



# 大熊猫源肺炎克雷伯菌耐药性和分子分型研究

燕霞<sup>1,2#</sup>, 杨梅<sup>1#</sup>, 李林<sup>1</sup>, 张东升<sup>1</sup>, 苏菲<sup>3</sup>, 李运莉<sup>1</sup>, 侯蓉<sup>1</sup>, 岳婵娟<sup>1</sup>, 刘颂蕊<sup>1\*</sup>, 苏小艳<sup>1\*</sup>

- 1 四川省大熊猫科学研究院, 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
- 2 四川农业大学动物医学院, 四川 成都 610081
- 3 浙江省农业科学院畜牧兽医研究所, 浙江 杭州 310021

燕霞, 杨梅, 李林, 张东升, 苏菲, 李运莉, 侯蓉, 岳婵娟, 刘颂蕊, 苏小艳. 大熊猫源肺炎克雷伯菌耐药性和分子分型研究. 微生物学报, 2022, 62(3): 1061–1072.

Yan Xia, Yang Mei, Li Lin, Zhang Dongsheng, Su Fei, Li Yunli, Hou Rong, Yue Chanjuan, Liu Songrui, Su Xiaoyan. Drug resistance and molecular typing of *Klebsiella pneumoniae* isolated from giant panda. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(3): 1061–1072.

**摘要:**【目的】对大熊猫源肺炎克雷伯菌进行耐药性及分子分型分析, 掌握肺炎克雷伯菌在大熊猫圈养种群中的耐药和流行情况, 指导临床用药。【方法】对 2018–2019 年收集到的 178 株大熊猫源肺炎克雷伯菌使用纸片扩散法(K-B 法)分析耐药表型, 使用 Wafergen Smartchip 超高通量荧光定量 PCR 法分析其耐药基因和可移动遗传元件, 使用多位点序列分型(MLST)法分析其序列类型(ST)。【结果】178 株大熊猫源肺炎克雷伯菌对多西环素耐药率最高(15.2%), 而且 2019 年分离到的肺炎克雷伯菌对头孢噻肟、亚胺培南和阿奇霉素的耐药性显著高于 2018 年( $P < 0.05$ ); 检出耐药基因 106 种(106/227), 可移动遗传元件 11 种(11/19), 涉及的耐药机制主要为外排泵(42.0%)、抗生素失活(41.8%)和改变作用靶位(16.2%); MLST 分型显示大熊猫源肺炎克雷伯菌主要分为 42 个不同的 ST 型, 且 ST 型与耐药性具有一定的相关性。【结论】从 2018 年到 2019 年大熊猫源肺炎克雷伯菌对  $\beta$ -内酰胺类和大环内酯类抗生素耐药率有所增加, 耐药机制以外排泵和抗生素失活为主。ST17、ST23 和 ST4007 可能是大熊猫源肺炎克雷伯菌的优势型。在大熊猫临床诊疗中, 应注

**基金项目:** 四川省科技计划(面上)(2018JY0363); 成都大熊猫繁育研究基金会项目(CPF2017-18)

Supported by the Science and Technology Planning Project of Sichuan Province (general) (2018JY0363) and by the Project of Chengdu Giant Panda Breeding Research Foundation (CPF2017-18)

<sup>#</sup>Those authors contributed equally to this work.

\*Corresponding authors. E-mail: SU Xiaoyan, suxiaoyan123456@sina.com; LIU Songrui, srui\_liu@163.com

Received: 5 July 2021; Revised: 18 September 2021; Published online: 30 September 2021

意抗生素的合理规范使用,以防耐药性进一步增加。

**关键词:** 大熊猫;肺炎克雷伯菌;耐药性;耐药机制;ST分型

## Drug resistance and molecular typing of *Klebsiella pneumoniae* isolated from giant panda

YAN Xia<sup>1,2#</sup>, YANG Mei<sup>1#</sup>, LI Lin<sup>1</sup>, ZHANG Dongsheng<sup>1</sup>, SU Fei<sup>3</sup>, LI Yunli<sup>1</sup>, HOU Rong<sup>1</sup>, YUE Chanjuan<sup>1</sup>, LIU Songrui<sup>1\*</sup>, SU Xiaoyan<sup>1\*</sup>

1 Sichuan Key Laboratory of Conservation Biology on Endangered Wildlife, Chengdu Research Base of Giant Panda Breeding, Sichuan Academy of Giant Panda, Chengdu 610081, Sichuan, China

2 College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 610081, Sichuan, China

3 Institute of Animal Husbandry and Veterinary Science, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, Zhejiang, China

**Abstract:** [Objective] This study aims to analyze the drug resistance and molecular types of *Klebsiella pneumoniae* isolated from giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*), which is expected to clarify the drug resistance and prevalence of *K. pneumoniae* in the captive population of giant panda and to guide clinical drug use. [Methods] For the 178 *K. pneumoniae* strains of giant panda collected from 2018 to 2019, the drug resistance phenotypes were analyzed with the Kirby-Bauer (K-B) disk diffusion method, drug resistance genes and mobile genetic elements by Wafergen Smartchip high-throughput fluorescent quantitative PCR, and sequence types (STs) by multi-locus sequence typing (MLST). [Results] The 178 strains had the highest resistance rate to doxycycline (15.2%) and the resistance to cefotaxime, imipenem, and azithromycin was significantly higher in strains isolated in 2019 than in 2018 ( $P < 0.05$ ). A total of 106 drug resistance genes (106/227) and 11 mobile genetic elements (11/19) were detected. The resistance mechanisms were mainly efflux pumps (42.0%), antibiotic inactivation (41.8%), and altered target sites of action (16.2%). MLST classified the strains into 42 STs, and ST was correlated with drug resistance. [Conclusion] The resistance rate of *K. pneumoniae* strains from giant panda to  $\beta$ -lactam and macrolide antibiotics increased from 2018 to 2019. The drug resistance mechanisms of the strains were mainly efflux pumps and antibiotic inactivation. ST17, ST23 and ST4007 may be the dominant types. In the clinical treatment of giant pandas, antibiotics should be rationally used to prevent further enhancement of drug resistance.

