

文章编号:1002-2694(2012)02-0193-03

## 健康肉鸡高比率携有多重耐药铜绿假单胞菌<sup>\*</sup>

孙理云,孔瑞娜,温广辉,鲁继谦

**摘要:**目的 检测健康成年肉鸡铜绿假单胞菌感染及其抗菌谱。**方法** 2011年1月—3月在河南省洛阳市2个菜市场随机抽取市售健康肉鸡鸡肠内容物,经SCDLP液体培养基增菌,菌液十六烷基三甲基溴化铵琼脂培养基培养,经氧化酶试验、绿脓菌素测定、明胶液化试验、42℃生长试验和硝酸盐还原产气试验等一系列试验鉴定分离细菌,鉴定的铜绿假单胞菌采用K-B法测定对头孢他啶、头孢吡肟、头孢哌酮、羧苄西林、氨曲南、庆大霉素、阿米卡星、妥布霉素、氯霉素、四环素、诺氟沙星、环丙沙星的耐药性。**结果** 20个样品9个分离出11株铜绿假单胞菌。11株细菌具有7种耐药模式;3种模式为多重耐药模式,共6株细菌,来源于6只肉鸡。**结论** 45%(9/20)肉鸡携带铜绿假单胞菌,30%(6/20)肉鸡携有多重耐药铜绿假单胞菌。

**关键词:**肉鸡;铜绿假单胞菌;多重耐药性**中图分类号:**R378 **文献标识码:**A

## Antibiogram of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from healthy broilers

SUN Li-yun, KONG Rui-na, WEN Guang-hui, LU Ji-qian

(College of Livestock Science &amp; Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

**ABSTRACT:** To investigate the prevalence and antibiogram of *Pseudomonas aeruginosa* in healthy broilers, a total of 20 intestinal content samples were obtained from broilers sold in 2 markets in Luoyang between January and March 2011. Of 9 samples(45%) were positive for *P. aeruginosa* and 11 isolates were identified as *Pseudomonas aeruginosa* using tests including oxidase, pyocyanin determination, gelatin liquidization, growth at 42℃ and nitrate reduction. Antimicrobial susceptibility tested by disk diffusion was conducted for ceftazidime, carbenicillin, cefoperazone, cefepime, gentamicin, amikacin, tobramycin, chloramphenicol, tetracycline, norfloxacin, and ciprofloxacin. The results revealed that all the 11 isolates showed 7 resistance profile patterns, and high resistance to chloramphenicol and high sensitivity to ceftazidime. However, these isolates varied in their resistance to carbenicillin (40.6% resistance, 18.18% moderate sensitivity), cefoperazone (27.27% moderate sensitivity), cefepime (36.36% moderate sensitivity), gentamicin (54.55% resistance, 18.18% moderate sensitivity), amikacin (54.55% resistance), tobramycin (54.55% resistance), tetracycline (54.55% resistance), norfloxacin (54.55% resistance) and ciprofloxacin (54.55% resistance). And 6 isolates were multidrug resistant bacteria.

**KEY WORDS:** broiler; *Pseudomonas aeruginosa*; multi-drug resistance

动物源食品及动物源细菌的抗生素抗性可由食物链传给人,抗生素抗性细菌的食源性污染是公共卫生的一种主要威胁,因而近年来人们加强了对动物源食品及动物源细菌的抗生素抗性的监测<sup>[1]</sup>。监测的细菌通常包括人兽共患病病原菌、兽医病菌和指示菌<sup>[2]</sup>。

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)通常生活在潮湿的环境,土壤、水和空气中广泛存在,也常常存在于人与动物肠道内和皮肤上<sup>[3]</sup>。该菌是一

种人兽共患病病原菌,造成人类和动物各种严重的疾病。

由于铜绿假单胞菌对大多数抗生素固有抗性并且对使用的抗生素迅速产生抗性,产生多耐药、广耐药甚至泛耐药铜绿假单胞菌,使得铜绿假单胞菌感染的治疗既困难又昂贵,并可以增加发病率和死亡率,因而铜绿假单胞菌的耐药性和抗菌模式监测成为目前国内外医院感染细菌抗药性检测的主要内容之一。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

