

水貂源铜绿假单胞菌的分离鉴定、 耐药性及毒力基因检测

张庆勋¹, 景胜凡^{1,2}, 韩姝伊¹, 王若琪^{1,3}, 冯胜勇^{1,4}, 何宏轩^{1*}

(1. 中国科学院动物研究所, 北京 100101; 2. 河北农业大学, 保定 071001;
3. 沈阳工学院, 抚顺 113122; 4. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 为查明河北某水貂养殖场水貂死亡原因, 本研究进行了病理组织学检查、细菌分离培养、细菌形态学观察、生化鉴定、16S rDNA 鉴定、药敏试验、耐药基因和毒力基因检测、动物回归试验等。结果显示, 共分离到 3 株铜绿假单胞菌, 16S rDNA 序列与 GenBank 中铜绿假单胞菌相应序列相似性达到 100%, 且 3 株分离菌均能使大鼠死亡。药敏结果表明, 分离菌对左氧氟沙星、庆大霉素、阿米卡星、多黏菌素 B 敏感, 对 β -内酰胺类、氨基糖苷类、大环内酯类、喹诺酮类、四环素类等抗生素耐药。分离菌携带 3 种超广谱 β -内酰胺酶基因(*bla*_{CTX-M1}、*bla*_{OXA-2}、*bla*_{OXA-10})、3 种碳青霉烯酶基因(*bla*_{VIM-1}、*bla*_{SPM-1}、*bla*_{KPC-1})及吸附相关基因、T1SS-T3SS 分泌系统、氧化应激相关基因、群体行为调控基因、磷脂酶相关的 17 种毒力基因。本研究结果为水貂绿脓杆菌病的临床诊断和治疗提供了参考依据。

关键词: 水貂; 绿脓杆菌; 分离鉴定; 耐药性

中图分类号: R378.99⁺1

文献标识码: A

Doi: 10.16431/j.cnki.1671-7236.2021.06.037

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Isolation, Identification, Drug Resistance and Virulence Genes Detection of *Pseudomonas aeruginosa* from Mink

ZHANG Qingxun¹, JING Shengfan^{1,2}, HAN Shuyi¹, WANG Ruoqi^{1,3},
FENG Shengyong^{1,4}, HE Hongxuan^{1*}

(1. Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;
2. Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China; 3. Shenyang Institute of
Technology, Fushun 113122, China; 4. University of Chinese Academy of
Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: To find out the cause of mink death in Hebei, pathogen identification was conducted by histopathological examination, bacterial isolation and culture, morphological observation, biochemical identification, drug susceptibility test, drug resistance gene and virulence gene detection and animal regression experiment. The results showed that 3 strains of *Pseudomonas aeruginosa* were isolated, 3 strains had 100% similarity with strains of *Pseudomonas aeruginosa* in GenBank, and all 3 strains could cause the death of the rats. Drug susceptibility test results showed that the isolates were highly susceptible to levofloxacin, gentamycin, amikacin, polymyxin B and ceftriaxone, and were resistant to extended-spectrum β -lactamases (ESBLs), aminoglycosides, macrolides, quinolones and tetracyclines. The isolates carried ESBLs genes

收稿日期: 2020-12-03

基金项目: 国家林业和草原局野生动物疫源疫病监测项目; 北京市野生动物疫源疫病主动监测和预警项目; 中国科学院战略生物资源科技支撑体系运行专项(CZBZX-1)

作者简介: 张庆勋(1990-), 男, 山东菏泽人, 博士, 研究方向: 野生动物疫源疫病, E-mail: zhangqingxun@ioz.ac.cn

* 通信作者: 何宏轩(1968-), 博士, 研究员, 研究方向: 野生动物疫源疫病, E-mail: hehx@ioz.ac.cn

(*bla*_{CTX-M1}, *bla*_{OXA-2}, *bla*_{OXA-10}), carbapenemases (*bla*_{VIM-1}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{KPC-1}), and 17 virulence-related markers including adhesion, T1SS-T3SS, oxidativestress, quorum sensing and regulation, and phospholipids. The results would provide references for disease control, therapeutical guidance and drug administration in mink.