**Keywords:** giant panda; *Klebsiella pneumoniae*; drug resistance; drug resistance mechanism; sequence type (ST)

肺炎克雷伯杆菌(*Klebsiella pneumoniae*, KP)属于肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*),为革兰氏阴性杆菌,广泛分布于人和动物肠道以及自然环境中<sup>[1]</sup>。KP可感染人类<sup>[2]</sup>、家畜禽(猪<sup>[3]</sup>、牛<sup>[4]</sup>、鸡<sup>[5]</sup>等)及野生动物(水貂<sup>[6]</sup>、穿山甲<sup>[7]</sup>、小熊

猫<sup>[8]</sup>、东非黑白疣猴<sup>[9]</sup>等)的呼吸系统、消化系统、泌尿系统及血液循环系统而引起疾病,是一种常见的人兽共患病原菌。由于广谱抗生素的广泛使用及滥用,临床上出现了越来越多的耐药肺炎克雷伯菌株,且在该菌中发现了多个

新的耐药基因和基因亚型<sup>[10-11]</sup>。2019年《全国细菌耐药监测报告》中指出,肺炎克雷伯菌的耐药菌株数量在革兰氏阴性耐药菌中位居第二,且对第三代头孢菌素的耐药率为31.9%,而耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌比例从2015年的7.6%上升至2019年的10.9% (<http://www.carss.cn/>),说明肺炎克雷伯菌的耐药性正在逐渐加剧。肺炎克雷伯菌的耐抗生素基因(antibiotic resistance genes, ARGs)可通过质粒等可移动遗传元件(mobile genetic elements, MGEs)在肺炎克雷伯菌等肠杆菌科细菌及其他细菌间广泛传播,从而促进细菌多重耐药甚至泛耐药表型的形成<sup>[12]</sup>。多重耐药肺炎克雷伯菌的形成使得临床有效治疗药物十分有限,且严重威胁动物和人类健康。

大熊猫是中国国宝以及世界野生生物保护旗舰物种,2019年全球圈养大熊猫数量达到600只<sup>[13]</sup>。研究表明,肺炎克雷伯菌可引起大熊猫出血性肠炎、血尿、败血症等多种疾病<sup>[14-17]</sup>。然而,目前对于大熊猫源肺炎克雷伯菌耐药性和分子流行病学研究还较少。为此,本研究拟对从大熊猫粪便分离到的178株肺炎克雷伯菌进行耐药性和分子分型研究,旨在探明大熊猫源肺炎克雷伯菌的耐药性和流行情况,为大熊猫源肺炎克雷伯菌的临床防治以及合理制定抗生素的使用方案提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株来源

178株肺炎克雷伯菌分离自某基地圈养大熊猫的新鲜粪便,其中2018年91株,2019年87株,大肠杆菌标准菌株ATCC25922由本实验室保存。

### 1.2 菌株的种属鉴定

在无菌条件下,将178株菌株接种于麦康

凯肌醇阿东醇羧苄青霉素琼脂(MIAC)培养基进行纯化复苏,37℃过夜培养后观察菌落形态特征。参照苏小艳等<sup>[18]</sup>的方法对178株肺炎克雷伯菌采用革兰氏染色、生化鉴定和16S rRNA基因测序方法再次进行种属鉴定。

### 1.3 细菌基因组DNA的提取

将菌株接种于BHI肉汤,取对数生长期新鲜菌液,参照TIANGEN<sup>®</sup>细菌基因组DNA提取试剂盒说明书提取肺炎克雷伯菌DNA。DNA质量和浓度用NanoDrop-ONE进行检测,并将其存于-80℃待用。

### 1.4 16S rRNA 基因序列分析

采用细菌通用引物PCR扩增细菌的16S rRNA基因,扩增产物大小为1500 bp,引物序列为:27F: 5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3'; 1492R: 5'-TACCTTGTTACGACTT-3'。PCR产物由生工生物工程(上海)股份有限公司测序后在NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中比对,确定分离菌株的种属。从GenBank中选取4株肺炎克雷伯菌、5株肠杆菌科不同属细菌的16S rRNA基因序列和分离菌株的16S rRNA基因序列,使用MEGA7.0软件,采用Neighbor-joining法绘制16S rRNA基因的系统发育树,分析其亲缘性。

### 1.5 K-B 法检测耐药表型

在无菌条件下,将实验菌株和ATCC25922标准质控菌株接种BHI固体培养基37℃恒温培养16-18 h,挑取单菌落接种于BHI肉汤,37℃振荡培养16-18 h,采用麦氏比浊法调节菌液浓度为 $1.5 \times 10^8$  CFU/mL。用无菌棉签蘸取菌液,均匀涂布于MH平板表面,室温干燥3-5 min,用无菌镊子将药敏纸片紧贴于培养基表面,不同药敏纸片间距不低于24 mm,各纸片中心相距不少于15 mm。将平板置于37℃恒温培养18-24 h后,用游标卡尺测量抑

