

广东省宠物源肺炎克雷伯菌耐药、毒力基因的检测与药物敏感性测定

吴素娟^{1,2}, 林昌成^{1,2}, 万鹏^{1,2}, 胡健欣^{1,2}, 黄鸿昊^{1,2}, 李杰^{1,2}, 熊文广^{1,2}, 曾振灵^{1,2*}

1 华南农业大学, 广东省兽药研制与安全评价重点实验室, 广东 广州

2 国家兽医微生物耐药性风险评估实验室, 广东 广州

吴素娟, 林昌成, 万鹏, 胡健欣, 黄鸿昊, 李杰, 熊文广, 曾振灵. 广东省宠物源肺炎克雷伯菌耐药、毒力基因的检测与药物敏感性测定[J]. 微生物学报, 2025, 65(7): 2976-2987.

WU Sujuan, LIN Changcheng, WAN Peng, HU Jianxin, HUANG Honghao, LI Jie, XIONG Wenguang, ZENG Zhenling. Resistance and virulence genes and antimicrobial susceptibility of pet-derived *Klebsiella pneumoniae* from Guangdong Province[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(7): 2976-2987.

摘要: 【目的】探究广东省部分地区宠物源肺炎克雷伯菌的耐药和毒力情况。【方法】采集犬猫粪便拭子, 通过分离培养、PCR 扩增 16S rRNA 和 *khe* 基因进行菌株鉴定。采用琼脂扩散法测定肺炎克雷伯菌分离株对 17 种抗菌药物的敏感性; 通过 PCR 检测 β -内酰胺类(*bla*_{SHV}、*bla*_{CTX}、*bla*_{TEM})、碳青霉烯类(*bla*_{KPC}、*bla*_{NDM})、氨基糖苷类(*rmtB*)、喹诺酮类(*qnrS*、*oqxAB*)、磺胺类(*Sul1*、*Sul2*)、酰胺醇类(*floR*)、四环素类[*tet(A)*]、磷霉素(*fosA3*)耐药基因以及部分毒力基因(*rmpA*、*maga*、*fimH*、*mrkD*、*uge*、*WabG*、*kfu*、*Aerobactin*、*ureA*)。【结果】从采集的 428 份粪便样品中分离得到 126 株肺炎克雷伯菌, 分离率为 29.4%。琼脂扩散法结果显示, 126 株分离菌对阿莫西林(75.40%)、氨苄西林(73.81%)、复方新诺明(61.90%)耐药率高, 对头孢他啶、阿米卡星、安普霉素和恩诺沙星较为敏感, 对替加环素、黏菌素、美罗培南敏感。耐药基因检测结果显示, 磺胺类耐药基因 *oqxAB* 检出率最高, 为 86.51%; 其次为 β -内酰胺酶耐药基因 *bla*_{SHV} (73.81%)、四环素类耐药基因 *tet(A)* (52.68%); 其他耐药基因均有不同程度检出(0.79%–46.03%), 碳青霉烯类耐药基因 *bla*_{KPC}、黏菌素耐药基因 *mcr-1* 和氨基糖苷类耐药基因 *rmtB* 未检出。毒力基因检测结果显示, 尿素酶相关基因 *ureA* 检出率为 100.00%, 脂多糖相关基因 *uge* 检出率为 95.54%, 菌毛相关基因 *fimH* 的检出率为 91.07%, 其他毒力基因均有不同程度检出(2.70%–8.90%), 荚膜相关基因 *maga* 与菌毛相关基因 *mrkD* 未检出。【结论】广东省部分地区宠物源肺炎克雷伯菌耐药状况严重, 但

资助项目: 国家重点研发计划 (2022YFD1800400)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFD1800400).

*Corresponding author. E-mail: zlzeng@scau.edu.cn

ORCID: WU Sujuan (0009-0001-4428-3562)

Received: 2024-12-17; Accepted: 2025-02-18; Published online: 2025-04-14

致病性较弱，应加强对其耐药性与致病力的监测。此外，临床上应严格管理和合理使用抗生素，避免多重耐药肺炎克雷伯菌的产生与传播。

关键词：肺炎克雷伯菌；宠物源；耐药基因；毒力基因

Resistance and virulence genes and antimicrobial susceptibility of pet-derived *Klebsiella pneumoniae* from Guangdong Province

WU Sujuan^{1,2}, LIN Changcheng^{1,2}, WAN Peng^{1,2}, HU Jianxin^{1,2}, HUANG Honghao^{1,2}, LI Jie^{1,2}, XIONG Wenguang^{1,2}, ZENG Zhenling^{1,2*}

1 Guangdong Provincial Key Laboratory of Veterinary Pharmaceutics Development and Safety Evaluation, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong, China

2 China National Risk Assessment Laboratory for Antimicrobial Resistance of Animal Original Bacteria, Guangzhou, Guangdong, China

Abstract: [Objective] To investigate the antibiotic resistance and virulence of pet-derived *Klebsiella pneumoniae* in some areas of Guangdong Province. **[Methods]** Fecal swabs were collected from dogs and cats for strain isolation, and 16S rRNA and *khe* genes were amplified by PCR to identify the strains. The sensitivity of *K. pneumoniae* isolates to 17 antibiotics was determined by the agar diffusion method. PCR was employed to detect resistance genes to β -lactams (*bla*_{SHV}, *bla*_{CTX}, and *bla*_{TEM}), carbapenems (*bla*_{KPC} and *bla*_{NDM}), aminoglycosides (*rmtB*), quinolones (*qnrS* and *oqxAB*), sulfonamides (*Sul1* and *Sul2*), amphenicols (*floR*), tetracyclines (*tet(A)*), and fosfomycin (*fosA3*) and some virulence genes (*rmpA*, *maga*, *fimH*, *mrkD*, *uge*, *WabG*, *kfu*, *Aerobactin*, and *ureA*). **[Results]** A total of 126 strains of *K. pneumoniae* were isolated from 428 fecal samples, with an isolation rate of 29.4%. The 126 isolates had high resistance rates to amoxicillin (75.40%), ampicillin (73.81%), and cotrimoxazole (61.90%). They were moderately sensitive to ceftazidime, amikacin, apramycin, and enrofloxacin, and they were sensitive to tigecycline, colistin, and meropenem. The detection rate of the resistance gene *oqxAB* was the highest, which was 86.51%, followed by those of the β -lactam resistance gene *bla*_{SHV} (73.81%) and the tetracycline resistance gene *tet(A)* (52.68%). Other resistance genes were detected to varying degrees (0.79% – 46.03%) and the carbapenem resistance gene *bla*_{KPC}, colistin resistance gene *mcr-1*, and aminoglycoside resistance gene *rmtB* were not detected. Among the virulence genes, the urease gene *urea*, lipopolysaccharide-related gene *uge*, and fimbria-related gene *fimH* showed the detection rates of 100.00%, 95.54%, and 91.07%, respectively. Other virulence genes were detected to varying degrees (2.70% – 8.90%), while the capsule-related gene *maga* and the fimbria-related gene *mrkD* were not detected. **[Conclusion]** In some areas of Guangdong Province, the antibiotic resistance of pet-derived *K. pneumoniae* is serious, but its pathogenicity is relatively weak. Monitoring of its drug resistance and pathogenicity should be strengthened. In addition, antibiotics should be strictly managed and rationally used in the clinical practice, so as to avoid the generation

