

# 一株肉牛源致病肺炎克雷伯菌的分离鉴定\*

李嫣然<sup>1</sup>, 苟丽萍<sup>1</sup>, 任志华<sup>1</sup>, 马晓平<sup>1</sup>, 张欣怡<sup>2</sup>, 左之才<sup>1\*\*</sup>

(1. 四川农业大学 动物医学院, 动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 四川 温江 611130;

2. 西昌学院 动物科学学院, 四川 西昌 615000)

**摘要:**【目的】确定导致某牛场牛呼吸系统疾病并引起急性死亡的病原。【方法】采集病牛鼻液样品并从中分离出1株优势菌株, 进而对分离菌株进行形态鉴定、生化鉴定、16S rRNA 鉴定、小鼠接种试验以及耐药性分析。【结果】分离菌镜检为革兰氏阴性球杆菌; 除精氨酸双水解试验呈阳性外, 其他生化特性均与肺炎克雷伯菌相符合; 其16S rRNA 序列与 GenBank 中肺炎克雷伯菌株之间的同源性均达99%。因此, 可将分离菌确定为肺炎克雷伯菌, 并将其命名为7Y-1。在小鼠接种试验中, 用 $1.01 \times 10^8$  CFU/mL 菌液腹腔注射8只SPF级昆明鼠(0.2 mL/只), 16~36 h内小鼠全部(8/8)死亡。剖检见肺、肝、脾和肾等多个组织器官充血肿大, 肠道积气积液、部分肠段充血、肿胀; 组织学观察可见肺、肝、脾淤血、出血、肾小球肾炎变化; 药敏试验结果显示: 分离菌株对人医常用碳青霉烯类的亚胺培兰、美罗培兰、氨基糖苷类的阿米卡星以及磺胺类的磺胺异噁唑等抗生素耐药, 对兽医临床常用的头孢曲松、头孢西丁、头孢唑林、卡那霉素、庆大霉素和氟苯尼考等抗生素高度敏感。【结论】本试验从病牛分离到对小鼠强致死性的肺炎克雷伯菌株具有特殊耐药性, 表明该菌可能为引起该肉牛呼吸道感染发病, 甚至引起死亡的主要病菌或继发性感染菌, 应引起高度重视。

**关键词:** 肉牛; 肺炎克雷伯菌; 分离鉴定; 致病性; 病理组织学

中图分类号: S 852.61

文献标识码: A

文章编号: 1004-390X (2020) 01-0054-08

## Isolation and Identification of a Pathogenic *Klebsiella pneumoniae* Strain from Beef Cattle

LI Yanran<sup>1</sup>, GOU Liping<sup>1</sup>, REN Zhihua<sup>1</sup>, MA Xiaoping<sup>1</sup>, ZHANG Xinyi<sup>2</sup>, ZUO Zhicai<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Animal Diseases and Human Health of Sichuan Province, College of Veterinary Medicine,

Sichuan Agricultural University, Wenjiang 611130, China; 2. College of Animal Science,

Xichang University, Xichang 615000, China)

**Abstract:** [Purpose] To determine the pathogen causing respiratory diseases and acute death of cattle in a cattle farm. [Method] Samples of sick cows nasal fluid were collected and a dominant strain was isolated. The isolated strain was further identified by morphological identification, biochemical identification, 16S rRNA identification, mice inoculation test and drug resistance analysis. [Result] The isolated bacteria were gram negative coccobacteria under microscopic examination. Except that arginine double hydrolysis test showed positive, other biochemical characteristics were consistent with *Klebsiella pneumoniae*. The homology between 16S rRNA sequence and *K.*

收稿日期: 2019-02-16

修回日期: 2019-12-06

网络首发时间: 2020-01-15 10:37:17

\*基金项目: 四川省科技计划项目(2018NZ0002); 国家重点研发计划项目(2018YFD0501800); 国家现代农业产业技术体系四川肉牛创新团队项目(035Z2036)。

作者简介: 李嫣然(1998—), 女, 河南周口人, 在读本科生, 主要从事临床兽医学研究。

E-mail: 631629740@qq.com

\*\*通信作者 Corresponding author: 左之才(1974—), 男, 四川宜宾人, 博士, 教授, 主要从事草食家畜动物疾病、宠物疾病的防控技术研究。E-mail: zzcjl@126.com

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20200114.1800.001.html>



*pneumoniae* strain in GenBank is 99%. Therefore, the isolated bacteria can be identified as *K. pneumoniae* and named 7Y-1. In the mice inoculation test, eight SPF-KM mice (0.2 mL/mouse) were intraperitoneally injected with  $1.01 \times 10^8$  CFU/mL bacterial solution, the mice all (8/8) died within 16-36 h. Section examination of lung, liver, spleen, kidney and other tissues and organs congestion swelling, intestinal gas and fluid, part of intestinal congestion, swelling; histological observation showed lung, liver congestion, spleen congestion hemorrhage and glomerulonephritis changes; the drug sensitivity test results showed that the isolated strains were resistant to carbapenems, imipenem, meropenem, aminoglycoside amikacin and sulfamethoxazole, and were highly sensitive to antibiotics commonly used in veterinary clinic, such as ceftriaxone, cefoxitin, cefazolin, kanamycin, gentamicin and florfenicol. [Conclusion] *K. pneumoniae* was isolated from the infected cattle and was highly lethal to mice, and had special drug resistance, indicating that the bacteria might be the main bacteria or secondary infection bacteria that caused the respiratory infection of the beef cattle, or even death, which should be paid high attention to.