菌圈直径。结果判定：药敏试验以大肠埃希氏菌 ATCC25922 做参照，根据美国临床和实验室标准委员会(CLSI) 2020 年检验标准，将判定结果分为敏感(S)、中介(I)和耐药(R)。

### 1.6 超高通量荧光定量 PCR 检测耐药基因及可移动元件

采用 Wafergen Smartchip 超高通量荧光定量 PCR (HT-qPCR)技术检测实验菌株的耐药基因(227 种)和转座子和整合子等可移动遗传元件(19 种)。此部分检测由湖南大地同年生物科技有限公司完成。

### 1.7 多位点序列分型(MLST)

用细菌基因组 DNA 作为模板，采用 PCR 技术扩增肺炎克雷伯菌 7 个管家基因(引物序列见表 1)，PCR 反应体系同 16S rRNA 基因序列分析。扩增条件为：94 °C 2 min；94 °C 30 s，50 °C 1 min，72 °C 30 s，35 个循环；72 °C 5 min。取 6 μL 扩增产物，在 1%琼脂糖凝胶中恒压 110 V 下电泳 30 min，置于凝胶成像系统观察 PCR 扩增结果并拍照记录。将 PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序，将测

序结果提交 MLST 网站(<https://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>)进行序列比对得到对应的 ST 型，运用 MEGA 7.0 软件采用 Neiber-joining 法构建系统发育树进行亲缘性分析。结合菌株的耐药表型分析耐药表型与 ST 型之间的关系。

## 2 结果与分析

### 2.1 大熊猫源肺炎克雷伯菌菌株的分离和鉴定结果

#### 2.1.1 大熊猫源肺炎克雷伯菌的革兰氏染色及生化鉴定结果

实验菌株在 MIAC 培养基上呈圆润凸起，中间粉白边缘红色的黏性菌落，用接种环挑取易拉成丝；革兰氏染色阴性，菌体呈卵圆形或球杆状，单个或成双排列；生化鉴定结果显示：所有菌株麦芽糖、蕈糖、蔗糖、甘露醇、柠檬酸盐、尿素、葡萄糖、乳糖、丙二酸盐、赖氨酸脱羧酶及 V-P 试验阳性，硫化氢及吲哚试验阴性，符合肺炎克雷伯菌的形态和生化特征。

表 1 肺炎克雷伯菌 7 个管家基因的引物序列

Table 1 Seven housekeeping genes' primer sequences of *Klebsiella pneumoniae*

Target genes	Primer sequences (5'→3')	Amplicon size/bp
<i>rpoB</i>	F: GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAGGCGAAATGGCWGAGAACCA R: TTGTGAGCGGATAACAATTTTCGAGTCTTCGAAGTTGTAACC	1 075
<i>gapA</i>	F: GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTATGAAATATGACTCCACTCACGG R: TTGTGAGCGGATAACAATTTCCCTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT	662
<i>mdh</i>	F: GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTACCCAACCTCGCTTCAGTTTCAG R: TTGTGAGCGGATAACAATTTCCCGTTTTTCCCCAGCAGCAG	756
<i>pgi</i>	F: GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAGAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC R: TTGTGAGCGGATAACAATTTCCGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT	566
<i>phoE</i>	F: GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG R: TTGTGAGCGGATAACAATTTCTGATCAGAAGCTGGTAGGTGAT	602
<i>infB</i>	F: GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTACTCGCTGCTGGACTATATTCG R: TTGTGAGCGGATAACAATTTCCGCTTTCAGCTCAAGAACTTC	462
<i>tonB</i>	F: GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTACTTTTATACCTCGGTACATCAGGTT R: TTGTGAGCGGATAACAATTTTCATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG	539

### 2.1.2 大熊猫源肺炎克雷伯菌的 16S rRNA 鉴定及系统发育树构建结果

通过 PCR 扩增细菌 16S rRNA 基因, 琼脂糖凝胶电泳检测结果显示, 在 1 500 bp 大小处出现条带(图 1), 将该产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序后在 NCBI 上进行 BLAST 分析, 178 株实验菌株与肺炎克雷伯菌的序列同源性均>99%。使用 MEGA 7.0 软件对实验菌株的 16S rRNA 基因序列进行进化树分析, 结果表明, 实验菌株与肺炎克雷伯菌(AB641121.1、AB642256.1、MT860295.1 及 NR036794.1)聚为一簇, 说明 178 株菌均与肺炎克雷伯菌亲缘性最高(图 2), 结合菌落生长特征及生化鉴定结果表明 178 株菌均为肺炎克雷伯菌。

### 2.2 大熊猫源肺炎克雷伯菌对抗生素的耐药情况

K-B 法检测细菌耐药性结果表明, 实验菌株对多西环素耐药率最高(15.2%), 对其他抗生素的耐药率较低(均低于 10%)。与 2018 年相比, 2019 年分离的肺炎克雷伯菌对头孢噻肟、亚胺培南和阿奇霉素的耐药性显著增高( $P<0.05$ ), 对头孢西丁耐药率显著降低( $P<0.05$ ); 对四环素类及磺胺类抗生素耐药率升高, 但无显著性差异( $P>0.05$ ) (表 2)。