and dissemination of multidrug resistant strains of *K. pneumoniae*.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*; pet-derived; resistance genes; virulence genes

肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)是一种常见的革兰阴性菌和条件致病菌,属肠杆菌科克雷伯属^[1],广泛分布于自然界,主要存在于动物及人的消化道、呼吸道与泌尿生殖道等部位^[2]。肺炎克雷伯菌是引起社区和医院获得性感染的常见机会致病菌,人类感染肺炎克雷伯菌后可导致多系统、多器官感染^[3];宠物感染肺炎克雷伯菌后易引发各种炎症及生殖系统疾病,严重感染可致死^[4]。近年来,国内养宠群体不断扩大,宠物在人们精神寄托中的替代作用日益凸显,这是导致宠物数量不断增长的主要内在驱动因素^[5]。同时,宠物诊疗行业的兴起进一步促使抗菌药物广泛用于治疗宠物临床上由各类细菌引起的感染,如消化道、呼吸道和皮肤等部位的感染。然而,由于抗菌药物的不规范使用,甚至滥用,使肺炎克雷伯菌出现了产超广谱 β -内酰胺酶(extended-spectrum beta-lactamases, ESBLs)和碳青霉烯酶耐药的多重耐药表型,已逐渐成为除大肠杆菌之外的另一重要耐药致病菌^[4,6-7],导致治疗用药的局限性增加。

宠物与主人及其家庭成员之间的密切接触,为多重耐药细菌在人和宠物之间的传播创造了有利条件,可能对人类健康造成一定威胁,对公众健康构成潜在风险^[8]。宠物医疗作为宠物经济产业链的下游环节之一^[9],而花鸟市场作为人群潜在购买宠物的地点都具有重要的参考价值。因此,本研究选取宠物医院和花鸟市场采集的犬猫粪便拭子进行肺炎克雷伯菌的分离鉴定,并对其耐药性和毒力基因进行检测,旨在为防控宠物因肺炎克雷伯菌引起的相关疾病及临床合理用药提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 样品来源

2022年和2023年分别从不同区域采集到

393份和35份新鲜犬猫粪便拭子,共428份粪便样品,其中广州市部分宠物医院319份、广州市某花鸟市场76份及东莞市某宠物医院33份。将样品装入样品袋中并编号,置于4℃保存备用。质控菌株大肠杆菌ATCC 25922由华南农业大学广东省兽药研制与安全评价重点实验室保存。

1.2 主要试剂

BHI肉汤(brain heart infusion broth)、MH肉汤(mueller hinton broth)、LB琼脂和MH琼脂(mueller hinton agar)均购自广东环凯微生物科技有限公司;麦康凯肌醇阿东醇羧苄青霉素(MacConkey inositol adonitol carbenicillin agar, MIAC)培养基购自青岛海博生物技术有限公司;DL2000 bp DNA marker、2×Taq PCR Master Mix均购自广东东盛生物科技有限公司;革兰染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。

1.3 抗菌药物

氨苄西林(纯度98%)、头孢他啶(纯度98%)、头孢噻吩(纯度98%)、多西环素(纯度97%)、替加环素(纯度98%)、氟苯尼考(纯度95%)、阿米卡星(纯度97%)、恩诺沙星(纯度98.5%)均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;黏菌素(6 500 IU/mg)、庆大霉素(590 IU/mg)、安普霉素(纯度99%)、环丙沙星(纯度99%)、阿莫西林(纯度99%)、头孢噻肟(纯度98%)、新霉素(纯度92%)、美罗培南(纯度98%)均购自大连美仑生物技术有限公司;磺胺甲噁唑(纯度99%)、甲氧苄啶(纯度98%)均购自广州翔博生物科技有限公司,复方新诺明由磺胺甲噁唑和甲氧苄啶按比例混合而成。

1.4 细菌的分离培养与革兰染色镜检

将粪便样品加入无菌BHI肉汤2 mL,置于37℃、180 r/min培养过夜后,划线接种于

MIAC 培养基, 37 °C 培养箱培养 12 h。进一步挑取大小一致、粉红色中心发白的单个疑似菌落划线于 MIAC 进行纯化, 37 °C 培养箱培养 12 h; 挑取单菌落并划线和涂布于 LB 琼脂, 37 °C 培养过夜。取单菌落按照革兰染色试剂盒使用步骤进行革兰染色与镜检观察。

1.5 16S rRNA 基因和特异性基因的检测

采用水煮法提取分离菌株的 DNA, 以其为模板, 利用 PCR 扩增 16S rRNA 基因和 *khe* 基因。16S rRNA 基因使用细菌通用引物^[10]; *khe* 基因为肺炎克雷伯菌的特异性鉴定基因, 参考文献[11]的基因序列, 由北京擎科生物科技股份有限公司合成, 引物信息见表 1。PCR 反应体系 (25 μ L): 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, 2 $\times$ Taq PCR Master Mix 12.5 μ L, 模板 DNA 2 μ L, ddH₂O 补足体系。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 30 s, 退火 30 s (退火温度见表 1), 72 °C 延伸 90 s, 共 30 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并将产物送至广州擎科生物技术有限公司进行测序。将分离株的 16S rRNA 基因和 *khe* 基因序列上传至 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) 进行序列比对。

1.6 药物敏感性试验

采用琼脂扩散法对分离菌株进行 17 种抗菌药物 (美罗培南、阿莫西林、头孢噻肟、头孢噻吩、氨苄西林、头孢他啶、新霉素、安普霉素、庆大霉素、阿米卡星、多西环素、黏菌素、环丙沙星、恩诺沙星、氟苯尼考、复方新诺明、替加环素) 最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 的测定, 以大肠杆菌 ATCC 25922 作为质控菌, 参考美国临床和实验室标准协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI^[12]) 和欧洲药敏试验委员会 (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST^[13]) 的标准进行试验。其中, EUCAST

