

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.11.01

鸡源肺炎克雷伯菌的分离鉴定和耐药性分析

王雅丽¹, 张宝锁³, 张雯², 崔生玲², 卿素珠¹, 杨奇^{2*}, 张为民^{1*}

(1. 西北农林科技大学动物医学院, 陕西杨凌 712100, 2. 宁夏回族自治区兽药饲料监察所, 宁夏银川 7500011,

3. 宁夏顺宝现代农业股份有限公司, 宁夏吴忠 751600)

[收稿日期] 2022-07-02 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 11-0001-09 [中图分类号] S851.66

[摘要] 为探究鸡源肺炎克雷伯菌的流行性和耐药情况, 本试验采集蛋鸡新鲜粪便 60 份(雏鸡 36 只/产蛋鸡 24 只), 通过分离培养、VITEK2 Compact 生化鉴定、特异性基因 PCR 扩增和微量肉汤稀释法对分离菌株进行了菌种鉴定、耐药表型、耐药基因以及毒力基因检测。结果显示, 从粪便样本中共分离出 48 株肺炎克雷伯菌; 分离菌株对氨苄西林、大观霉素、四环素、氟苯尼考、磺胺异噁唑和复方新诺明表现出高度耐药, 耐药率范围为 50.00% ~ 100.00%, 对奥格门丁、庆大霉素、头孢类和喹诺酮类药物耐药程度较低, 耐药率范围为 14.58% ~ 27.08%, 对黏菌素和美罗培南敏感; 75.02% 的菌株表现为多重耐药, 最高表现为 8 重耐药, 占 10.42%。耐药基因和毒力基因检测结果显示, 48 株肺炎克雷伯菌共检出 *aadA1*, *tetA*, *oqxA*, *oqxB*, *bla_{TEM}* 和 *qnrB* 等 6 种耐药基因, 以及 *entB*, *wabG*, *uge* 和 *kfuBC* 等 4 种毒力基因, 本试验结果可为临床用药、动物源细菌耐药性监测和健康养殖提供数据支持。

[关键词] 肺炎克雷伯菌; 耐药表型; 耐药基因

Isolation, Identification and Drug Resistance Analysis of *Klebsiella pneumoniae* from Chickens

WANG Ya-li¹, ZHANG Bao-suo³, ZHANG Wen², CUI Sheng-ling², QING Su-zhu¹, YANG Qi², ZHANG Wei-min¹

(1. College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; 2. Ningxia Supervision Institute for Veterinary Drugs and Animal Feedstuffs, Yinchuan, Ningxia 7500011; China, 3. Ningxia Shunbao Modern Agricultural Limited Company, Wuzhong 751600, China)

Corresponding author: YANG Qi, E-mail: yangqzm@163.com; ZHANG Wei-min, E-mail: ylzhangwm@163.com

Abstract: To investigate the prevalence and drug resistance of *Klebsiella pneumoniae* in chickens, 60 fresh feces of laying hens (36 chicks / 24 laying hens) were collected for experimental study. The identification, drug resistance phenotype, resistance genes and virulence genes of *K. pneumoniae* were detected by PCR, VITEK2 Compact biochemical test and standard broth microdilution method. Results showed that a total of 48 *K. pneumoniae* strains were isolated from feces. *K. pneumoniae* isolates had high resistance to ampicillin, spectinomycin, tetracycline,

基金项目: 宁夏回族自治区重点研发计划重点项目: 畜禽养殖场兽用抗菌药使用减量化关键技术应用研究 (2021BEF02041); 农业重大实用技术推广项目: 规模养殖场减抗养殖关键技术开发与示范

作者简介: 王雅丽, 从事疫病的中草药防治及其机理研究。张宝锁, 兽医师, 从事蛋鸡养殖及其疫病防治工作, 与王雅丽为共同第一作者。

通讯作者: 杨奇, E-mail: yangqzm@163.com; 张为民, E-mail: ylzhangwm@163.com

florfenicol, sulfisoxazole and trimethoprim – sulfamethoxazole, with resistance rates ranging from 50.00% ~ 100.00%; Isolates showed low resistance to amoxicillin/clavulanic acid, gentamicin, cephalosporins and quinolones, with resistance rates ranging from 14.58% to 27.08%. All isolates were sensitive to colistin and meropenem. Multi – drug resistant strains accounted for 75.02% of the isolates, and 10.42% strains were resistant to eight kinds of antibacterial drugs. The results of drug resistance genes and virulence genes detection showed that a total of 6 drug resistance genes and 4 virulence genes were detected from 48 *K. pneumoniae* strains, including *aadA1*, *tetA*, *oqxA*, *oqxB*, *bla_{TEM}* and *qnrB* genes, *uge*, *wabG*, *kfuBC* and *entB*. This study can provide data support for clinical drug use, animal health breeding and clinical animal drug resistance monitoring.

