



新疆绵羊肺炎克雷伯菌分离鉴定及部分生物学特性研究

赵洁雅¹,陈世军²,杨会国³,郝 耿³,汪 萍²,马文戈²,夏 俊²

(1. 新疆农业大学,新疆 乌鲁木齐 830052;2. 新疆畜牧科学院 兽医研究所/动物临床医学研究中心,新疆 乌鲁木齐 830052;3. 新疆畜牧科学院 畜牧研究所,新疆 乌鲁木齐 830052)

摘要:为促进绵羊健康养殖生产和对肺炎克雷伯氏菌感染的诊断和防治,采集病死绵羊的脏器组织并从中分离出 1 株革兰阴性短杆菌,对细菌进行鉴定、药敏试验、毒力试验、16S rRNA 保守区的克隆、测序和序列比对。结果表明:PCR 条带长度约为 1 500 bp,基因序列与肺炎克雷伯氏菌同源性高达 99%,最终确诊为肺炎克雷伯菌。动物试验及药敏试验表明该菌具有较强的致病性,对头孢他啶等敏感,对青霉素耐药,推断此株肺炎克雷伯氏菌为导致绵羊死亡的主要病原菌。

关键词:绵羊;肺炎克雷伯氏菌;分离鉴定

肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)是革兰阴性杆菌,属于肠杆菌科肠道杆菌属,1893 年 Friedlander 从大叶性肺炎病人的肺脏中第一次分离到此种细菌,其广泛存在于人和动物肠道、呼吸道以及水、土壤、农产品和林产品中^[1]。可引起肺炎、支气管炎、泌尿道系统和创伤的感染,甚至脑膜炎、腹膜炎和败血症等^[2]。由于抗菌药物的广泛使用,导致该菌对多种抗菌药物产生了耐药性,从而使该菌所致疾病的预防和治疗难度增大,因而其发病率和死亡率均明显升高^[3]。肺炎克雷伯氏菌不仅对养殖业产生严重影响,在经济上造成重大损失,而且严重危害人类的身体健康^[4]。

据相关资料显示,各种降低免疫功能的慢性病、肾上腺皮质激素和其它免疫抑制剂的应用和某些创伤性诊疗技术也会增加肺炎克雷伯氏菌的易感性,是生产过程中不能忽视的问题。本试验对采集的病料进行了病原的分离、鉴定、基因克隆、药敏试验及毒力试验,最终确定该病情的病原为羊肺炎克雷伯氏菌,为绵羊健康养殖生产和对

肺炎克雷伯氏菌感染的诊断和治疗提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料采集 采集自新疆某发病羊场病死绵羊的肝和肺。

1.1.2 试验动物 由新疆乌鲁木齐疾控中心与预防中心提供的 BALB/c 小鼠。

1.1.3 培养基及试剂 LB 培养基购自青岛海博生物技术有限公司。细菌 DNA 提取试剂盒、胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒均为 TIANGEN 公司产品。2×PCR Mix 购自上海生工生物工程有限公司。pMD19-T 载体、T4 DNA 连接酶为宝生物工程(大连)有限公司产品。DL10000 DNA Marker、DL2000 DNA Marker 均为上海生工生物工程有限公司产品。生化试剂及其它试剂均为国产分析纯产品。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 细菌鉴定通用引物:5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3';5'-ACG-GTTACCTTGTTACGACTT-3'。由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2.2 组织涂片镜检 在无菌条件下,取病羊肺和肝组织涂片接种于普通 LB 培养平板,置 37 ℃ 培养 12~24 h,观察菌落形态特征。挑选典型菌落经革兰染色后在显微镜 100 倍油镜下观察菌体形态及染色特征。

收稿日期:2018-02-01

基金项目:边境地区家畜动物外来动物疫病监测溯源技术研究资助项目(2017YFD0501801);国家绒毛用羊产业技术体系寄生虫病防治岗位资助项目(CARS-39-15);肉羊产业提质增效关键技术与示范资助项目(2017B01005-2)。

第一作者简介:赵洁雅(1994-),女,在读学士,从事动物医学研究。E-mail:1429205786@qq.com。

通讯作者:夏俊(1980-),男,博士,副研究员,从事动物传染病研究。E-mail:xiajun2004263@163.com。

1.2.3 16S rRNA 基因的 PCR 扩增 在培养平板上无菌挑取单个菌落直接加入到反应体系中进行菌落 PCR 扩增,反应体系(25 μL): $2\times\text{Taq PCR Master Mix}$ 12.5 μL ,引物各 1 μL ,超纯水补至 25 μL ;反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 循环变性 30 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 退火复性 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s,进行 30 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 10 min,最后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,反应结束后产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,用琼脂凝胶回收试剂盒将 PCR 产物回收后,送上海生工生物工程有限公司测序。

1.2.4 动物试验 采用无菌操作技术,以 0.3 $\text{mL}\cdot\text{只}^{-1}$ 的剂量对小白鼠进行腹腔注射,对照组以 0.3 $\text{mL}\cdot\text{只}^{-1}$ 的剂量腹腔注射无菌 PBS,每组 5 只,健康小白鼠暂养 3 d 观察健康后进行致病性试验,在接种后每隔 3 h 观察 1 次,记录试验动物的临床表现,对死亡试验动物进行解剖,观察并记录各组织器官的病变;从死亡小白鼠肺脏和肝脏中再次分离细菌,并进行鉴定。