**Keywords:** beef cattle; *Klebsiella pneumoniae*; separation and identification; pathogenicity; histopathology

肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 属肠杆菌科 (Enterobacteriaceae) 克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*)<sup>[1]</sup>, 广泛存在于人和动物的消化道、呼吸道、肠道、泌尿生殖道以及水和土壤<sup>[2]</sup>。正常情况下, 本菌不会引起动物发病, 但当机体抵抗力下降或本菌大量增殖时<sup>[3]</sup>, 就会导致人和动物发生脑膜炎、肺炎、肠炎、子宫炎及其他化脓性炎症<sup>[4-5]</sup>, 甚至引发败血症<sup>[6]</sup>。近年来, 由肺炎克雷伯菌引起动物发病的报道有貂<sup>[7]</sup>、竹鼠<sup>[8]</sup>、兔<sup>[9]</sup>、猪<sup>[2]</sup>、牛<sup>[10]</sup>、扭角羚<sup>[11]</sup>和大熊猫<sup>[12]</sup>等。

随着肉牛产业的快速发展, 因异地育肥、运输应激等导致肺炎克雷伯菌感染, 引起肺炎和乳腺炎、甚至死亡的病例增多。有学者分别从上呼吸道、肺部感染, 甚至腹泻和患乳腺炎的病牛体内分离到肺炎克雷伯菌, 表明肺炎克雷伯菌感染引起动物发病的危害越来越严重<sup>[4,10,13-15]</sup>。本试验从呼吸道感染并引起死亡的病牛鼻液中分离到1株致病力较强的肺炎克雷伯菌, 经敏感药物治疗得到有效控制, 报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 被检材料

2018年8月, 四川省乐山市某牛场存栏300余头肉牛, 因新购入50余头牛后引起全场牛陆续发病约1周, 并有6头牛死亡。因此, 笔者受邀前往诊断, 新发病牛临床主要表现为体温高

达41℃, 流脓性鼻液、咳嗽、气喘、呼吸困难等症状; 初期发病牛按建议采用氟苯尼考治疗2d, 病情已得到有效控制, 不再有牛死亡。遂无菌采集新发病牛的鼻腔拭子, 进行细菌的分离培养。

#### 1.1.2 培养基

MH肉汤、营养肉汤、胰蛋白胍大豆肉汤(TSB)均购于青岛高科园海博生物技术有限公司; 琼脂粉购于上海伊卡生物技术有限公司。

#### 1.1.3 试剂

40%的甲醛溶液购于成都科隆化学制品有限公司; 常用微量生化管及药敏纸片均购于杭州微生物试剂有限公司; 2×Taq Master MIX及16S通用引物均购于上海生工生物工程股份有限公司。

#### 1.1.4 试验动物

12只4周龄18~20g健康SPF昆明系小白鼠(雌雄各半)购于成都达硕实验动物有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 病原的分离及纯培养

接种环蘸取样本划线于普通营养琼脂平板上, 放置于37℃恒温箱内12h。挑取单个菌落, 通过连续划线于培养基进一步纯化。观察菌落形态及生长情况, 并挑取单个菌落革兰氏染色镜检。

### 1.2.2 生化试验

将纯培养物进行葡萄糖、甘露醇、蔗糖、枸橼酸盐、乳糖、丙二酸盐、阿拉伯糖、棉籽糖、鼠李糖、侧金盏花醇、木糖、H<sub>2</sub>S、山梨醇、硝酸盐还原、七叶苷、精氨酸双水解酶和明胶等生

化试验，24 h 后观察试验结果并记录。结果判定参照生化管使用说明书和《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[16]</sup>。

1.2.3 16S rRNA 序列的测定及同源性分析

将已纯化的分离菌菌液直接经 PCR 扩增 16S rRNA，扩增所用的通用引物序列如下：

SgF: 5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3';  
SgR: 5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3'。

PCR 反应体系 (25 μL) 包括：2×*Taq* PCR MIX 12.5 μL，上下引物各 1 μL，ddH<sub>2</sub>O 8.5 μL，菌液 2 μL。反应条件：95 ℃ 5 min，95 ℃ 1 min，55 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s，40 个循环后 72 ℃ 延伸 7 min。PCR 产物经 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测，纯化回收目的片段并由上海生工生物工程股份有限公司测序。将其基因序列通过 NCBI 进行序列同源性分析，选取 GenBank 已公布的 14 株菌的 16S rRNA 基因序列构建系统发育树。

1.2.4 小鼠接种试验

取 8 只 SPF 级昆明小鼠腹腔注射菌液 0.2 mL/只 (1.01×10<sup>8</sup> CFU/mL)，另取 4 只腹腔注射等量生理盐水。观察记录小鼠临床表现与死亡情况。剖检死亡小鼠，观察病变脏器，并从心、肝、脾、肺、肾和脑组织分离细菌，同时取病变器官组织于 10% 中性福尔马林溶液中固定以便做病理组织切片染色观察。

1.2.5 药敏试验

采用纸片扩散法进行药敏试验。取菌液 100 μL 均匀涂布在 MH 琼脂培养基上，待菌液被完全吸收后，贴上药敏纸片，置于 37 ℃ 恒温培养箱培养 24 h 后测量不同药敏纸片的抑菌圈直径。依据 CLSI 2018 标准<sup>[17]</sup>对试验操作与结果进行判读。