Key words: *K. pneumoniae*; Drug resistance phenotype; Resistance genes

肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 是一种常见的革兰氏阴性条件致病杆菌,为肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*) 克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*) 成员,多存在于动物黏膜表面或自然环境 (如水、土壤等) 中^[1],能够引起动物肺炎、肠炎、脑膜炎和败血症等严重疾病,也是一种重要的人兽共患病原菌。肺炎克雷伯菌具有多种质粒和可移动遗传元件,基于此特点该菌可以携带多种抗性基因或从环境中获得并积累抗性基因,或将耐药基因传递给敏感菌株,从而可能导致多重耐药或者超级耐药细菌的出现^[2-3]。肺炎克雷伯菌是引起医院临床感染的主要细菌之一^[4],2020 年中国细菌耐药监测报告显示,肺炎克雷伯菌分离率在医源革兰氏阴性菌位居第二位,仅次于大肠埃希菌,且耐药率也呈现明显上升趋势^[5]。

近年来,由于肺炎克雷伯菌对蛋鸡的危害增大和耐药性严重,常引起禽类肺炎、眼炎、肝脓肿、肠炎、败血症和生殖系统疾病等。基于此,本试验从蛋鸡粪便中分离鉴定肺炎克雷伯菌,并对分离菌株的耐药表型、耐药基因和毒力基因进行检测,以了解肺炎克雷伯菌的耐药现状和毒力基因流行情况,为动物临床用药提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样本采集 选择宁夏回族自治区某规模化蛋鸡场为采样点,在鸡舍内随即选取临床健康雏鸡 ($n = 36$) 和产蛋鸡 ($n = 24$),用无菌棉签蘸取其排泄的新鲜粪便 (扒开粪便表皮,蘸取内部粪便),置于无菌采样袋,共 60 份。

1.1.2 标准菌株 大肠埃希菌 (ATCC25922) 和肺炎克雷伯菌 (ATCC13883) 由宁夏回族自治区兽药饲料监察所提供。

1.1.3 主要试剂和仪器 麦康凯肌醇阿东醇羧苄青霉素琼脂 (MIAC) 购自青岛海博生物技术有限公司;VITEK 2 革兰氏阴性细菌鉴定卡购自生物梅里埃有限公司;革兰氏阴性细菌药敏板 (动物源) 购自上海星佰生物技术公司;全自动微生物鉴定仪 (VITEK2) 购自梅里埃诊断产品有限公司;PCR 仪购自德国耶拿分析仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细菌分离培养 将粪便稀释于蛋白胨缓冲液中增菌培养 30 min,滤液添加至麦康凯肉汤孵育 18 ~ 24 h。将菌液划线接种于 MIAC 培养基,37 °C 培养 18 ~ 24 h。挑取培养基上单个、圆形、呈粉红色至紫红色且带沉淀环的菌落,再次划线接种使其纯化,直至平板上菌落形态一致且符合肺炎克雷伯菌菌落特征。每次传代培养均设置肺炎克雷伯菌标准菌株 ATCC13883 为阳性对照,未接种培养基为阴性对照,并同条件培养。

1.2.2 PCR 鉴定 采用煮沸法提取待测菌株模板 DNA。参考文献^[6]合成肺炎克雷伯菌的特异性基因溶血酶素 *khe* 基因,上游引物 5' – TGATTGCATTCGCCACTGG – 3',下游引物 5' – GGTC AACCCAACGATCCTG – 3',目的基因片段大小为 428 bp。PCR 扩增体系 (20 μL): 2 × DreamTaq Green Mix 8 μL,上下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL, DNA 模板 2 μL 和 ddH₂O 8 μL。扩增程序:95 °C 预

变性 3 min;95 °C 变性 30 s,57 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,30 个循环;最后 72 °C 延伸 5 min,4 °C 保存。扩增产物用 1.25% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

1.2.3 VITEK2 Compact 全自动微生物系统鉴定 用无菌棉拭子挑取适量形态相似的菌落混悬于 0.45% 的无菌生理盐水中,使其终浓度为 0.5 ~ 0.63 麦氏浊度。将菌液管和革兰氏阴性鉴定卡放入卡架中,装入梅里埃 VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定系统中自动鉴定。

1.2.4 药敏试验 参照美国临床实验室标准化委员会 CLSI 相关标准进行操作和结果判定。采用革兰氏阴性细菌药敏板对分离株进行 14 种常用抗菌药物的敏感性检测,包括氨苄西林(AMP)、奥格门丁(A/C)、庆大霉素(GEM)、大观霉素(SPT)、四环素(TET)、氟苯尼考

(FFC)、磺胺异噁唑(SF)、复方新诺明(甲氧苄啶/磺胺甲恶唑,SXT)、头孢噻吩(CEF)、头孢他啶(CAZ)、恩诺沙星(ENR)、氧氟沙星(OFL)、美罗培南(MEM)和黏菌素(CL)。大肠埃希菌 ATCC25922 为质控菌株。

