

# 扬子鳄源 ST-25 型肺炎克雷伯氏菌的分离鉴定及致病性分析

梁引龙<sup>1</sup>, 葛梦丽<sup>1</sup>, 徐佳俊<sup>1</sup>, 吴飞<sup>1</sup>, 米家伟<sup>1</sup>, 丁琦瑛<sup>1</sup>, 陈洪超<sup>1</sup>,  
周永康<sup>2</sup>, 易平四<sup>2</sup>, 徐前明<sup>1\*</sup>

1 安徽农业大学 动物医学院, 安徽 合肥

2 安徽扬子鳄国家级自然保护区管理局, 安徽 宣城

梁引龙, 葛梦丽, 徐佳俊, 吴飞, 米家伟, 丁琦瑛, 陈洪超, 周永康, 易平四, 徐前明. 扬子鳄源 ST-25 型肺炎克雷伯氏菌的分离鉴定及致病性分析[J]. 微生物学报, 2026, 66(5): 2371-2383.

LIANG Yinlong, GE Mengli, XU Jiajun, WU Fei, MI Jiawei, DING Qiyang, CHEN Hongchao, ZHOU Yongkang, YI Pingsi, XU Qianming. Isolation, identification, and pathogenicity analysis of ST25 *Klebsiella pneumoniae* from *Alligator sinensis*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(5): 2371-2383.

**摘要:**【目的】探明一例起源于安徽省扬子鳄繁殖研究中心的成年鳄死因。【方法】分别从该成年鳄的心、肝、脾、肺中进行病原分离培养, 采用形态观察、生化特性及分子生物学方法进行鉴定; 利用拉丝试验判定黏液表型; 根据 7 个管家基因进行多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST); 通过毒力基因分析、致病性试验、耐药基因分析及药物敏感性试验, 阐明分离菌株的致病性和耐药性。【结果】从 4 种组织脏器中分离出的病原菌为形态一致的革兰阴性杆菌, 结合生化试验、16S rRNA 基因和 *khe* 基因鉴定结果, 确定菌株均为肺炎克雷伯氏菌(命名为 YZE01), 经荚膜血清型鉴定为 K2 型; 拉丝试验呈阳性, 表明该菌株为高黏液型; MLST 分析表明, 该菌为 ST25 型; 毒力基因检测显示, 其携带 *rmpA*、*rmpA2*、*entB*、*fimH*、*markD* 和 *wabG* 这 6 种毒力基因。致病性试验显示, 部分受试小鼠在感染后 24 h 内死亡, 剖检后在其心、肝、脾、肺中均可分离出该菌; 且肝肺组织呈现不同程度的出血和淤血病变; 此外, RT-qPCR 结果显示, 肺组织炎症因子 *IL-1 $\beta$* 、*IL-6*、*IL-8* 及 *TNF- $\alpha$*  的表达水平在 12 h 时达到高峰后下降。在耐药性方面, 该菌株同时携带 *blaSHV*、*armA* 和 *ermB* 这 3 种耐药基因, 对头孢氨苄、头孢唑林、氨苄西林、链霉素、庆大霉素、红霉素、罗红霉素和克林霉素均不敏感。【结论】所分离的肺炎克雷伯氏菌 YZE01 株携带多种毒力基因, 具有较强的致病性和耐药性, 对扬子鳄具有显著的损伤和致死作用, 可为扬子鳄疾病的防控提供有效手段。

资助项目: 2024年扬子鳄疾病防控预警检测项目合同(24375003)

This work was supported by the *Alligator sinensis* Disease Prevention and Control Early Warning Detection Project in 2024 (24375003).

\*Corresponding author. E-mail: xuqianming2006@163.com

Received: 2025-11-24; Accepted: 2026-01-09; Published online: 2026-01-21

关键词：扬子鳄；肺炎克雷伯菌；分离鉴定；致病性；耐药性

## Isolation, identification, and pathogenicity analysis of ST25 *Klebsiella pneumoniae* from *Alligator sinensis*

LIANG Yinlong<sup>1</sup>, GE Mengli<sup>1</sup>, XU Jiajun<sup>1</sup>, WU Fei<sup>1</sup>, MI Jiawei<sup>1</sup>, DING Qiyang<sup>1</sup>, CHEN Hongchao<sup>1</sup>, ZHOU Yongkang<sup>2</sup>, YI Pingsi<sup>2</sup>, XU Qianming<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> College of Veterinary Medicine, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui, China

<sup>2</sup> Anhui *Alligator sinensis* National Nature Reserve Administration, Xuancheng, Anhui, China