用于分离株对替加环素敏感性结果的判读。

1.7 耐药基因 PCR 扩增

对分离出的目标菌株进行部分耐药基因的扩增, 分别为黏菌素耐药基因 *mcr-1*; β -内酰胺酶类耐药基因 *bla*_{SHV}、*bla*_{CTX}、*bla*_{TEM}; 碳青霉烯类耐药基因 *bla*_{KPC}、*bla*_{NDM}; 磺胺类耐药基因 *Sul1*、*Sul2*; 磷霉素耐药基因 *fosA3*; 酰胺醇类耐药基因 *floR*; 氨基糖苷类耐药基因 *rmtB*; 喹诺酮类耐药基因 *qnrS*、*oqxAB*; 四环素类耐药基因 *tet(A)*。参考文献[14-23]合成基因, 引物均由广州擎科生物技术有限公司合成, 引物信息见表 1。PCR 反应体系和反应程序同 1.5 节。

1.8 毒力基因扩增

对分离出的目标菌株, 选取部分毒力基因进行 PCR 扩增。参考文献[18,24-25]合成相关引物, 引物序列信息见表 2, 引物均由广州擎科生物技术有限公司合成。PCR 反应体系和反应条件同 1.5 节。

2 结果与分析

2.1 细菌的分离培养与革兰染色

从 428 份粪便样品中分离得到 126 株疑似肺炎克雷伯菌, 分离率为 29.4%, 按不同来源分别命名。疑似肺炎克雷伯菌在 MIAC 琼脂培养基上菌落大小一致, 呈粉色、中心发白, 表面光滑、中间凸起, 菌落湿润 (图 1A)。将疑似菌落染色后, 在油镜下观察细菌形态, 为革兰阴性细菌, 呈杆状 (图 1B)。

2.2 16S rRNA 和 *khe* 基因检测

采用 PCR 方法对 16S rRNA 基因 (图 2A) 和 *khe* 基因扩增结果 (图 2B), 进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示均扩增出约 1 500 bp 和 428 bp 的目的片段, 与预期片段大小相符。将 16S rRNA 和 *khe* 基因的测序结果上传至 NCBI 进行序列比对, 证实分离到的菌株均为肺炎克雷伯菌。

表1 细菌鉴定与耐药基因检测引物信息

Table 1 Sequence information of primers used for bacterial identification and detection of drug resistance genes

基因 Genes	引物序列 Primer sequences (5'→3')	片段大小 Target fragment (bp)	退火温度 Annealing temperature (°C)	参考文献 References
16S rRNA	F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG R: ACGGCTACCTTGTTACGACTT	1 500	55	[10]
<i>khe</i>	F: TGATTGCATTCGCCACTGG R: GGTCAACCCAACGATCCTG	428	68	[11]
<i>mcr-1</i>	F: TCGCGGCATTCGTTATA R: GGTGGCGTTCAGCAGTC	535	52	[14]
<i>bla</i> _{CTX}	F: TTAGGAARTGTGCCGCTGYA R: CGATATCGTTGGTGGTRCCAT	688	56	[15]
<i>bla</i> _{TEM}	F: ATAAAATTCTTGAAGACGAAA R: GACAGTTACCAATGCTTAATC	1 076	55	[16]
<i>bla</i> _{SHV}	F: TTATCTCCCTGTTAGCCACC R: GATTTGCTGATTTCTGCTCGG	795	55	[17]
<i>bla</i> _{KPC}	F: CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG R: CTTGTCATCCTTGTTAGGCG	566	55	[18]
<i>bla</i> _{NDM}	F: GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC R: CGGAATGGCTCATCACGATC	621	53	[18]
<i>Sul1</i>	F: TCGGACAGGGCGTCTAAG R: GGGTATCGGAGCGTTTGCA	925	56	[18]
<i>Sul2</i>	F: CGGCATCGTCAACATAACCT R: TGTGCGGATGAAGTCAGCTC	721	57	[19]
<i>fosA3</i>	F: GCGTCAAGCCTGGCATT R: GCCGTCAGGGTCGAGAAA	282	56	[20]
<i>floR</i>	F: CTGAGGGTGTCGTCATCTAC R: GCTCCGACAATGCTGACTAT	673	57	[20]
<i>rmtB</i>	F: ACATCAACGATGCCCTCAC R: AAGTTCTGTTCCGATGGTC	725	52	[20]
<i>oqxAB</i>	F: GTCCAGCGATAATCAGGC R: GGTCTCGGCAATCACTTT	669	54	[21]
<i>qnrS</i>	F: ACGACATTCGTCAACTGCAA R: TAAATTGGCACCCCTGTAGGC	417	54	[22]
<i>tet(A)</i>	F: CCAATCCATCGACAATCACC R: CAGCCGAATACAGTGATCC	583	53	[23]

2.3 药物敏感性试验结果

采用琼脂扩散法对 126 株肺炎克雷伯菌进行 17 种药物的敏感性测定。结果显示，分离株对阿莫西林、氨苄西林、复方新诺明的耐药率较高，分别为 75.40%、73.81%、61.90%；其次

对庆大霉素、头孢噻呋、多西环素、头孢噻肟、氟苯尼考、新霉素和环丙沙星具有不同程度的耐药，耐药率分别为 44.44%、40.48%、34.13%、26.98%、24.60%、18.25% 和 16.67%；对头孢他啶、恩诺沙星、阿米卡星、安普霉素、

表2 毒力基因检测引物序列信息

Table 2 Sequence information of primers used for detection of virulence genes

基因 Genes	引物序列 Primer sequences (5'→3')	片段大小 Target fragment (bp)	退火温度 Annealing temperature (°C)	参考文献 References
<i>rmpA</i>	F: ACTGGGCTACCTCTGCTTCA R: CTTGCATGAGCCATCTTTCA	535	55	[24]
<i>mrkD</i>	F: ATGTCGCTGAGGAAATTACTAACGC R: TTAATCGTACGTAAGGTAAAGATCAT	958	56	[24]
<i>WabG</i>	F: ACCATCGGCCATTTGATAGA R: CGGACTGGCAGATCCATATC	683	54	[24]
<i>maga</i>	F: GGTGCTCTTTACATCATTGC R: GCAATGGCCATTTGCGTTAG	1 283	53	[18]
<i>uge</i>	F: TCTTCACGCCTTCCTTCACT R: GATCATCCGGTCTCCCTGTA	535	55	[18]
<i>fimH</i>	F: TGCTGCTGGGCTGGTCGATG R: GGGAGGGTGACGGTGACATC	550	57	[18]
<i>kfu</i>	F: GAAGTGACGCTGTTTCTGGC R: TTTCGTGTGGCCAGTGACTC	520	57	[18]
<i>Aerobactin</i>	F: GCATAGGCGGATACGAACAT R: CACAGGGCAATTGCTTACCT	556	56	[18]
<i>ureA</i>	F: GCTGACTTAAGAGAACGTTATG R: GATCATGGCGCTACCTCA	337	54	[25]