Key words: mink; *Pseudomonas aeruginosa*; isolation and identification; drug resistance

铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, *P. aeruginosa*) 又称绿脓杆菌, 是一种革兰氏阴性菌, 属于假单胞菌属, 广泛存在于自然界中。铜绿假单胞菌是重要的条件致病菌, 也是医院获得性感染的主要病原菌之一, 能够导致广泛感染如急性和慢性呼吸道感染及血液感染^[1-3]。研究发现, 铜绿假单胞菌感染能够对毛皮动物(貂、狐及貉)、家养动物(鸡、羊和牛)、宠物(猫和犬)等造成严重伤害, 如水貂和狐狸出血性肺炎和鸡败血性绿脓杆菌病, 发病急、死亡率高、危害严重^[4-8]。以往的研究表明, 铜绿假单胞菌可通过呼吸道飞沫和气溶胶在空中传播, 也可通过污染的水直接或间接传播。在养殖业中, 污染的水、笼舍、饲料槽等是铜绿假单胞菌的储藏库, 是绿脓杆菌病暴发的来源^[9-10]。本研究对 2020 年河北省某水貂养殖场送检的 3 只疑似患有出血性肺炎的死亡水貂进行了病理诊断和细菌分析鉴定, 并对分离的绿脓杆菌进行了药物敏感性、毒力基因和耐药基因、致病性的分析, 以期水貂源绿脓杆菌的临床诊断、致病性和耐药性调查和风险评估提供基础支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

河北省某养殖场送检的 3 只患病死亡水貂。10 周龄雌性 Wistar 大鼠购自斯贝福(北京)生物技术有限公司; 抗生素药敏纸片购自北京天坛药物生物技术开发公司; 博检革兰氏阴性细菌鉴定系统购自青岛高科园海博生物技术有限公司; 脱纤维羊血购自北京赛谱锐思科技有限公司; DNA 聚合酶购自江苏康为世纪生物科技有限公司。

1.2 肺部 HE 染色及细菌分离培养

对 3 只死亡水貂进行病理剖检, 采集肺部病变组织保存于福尔马林中, 对保存组织进行 HE 染色。同时无菌采集肺部组织, 划线接种至普通琼脂培养基, 37 °C 培养 24 h, 挑取单个优势菌落进行纯化培养。取新鲜细菌培养物进行革兰氏染色, 镜检观察菌落形态特征。

1.3 细菌生化及 PCR 鉴定

取 0.5 麦氏比浊单位新鲜细菌培养物接种于微

量生化鉴定管, 按照博检革兰氏阴性细菌鉴定系统操作说明, 37 °C 培养 18~24 h 后观察结果。采用高温裂解法(0.25% SDS 于 95 °C 裂解 10 min)提取细菌基因组 DNA。利用细菌 16S rDNA 通用引物(27F: 5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3'; 1492R: 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')和铜绿假单胞菌特异性引物(*Pseudomonas*-F: 5'-CTACC-GCTCCTCGTCACTCTG-3'; *Pseudomonas*-R: 5'-CGTGTTCTCCTGCACATCCTT-3')进行 PCR 鉴定。PCR 反应体系 50 μL: 2 × *Taq* MasterMix 25 μL, 上、下游引物各 1 μL, 模板 DNA 2 μL, ddH₂O 21 μL。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s(铜绿假单胞菌特异性引物延伸 30 s), 共 35 个循环; 72 °C 延伸 7 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定并回收后, 送至华大基因进行测序。将 16S rDNA 测序结果与 NCBI 数据库中序列进行相似性比对分析, 并利用 MegaX 中的 Neighbor-Joining 法构建系统发育树, Bootstrap 值设置为 1 000。

1.4 药敏试验

参照 K-B 纸片扩散法进行药敏试验。将已纯化的 3 株铜绿假单胞菌制成 0.5 麦氏比浊单位的细菌悬液, 取 100 μL 涂布于普通琼脂培养基上, 将 17 种抗生素药敏片贴于培养基上, 37 °C 培养 16 h 后测量各个抗生素的抑菌圈直径。