2 结果与分析

2.1 细菌分离及形态观察、镜检结果

从鼻腔拭子分离得到 1 株革兰氏阴性、球杆状的优势菌株 7Y-1 (图 1)。在普通琼脂培养基上，分离菌生长为灰白色、圆形突起、边缘整齐、表面光滑的菌落 (图 2)，接种环挑之易拉成丝。

2.2 生化鉴定

生化试验结果 (表 1) 显示：分离株精氨酸双水解酶试验结果呈阳性，与肺炎克雷伯菌标准生化试验结果不同，其余生化特性均与肺炎克雷伯菌的生化特性一致。

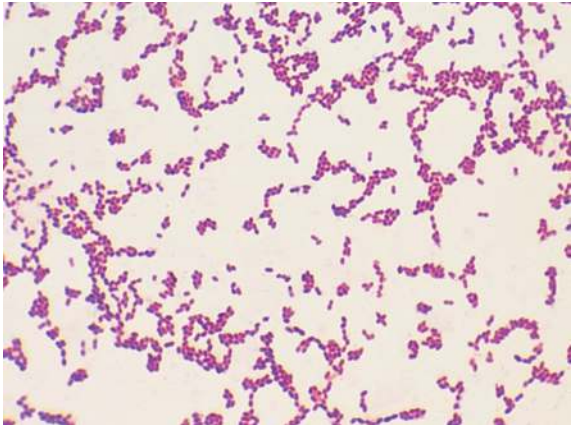


图 1 分离菌株革兰氏染色结果 (1 000×)

Fig. 1 Gram staining results of the isolated strain (1 000×)



图 2 分离菌株普通营养琼脂培养结果

Fig. 2 The result of isolated strain on the normal nutrient agar culture

表 1 分离株生化试验结果

Tab. 1 Biochemical test results of the isolate

| 底物<br>substrates | 结果<br>results | 底物<br>substrates                | 结果<br>results |
|------------------|---------------|---------------------------------|---------------|
| 葡萄糖 glucose      | +             | 甘露醇 mannitol                    | +             |
| 蔗糖 sucrose       | +             | 侧金盏花醇 adonitol                  | +             |
| 乳糖 lactose       | +             | 山梨醇 sorbitol                    | +             |
| 阿拉伯糖 arabinose   | +             | 明胶 gelatin                      | -             |
| 鼠李糖 rhamnose     | +             | H <sub>2</sub> S                | -             |
| 木糖 xylose        | +             | 七叶苷 esculoside                  | +             |
| 棉籽糖 raffinose    | +             | 硝酸盐还原<br>nitrate reduction      | +             |
| 枸橼酸盐 citrate     | +             | 精氨酸双水解酶<br>arginine dihydrolase | +             |
| 丙二酸盐 malonate    | +             |                                 |               |

注：“+”为阳性反应，“-”为阴性反应。

Note: “+” is positive and “-” is negative.

2.3 菌株的 16S rRNA 分子鉴定及同源性分析

16S rRNA 基因扩增结果显示：其 PCR 扩增产物约为 1 500 bp (图 3)，与预期目的片段大小

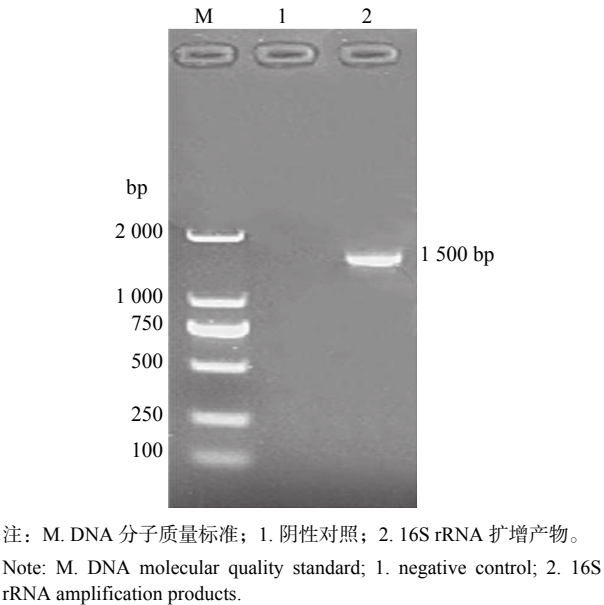


图 3 分离株 16S rRNA 序列 PCR 扩增

Fig. 3 Amplification of 16S rRNA from the isolate by PCR

一致。分离菌株 16S rRNA 基因测序结果经 BLAST 对比分析，结果显示与肺炎克雷伯菌的同源性为 99%。系统进化树显示：7Y-1 与来源于人类粪便的中国无锡株、北京株、污水处理厂活性污泥的中国大连株以及未公布来源的美国株、日本株聚为 1 个分支 (图 4、表 2)。