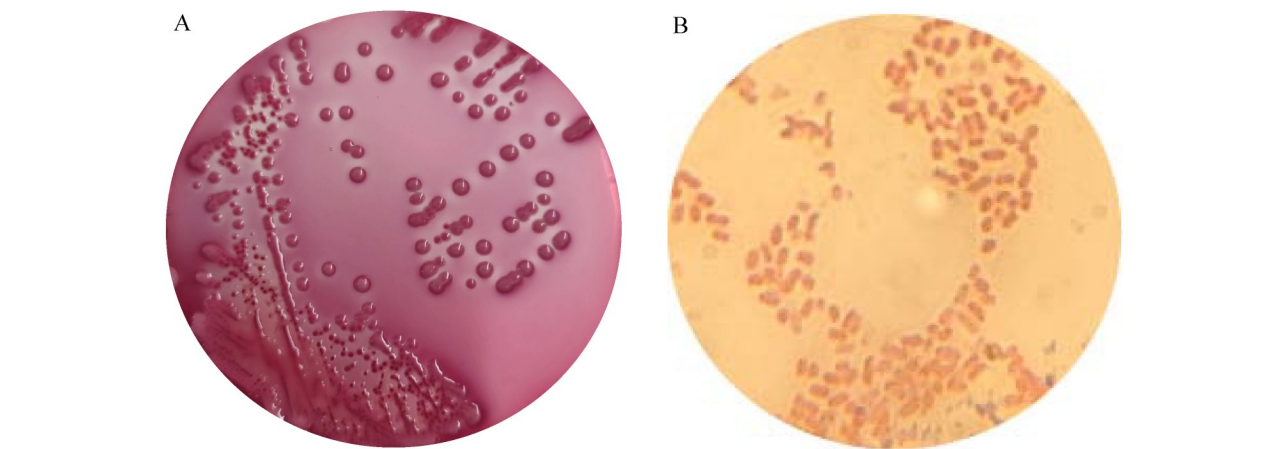


图1 MIAC培养基的肺炎克雷伯菌菌落(A)与革兰氏染色镜检结果(B, 400×)
Figure 1 *Klebsiella pneumoniae* colonies in MIAC (A) and Gram-stained microscopic findings (B, 400×).

较为敏感；对替加环素、黏菌素、美罗培南敏感(图 3)。

2.4 耐药基因检测结果

耐药基因检测结果显示，β-内酰胺酶耐药基

因 *bla*_{SHV} 检出率为 73.81%，*bla*_{CTX} (26.98%)、*bla*_{TEM} (30.16%)也有不同程度的检出；碳青霉烯类耐药基因 *bla*_{NDM} 检出率为 0.79%；氟喹诺酮类耐药基因 *oqxAB* 检出率最高，为 86.51%，

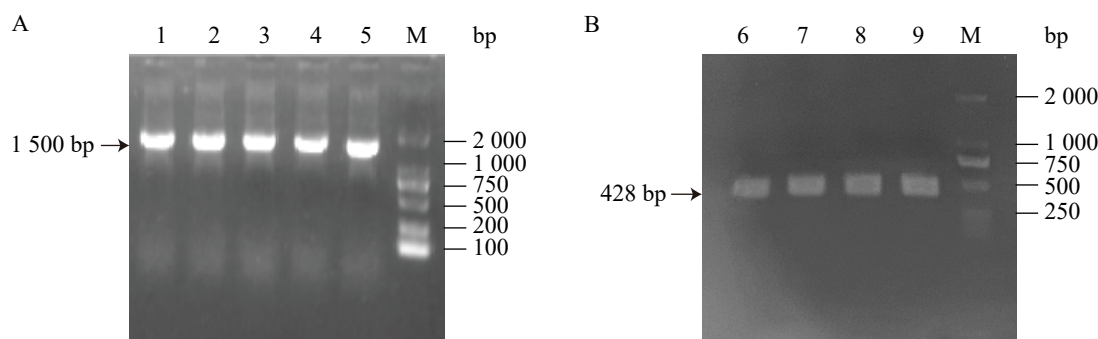


图2 分离菌株16S rRNA (A)和*khe* (B)基因PCR扩增结果。泳道1-9: 部分分离菌株的PCR扩增结果; 泳道M: DL2000 DNA marker。

Figure 2 The amplification of 16S rRNA (A) and *khe* (B) genes of isolated strains. Lanes 1-9: PCR results of some isolated strains; Lane M: DL2000 DNA marker.

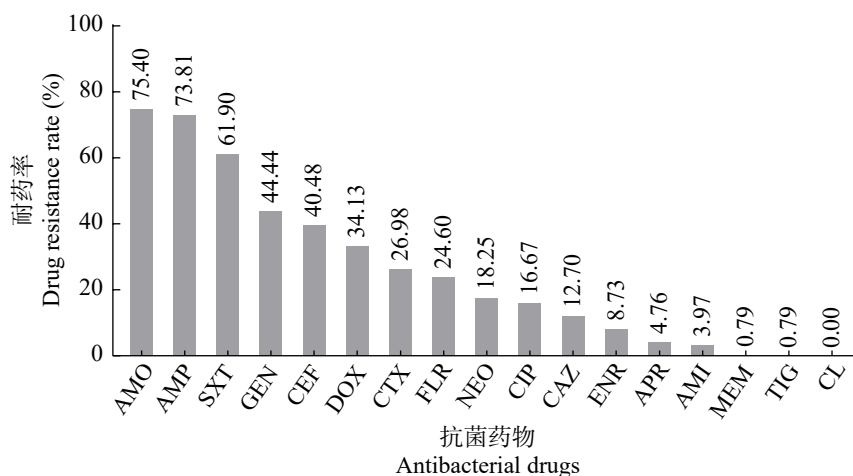


图3 肺炎克雷伯菌药敏检测结果。AMP: 氨苄西林; AMO: 阿莫西林; CTX: 头孢噻肟; CEF: 头孢噻呋; CAZ: 头孢他啶; AMI: 阿米卡星; GEN: 庆大霉素; NEO: 新霉素; APR: 安普霉素; TIG: 替加环素; DOX: 多西环素; CIP: 环丙沙星; ENR: 恩诺沙星; SXT: 复方新诺明; FLR: 氟苯尼考; CL: 黏菌素; MEM: 美罗培南。