1.5 耐药基因及毒力基因检测

参考文献^[9-11]设计合成绿脓杆菌常见的 8 种抗生素耐药基因, 包括超广谱 β-内酰胺酶 (*bla*_{CTX-M1}, *bla*_{OXA-2}, *bla*_{OXA-10}) 和碳青霉烯酶 (*bla*_{VIM-1}, *bla*_{VIM-2}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{KPC-1})。参考文献^[9, 12-14]设计合成铜绿假单胞菌常见的 21 种毒力基因, 包括吸附相关基因(*algU*, *algD*)、T1SS 分泌系统(*aprA*)、T2SS 分泌系统(*lasA*, *lasB*, *toxA*)、T3SS 分泌系统(*exoS*, *exoU*, *exoT*, *exoY*)、氧化应激相关基因(*phz I*, *phz II*, *phzM*, *phzS*, *phzH*)、群体行为调控基因(*las I*, *lasR*, *rhlL*, *rhlR*)、磷脂酶(*plcH*, *plcN*)。利用细菌基因组 DNA 对上述耐药基因及毒力基因进行 PCR 检测, PCR 反应体系和程序同 1.3, 其中退火温度范

围为 52~60 °C,延伸时间范围为 30~120 s。

1.6 动物回归试验

将试验大鼠分为对照组和试验组,每组 3 只,3 个试验组分别腹腔接种 200 μ L(1×10^8 CFU/mL) 细菌悬液,对照组注射等量生理盐水,观察动物的发病及死亡情况,并通过粪便和肺部进行铜绿假单胞菌分离检测,同时对大鼠肺脏组织进行 HE 染色观察病理结果。

2 结果

2.1 病原菌的分离

对 3 只死亡水貂进行剖检,发现胸腔出血、淤血,肺部有严重出血坏死,心脏有出血,肝脏有边缘坏死肿大出血、胆汁溢出,肝脏黄染,脾脏轻微肿大颜色发黑,气管、胃壁、肠道轻微出血,肠道内无内容物,肾脏无异常。初步判定为出血性肺炎。肺部细菌培养结果发现,普通琼脂上有边缘不整齐绿色菌落,具有芳香气味(图 1A);血平板上具有不规则的带溶血环的菌落(图 1B),镜检可见两端钝圆的小杆

菌。同时对肺脏组织进行 HE 染色,发现血管扩张、出血,肺泡腔内见红细胞,肺泡隔增厚,可见红细胞及含铁血黄素沉着,少量炎性细胞浸润(图 2),怀疑为出血性肺炎感染早期。

2.2 分离菌株的生化鉴定

对 3 株分离菌株进行生化鉴定,结果显示一致的生化特性(表 1)。3 株菌都能够分解葡萄糖、脲酶、ONPG、精氨酸、赖氨酸、鸟氨酸和柠檬酸,氧化酶阳性,能够液化明胶,不产生硫化氢和吲哚,VP 试验阴性,符合铜绿假单胞菌的生化鉴定特征。

2.3 PCR 鉴定及序列分析

以 3 株分离菌株的 DNA 为模板,通过 16S rDNA 引物进行检测,结果显示,扩增片段大小均为 1 500 bp(图 3),与预期目的基因大小一致。3 株菌 16S rDNA 的测序结果相似性为 100%,经 NCBI 中 BLAST 比对发现,分离菌株与铜绿假单胞菌相似性为 100%。系统发育分析结果显示,3 株分离菌株与铜绿假单胞菌聚为一支(图 4)。以上结果证实分离菌为铜绿假单胞菌。

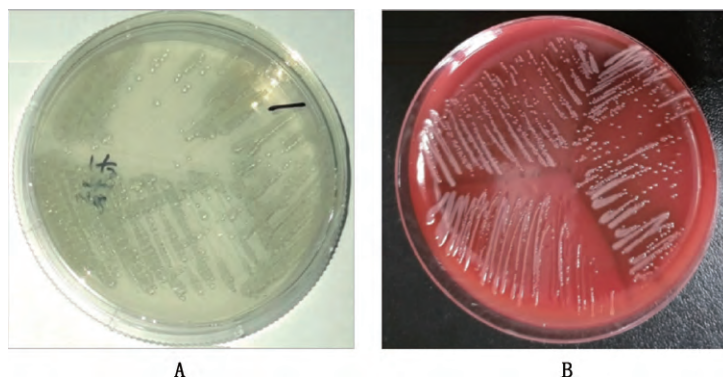


图 1 普通琼脂培养板(A)和血平板(B)分离菌株的菌落形态

Fig. 1 Colony morphology of the isolates on general nutrition agar plate (A) and blood plate (B)