2.4 小鼠接种试验

小鼠腹腔注射 7Y-1 菌液 3 h 后，表现精神沉郁、被毛逆立、闭眼缩颈和扎堆畏寒。攻菌 12 h，小鼠眼睑周围产生黄色分泌物、并上下眼睑粘连，肛门处被毛粘有粪便，粪便黄软、粘连。16~36 h 内 8 只小鼠全部死亡。对照组小鼠无异常表现。剖解死亡小鼠可见肺、肝、肾充血肿大 (图 5a~c)，脾脏淤血肿大 (图 5d)，胆囊肿大，肠道积气积液、部分肠段充血、肿胀 (图 5e)；从病死小鼠的脑、脾、肝、肺、肾等组织中均可分离到与攻毒菌株 7Y-1 培养特性、革兰氏染色形态

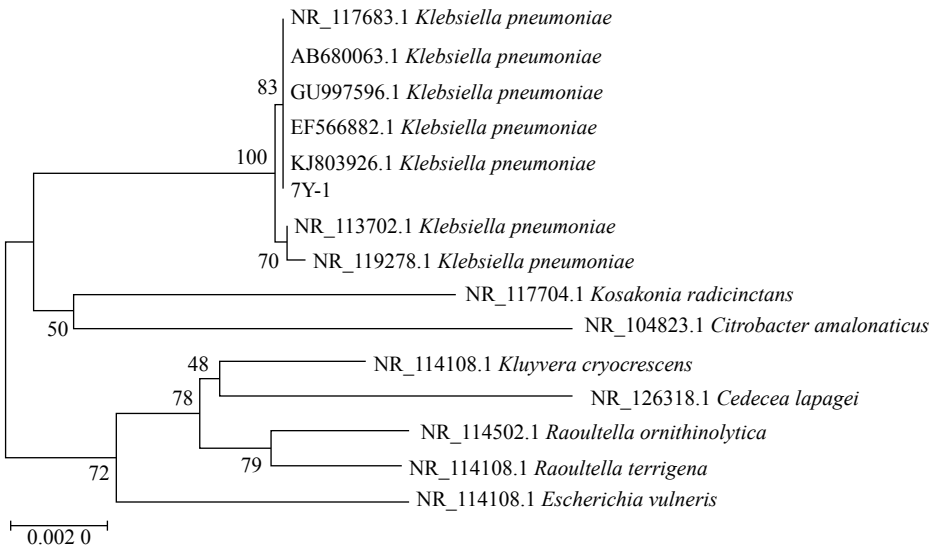


图 4 分离株的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of isolates

表 2 GenBank 中公布的参考菌株信息

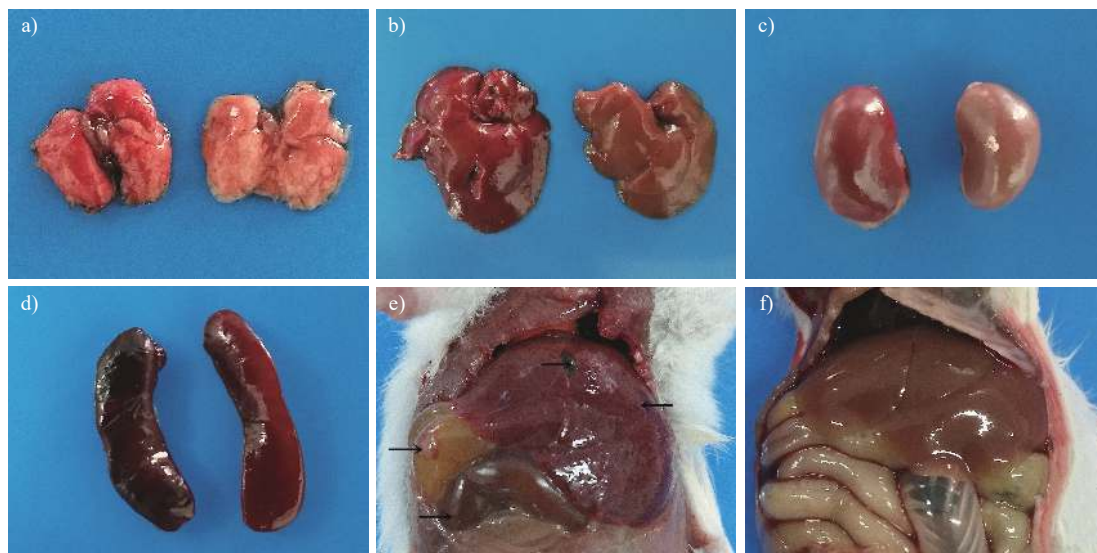
Tab. 2 Information of reference strains published in GenBank

| 菌株<br>strain | 来源<br>source                                             | 登录号<br>accession No. | 分离地<br>separated area | 分离时间<br>separated time |
|--------------|----------------------------------------------------------|----------------------|-----------------------|------------------------|
| DSM 30104    | 未知 unknown                                               | NR_117683.1          | 美国 America            | 2014                   |
| NBRC 3321    | 未知 unknown                                               | AB680063.1           | 日本 Japan              | 2011                   |
| SDM45        | 人类粪便 human feces                                         | GU997596.1           | 中国北京 Beijing, China   | 2010                   |
| —            | 污水处理厂活性污泥<br>activated sludge of sewage disposal factory | EF566882.1           | 中国大连 Dalian, China    | 2007                   |
| CCFM8369     | 人类粪便 human feces                                         | KJ803926.1           | 中国无锡 Wuxi, China      | 2014                   |

注：“—”表示登录号为 EF566882.1 的肺炎克雷伯菌无代号。

Note: “—” means the *K. pneumoniae* strain with accession No. EF566882.1, but without identification code.