**Abstract:** [Objective] To determine the cause of death of an adult crocodile in the *Alligator sinensis* Management Center in Anhui Province. [Methods] Bacteria were isolated from the heart, liver, lung, and spleen via the culture method, and the isolates were identified by morphological observation, biochemical tests, and molecular biological methods. Furthermore, the mucus phenotype was determined by means of the string test. Multilocus sequence typing (MLST) was conducted on the basis of seven housekeeping loci. Virulence gene analysis, pathogenicity test, drug resistance gene analysis, and antimicrobial susceptibility testing were conducted to clarify the pathogenicity and drug resistance of the isolates. [Results] The pathogenic bacteria isolated from the four organs were morphologically consistent Gram-negative bacilli. Through biochemical tests and 16S rRNA gene and *khe* sequencing, the isolates were identified as *Klebsiella pneumoniae* YZE01, capsular serotype K2. String test showed that the strain was hypermucinous *K. pneumoniae*, and MLST analysis showed that the strain belonged to sequence type 25 (ST25). The strain carried six virulence genes: *fimH*, *entB*, *rmpA*, *rmpA2*, *mrkD*, and *wabG*. Pathogenicity tests showed that some of the tested mice died within 24 h after infection with YZE01, and the same strain was isolated from the heart, liver, lung, and spleen. The lung tissue of infected mice showed hemorrhage and congestion lesions to different degrees. In addition, RT-qPCR revealed that the transcript levels of *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *IL-8*, and *TNF- $\alpha$*  in the lung peaked at 12 h post-infection and then declined. The strain carried three drug resistance genes (*blaSHV*, *armA*, and *ermB*), and it was not sensitive to cephalexin, cefazolin, ampicillin, streptomycin, gentamicin, erythromycin, roxithromycin, and clindamycin. [Conclusion] The isolated strain *K. pneumoniae* YZE01 carries a variety of virulence genes and has strong pathogenicity and drug resistance. It is considered as a major cause of death in *A. sinensis*. The findings are conducive to the prevention and control of diseases in *A. sinensis*.

**Keywords:** *Alligator sinensis*; *Klebsiella pneumoniae*; isolation and identification; pathogenicity; drug resistance

扬子鳄(*Alligator sinensis*)作为我国特有的一种小型鳄类，被列为国家一级保护动物，且被

世界自然保护联盟列为濒危物种。近些年来，随着自然保护区相继建立、人工繁育技术不断

完善, 扬子鳄种群数量明显增长。然而, 适宜栖息地稀少且高度破碎, 加之环境污染, 病原体(尤其是致病性细菌)成为严重威胁扬子鳄健康与生存的重要因素之一, 如沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)<sup>[1]</sup>、雷氏普罗威登斯菌(*Providencia rettgeri*)<sup>[2]</sup>和肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)<sup>[3]</sup>等。

肺炎克雷伯氏菌作为一种广泛存在于自然界的条件性致病菌, 因其显著的致病性和日益严峻的耐药性问题而备受关注。据 2023 年全国细菌耐药监测网报告, 该菌在人体呼吸道中的检出率位居第二, 且在 72 006 株分离株中有将近 20% 表现出多重耐药特征<sup>[4]</sup>。该菌可感染多种动物宿主(包括猪、马、牛等)<sup>[5]</sup>, 感染后主要表现为呼吸困难、精神萎靡、食欲减退等症状, 严重时可导致迅速死亡<sup>[6]</sup>。国内外已报道多起人和动物感染肺炎克雷伯氏菌的病例<sup>[3]</sup>, 其中黄喉拟水龟(*Mauremys mutica*)也面临感染风险。由于集约化养殖加速了该菌的传播, 其危害性尤为突出<sup>[7]</sup>, 是黄喉拟水龟死亡率上升的主要原因之一, 给养殖业带来巨大经济损失。然而, 关于扬子鳄感染该菌的报道仍然匮乏, 且扬子鳄源肺炎克雷伯氏菌的耐药特征仍未明确。本研究对该菌进行分离与鉴定, 并对其致病性、毒力基因和耐药基因携带情况进行系统性分析, 以期为该病的防控提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 样本来源与实验动物

病料取自安徽省扬子鳄繁殖研究中心一头病死扬子鳄, 剖检可见肝肺组织呈现不同程度的出血和淤血病变, 脾脏显著肿大。在无菌环境下采集其心、肝、脾、肺组织, 用于病原分离。实验动物选用 6 周龄的无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级雌性昆明鼠, 由安徽医科大学实验动物中心提供。

本研究所有动物实验均获得安徽农业大学

科技伦理委员会的批准, 编号为 KJLL2025021。实验严格遵守国际公认的实验动物护理和使用指南(ARRIVE 指南), 以最大限度减少动物痛苦。

### 1.2 主要试剂和仪器

固体 LB 培养基, 西陇科学股份有限公司; 脱脂绵羊血, 常德比克曼生物科技有限公司; 增强革兰氏染色液, 上海源叶生物科技有限公司; 生理生化反应管、药敏片, 杭州微生物试剂有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 2×M5 HiPer plus Taq HiFi PCR mix, 北京聚合美生物科技有限公司; 蛋白酶 proteinase K、DL2000 DNA marker、PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit, 宝生物工程(大连)有限公司; Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

电热恒温培养箱, 上海三发科学仪器有限公司; 恒温培养摇床, 上海溪乾仪器设备有限公司; 单人单面垂直净化工作台, 山东高芯生物传感器研究院有限公司; T100™ PCR 仪, Bio-Rad 公司; 核酸电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; 凝胶成像系统, 上海勤翔科学仪器有限公司; 实时荧光定量 PCR 仪, 赛默飞世尔科技公司。

### 1.3 细菌的分离与鉴定

#### 1.3.1 细菌的分离培养

参照文献[8]的方法, 在无菌条件下将采集的组织置于离心管中, 加入适量生理盐水进行研磨。在超净台中用一次性接种环蘸取研磨液, 接种于麦康凯和新鲜绵羊血琼脂培养基, 进行分离培养。将纯分后的菌落按常规革兰氏染色法染色, 镜检观察其形态。