### 2.3 大熊猫源肺炎克雷伯菌携带耐药基因情况

耐药基因检测结果显示, 实验菌株共携带 106 种 ARGs (106/227), 涉及到多重耐药、

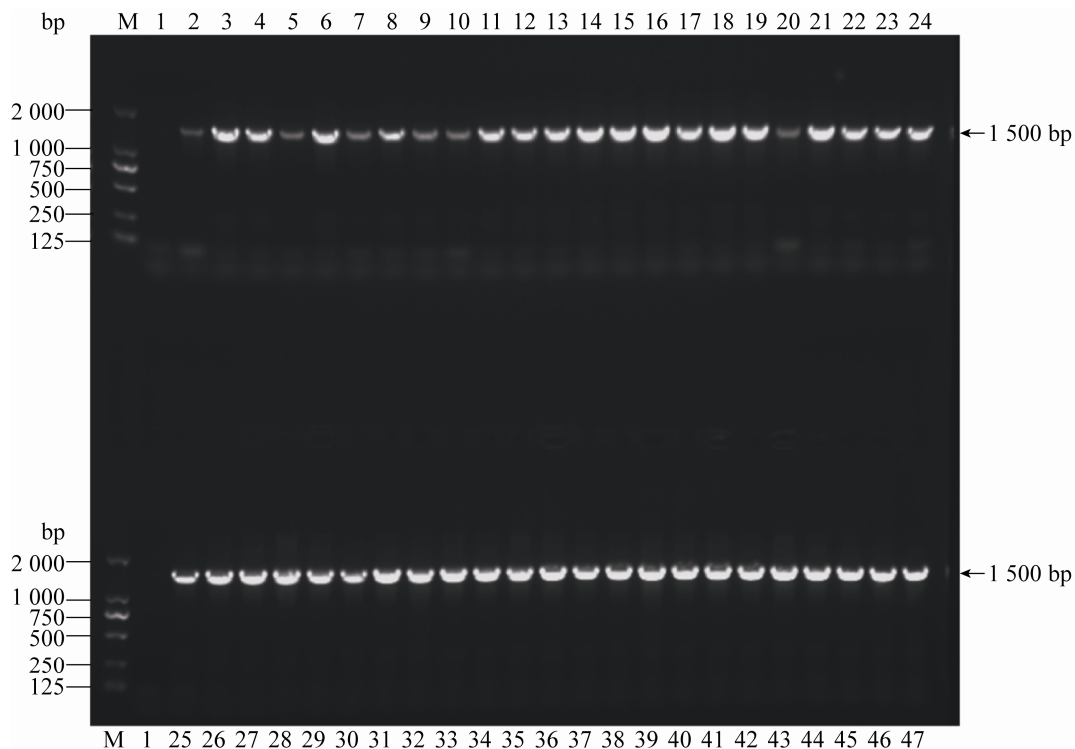


图 1 部分肺炎克雷伯菌 16S rRNA 基因的 PCR 胶图

Figure 1 16S rRNA gene PCR test results of some *Klebsiella pneumoniae* strains. M: DL 2 000 maker; lane 1: the negative control (normal saline); lane 2–47: PCR amplification products of some *K. pneumoniae* strains.