##### 1.1.1 样品采集 2011年1—3月在河南省洛阳

<sup>\*</sup> 河南科技大学人才科研基金(05-10)资助

作者单位:河南科技大学动物科技学院,洛阳 471003;

Email:sunliyun8891@sina.com

市 2 个菜市场随机抽取 20 份市售健康肉鸡完整鸡肠。肉鸡在开膛后直接取完整的肠道放入无菌塑料袋中。取样后样品冷藏, 4 h 内进行检查。

**1.1.2 主要培养基和试剂** SCDLP 液体培养基(杭州天和微生物试剂有限公司), 十六烷基三甲基溴化铵琼脂培养基(青岛高科园海博生物技术有限公司), 营养肉汤(北京双旋微生物培养基制造厂), 绿脓素测定用培养基, 明胶培养基, 细菌生化反应管(杭州天和微生物试剂有限公司), 吐温-80(温州市化学用料厂)。

抗生素药敏试纸头孢他啶(CAZ; 30  $\mu\text{g}$ /片)、头孢哌酮(CFP; 75  $\mu\text{g}$ /片)、头孢吡肟(FEP; 30  $\mu\text{g}$ /片)、羧苄青霉素(CAR; 100  $\mu\text{g}$ /片)、氨曲南(AZT; 30  $\mu\text{g}$ /片)、庆大霉素(GM; 10  $\mu\text{g}$ /片)、阿米卡星(AN; 30  $\mu\text{g}$ /片)、妥布霉素(TM; 10  $\mu\text{g}$ /片)、氯霉素(C; 30  $\mu\text{g}$ /片)、四环素(Tet; 30  $\mu\text{g}$ /片)、诺氟沙星(NOR; 10  $\mu\text{g}$ /片)和环丙沙星(CIP; 5  $\mu\text{g}$ /片)均为杭州天和微生物试剂有限公司产品。

## 1.2 方法

**1.2.1 样品处理及增菌** 无菌剪开肠管, 将约 10 g 肠内容物挤入 10 mL 灭菌生理盐水, 混匀后, 加入 80 mL SCDLP 增菌液。将增菌液置于 37 °C 培养箱中进行增菌培养 18~24 h。

**1.2.2 细菌的分离纯化和鉴定** 参照中华人民共和国国家标准 GB7918.4-87 鉴定细菌<sup>[4]</sup>。

**1.2.4 药敏试验方法** 采用临床与实验室标准协会(CLSI)推荐的纸片扩散法进行<sup>[5]</sup>。从琼脂平板上挑取 3~5 个形态特征一致的菌落, 用接菌环接触每个菌落顶部后将细菌转移到含 4~5 mL 适宜的肉汤培养基中。将肉汤培养物置 35 °C 孵育 18 h。将菌液均匀涂布于 MH 琼脂平板。涂布细菌后 15 min 之内在琼脂表面置放药敏纸片。纸片贴好后 15 min 内将平板倒置 37 °C 培养, 16~18 h 测定抑菌区直径, 判定结果。质控菌株采用铜绿假单胞菌 ATCC278533。

## 2 结 果

**2.1 细菌的分离鉴定** 在 20 个样本中, 9 个样本分离出铜绿假单胞菌, 菌株数 11 株, 分别为 Y3、Y4、Y5、Y6、Y7、Y8、Y9、Y10、Y11、Y12、Y13, 其中 Y6 和 Y7、Y8 和 Y9 分离自同一样本。

**2.2 细菌药敏试验结果** 分离的细菌对氯霉素耐药率最高, 为 100%, 而对羧苄西林耐药、庆大霉素、阿米卡星、妥布霉素、四环素、诺氟沙星和环丙沙星 7 种药具有相同的耐药率, 均为 54.55%; 但分别有

27.27% 和 18.18% 细菌对庆大霉素和羧苄西林中度敏感; 另外分别有 63.64%、36.36% 和 27.27% 的细菌对  $\beta$ -内酰胺类的氨曲南、头孢吡肟和头孢哌酮中度敏感。敏感率最低的药物是氯霉素, 没有 1 株细菌敏感, 次低为庆大霉素, 敏感率为 18.18%。敏感率最高的药物是  $\beta$ -内酰胺类的头孢他啶, 为 100%, 另外 4 种  $\beta$ -内酰胺类药物氨曲南、头孢吡肟、头孢哌酮和羧苄西林的敏感率分别为 36.36%、63.64%、72.73% 和 27.27%。四环素、氟喹诺酮类的诺氟沙星和环丙沙星与氨基糖苷类的阿米卡星和妥布霉素有相同的敏感率, 均为 45.45%。