注: a) 左为试验组小鼠肺脏, 表现为充血; 右为对照组小鼠肺脏, 无明显病变; b) 左为试验组小鼠肝脏, 表现为充血、肿大; 右为对照组小鼠肝脏, 无明显病变; c) 左为试验组小鼠肾脏, 表现为充血、肿大, 表面光滑潮红; 右为对照组小鼠肾脏, 无明显病变; d) 左为试验组小鼠脾脏, 表现为淤血肿大、颜色暗红; 右为对照组小鼠脾脏, 无明显病变; e) 试验组小鼠脏器官, 表现为肝脏充血肿大, 有大量出血点; 胆囊肿大; 肠壁菲薄、肠道积气积液、部分肠段充血、肿胀; f) 对照组小鼠脏器官组织, 肝脏、胆囊、肠道均未见异常变化。

Note: a) The lungs of mice in the experimental group are shown on the left, showing hyperemia; on the right is the lung of the control group without obvious lesion; b) On the left is the liver of mice in the experimental group, showing hyperemia and enlargement; on the right is the liver of the control group without obvious lesion; c) On the left is the kidney of the experimental group of mice, showing hyperemia, enlargement and smooth flush on the surface; the kidney of the control group showed no obvious lesion; d) On the left is the spleen of mice in the experimental group, presenting as congestion, swelling and dark red color; on the right is the spleen of the control group without obvious lesion; e) The viscera of mice in the experimental group showed hepatic hyperemia and enlargement, with a large number of bleeding points; gallbladder enlargement; intestinal wall thin, intestinal gas effusion, part of intestinal congestion, swelling; f) No abnormal changes were observed in the liver; gall bladder and intestinal tract of the mice in the control group.

图 5 病理剖检结果

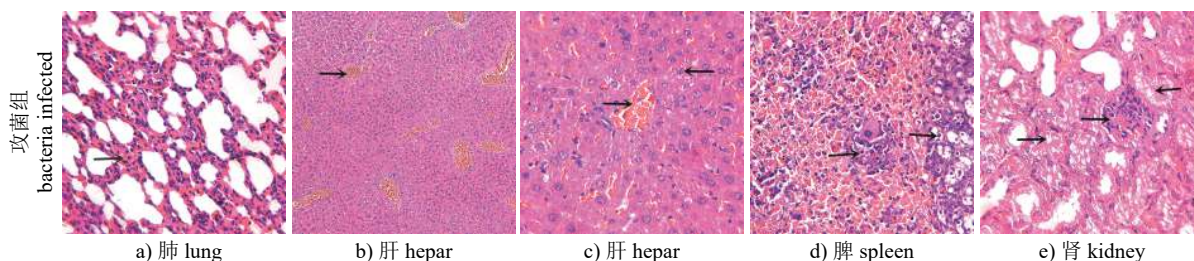
Fig. 5 The results of pathological examination

相同的细菌, 表明 7Y-1 对小鼠具有较强致病性, 可致小鼠包括脑在内的多种组织器官感染, 能透过血脑屏障引起脑膜炎。

## 2.5 病理学观察结果

攻菌死亡小鼠的各组织器官均表现出不同程度的淤血和出血。组织病理学变化有肺间质增

宽, 肺泡隔充血水肿 (图 6a)。肝中央静脉、肝窦淤血, 肝小叶消失 (图 6b); 肝索肿大、排列紊乱, 肝细胞水泡变性 (图 6c)。脾脏淤血、出血, 脾髓内充满大量红细胞, 淋巴细胞呈岛屿状分布; 脾实质细胞大量变性、坏死, 出现空泡 (图 6d)。肾脏表现为肾小球肾炎, 可见肾小球增大、



注: a) 肺泡隔充血水肿 (H.E., 400×); b) 肝脏淤血; 肝小叶消失 (H.E., 200×); c) 肝索肿大, 排列紊乱。肝细胞水肿、水泡变性 (H.E., 400×); d) 脾脏淤血, 出血。实质细胞变性坏死 (H.E., 400×); e) 肾小球体积增大, 肾小囊狭窄。肾小管上皮细胞水泡变性, 管内见蛋白样物质渗出 (H.E., 400×)。

Note: a) Alveolar septal hyperemia edema (H.E., 400×); b) Liver congestion; lobular loss (H.E., 200×); c) The hepatic cords are enlarged and disordered. Hepatocyte edema and vesicular degeneration (H.E., 400×); d) Spleen congestion and bleeding. Parenchymal cell degeneration and necrosis (H.E., 400×); e) Glomerular volume increased and renal capsule stenosis. The renal tubular epithelial cells have vesicular degeneration, and exudative proteinoid material is seen in the renal tubules (H.E., 400×).