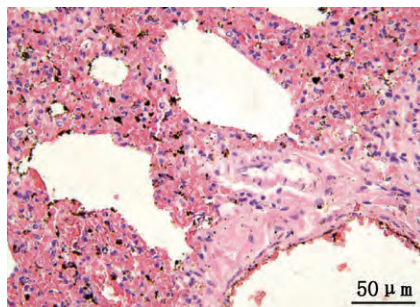


图 2 水貂肺脏组织显微结构(HE 染色)

Fig. 2 Microstructure of lung in mink(HE staining)

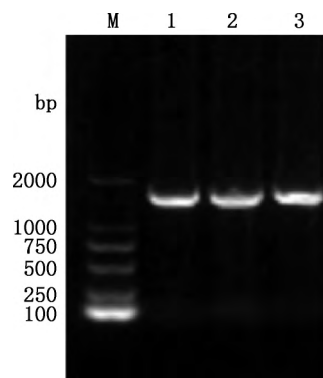
表 1 分离菌株生化鉴定结果

Table 1 Biochemical identification results of the isolates

项目 Items	结果 Results	项目 Items	结果 Results
ONPG 试验 ONPG test	+	明胶 Gelatin	+
精氨酸 Arginine	+	葡萄糖 Glucose	+
赖氨酸 Lysine	+	甘露醇 Mannose	-
鸟氨酸 Ornithine	+	肌醇 Inositol	-
柠檬酸 Citrate	+	山梨醇 Sorbose	-
硫化氢 H ₂ S	-	鼠李糖 Rhamnose	-
脲酶 Urea	+	蔗糖 Saccharose	-
乳糖 Lactose	-	蜜二糖 Melibiose	-
吲哚 Indole	-	阿拉伯糖 Arabinose	-
VP 试验 VP test	-	氧化酶 Oxidase	+

+, 阳性; -, 阴性

+, Positive; -, Negative



M, DL2000 DNA Marker; 1~3, 分离菌株 Hb1~Hb3

M, DL2000 DNA Marker; 1-3, Isolated strains Hb1-Hb3

图 3 分离菌株 16S rDNA PCR 扩增

Fig. 3 16S rDNA amplification of the isolates by PCR

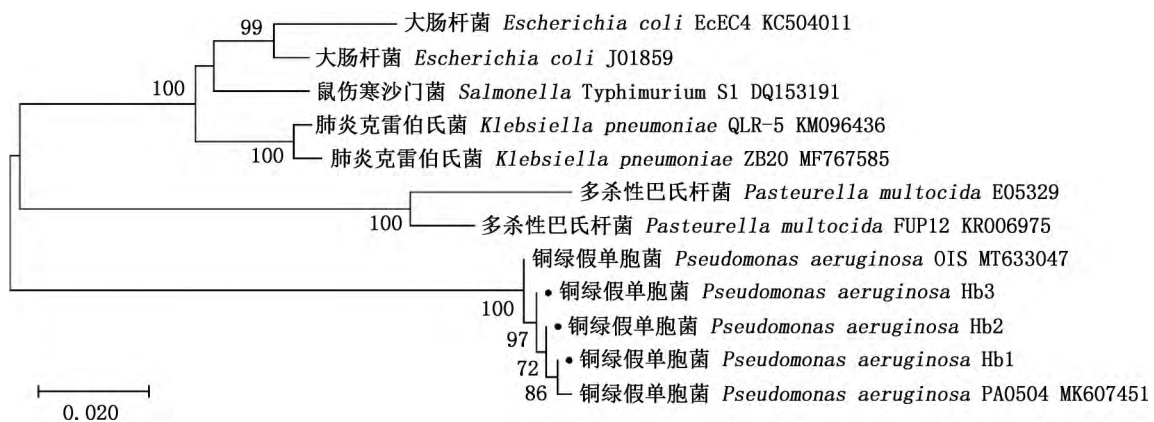


图 4 分离菌株 16S rDNA 基因序列系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on 16S rDNA gene of the isolates

2.4 药敏试验

采用 17 种抗菌药物对分离株进行药敏试验, 结果显示, 3 株分离菌株对左氧氟沙星、庆大霉素、阿

米卡星、多黏菌素 B 敏感; 对阿莫西林/克拉维酸、氨苄西林、红霉素、呋喃妥因、青霉素、氯霉素、萘啶酸、四环素、卡那霉素、利福平耐药; 菌株 Hb1 和

Hb3 对链霉素耐药, 而 Hb2 对其中度敏感; 菌株 Hb1 对头孢曲松中度敏感, Hb2 和 Hb3 对其敏感;