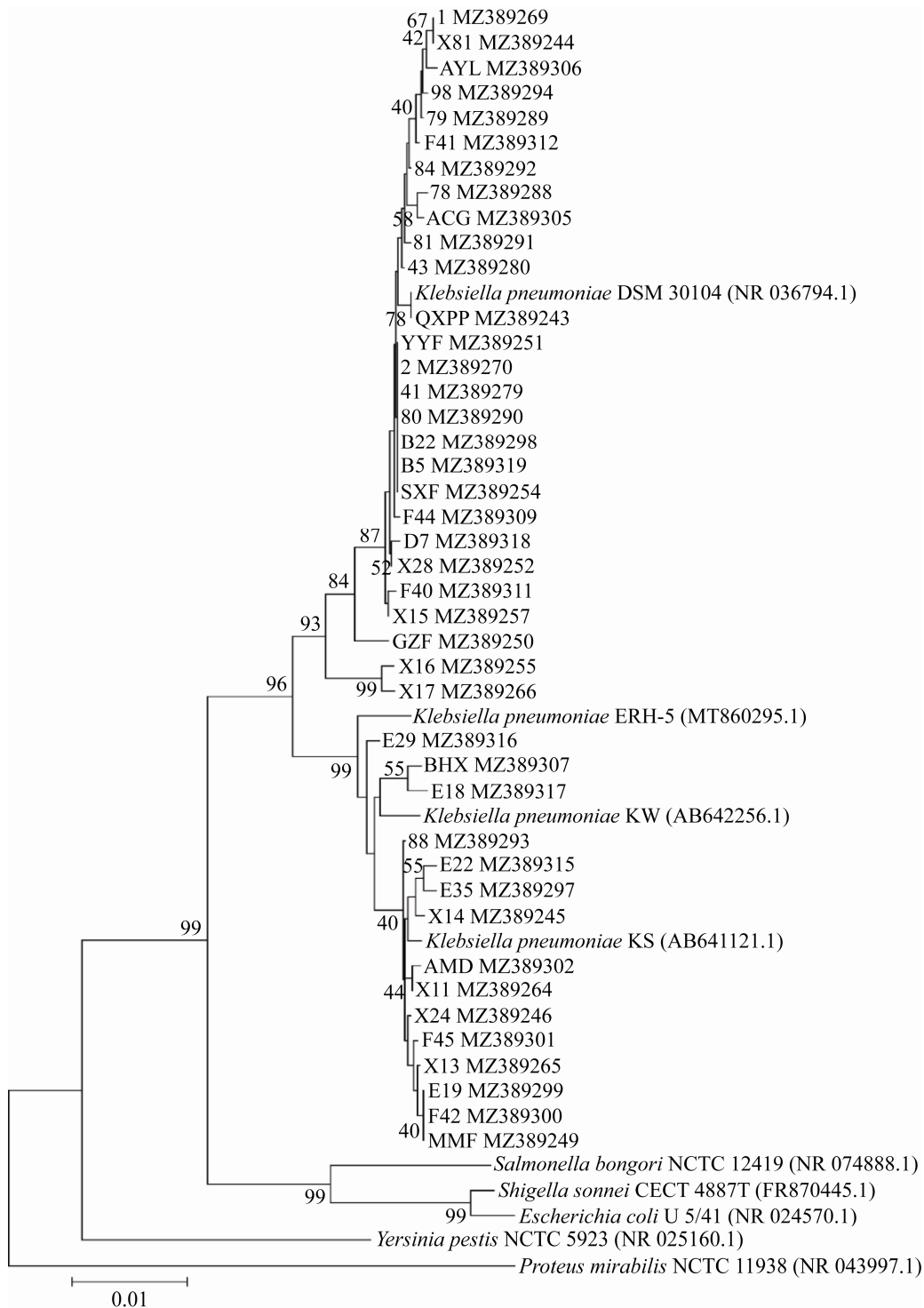


图 2 部分分离肺炎克雷伯菌株 16S rRNA 基因的系统发育树

Figure 2 16S rRNA gene phylogenetic tree of some *Klebsiella pneumoniae* isolated strains. Phylogenetic tree generated by the neighbor-joining method based on 16S rRNA gene sequences of selected representative strains from giant panda. Numbers in bracket represent the sequences accession number in GenBank. The number of each branch points is the percentage supported by bootstrap 1 000. Bar, 0.01 sequence divergence.

表 2 大熊猫源肺炎克雷伯菌对 37 种抗生素的耐药情况( $n=178$ )Table 2 Drug resistance of *Klebsiella pneumoniae* from giant panda to 37 antibiotics ( $n=178$ )

Classification	Antibiotic	Drug resistance in 2018/%	Drug resistance in 2019/%	The total resistance/%
β-lactams	PIP	1.1	4.6	2.8
	MOX	0.0	0.0	0.0
	CAZ	0.0	1.1	0.6
	CFM	2.2	0.0	1.1
	CMZ	1.1	0.0	0.6
	FEP	0.0	0.0	0.0
	CTX	0.0	4.6*	2.2
	CA	2.2	2.3	2.2
	CZ	5.5	2.3	3.9
	CTR	0.0	1.1	0.6
	FOX	6.6	0.0*	3.4
	TZD	0.0	0.0	0.0
	CXM	0.0	2.3	1.1
	CEC	3.3	2.3	2.8
	AMS	4.4	1.1	2.8
	CFP	1.1	0.0	0.6
	ZOX	0.0	0.0	0.0
	AT	1.1	0.0	0.6
	MEM	0.0	1.1	0.6
Aminoglycoside	IPM	1.1	8.0*	4.5
	K	1.1	1.1	1.1
	GM	2.2	2.3	2.2
S	S	3.3	3.4	3.4
Quinolones	ENX	1.1	1.1	1.1
	OFX	0.0	1.1	0.6
	NOR	0.0	1.1	0.6
	LOM	0.0	2.3	1.1
	FO	0.0	2.3	1.1
	LVX	1.1	3.4	2.2
	CIP	0.0	1.1	0.6
	GAT	0.0	0.0	0.0
Chloramphenicol	C	6.6	12.6	9.6
Macrolides	AZM	0.0	5.7*	2.8
Tetracycline	DX	13.2	17.2	15.2
	MI	5.5	4.6	5.1
Sulfonamides	SXT	9.9	9.2	9.6
	TMP	8.8	9.2	9.0

PIP: piperacillin; MOX: moxalactam; CAZ: ceftazidime; CFM: cefixime; CMZ: cefmetazole; FEP: cefepime; CTX: cefotaxime; CA: cephalaxin; CZ: cephazolin; CTR: ceftriaxone; FOX: ceftiofloxacin; TZD: piperacillin/tazobactam; CXM: cefuroxime; CEC: cefaclor; AMS: ampicillin/sulbactam; CFP: cefoperazone; ZOX: ceftizoxime; AT: aztreonam; MEM: meropenem; IPM: imipenem; K: kanamycin; GM: gentamicin; S: streptomycin; ENX: enoxacin; OFX: ofloxacin; NOR: norfloxacin; LOM: lomefloxacin; FO: fleroxacin; LVX: levofloxacin; CIP: ciprofloxacin; GAT: gatifloxacin; C: chloramphenicol; AZM: azithromycin; DX: doxycycline; MI: minocycline; SXT: cotrimoxazole; TMP: trimethoprim. \*: the statistical difference when compared with antibiotic resistance rate in *K. pneumoniae* between 2018 and 2019 at  $P<0.05$ .

$\beta$ -内酰胺类、氨基糖苷类、四环素类、大环内脂类-林可胺类-链阳霉素 B (MLSB)、万古霉素及磺胺类等 7 类耐药基因, 其中多重耐药基因和  $\beta$ -内酰胺类耐药基因含量最高, 分别为 33.2% 和 26.6% (图 3)。实验菌株主要的耐药机制为外排泵(42.0%)、抗生素失活(41.8%)和改变作用靶位(16.2%) (图 4)。

#### 2.4 大熊猫源肺炎克雷伯菌携带的可移动元件情况

可移动元件检测结果显示, 在实验菌株中共检出 11 种(11/19) MGEs, 包括转座酶(40.7%)、整合子(33.3%)和质粒(25.9%) (图 5)。

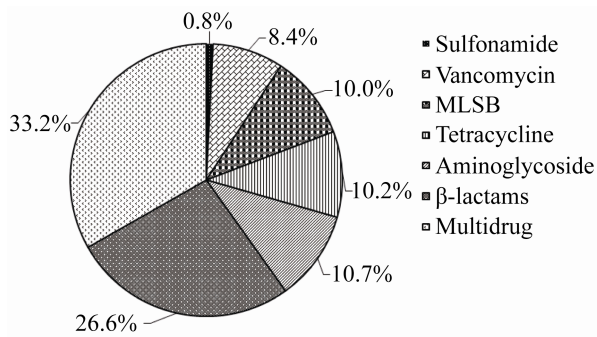


图 3 大熊猫源肺炎克雷伯菌携带的 ARGs 情况  
Figure 3 The content of ARGs carried by *Klebsiella pneumoniae* from giant panda.