1.2.5 耐药基因和毒力基因检测 依据参考文献^[7-16]设计耐药基因和毒力基因引物,由西安擎科新业生物技术有限公司合成。具体引物信息见表 1 和表 2,包括 β-内酰胺类耐药基因 *bla_{NDM}*、*bla_{KPC}*、*bla_{CTX}* 和 *bla_{TEM}*、氨基糖苷类 *aac(6)-Ib-cr*、*aadA1* 和 *rmtB*、四环素类 *tetA* 和 *tetB*、喹诺酮类 *qnrA*、*oqxA*、*oqxB*、*qnrB* 和 *gyrA* 以及粘菌素类 *mcr-1*,共 15 种耐药基因。毒力基因包括荚膜多糖基因 *rmpA*、脂多糖合成相关基因 *wabG* 和 *uge*、铁捕获能力 *kfuBC* 和 *Aerobactin* 以及铁载体 *entB* 和 *icuA*。除退火温度外,反应体系与反应程序同 1.2.2。

表 1 肺炎克雷伯菌耐药基因序列

Tab 1 Primer information for resistance genes of *K. pneumoniae*

基因 Genes	上下游引物序列 Forward and Reverse Primer sequences	退火温度 Annealing Temperature/°C	产物长度 Product/bp
<i>bla_{NDM}</i>	F: 5' - GCTTTGGCGATCTGCTTTTC - 3' R: 5' - CGGAATGGCTCATCAGGATC - 3'	55	621
<i>bla_{KPC}</i>	F: 5' - CGTCTAGTCTGCTCTCTTG - 3' R: 5' - CTGTCTATCCTTGTTAGGCG - 3'	55	798
<i>bla_{CTX}</i>	F: 5' - TTAGGAARTGTGCCGCTGTA - 3' R: 5' - CGATATCGTTGGTGGTRCCAT - 3'	55	688
<i>bla_{TEM}</i>	F: 5' - ATGCGTTATATTCGCCTGTG - 3' R: 5' - GTTAGCGTTGCCAGTGCTCG - 3'	55	861
<i>aac(6') - Ib - cr</i>	F: 5' - ATGACTGAGCATGACCTTGC - 3' R: 5' - TTAGGCATCACTGCGTGTTC - 3'	55	519
<i>aadA1</i>	F: 5' - GCAGCGCAATGACATTCCTG - 3' R: 5' - ATCCTCGGCGGATTTTG - 3'	55	282
<i>rmtB</i>	F: 5' - TGCGGCGCATCCTGACTGAGGA - 3' R: 5' - GGGAAAGCTGACAGCCATGCGC - 3'	59	542
<i>qnrA</i>	F: 5' - AAGGAAGCCGTATGGATATT - 3' R: 5' - TAAAGCTCCGGCAGCACTAT - 3'	51	670
<i>oqxA</i>	F: 5' - GACAGCGTCGCACAGAATG - 3' R: 5' - GGAGACGAGGTTGGTATGGA - 3'	57	339
<i>oqxB</i>	F: 5' - CGAAGAAAAGACCTCCCTACCC - 3' R: 5' - CGCCGCCAATGAGATACA - 3'	57	240
<i>qnrB</i>	F: 5' - CGACCTGAGCGGCACTGAAT - 3' R: 5' - TGAGCAACGATGCCTGCTAG - 3'	57	515
<i>gyrA</i>	F: 5' - CGCGTACTATACGCCATGAACGTA - 3' R: 5' - ACCGTTGATCACTTCGGTCAGG - 3'	59	441
<i>tetA</i>	F: 5' - GCTACATCTGCTTGCCTTC - 3' R: 5' - CATAGATCGCCGTAAGAGG - 3'	57	210
<i>tetB</i>	F: 5' - TTGGTTAGGGCAAGTTTTG - 3' R: 5' - GTAATGGCCAATAACACCG - 3'	52	659
<i>mcr-1</i>	F: 5' - AGTCCGTTTGTCTTGTGGC - 3' R: 5' - AGATCCTTGGTCTCGGCTTG - 3'	51	320

表 2 肺炎克雷伯菌毒力基因引物序列

Tab 2 Primer information for virulence genes of *K. pneumoniae*

基因 Genes	上下游引物序列 Forward and Reverse Primer sequences	退火温度 Annealing Temperature/°C	产物长度 Product/bp
<i>Aerobactin</i>	F: 5' - GCATAGGCGGATACGAACAT - 3' R: 5' - CACAGGGCAATTGCTTACCT - 3'	55	556
<i>kfuBC</i>	F: 5' - GAAGTGACGCTGTTTCTGGC - 3' R: 5' - TTTCGTGTGGCCAGTACTC - 3'	57	797
<i>rmpA</i>	F: 5' - ACTGGGCTACCTCTGCTTCA - 3' R: 5' - CTTGCATGAGCCATCTTTCA - 3'	53	535
<i>uge</i>	F: 5' - GATCATCCGGTCTCCCTGTA - 3' R: 5' - TCTTCACGCCTTCTTCACT - 3'	55	535
<i>wabG</i>	F: 5' - CGGACTGGCAGATCCATATC - 3' R: 5' - ACCATCGGCCATTTGATAGA - 3'	57	683
<i>entB</i>	F: 5' - ATTTCTCAACTTCTGGGGC - 3' R: 5' - AGCATCGGTGGCGGTGGTCA - 3'	59	371
<i>iucA</i>	F: 5' - AATCAATGGCTATTTCCCGCTG - 3' R: 5' - CGCTTCACTTCTTTCAGTACAGG - 3'	59	239

