

紫色色杆菌感染小熊猫引起肺炎的临床调查

修云芳^{1,2} 邵良平^{3*} 李碧春¹ 徐素慧² 吴尚明³ 王隆伯⁴ 王德春⁵ 周伦江⁴ 陈玉村²

(1 扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009) (2 福州大熊猫研究中心, 福州 350001) (3 福建农林大学动物科学学院, 福州 350002)

(4 福建省农业科学院畜牧兽医研究所, 福州 350013) (5 福州总医院, 福州 350025)

摘要: 本文报道了福州大熊猫研究中心小熊猫感染紫色色杆菌引起肺炎的群发病例。7 只小熊猫中, 出现以呼吸衰竭为主要临床症状的 3 只小熊猫在发病 3 d 内全部死亡, 病死率 100%。死亡的小熊猫解剖病变为气管内有白色泡沫样分泌物, 肺有化脓性坏死并严重淤血; 胸腔, 心包积液且胸水浑浊; 肝脏呈弥漫性空泡变性, 淤血和散在局灶性坏死。通过流行病学调查, 病理解剖观察, 细菌分离培养和鉴定及动物回归试验, 诊断为紫色色杆菌无色变种感染。根据 GenBank 数据库提供的紫色色杆菌 16S RNA 基因序列, 设计一对引物 (5' GAG CAA ACA GGA TTA GAT ACC 3'; 5' TTA CGG TTA CCT TGT TAC GAC 3'), 获得目的基因片段 739 bp, 将核苷酸序列测定的结果与 GenBank 数据库提供的 7 株紫色色杆菌进行同源性比较。分离的菌株 (FJ08A) 与 CV09 株、ES-BV4400 株同源性均为 98.8%, 与 AY117554 株、EAV2 株、AJ871127 株、LMG3953 株、JS1 株同源性分别为 98.2%、98.0%、94.9%、93.1%、92.8%。依据调查结果和药物敏感试验, 对其余 4 只未发病的小熊猫采取肌肉注射头孢哌酮钠和口服复方新诺明进行预防性治疗, 效果良好, 未有新病发生。结果表明: (1) 紫色色杆菌是革兰氏阴性菌, 致病性强, 致死率高, 腹腔注射分离的紫色色杆菌菌液导致接种小白鼠在 2~3 d 内全部死亡。小熊猫感染后, 发病迅速, 致死率高, 应引起重视; (2) 紫色色杆菌是一种条件致病菌, 外伤感染是主要致病因素。

关键词: 小熊猫; 紫色色杆菌; 肺炎; 临床调查

中图分类号: S851.347.402

文献标识码: A

文章编号: 1000-1050(2011)01-0108-05

Clinical investigation of pneumonia in the red panda (*Ailurus fulgens*) caused by the non-pigmented strain of *Chromobacterium violaceum*

XIU Yunfang^{1,2}, SHAO Liangping^{3*}, LI Bichun¹, XU Suhui², WU Shangming³, WANG Longbo⁴, WANG Dechun⁵, ZHOU Lunjiang⁴, CHEN Yucun²

(1 College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

(2 Fuzhou Giant Panda Research Center, Fuzhou 350001, China)

(3 Animal Science College, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

(4 Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China)

(5 Fuzhou General Hospital, Fuzhou 350025, China)

Abstract: This clinical investigation reports several cases of pneumonia in the red panda (*Ailurus fulgens*) which occurred at Fuzhou Giant Panda Research Center in July, 2008. Among 7 infected animals, 3 red pandas died within 3 days after showing symptoms of high fever and severe respiratory disease. Necropsy results showed a white foamy discharge in the trachea; suppurative necrosis and massive congestion in the lung; turbid pleural and pericardial effusions; a liver with multiple atrophic foci and focal congestive necrosis. Through bacterial isolation and identification, the pathogen was confirmed to be non-pigmented *Chromobacterium violaceum*. Based on GenBank database of 16S RNA gene sequences for *Chromobacterium violaceum*, primer pairs (5' GAG CAA ACA GGA TTA GAT ACC 3'; 5' TTA CGG TTA CCT TGT TAC GAC 3') were designed to amplify a 739 bp gene fragment by PCR. The nucleotide sequences obtained subsequently were compared to seven strains of *Chromobacterium violaceum* from the GenBank database and found to be 98.8% identical to strains CV09

