

大熊猫源肺炎克雷伯菌生物学特性

李敏^{#1}, 苏小艳^{#2}, 李学英¹, 张焕容^{*1}

1 西南民族大学畜牧兽医学院, 四川 成都 610041

2 成都大熊猫繁育研究基地 四川省濒危野生动物保护生物学重点实验室, 四川 成都 610081

李敏, 苏小艳, 李学英, 张焕容. 大熊猫源肺炎克雷伯菌生物学特性[J]. 微生物学通报, 2022, 49(12): 5206-5221

Li Min, Su Xiaoyan, Li Xueying, Zhang Huanrong. Isolation, identification, and biological characterization of *Klebsiella pneumoniae* from *Ailuropoda melanoleuca*[J]. Microbiology China, 2022, 49(12): 5206-5221

摘要:【背景】肺炎克雷伯菌是仅次于大肠杆菌的常见条件致病菌之一, 严重时可导致大熊猫发生出血性肠炎、全身性败血症等。【目的】明确大熊猫源肺炎克雷伯菌的生物学特性, 对防控该病作出科学指导。【方法】分别采用结晶紫染色法、拉丝实验、K-B 纸片法和 PCR 技术对 46 株大熊猫源肺炎克雷伯菌的生物被膜形成能力、高黏性表型、耐药表型和 15 种常见毒力基因等生物学特性进行研究, 并根据以上生物学特性选择一株可能具有致病性的分离菌 *pneumoniae-X-5*, 研究其对小鼠的致病性。【结果】46 株肺炎克雷伯菌均可形成荚膜; 12 株为高黏性表型肺炎克雷伯菌; 能形成生物被膜的菌株占比为 65% (30/46); 分离出的 46 株菌中多重耐药菌株占 58% (27/46), 对氨苄西林、苯唑西林、青霉素、万古霉素呈 100% 耐药; 毒力基因检出率最高的为 *ureA* (91.30%, 42/46)。 *pneumoniae-X-5* 菌株对小鼠的 LD_{50} 为 8.9×10^4 CFU/mL; 该菌株攻毒小鼠肺泡间隔增厚, 炎性细胞浸润, 肝细胞变性坏死, 脾充血, 十二指肠黏膜上皮和固有层分离, 固有层部分细胞坏死。死亡小鼠脾脏含细菌量最多, 其次为肝脏。【结论】本试验阐明了部分大熊猫源肺炎克雷伯菌的多重耐药性、能形成生物被膜、具有高黏表型等病原生物学特性, 为大熊猫肺炎克雷伯杆菌病的防控及临床治疗提供了科学依据。

关键词: 大熊猫; 肺炎克雷伯菌; 高黏性表型; 毒力基因; 耐药表型; 致病性; 病理变化

基金项目: 成都大熊猫繁育研究基地项目(2021CPB-B15)

#对本文贡献相同

Supported by: Chengdu Research Base of Giant Panda Breeding Program (2021CPB-B15)

#These authors equally contributed to this work

*Corresponding author: E-mail: 22100058@swun.edu.cn

Received: 2022-08-28; Accepted: 2022-09-07; Published online: 2022-09-26

Isolation, identification, and biological characterization of *Klebsiella pneumoniae* from *Ailuropoda melanoleuca*

LI Min^{#1}, SU Xiaoyan^{#2}, LI Xueying¹, ZHANG Huanrong^{*1}

1 College of Animal and Veterinary Sciences, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, Sichuan, China

2 Chengdu Research Base of Giant Panda Breeding, Sichuan Key Laboratory of Conservation Biology for Endangered Wildlife, Chengdu 610081, Sichuan, China

Abstract: [Background] *Klebsiella pneumoniae*, one of the common opportunistic pathogens after *Escherichia coli*, can lead to hemorrhagic enteritis and systemic sepsis in giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*). [Objective] To identify the biological characteristics of *K. pneumoniae* from giant pandas and provide scientific guidance for the prevention and control of the disease. [Methods] The biofilm formation, high viscosity, drug resistance, and 15 common virulence genes of 46 strains of *K. pneumoniae* from *A. melanoleuca* were studied via crystal violet staining, string test, K-B disk diffusion method, and PCR, respectively. Further, we selected an isolate (pneumoniae-X-5) that may be pathogenic according to the above biological characteristics to study its pathogenicity in mice. [Results] All the 46 strains of *K. pneumoniae* could form capsule, among which 12 strains showed the phenotype of high viscosity and 65% (30/46) of the strains could form biofilm. Among the strains, 58% (27/46) were multi-drug resistant and 100% were resistant to ampicillin, oxacillin, penicillin, and vancomycin. Of the virulence genes, *ureA* had the highest detection rate of 91.30% (42/46). The LD_{50} of pneumoniae-X-5 in mice was 8.9×10^4 CFU/mL. The mice challenged with this strain had thickened alveolar septa, inflammatory cell infiltration, hepatocyte degeneration and necrosis, splenic congestion, separation of duodenal mucosal epithelium and lamina propria, and partial cell necrosis in the lamina propria. The spleen contained the highest amount of bacteria in the dead mice, followed by the liver. [Conclusion] This study elucidates the multi-drug resistance, biofilm formation, high viscosity and other pathogenic characteristics of *K. pneumoniae* from *A. melanoleuca*, providing a scientific basis for the prevention, control, and clinical treatment of *K. pneumoniae* disease in *A. melanoleuca*.

Keywords: *Ailuropoda melanoleuca*; *Klebsiella pneumoniae*; high viscosity; virulence gene; drug resistance; pathogenicity; pathological change

大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)是我国 I 级保护动物, 已经存活了 800 万年之久, 在动物界有“活化石”之称, 是世界公认的易危动物, 是生物多样性保护的旗舰种, 现主要分布于川、陕、甘三省。大熊猫种群数量不仅受到气候环境、动物栖息地改变的影响, 同时也受到疾病的威胁, 而细菌性疾病是影响大熊猫生命健康的重要因素之一。大量的研究发现, 肺炎克雷伯菌可引起大熊猫出血性肠炎和败血症等。

1986 年以来, 成都动物园出现多起大熊猫细菌性感染, 引起大熊猫严重的出血性肠炎, 导致数例大熊猫死亡, 造成了无法弥补的损失^[1]。1998 年, 王强等^[2]报道, 成都动物园两只大熊猫因感染肺炎克雷伯菌而发生出血性肠炎; 熊焰等^[3]从其中一只死亡的亚成体大熊猫中分离到致病性的肺炎克雷伯菌和大肠杆菌, 并分析此病例可能是在肠炎的基础上逐步发展为败血症, 使全身组织器官发生病变, 最终导致该大熊猫的死

亡。陈垚焱等^[4]报道,因外伤继发肺炎克雷伯菌与奇异变形杆菌感染的大熊猫表现为全身感染性败血症,全身多组织器官变性与坏死。

由于大熊猫为珍稀易危野生动物,数量较少,采样不易,截至目前,对人工圈养大熊猫种群疾病的诊断与防治主要依据其临床症状和流行病学资料。本试验对大熊猫源肺炎克雷伯菌的培养及染色特性、高黏性表型、常见毒力基因、生物被膜形成能力、耐药性和致病性等进行研究,以期明确部分大熊猫源肺炎克雷伯菌的生物学特性,为大熊猫源肺炎克雷伯菌感染的防控提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌 株

46株大熊猫源肺炎克雷伯菌株和肺炎克雷伯菌标准菌株 ATCC700603,均由成都大熊猫繁育研究基地保存并提供。

1.1.2 实验动物

6-8周龄雌性昆明小鼠50只,重量为(20±2)g,购自成都达硕实验动物中心。

1.1.3 培养基、主要试剂和仪器

麦康凯培养基(MCA)和LB液体培养基,青岛海博生物技术有限公司。药敏片,杭州微生物试剂有限公司;DL2000 DNA Marker,天根生化科技(北京)有限公司;PCR扩增引物,生工生物工程(上海)股份有限公司合成。酶标仪,伯乐(Bio-Rad)生命医学产品有限公司;恒温培养箱,上海和呈仪器制造有限公司;自动凝胶图像系统,上海天能科技公司;超净工作台,浙江华夏医疗科技有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 大熊猫源肺炎克雷伯菌的复苏和鉴定