菌株 Hb1 和 Hb3 对头孢噻肟中度敏感, Hb2 对其敏感(表 2)。

表 2 分离菌株药敏试验结果

Table 2 Drug susceptibility test results of the isolates

药物 Drugs	分离株 Isolates		
	Hb1	Hb2	Hb3
阿莫西林/克拉维酸 Amoxicillin/Clavulanate	R	R	R
氨苄西林 Ampicillin	R	R	R
链霉素 Streptomycin	R	I	R
左氧氟沙星 Levofloxacin	S	S	S
红霉素 Erythromycin	R	R	R
头孢曲松 Ceftriaxone sodium	I	S	S
呋喃妥因 Furantoin	R	R	R
青霉素 Penicillin	R	R	R
头孢噻肟 Cefotaxime sodium	I	S	I
庆大霉素 Gentamicin	S	S	S
氯霉素 Chloramphenicol	R	R	R
萘啶酸 Nalidixic acid	R	R	R
四环素 Tetracycline	R	R	R
阿米卡星 Amikacin	S	S	S
卡那霉素 Kanamycin	R	R	R
利福平 Rifampin	R	R	R
多黏菌素 B Polymyxin B	S	S	S

S, 敏感; I, 中度敏感; R, 耐药

S, Sensitivity; I, Intermediary; R, Resistance

2.5 耐药基因及毒力基因检测

采用铜绿假单胞菌 21 种毒力基因特异性引物进行 PCR 扩增, 结果显示, 除了 T2SS 分泌系统中 *lasA* 和 *toxA* 基因、T3SS 分泌系统中 *exoU* 和 *exoT* 基因未携带以外, 其余与吸附相关基因、T1SS 分泌系统、氧化应激相关基因、群体行为调控基因、磷脂

酶相关的 17 种毒力基因皆为阳性。采用铜绿假单胞菌 8 种超广谱 β -内酰胺酶和碳青霉烯酶抗生素耐药基因特异性引物进行 PCR 扩增, 结果显示, 分离菌株携带所有检测的超广谱 β -内酰胺酶基因和部分碳青霉烯酶基因 (*bla_{VIM-1}*、*bla_{SPM-1}*、*bla_{KPC-1}*), 而未携带碳青霉烯酶基因 *bla_{VIM-2}* 和 *bla_{NDM-1}* (表 3)。

表 3 分离菌株耐药基因及毒力基因检测结果

Table 3 Detection results for drug resistance genes and virulence gene of the isolates

分类 Classification	功能 Function	基因 Genes	分离菌株 Isolates			
			Hb1	Hb2	Hb3	
毒力相关基因 Virulence associated genes	吸附 Adhesion	<i>algU</i>	+	+	+	
		<i>algD</i>	+	+	+	
	T1SS 分泌系统 Type I secretory systems	<i>aprA</i>	+	+	+	
		T2SS 分泌系统 Type II secretory systems	<i>lasA</i>	-	-	-
			<i>lasB</i>	+	+	+
	T3SS 分泌系统 Type III secretory systems	<i>toxA</i>	-	+	+	
		<i>exoS</i>	+	+	+	
		<i>exoU</i>	-	-	-	
		<i>exoT</i>	-	+	+	
		<i>exoY</i>	+	+	+	

续表

分类 Classification	功能 Function	基因 Genes	分离菌株 Isolates		
			Hb1	Hb2	Hb3
	氧化应激 Oxidative stress	<i>phz I</i>	+	+	+
		<i>phz II</i>	+	+	+
		<i>phzM</i>	+	+	+
		<i>phzS</i>	+	+	+
		<i>phzH</i>	+	+	+
	群体行为调控 Quorum sensing regulation	<i>las I</i>	+	+	+
		<i>lasR</i>	+	+	+
		<i>rhlL</i>	+	+	+
		<i>rhlR</i>	+	+	+
	磷脂酶 Phospholipase	<i>plcH</i>	+	+	+
		<i>plcN</i>	+	+	+
抗生素耐药基因 Antibiotic resistance genes	超广谱 β -内酰胺酶 Extended-spectrum β -lactamases	<i>bla_{CTX-M1}</i>	+	+	+
		<i>bla_{OXA-2}</i>	+	+	+
		<i>bla_{OXA-10}</i>	+	+	+
	碳青霉烯酶 Carbapenemases	<i>bla_{VIM-1}</i>	+	+	+
		<i>bla_{VIM-2}</i>	-	-	-
		<i>bla_{SPM-1}</i>	+	+	+
		<i>bla_{NDM-1}</i>	-	-	-
		<i>bla_{KPC-1}</i>	+	+	+