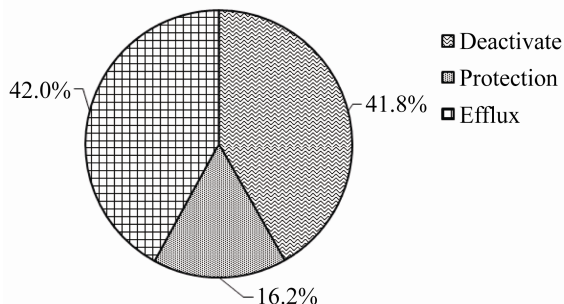


图 4 大熊猫源肺炎克雷伯菌涉及的耐药机制  
Figure 4 Drug resistance mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* from giant panda.

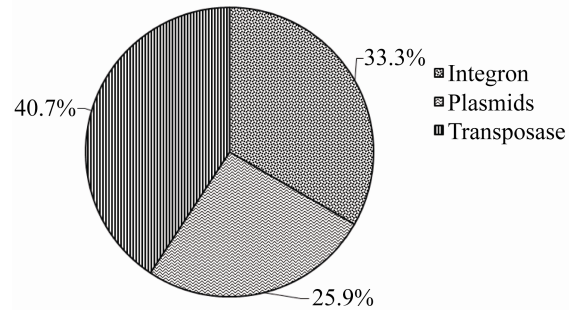


图 5 大熊猫源肺炎克雷伯菌携带的 MGEs 情况  
Figure 5 The content of MGEs carried by *Klebsiella pneumoniae* from giant panda.

#### 2.5 大熊猫源肺炎克雷伯菌 MLST 分析结果

MLST 分析发现, 实验菌株有 42 个不同的 ST 型, 其中 ST17、ST23、ST4007 型各占 5.9%; ST230、ST309、ST485 各占 3.9%。使用 MEGA 7.0 软件进行亲缘性分析发现 42 个 ST 主要聚集成 3 个群: ST710、ST2013、ST2994 聚为一个群(C 群), ST526、ST4009、ST984、ST1319 聚为一个群(B 群), 其余 ST 型聚为一个群(A 群) (图 6)。通过对 3 个 ST 群肺炎克雷伯菌的耐药表型进行关联分析发现, B 群肺炎克雷伯菌对 CA、CZ、FOX、IPM 等  $\beta$ -内酰胺类抗生素具有更高的耐药率; A 群肺炎克雷伯菌的耐药谱最广, 对氨基糖苷类、喹诺酮类、氯霉素类、大环内脂类、四环素及磺胺类抗生素均具有不同程度的耐药; C 群肺炎克雷伯菌内的耐药情况最低(表 3)。

### 3 讨论与结论

肺炎克雷伯菌是临床常见的人兽共患传染病病原菌之一<sup>[3]</sup>。本研究对 2018–2019 年分离鉴定的 178 株大熊猫源肺炎克雷伯菌进行耐药表型检测, 发现该菌对 32 种抗生素具有不同程度的耐药性, 对多西环素的耐药率最高(15.2%),





表 3 3 个 ST 群肺炎克雷伯菌的耐药表型分析结果( $n=178$ )Table 3 Drug resistance phenotypes' analysis results of three ST clusters *Klebsiella pneumoniae* ( $n=178$ )

Classification	Antibiotic	Drug resistance of group A/%	Drug resistance of group B/%	Drug resistance of group C/%
β-lactams	PIP	4.5	0.0	0.0
	CTX	4.5	0.0	0.0
	CA	2.3	25.0	0.0
	CZ	2.3	25.0	0.0
	FOX	0.0	25.0	0.0
	CXM	2.3	0.0	0.0
	CEC	2.3	0.0	0.0
	AMS	2.3	0.0	0.0
Aminoglycoside	IPM	13.6	50.0	0.0
	K	2.3	0.0	0.0
	GM	2.3	0.0	0.0
Quinolones	S	4.5	0.0	0.0
	ENX	2.3	0.0	0.0
	OFX	2.3	0.0	0.0
	NOR	2.3	0.0	0.0
	LOM	4.5	0.0	0.0
	FOX	4.5	0.0	0.0
	LVX	6.8	0.0	0.0
Chloramphenicol	CIP	2.3	0.0	0.0
	C	20.5	0.0	0.0
Macrolides	AZM	9.1	0.0	0.0
Tetracycline	DX	22.7	0.0	0.0
	MI	6.8	0.0	0.0
Sulfonamides	SXT	13.6	0.0	0.0
	TMP	13.6	0.0	0.0