无菌条件下挑取46份大熊猫源肺炎克雷伯

菌和肺炎克雷伯菌标准菌株 ATCC 700603 甘油保种菌液,划线接种于MCA平板培养基,37℃恒温培养8-12h,观察其菌落特征,典型菌落进行革兰染色镜检,观察细菌的形态及染色特性。采用酚氯仿法提取肺炎克雷伯菌DNA作为模板,参照文献[5]对肺炎克雷伯菌 *khe* 基因设计的特异性引物进行PCR扩增:F:5'-ATGAAACGACCTGATTGCATTCGC-3';R:5'-TTACTTTTCCGCGGCTTACCGTC-3'。

将PCR扩增产物进行1%琼脂糖凝胶后,置于凝胶成像系统观察PCR扩增结果并送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.2.2 药物敏感性试验

依据美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)标准^[6],采用K-B纸片法检测大熊猫源肺炎克雷伯菌对阿莫西林、氨苄西林、氯霉素等40种临床常用药物的敏感性,每种抗菌药物重复3次。对3类或3类以上药物耐药的菌株被判定为多重耐药菌株。

1.2.3 生物被膜形成能力测定

参照文献[7]中的结晶紫染色法,对46株大熊猫源肺炎克雷伯菌进行生物被膜形成能力测定,在 OD_{595} 处测定吸光值。每株菌做3次重复,吸光值取平均值。生物被膜形成能力判定标准为: $OD_{595} > 4 OD_c$ (空白对照 OD_{595})为强成膜能力, $2 OD_c < OD_{595} \leq 4 OD_c$ 为中等成膜能力, $OD_c < OD_{595} \leq 2 OD_c$ 为弱成膜能力, $OD_{595} \leq OD_c$ 为无生物被膜形成能力。

1.2.4 拉丝试验

将菌株接种在MCA平板上,37℃培养过夜后用接种环轻触菌落表面,能拉起黏液丝且长度>5mm为阳性菌株,黏液丝长度<5mm则为阴性菌株;传代2次,重复操作2次。拉丝试验阳性菌株归为高黏性肺炎克雷伯菌组,拉

丝试验阴性菌株归为普通肺炎克雷伯菌组。

1.2.5 荚膜染色

用干墨水法^[8]对 46 株肺炎克雷伯菌和肺炎克雷伯菌标准菌株 ATCC 700603 进行荚膜染色, 加 1 滴 6% 葡萄糖液于洁净载玻片一端, 挑少量肺炎克雷伯菌与其充分混合, 再加 1 滴墨水充分混匀, 于空气中自然干燥后滴加甲醇固定, 再用甲基紫染色 1-2 min 后镜检, 紫色菌体

周围清晰透明则形成荚膜。

1.2.6 毒力基因检测

以 1.2.1 中提取的 DNA 为模板, 参照文献[9]中肺炎克雷伯菌毒力基因特异性引物(表 1)进行 PCR 扩增, 检测大熊猫源肺炎克雷伯菌的毒力基因携带情况。15 种致病性相关的常见毒力基因为: 荚膜相关毒力基因(*rmpA*、*magA*), 菌毛相关毒力基因(*fimH*、*mrkD*), 脂多糖相关毒力基

表 1 肺炎克雷伯菌毒力基因引物信息^[10-12]

Table 1 Specific primers of *Klebsiella pneumoniae* virulence genes^[10-12]

Virulence gene	Target gene	Primer sequence (5'→3')	Fragment size (bp)	Annealing temperature (°C)
Capsules	<i>rmpA</i>	TACATATGAAGGAGTAGTTAAT GAGCCATCTTTCATCAAC	505	48
	<i>magA</i>	GGTGCTCTTTACATCATTGC GCAATGGCCATTTGCGTTAG	1 238	61
Pili	<i>fimH</i>	TGCTGCTGGGCTGGTCGATG GGGAGGGTGACGGTGACATC	534	50
	<i>mrkD</i>	AAGCTATCGCTGTACTTCCGGCA GGCGTTGGCGCTCAGATAGG	340	51
Lipopolysaccharides	<i>wabG</i>	ACCATCGGCCATTTGATAGA CGGACTGGCAGATCCATATC	683	57
	<i>uge</i>	TCTTCACGCCTTCCTTCACT GATCATCCGGTCTCCCTGTA	550	51
Siderophores	<i>entB</i>	GTCAACTGGGCCTTTGAGCCGTC TATGGGCGTAAACGCCGGTGAT	400	60
	<i>ybtA</i>	ATGACGGAGTCACCGCAAAC TTACATCACGCGTTTAAAGG	960	59
	<i>kfu</i>	ATAGTAGGCGAGCACCGAGA AGAACCTTCTCGCTGAACA	530	59
	<i>aero</i>	GCATAGGCGGATACGAACAT CACAGGGCAATTGCTTACCT	556	52
	<i>iutA</i>	GGCTGGACATCATGGGAACTGG CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	300	55
	<i>icuB</i>	ATGTCTAAGGCAAACATCGT TTACAGACCGACCTCCGTGA	948	55
Allantoins	<i>alls</i>	AATCAATGGCTATTCCCGCTG CGCTTCACTTCTTTCACTGACAG	239	50
		CCGAAACATTACGCACCTTT ATCACGAAGAGCCAGGTCAC	508	58
Urease	<i>ureA</i>	TCAGATAATCGGGTTGTGAACGGT CGTCGCCTGGCCCGCGGCCT	261	59

因(*wabG*、*uge*), 铁载体相关毒力基因(*entB*、*ybtA*、*kfu*、*aero*、*iutA*、*icuA* 和 *icuB*), 尿素酶相关毒力基因(*ureA*), 以及尿囊素相关毒力基因(*alls*), 引物信息与 PCR 退火温度见表 1。

1.2.7 细菌 LD_{50} 的测定

在前部分试验中, 检测到一株生物被膜形成能力强且有荚膜、高黏性、携带毒力基因最多、编号为 *pneumoniae*-X-5 的大熊猫源肺炎克雷伯菌, 因此以此株菌株进行致病性试验。将培养过夜的 *pneumoniae*-X-5 菌液计数后, 调整菌液浓度分别为 7×10^3 、 7×10^4 、 7×10^5 、 7×10^6 、 7×10^7 、 7×10^8 、 7×10^9 和 7×10^{10} CFU。将 50 只 6–8 周龄的昆明小鼠随机分为 10 组, 每组 5 只。采用腹腔注射方式分别将 8 个不同浓度 *pneumoniae*-X-5 菌液注射给其中 8 组, 每只 0.2 mL。同时, 肺炎克雷伯菌标准菌株以 7×10^9 CFU/mL 接种 1 组昆明小鼠作为阳性对照, 每只 0.2 mL。生理盐水以同种接种方式和剂量注射 1 组昆明小鼠作为阴性对照。攻毒后, 观察各组小鼠的精神状况等临床症状, 并记录各组小鼠发病及死亡情况, 采用改良寇氏法计算 LD_{50} ^[13]。计算公式为:

$$LD_{50} = \lg^{-1} [X_m - i(\sum p - 0.5)]$$

式中: X_m 是最高致死量的对数值; i 是相邻剂量的对数差; $\sum p$ 是各组死亡率的总和。

在无菌条件下, 分别采取攻毒株、阳性对照和阴性对照小鼠的肝、脾、肺等组织, 置于 4% 的多聚甲醛溶液(组织固定液体积为样品体积的 10–15 倍)固定后, 送至成都里来生物科技有限公司进行组织切片制备和 HE 染色, 观察试验小鼠的组织病理变化。

1.2.8 组织中细菌的定量检测

在无菌条件下, 用无菌手术器械分别采集 3 只感染 7×10^7 CFU 肺炎克雷伯菌 *pneumoniae*-X-5 和 ATCC 700603 死亡小鼠的心、肝、脾、肺、

肾等组织, 大小约为 $2 \text{ cm} \times 1 \text{ cm} \times 0.5 \text{ cm}$, 用可精确称量至 0.000 1 g 的电子天平称量各组织后加入 5 mL 无菌生理盐水, 用无菌剪刀剪碎组织后使用无菌研磨器研磨成匀浆, 再用无菌生理盐水 10 倍稀释, 按涂布法进行培养后细菌计数, 每个稀释度 3 个重复。选取菌落总数在 30–300 之间的平板进行计数, 并按公式 $Y = 5X/M \times 10^{n+1}$ 计算每克组织中的菌落数, 即每克组织中的细菌含量。式中: Y 为每克组织的细菌含量; X 为菌落计数; M 为不同组织的质量; n 为组织匀浆的稀释倍数^[14]。同时, 随机挑取平板上的单菌落扩增肺炎克雷伯菌 *khe* 特异性基因, 进行病原菌的鉴定。