+, 阳性; -, 阴性

+, Positive; -, Negative

2.6 致病性试验

动物回归试验结果显示, 试验组大鼠出现食欲减退、精神不振、鼻腔周围有红色泡沫样液体、腹泻等症状, 在 48 h 全部死亡。对死亡大鼠进行剖检发现具有出血性肺炎病变; HE 染色显示, 死亡大鼠肺泡腔扩张, 肺泡隔间大, 出血, 少量炎性细胞浸润(图 5)。无菌采集大鼠肺脏组织和粪便进行细菌培养, 经铜绿假单胞菌特异性引物检测为阳性(图 6)。以上结果证实, 本次分离的 3 株铜绿假单胞菌具有较强的致病性。

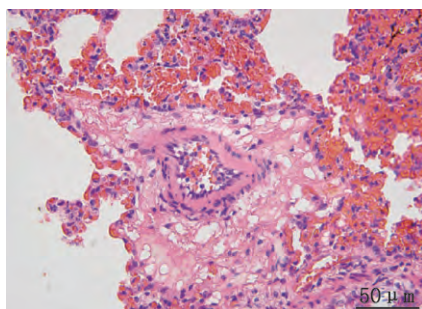
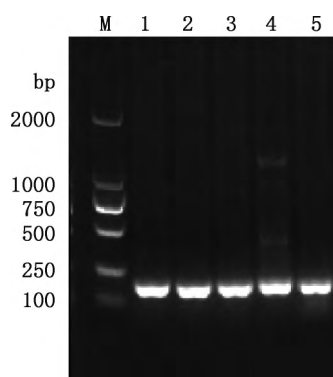


图 5 大鼠肺脏组织显微结构(HE 染色)

Fig. 5 Microstructure of lung in rat (HE staining)



M, DL2000 DNA Marker; 1~3, 分离菌株 Hb1~Hb3; 4, 大鼠肺脏分离菌; 5, 大鼠粪便分离菌

M, DL2000 DNA Marker; 1-3, Isolated strains Hb1-Hb3; 4, Isolated strain from lung in rat; 5, Isolated strain from fecal in rat

图 6 分离菌株特异性引物 PCR 扩增

Fig. 6 PCR amplification of specific primers of the isolates

3 讨论

铜绿假单胞菌是引发水貂、狐狸、貉等毛皮动物出血性肺炎的重要病原菌之一, 给毛皮动物养殖业造成重大的经济损失^[4-5]。本研究从 3 只具有出血

性肺炎症状的水貂肺脏组织中分离得到 3 株优势菌株,通过组织病理学观察、形态学鉴定、生化鉴定及分子生物学方法证实分离菌株为铜绿假单胞菌。动物致病性试验结果显示,大鼠出现出血性肺炎症状,且 48 h 内全部死亡,确定铜绿假单胞菌是导致水貂死亡的主要病原菌。同时分离菌具有较强的致病性,这可能与该菌株携带的毒力基因相关。铜绿假单胞菌的致病性主要依赖于毒力相关基因及其调控因子的表达,包括黏附素、外毒素、蛋白酶和色素等^[9,15-16]。本研究对 3 株分离菌所携带的毒力基因进行了鉴定,结果发现,在所检测的 21 种毒力基因中有 17 种呈阳性,表明分离菌株较强的致病性可能与其携带多种毒力基因相关。