图 6 病理组织学观察结果

Fig. 6 The results of histopathological examination

肾小囊狭窄，肾小管上皮细胞水泡变性、肾小管内蛋白质渗出(图 6e)。

2.6 药敏试验

由表 3 可知：分离菌株 7Y-1 对头孢曲松、头孢吡肟、头孢西丁、头孢唑林、头孢哌酮/舒巴

坦、四环素、米诺环素、卡那霉素、庆大霉素、氟苯尼考、诺氟沙星和哌拉西林等抗生素高度敏感；对亚胺培南、美罗培南、丁胺卡那、氯霉素、多粘菌素 B 和磺胺异噁唑多种抗生素耐药。

表 3 分离菌株药敏试验结果  
Tab. 3 Drug susceptibility test results of isolated strains

|                          | 药物<br>drug                      | 抑菌圈直径判断标准 <sup>[17]</sup> /mm<br>criteria for judging the diameter of bacteriostatic circle |       |     | 抑菌圈直径/mm<br>inhibition zone diameter | 敏感性<br>susceptibility |
|--------------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-----|--------------------------------------|-----------------------|
|                          |                                 | R                                                                                           | I     | S   |                                      |                       |
| 碳青霉烯类<br>Carbapenems     | 亚胺培南 Imipenem                   | ≤19                                                                                         | 20~22 | ≥23 | 19                                   | R                     |
|                          | 美罗培南 Meropenem                  | ≤19                                                                                         | 20~22 | ≥23 | 14                                   | R                     |
| 头孢类<br>Cephalosporins    | 头孢曲松 Ceftriaxone                | ≤20                                                                                         | 20~22 | ≥22 | 28                                   | S                     |
|                          | 头孢吡肟 Cefepime                   | ≤19                                                                                         | 19~24 | ≥24 | 24                                   | S                     |
|                          | 头孢西丁 Cefoxitin                  | ≤14                                                                                         | 15~17 | ≥18 | 28                                   | S                     |
|                          | 头孢唑林 Cefazolin                  | ≤19                                                                                         | 19~23 | ≥23 | 24                                   | S                     |
|                          | 头孢哌酮 Cefoperazone/舒巴坦 Sulbactam | ≤15                                                                                         | 16~20 | ≥21 | 24                                   | S                     |
|                          | 链霉素 Streptomycin                | ≤11                                                                                         | 12~14 | ≥15 | 14                                   | I                     |
| 氨基糖苷类<br>Aminoglycosides | 卡那霉素 Kanamycin                  | ≤13                                                                                         | 14~17 | ≥18 | 20                                   | S                     |
|                          | 丁胺卡那 Amikacin                   | ≤14                                                                                         | 15~16 | ≥17 | 13                                   | R                     |
|                          | 庆大霉素 Gentamicin                 | ≤12                                                                                         | 13~14 | ≥15 | 17                                   | S                     |
| 四环素类<br>Tetracyclines    | 四环素 Tetracycline                | ≤11                                                                                         | 12~14 | ≥15 | 20                                   | S                     |
|                          | 米诺环素 Minocycline                | ≤12                                                                                         | 13~15 | ≥16 | 17                                   | S                     |
| 酰胺醇类<br>Amphenicols      | 氯霉素 Chloramphenicol             | ≤12                                                                                         | 13~17 | ≥18 | 0                                    | R                     |
|                          | 氟苯尼考 Florfenicol                | ≤12                                                                                         | 13~17 | ≥18 | 21                                   | S                     |
| 喹诺酮类<br>Quinolones       | 环丙沙星 Ciprofloxacin              | ≤15                                                                                         | 16~20 | ≥21 | 20                                   | I                     |
|                          | 诺氟沙星 Norfloxacin                | ≤12                                                                                         | 13~16 | ≥17 | 23                                   | S                     |
| 多肽类 Polypeptide          | 多黏菌素 B Polymyxin B              | ≤11                                                                                         | —     | ≥12 | 11                                   | R                     |
| 青霉素类 Penicillins         | 哌拉西林 Piperacillin               | ≤17                                                                                         | 18~20 | ≥21 | 22                                   | S                     |
| 磺胺类<br>Sulfonamides      | 磺胺异噁唑 Sulfisoxazole             | ≤12                                                                                         | 13~16 | ≥17 | 0                                    | R                     |

注：“S”表示高度敏感；“I”表示中度敏感；“R”表示耐药。  
Note: “S” means highly sensitive; “I” means moderate sensitivity; “R” means resistance.

3 讨论

肺炎克雷伯菌被认为是条件致病菌<sup>[18]</sup>，可引起牛重症肺炎、败血症、脑膜炎和乳腺炎等疾病，具有较高的发病率和死亡率<sup>[19]</sup>。由于该菌易与其他病毒、细菌发生混合感染，导致疾病的严重性，且该菌具有严重的耐药性，从而给本病的治疗加大了难度，给养殖行业带来巨大的经济损失，已引起全世界关注<sup>[20]</sup>。养殖户从异地买回架子肉牛 3 d 后，引起全群牛发生以精神食欲废绝，体温升高达 41 ℃，以及呼吸道症状(呼吸急促、流脓鼻涕、咳嗽)为主症的疾病，采用青霉素和链霉素治疗无效，并已有 6 头牛死亡。于

是，笔者应邀前往诊断，查找该牛群发病原因。到场时发现，发病牛按照建议改用氟苯尼考进行治疗后，除个别病牛精神稍差、呼吸较快外，多数病牛病情得到有效控制，不再有牛只死亡；但有零星新发病牛，症状与之前发病牛类似。遂采集新发生呼吸道疾病的病牛鼻腔拭子，并从中分离到 1 株致病力较强的肺炎克雷伯菌。后经采用紧急处理措施，加强牛场消毒、饲养管理工作，对发病牛继续采用氟苯尼考(7Y-1 高度敏感)治疗，1 周后回访全场疾病得以完全控制。此次从发生呼吸道疾病肉牛鼻腔拭子分离到的优势致病菌株为肺炎克雷伯菌，分析其原因与外地购买肉牛并长途运输应激，以及运回后几日当地连