基金项目: 福建省生物技术科技项目 (2000Z156)

作者简介: 修云芳 (1973-), 女, 硕士, 高级兽医师, 主要从事大熊猫和小熊猫的研究。

收稿日期: 2010-01-07; 修回日期: 2010-09-21

* 通讯作者, Corresponding author, E-mail: shaolp1955@126.com

and ESBV4400 as well as 98.2% , 98.0% , 94.9% , 93.1% and 92.8% identical to strains AY117554, EAV2, AJ871127, LMG3953 and JS1, respectively. Intraperitoneal inoculation of 5 mice with the isolated pathogen culture resulted in the death of all mice within 2 – 3 days, a reflection of the virulence of this isolate. Several measures were implemented to control the spread of infection including disinfecting of the grounds, housing environment, and water supply. We further tested the clinical isolate for antibiotic susceptibility and based on these findings, the 4 remaining asymptomatic pandas were all treated twice daily intramuscularly with Cefoperazone sodium for two days in combination with oral dosing of Sulfamethoxazole twice a day for four days, and no new case was seen after the treatments. This investigation indicates that the rapid onset of infection and high fatality rate of *Chromobacterium violaceum* in the red panda should be noted and we conclude that trauma or injury to these animals in combination with pathogen contaminated surroundings and water supplies are the main reasons for onset of the infection.

Key words: Clinical investigation ; *Chromobacterium violaceum*; Pneumonia; Red panda (*Ailurus fulgens*)

福州大熊猫研究中心于 1994 年开始圈养小熊猫，现饲养 35 只，分三群饲养。其中一群饲养 7 只小熊猫。2008 年 7 月 21 日至 7 月 28 日，该群 3 只小熊猫出现以发热，食欲不振，呼吸困难为主要临床症状群发病情，治疗无效死亡。发病期间，对发病的原因进行调查研究，确诊为紫色色杆菌感染，因治疗及时病情得到有效控制，报告如下。

1 调查项目与结果

1.1 发病经过及临床症状

2008 年 7 月 19 日，同群小熊猫咬斗，3 d 后 6 号小熊猫发热，食欲不振，呼吸高度困难，右后肢伤口化脓，经外伤处理结合抗生素治疗无效，于 22 日死亡。7 月 26 日和 28 日，35 号小熊猫和 1 号小熊猫分别发病，表现为发热，食欲不振，呼吸高度困难，昏迷，经抢救无效，在发现症状后 12 h

内死亡。

1.2 尸体剖检及病理变化

剖检 3 只死亡小熊猫均可见气管内白色泡沫样分泌物，胸腔积液，胸水浑浊，胸膜有化脓灶并粘连，心包积液。采集肺、肝和脾做组织病理学检查，可见肺脏化脓性坏死、灶性浸润、严重淤血；肝脏弥漫性空泡变性、淤血和散在局灶性坏死；脾脏淤血。

1.3 细菌分离培养和鉴定

采集气管内白色泡沫样分泌物和肺脏组织，血琼脂平板分离培养 24 ~ 48 h，可见圆形、表面粗糙、β 溶血的白色菌落。细菌学检查为 G⁻ 短杆菌。用 Biomerieux Vitek（法国生物 - 梅里埃）和 MicroScan WalkAway - 96/40（德国德灵）细菌鉴定与药敏测试系统，均鉴定为紫色色杆菌（表 1）。

表 1 分离菌的生化鉴定结果

Table 1 Biochemistry identification of the isolate

项目 Items	DP3	OFG	GC	ACE	ESC	PLI	URE	CIT	MAL	TDA	PXB	LAC	MLT	MAN	XYL
结果 Results	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
项目 Items	RAF	SOR	SUC	INO	ADO	COU	H ₂ S	ONP	RHA	ARA	GLU	ARG	LYS	ORN	OXI
结果 Results	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+

1.4 分子生物学鉴定

按照 GenBank 数据库提供的紫色色杆菌 16S RNA 基因序列，用 Primer Express 5.0 软件设计一对引物，UP Primer: 5' GAG CAA ACA GGA TTA GAT ACC 3'; LOW Primer: 5' TTA CGG TTA CCT TGT TAC GAC 3'。目的片段为 739 bp。