2 结果

2.1 肺炎克雷伯菌株的菌落特征 肺炎克雷伯菌在 MIAC 培养基上形成边缘光滑湿润、中间凸起的紫红色菌落,菌落周围有沉淀环(图 1)。



图 1 肺炎克雷伯菌在 MIAC 培养基上的菌落形态
Fig 1 Colony morphology and microscopic images of *K. pneumoniae* on MIAC agar

2.2 分离株 PCR 鉴定 肺炎克雷伯菌特异性基因 *khe* 的扩增产物大小为 428 bp。以标准菌株 ATCC13883 为阳性对照,对分离株进行基因扩增、核酸凝胶电泳鉴定,60 份样本中有 48 株菌株出现预期目的条带,与标准菌株结果一致(图 2)。

2.3 生化仪鉴定 VITEK2 Compact 鉴定是在细菌

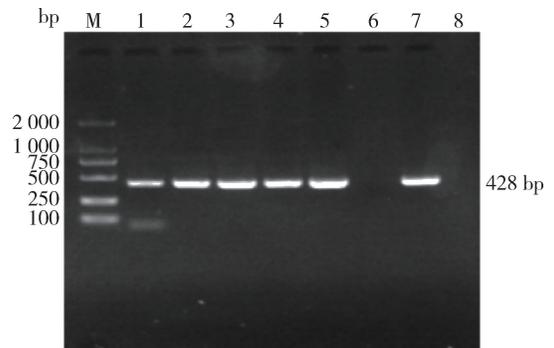


图 2 部分菌株 *khe* 基因扩增电泳鉴定结果
Fig 2 Identification of partial isolates by *khe* amplification and nucleic electrophoresis
M. DL 2000 DNA Marker; 1. ATCC13883;
2-7. 部分分离菌株; 8. 阴性对照
M. DL 2000 DNA Marker; 1. ATCC13883;
2-7. Partial isolates; 8. Negative control

生化反应的基础上,比对分析待检细菌的生化反应谱与对数期菌株的生物学特征来鉴定菌种。结果显示,48 株 PCR 阳性的分离株均为肺炎克雷伯菌,可信度均在 90.00% 以上,分离率为 80.00% (48/60),其中雏鸡粪便中肺炎克雷伯菌的分离率(36/

36) 高于产蛋鸡(12/24)。

2.4 药敏检测结果

2.4.1 分离菌株对 14 种抗菌药物敏感性检测结果 药敏检测结果显示:质控菌株药敏结果在规定范围内,分离菌株对氨苄西林、大观霉素、四环素、氟苯尼考、磺胺异噁唑和复方新诺明的

耐药率分别为 100.00%、79.17%、81.25%、50.00%、72.91% 和 72.91%,呈现出高度抗药性。对奥格门丁、庆大霉素、头孢类和喹诺酮类药物耐药程度较低,耐药率为 14.58% ~ 27.08%,未检测出对美罗培南和黏菌素耐药的菌株(表 2)。

表 3 肺炎克雷伯菌分离株对 14 种抗菌药物药敏检测结果

Tab 3 Sensitivity results of *K. pneumoniae* isolates to 14 antibacterial drugs

药物种类 Antibacterial categories	抗菌药物 Antibacterial drugs	菌株数 n = 48			耐药率 Resistance rate
		S	I	R	
青霉素类	氨苄西林(AMP)	0	0	48	100.0%
β-内酰胺复合药物	奥格门丁(A/C)	30	5	13	27.08%
	庆大霉素(GEM)	31	9	8	16.67%
氨基糖苷类	大观霉素(SPT)	10	0	38	79.17%
	四环素类	四环素(TET)	8	1	39
酰胺醇类	氟苯尼考(FFC)	19	5	24	50.00%
磺胺类	磺胺异噁唑(SF)	13	0	35	72.91%
	复方新诺明(SXT)	13	0	35	72.91%
头孢类	头孢噻唑(CEF)	34	4	10	20.83%
	头孢他啶(CAZ)	40	1	7	14.58%
喹诺酮类	恩诺沙星(ENR)	29	7	12	25.00%
	氧氟沙星(OFL)	38	0	10	20.83%
碳青霉烯类	美罗培南(MEM)	48	0	0	0.00%
多肽类	粘杆菌素(CL)	48	0	0	0.00%