algU 和 algD 是褐藻胶生物合成的基本蛋白,是铜绿假单胞菌主要的黏附素,在水貂源及急性呼吸道患者源铜绿假单胞菌分离株中具有最高的携带率^[9,14],而本研究中其携带率均为 100%。aprA 是 T1SS 分泌系统分泌的一种重要锌离子金属蛋白酶,其功能主要是与细菌的侵袭、免疫逃避及与 T2SS 系统分泌的弹性蛋白酶协同作用导致胶原蛋白和纤维蛋白原降解有关^[17]。本研究中,aprA 高携带率与之前的研究相似^[9,14,18]。tox A 通过 T2SS 分泌系统分泌的重要外毒素,能够抑制宿主细胞蛋白合成^[19],在本研究中的 3 株分离菌中占 67% (2/3)。研究发现,所有的铜绿假单胞菌分离株都包含至少一种 T3SS 系统分泌蛋白,主要与肺炎相关的毒力因子^[14,20],而此次的水貂源绿脓杆菌分离株中携带 exoS 和 exoY,不携带 exoU 和 exoT。由 phz I、phz II、phzH、phzM 和 phzS 编码的吩嗪化合物主要与氧化应激、线粒体失活相关^[21],研究发现铜绿假单胞菌具有较高的携带率。其他毒力因子如群体行为调控和磷脂酶基因,在生物膜形成、应对环境变化、免疫逃避、细胞损伤等方面发挥作用^[22-23],本研究发现水貂源铜绿假单胞菌此类毒力基因携带率较高。

近年来,铜绿假单胞菌中与超广谱 β -内酰胺酶和碳青霉烯酶等耐药相关的多重耐药及泛耐药菌株的不断出现,已成为全球性的公共卫生安全问题,这给铜绿假单胞菌的抗菌治疗带来了新的挑战^[6,9,24]。超广谱 β -内酰胺酶是一类可水解灭活 β -内酰胺类抗生素(如青霉素、头孢菌素、单内酰胺类等)的 β -内酰胺酶, β -内酰胺酶活性是革兰氏阴性杆菌对 β -内酰胺类抗生素表现出耐药性的重要机制。本研究发现,3 株分离菌对 β -内酰胺类如氨苄西林和阿莫西

林、氨基糖苷类如卡那霉素、大环内酯类如红霉素、喹诺酮类、四环素类等抗生素耐药,与动物源性分离株及临床分离株具有相似的抗生素耐药性^[4-5,9,14]。同时发现,分离菌携带 3 种超广谱 β -内酰胺酶基因($\text{bla}_{\text{CTX-MI}}$ 、 $\text{bla}_{\text{OXA-2}}$ 、 $\text{bla}_{\text{OXA-10}}$)和 3 种碳青霉烯酶基因($\text{bla}_{\text{VIM-1}}$ 、 $\text{bla}_{\text{SPM-1}}$ 、 $\text{bla}_{\text{KPC-1}}$),对铜绿假单胞菌临床分离株的超广谱 β -内酰胺酶和碳青霉烯酶基因分布的研究有利于合理规范使用抗生素。

4 结 论

本研究分离得到 3 株铜绿假单胞菌,耐药性显示该分离菌株对左氧氟沙星、庆大霉素、阿米卡星、多黏菌素 B 等敏感,对 β -内酰胺类、氨基糖苷类、大环内酯类、喹诺酮类、四环素类等抗生素耐药,同时分离菌株携带多种超广谱 β -内酰胺酶、碳青霉烯酶和毒力基因。

参考文献 (References):

- [1] 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.
- [2] SUAREZ C, PENA C, TUBAU F, et al. Clinical impact of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections[J]. *Journal of Infection*, 2009, 58(4): 285-290.
- [3] CURRAN C S, BOLIG T, TORABI-PARIZI P. Mechanisms and targeted therapies for *Pseudomonas aeruginosa* lung infection[J]. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2018, 197(6): 708-727.
- [4] 朱利霞,王洪彬,赵希艳,等.水貂铜绿假单胞菌的分离鉴定及药敏试验[J]. *动物医学进展*, 2020, 41(9): 128-132.
ZHU L X, WANG H B, ZHAO X Y, et al. Isolation, identification and drug susceptibility test of *Pseudomonas aeruginosa* in mink[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2020, 41(9): 128-132. (in Chinese)
- [5] 孙娜,陈强,温永俊,等.水貂绿脓杆菌分离鉴定及药物敏感性分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2015, 42(10): 2788-2793.
SUN N, CHEN Q, WEN Y J, et al. Isolation, identification and drug sensitivity analysis of *Pseudomonas aeruginosa* from minks[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2015,