1.2.5 药敏试验 药敏试验参照刁菁等^[5]所述方法进行,将分离的纯培养物无菌划线于普通平板,静置 5 min 后用无菌镊子取药敏纸片分别贴于培养基表面,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后,测量各种药敏纸片的抑菌圈直径并判定结果。

2 结果与分析

2.1 组织涂片镜检

无菌取肝和肺等的组织,涂片并经革兰染色后于光学显微镜下观察,均可发现大量的革兰阴性粗短杆菌。

2.2 细菌的分离培养

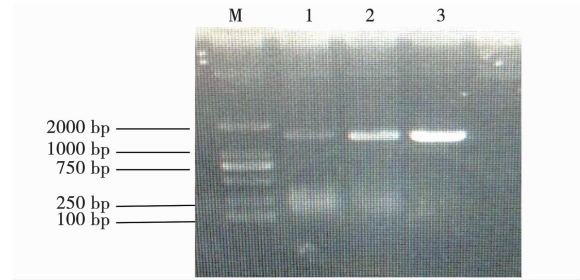
将病料划线接种于普通 LB 培养平板,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,可见该菌在平皿上形成灰白色、半透明、微隆起的圆形菌落,挑取时牵拉成丝,且菌落湿润。挑取单个菌落涂片并经革兰染色后镜检,可见革兰阴性的粗短杆菌、荚膜明显、无芽孢、菌体两端顿圆、单个散在,少数菌体两两相连,中等大小粗短杆菌。

2.3 16S rRNA 扩增及测序鉴定结果

16S rRNA 基因扩增结果显示,其 PCR 扩增产物约为 1 500 bp(图 1)。测序结果为:TGCAG TCGAACGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTC GGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAAT

GTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGAT
AACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCA
TAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCT
TCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAG
ATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACG
GCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGT
CTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAC
GAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGC
AGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGC
AAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATG
AAGAAGGCCTTCGGGTGTAAAGTACTTT
CAGCGGGGAGGAAGGGAATAAGGTAAAT
AACCTTGTTTCATTGACGTTACCCGCAGAA
GAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGC
CGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAA
TCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCA
GGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCC
CCGGGCTCAACCTGGGAACCTGCATTGAA
ACTGGCAGGCTGGAGTCTTGTAGAGGGGG
GTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGC
GTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGA
AGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCT
CAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG
ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAA
ACGATGTGCGACTTGGAGGTTGTTCCCTTG
AGGAGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAA
GTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAG
GTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCC
CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT
TCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACT
CTTGACATCCAGAGAACTTAGCAGAGATG
CTTTGGTGCCTTCGGGAACCTCTGAGACAG
GTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTT
GTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGA
GCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGG
TCCGGCCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCA
GTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGA
CGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAG
GGCTACACACGTGCTACAATGGCATATAC
AAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCG
GACCTCATAAAGTATGTTCGTAGTCCGGAT
TGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTC

GGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTA CACACCGCCCGTCAACCATGGGAGTGGGT TGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCG GGAGGGCG。对测序结果进行 BLAST 分析,显示该菌 16S rRNA 基因序列与肺炎克雷伯氏菌 16S rRNA 基因序列的同源性为 99%。因此,确定分离菌为肺炎克雷伯氏菌。



M:DL2000 DNA Marker;1,2,3 为分离菌株。
M:DL2000 DNA Marker;1,2,3 are isolated strains.

图 1 PCR 扩增产物

Fig. 1 PCR amplification products

2.4 动物试验致病性结果

试验组小鼠在 4 h 后开始发病,表现为精神不振,呼吸困难,全身哆嗦,闭眼缩颈,畏寒,挤堆嗜睡,食欲减退。接种 8~16 h 全部死亡(图 2),腹腔有胶冻样积液,肠道严重臌气,肺脏有实变和充血,肾脏有出血点等症状,与自然发病小鼠症状一致;对照组连续观察 7 d 未见异常。从死亡小鼠肺脏中再次分离到的菌株经鉴定与试验菌株一致。



图 2 小鼠攻毒试验

Fig. 2 Drug attack test of mice

2.5 药敏试验结果

分别测量 5 株 Kpn 的抑菌环大小,取其平均值(表 1)。结果表明,该菌具有较强的致病性,对

头孢他啶等敏感,对青霉素耐药,可能与青霉素的大量使用有关。

表 1 分离株的药物敏感性试验
Table 1 Antibiotic sensitivity test of the bacteria isolates

药物名称 Drug names	抑菌圈直径/mm Diameter of the inhibition zone	敏感程度 Sensitivity
头孢曲松 Ceftriaxone	23.0	S
头孢他啶 Ceftazidime	24.5	S
舒巴坦 Sulbactam	22.0	S
先锋霉素 VI Cephalosporin VI	11.5	I
先锋霉素 V Cephalosporin V	10.0	I
四环素 Tetracycline	4.0	R
卡那霉素 Kanamycin	3.2	R
红霉素 Erythromycin	4.0	R
卡那霉素 Kanamycin	5.2	R
新生霉素 Novobiocin	5.5	R
庆大霉素 Gentamicin	4.5	R
链霉素 Streptomycin	4.8	R
青霉素 Penicillin	0	R
氨苄西林 Ampicillin	3.5	R
左氟沙星 Levofloxacin	0	R
利福平 Rifampicin	2.3	R
氨苄青霉素 Ampicillin	6.0	R

S:敏感;I:中感;R:抗感。
R; Resistance; I; Intermediate susceptibility; S; Susceptibility.