2.4.2 雏鸡和产蛋鸡肺炎克雷伯菌分离株耐药率统计 对雏鸡和产蛋鸡粪便分离到的肺炎克雷伯菌的药敏结果进行分析比较(图 3)。结果显示各生长阶段分离菌株对氨苄西林均耐药,对美罗培南和黏菌素均敏感,此外雏鸡源分离菌株对大观霉素、四环素、磺胺异噁唑和复方新诺明耐药率均高于 90.00%,且对其他 11 种抗菌药的耐药率均高于产蛋鸡。

2.4.3 分离菌株多重耐药分析 对分离株的耐药谱进行统计分析。结果显示,12.50% 菌株表现双重耐药,75.02% 分离株表现为多重耐药(≥3 类抗菌药),其中 5 重耐药的菌株占比最高,为 22.92%,最高为 8 重耐药,占 10.42%(图 4)。

2.5 耐药基因和毒力基因检测 48 株肺炎克雷伯

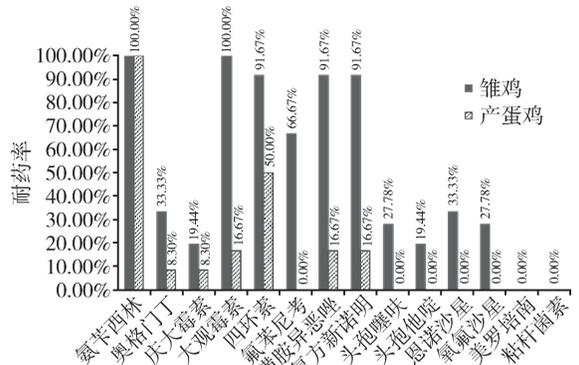


图 3 不同生长阶段肺炎克雷伯菌分离株耐药率统计
Fig 3 Resistance rate of *K. pneumoniae* isolates at different growth stages

菌的耐药基因和毒力基因检测结果见表 4 可知,共检出 6 种耐药基因,分别是 *bla_{TEM}*、*aadA1*、*tetA*、*qnrB*、*oqxA* 和 *oqxB*, 以及 *uge*、*wabG*、*kfuBC* 和 *entB4*

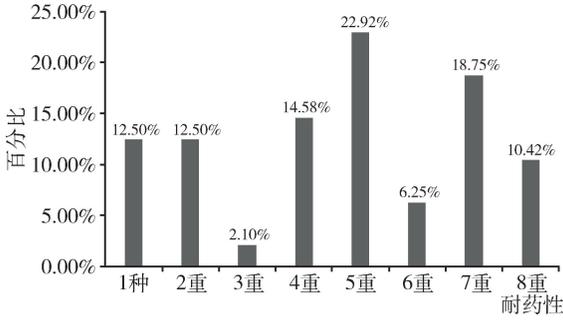


图 4 肺炎克雷伯菌分离株多重耐药率统计

Fig 4 Multiple drug resistance information in *K. pneumoniae* isolates

种毒力基因,其他耐药基因和毒力基因未检出。

2.6 耐药基因与耐药表型比较分析 对 48 株肺炎克雷伯菌的耐药表型和耐药基因进行比较分析,结果见表 5。氨基糖苷类和四环素类耐药表型阳性率与 *aadA1* 和 *tetA* 基因的检出情况基本符合,其耐药表型高于基因型。在全部耐 β -内酰胺类药物的分离菌株和 1 株中介程度的菌株中均检测出了 *bla_{TEM}* 基因。喹诺酮类药物方面,中介菌株 *qnrB* 基因阳性率高于耐药菌株,*oqxA* 和 *oqxB* 基因在其耐药、中介和敏感菌株中均有检出。

表 4 肺炎克雷伯菌分离株耐药基因和毒力基因检出情况 (%)

Tab 4 Detection of resistance genes and virulence genes in *K. pneumoniae* isolates