Figure 3 The result of *Klebsiella pneumoniae* drug sensitivity test. AMP: Ampicillin; AMO: Amoxicillin; CTX: Cefotaxime; CEF: Ceftiofur; CAZ: Ceftazidime; AMI: Amikacin; GEN: Gentamicin; NEO: Neomycin; APR: Apramycin; TIG: Tigecycline; DOX: Doxycycline; CIP: Ciprofloxacin; ENR: Enrofloxacin; SXT: Cotrimoxazole; FLR: Florfenicol; CL: Colistin; MEM: Meropenem.

qnrS 检出率为 27.78%; 磺胺类耐药基因 *Sul1* 检出率为 16.67%, *Sul2* (46.03%) 检出率较高; 四环素类耐药基因 *tet(A)* 检出率较高, 为 52.68%; 磷霉素耐药基因 *fosA3* 检出率为 21.43%; 氟苯尼考耐药基因 *floR* 检出率为 24.60%; 黏菌素耐

药基因 *mcr-1*、碳青霉烯酶类 *bla_{KPC}* 和氨基糖苷类耐药基因 *rmtB* 未检出(图 4)。

2.5 毒力基因检测结果

毒力基因检测结果显示: 荚膜相关基因 *rmpA* 的检出率为 6.30%, *magA* 未检出; 脂多糖

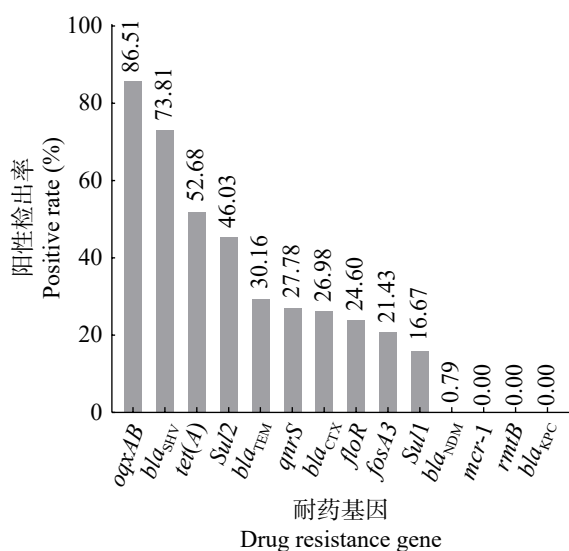


图4 肺炎克雷伯菌分离株的耐药基因检测结果

Figure 4 The result of drug resistance genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates.

相关基因 *wabG*、*uge* 的检出率分别为 8.90%、95.54%；菌毛相关基因 *fimH* 检出率为 91.07%，*mrkD* 未检出；铁载体相关基因 *kfu*、*Aerobactin* 检出率分别为 7.10%、2.70%；尿素酶相关基因 *ureA* 检出率最高，为 100.00% (图 5)。

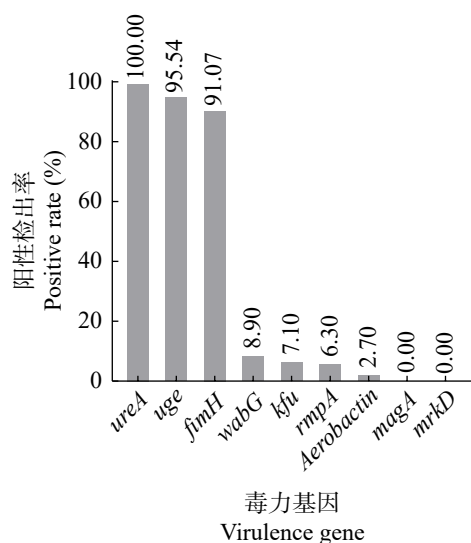


图5 肺炎克雷伯菌分离株的毒力基因检测结果

Figure 5 The result of virulence genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates.

3 讨论

近年来，中国养宠数量持续上升，肺炎克雷伯菌引起的人和动物患病的相关报道也在迅速增多。已有报道从不同患病动物中分离出高致病性、高水平多重耐药的肺炎克雷伯菌^[26]，该菌可不同程度地引起人和动物的创伤、呼吸系统和泌尿系统感染，甚至引发败血症、脑膜炎和腹膜炎^[27]。Chen 等^[28]收集 2015 年 9 月至 2020 年 10 月的一对健康夫妇及其宠物的粪便，研究表明观察的家庭成员之间存在肺炎克雷伯菌的低水平传播。粪便已被证明是耐药菌传播的媒介，细菌在粪便中可持留 6 个月以上^[29]。人类对宠物日常生活的管理以及人宠直接的近距离接触均有利于细菌传播。这会对人类健康与公共环境造成潜在风险，需重视宠物将耐药菌传播给人类的可能性。因此，本研究以宠物犬猫为采集对象，共采集 428 份粪便样品，分离得到 126 株肺炎克雷伯菌(分离率为 29.4%)。其中，广州地区宠物医院共分离得到 68 株，分离率为 21.3% (68/319)；广州市花鸟市场共分离得到 29 株，分离率为 38.2% (29/76)。花鸟市场中肺炎克雷伯菌的分离率较宠物医院高，可能由于花鸟市场的宠物管理及卫生情况较宠物医院差，而且商店与医院的盈利方式不同，人员流动相对较大，更容易造成细菌的传播。

目前，抗菌药物仍是临床治疗宠物细菌性疾病的首选方式。宠物临床主要用药包括：阿莫西林克拉维酸钾用于敏感菌引起的各种感染，如皮肤、软组织、呼吸道、尿道和肠道感染；新霉素常用于眼部感染，如结膜炎和角膜炎等；恩诺沙星首选用于泌尿系统疾病，如膀胱炎和猫下泌尿道综合征；当犬猫支原体和衣原体感染致呼吸道疾病时，常用多西环素联合阿莫西林克拉维酸钾。宠物抗生素使用指南是限制细菌耐药性发生与耐药细菌在人畜共患病传播的重要工具^[30]，须严格遵守抗菌药物的使用原则，掌握药物的使用机理、临床症状，结合宠物自