移动元件差异性不显著。2019 年分离的大熊猫源肺炎克雷伯菌对抗生素的耐药性高于 2018 年的具体原因还需进一步的研究。

MLST 是基于 7 个管家基因序列分析菌株流行情况及变异情况的分型方法, 具有操作简单并能快速得到结果的特点<sup>[22]</sup>。不同物种流行的 ST 型不同, 在中国, 人上主要流行 ST11 和 ST23<sup>[23-24]</sup>, 家畜上主要流行 ST218 (牛)<sup>[25]</sup>、ST37 (鸡)、ST258 (猪)、ST60 (兔) 和 ST11 (犬)<sup>[26]</sup>。本研究发现 ST17、ST23 和 ST4007 在大熊猫源肺炎克雷伯菌中的含量最高(分别为 5.88%), 说

明在该基地的大熊猫圈养种群中, 这 3 种 ST 型可能是肺炎克雷伯菌的优势型。42 个 ST 型分为 A、B、C 3 个类群, A 群肺炎克雷伯菌耐药谱更广, 而且整体耐药率更高, 说明大熊猫源肺炎克雷伯菌的耐药性与其 ST 型具有一定的相关性。

综上所述, 本研究对大熊猫源肺炎克雷伯菌的耐药表型、耐药基因、可移动遗传元件和分子分型进行了研究, 并对其可能的耐药机制进行了探讨, 发现肺炎克雷伯菌对多西环素耐药率最高, 而且 2019 年菌株的耐药性比 2018 年

高; 实验菌株携带大量耐药基因和移动遗传元件, 而且其耐药机制以外排泵和抗生素失活为主; ST17、ST23 和 ST4007 可能是大熊猫源肺炎克雷伯菌的优势型, 其 ST 型与耐药性有一定的相关性。本研究提示了大熊猫源肺炎克雷伯菌存在耐药现象, 临床治疗中需进一步规范抗生素的合理使用。鉴于多重耐药菌和耐药基因已成为一种新型环境污染物引发世界公共卫生问题, 因此本研究可为防控和研究大熊猫等濒危野生动物的抗生素耐药提供科学的参考依据。

## 参考文献

- [1] 张慧芳, 王瑞兰. 高毒力肺炎克雷伯菌的研究进展. 中华肺部疾病杂志(电子版), 2021, 14(2): 253–255.  
Zhang HF, Wang RL. Research progress of *Klebsiella pneumoniae*. *Chinese Journal of Lung Diseases: Electronic Edition*, 2021, 14(2): 253–255. (in Chinese)
- [2] Mobasser G, Thong KL, Rajasekaram G, Teh CSJ. Molecular characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* from a Malaysian hospital. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2020, 51(1): 189–195.
- [3] 高隽. 河南驻马店地区猪源肺炎克雷伯氏菌分离菌株生物学特性. 中国兽医杂志, 2019, 55(3): 94–96, 99.  
Gao L. Biological characteristics of a strain of *Klebsiella pneumoniae* isolated from pigs in Zhumadian. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2019, 55(3): 94–96, 99. (in Chinese)
- [4] Komatsu T, Yoshida E, Shigenaga A, Yasuie N, Uchiyama S, Takamura Y, Sugie K, Kimura K, Haritani M, Shibahara T. Fatal suppurative meningoencephalitis caused by *Klebsiella pneumoniae* in two calves. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2021, 83(7): 1113–1119.
- [5] 彭广能, 熊焰. 大熊猫肺炎克雷伯氏菌的研究现状. 四川畜牧兽医, 2000, 27(S1): 86–87.  
Peng GN, Xiong Y. The studying status quo on the panda *Klebsiella pneumoniae*. *Sichuan Animal and Veterin Sciences*, 2000, 27(S1): 86–87. (in Chinese)
- [6] 张传美, 谢士杰, 孙晓琦, 郭玉广, 王丽红, 单虎, 杨海燕. 貂源肺炎克雷伯菌耐药性、毒力及免疫原性分析. 中国预防兽医学报, 2021, 43(1): 29–34.  
Zhang CM, Xie SJ, Sun XQ, Guo YG, Wang LH, Shan H, Yang HY. Drug sensitivity test, virulence and immunogenicity of *Klebsiella pneumoniae* isolates from minks. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2021, 43(1): 29–34. (in Chinese)
- [7] 张安洁, 杨勇, 肖望成, 徐孝青, 曾邦权, 肖啸, 代飞燕, 秦莉. 马来穿山甲多种菌混合感染的细菌分离鉴定及小鼠的毒力试验. 中国兽医学报, 2020, 40(1): 102–108.  
Zhang AJ, Yang Y, Xiao WC, Xu XQ, Zeng BQ, Xiao X, Dai FY, Qin L. Isolation and identification of bacteria form pangolin Malay with multiple bacterial infection and toxicity test in mice. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2020, 40(1): 102–108. (in Chinese)
- [8] 王艳君, 张琴, 徐静, 毕靖征. 小熊猫肺炎克雷伯菌的分离与鉴定. 上海畜牧兽医通讯, 2020(2): 28–29, 35.  
Wang YJ, Zhang Q, Xu J, Bi JZ. Isolation and identification of *Klebsiella pneumoniae* from red panda. *Shanghai Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2020(2): 28–29, 35. (in Chinese)
- [9] 王艳君, 冯永其, 徐静. 东非黑白疣猴肺炎克雷伯氏菌的分离鉴定. 上海畜牧兽医通讯, 2018(5): 14–15, 17.  
Wang YJ, Feng YQ, Xu J. Isolation and identification of *Klebsiella pneumoniae* from *Colobus guereza*. *Shanghai Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2018(5): 14–15, 17. (in Chinese)
- [10] Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla* (NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, 53(12): 5046–5054.
- [11] Rodriguez-Martinez JM, Nordmann P, Fortineau N, Poirel L. VIM-19, a metallo-beta-lactamase with increased carbapenemase activity from *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(1): 471–476.
- [12] Li P, Liang QQ, Liu WG, Zheng BW, Liu LZ, Wang W, Xu ZJ, Huang M, Feng YJ. Convergence of carbapenem resistance and hypervirulence in a highly-transmissible ST11 clone of *K. pneumoniae*: an epidemiological, genomic and functional study. *Virulence*, 2021, 12(1): 377–388.
- [13] 吴生才. 大熊猫繁育技术委员会 2019 年年会在蓉召