分离菌株 Isolates	耐药基因 Resistance genes	毒力基因 Virulence genes
K1, K37, K38, K42, K48	<i>oqxA/ oqxB</i>	<i>uge/ entB/ wabG</i>
K2, K6, K7, K8, K13	<i>bla_{TEM}/ aadA1/ oqxA/ oqxB/ tetA</i>	<i>kfuBC/ uge/ entB/ wabG</i>
K3, K14	<i>bla_{TEM}/ aadA2/ qnrB/ oqxA/ oqxB/ tetA</i>	<i>kfuBC/ uge/ entB/ wabG</i>
K4, K28, K31, K33, K35	<i>aadA1/ oqxA/ oqxB/ tetA</i>	<i>entB/ wabG</i>
K5, K21, K22, K25, K26, K27	<i>bla_{TEM}/ aadA1/ oqxA/ oqxB/ tetA</i>	<i>uge/ entB/ wabG</i>
K9	<i>aadA1/ oqxA/ oqxB/ kfuBC</i>	<i>uge/ entB/ wabG</i>
K10, K15, K17	<i>bla_{TEM}/ aadA1/ qnrB/ oqxA/ oqxB</i>	<i>uge/ entB/ wabG</i>
K11	<i>aadA1/ qnrB/ oqxA/ oqxB/ tetA</i>	<i>uge/ entB/ wabG</i>
K12	<i>aadA1/ oqxA/ oqxB</i>	<i>uge/ entB/ wabG</i>
K16	<i>aadA1/ oqxB/ tetA</i>	<i>uge/ entB/ wabG</i>
K18	<i>bla_{TEM}/ aadA1/ oqxA/ oqxB/ tetA</i>	<i>uge/ entB</i>
K19	<i>oqxA</i>	<i>entB</i>
K20	<i>bla_{TEM}/ aadA1/ qnrB/ oqxA/ oqxB</i>	<i>uge/ entB</i>
K23, K24, K32, K34, K36	<i>aadA1/ oqxA/ oqxB/ tetA</i>	<i>uge/ entB/ wabG</i>
K29, K30	<i>aadA1/ tetA</i>	<i>entB</i>
K39, K40	<i>oqxA/ oqxB/ tetA</i>	<i>uge/ entB/ wabG</i>
K41	<i>oqxB</i>	<i>uge/ entB/ wabG</i>
K43	<i>oqxA/ oqxB</i>	<i>kfuBC/ uge/ entB/ wabG</i>
K44	<i>oqxB</i>	<i>uge/ entB/ wabG</i>
K45	<i>oqxA/ oqxB</i>	<i>entB</i>
K46, K47	<i>oqxA/ oqxB</i>	<i>uge/ entB</i>

注:K1 ~ K36 为雏鸡源肺炎克雷伯菌分离菌株,K37 ~ K48 为产蛋鸡源肺炎克雷伯菌分离菌株。

表 5 肺炎克雷伯菌耐药表型与基因型的比对情况

Tab 5 The coincidence of resistant phenotype and genotype of *K. pneumoniae*

药物类别	耐药菌/株		中介菌/株		敏感菌/株	
	耐药	携带耐药基因	中介	携带耐药基因	敏感	携带耐药基因
β-内酰胺类 CEF/ A/C A/C + CAZ/ CEF A/C + CEF + CAZ	17	<i>bla_{TEM}</i> (17)	5	<i>bla_{TEM}</i> (1)	26	0
氨基糖苷类 SPT、GEM + SPT	38	<i>aadA1</i> (34)	10	0	0	0
四环素类 TET	39	<i>tetA</i> (31)	1	0	8	0
喹诺酮类 ENR、ENR + OFL	12	<i>qnrB</i> (1) <i>oqxA</i> (12) <i>oqxB</i> (12)	7	<i>qnrB</i> (6) <i>oqxA</i> (7) <i>oqxB</i> (7)	29	<i>qnrB</i> (0) <i>oqxA</i> (23) <i>oqxB</i> (26)

3 讨论与结论

近年来,从雏鸡、奶牛、貂和犬等多种患病动物均分离出高致病性、多重耐药肺炎克雷伯菌^[17-20]。本研究从 60 份健康蛋鸡的粪便中分离到 48 株肺炎克雷伯菌,分离率为 80.00%。药敏试验结果显示,分离菌株对氨苄西林、大观霉素、四环素、氟苯尼考、磺胺异噁唑和复方新诺明均表现出高度耐药性,其中对氨苄西林属于固有耐药^[21],对奥格门丁、庆大霉素、头孢类和喹诺酮类药物耐药程度较低,而对黏菌素和美罗培南敏感。多重耐药情况较为严重,75.02% 的分离菌株表现出多重耐药性,其中以 5 重(22.92%)和 7 重耐药菌(18.75%)为主,最高表现为 8 重耐药菌(10.42%)。有研究表明,河南省鸡源肺炎克雷伯菌(来自鸡场环境、病死鸡和市售鸡肉)对环丙沙星(71.70%)和四环素(66.04%)表现出高度耐药,49.06% 的分离菌株表现为多重耐药^[19],低于本研究分离菌株的耐药水平;河北省乳房炎奶牛源分离到的肺炎克雷伯菌对庆大霉素和头孢喹肟表现中度耐药,耐药率为 48.90% 和 55.60%,高于本试验结果^[18],可见不同地区畜禽肺炎克雷伯菌耐药性有差异,可能是临床常用药物存在差异导致。

本研究中雏鸡源分离菌株对大观霉素、四环素、磺胺异噁唑和复方新诺明耐药率均高于 90%,且对除氨苄西林、美罗培南和黏菌素外的 11 种抗菌药物耐药率均高于产蛋鸡。需要注意的是,1 株

雏鸡源肺炎克雷伯菌对 12 种抗菌药物表现出耐药性,以及 2 株产蛋鸡源肺炎克雷伯菌表现出多重耐药性。对该蛋鸡养殖场抗菌药使用记录调查发现,采集样本的鸡舍并未存在不规范或大量使用抗菌药情况,且鸡入舍以来仅使用过头孢类药物,因此可能是养殖场内部环境消毒不彻底,存在细菌耐药性的积累或蛋雏鸡亲代种群垂直传播而导致的高度耐药性。