2 结果与分析

2.1 大熊猫源肺炎克雷伯菌的复苏和鉴定结果

在麦康凯琼脂培养基上长出表面光滑、边缘整齐、中心玫瑰红色、周围淡粉色的菌落, 经革兰染色镜检后分离菌株呈革兰染色阴性、较粗的短杆菌, 单个、成双或短链状排列。肺炎克雷伯菌 *khe* 特异性基因扩增结果显示, 46 株肺炎克雷伯菌分离株扩增产物电泳后均在 500 bp 片段大小处出现条带, 与目的片段 498 bp 大小相符, 说明 46 株分离株均为肺炎克雷伯菌。

2.2 药敏试验结果

46 株大熊猫源肺炎克雷伯菌的药物敏感性检测结果显示, 大熊猫源肺炎克雷伯菌分离株对氨苄西林、青霉素、万古霉素、苯唑西林呈 100% 耐药, 对阿莫西林、多西环素耐药率分别为 97.82% 和 52.17%, 对其他抗生素的耐药率均低于 50% (表 2), 58% (27/46) 为多重耐药菌株。

2.3 生物被膜形成能力测定结果

对 46 株大熊猫源肺炎克雷伯菌进行生物被膜形成能力测定。结果显示, 13 株分离株为中

表 2 46 株肺炎克雷伯菌耐药试验结果

Table 2 Drug resistance test results of 46 strains of *Klebsiella pneumoniae*

Antibiotic species	Drug name	Resistant strains (%)	Antibiotic species	Drug name	Resistant strains (%)
Polypeptides	Vancomycin	46 (100.00)	Beta-lactams	Ceftazidime	0 (0.00)
	Quinolones	Enoxacin		2 (4.34)	Cefixime
Ofloxacin		1 (2.17)		Cefmetazole	1 (2.17)
Norfloxacin		1 (2.17)		Cefepime	0 (0.00)
Lomefloxacin		0 (0.00)		Cefotaxime	3 (6.52)
Fleroxacin		2 (4.34)		Cephalexin	3 (6.52)
Levofloxacin		4 (8.69)		Cefazolin	6 (13.04)
Ciprofloxacin		1 (2.17)		Ceftriaxone	0 (0.00)
Gatifloxacin		0 (0.00)		Cefoxitin	6 (13.04)
Aminoglycosides	Kanamycin	2 (4.34)		Piperacillin	4 (8.69)
	Gentamicin	3 (6.52)		Cefuroxime	2 (4.34)
	Streptomycin	5 (10.86)		Cefaclor	5 (10.86)
Chloramphenicol	Chloramphenicol	14 (30.43)		Oxacillin	46 (100.00)
	Sulfonamides	Bactrim		15 (32.60)	Aztreonam
Trimethoprim		14 (30.43)	Imipenem	0 (0.00)	
Macrolides	Azithromycin	4 (8.69)	Moxalactam	0 (0.00)	
			Meropenem	0 (0.00)	
Tetracyclines	Doxycycline	24 (52.17)	Ampicillin	46 (100.00)	
	Minocycline	7 (15.21)	Penicillin	46 (100.00)	
			Amoxicillin	45 (97.82)	
			Cefperazone	3 (6.52)	
			Ceftizoxime	0 (0.00)	

注: 括号外数字是菌株数, 括号内数值是耐药率

Note: The number outside the brackets is the number of strains, and the number inside the brackets is the resistance rate.

等强度产生物被膜能力的肺炎克雷伯菌, 17 株分离株为弱阳性产生物被膜能力的肺炎克雷伯菌, 16 株分离株未产生物被膜(表 3)。

2.4 拉丝试验结果

如图 1 所示, 12 株肺炎克雷伯菌为高黏性肺炎克雷伯菌株, 其余 34 株为非高黏液性肺炎克雷伯菌。

2.5 荚膜染色结果

采用干墨水染色法对 46 株大熊猫源肺炎克雷伯菌进行荚膜生成鉴定, 结果显示, 染色后的菌株菌体颜色均为紫色, 背景为灰白色, 荚膜为透明清晰的圆环(图 2), 表明 46 株大熊猫源肺炎克雷伯菌分离株和标准菌株菌均可形成完整的荚膜。

2.6 毒力基因检测结果

采用 PCR 方法检测 15 种常见毒力基因在 46 株大熊猫源肺炎克雷伯菌的携带情况。结果显示, 毒力基因 *ureA* 检出率最高, 为 91.30% (42/46); 毒力基因 *makD*、*wabG*、*ugE* 的检出率较高分别是 84.78% (39/46)、82.61% (38/46)、80.44% (37/46); 毒力基因 *fimH*、*entB* 次之, 携带率分别是 67.39% (31/46)、63.04% (29/46), 毒力基因 *iucB*、*iucA*、*ybtA*、*magA*、*rmpA* 检出率较低, 为 2.17%–17.39%。常见但未检测到的毒力基因是 *iutA* 和 *aero*。此外, 1 株分离菌株(编号为 *pneumoniae*-X-5)同时携带 13 种毒力基因, 31 株分离菌株携带 5–7 种毒力基因, 3 株分离菌未检测到毒力基因(图 3)。

表 3 肺炎克雷伯菌生物被膜形成能力的测定结果

Table 3 Results of biofilm forming ability of *Klebsiella pneumoniae*

Strain No.	Absorbance value (OD_{595})	Standard deviation	Control	Result	Strain No.	Absorbance value (OD_{595})	Standard deviation	Control	Result
1	0.613	0.068	0.225	+	24	0.401	0.029	0.131	+
2	0.416	0.120	0.035	-	25	0.150	0.009	0.283	-
3	0.568	0.176	0.273	-	26	0.542	0.064	0.140	+
4	0.678	0.081	0.141	+	27	0.291	0.076	0.155	-
5	0.606	0.058	0.138	+	28	0.491	0.059	0.265	+
6	0.251	0.012	0.115	-	29	1.261	0.126	0.271	++
7	0.629	0.117	0.180	+	30	0.613	0.038	0.247	+
8	2.021	0.153	0.184	++	31	0.429	0.023	0.201	+
9	1.185	0.504	0.287	++	32	0.434	0.141	0.261	+
10	0.381	0.011	0.196	-	33	0.468	0.020	0.177	+
11	1.438	0.356	0.222	++	34	0.799	0.471	0.187	++
12	0.953	0.139	0.280	++	35	1.239	0.034	0.243	++
13	1.189	0.319	0.254	++	36	0.435	0.295	0.130	-
14	0.390	0.046	0.22	-	37	0.321	0.04	0.243	-
15	1.012	0.264	0.289	++	38	0.844	0.086	0.133	+
16	0.962	0.077	0.301	++	39	0.488	0.067	0.251	+
17	1.547	0.080	0.250	++	40	0.262	0.048	0.289	-
18	0.384	0.040	0.130	-	41	0.326	0.021	0.155	-
19	0.461	0.074	0.149	+	42	1.327	0.138	0.154	++
20	0.574	0.046	0.141	+	43	0.594	0.119	0.230	+
21	0.254	0.005	0.136	-	44	0.170	0.007	0.142	-
22	0.259	0.059	0.242	-	45	0.682	0.138	0.152	+
23	0.220	0.131	0.111	-	46	1.392	0.268	0.268	++

注：-：阴性；+：弱阳性；++：中等

Note: -: Negative; +: Weak positive; ++: Medium.

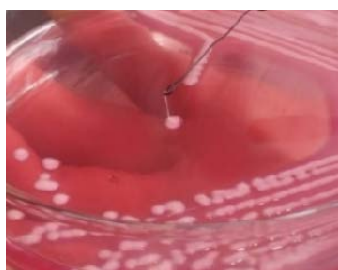


图 1 肺炎克雷伯菌黏液丝试验阳性

Figure 1 Drawing phenomenon of high mucus phenotype of *Klebsiella pneumoniae*.