#### 1.3.2 生化鉴定

挑取单菌落接种于生化鉴定管中, 置于 37 °C 恒温培养箱中培养 18 h, 观察反应变化, 将试验结果与《伯杰细菌鉴定手册》(第 8 版)<sup>[9]</sup>

进行比对。

### 1.3.3 分离菌株的 PCR 鉴定和 16S rRNA 基因序列分析

根据细菌基因组 DNA 提取试剂盒的方法提取分离菌株的 DNA, 用于后续试验。根据 16S rRNA 基因通用引物(27F 和 1423R)及肺炎克雷伯氏菌的特异性基因 *khe* 引物(表 1)进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(20  $\mu$ L): 2 $\times$ M5 HiPer plus Taq HiFi PCR mix 10  $\mu$ L, 上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L, DNA 模板 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 6  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 25 s, 58  $^{\circ}$ C 退火 25 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 终延伸 5 min。所有引物均由南京擎科生物科技有限公司合成(下同), 产物经纯化后送至该公司进行测序, 将测序结果在 BLAST 数据库中进行比对分析, 并运用 MEGA X 软件以邻接法构建系统发育树。

### 1.3.4 荚膜血清型鉴定

以提取得到的 DNA 为模板, 参照文献[10]中的引物序列和反应条件对分离株进行肺炎克雷伯氏菌常见的 K1、K2、K5、K20、K54 和 K57 荚膜血清型的 PCR 扩增。

### 1.3.5 拉丝试验

使用灭菌接种环将菌液划线接种至麦康凯琼脂平板, 37  $^{\circ}$ C 培养 24 h 后, 挑选单菌落进行拉丝试验测试菌株黏性。若有黏液丝形成且长度 $\geq$ 5 mm, 则判定该菌株为高黏液型。

## 1.4 多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)

参照文献[10], 合成肺炎克雷伯氏菌 7 个管

家基因 *gapA*、*infB*、*pgi*、*mdh*、*rpoB*、*tonB* 和 *phoE* 的引物。以提取的 DNA 为模板, 根据 1.3.3 节的反应体系以及以下反应条件进行 PCR 扩增: 95  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 25 s, 55  $^{\circ}$ C 25 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 共 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 5 min。阳性产物进行测序后将测序结果提交至 PubMLST (<https://pubmlst.org/organisms/pseudomonas-aeruginosa>) 数据库中, 获得菌株的 ST 分型。

## 1.5 毒力基因检测

取肺炎克雷伯氏菌的 DNA 为模板, 参照文献[11-12]合成肺炎克雷伯氏菌的 14 个毒力基因 *rmpA*、*rmpA2*、*magA*、*iutA*、*entB*、*iroB*、*kfu*、*iucA*、*aerobactin*、*fimH*、*markD*、*allS*、*wabG*、*wcaG* 的引物, 并根据该文献中的反应条件完成 PCR 扩增。将产物置于 1.5% 琼脂糖凝胶中进行电泳分离, 最后借助凝胶成像系统进行观察分析, 以确定分离菌株是否携带相应的毒力基因, 为后续研究提供关键依据。

## 1.6 致病性试验

参照文献[13], 通过预实验进行浓度梯度筛选, 分别设置  $2\times 10^8$ 、 $2\times 10^9$ 、 $2\times 10^{10}$  CFU/mL 3 个浓度梯度开展小鼠攻菌试验, 发现以  $2.0\times 10^9$  CFU/mL 的菌液浓度为适宜浓度。选购 20 只 6 周龄的 SPF 雌性昆明鼠进行致病性分析。将小鼠随机分为 1 组对照组和 3 组实验组(5 只/组), 进行 3 次独立的生物学重复实验。实验组腹腔注射分离菌菌液 0.2 mL ( $2\times 10^9$  CFU/mL); 对照组注射等量普通 LB 培养基, 隔离饲养, 定时观察小鼠生理状况并记录。待小鼠死亡后剖检, 观察各脏器组织的病理变化, 并在无菌条件下, 在血平板上接种死亡小鼠的病变组织进

表1 相关引物序列

Table 1 Sequences of relevant primers

Gene names	Primer sequences (5'→3')	Amplicon size/bp	Annealing temperature/ $^{\circ}$ C
<i>khe</i>	F: TGATTGCATTCGCCACTGG R: GGTCAACCCAACGATCCTG	428	58
16S rRNA	27F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 1429R: GGTTACCTTGTTACGACTT	1 465	60

行细菌的分离培养, 参照 1.3.3 节的方法对各脏器的分离菌株进行 PCR 鉴定。

## 1.7 肺部组织炎症相关基因 mRNA 表达水平

按照 TRIzol 法提取肺部组织总 RNA, 检测 RNA 纯度并调整其浓度。根据反转录试剂盒说明书将 RNA 反转录成 cDNA。参照文献[14-15]合成引物序列, RT-qPCR 方法检测 *IL-1 $\beta$* 、*IL-6*、*IL-8* 和 *TNF- $\alpha$*  基因的 mRNA 表达水平, 并以  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法进行数据分析。进行 3 次生物学重复后, 数据采用 GraphPad Prism 9.5 软件中的 one-way ANOVA 进行数据统计与图形绘制, 结果均以 mean $\pm$ SD 表示, 其中  $P < 0.05$  表示差异显著,  $P < 0.01$  和  $P < 0.001$  表示差异极显著。