将提取的 DNA 通过 PCR 扩增反应，其产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳，扩增到目的基因片段，其大小为 739 bp（图 1）。提取质粒用 Hind III 与 Bam HI

进行酶切，酶切到目的基因片段（图 2）。将分离株（FJ08A）送 TaKaRa（大连）公司测序，测序结果与 GenBank 数据库提供的 7 株紫色色杆菌进行同源性比较，结果表明，分离菌株（FJ08A）与 CV09 株、ESBV4400 株同源性最高，均为 98.8%，与 AY117554 株、EAV2 株、AJ871127 株、LMG3953 株和 JS1 株的同源性分别为 98.2%、98.0%、94.9%、93.1%、92.8%（图 3）。分离菌株经分子生物学鉴定，确认为紫色色杆菌，与生化鉴定结

果完全吻合。

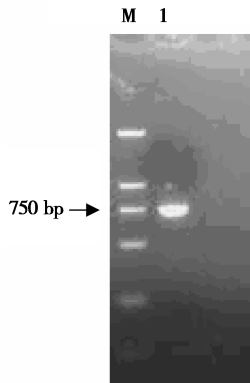


图 1 扩增到目的基因片段
Fig. 1 Amplified Gene fragment

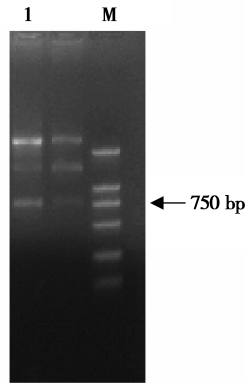


图 2 酶切到目的基因片段
Fig. 2 Target gene fragment

	1	2	3	4	5	6	7	8		
1	■	93.1	94.9	98.2	98.8	98.0	98.8	92.8	1	FJ08A
2	0.9	■	98.8	99.9	99.9	96.8	98.7	99.1	2	LMG3953
3	1.1	1.2	■	98.4	98.8	97.7	99.9	96.7	3	AJ871127
4	1.0	0.1	1.3	■	99.9	96.9	98.8	98.0	4	AY117554
5	1.2	0.1	1.2	0.1	■	96.6	98.7	98.3	5	cv09
6	1.4	2.2	1.3	2.1	2.2	■	97.8	95.2	6	EAV2
7	1.2	1.3	0.1	1.2	1.2	1.2	■	97.1	7	ESBV4400
8	1.5	0.1	1.6	0.4	0.4	2.5	1.6	■	8	JS1
	1	2	3	4	5	6	7	8		

图 3 FJ08A 株与其他株的核苷酸序列同源性比较分析
Fig. 3 Homology comparisons of FJ08A to strains of *Chromobacterium violaceum* in the GenBank database

1.5 药物敏感试验

分离菌药物最小抑菌浓度 (MIC) 试验结果见表 2。

表 2 分离菌药物最小抑菌浓度 (MIC) 试验结果

Table 2 Antimicrobial susceptibility results of the isolate

药品名	最低抑菌浓度 (g/mL)	结果	药品名称	最低抑菌浓度 (g/mL)	结果
Antibiotics	MIC	Results	Antibiotics	MIC	Results
头孢哌酮/舒巴坦	—	高敏	头孢吡肟	> 32	耐药
Cefoperazone/ Sulbactam	—	HS	Cefepime	> 32	R
加替沙星	—	高敏	头孢曲松	> 32	耐药
Gatifloxacin	—	HS	Ceftriaxone	> 32	R
环丙沙星	≤ 1	敏感	头孢他啶	> 16	耐药
Ciprofloxacin	≤ 1	S	ceftazidime	> 16	R
左旋氧氟沙星	≤ 2	敏感	头孢噻肟	> 32	耐药
Levofloxacin	≤ 2	S	cefotaxime	> 32	R
复方新诺明	≤ 2/38	敏感	哌拉西林/他唑巴坦	> 64	耐药
Sulfamethoxazole	≤ 2/38	S	Piperacillin/Tazobactam	> 64	R
妥布霉素	4	敏感	头孢西丁	—	显著耐药
Tobramycin	4	S	Cephamycin C	—	SR
阿米卡星	≤ 16	敏感	头孢唑啉	—	显著耐药
Amikacin	≤ 16	S	cefazoline	—	SR
庆大霉素	4	敏感	氨苄西林	—	显著耐药
Gentamicin	4	S	Ampicillin	—	SR
亚胺培南	8	中敏	氨苄西林/舒巴坦 R	—	显著耐药
Imipenem	8	MS	AmpicillinSodiumandSul-	—	SR
替卡西林/克拉维酸	> 64	耐药	bactamSodium	—	SR
Ticarcillin / clavulanic acid	> 64	R	阿莫西林/克拉维酸	—	显著耐药
			Amoxicillin/Clavulanate	—	SR