2.7 细菌 LD_{50} 测定结果

筛选大熊猫源肺炎克雷伯菌 *pneumoniae*-X-5 进行小鼠攻毒实验结果(图 4)显示,高剂量组(7×10^8 – 7×10^{10} CFU)攻毒后 5 h 开始小鼠陆续发

生死亡,48 h 内死亡率为 100%;中剂量组(7×10^5 – 7×10^7 CFU)在攻毒后 11 h 开始陆续发生死亡, 7×10^6 CFU 和 7×10^7 CFU 浓度组 48 h 内死亡率均为 100%, 7×10^5 CFU 浓度组 48 h 内死亡率为 80% (4/5);低剂量组(7×10^3 – 7×10^4 CFU)中, 7×10^4 CFU 浓度在 24 h 后陆续死亡,48 h 内死亡率为 60% (3/5), 7×10^3 CFU 组无小鼠死亡。阴性对照无死亡现象。根据改良寇氏法计算得出分离菌株 *pneumoniae*-X-5 对小鼠的 LD_{50} 为 8.9×10^4 CFU/mL,表明分离菌株 *pneumoniae*-X-5 对小鼠具有较强的致病力。

腹腔注射肺炎克雷伯菌 *pneumoniae*-X-5 后,试验小鼠表现为精神逐渐萎靡,趴卧于鼠

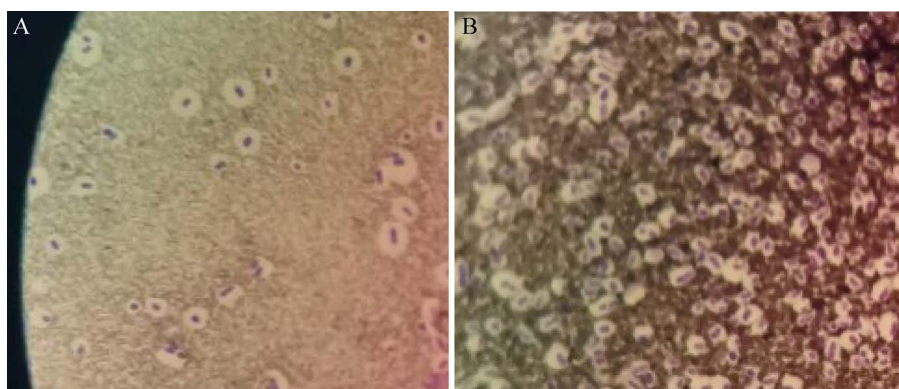


图2 肺炎克雷伯菌荚膜染色结果(1 000×) A: 部分样本肺炎克雷伯菌荚膜; B: 肺炎克雷伯菌标准菌株荚膜

Figure 2 Capsule stain of *Klebsiella pneumoniae* (1 000×). A: Partial sample *Klebsiella pneumoniae* capsule; B: *Klebsiella pneumoniae* standard strain capsule.

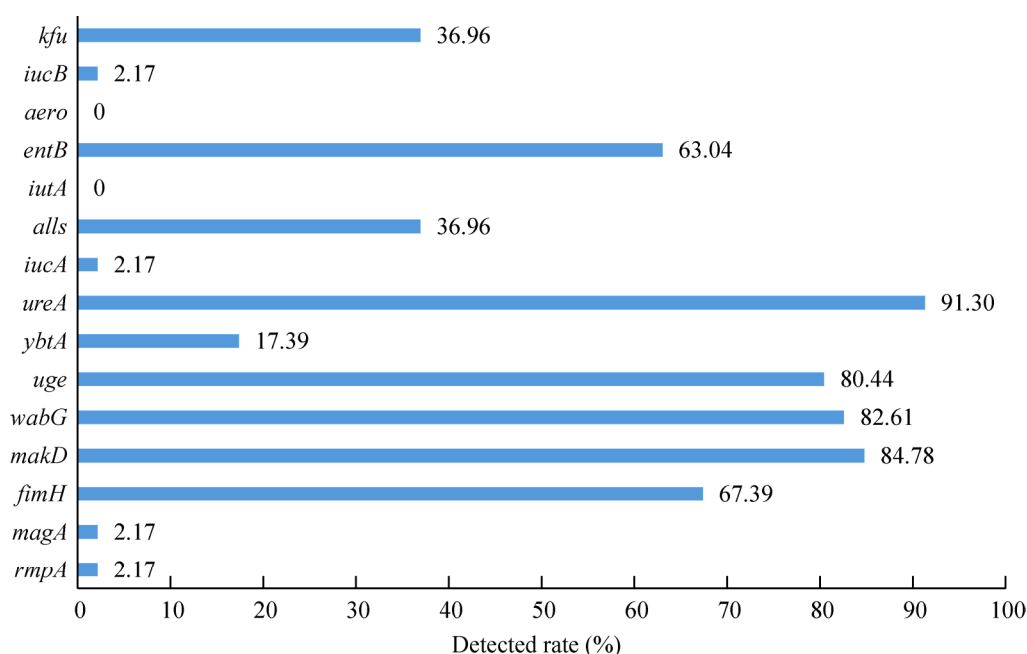


图3 肺炎克雷伯菌毒力基因检出情况

Figure 3 Detection of virulence genes in *Klebsiella pneumoniae*.

笼中, 不愿活动, 被毛凌乱无光泽, 呈腹式呼吸, 眼睛半睁, 眼神无光, 随后个别小鼠眼部伴有渗出物和腹泻等症状, 采食和饮水量明显减少, 感染后第2天到达死亡高峰期。感染肺炎克雷伯菌 pneumoniae-X-5 未死亡小鼠在接种48 h 后逐渐恢复为正常状态, 而感染肺炎克雷

伯菌标准菌株 ATCC 700603 的小鼠临床症状较相同感染量的肺炎克雷伯菌 pneumoniae-X-5 的临床症状轻、病程较缓慢、死亡率较低。感染肺炎克雷伯菌标准菌株 ATCC 700603 的未死亡小鼠接种24 h 后逐渐恢复。生理盐水对照组未见异常。对感染肺炎克雷伯菌 pneumoniae-X-5

后死亡的小鼠进行剖检观察,可见肠腔内有较多浅黄色黏性渗出物,肺脏、肝脏、脾脏肿胀并伴有出血现象,脾脏出血较为明显。胃部胀气,肠道内容物稀薄,小肠壁变薄,肠道出血。剖检感染肺炎克雷伯菌标准菌株 ATCC 700603 的小鼠后发现,肝脏、脾脏、十二指肠病变与感染肺炎克雷伯菌 *pneumoniae*-X-5 死亡小鼠的病变相同,但病变程度相对较轻。剖检生理盐水对照组处死小鼠无明显的病变,心脏与肾脏均无明显病变(图 5)。

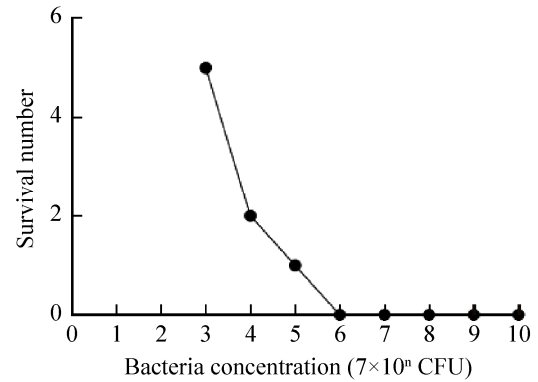


图 4 试验小鼠的生存曲线图

Figure 4 Growth curve for test mice.