## 1.8 耐药基因的检测

以提取的肺炎克雷伯氏菌 DNA 为模板, 按参考文献[16]合成 14 个特异性耐药基因引物: *bla<sub>SHV</sub>*、*bla<sub>NDM-1</sub>*、*bla<sub>KPC</sub>*、*bla<sub>ACT</sub>*、*bla<sub>OXA</sub>*、*ereA*、*ermB*、*mphA*、*armA*、*rmtB*、*rmtC*、*catA*、*cmlA* 和 *floR*, 并根据该文献中的反应条件进行 PCR 扩增。将产物置于 1.5% 琼脂糖凝胶中进行电泳分离, 最后借助凝胶成像系统进行观察分析。

## 1.9 药物敏感性试验

根据美国临床与实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)指南推荐采用琼脂纸片扩散试验观察所分离菌株对药物的敏感性。取调整  $OD_{600}$  值在 0.08–0.10 的菌液 100  $\mu$ L, 用无菌涂布器涂布于 LB 固体培养基上, 静置干燥后用无菌镊将药敏纸片贴于培养基表面, 37  $^{\circ}$ C 恒温培养过夜, 用直尺测量抑菌圈直径, 进行 3 次生物学重复, 结果以 mean $\pm$ SD 表示, 根据 CLSI 标准进行药物敏感性判定。

# 2 结果与分析

## 2.1 细菌的分离与鉴定

### 2.1.1 细菌的分离培养

四种组织样本经血琼脂平板培养后, 均长

出中央突起、表面光滑、形态一致的灰白色菌落。经革兰氏染色后, 在显微镜(1 000 $\times$ )下可见呈单个或短链排列的粗短杆菌, 呈红色, 初步判断为革兰阴性杆菌。鉴于各脏器分离株的形态与染色特征完全相同, 后续实验选取其中一株作为代表进行深入研究。

### 2.1.2 生化鉴定结果

生化鉴定结果显示, 该分离菌株可发酵葡萄糖、乳糖、山梨醇、蔗糖、木糖、阿拉伯糖及 D-核糖; 枸橼酸盐利用、尿素酶和赖氨酸脱羧酶试验均呈阳性; 而苯丙氨酸脱氨酶、鸟氨酸脱羧酶试验以及硫化氢产生试验均呈阴性, 这与肺炎克雷伯氏菌的生化特性一致, 初步判断该菌为肺炎克雷伯氏菌。

### 2.1.3 16S rRNA 基因、*khe* 基因 PCR 鉴定及系统发育树构建

以细菌 16S rRNA 基因的通用引物进行 PCR 扩增, 得到的条带长度约为 1 500 bp (图 1A), 进一步对分离菌株进行 *khe* 基因 PCR 鉴定, 扩

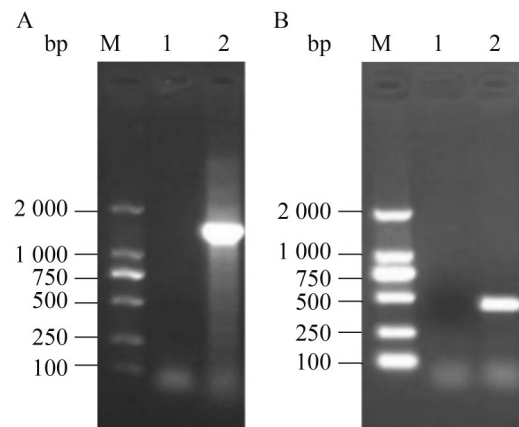


图1 分离菌株YZE01 16S rRNA基因和*khe*基因 PCR扩增结果

Figure 1 PCR amplification results of 16S rRNA gene and *khe* gene from the isolated strain YZE01. A: 16S rRNA gene PCR amplification results; B: *khe* gene PCR amplification results. Lane M: DL2000 DNA marker; Lane 1: Negative; Lane 2: The isolated strain.

增大大小约为 428 bp 的特异性条带(图 1B), 与目的条带大小相符。将 16S rRNA 基因序列在 NCBI 中进行 BLAST 检索, 登录号为 PX588409, 结果显示分离菌株与 GenBank 中肺炎克雷伯氏菌参考株(CP130561.1)的相似性达 99.61%。系统发育树分析表明分离菌株与肺炎克雷伯氏菌(LR890569)处于同一进化分支(图 2)。综上所述, 可确定分离菌株为肺炎克雷伯氏菌, 并命名为 YZE01。

### 2.1.4 荚膜血清分型结果

PCR 扩增结果显示, K2 型血清型引物扩增产物在 641 bp 处有明亮的条带(图 3), 与目的条带大小一致, 因此鉴定分离的 YZE01 株为 K2 型肺炎克雷伯氏菌。

### 2.1.5 拉丝试验结果

接种环轻触菌落后形成长度大于 5 mm 的黏液丝(图 4), 符合阳性特征。

## 2.2 多位点序列分型(MLST)

针对所分离的 YZE01 株进行 7 个管家基因

的扩增和测序, 并将测序结果与 MLST 数据库中的标准序列比较, 进而鉴定所分离的 YZE01 株为 ST25 型。

### 2.3 分离菌株的毒力基因分析

肺炎克雷伯氏菌 YZE01 株共检测出 6 种毒力基因, 分别为 *rmpA*、*rmpA2*、*entB*、*fimH*、*markD* 和 *wabG* (图 5)。其余 8 种毒力基因: *magA*、*iutA*、*iroB*、*kfu*、*iucA*、*aerobactin*、*allS*、*wcaG* 均未检出。