- 42(10):2788-2793. (in Chinese)
- [6] BAI X, LIU S, ZHAO J, et al. Epidemiology and molecular characterization of the antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in Chinese mink infected by hemorrhagic pneumonia[J]. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 2019, 83(2):122-132.
- [7] 李巧玲, 庞洪泽, 张文举, 等. 狐源绿脓杆菌的分离鉴定及药敏试验[J]. *畜牧与兽医*, 2018, 50(1):99-102. LI Q L, PANG H Z, ZHANG W J, et al. Isolation, identification and drug sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* in foxes[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2018, 50(1):99-102. (in Chinese)
- [8] 李冰心, 程柏丛, 王 俊, 等. 乳鸽源绿脓杆菌的分离与鉴定[J]. *福建畜牧兽医*, 2020, 42(5):10-12. LI B X, CHENG B C, WANG J, et al. Isolation and identification of *Pseudomonas aeruginosa* of pigeon[J]. *Fujian Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2020, 42(5):10-12. (in Chinese)
- [9] RODRIGUES Y C, FURLANETO I P, MACIEL A H P, et al. High prevalence of atypical virulotype and genetically diverse background among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a referral hospital in the Brazilian Amazon[J]. *PLoS One*, 2020, 15(9):e0238741.
- [10] BONNET R, SAMPAIO J L M, LABIA R, et al. A novel CTX-M β -lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant *Erobacteriaceae* isolated in Brazil[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000, 44(7):1936-1942.
- [11] POIREL L, NAAS T, NICOLAS D, et al. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase and its plasmid-and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000, 44(4):891-897.
- [12] SABHARWAL N, DHALL S, CHHIBBER S, et al. Molecular detection of virulence genes as markers in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from urinary tract infections[J]. *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics*, 2014, 5(3):125.
- [13] FINNAN S, MORRISSEY J P, O'GARA F, et al. Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients and the hospital environment[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(12):5783-5792.
- [14] QIAN Z, HUI P, HAN L, et al. Serotypes and virulence genes of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from mink and its pathogenicity in mink[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 139:103904.
- [15] OLIVER A, MULET X, LOPEZ-CAUSAPE C, et al. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones[J]. *Drug Resistance Updates*, 2015, 21:41-59.
- [16] FARAJI F, MAHZOUNIEH M, EBRAHIMI A, et al. Molecular detection of virulence genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from children with cystic fibrosis and burn wounds in Iran[J]. *Microbial pathogenesis*, 2016, 99:1-4.
- [17] LOMHOLT J A, POULSEN K, KILIAN M. Epidemic population structure of *Pseudomonas aeruginosa*; Evidence for a clone that is pathogenic to the eye and that has a distinct combination of virulence factors[J]. *Infection and Immunity*, 2001, 69(10):6284-6295.
- [18] HASSUNA N A, MANDOUR S A, MOHAMED E S. Virulence constitution of multi-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Upper Egypt[J]. *Infection and Drug Resistance*, 2020, 13:587.
- [19] ALGAMMAL A M, MABROK M, SIVARAMASAMY E, et al. Emerging MDR-*Pseudomonas aeruginosa* in fish commonly harbor oprL and toxA virulence genes and bla_{TEM}, bla_{CTX-M}, and tetA antibiotic-resistance genes[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1):1-12.
- [20] RELLO J, BORGATTA B, LAGUNES L. Management of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia; One size does not fit all[J]. *Critical Care*, 2014, 18(2):136.
- [21] GELLATLY S L, HANCOCK R E W. *Pseudomonas aeruginosa*; New insights into pathogenesis and host defenses[J]. *Pathogens and Disease*, 2013, 67(3):159-173.
- [22] SENTURK S, ULUSOY S, BOSGELMEZ-TINAZ G, et al. Quorum sensing and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* during urinary tract infections[J]. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 2012, 6(6):501-507.
- [23] WOLSKA K, SZWEDA P. Genetic features of clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains[J]. *Polish Journal of Microbiology*, 2009, 58(3):255-260.
- [24] 陈永红, 葛冰磊, 徐成春. 铜绿假单胞菌临床感染分布及耐药性分析[J]. *中国实验诊断学*, 2020, 24(11):1774-1777. CHEN Y H, GE B L, XU C C. Clinical distribution and drug resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains[J]. *Chinese Journal of Laboratory Diagnosis*, 2020, 24(11):1774-1777. (in Chinese)

(责任编辑 晋大鹏)