分离的 11 株铜绿假单胞菌抗菌模式变化很大, 共有 7 种抗菌模式(见表 1), 同一样品来源的 Y6 和 Y7、Y8 和 Y9 抗菌模式不同。Y10 仅对氯霉素有抗性, 对其他药物均敏感; Y7、Y9、Y13 细菌对 2 类抗生素有抗性(包括中等抗性, 下同); Y4 对 3 类抗生素有抗性; Y3、Y5、Y6、Y8、Y11 和 Y12 对所检测的 5 类抗生素均呈抗性。在这些抗生素中, 一些是铜绿假单胞菌固有抗性的, 如羧苄西林、氯霉素和四环素。

表 1 分离菌的抗菌素抗性模式

Tab. 1 Resistance phenotype of the isolated bacterial strains

Strains	Resistance Phenotype
Y10	C
Y7 Y9	C, GM
Y13	C, CAR
Y4	C, GM, CAR, AZT
Y3, Y8	C, Tet, NOR, CIP, GM, TM, AN, CAR, AZT
Y5	C, Tet, NOR, CIP, GM, TM, AN, CAR, AZT, FEP
Y6 Y11 Y12	C, Tet, NOR, CIP, GM, TM, AN, CAR, AZT, FEP, CFP

按照 Magiorakos 等多重耐药铜绿假单胞菌的定义<sup>[6]</sup>, Y3、Y5、Y6、Y8、Y11 和 Y12 为多抗铜绿假单胞细菌。因此多重耐药铜绿假单胞菌占分离菌株的 54.55%, 30% 的肉鸡携带多重耐药菌。

## 3 讨 论

铜绿假单胞菌广泛分布于自然界及人和动物中。我国已有报道铜绿假单胞菌引起鸡、羊、猪、兔、奶牛、貂、袋鼠、狮、朱鹮、海豚、鱼等动物发病, 但该菌在不同动物的流行情况尚未见报道。本研究我们对成年肉鸡流行情况进行了初步研究。结果表明铜

绿假单胞菌在肉鸡中分离率高达 45%。

国外鸡铜绿假单胞菌的分离率不一。Kamel 等由 31% 鸡呼吸道和 20% 鸡皮肤分离到铜绿假单胞菌<sup>[7]</sup>, Manal 等由有呼吸系统症状疾病鸡分离铜绿假单胞菌的比例为 26.8%<sup>[8]</sup>, 而 Shittu 等由 5% 的鸡粪样分离出铜绿假单胞菌<sup>[9]</sup>。与国外鸡铜绿假单胞菌分离率相比, 我们分离率高, 原因可能有多种, 采用的方法是其一, 我们首先用 SCLDP 培养基选择性增菌, 然后再用十六烷基三甲基溴化铵琼脂培养基选择性培养增菌液, 提高了分离细菌的效率。

2008 年卫生部全国细菌耐药监测网监测结果显示, 铜绿假单胞菌对氯霉素的耐药率为 87%, 对四环素的耐药率为 58.9%, 对庆大霉素的耐药率为 35.6%, 对阿米卡星的耐药率为 21.3%, 对妥布霉素的耐药率为 35.6%, 对环丙沙星的耐药率为 26.3%<sup>[10-11]</sup>。而本研究中鸡源铜绿假单胞菌对这些药的耐药率为 54.55% 及以上, 明显高于人源细菌的耐药率; 在我国氯霉素、四环素、庆大霉素、阿米卡星、妥布霉素、环丙沙星和诺氟沙星这些药物是人兽共用的抗生素, 氨基糖苷类、四环素类药物添加剂、混饮、混饲由于基层兽医从业者者没有经过专门培训, 没有执行或缺少抗菌药的使用规范, 导致药物滥用的现象时有发生, 鸡源铜绿假单胞菌对这些抗生素抗性比例高可能与这些有关。