### 2.4 分离菌株致病性分析

攻毒 18 h 后, 实验组小鼠呼吸加重、被毛凌乱、食欲减退; 对照组小鼠精神状态、运动情况和饮食情况等均正常。感染 36 h 后实验组小鼠全部死亡; 对照组未见任何异常(图 6A)。剖检死亡小鼠, 可见其肺脏实变且出血严重、肝脏肿大(图 6B)。对攻菌后小鼠脏器细菌带菌情况分析表明, 死亡小鼠体内各脏器分离所得菌落形态一致(图 6C), 经 *khe* 基因鉴定, 确定

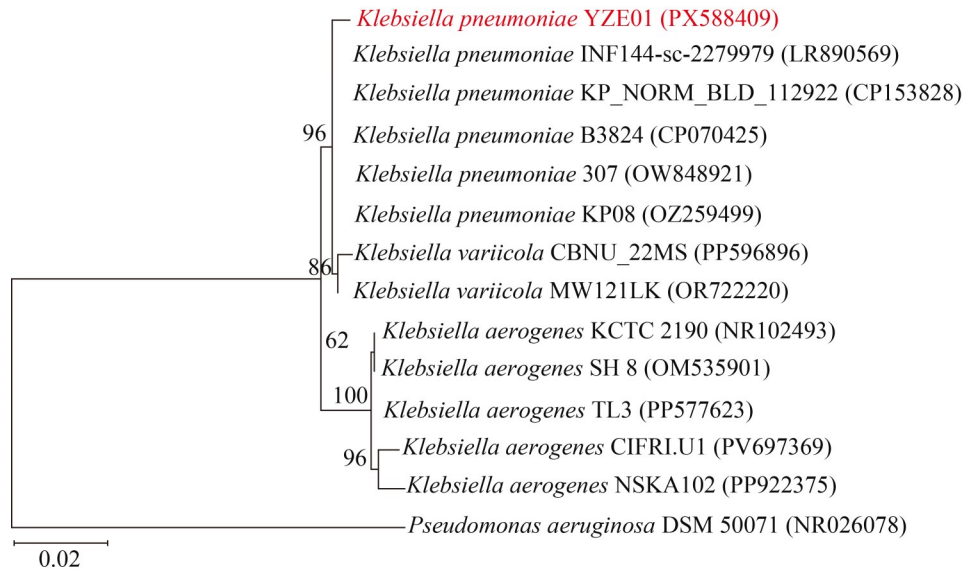


图2 分离菌株16S rRNA基因序列系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences of isolated strains. The phylogenetic tree depicts evolutionary relationships among strains, with terminal branches labeled by strain names and corresponding GenBank accession numbers; Bootstrap values at nodes indicate statistical support for each clade; The scale bar (0.02) represents nucleotide substitutions per site.

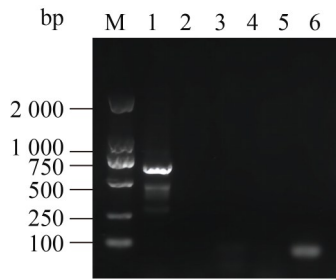


图3 荚膜血清分型

Figure 3 Capsule serotyping. Lane M: DL2000 DNA marker; Lane 1: K2; Lane 2: K1; Lane 3: K5; Lane 4: K20; Lane 5: K54; Lane 6: K57.

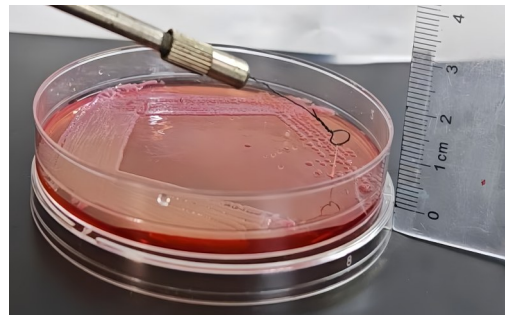


图4 拉丝试验结果

Figure 4 Wire drawing test results.