续下雨,圈舍潮湿闷热等因素,致机体抵抗力下降发生感染有关。而牛场本身原因则认为是发病牛需要大量人力去治疗而疏于卫生、清洁管理,以及未有单独的隔离舍而感染所致。

试验中分离菌 7Y-1 能引起小鼠较以往报道肺炎克雷伯菌致小鼠器官发生更多、更为广泛的病变。据报道,猪源肺炎克雷伯菌可引起小鼠肝脏、脾脏和肺脏病变<sup>[21]</sup>;扭角羚源肺炎克雷伯菌引起肺脏和脾脏病变<sup>[11]</sup>;肉牛上呼吸道肺炎克雷伯菌引起肺脏、肝脏和肠道病变<sup>[10]</sup>。分离菌 7Y-1 攻小鼠 12 h 后,引起眼的黄色分泌物增多、甚至引起上下眼睑粘连,粪便黄软、有黏液;8 只小鼠在攻菌后 16~36 h 内全部死亡,死亡小鼠的肺、肝、脾和肾等实质器官均出现肿大、出血,肠道积气、积液和出血等病变;并且从死亡鼠的肺、肝、脾、肾和脑等多个脏器分离出与分离菌 7Y-1 一致的肺炎克雷伯菌。由此可见,分离菌 7Y-1 对机体组织器官的侵袭力强,且可透过血脑屏障,具有强致病性,但其致病机制尚不清楚,有待深入研究。

分离菌 7Y-1 的部分生化特性发生了改变,其精氨酸双水解试验结果呈阳性,与徐丽等<sup>[22]</sup>报道猪源肺炎克雷伯菌生化结果一致,不同于以往呈阴性的报道<sup>[23-25]</sup>。利用 16S rRNA 基因序列同源性分析发现:7Y-1 与来源于人类粪便、污水处理厂活性污泥等的肺炎克雷伯菌同源性最高;同时,其耐药性也很特殊,对人医常用的碳青霉烯类的亚胺培兰、美罗培兰以及氨基糖苷类的阿米卡星、磺胺类的磺胺异噁唑等抗生素耐药,而对兽医临床常用的药物如头孢曲松、头孢西丁、头孢唑林、卡那霉素、庆大霉素和氟苯尼考等抗生素高度敏感。这与该菌可能受宿主(人、畜)、环境等因素影响发生变异而具有较强的环境适应力和致病性有关。

本次从病牛鼻拭子分离得到的肺炎克雷伯菌株不仅在生化特性上发生了改变,其致病性与耐药性也与以往存在一些差异,发生上述变化的原因及其机制值得进一步研究,应高度重视。尽管该牛场采用敏感药物治疗有效控制了病情,但在肉牛养殖过程中,特别是对于新进牛群应注意隔离观察,养殖场应进行定期消毒处理,并控制无关人员的出入,以防止肺炎克雷伯菌的感染,降低养殖风险。

#### [参考文献]

- [1] 谭爱萍,邓玉婷,姜兰,等.一株多重耐药鳃源肺炎克雷伯菌的分离鉴定[J].水生生物学报,2013,37(4): 744. DOI: 10.7541/2013.89.
- [2] 侯相山,王洪水.猪肺炎克雷伯氏菌感染的诊断与防治[J].中国兽医杂志,2007,43(7): 74. DOI: 10.3969/j.issn.0529-6005.2007.07.043.
- [3] 杨锐,文继锋,龚永平,等.小熊猫感染肺炎克雷伯菌的检查及药敏试验[J].中国人兽共患病学报,2017,33(3): 271. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2017.03.015.
- [4] 冯娜,高翔,肖敏,等.牛源肺炎克雷伯菌的分离鉴定及遗传进化分析[J].中国兽医科学,2016,46(11): 1358. DOI: 10.16656/j.issn.1673-4696.2016.11.003.
- [5] HUANG Y J, WU C C, CHEN M C, et al. Characterization of the type 3 fimbriae with different MrkD adhesins: possible role of the MrkD containing an RGD motif[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, 350(3): 537. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.09.070.
- [6] STAHLHUT S G, TCHESNOKOVA V, STRUVE C, et al. Comparative structure-function analysis of mannose-specific FimH adhesins from *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*[J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(21): 6592. DOI: 10.1128/JB.00786-09.
- [7] 韩坤,白雪,闫喜军,等.貂源肺炎克雷伯氏菌的分离及毒力和耐药性的分析[J].中国兽医科学,2018,48(8): 1019. DOI: 10.16656/j.issn.1673-4696.2018.0144.
- [8] 马磊,颜其贵,万莉,等.竹鼠肺炎克雷伯菌的分离鉴定[J].中国人兽共患病学报,2011,27(9): 825. DOI: 10.3969/j.issn.1002-2694.2011.09.014.
- [9] 王孝友,王永康,杨睿,等.兔肺炎克雷伯氏菌的分离与鉴定[J].中国兽医杂志,2012,48(2): 43. DOI: 10.3969/j.issn.1005-6327.2011.04.003.
- [10] 林雅,韩冠双,郭建华,等.肉牛上呼吸道肺炎克雷伯菌的分离鉴定及耐药分析[J].中国兽医学报,2015,35(11): 1777. DOI: 10.16303/j.cnki.1005-4545.2015.11.10.
- [11] 郝中香,廖红,刘丹,等.扭角羚肺炎克雷伯菌的分离鉴定[J].中国畜牧兽医,2015,42(1): 203. DOI: 10.16431/j.cnki.1671-7236.2015.01.032.
- [12] 王强,江华,中尾建子,等.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. DOI: 10.3969/j.issn.1000-7083.1998.01.011.
- [13] 蒙正群,冷依伊,任梅滢,等.一株牛源肺炎克雷伯菌的分离鉴定与耐药基因型检测[J].浙江农业学报,2017,29(4): 534. DOI: 10.3969/j.issn.1004-1524.2017.04.03.
- [14] MUNOZ M A, AHLSTRÖM C, RAUCH B J, et al. Fecal shedding of *Klebsiella pneumoniae* by dairy cows[J]. Journal of Dairy Science, 2006, 89(9): 3425. DOI: 10.3168/jds.s0022-0302(06)72379-7.
- [15] 贺番,贺瑜,孟宁生,等.奶牛乳房炎克雷伯氏菌的分离鉴定[J].畜牧兽医科技信息,2015(11): 19. DOI: 10.3969/JISSN.1671-6027.2015.11.009.
- [16] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001.
- [17] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[M]. 28th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.