身的生长习性、饮食习惯等,合理用药并发挥最大化的治疗效果^[31]。

已有研究发现,分离于宠物医院的犬源肺炎克雷伯菌的耐药程度有不断攀升的趋势,从对一代头孢菌素类抗生素耐药到对二代和三代头孢菌素类、四环素类、喹诺酮类及磺胺类等抗菌药物耐药^[32]。产ESBLs细菌通过超广谱 β -内酰胺酶耐药基因可以水解 β -内酰胺类抗生素从而使细菌获得相关耐药表型^[33]。本研究分离得到的肺炎克雷伯菌对阿莫西林(75.40%)和氨苄西林(73.81%)具有高耐药率。对超广谱 β -内酰胺酶耐药基因检测发现,*bla_{SHV}* (73.81%)较*bla_{CTX}* (26.98%)与*bla_{TEM}* (30.16%)检出率最高,推测这与犬猫治疗中使用阿莫西林等青霉素类药物造成的抗生素压力有关。张聪等^[18]对南宁市犬源肺炎克雷伯菌耐药性进行分析,发现该研究分离得到的3株(3/4)犬分离株均携带耐药基因*bla_{SHV}*,该结果与本研究肺炎克雷伯菌中*bla_{SHV}*检出率高一致。*floR*与氟苯尼考耐药检出率一致,均为24.60%。然而*rmtB*未检出,分离菌株却具有对庆大霉素(44.44%)和阿米卡星(3.97%)耐药表型,可能是存在能介导氨基糖苷类耐药的其他耐药基因,如*aac(6')-Ia*与*ant(3'')-Ia*等。值得注意的是,本研究中四环素类耐药基因*tet(A)* (52.68%)检出率高于多西环素耐药表型(34.13%);而磺胺类耐药基因*Sul1* (16.67%)、*Sul2* (46.03%)检出情况却低于复方新诺明的耐药表型(61.90%)。喹诺酮类耐药基因*oqxAB*的高检出率(86.51%)和*qnrS* (27.78%)的相对低检出,与恩诺沙星(8.73%)、环丙沙星(16.67%)的耐药表型检出情况差距较大。这表明细菌耐药表型的形成并非单一因素所能决定,而是受到多种复杂因素的共同影响。耐药表型可能存在一定的波动性和不确定性,使细菌耐药表型难以预测。这也提醒我们在评估细菌耐药性时,不能仅依赖耐药基因的检测结果,还需要综合考虑多种因素的影响。

随着宠物行业的迅猛发展,动物诊疗机构

中药品管理与使用问题越来越突出,人药兽用也引发了社会各界的高度关注^[34]。磷霉素未被批准用于宠物临床用药,但分离菌株中*fosA3*检出率为21.43%,可能与 β -内酰胺类、氨基糖苷类等药物使用压力下,磷霉素耐药基因通过质粒共传播导致该基因检出,这与易梦颖等^[20]研究宠物源大肠埃希菌中*fosA3*检出原因相似。美罗培南是半合成碳青霉烯类抗生素,为人医临床上治疗多种不同感染的常用药。新型金属 β -内酰胺酶耐药基因*bla_{NDM}*介导美罗培南等碳青霉烯类抗生素耐药,与其传播相关的常见质粒通常携带各种耐药基因,从而导致细菌呈现多重耐药表型。该基因于2008年在前往新德里的瑞典患者中首次报道,目前,亚洲大陆(主要是印度和中国)是NDM生产者的主要储存库,其次是英国^[35]。本研究中药敏试验结果显示有1株表现出美罗培南耐药,*bla_{NDM}*耐药基因检出率为0.79% (1/126),需要进一步探究其可能的来源并评估其进一步传播的风险。

肺炎克雷伯菌感染机体的能力与菌毛、荚膜、铁载体与脂多糖等毒力基因相关。肺炎克雷伯菌主要表达I型、III型菌毛。I型菌毛由*fim*基因群表达(如*fimH*),介导菌株黏附并侵入宿主细胞,是尿路感染的关键原因;III型菌毛由*mrk*基因群表达(如*mrkD*),主要是黏附于内皮细胞及呼吸道和泌尿生殖道上皮细胞^[36]。本研究中*fimH*与*mrkD*检出率具有明显差异,推测本研究分离的肺炎克雷伯菌主要为产I型菌毛细菌,还需进一步研究菌毛分型与各毒力基因之间的关联性。荚膜相关基因*rmpA*可导致高黏膜黏度,促进细菌生物膜的形成,与毒力的增强及耐药性的形成有关^[37-38],目前认为*rmpA*基因是鉴定高毒力肺炎克雷伯菌的重要生物标志物之一。Abbas等^[39]表明,*Aerobactin*在各种小鼠模型、人类腹水和血液中起到增强细菌铁获取、生长和/或毒力方面的关键作用,它也被认为是检测高毒力肺炎克雷伯菌的有用生物标志物。本研究从宠物源分离得到的肺炎克雷伯

菌 *rpmA* 和 *Aerobactin* 检出率低, 提示广东省部分地区宠物源高毒力肺炎克雷伯菌流行率低。

4 结论

本研究表明, 广东省部分地区宠物源肺炎克雷伯菌对常用抗菌药物耐药情况严重, 但致病性较弱。提示兽用临床上应检测肺炎克雷伯菌的致病力变化, 加强对抗生素的管理及使用, 避免多重耐药高毒力肺炎克雷伯菌的广泛传播。