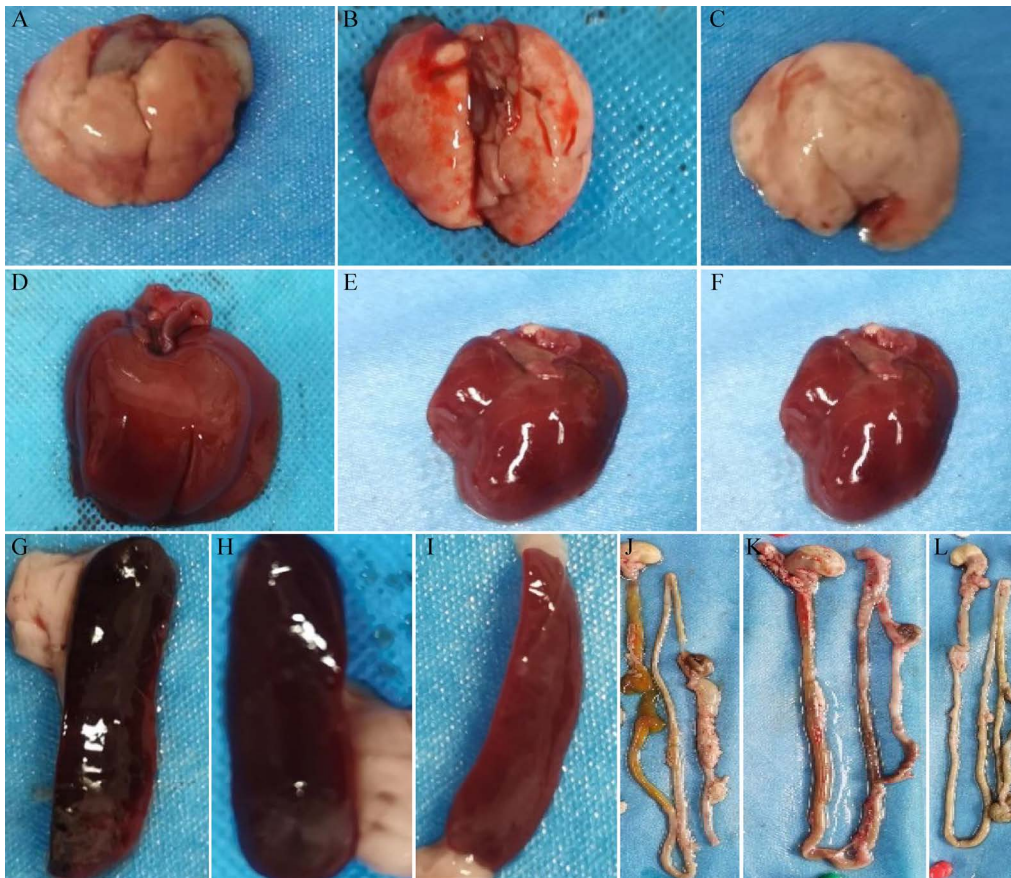


图 5 试验小鼠的剖检 A-C: 分别为攻毒组、阳性标准菌株对照组、阴性对照组的肺脏; D-F: 分别为攻毒组、阳性标准菌株对照组、阴性对照组的肝脏; G-I: 分别为攻毒组、阳性标准菌株对照组、阴性对照组的脾脏; J-L: 分别为攻毒组、阳性标准菌株对照组、阴性对照组的肠道

Figure 5 Necropsy of test mice. A-C: Lung of challenge group, positive standard strain control group and negative control group; D-F: Liver of challenge group, positive standard strain control group and negative control group; G-I: Spleen of challenge group, positive standard strain control group and negative control group; J-L: Intestine of challenge group, positive standard strain control group and negative control group.

由感染肺炎克雷伯菌 *pneumoniae*-X-5 的小鼠组织病理切片可见, 部分肝细胞变性坏死, 肝细胞胞质内含空泡, 部分肝细胞崩解, 肝窦及血管内伴有少量炎性细胞; 脾脏红髓内细胞成分减少, 大量红细胞堆积; 肺部肺泡隔轻微增厚, 见炎性细胞浸润; 十二指肠黏膜上皮和固有层分离, 固有层部分细胞坏死, 中央乳糜管轻微扩张。感染肺炎克雷伯菌标准菌株 ATCC 700603 的小鼠组织病理切片可见,

少量肝细胞变性, 胞质内含不等量不着色空泡; 脾脏白髓和红髓分界不明显, 白髓脾小结淋巴细胞数量明显减少, 大量淋巴细胞坏死, 崩解; 十二指肠固有层中央乳糜管轻微扩张。生理盐水对照组小鼠组织切片未见明显的病理学病变(图 6)。

2.8 组织中的细菌定量结果

感染肺炎克雷伯菌 *pneumoniae*-X-5 和肺炎克雷伯菌标准菌株 ATCC 700603 死亡的小鼠,

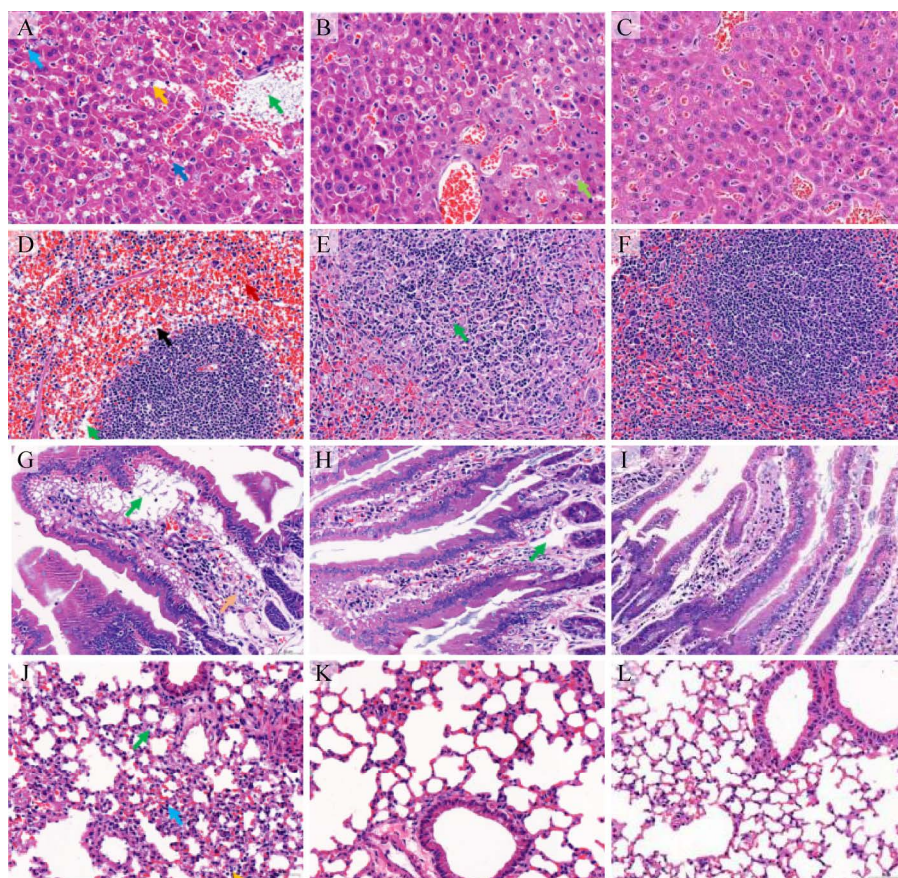


图 6 攻毒组小鼠与阳性标准菌株对照组小鼠的病理变化结果 A-C: 攻毒组、阳性对照组、阴性对照组的肝脏病理切片; D-F: 攻毒组、阳性对照组、阴性对照组的脾脏病理切片; G-I: 攻毒组、阳性对照组、阴性对照组的肠道病理切片; J-L: 攻毒组、阳性对照组、阴性对照组的肺部病理切片

Figure 6 Pathological changes in the experimental group and mice with positive standard strains. A-C: Liver pathological sections of challenge group, positive control group and negative control group; D-F: Spleen pathological sections of challenge group, positive control group and negative control group; G-I: Intestinal pathological sections of challenge group, positive control group and negative control group; J-L: Lung pathological sections of challenge group, positive control group and negative control group.

其组织匀浆培养后均可以观察到菌落, 随机挑取每个平板上的单个菌落, 用肺炎克雷伯菌 *khe* 基因特异性引物鉴定后均为肺炎克雷伯菌。组织匀浆 10 倍稀释培养后, 在 10^{-4} – 10^{-6} 稀释倍数之间, 平板上菌落总数在 30–300 之间, 进行细菌计数。感染肺炎克雷伯菌 *pneumoniae*-X-5 和肺炎克雷伯菌标准菌株 ATCC 700603 死亡的小鼠, 其不同组织器官的细菌计数结果(表 4)表明脾脏所含细菌量最多, 其次为肝脏, 细菌含量最少的脏器为肺(图 7)。但感染肺炎克雷伯菌 *pneumoniae*-X-5 死亡小鼠的脾脏、肝脏组织器官细菌含量比感染肺炎克雷伯菌标准菌株 ATCC 700603 死亡的小鼠组织器官的细菌含量多, 而肺脏的细菌含量大致相同。

3 讨论与结论

肺炎克雷伯菌是仅次于大肠杆菌的常见的条件致病菌之一^[15]。近年来, 由于在兽医临床上广泛使用广谱抗菌药物治疗相关细菌性疾病, 其耐药率呈上升趋势, 甚至导致肺炎克雷伯菌产生了多重耐药的情况, 人、猫、狗、大熊猫、金丝猴、黑叶猴等^[16-21]野生动物病例中