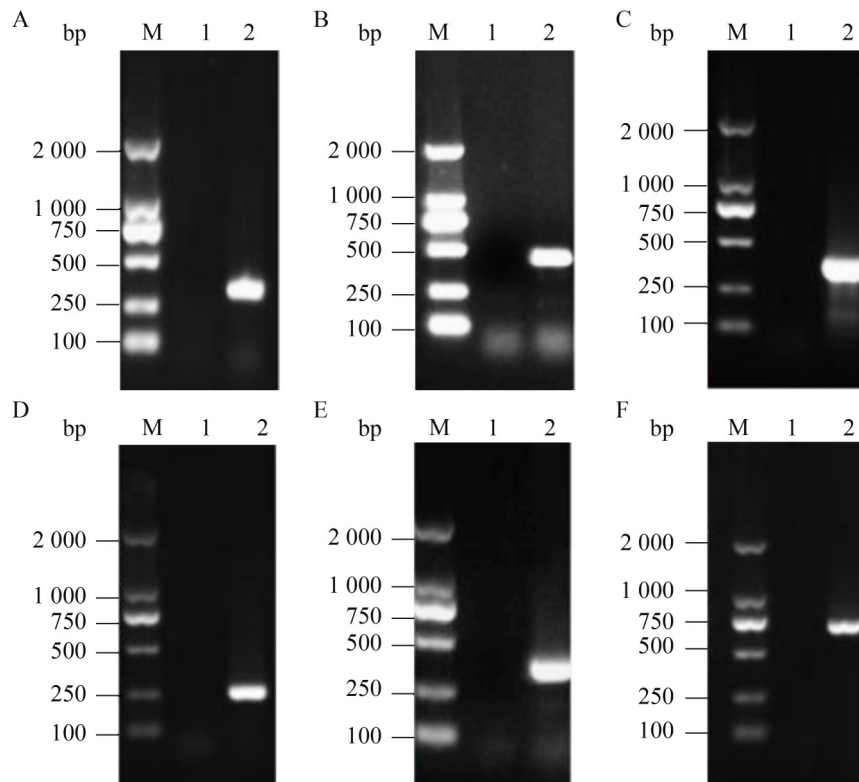


图5 毒力基因的鉴定结果

Figure 5 Identification results of virulence genes. A: *rmpA* gene; B: *rmpA2* gene; C: *entB* gene; D: *fimH* gene; E: *markD* gene; F: *wabG* gene. Lane M: DL2000 DNA marker; Lane 1: Negative; Lane 2: The isolated strain.

其均为肺炎克雷伯氏菌(图 6D)。

## 2.5 肺部组织炎症相关基因 mRNA 表达分析

感染肺炎克雷伯氏菌的肺部组织中，炎症

相关基因 mRNA 表达水平结果显示：*IL-1β*、*IL-6*、*IL-8*、*TNF-α* 基因总体呈现先上升，后下降的趋势，在 12 h 达到顶峰。与对照组相比，*IL-1β*、*IL-6* 的 mRNA 表达量在感染 6 h 和 12 h

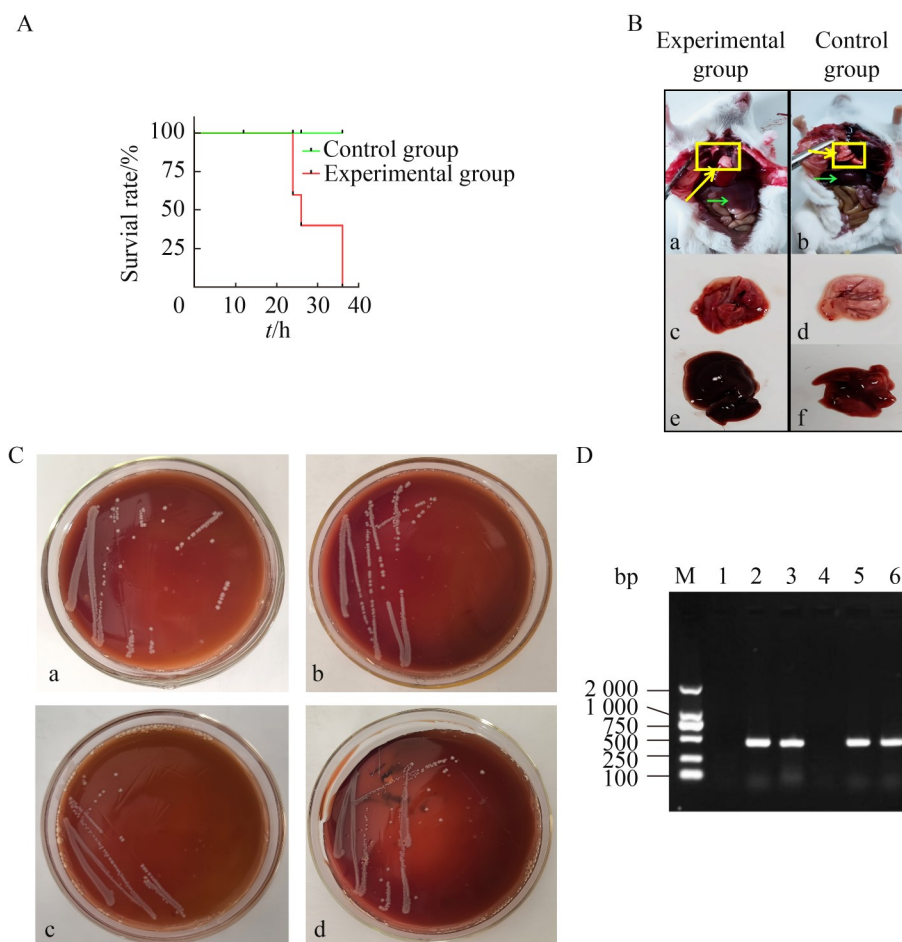


图6 小鼠剖检对比及各脏器分离菌的鉴定

Figure 6 Comparative necropsy of mice and identification of bacteria isolated from various organs. A: Survival curves; B: Laparotomy diagram (a: Experimental group; b: Control group; c–d: Lung; e–f: Liver); C: Colony morphology of bacterial isolates from various organs (a: Isolated heart bacteria; b: Isolated liver bacteria; c: Isolated spleen bacteria; d: Isolated lung bacteria); D: *khe* gene-based identification of bacterial isolates from various organs (Lane M: DL2000 DNA marker; Lane 1: Negative; Lane 2: Spleen; Lane 3: Liver; Lane 4: Kidney; Lane 5: Lung; Lane 6: Heart).