作者贡献声明

吴素娟: 方案设计、数据处理与分析、数据管理、数据可视化、文稿写作及编辑; 林昌成: 数据处理、实验操作; 万鹏: 方案设计、数据分析、文稿审查; 胡健欣: 方案设计、数据分析、文稿审查; 黄鸿昊: 方案设计、文稿审查; 李杰: 方案设计、文稿审查; 熊文广: 方案设计、项目管理、监督指导; 曾振灵: 方案设计、项目管理、监督指导、文稿审查及编辑。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] 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 β -内酰胺酶肺炎克雷伯杆菌的分离鉴定[J]. 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 β -lactamases producing *Klebsiella pneumoniae* in captive giant panda[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2021, 41(7): 1276-1281 (in Chinese).
- [2] 解秀梅, 童富珍. 西宁地区宠物犬源肺炎克雷伯菌血清型鉴定、致病性及耐药性检测[J]. 动物医学进展, 2021, 42(7): 131-134. XIE XM, TONG FZ. Serotype identification, pathogenicity and drug resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolated from pet dogs in Xining[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2021, 42(7): 131-134 (in Chinese).
- [3] 俞凤, 胡龙华, 肖艳萍, 杨军平. 血流感染肺炎克雷伯菌毒力基因分布和临床分子特征[J]. 检验医学, 2024, 39(3): 249-255. YU F, HU LH, XIAO YP, YANG JP. Virulence genes and molecular characteristics of *Klebsiella pneumoniae* isolated from bloodstream infection patients[J]. Laboratory Medicine, 2024, 39(3): 249-255 (in Chinese).
- [4] 任君, 乔启, 张晴, 杜荣起, 杨宁宁, 罗安智, 刘燕霏, 杨建德. 犬源肺炎克雷伯氏菌的分离与鉴定[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2020(6): 63-66, 156. REN J, QIAO Q, ZHANG Q, DU RQ, YANG NN, LUO AZ, LIU YF, YANG JD. Isolation and identification of canine *Klebsiella pneumoniae*[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2020(6): 63-66, 156 (in Chinese).
- [5] 陈来华. 中国宠物行业现状与影响因素及发展趋势[J]. 中国动物保健, 2018, 20(8): 4-8.
- [6] RIPABELLI G, TAMBURRO M, GUERRIZIO G, FANELLI I, FLOCCO R, SCUTELLÀ M, SAMMARCO ML. Tracking multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* from an Italian hospital: molecular epidemiology and surveillance by PFGE RAPD and PCR-based resistance genes prevalence[J]. Current Microbiology, 2018, 75(8): 977-987.
- [7] MARQUES C, BELAS A, ABOIM C, CAVACO-SILVA P, TRIGUEIRO G, GAMA LT, POMBA C. Evidence of sharing of *Klebsiella pneumoniae* strains between healthy companion animals and cohabiting humans[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2019, 57(6): e01537-18.
- [8] ORTIZ-DÍEZ G, MENGÍBAR RL, TURRIENTES MC, ARTIGAO MB, GALLIFA RL, TELLO AM, PÉREZ CF, SANTIAGO TA. Prevalence, incidence and risk factors for acquisition and colonization of extended-spectrum beta-lactamase- and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from dogs attended at a veterinary hospital in Spain[J]. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 2023, 92: 101922.
- [9] 王海棚, 刘燕, 朱金凤. 宠物行业现状及发展趋势[J]. 河南农业, 2019(6): 50-51. WANG HP, LIU Y, ZHU JF. Present situation and development trend of pet industry[J]. Agriculture of Henan, 2019(6): 50-51 (in Chinese).
- [10] 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[J]. 微生物学报, 2022, 62(3): 1061-1072. YAN X, YANG M, LI L, ZHANG DS, SU F, LI YL, HOU R, YUE CJ, LIU SR, SU XY. Drug resistance and molecular typing of *Klebsiella pneumoniae* isolated from giant panda[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(3): 1061-1072 (in Chinese).
- [11] HE YX, GUO XG, XIANG SF, LI J, LI XQ, XIANG H, HE JL, CHEN DL, CHEN JP. Comparative analyses of

- phenotypic methods and 16S rRNA, *khe*, *rpoB* genes sequencing for identification of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2016, 109(7): 1029-1040.
- [12] Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI M100-Ed34 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Eighteenth Informational Supplement[S]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2024.
- [13] EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12.0. [S]. Växjö, Sweden: The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2022.
- [14] WAN P, CUI SY, MA ZB, CHEN L, LI XS, ZHAO RN, XIONG WG, ZENG ZL. Reversal of *mcr-1*-mediated colistin resistance in *Escherichia coli* by CRISPR-Cas9 system[J]. *Infection and Drug Resistance*, 2020, 13: 1171-1178.
- [15] FINTON MD, MEISAL R, PORCELLATO D, BRANDAL LT, LINDSTEDT BA. Whole genome sequencing and characterization of multidrug-resistant (MDR) bacterial strains isolated from a Norwegian University campus pond[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1273.
- [16] RAVI NK, PAL AK, SONI R, TRIPATHI P, SINGHAL A, JHA PK, TRIPATHI V. Assessment of antibiotic resistance profile of bacteria isolated from Ghaghara River, India[J]. *Water Supply*, 2022, 22(11): 8080-8091.
- [17] JENA J, DEBATANK, SAHOOR K, GAUR M, SUBUDHI E. Molecular characterization of extended spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* strains isolated from a tertiary care hospital[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2018, 115: 112-116.
- [18] 张聪, 肖亦辰, 陈怀君, 袁敬知, 韦德源, 王晓晔. 伴侣动物源肺炎克雷伯氏菌的分离鉴定及毒力和耐药性分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2020, 47(5): 1583-1592.
- ZHANG C, XIAO YC, CHEN HJ, YUAN JZ, WEI DY, WANG XY. Isolation, identification and analysis of virulence and drug resistance of *Klebsiella pneumoniae* from companion animals[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2020, 47(5): 1583-1592 (in Chinese).
- [19] MATTER D, ROSSANO A, LIMAT S, VORLET-FAWER L, BRODARD I, PERRETEN V. Antimicrobial resistance profile of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Actinobacillus porcitosillarum*[J]. *Veterinary Microbiology*, 2007, 122(1/2): 146-156.
- [20] 易梦颖, 王晶, 卢沛兰, 黄馨仪, 夏应碧, 黄佳为, 严杰聪, 庄子琳, 刘健华. 宠物源大肠埃希菌耐药性及耐药基因调查[J]. *华南农业大学学报*, 2019, 40(6): 15-21.
- YI MY, WANG J, LU PL, HUANG XY, XIA YB, HUANG JW, YAN JC, ZHUANG ZL, LIU JH. Antimicrobial resistance and resistance genes of *Escherichia coli* from pets[J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2019, 40(6): 15-21 (in Chinese).
- [21] ZHAO JJ, CHEN ZL, CHEN S, DENG YT, LIU YH, TIAN W, HUANG XH, WU CM, SUN YX, SUN Y, ZENG ZL, LIU JH. Prevalence and dissemination of *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from animals, farmworkers, and the environment[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2010, 54(10): 4219-4224.
- [22] PARK H, KIM J, RYU S, JEON B. The rate of frequent co-existence of plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) and extended-spectrum β -lactamase (ESBL) genes in *Escherichia coli* isolates from retail raw chicken in Korea[J]. *Food Science and Biotechnology*, 2022, 31(6): 739-743.
- [23] 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]. 阿拉尔市: 塔里木大学硕士学位论文, 2021.
- WANG ZH. Molecular epidemiological investigation and drug resistance characteristics of *Klebsiella pneumoniae* in intensive cattle farms in Xinjiang[D]. Aral: Master's Thesis of Tarim University, 2021 (in Chinese).
- [24] 左伟, 武琦, 张千, 常攀, 卢炜豪, 姜永志, 边巴央拉, 罗润波, 索朗斯珠, 贡嘎. 藏猪源肺炎克雷伯菌的分离鉴定及生物学特性研究[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2022(9): 72-79, 141.
- [25] 张超, 王文佳, 程成, 张凯, 许立华. 宁夏地区牛源肺炎克雷伯氏菌分离鉴定及主要毒力基因分析[J]. *农业科学研究*, 2019, 40(2): 1-5.
- ZHANG C, WANG WJ, CHENG C, ZHANG K, XU LH. Isolation and identification of *Klebsiella pneumoniae* from cattle in Ningxia and main virulence gene analysis[J]. *Journal of Agricultural Sciences*, 2019, 40(2): 1-5 (in Chinese).
- [26] 张一健. 猫科动物肺炎克雷伯氏杆菌病的诊治[J]. *福建畜牧兽医*, 2007, 29(1): 54-55.
- ZHANG YJ. Diagnosis and treatment of *Klebsiella pneumoniae* in cats[J]. *Fujian Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2007, 29(1): 54-55 (in Chinese).
- [27] 钟世勋, 王迪, 曲亭合, 潘德琴, 黄璇, 李奕芙, 邵明旭, 朱瑞良. 不同动物种源肺炎克雷伯氏菌分离株 23S rRNA 序列分析[J]. *中国预防兽医学报*, 2013, 35(11): 937-939.
- ZHONG SX, WANG D, QU TH, PAN DQ, HUANG X, LI YF, SHAO MX, ZHU RL. Sequence analysis of 23S rRNA genes of different animal species *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2013, 35(11): 937-939 (in Chinese).
- [28] CHEN CM, TANG HL, CHIOU CS, TUNG KC, LU MC, LAI YC. Colonization dynamics of *Klebsiella*

