗菌药物敏感试验(参照中华人民共和国卫生行业标准 WS/T-125-1999 纸片法抗菌药物敏感试验标准),以大肠埃希菌 ATCC25922、金黄色葡萄菌 ATCC25923 为质控菌株,检测分离菌株对 24 种常见抗菌药物的敏感性。

2 结果与分析

2.1 病原分离培养 从死亡蟒蛇的心血、肺、肝脏组织均分离到菌落形态较一致的细菌,在血液琼脂平板上呈淡绿色, β 溶血;在营养琼脂平板上初时为浅灰色,长时间培养呈淡绿色;在麦康凯琼脂上为无色的较大的菌落或菌苔。取平板上优势的典型菌落纯化,接种斜面保存,数日后培养物及培养基均呈淡绿色。

2.2 病原特性 分离株革兰氏染色为阴性,菌体呈直杆状,单个或成对,两端钝圆,菌体均呈一端单鞭毛;液体培养基混浊,表面有菌膜,培养基呈绿色。

2.3 运动力检查 悬滴标本显微镜观察,分离菌株均呈直线运动。

2.4 生化试验 从表 1 可知,所分离的菌株氧化酶阳性,接触酶阳性,葡萄糖氧化发酵(O/F)为氧化型,不发酵。能还原硝酸盐,液化明胶,精氨酸双水解酶阳性,赖氨酸脱羧酶及鸟氨酸脱羧酶阴性;分解木糖、蕈糖、葡萄糖;不分解蔗糖、乳糖、果糖、棉子糖、半乳糖;MR 试验阴性,V-P 试验阴性,不产生 H_2S ,其生化特性与铜绿假单胞菌相符^[2-3]。

表 1 分离菌株的生理生化试验结果

Tab.1 The results of biochemical test

测定项目 Test item	结果 Results	测定项目 Test item	结果 Results
氧化酶 Oxidase catalase	+	蕈糖 Trehalose	+
接触酶 Catalase	+	蔗糖 Sucrose	-
O/F Oxidation/Fermentation	O 氧化型	菊糖 Alantoin	-
吲哚试验 Indole test	-	阿拉伯糖 Arabinose	-
甲基红 M. R Methyl red test	-	乳糖 Lactose	-
V-P Voges-Prokauer test	-	果糖 Levulose	-
硝酸盐还原 Nitrate deoxidize	+	棉子糖 Gossypose	-
精氨酸双水解酶 Arginine hydratase	+	枸缘酸盐 Trisodium citrate	+
液化明胶 Deliquesce gelatine	+	半乳糖 Galactose	-
赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	-	葡萄糖 Glucose	+
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	-	硫化氢 H_2S	-
木糖 Xylose	+		

2.5 病原鉴定 获得的分离菌株,O/F 试验为氧化型不发酵,革兰氏阴性,菌体为直的杆菌,一端单鞭毛,能快速运动,接触酶阳性,氧化酶阳性,硝酸盐还原阳性,根据《伯杰氏细菌鉴定手册》^[3],本分离菌可定为假单胞菌科(Pseudomonadaceae)。本菌 V-P 试验阴性,不产生吲哚,不产生 H_2S ,不产生赖氨酸脱羧酶,不产生鸟氨酸脱羧酶,依文献[2-3]的标准,可将其归入假单胞菌属(Pseudomonas)。

根据 rRNA 的同源性假单胞菌属分为 5 个 rRNA 同源群,帕氏(palleroni)RNA 第 1 组包括铜绿假单胞

菌(*P. aeruginosa*)、荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)5个生物变种、绿针假单胞菌(*P. chlovaphis*)、致黄色假单胞菌(*P. chloroaphis*)、恶臭假单胞菌(*P. putida*)2个生物变种、丁香假单胞菌致病亚种(*P. syingae path. vars*)、绿黄假单胞菌(*P. viridiflava*)、菊苣假单胞菌(*P. cidorii*)、施氏假单胞菌(*P. stutzeri*)、门多萨假单胞菌(*P. mendocirna*)、产碱假单胞菌(*P. alcaligenes*)、类产碱假单胞菌(*P. pseudoalcaligenes*)。