在所监测  $\beta$ -内酰胺类药物中, 红霉素在我国是人兽共用的抗生素, 分离菌对其敏感率是所监测  $\beta$ -内酰胺类药物中最低的。另外 4 种  $\beta$ -内酰胺类药物, 鸡源铜绿假单胞菌对头孢他定和头孢哌酮的敏感率比人源的高, 但对头孢吡肟和氨曲南的敏感性较人源的低<sup>[10-11]</sup>。这是值得人们重视的。因为头孢吡肟是人感染铜绿假单胞菌第一线药物, 氨曲南和头孢吡肟不用于家禽, 这些菌株对这些药物产生耐药性的, 值得研究。

人们对人源铜绿假单胞菌对不同抗生素敏感性的研究日益增多, 但多重耐药菌的流行情况研究不多, 动物源的多重耐药菌流行情况更是未见报道。已报道的世界各地人源多重耐药菌的流行率不一, 2005 年以前报道的多数不超过 10%<sup>[12]</sup>, 2009 年马来西亚一医院分离的铜绿假单胞菌多重耐药菌占 19.6% (19/97)<sup>[13]</sup>, 而我们的 54.55% 结果明显高于人源多重耐药菌的流行率。由于我们检测的样本均是市售成年肉鸡, 下一步我们要对不同阶段、饲养场

的家禽情况进行研究。

## 参考文献:

- [1] Caprioli A, Busani L, Martel J L, et al. Monitoring of antibiotic resistance in bacteria of animal origin: epidemiological and microbiological methodologies[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2000, 14 :295-301.
- [2] Gnanou JC, Sanders P. Antibiotic resistance in bacteria of animal origin: methods in use to monitor resistance in EU countries[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2000, 15:311-322.
- [3] 陆承平. 兽医微生物学 [M]. 3 版, 北京: 中国农业出版社, 2001: 274-275.
- [4] 中华人民共和国国家标准化妆品微生物标准检验方法绿脓杆菌 GB7918.4-87.
- [5] Wikler MA, Low DE, Cockerill FR, et al. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard [M]. 9th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute document M2-A9. Wayne, PA: CLSI; 2006.
- [6] Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey R B, et al. Multidrug resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2011.
- [7] Kamel G M, Ezz eldeen N A, El-Mishad M Y et al. Susceptibility pattern of *Pseudomonas aeruginosa* against antimicrobial agents and some plant extracts with focus on its prevalence in different sources[J]. Global Veterinaria, 2011, 6 (1): 61-72.
- [8] Manal M, El-Jakee, J Abo-Alyazeed H, et al. Preparation and evaluation of the protective efficacy of *pseudomonas aeruginosa* irradiated vaccine in chickens[J]. Vet Med J Giza, 2002, 50(4): 709-719.
- [9] Shittu OB, Nwagbonwe CAK, George OO. Antibiotic resistance patterns of *Escherichia coli* isolates from human, pet, livestock and poultry living in close contact[J]. ASSET An International Journal, ASSET Series B, 2007, 6 (2): 164-170.
- [10] 年华, 郭丽洁, 丁丽萍, 等. Mohnarin2008 年度报告: 东北地区细菌耐药监测[J]. 中国抗生素杂志, 2010, 35(7): 482-489.
- [11] 胡云建, 陈东科. Mohnarin2008 年度报告: 非发酵革兰阴性杆菌耐药性监测[J]. 中国抗生素杂志, 2010, 35(7): 548-555.
- [12] Giske CG, Monnet DL, Cars O, et al. Clinical and economic impact of common multidrug-resistant gram-negative bacilli[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2008, 52 (3): 813-821.
- [13] Pathmanathan SG, Samat NA, Mohamed R. Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from a Malaysian Hospital[J]. Malaysian Journal of Medical Sciences, 2009, 16(2):27-32.