极显著升高( $P < 0.001$ ), 12 h 达到高峰; *IL-8* 的 mRNA 表达量在感染 6 h 无明显差异, 在 12 h 和 24 h 极显著升高( $P < 0.001$ ); *TNF- $\alpha$*  的 mRNA 表达量在感染 6 h 显著升高( $P < 0.05$ ), 在 12 h 和 24 h 极显著升高( $P < 0.001$ ) (图 7)。

## 2.6 分离菌株耐药基因分析

肺炎克雷伯氏菌 YZE01 株仅检出 3 种耐药基因, 分别为 *bla<sub>SHV</sub>*、*armA* 和 *ermB* (图 8), 其

余耐药基因均未检出。

## 2.7 分离菌株药物敏感性分析

药敏试验结果如表 2 所示, 肺炎克雷伯氏菌 YZE01 株对头孢曲松、复方新诺明、丁胺卡那、氧氟沙星、诺氟沙星、环丙沙星、多黏菌素 B 敏感, 对头孢氨苄、头孢唑林、氨苄西林、链霉素、庆大霉素、红霉素、罗红霉素、克林霉素耐药。

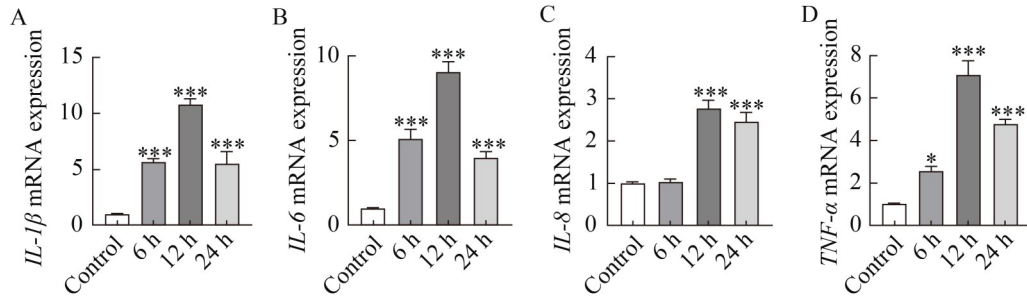


图7 小鼠肺部组织相关基因mRNA相对表达水平

Figure 7 The relative mRNA expression levels of related genes in mouse lung tissue. A: *IL-1 $\beta$*  mRNA expression; B: *IL-6* mRNA expression; C: *IL-8* mRNA expression; D: *TNF- $\alpha$*  mRNA expression. \*  $P < 0.05$ : Significant difference; \*\*  $P < 0.01$ : Highly significant; \*\*\*  $P < 0.001$ : Extremely significant.

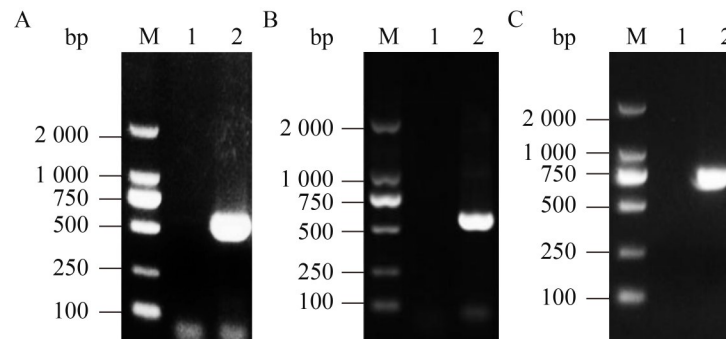


图8 耐药基因的鉴定结果

Figure 8 Identification results of drug resistance genes. A: *bla<sub>SHV</sub>* gene; B: *armA* gene; C: *ermB* gene. Lane M: DL2000 DNA marker; Lane 1: Negative; Lane 2: The isolated strain.

### 3 讨论与结论

扬子鳄作为湿地生态系统的重要物种, 对维持生态平衡起着关键作用。一旦被高耐药或高毒力的细菌感染, 不仅会直接危害个体健康, 还可能通过食物链传播抗性基因, 进而加剧抗生素耐药性在环境中的传播风险<sup>[17]</sup>。这也凸显了在野生动物保护工作中加强抗菌药物管理的重要性。

本研究从一例病死扬子鳄组织中分离出一株肺炎克雷伯氏菌, 并将其命名为 YZE01。血清型检测显示, 该菌株为 K2 型, 这是高毒力菌株中常见的荚膜类型之一; 拉丝试验呈阳性, 表明该菌株具备典型的高黏液表型, 提示其可

分泌大量荚膜多糖, 形成有效的免疫屏障<sup>[18]</sup>。Abhinand 等<sup>[19]</sup>指出, 这种荚膜多糖使宿主体内的巨噬细胞难以识别和吞噬, 肺炎克雷伯氏菌凭借此产生抗吞噬能力, 可延长存活时间并持续繁殖, 进而增加感染风险和治疗难度。同时, MLST 分析结果显示, 本研究分离的 YZE01 株为肺炎克雷伯氏菌 ST25 型。目前报道该基因型具有高度传播能力, 且常携带多重耐药基因, 在全球范围内频繁引发严重人类感染(如血流感染、肺炎和新生儿败血症等), 因存在潜在人畜共患风险从而被广泛关注<sup>[20-22]</sup>。然而, 对爬行动物感染的报道极为有限。