鉴于本分离菌株单鞭毛,有绿脓菌素可排除属内其他种,本菌的生化特性与文献[2-3]描述的铜绿假单胞菌特性相符,因此,本分离菌株可确认为铜绿假单胞菌。

2.6 动物试验 试验组接种3条幼蟒蛇,48 h开始出现死亡,到96 h幼蟒蛇全部死亡,对照组健康。剖检死亡幼蟒蛇可见肝淤血和肺淤血、出血,并从其心血、肺、肝组织中分离到该菌。

2.7 药敏试验 从表2可知,该菌分离株对环丙沙星、氟苯尼考、氯霉素、妥布霉素敏感;对氧氟沙星、丁胺卡那霉素、新霉素、多粘菌素和庆大霉素中度敏感;对红霉素、卡那霉素、链霉素、氨苄青霉素、阿莫西林、四环素、青霉素、罗红霉素、壮观霉素、头孢氨苄、头孢拉定等耐药,呈多重耐药性。

表2 药敏试验判定标准与药敏试验结果

Tab. 2 The criteria and the result of antibiotic sensitivity test

抗菌药物 Names of antibiotics	判定标准(抑菌圈直径)/mm Criteria(diameter of inhibitory rings)			结果判定(抑菌圈直径)/mm Result (diameter of inhibitory rings)
	耐药(R) Resistant	中介(I) Intermediate	敏感(S) Susceptible	
庆大霉素 Gidomycin	<12	13~14	≥15	13 I
卡那霉素 Kanamycin	<12	13~18	≥19	11 R
链霉素 Streptomycin	<10	11~15	≥16	9 R
红霉素 Erythromycin	<12	13~23	≥24	7 R
环丙沙星 Ciprofloxacin	<15	16~20	≥21	26 S
氟哌酸 Norfloxacin	<11	12~17	≥18	8 R
丁胺卡那霉素 Amikacin	<14	15~16	≥17	16 I
氨苄青霉素 Ampicillin	<12	13~17	≥18	7 R
阿莫西林 Amoxicillin	<12	13~17	≥18	8 R
氧氟沙星 Ofloxacin	<12	13~16	≥16	15 I
多粘菌素 Polymyxin	<7	8~12	≥13	11 I
四环素 Tetracycline	<14	15~18	≥19	13 R
青霉素 Penicilin	<10	11~15	≥16	5 R
罗红霉素 Roxithromycin	<10	11~15	≥16	9 R
新霉素 Novomycin	<10	11~15	≥16	11 I
壮观霉素 Spectinomycin	<12	13~18	≥19	8 R
复方新诺明 Selectrin	<12	13~16	≥17	5 R
头孢唑啉 Cephazoline	<13	14~18	≥19	9 R
头孢氨苄 Cefalexin	<14	15~17	≥18	10 R
头孢拉定 Cefradine	<14	15~17	≥18	8 R
氟苯尼考 Florfenicol	<12	13~17	≥18	20 S
妥布霉素 Tobramycin	<12	13~14	≥15	18 S
交沙霉素 Josamycin	<13	14~22	≥23	12 R
氯霉素 Chloromycin	<12	13~17	≥18	19 S

3 讨论

铜绿假单胞菌分布广泛,如在周围环境、人和动物皮肤、呼吸道、消化道等部位均有分布,是体弱和免疫功能低下患者并发感染常见的重要病原之一,由其引起的医院感染率高达30%以上^[4]。而近年来铜绿