均出现了肺炎克雷伯菌的多重耐药菌株, 给细菌性疾病的治疗带来了巨大的挑战。由于物种珍贵, 大熊猫来源肺炎克雷伯菌的研究鲜有报道。燕霞等^[22]于 2022 年首次证实产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌存在于圈养大熊猫中。本试验中分离出的 46 株菌中有 58% (27/46) 以上为多重耐药菌株, 其中对氨苄西林、万古霉素、苯唑西林、青霉素呈 100% 耐药, 对阿莫西林、多西环素的耐药率在 50% 以上。王哲红等^[23]对奶牛源肺炎克雷伯菌进行的耐药分析结果显示, 3 株分离菌对青霉素类、头孢菌素类、磺胺类药物均产生不同程度的耐药; 而张文举^[24]分离的 63 株狐源肺炎克雷伯菌对氨基糖苷类抗生素耐药较为普遍。分析耐药表型产生差异的原因可能是与抗生素的使用频率、种类或用药习惯及地域差异有关。本试验证实在圈养大熊猫群中已出现多重耐药菌株, 提示在临床上对这些药物应谨慎使用。

肺炎克雷伯菌有极强的形成生物被膜的能力, 生物被膜使细菌能更好地适应恶劣环境。生物被膜也被证明与肺炎克雷伯菌的致病性和耐药性息息相关^[25]。本试验测定 46 株大熊猫源

表 4 组织细菌定量试验结果

Table 4 Quantitative test results of tissue bacteria

Name	Group	Isolated strains			Positive standard strain		
		Tissue quality (g)	Number of tissue colonies (g)	Tissue bacterial content (CFU/g)	Tissue quality (g)	Number of tissue colonies (g)	Tissue bacterial content (CFU/g)
Spleen	1	0.50	71	7.1×10^9	0.52	60	5.7×10^8
	2	0.60	77	6.5×10^9	0.62	58	4.6×10^8
	3	0.57	78	6.7×10^9	0.49	44	4.4×10^8
Liver	1	1.07	55	2.5×10^9	0.60	55	4.5×10^8
	2	0.93	54	2.9×10^9	0.88	58	3.2×10^8
	3	0.59	52	3.3×10^9	0.79	64	4.1×10^8
Lung	1	0.41	45	5.4×10^7	0.49	47	4.7×10^7
	2	0.47	54	5.6×10^7	0.43	49	5.6×10^7
	3	0.52	52	4.9×10^7	0.39	42	4.3×10^7

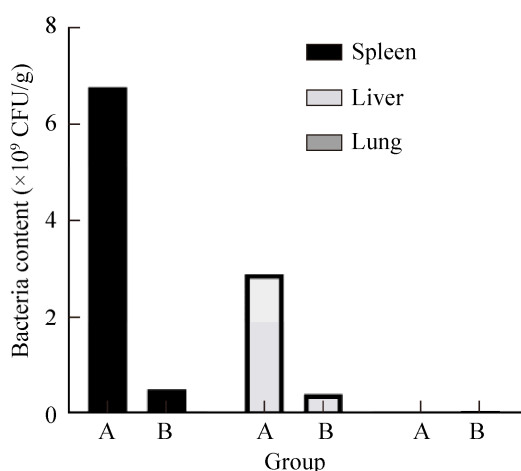


图 7 攻毒组(A)与标准对照组(B)组织细菌含量差别

Figure 7 The difference of bacterial content between the challenge group (A) and the standard control group (B).

肺炎克雷伯菌的生物被膜形成能力的研究结果显示, 有 13 株肺炎克雷伯菌具有中等强度的生物被膜形成能力, 17 株肺炎克雷伯菌的生物被膜形成能力较弱, 而有 16 株分离菌不形成生物被膜。生物被膜阳性率为 65%, 与文献[26-27]研究报道的狐狸源、貂源肺炎克雷伯菌的生物被膜形成能力相比阳性率较低, 这可能是由于来源物种不同, 肺炎克雷伯菌生物被膜的形成能力也不一样。杨帆等^[28]的研究报道同样表明, 鸡、猪源肺炎克雷伯菌株与兔、犬源肺炎克雷伯菌株之间生物被膜形成能力有较明显的差异。

高黏表型与菌株的高毒力密切相关^[29]。研究认为, “拉丝试验”可作为区别高毒力肺炎克雷伯菌和经典型肺炎克雷伯菌的判定标准。但近年来的研究表明, 拉丝试验阳性仅可作为高毒力菌株的初筛依据, 应当结合其毒力基因的检测进一步预测其毒力^[30]。本试验结果显示, 46 株大熊猫源肺炎克雷伯菌中, 高黏性表型占 26.08% (12/46), 同时对该 46 株肺炎克雷伯菌的

15 种常见毒力基因检测的结果表明, *entB*、*ureA*、*ugE*、*wabG*、*makD*、*fimH* 的检出率均在 63% (29/46) 以上, 而 *rmpA*、*magA*、*iucA*、*iucB* 只在其中 1 株菌中同时检出。毒力因子在肺炎克雷伯菌致病机制中起重要作用, 荚膜、脂多糖、菌毛、铁载体系统参与细菌的定殖与侵袭, 增强菌株毒力^[31]。许多研究结果表明, 1 型菌毛 *fimH* 是肺炎克雷伯菌中最常检测到的毒力因子之一^[32-33]。虽然 *fimH* 可介导肺炎克雷伯菌黏附于尿路上皮细胞和内皮细胞, 但是 *fim* 与高毒力肺炎克雷伯菌之间并无明显的相关性^[34], 本试验中 *fimH* 的检出率在 60% 以上, 与其得出的结论一致。与经典型肺炎克雷伯菌相比, 高毒力的肺炎克雷伯菌产生更多的铁载体蛋白, 铁载体活性增加 6-10 倍, 与毒力相关的肠杆菌素、耶尔森菌素、沙门菌素和杆菌素是目前已知的 4 种铁载体, 并且已有研究证实杆菌素是高毒力肺炎克雷伯菌的关键毒力介质^[35]。Russo 等^[36]的研究结果表明, *iucA*、*rmpA* 基因可以确定高毒力肺炎克雷伯菌的准确性大于 0.95。*iucA* 是编码杆菌素的 *iuc* 操纵子中的基因之一, 也是区分高毒力肺炎克雷伯菌与经典型肺炎克雷伯菌最准确的遗传标记之一。荚膜与肺炎克雷伯菌的侵袭性感染密切相关, 其中 K1 和 K2 荚膜血清型在高毒力肺炎克雷伯菌中最普遍, 而 *magA* 是 K1 血清型的特异性基因^[37], 细菌中存在 *magA* 使得吞噬细胞无法进入细胞, 而且对血清补体的杀伤作用具有较强的抵抗力。毒力因子 *rmpA* 也可激活荚膜的生成, 增加菌株的粘液表型, 但本试验测得的高黏表型菌株高于 *rmpA* 的检出率, 分析原因可能为有共同调节高黏表型的毒力因子。因此, 本试验将 1 株同时携带 13 种毒力基因, 其中包括 *rmpA*、*magA*、*iucA* 等基因的肺炎克雷伯菌 pneumoniae-X-5, 腹腔注射小鼠后测得 LD_{50} 为 1.7×10^4 CFU/mL。目前,

肺炎克雷伯菌已建立的体内感染模型有肺炎感染模型、脓毒血症感染模型、皮肤及软组织感染模型等。本试验建立的是腹腔脓毒血症感染模型操作简便,可较好地模拟细菌由接种部位感染至全身的演变过程^[38]。结果表明,该菌株致病性高于张文举等^[39-41]分离的肺炎克雷伯菌株。此外,与阳性对照肺炎克雷伯菌参考菌株相比,pneumoniae-X-5菌株感染小鼠的临床症状和病理学变化都更明显,死亡小鼠的脾脏和肝脏组织中细菌含量更多,表明肺炎克雷伯菌 pneumoniae-X-5在脾脏和肝脏中的生长繁殖速度更快且致病力更强,证明大熊猫源肺炎克雷伯菌 pneumoniae-X-5为高毒力肺炎克雷伯菌株。本试验为进一步研究该菌的病原生物学特性提供了依据。研究结果表明,多重耐药菌株已在圈养大熊猫种群中出现,耐药情况非常严峻。为减少耐药菌株的产生,必须加强抗菌药物的管理与使用,做好科学预防与治疗。