3 结论与讨论

本试验通过对发病绵羊进行细菌分离,根据培养特性、理化特征和 16S rRNA 序列分析,判定分离得到的菌株为肺炎克雷伯氏菌,选择试验动物小白鼠对分离菌株进行致病性试验,该菌对供试的小白鼠有致病性,确定分离得到菌株为此次绵羊发病的主要病原菌。该菌对供试的头孢曲松等药物高度敏感,对青霉素等耐药,这可能与青霉素的大量使用有关。建议临床上选用高敏药物或中敏药物进行治疗,避免滥用抗生素而引起的病原菌对大量药物产生耐药性。

克雷伯菌对营养的要求不高,在普通培养基上就可以生长良好,形成灰白色较大的粘性菌落,用接种环挑取时易拉成丝,这一特性有助于对该

菌的诊断。在肠杆菌选择培养基上能发酵乳糖使菌落显色。本文中对该菌的确诊,还需要做基因测序,通过对细菌 16S rRNA 保守区的克隆、测序和序列比对,最终才能对克雷伯菌进行确诊。该方法较传统的细菌涂片染色后形态学观察、生化试验、动物试验等更加快速、准确。

克雷伯菌的研究在我国主要集中在人类的呼吸道病原方面,而在绵羊肺炎病原菌研究方面的报道非常少。近几年,随着养羊业规模化程度越来越高,呼吸道疾病的发病率及危害也日益严重化。此前报道绵羊肺炎的病原以巴氏杆菌或支原体为多,本文中从绵羊肺炎病例的病料中检测到克雷伯菌,这为今后绵羊肺炎的诊断和防治了提

供一定的参考。

参考文献:

- [1] 马磊,颜其贵,万莉,等. 竹鼠肺炎克雷伯氏菌的分离鉴定[J]. 中国人兽共患病学报,2011,27(9):825-827.
- [2] 冯娜,高翔,肖敏,等. 牛源肺炎克雷伯氏菌的分离鉴定及遗传进化分析[J]. 中国兽医科学,2016,46(11):1358-1364.
- [3] Padilla E, Llobet E, Doménech-Sánchez A, et al. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence [J]. Antimicrobial Agents & Chemotherapy, 2010, 54(1):177.
- [4] 王秀坤,王克军,孙宇. 绒山羊肺炎克雷伯氏菌病的诊断与治疗报告[J]. 现代畜牧兽医,2013(4):33-34.
- [5] 刁菁,杨秀生,李天保,等. 病原微生物药敏检测方法的研究进展[J]. 中国农学通报,2013,29(8):1-5.

Isolation and Identification of Sheep *Klebsiella pneumoniae* in Xinjiang and the Research of Its Partial Biological Characteristics

ZHAO Jie-ya¹, CHEN Shi-jun², YANG Hui-guo³, HAO Geng³, WANG Ping², MA Wen-ge², XIA Jun²

(1. Xinjiang Agriculture University, Urumqi 830052, China; 2. Veterinary Research Institute, Xinjiang Academy of Animal Science, Animal Clinical Medicine Research Center, Urumqi 830052, China; 3. Institute of Animal Science, Xinjiang Academy of Animal Science, Urumqi 830052, China)

Abstract: In order to promote the healthy production of sheep and provide reference for the diagnosis and prevention of *Klebsiella pneumoniae* infection, the organ tissues of dead sheep were collected, and a gram-negative bacilli was isolated from it. The bacteria were identified and the drug sensitivity test, virulence test, 16S rRNA conserved region cloning, sequencing and sequence alignment were carried out. The results showed that the length of PCR band was about 1 500 bp, and the homology of *Klebsiella pneumoniae* was up to 99%, and *Klebsiella pneumoniae* was finally confirmed. Animal test and drug sensitivity test showed that the bacteria had strong pathogenicity, and the bacteria was sensitive to ceftazidime and was resistant to penicillin. It was inferred that *Klebsiella pneumoniae* was the main pathogen causing the death of sheep.

Keywords: sheep; *Klebsiella pneumoniae*; isolation and identification

致 读 者

为适应我国信息化建设,扩大本刊及作者知识信息交流渠道,本刊现被《中国学术期刊网出版总库》及 CNKI 等系列数据库收录,其作者文章著作权使用费与本刊稿酬一次性给付。如作者不同意文章被收录,请在来稿时声明,本刊将做适当处理。

《黑龙江农业科学》编辑部