假单胞菌引起的动物感染的报道也逐年增加,如引起多种家畜创伤感染,牛的乳腺炎、泌尿系统感染、牛的脓肿、腹膜炎、关节炎;猪、牛、鸡的呼吸道感染、肺炎及兔、水貂、灰鼠、雄猫等兽类的类似感染,但爬行类的铜绿假单胞菌感染却少见报道。笔者从人工养殖的热带野生动物蟒蛇病例体内分离到1株铜绿假单胞菌,感染蟒蛇以急性支气管炎、肺炎、细菌性肺脓肿、肺淤血、出血为特征,其病变与哺乳动物类似。这些结果表明,铜绿假单胞菌感染具有普遍性,是野生动物呼吸系统疾病的重要感染菌之一。

临床上许多病原菌都具有耐药性,这与抗菌药物的滥用有一定的关系。本研究的药敏试验结果表明,在24种常见抗菌药物中,分离到的铜绿假单胞菌株只对环丙沙星、氯霉素、氟苯尼考、妥布霉素敏感;对红霉素、链霉素、卡那霉素等15种抗菌药物表现出耐药多重性,因此,在进行该菌感染治疗时,应当避免使用这些药物。通过药物敏感试验来选择临床治疗药物是较可行的方法。由于发现铜绿假单胞菌对环丙沙星、妥布霉素、氟苯尼考等药物高度敏感,故在临床治疗过程中可把环丙沙星、妥布霉素、氟苯尼考等作为首选治疗药物。

铜绿假单胞菌的耐药机理非常复杂,表现为:1)细菌产生活性酶,如 β -内酰胺酶、氨基糖苷纯化酶等;2)细菌改变药物作用靶位,如DNA螺旋酶等结构发生改变,逃避药物作用;3)生物膜的形成;4)细胞外膜通透性降低等。

铜绿假单胞菌可通过基因突变或基因水平转移获得耐药基因,产生各种 β -内酰胺酶和抗菌药物修饰酶,外排泵高表达,外膜通透性改变和药物作用靶位的改变等,从而产生多重耐药性^[5],但细菌的耐药机理及耐药性都具有地域性差别,因此,阐明本地区养殖场的铜绿假单胞菌耐药谱及其耐药基因表达水平,对有效预防铜绿假单胞菌耐药菌株迅速扩散有重要的现实意义;对本地养殖场铜绿假单胞菌耐药动态监测,将有助于抗感染治疗时,能够合理选择抗菌药物,最大限度地减少养殖场的损失。

参考文献:

- [1] 吴信法. 兽医细菌学[M]. 北京:中国农业出版社,1998:138-144.
- [2] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001.
- [3] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 第8版. 中国科学院微生物研究所《伯杰氏细菌鉴定手册》翻译组, 译. 北京:科学出版社,1984:274-313.
- [4] 周秀珍,孙继梅,刘建华. 连续10年铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药率分析[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(13):1432-1433.
- [5] 崔爱瑛. 132株铜绿假单胞菌来源、耐药性及耐药基因的携带情况分析[J]. 山东医药,2011,38(1):107-108.

Identification of a Strain of *Pseudomonas Aeruginosa* Isolated from Python and Its Tolerance to Antibiotics

ZENG Jifeng¹, LIN Jiecai¹, LI Xiaochun¹, ZHENG Jiping¹, LIAO Shizhuang²

(1. College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. Hainan Dongshenghong Python Co. Ltd., Wenchang 571346, China)

Abstract: Based on the colonial morphology, Gram's staining, bacteria growth requirements, biochemical properties, and animal inoculation tests, a *Pseudomonas aeruginosa* strain was isolated and identified from the tissues of the python (*Python molurus*) dead of pneumonia and acute bronchitis. The strain was tested with 24 different antibiotics to determine its tolerance against the antibiotics. The results showed that the strain was highly sensitive to florfenicol, tobramycin, chloramphenicol and ciprofloxacin, but tolerant to erythromycin, norfloxacin, ampicillin, cefradine, novomycin, selectrin, kanamycin, roxithromycin, amikacin, ofloxacin, amoxicillin, cido-mycin, tetracycline, etc, showing its multi-tolerance to antibiotics.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; isolation and identification; tolerance; *Python molurus*