REFERENCES

- [1] 郭捷,姜永康,曹国文,王强,李尧述,钟顺隆,何光昕,田华剑. 两例大熊猫肠道致病菌的分离与鉴定[J]. 中国兽医科技, 1988, 18(11): 38-41
Wu J, Jiang YK, Cao GW, Wang Q, Li YS, Zhong SL, He GX, Tian HJ. Isolation and identification of intestinal pathogenic bacteria in two giant pandas[J]. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology, 1988, 18(11): 38-41 (in Chinese)
- [2] 王强,江华,中尾建子,今津孝二. 大熊猫肺炎克雷伯氏菌出血性肠炎病例报告[J]. 四川动物, 1998, 17(1): 29
Wang Q, Jiang H, Masayoshi N, Koji I. Case report of *Klebsiella pneumoniae* hemorrhagic enteritis in giant panda[J]. Sichuan Journal of Zoology, 1998, 17(1): 29 (in Chinese)
- [3] 熊焰,王印,彭广能,张化贤,张和民,何廷美,李德生,韩洪应. 亚成体大熊猫细菌性败血病病因及病理研究[J]. 中国兽医科技, 1998, 28(1): 7-9
Xiong Y, Wang Y, Peng GN, Zhang HX, Zhang HM, He
- TM, Li DS, Han HY. Study on etiology and pathogenicity of bacterial septicemia in sub-adult giant panda[J]. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology, 1998, 28(1): 7-9 (in Chinese)
- [4] 陈焘焱,刘颂蕊,苏小艳,耿毅,黄文俊,陈欣,白明焕,程子瑄. 一例大熊猫肺炎克雷伯菌与奇异变形杆菌感染的诊断[J]. 野生动物学报, 2020, 41(4): 1013-1019
Chen YY, Liu SR, Su XY, Geng Y, Huang WJ, Chen X, Bai MH, Cheng ZX. A case of *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis* infection in giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*)[J]. Chinese Journal of Wildlife, 2020, 41(4): 1013-1019 (in Chinese)
- [5] 冯娜. 一株牛源肺炎克雷伯菌的分离鉴定及其基因组初步分析[D]. 兰州: 甘肃农业大学硕士学位论文, 2017
Feng N. Isolation and identification of a bovine *Klebsiella pneumoniae* and preliminary analysis of its genome[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Gansu Agricultural University, 2017 (in Chinese)
- [6] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighteenth Informational Supplement: M100-S18[S]. Wayne, PA, USA: CLSI, 2020
- [7] Stepanović S, Cirković I, Ranin L, Svabić-Vlahović M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface[J]. Letters in Applied Microbiology, 2004, 38(5): 428-432
- [8] 陈燕飞. 细菌荚膜的制片技术[J]. 太原师范学院学报(自然科学版), 2008, 7(1): 151-154
Chen YF. The production technology of bacteria *Clostridium*[J]. Journal of Taiyuan Normal University: Natural Science Edition, 2008, 7(1): 151-154 (in Chinese)
- [9] 和晋渝. 肺炎克雷伯菌的血清分型及毒力基因分布的研究[D]. 重庆: 重庆医科大学硕士学位论文, 2012
He JY. Study on serotypes and distribution characteristic of virulence genes of *Klebsiella pneumoniae*[D]. Chongqing: Master's Thesis of Chongqing Medical University, 2012 (in Chinese)
- [10] 王哲红. 新疆集约化牛场肺炎克雷伯菌分子流行病学调查及耐药特性研究[D]. 阿拉尔: 塔里木大学硕士学位论文, 2021
Wang ZH. Molecular epidemiological investigation and drug resistance characteristics on *Klebsiella pneumoniae* of intensive cattle farms in Xinjiang[D]. Ala'er: Master's

- Thesis of Tarim University, 2021 (in Chinese)
- [11] 王建莉. 貂源肺炎克雷伯氏菌血清型和毒力基因的检测及其致病性研究[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2017
- Wang JL. Detection test of serotype and virulence genes in *Klebsiella pneumoniae* from mink and its pathogenesis in mice and mink[D]. Tai'an: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2017 (in Chinese)
- [12] 陈聪. 肺炎克雷伯菌的耐药性及其毒力基因相关性研究[D]. 苏州: 苏州大学硕士学位论文, 2019
- Chen C. The relationship between the resistance and virulence factors in *Klebsiella pneumoniae*[D]. Suzhou: Master's Thesis of Soochow University, 2019 (in Chinese)
- [13] 黄晓冬, 蔡建秀, 林海鸿. 天竺桂挥发油的毒理学研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(1): 138-139
- Huang XD, Cai JX, Lin HH. Toxicological study of volatile oil from *Tenjikukatsura*[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2012, 23(1): 138-139 (in Chinese)
- [14] 卜海激, 申洪, 朱天岭, 孟辉, 张鋆歆, 吴正蓉, 陈清. 犬海水中火器伤细菌感染定量研究[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(6): 598-601
- Bu HJ, Shen H, Zhu TL, Meng H, Zhang YX, Wu ZR, Chen Q. Quantitative study of bacteriological infections in dogs undergoing gunshot wound in seawater[J]. Journal of First Military Medical University, 2003, 23(6): 598-601 (in Chinese)
- [15] 陈强, 程悦宁, 冯秋菊, 郭利, 张淑琴, 谭斌, 易立, 赵权, 程世鹏, 孙娜. 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, 49(2): 700-708
- Chen Q, Cheng YN, Feng QJ, Guo L, Zhang SQ, Tan B, Yi L, Zhao Q, Cheng SP, Sun N. Isolation, identification and drug resistance analysis of *Klebsiella pneumoniae* from minks[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2022, 49(2): 700-708 (in Chinese)
- [16] Huynh BT, Passet V, Rakotondrasoa A, Diallo T, Kerleguer A, Hennart M, Lauzanne A, Herindrainy P, Seck A, Bercion R, Borand L, Pardos de la Gandara M, Delarocque-Astagneau E, Guillemot D, Vray M, Garin B, Collard JM, Rodrigues C, Brisse S. *Klebsiella pneumoniae* carriage in low-income countries: antimicrobial resistance, genomic diversity and risk factors[J]. Gut Microbes, 2020, 11(5): 1287-1299
- [17] Sato T, Harada K, Usui M, Tsuyuki Y, Shiraishi T, Tamura Y, Yokota SI. Tigecycline susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* complex and *Escherichia coli* isolates from companion animals: the prevalence of tigecycline-nonsusceptible *K. pneumoniae* complex, including internationally expanding human pathogenic lineages[J]. Microbial Drug Resistance: Larchmont, NY, 2018, 24(6): 860-867
- [18] Harada K, Shimizu T, Mukai Y, Kuwajima K, Sato T, Usui M, Tamura Y, Kimura Y, Miyamoto T, Tsuyuki Y, Ohki A, Kataoka Y. Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance in *Klebsiella* spp. isolates from companion animals in Japan: clonal dissemination of multidrug-resistant extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1021
- [19] 陈永林, 张成林, 胥哲. 大熊猫克雷伯氏菌病的诊断[J]. 中国兽医杂志, 2002, 38(8): 48
- Chen YL, Zhang CL, Xu Z. Diagnosis of *Klebsiella* disease in giant panda[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2002, 38(8): 48 (in Chinese)
- [20] 郭定宗, 胡薛英, 周诗其, 李家奎, 汪民权, 杜有顺, 余汉成. 金丝猴肺炎克雷伯氏菌及埃希氏大肠杆菌败血症的病理学观察[J]. 华中农业大学学报, 2001, 20(1): 60-62
- Guo DZ, Hu XY, Zhou SQ, Li JK, Wang MQ, Du YS, Yu HC. Pathological observation of septicemia on a golden monkey infected by *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*[J]. Journal of Huazhong Agricultural, 2001, 20(1): 60-62 (in Chinese)
- [21] 崔瑾, 陈武, 李婉萍, 彭仕明, 廖锐章, 单芬. 黑叶猴源肺炎克雷伯菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 中国兽医科学, 2020, 50(9): 1142-1146
- Cui J, Chen W, Li WP, Peng SM, Liao RZ, Shan F. Isolation and identification of Francois's langur-derived *Klebsiella pneumoniae* and drug sensitivity test[J]. Chinese Veterinary Science, 2020, 50(9): 1142-1146 (in Chinese)
- [22] 燕霞, 杨梅, 蒋雨林, 李林, 张东升, 李运莉, 侯蓉, 岳婵娟, 嵇晓光, 刘颂蕊, 等. 大熊猫源产碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌的耐药性和致病性研究[J]. 中国预防兽医学报, 2022, 44(2): 214-218
- Yan X, Yang M, Jiang YL, Li L, Zhang DS, Li YL, Hou R, Yue CJ, Ji XG, Liu SR, et al. Study on antibiotic resistance and pathogenicity of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from giant panda[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2022, 44(2): 214-218 (in Chinese)