- 开. 绿色天府, 2019, 000(12): 11.
- Wu SC. Giant panda breeding technical committee 2019 annual meeting held in Chengdu. *Green Tian Fu*, 2019, 000(12): 11. (in Chinese)
- [14] 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症病因及病性研究. *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. Etiology and pathogenicity of subadult bacterial septicemia in giant panda. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*, 1998, 28(1): 7-9. (in Chinese)
- [15] 陈永林, 张成林, 胥哲. 大熊猫克雷伯氏菌病的诊断. *中国兽医杂志*, 2002, 38(8): 48.
- Chen YL, Zhang CL, Xu Z. Diagnosis of *Klebsiella pneumoniae* infection in giant panda. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2002, 38(8): 48. (in Chinese)
- [16] 王成东, 兰景超, 罗婵, 杨智, 张再蓉. 大熊猫感染性泌尿生殖道血尿症病原—肺炎克雷伯氏杆菌. *四川动物*, 2006, 25(1): 83-85, 202.
- Wang CD, Lan JC, Luo L, Yang Z, Zhang ZR. *Klebsiella pneumoniae*—pathogen of urogenital hematuria of giant panda. *Sichuan Journal of Zoology*, 2006, 25(1): 83-85, 202. (in Chinese)
- [17] 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. *四川动物*, 1998, 17(1): 29.
- Wang Q, Jiang H, Nakao T, Imazu KJ. A case report of *Klebsiella pneumoniae* hemorrhagic enteritis in giant panda. *Sichuan Journal of Zoology*, 1998, 17(1): 29. (in Chinese)
- [18] 苏小艳, 李运莉, 燕霞, 张东升, 李林, 侯蓉, 岳婵娟, 刘颂蕊. 大熊猫源产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶肺炎克雷伯杆菌的分离鉴定. *中国兽医学报*, 2021, 41(7): 1276-1281.
- Su XY, Li YL, Yan X, Zhang DS, Li L, Hou R, Yue CJ, Liu SR. Isolation and identification of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases-producing *Klebsiella pneumoniae* in captive giant panda. *Chinese journal of veterinary science*, 2021, 41(7): 1276-1281. (in Chinese)
- [19] 王琳, 杨阳, 张一颖, 李萌, 刘方舟, 李园白. 中药抗菌作用文献研究现状. *世界中西医结合杂志*, 2017, 12(12): 1663-1665, 1763.
- Wang L, Yang Y, Zhang YY, Li M, Liu FZ, Li YB. Literature research of the anti-bacterial effects of Chinese herbal medicines. *World Journal of Integrated Traditional and Western Medicine*, 2017, 12(12): 1663-1665, 1763. (in Chinese)
- [20] Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology Spectrum*, 2016, 4(2): 1-37.
- [21] Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *The Lancet Infectious Diseases*, 2009, 9(4): 228-236.
- [22] 杨晨, 胡仁静, 胡锡池, 严子禾, 杜筱英. MLST 在碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌分子流行病学分析中的应用. *中华医院感染学杂志*, 2016, 26(23): 5514-5516.
- Yang C, Hu RJ, Hu XC, Yan ZH, Du XY. Application of MLST in molecular epidemiology analysis of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Chinese Journal of Nosocomiology*, 2016, 26(23): 5514-5516. (in Chinese)
- [23] 黄丹艳, 史秋橙, 蓝鹏, 俞云松. 浙江地区碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌分布、流行及耐药基因分析. *中华传染病杂志*, 2018(1): 7-11.
- Huang DY, Shi QC, Lan P, Yu YS. Distribution, molecular epidemiology and resistance genes of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* in Zhejiang Province. *Chinese Journal of Infectious Diseases*, 2018(1): 7-11. (in Chinese)
- [24] 胡仁静, 汤怡颖, 胡锡池, 顾兵. 肝脓肿相关肺炎克雷伯菌毒力基因检测及同源性分析. *临床检验杂志*, 2018, 36(4): 263-266.
- Hu RJ, Tang YY, Hu XC, Gu B. Virulence genes and homology analysis of *Klebsiella pneumoniae* associated with pyogenic liver abscess. *Chinese Journal of Clinical Laboratory Science*, 2018, 36(4): 263-266. (in Chinese)
- [25] Cheng FJ, Li ZC, Lan SM, Liu W, Li XY, Zhou ZY, Song ZH, Wu J, Zhang ML, Shan WJ. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* associated with cattle infections in southwest China using multi-locus sequence typing (MLST), antibiotic resistance and virulence-associated gene profile analysis. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2018, 49: 93-100.
- [26] 杨帆, 邓保国, 魏纪东, 赵永新, 李敏. 医源与动物源肺炎克雷伯菌耐药性和分子特性研究. *中国人兽共患病学报*, 2017, 33(10): 888-892, 902.
- Yang F, Deng BG, Wei JD, Zhao YX, Li M. Drug-resistant and molecular characteristic of *Klebsiella pneumoniae* isolated from nosocomial and animal origins. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2017, 33(10): 888-892, 902. (in Chinese)

(本文责编 张晓丽)