S: Sensitive; HS: High sensitivity; MS: Medium sensitivity; R: Resistance; SR: Strict resistance

1.6 动物回归试验

10 只体重 18 ~ 25 g 健康的普通级小白鼠 (南京军区总医院提供), 分为 2 组, 每组 5 只。第 1 组腹腔注射 1 麦氏单位紫色色杆菌菌液 0.2 mL; 第 2 组 (对照组) 腹腔注射灭菌注射用水 0.2 mL。观察 72 h。结果发现, 第 1 组小白鼠在 48 ~ 72 h 全部死亡, 第 2 组小白鼠全部存活。

死亡小白鼠剖检可见肺淤血, 局部有小化脓灶; 肝脏淤血明显。取肺和肝脏, 接种血琼脂平板

培养 24 ~ 48 h, 均长出圆形、表面粗糙、β 溶血的白色菌落。分离菌用 Biomerieux Vitek 细菌鉴定仪鉴定, 结果与细菌分离培养和鉴定完全一致。

1.7 治疗

根据药敏结果, 全群小熊猫逐只肌肉注射头孢哌酮钠, 每天 2 次, 连续注射 2 d; 逐只口服复方新诺明, 每天 2 次, 连续 4 d。过氧乙酸消毒剂对兽舍及环境全面消毒, 每天一次; 舍栏地面火焰消毒, 每天一次。清洁并消毒储水塔, 供应清洁的自

来水。通过以上处理, 未见新的病例发生, 疫情得到有效控制。

2 讨论

紫色色杆菌是一种热带和亚热带地区水与土壤中存在革兰氏阴性杆菌, 是条件致病菌。该菌最早发现于巴西亚马逊河流域的黑河, 极少引起人类和动物感染, 一旦感染, 病程发展迅速, 内脏脓肿, 死亡率极高 (邹红霞和杨庆民, 2006)。迄今已经从人类患者的结膜炎、眼眶蜂窝织炎、皮肤脓液、血液、阴道分泌物、肝脓肿液等样本中分离到紫色色杆菌 (Feldman *et al.*, 1984; 徐焕伦等, 1993; Lee *et al.*, 1999; 解晓珍等, 2001; 符玉文等, 2002; 周方红和郭思建, 2004; Baker *et al.*, 2008)。许美凤 (2002) 和金保中等 (2003) 报道了泉水和井水样本检出紫色色杆菌。水源紫色色杆菌的污染引起人们的关注。动物紫色色杆菌感染鲜见报道, Dyer 等 (2000) 报道了一例成年雄性小熊猫感染紫色色杆菌死亡病例, Ajithdoss 等 (2009) 报道了一例新生牛犊紫色色杆菌感染引起的败血症。

人类主要是通过破损的皮肤或伤口接触到被紫色色杆菌污染的水或土壤而发生感染。紫色色杆菌感染的人起病急, 病情发展快, 无特征性临床症状, 在 48 h 内如果没有进行有效的抗生素治疗, 有可能迅速发展为败血症, 引起肝、脾、肾等多器官脓肿和组织炎症, 导致死亡 (邹红霞和杨庆民, 2006)。本文报道的小熊猫感染紫色色杆菌的病例与人的感染途径和急性发病过程基本相同。剖检病理变化与 Dyer 等 (2000) 报道的基本一致。