- [23] 王哲红, 吴桐忠, 赵玉宾, 张星星, 韩猛立, 钟发刚, 胡建军, 黄新. 石河子地区某规模化奶牛场肺炎克雷伯菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. 中国畜牧兽医, 2021, 48(9): 3464-3472
Wang ZH, Wu TZ, Zhao YB, Zhang XX, Han ML, Zhong FG, Hu JJ, Huang X. Isolation, identification and drug resistance analysis of *Klebsiella pneumoniae* in a large-scale dairy farm in Shihezi area[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2021, 48(9): 3464-3472 (in Chinese)
- [24] 张文举. 河北省秦皇岛地区狐源肺炎克雷伯菌毒力与耐药检测及分析[D]. 秦皇岛: 河北科技师范学院硕士学位论文, 2019
Zhang WJ. Detection and analysis of drug resistance and virulence of *Klebsiella fox pneumoniae* in Qinhuangdao, Hebei province[D]. Qinhuangdao: Master's Thesis of Hebei Normal University of Science & Technology, 2019 (in Chinese)
- [25] Corona-Izquierdo FP, Membrillo-Hernández J. Biofilm formation in *Escherichia coli* is affected by 3-(N-morpholino) propane sulfonate (MOPS)[J]. Research in Microbiology, 2002, 153(3): 181-185
- [26] 韩坤. 貂源肺炎克雷伯菌的生物学特性及致病性研究[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2019
Han K. Biological characteristics and pathogenicity analysis of *Klebsiella pneumoniae* from mink[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019 (in Chinese)
- [27] 杨延, 刘梦, 赵丽丽, 魏成威, 王晓妍, 蒋情琴, 葛俊伟, 陈洪岩. 狐狸源肺炎克雷伯氏菌分离株生物学特征分析[J]. 中国预防兽医学报, 2018, 40(11): 998-1002
Yang Y, Liu M, Zhao LL, Wei CW, Wang XY, Jiang QQ, Ge JW, Chen HY. Analysis of biological characteristics of *Klebsiella pneumoniae* isolated from fox[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2018, 40(11): 998-1002 (in Chinese)
- [28] 杨帆, 李淑梅, 魏纪东, 李敏. 动物源肺炎克雷伯菌毒力基因及生物膜研究[J]. 中国预防兽医学报, 2017, 39(9): 764-766
Yang F, Li SM, Wei JD, Li M. Virulence genes and biofilm of *Klebsiella pneumoniae* isolated from animals[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2017, 39(9): 764-766 (in Chinese)
- [29] 王倩, 廖深玲, 袁余, 唐思诗, 泽娜, 何超. 肺炎克雷伯菌临床分离株毒力与耐药表型的关系[J]. 中华医院感染学杂志, 2022, 32(4): 496-500
Wang Q, Liao SL, Yuan Y, Tang SS, Ze N, He C. Relationship between virulence of clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates and drug resistance phenotypes[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2022, 32(4): 496-500 (in Chinese)
- [30] 马明葱, 李晓雨, 卓超. 高黏液表型与基因型预测肺炎克雷伯菌毒力的比较[J]. 中国感染控制杂志, 2021, 20(11): 1003-1007
Ma MC, Li XY, Zhuo C. Comparison of hypermucoviscous phenotype and genotype in predicting virulence of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Chinese Journal of Infection Control, 2021, 20(11): 1003-1007 (in Chinese)
- [31] 王海日罕, 多丽波. 高毒力高耐药肺炎克雷伯菌的研究进展[J]. 中国感染控制杂志, 2021, 20(11): 1069-1074
Wang HRH, Duo LB. Advances in hypervirulent and high antimicrobial-resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. Chinese Journal of Infection Control, 2021, 20(11): 1069-1074 (in Chinese)
- [32] Davies YM, Cunha MPV, Dropa M, Lincopan N, Gomes VTM, Moreno LZ, Sato MIZ, Moreno AM, Knöbl T. Pandemic clones of CTX-M-15 producing *Klebsiella pneumoniae* ST15, ST147, and ST307 in companion parrots[J]. Microorganisms, 2022, 10(7): 1412
- [33] Ranjbar R, Fatahian Kelishadroki A, Chehelgerdi M. Molecular characterization, serotypes and phenotypic and genotypic evaluation of antibiotic resistance of the *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different types of hospital-acquired infections[J]. Infection and Drug Resistance, 2019, 12: 603-611
- [34] Shah RK, Ni ZH, Sun XY, Wang GQ, Li F. The determination and correlation of various virulence genes, ESBL, serum bactericidal effect and biofilm formation of clinical isolated classical *Klebsiella pneumoniae* and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from respiratory tract infected patients[J]. Polish Journal of Microbiology, 2017, 66(4): 501-508
- [35] Lee CR, Lee JH, Park KS, Jeon JH, Kim YB, Cha CJ, Jeong BC, Lee SH. Antimicrobial resistance of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, hypervirulence-associated determinants, and resistance mechanisms[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2017, 7((3)): 483
- [36] Russo TA, Olson R, Fang CT, Stoesser N, Miller M, MacDonald U, Hutson A, Barker JH, La Hoz RM,

- Johnson JR. Identification of biomarkers for differentiation of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from classical *K. pneumoniae*[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2018, 56(9): e00776-e00718
- [37] Remya P, Shanthi M, Sekar U. Occurrence and characterization of hyperviscous K1 and K2 serotype in *Klebsiella pneumoniae*[J]. Journal of Laboratory Physicians, 2018, 10(3): 283-288
- [38] 赵娟, 刘志远, 刘贵建. 肺炎克雷伯菌动物感染模型及在中药抗感染应用中的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(3): 269-272, 276
- Zhao J, Liu ZY, Liu GJ. Animal models of *Klebsiella pneumoniae* infection and their applications in anti-infection of Chinese traditional medicine[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2019, 40(3): 269-272, 276 (in Chinese)
- [39] 张文举, 刘少杰, 张艳英, 张海华, 李蕴玉, 李佩国, 张召兴, 贾青辉, 张香斋. 河北部分地区狐狸源肺炎克雷伯菌血清型鉴定、毒力基因及致病性检测[J]. 中国兽医学报, 2020, 40(4): 735-739
- Zhang WJ, Liu SJ, Zhang YY, Zhang HH, Li YY, Li PG, Zhang ZX, Jia QH, Zhang XZ. Serotype identification, virulence genes and pathogenicity detection of *Klebsiella pneumoniae* from foxes in some areas of Hebei province[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2020, 40(4): 735-739 (in Chinese)
- [40] 钟世勋, 迟珊珊, 王振, 姜晓东, 刘丽萍, 邵明旭, 王传文, 于翠莲, 朱瑞良. 毛皮动物肺炎克雷伯菌III型菌毛 A 基因克隆测序与生物信息分析[J]. 中国兽医学报, 2015, 35(1): 74-80
- Zhong SX, Chi SS, Wang Z, Jiang XD, Liu LP, Shao MX, Wang CW, Yu CL, Zhu RL. Secondary structure and B-cell epitopes prediction of the type III fimbria structural gene A of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2015, 35(1): 74-80 (in Chinese)
- [41] 郝中香, 廖红, 刘丹, 郭玲, 杨绍林, 文彩芳, 张曼丽, 罗露, 郗立新, 杨艳, 等. 扭角羚肺炎克雷伯氏菌的分离鉴定[J]. 中国畜牧兽医, 2015, 42(1): 203-208
- Hao ZX, Liao H, Liu D, Guo L, Yang SL, Wen CF, Zhang ML, Luo L, Xi LX, Yang Y, Shen LM, Yan QG. Isolation and identification of *K. pneumoniae* in takin[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2015, 42(1): 203-208 (in Chinese)