肺炎克雷伯菌具有多种质粒和可移动的遗传元件,是耐药基因的主要传播载体^[3]。从 48 株肺炎克雷伯菌分离菌株中检出 6 种耐药基因,其中 *oqxA* 和 *oqxB* 检出率最高,几乎在所有分离菌中检出,与陈强^[22]研究一致。研究显示,*oqxA* 和 *oqxB* 参与编码肺炎克雷伯菌外排泵,除介导喹诺酮类耐药外,还能够降低菌株对替加环素和呋喃妥因的敏感性^[23]。*bla_{TEM}* 基因的阳性率与 β-内酰胺类耐药表型相符率较高,而 *aadA1*、*tetA* 和 *qnrB* 在耐氨基糖苷类、四环素类和喹诺酮类的菌株检出率较低,存在其他耐药基因未检出的可能性。

本研究对分离的鸡源肺炎克雷伯菌荚膜、脂多糖和铁源摄取系统共 7 种毒力基因进行了检测,其中 *entB*、*wabG*、*uge* 检出率较高,*kfuBC* 检出率较低,而 *rmpA*、*Aerobactin* 和 *icuA* 基因未检出。肠杆菌素生物合成铁载体(*entB*)是一种由菌体细胞分泌的、能够高度亲和 Fe³⁺ 的特异性铁螯合剂,以帮助细菌摄取铁源,在菌株毒力中起关键作用^[24],*wabG* 基

因能够调控肺炎克雷伯菌脂多糖的合成,以及荚膜形成,帮助菌株躲避细胞的吞噬作用,并增强菌株的粘附能力^[8,25]。*uge* 基因参与肺炎克雷伯菌核心脂多糖的生物合成,人为构建的 *uge* 基因突变体能够显著降低菌株的毒力和感染宿主的能力^[26]。据报道,贡嘎等^[27]从患呼吸道疾病的牦牛中分离到的 8 株肺炎克雷伯菌均携带 *mrkD*、*fimH* 和 *wabG*; 张传美等^[20]从患肺炎的水貂中分离的 10 株肺炎克雷伯菌,均携带 *uge*、*ureA*、*wabG* 和 *iucB* 基因,与本试验中 *uge* 和 *wabG* 毒力基因检出率相似。

研究表明,鸡场肺炎克雷伯菌分离率较高,且分离菌株对常见抗菌药物耐药程度较为严重,可为该地区耐药性监测和疾病防控提供参考依据。

参考文献:

- [1] Wang G, Zhao G, Chao X, et al. The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2020, 17(17): 6278.
- [2] NAVON - VENEZIA S, KONDRATYEVA K, CARATTOLI A. *Klebsiella pneumoniae*; a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2017, 41(3): 252 - 275.
- [3] Wyres KL, Holt KE. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2018, 45:131 - 139.
- [4] Brisse S, Van H T, Kusters K, et al. Development of a rapid identification method for *Klebsiella pneumoniae* phylogenetic groups and analysis of 420 clinical isolates[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2004, 10(10): 942 - 945.
- [5] 胡付品,郭燕,朱德妹,等. 2020 年 CHINET 中国细菌耐药监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2021,21(04):377 - 387.
Hu F, Guo Y, Zhu D, et al. CHINET surveillance of bacterial resistance: results of 2020[J]. *Chin J Infect Chemother*, 2021, 21(04):377 - 387.
- [6] Neuberger A, Oren I, Sprecher H. Clinical impact of a PCR assay for rapid identification of *Klebsiella pneumoniae* in blood cultures[J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(1): 377 - 379.
- [7] Ballen V, Gabasa Y, Ratia C, et al. Antibiotic resistance and virulence profiles of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical sources[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 738223.
- [8] 曹菲菲. 规模化牧场奶牛乳腺炎病原菌分离鉴定及肺炎克雷伯菌耐药性和致病力研究[D]. 扬州:扬州大学,2020.
Cao F. Isolation and Identification of Mastitis Pathogens in Large scale Pasture Dairy Cows and Study on Drug Resistance and Pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae* [D]. Yangzhou University, 2020.
- [9] Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2011, 70(1): 119 - 23.
- [10] Dallenne C, Dacosta A, DECRÉ D, et al. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta - lactamases in *Enterobacteriaceae* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2010, 65(3): 490 - 495.
- [11] Essack SY, Hall LM, Pillay DG, et al. Complexity and diversity of *Klebsiella pneumoniae* strains with extended - spectrum beta - lactamases isolated in 1994 and 1996 at a teaching hospital in Durban, South Africa. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45(1): 88 - 95.
- [12] Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, et al. Multiplex PCR for detection of plasmid - mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL - producing enterobacterial isolates [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2007, 60(2): 394 - 397.
- [13] Rebelo AR, Bortolaia V, Kjeldgaard JS, et al. Multiplex PCR for detection of plasmid - mediated colistin resistance determinants, *mcr - 1*, *mcr - 2*, *mcr - 3*, *mcr - 4* and *mcr - 5* for surveillance purposes[J]. *Euro Surveill*, 2018, 23(6): 17 - 00672.
- [14] Chen X, Zhang W, Pan W, et al. Prevalence of *qnr*, *aac(6)* - *Ib - cr*, *qepA*, and *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and the environment[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(6): 3423 - 3427.
- [15] 武瑞兵,高玉敏,王鹏翔,等. 牛肉源大肠杆菌的耐药性检测及相关耐药基因分布[J]. 中国畜牧兽医,2015,42(02): 452 - 458.
Wu R, Gao Y, Wang P, et al. Detection of Antibiotic Resistance and Distribution of Resistance Determinants in *Escherichia coli* I - isolated from Beef [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2015, 42(02): 452 - 458.
- [16] 马红映. 广泛耐药肺炎克雷伯菌耐药机制研究及临床特征分析[D]. 苏州:苏州大学,2017.
Ma H. Acquired resistance - related genes and clinical characteristic in Extensively drug - resistant *Klebsiella pneumoniae* [D]. Soochow University, 2017.
- [17] 黄攀,于惠迪,金文杰,等. 鸡源产 ESBLs 肺炎克雷伯菌的分