朱建国 (1993) 描述了紫色色杆菌的菌落, 呈中等大小、圆形、湿润、鲜艳紫罗兰色, 但有粗糙及无色变种。孙百华和谢三星 (1996) 及 Sivendrai 和 Tan (1997) 也报道了在自然界中存在无色变异株, 其毒力和特性都与产生色素菌株相似。本研究通过病死小熊猫病变组织的细菌分离培养和鉴定, 确定为紫色色杆菌后, 按照 GenBank 数据库提供的紫色色杆菌 16S RNA 基因序列, 设计一对引物, 扩增到目的基因片段, 测序结果与 GenBank 数据库提供的 7 株紫色色杆菌进行同源性比对, 进一步确诊了小熊猫的群发病例为紫色色杆菌的感染。由于分离到的紫色色杆菌的菌落为白色, 确定为紫色色杆菌的无色变种。由于紫色色杆菌有很强的环境适应性和很高的致病性, 许多研究

者开展了该菌的基因组学、分子生物学和酶学等领域的研究 (Chemin *et al.*, 1998; Kolibachuk *et al.*, 1999; Haselkorn, 2003; Segal *et al.*, 2003; Cheng *et al.*, 2007)。

药物敏感试验结果为小熊猫感染紫色色杆菌提供了积极有效的治疗措施。经过治疗和精心护理及严格的环境消毒和饮水卫生, 疾病得到有效控制。黄志刚等 (2006) 报道了紫色色杆菌耐药谱分析与本研究的结果不完全一致。说明了在不同环境中紫色色杆菌对抗生素的耐药性不同。临床上及时分离细菌和药物敏感试验, 快速确定治疗方案, 对挽救患病动物和控制疾病极其重要。

腹腔注射分离菌的菌液导致小白鼠全部死亡, 表明了分离的紫色色杆菌致病性强, 应引起重视。由于紫色色杆菌病是人畜 (兽) 共患病, 临床兽医和相关工作人员应做好个人防护。

致谢: 本文的英文部分由 Jarrat L. Jordan 博士和施福顺博士修改, 福建医科大学附属协和医院黄心宏主任在细菌分离培养和鉴定方面给予帮助, 特此致谢。

参考文献:

- Ajithdoss D K, Porter B F, Calise D V, Libal M C, Edwrds J F. 2009. Septicemia in a neonatal calf associated with *Chromobacterium violaceum*. *Pathol*, **46**: 71 - 74.
- Baker S, Campbell J I, Stabler R, Nguyen H V M, To D S, Nguyen D V, Farrar J. 2008. Fatal wound infection caused by *Chromobacterium violaceum* in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Journal of Clinical Microbiology*, **46** (11): 3853 - 3855.
- Cheng Y Q, Yang M, Matter A M. 2007. Characterization of a gene cluster responsible for the biosynthesis of anticancer Agent FK228 in *Chromobacterium violaceum* No. 968. *Applied and Environmental Microbiology*, **73** (11): 3460 - 3469.
- Chemin L S, Winson M K, Thompson J M, Haran S. 1998. Chitinolytic activity in *Chromobacterium violaceum*: substrate analysis and regulation by quorum sensing. *Journal of Bacteriology*, **180** (17): 4435 - 4441.
- Dyer N W, Krogh D F, DeVold R, Wilson S L, White D G. 2000. Chromobacteriosis in a Chinese red panda (*Ailurus fulgens styani*). *J Vet Diagn Invest*, **12**: 177 - 179.
- Feldman R B, Stern G A, Hood C I. 1984. *Chromobacterium violaceum* infection of the eye a report of two cases. *Arch Ophthalmol*, **102**: 711 - 713.
- Fu Y W, Wang L X, Xu D X, Luo C Y, Jiang Z Y. 2002. *Chromobacterium violaceum* isolation from a case of skin purulence and blood. *The Journal of Evidence-based Medicine*, **2**: 87. (in Chinese)
- Haselkorn R. 2003. Brazilian National Genome Project Consortium; The

- complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100** (20): 11660 - 11665.
- Huang Z G, He M Y, Huang S. 2006. The clinical character and drug resistance analysis of infection with *Chromobacterium violaceum*. *Chinese Journal of Microecology*, **18** (6): 486 - 487. (in Chinese)
- Jin B Z, Wu J Q, Zhou Z G. 2003. Isolation of *Chromobacterium violaceum* from wellspring. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, **13** (6): 174. (in Chinese)
- Kaufman S C, Ceraso D, Schugurensky A. 1986. First case report from Argentina of fatal septicemia caused by *Chromobacterium violaceum*. *Journal of Clinical Microbiology*, **23** (5): 956 - 958.
- Kolibachuk D, Miller A, Dennis D. 1999. Cloning, molecular analysis, and expression of the polyhydroxyalkanoic acid synthase (phaC) gene from *Chromobacterium violaceum*. *Applied and Environmental Microbiology*, **65** (8): 3561 - 3565.
- Lee J, Kim J S, Nahm C H, Choi J W, Kim J, Pai S H. 1999. Two Cases of *Chromobacterium violaceum* infection after injury in a subtropical region. *Journal of Clinical Microbiology*, **37** (6): 2068 - 2070.
- Sivendrai R, Tan S H. 1997. Pathogenicity of Nonpigmented Cultures of *Chromobacterium violaceum*. *Journal of Clinical Microbiology*, **5** (5): 514 - 516.
- Sun B H, Xie S X. 1996. *Chromobacterium violaceum* infection in human being. *Chinese Journal of Zoonoses*, **12** (1): 36 - 37. (in Chinese)
- Segal B H, Ding L, Holland S M. 2003. Phagocyte NADPH Oxidase, but not inducible Nitric Oxide Synthase, is essential for early control of Burkholderia cepacia and *Chromobacterium violaceum* infection in mice. *Infection and Immunity*, **71** (1): 205 - 210.
- Xie X Z, Lin Y L, Zhang Z K. 2001. Isolation of *Chromobacterium violaceum* from the incision and vaginal secretion in a case of cesarean section. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, **23** (2): 175. (in Chinese)
- Xu H L, Gu J H, Yang S T. 1993. Isolation of *Chromobacterium violaceum* from the incision and vaginal secretion in a case of cesarean section. *Journal of Clinical Laboratory Science*, **11** (3): 149. (in Chinese)
- Xu M F. 2002. Isolation of *Chromobacterium violaceum* from 3 cases of purulent infection. *Strail Journal of Preventive Medicine*, **8** (5): 54 - 55. (in Chinese)
- Zhou F H, Guo S J. 2004. Isolation of *Chromobacterium violaceum* from a case of heart blood sample. *China Journal of Modern Medicine*, **14** (18): 160. (in Chinese)
- Zhu J G. 1993. Handbook of Clinical Bacteria Identification. Beijing: Beijing Medical University & Chinese Concord Medical University United Press, 191 - 195. (in Chinese)
- Zou H X, Yang Q X. 2006. Advance of research in *Chromobacterium violaceum*. *Occupation and Health*, **22** (22): 1928 - 1929. (in Chinese)
- 孙百华, 谢三星. 1996. 人类的紫色色杆菌感染. 中国人兽共患病杂志, **12** (1): 36 - 37.
- 朱建国. 1993. 临床常见细菌鉴定手册. 北京: 北京医科大学, 中国协和医科大学联合出版, 191 - 195.
- 许美凤. 2002. 首次自德化检出紫色色杆菌的鉴定报告. 海峡预防医学杂志, **8** (5): 54 - 55.
- 周方红, 郭思建. 2004. 从心血标本中培养出一株紫色色杆菌. 中国现代医学杂志, **14** (18): 160.
- 金保中, 吴景清, 周正明. 2003. 从水源水中分离出一株紫色色杆菌. 中国卫生检验杂志, **13** (6): 174.
- 邹红霞, 杨庆民. 2006. 紫色色杆菌的研究现状. 职业与健康, **22** (22): 1928 - 1929.
- 符玉文, 王露霞, 徐德兴, 罗春梅, 姜志勇. 2002. 从皮肤脓液及血液中分离出紫色色杆菌. 循证医学, **2**: 87.
- 徐焕伦, 顾金华, 杨世廷. 1993. 从三例脓毒败血症患者血液分离出紫色色杆菌. 临床检验杂志, **11** (3): 149.
- 黄志刚, 何美月, 黄琛. 2006. 紫色色杆菌感染临床特症及耐药谱分析. 中国微生态学杂志, **18** (06): 486 - 487.
- 解晓珍, 林亚丽, 张中奎. 2001. 剖腹产患者切口及阴道分泌物中分离出紫色色杆菌 1 例报告. 第三军医大学学报, **23** (2): 175.