- [18] STRUVE C, KROGFELT K A. Pathogenic potential of environmental *Klebsiella pneumoniae* isolates[J]. Environmental Microbiology, 2004, 6(6): 584. DOI: [10.1111/j.1462-2920.2004.00590.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00590.x).
- [19] 许惠. 肉牛肺炎克雷伯菌病的诊治报告[J]. 中国奶牛, 2012(14): 42. DOI: [10.3969/j.issn.1004-4264.2012.14.018](https://doi.org/10.3969/j.issn.1004-4264.2012.14.018).
- [20] 刘保光, 贺志沛, 吴华, 等. 兽医临床肺炎克雷伯菌的流行现状及防治措施研究[J]. 农业灾害研究, 2013, 3(8): 32. DOI: [10.19383/j.cnki.nyzhyj.2013.08.012](https://doi.org/10.19383/j.cnki.nyzhyj.2013.08.012).
- [21] 林星宇, 王印, 杨泽晓, 等. 猪源肺炎克雷伯菌的分离鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2015, 37(5): 375. DOI: [10.3969/j.issn.1008-0589.2015.05.12](https://doi.org/10.3969/j.issn.1008-0589.2015.05.12).
- [22] 徐丽, 温贵兰, 张升波, 等. 一株猪源肺炎克雷伯杆菌的分离与鉴定[J]. 中国兽医科学, 2018, 48(9): 1109. DOI: [10.16656/j.issn.1673-4696.2018.0168](https://doi.org/10.16656/j.issn.1673-4696.2018.0168).
- [23] 徐海圣, 舒妙安. 中华鳖肺炎克雷伯氏菌病的病原研究[J]. 浙江大学学报(理学版), 2002, 29(6): 702. DOI: [10.3321/j.issn:1008-9497.2002.06.019](https://doi.org/10.3321/j.issn:1008-9497.2002.06.019).
- [24] 司振书, 张海涛, 邵丹, 等. 肉杂鸡肺炎克雷伯菌耐药菌株的分离鉴定[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(8): 152. DOI: [10.15889/j.issn.1002-1302.2017.08.042](https://doi.org/10.15889/j.issn.1002-1302.2017.08.042).
- [25] 李巧玲, 肖丽荣, 张文举, 等. 蓝狐源肺炎克雷伯菌的鉴定与药敏试验[J]. 畜牧与兽医, 2018, 50(3): 103.

责任编辑: 何馨成

(上接第 19 页)

- [15] WIJKAMP I, GOLDBACH R, PETERS D. Propagation of *Tomato spotted wilt virus* in *Frankliniella occidentalis* does neither result in pathological effects nor in transovarial passage of the virus[J]. Entomologia Experimentalis et Applicata, 1996, 81(3): 285. DOI: [10.1046/j.1570-7458.1996.00098.x](https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.1996.00098.x).
- [16] DE ASSIS FILHO F M, DEOM C M, SHERWOOD J L. Acquisition of *Tomato spotted wilt virus* by adults of two *Thrips* species[J]. Phytopathology, 2004, 94(4): 333. DOI: [10.1094/phyto.2004.94.4.333](https://doi.org/10.1094/phyto.2004.94.4.333).
- [17] ULLMAN D E, WESTCOT D M, HUNTER W B, et al. *Tomato spotted wilt virus* and one thrips vector: *Frankliniella occidentalis* (Pergande) internal morphology and virus location[J]. ARS-US Department of Agriculture, Agricultural Research Service (USA), 1992(87): 127.
- [18] ULLMAN D E. A midgut barrier to *Tomato spotted wilt virus* acquisition by adult Western flower Thrips[J]. Phytopathology, 1992, 82(11): 1333. DOI: [10.1094/phyto-82-1333](https://doi.org/10.1094/phyto-82-1333).
- [19] MONTERO ASTÚA M. Unveiling and blocking the interaction between *Tomato spotted wilt virus* and its insect vector, *Frankliniella occidentalis*[D]. Manhattan: Kansas State University, 2012.

责任编辑: 何承刚