- pneumoniae* in the pet animals and human owners in a single household[J]. *Veterinary Microbiology*, 2021, 256: 109050.
- [29] BRILHANTE M, GOBELI BRAWAND S, ENDIMIANI A, ROHRBACH H, KITTL S, WILLI B, SCHULLER S, PERRETE V. Two high-risk clones of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* that cause infections in pets and are present in the environment of a veterinary referral hospital[J]. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2021, 76(5): 1140-1149.
- [30] JIN M, OSMAN M, GREEN BA, YANG YF, AHUJA A, LU ZY, CAZER CL. Evidence for the transmission of antimicrobial resistant bacteria between humans and companion animals: a scoping review[J]. *One Health*, 2023, 17: 100593.
- [31] 张永华, 姚美玲. 宠物常见细菌性疾病及其防治[J]. *今日畜牧兽医*, 2023, 39(10): 92-94.
ZHANG YH, YAO ML. Common bacterial diseases of pets and their prevention and treatment[J]. *Today Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2023, 39(10): 92-94 (in Chinese).
- [32] 叶慧雯, 陈鸣远, 黄海钊, 郑恩沛, 张凌麒, 周彬, 张红. 犬源肺炎克雷伯菌的分离鉴定及对头孢菌素类药物的耐药性分析[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2023(23): 71-76, 133-134.
YE HW, CHEN MY, HUANG HZ, ZHENG EP, ZHANG LQ, ZHOU B, ZHANG H. Isolation and identification of *Klebsiella pneumoniae* from dogs and analysis of drug resistance to cephalosporins[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary*, 2023(23): 71-76, 133-134 (in Chinese).
- [33] 张铭琰, 耿英芝, 于森, 李雪, 刘海霞, 王伟杰, 魏彤竹, 孙婷婷, 张眉眉. 产超广谱 β -内酰胺酶沙门氏菌的分布与基因型研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(1): 170-174.
ZHANG MY, GENG YZ, YU M, LI X, LIU HX, WANG WJ, WEI TZ, SUN TT, ZHANG MM. Distribution and genotype of extended-spectrum β -lactamase-producing *Salmonella*[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2022, 13(1): 170-174 (in Chinese).
- [34] 祁会彩, 杨光敏, 潘康锁, 卜颖华, 王文同, 冶冬阳. 动物诊疗机构人用药品使用现象分析及建议[J]. *动物医学进展*, 2016, 37(11): 115-117.
QI HC, YANG GM, PAN KS, BU YH, WANG WT, YE DY. Analysis and suggestions on use of human medicine by animal medical institutions[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2016, 37(11): 115-117 (in Chinese).
- [35] SILVA JMD, MENEZES J, MARQUES C, POMBA CF. Companion animals-an overlooked and misdiagnosed reservoir of carbapenem resistance[J]. *Antibiotics*, 2022, 11(4): 533.
- [36] 朱利霞, 王洪彬, 赵希艳, 高桂生, 史秋梅, 高光平. 毛皮动物源肺炎克雷伯菌部分毒力基因、耐药基因检测及药敏试验[J]. *中国兽医学报*, 2019, 39(9): 1744-1752.
ZHU LX, WANG HB, ZHAO XY, GAO GS, SHI QM, GAO GP. Detection of virulence gene and resistance gene and drug sensitivity test of *Klebsiella pneumoniae* in fur-bearing animal[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2019, 39(9): 1744-1752 (in Chinese).
- [37] KOCSIS B. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: an update on epidemiology, detection and antibiotic resistance[J]. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 2023, 70(4): 278-287.
- [38] BAKHTIARI R, JAVADI A, AMINZADEH M, MOLAEI-AGHAEI E, SHAFFAGHAT Z. Association between presence of *RmpA*, *MrkA* and *MrkD* genes and antibiotic resistance in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from hospitals in Tehran, Iran[J]. *Iranian Journal of Public Health*, 2021, 50(5): 1009-1016.
- [39] ABBAS R, CHAKKOUR M, ZEIN EL DINE H, OBASEKI EF, OBEID ST, JEZZINI A, GHSSEIN G, EZZEDDINE Z. General overview of *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology and the role of siderophores in its pathogenicity[J]. *Biology*, 2024, 13(2): 78.