- 离鉴定及其耐药性分析[J]. 中国家禽, 2018, 40(18): 57-59.
- Huang P, Yu H, Jin W, *et al.* Isolation, identification and drug resistance analysis of ESBLs producing *Klebsiella Pneumoniae* from chicken[J]. *China Poultry*, 2018, 40(18): 57-59.
- [18] 石玉祥, 赵文鹏, 刘洋, 等. 奶牛乳房炎源性肺炎克雷伯杆菌的分离鉴定和耐药性分析[J]. 中国兽医杂志, 2020, 56(03): 95-98+136.
- Shi Y, Zhao W, Liu Y, *et al.* Isolation, Identification and Drug Resistance Analysis of *Klebsiella Pneumoniae* Derived from Bovine Mastitis[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2020, 56(03): 95-98+136.
- [19] 李淑梅, 陈俊杰, 孟志芬, 等. 鸡源性肺炎克雷伯菌的多位点序列分型和耐药性调查[J]. 中国预防兽医学报, 2017, 39(06): 500-503.
- Li S, Chen J, Meng Z, *et al.* Multilocus sequence typing and antibiotics resistance profiles of *Klebsiella pneumoniae* isolated from chicken[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2017, 39(06): 500-503.
- [20] 张传美, 谢士杰, 孙晓琦, 等. 貂源肺炎克雷伯菌耐药性、毒力及免疫原性分析[J]. 中国预防兽医学报, 2021, 43(01): 29-34.
- Zhang C, Xie S, Sun X, *et al.* Drug Sensitivity Test, Virulence and Immunogenicity of *Klebsiella pneumoniae* isolates from minks[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2021, 43(01): 29-34.
- [21] Hennequin C, Robin F. Correlation between antimicrobial resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2016, 35(3): 333-341.
- [22] 陈强, 程悦宁, 冯秋菊, 等. 水貂肺炎克雷伯菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. 中国畜牧兽医, 2022, (02): 700-708.
- Chen Q, Cheng Y, Feng Q, *et al.* Isolation, Identification and Drug Resistance Analysis of *Klebsiella pneumoniae* from Minks[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2022, (02): 700-708.
- [23] Li J, Xu Q, Ogurek S, *et al.* Efflux Pump AcrAB Confers Decreased Susceptibility to Piperacillin - Tazobactam and Ceftolozane - Tazobactam in Tigecycline - Non - Susceptible *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Infect Drug Resist*, 2020, 13: 4309-4319.
- [24] El Fertas - aissani R, Messai Y, Alouache S, *et al.* Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. *Pathol Biol (Paris)*, 2013, 61(5): 209-216.
- [25] 张超. 宁夏地区牛源肺炎克雷伯氏菌分离鉴定及部分毒力基因与耐药基因分析[D]. 银川: 宁夏大学, 2018.
- Zhang C. Isolation and identification of *Klebsiella pneumoniae* in Ningxia area and analysis of its partial virulence genes and drug resistance genes[D]. Ningxia University, 2018.
- [26] Regrue M, Hita B, Pique N, *et al.* A gene, *uge*, is essential for *Klebsiella pneumoniae* virulence. *Infect Immun*, 2004, 72(1): 54-61.
- [27] 贡嘎, 格桑卓玛, 左伟, 等. 西藏部分地区牦牛源肺炎克雷伯菌的分离、鉴定、毒力及耐药基因分析[J]. 中国兽医学报, 2021, 41(01): 102-109.
- Gong G, Gesang Z, Zuo W, *et al.* Isolation, identification, virulence and drug resistance genes detection of *Klebsiella pneumoniae* in Tibet yak[J]. *Chinese Journal Chinese Journal of Veterinary Science*, 2021, 41(01): 102-109.

(编辑: 陈希)