为探讨 YZE01 株的致病性, 通过 PCR 技术筛查获得了 6 个关键毒力基因(*rmpA*、*rmpA2*、

表2 分离菌株药敏试验结果

Table 2 Susceptibility test results of isolated strains

Types of antibiotics	Antimicrobial	Diameter of the bacteriostatic zone/mm	Sensitivity
β-lactams	Cephalexin	16.67±0.58	R
	Cefoperazone	13.33±1.53	I
	Cefazolin	18.33±0.58	R
	Ceftriaxone	22.33±2.08	S
	Ceftazidime	19.00±1.73	I
	Ampicillin	0.00±0.00	R
Sulfonamides	Trimethoprim/sulfamethoxazole (co-trimoxazole)	21.67±0.58	S
Aminoglycosides	Streptomycin	0.00±0.00	R
	Gentamicin	9.67±1.15	R
	Amikacin	18.00±0.00	S
Tetracyclines	Tetracycline	11.33±0.58	I
	Doxycycline	13.00±1.00	I
Quinolones	Ofloxacin	16.67±0.58	S
	Norfloxacin	20.00±0.00	S
	Ciprofloxacin	20.67±1.53	S
Macrolides	Erythromycin	0.00±0.00	R
	Roxithromycin	0.00±0.00	R
	Azithromycin	8.33±1.15	I
Peptides	Polymyxin B	17.67±1.53	S
Lincosamides	Clindamycin	7.33±0.58	R
Amido-alcohols	Florfenicol	11.00±0.00	I

S: Susceptible; I: Intermediate; R: Resistant.

*entB*、*fimH*、*markD* 和 *wabG*), 该菌株同时携带 *rmpA* 和 *rmpA2* 基因, 二者可显著上调荚膜多糖的合成, 与菌株的高黏液表型和高致病性密切相关<sup>[23]</sup>。与经典的 K1 型高毒力携带菌株相比, 该菌株缺失了 *magA* 基因(K1 型荚膜转运标志), 其毒力基因组合更为精简, 且未携带狐源 hvKP 常见的 *iucA*、*iroB*、*kfu* 基因<sup>[24]</sup>及猪源 ST-35 株的 *aerobactin* 铁载体系统(由 *iuc* 基因簇编码)<sup>[7]</sup>, 仅保留了 *entB*、*fimH* 和 *markD* 等核心毒力元件。该菌株可借助 *entB* 所介导的铁摄取系统和双黏附系统突破宿主黏液屏障, 进一步增强细菌在宿主体内的生存能力<sup>[25-26]</sup>。这与蔡粮预等<sup>[6]</sup>报道的牛源菌株一致, 可见这 3 种核心元件在不同宿主间保守性较高, 是构成跨宿主感染的

基础毒力因子。为验证其致病力, 建立了小鼠腹腔攻毒模型, 结果显示, 病理剖检可见受试小鼠肺脏、肝脏出现较为严重的出血和淤血病变, 与李佳华等<sup>[24]</sup>报道的病变情况较为一致。此外, 为进一步证实该菌是否可特异性诱发急性肺炎, 动态监测了感染小鼠肺组织中 *IL-1β*、*IL-6*、*IL-8* 和 *TNF-α* 的 mRNA 表达, 结果显示所有指标均在 12 h 达峰后迅速回落, 表明炎症反应在早期被强烈激活<sup>[14-15]</sup>。炎症因子的早期上调是宿主试图清除感染的一种防御机制, 但最终机体不能自我清理, 导致在 36 h 内全部死亡, 这也与毕建蝶等<sup>[14]</sup>报道的模式高度吻合。

在耐药性方面, 本研究分离的 YZE01 株虽同属临床高风险 ST25 型, 但其耐药谱与典型人

源 ST25 分离株存在较为明显差异。已有报道显示, 人源 ST25 型菌株中普遍携带 *bla*<sub>NDM-1</sub>、*bla*<sub>OXA</sub> 等典型碳青霉烯酶基因, 对碳青霉烯类药物呈现高度耐药<sup>[27-30]</sup>。YZE01 株未检出上述基因, 仅携带 *bla*<sub>SHV</sub>、*armA* 和 *ermB* 3 种耐药基因, 其中 *bla*<sub>SHV</sub> 基因编码 A 类广谱 β-内酰胺酶, 可水解青霉素类及第一、二代头孢菌素<sup>[31]</sup>。药物敏感试验结果也显示, 该菌株对氨苄西林和头孢唑林耐药, 但对三代头孢、碳青霉烯类药物敏感; *armA* 基因通常会使氨基糖苷类抗生素[如庆大霉素、阿米卡星(丁胺卡那)]产生高水平耐药<sup>[6]</sup>, 但本研究中 YZE01 株对丁胺卡那仍保有敏感性; 同时菌株携带的 *ermB* 基因可对大环内酯类和林可酰胺类药物产生耐药<sup>[28]</sup>, 但该菌株对阿奇霉素保持中度敏感。这一结果与 2023 年郭燕等<sup>[4]</sup>报道的人源多重耐药株以及猪源 ST25 型菌株相比<sup>[32-33]</sup>, 其耐药谱相对较窄。

综上所述, 本研究表明扬子鳄源肺炎克雷伯氏菌 YZE01 株是 ST25-K2 型高黏液菌株, 具有较强的致病性和一定的耐药性, 是该扬子鳄死亡的重要原因。同时, 该研究也揭示了扬子鳄源 ST25 菌株在耐药特征上与人源或猪源菌株的显著差异, 这可为扬子鳄相关疾病的防控策略及用药指导提供理论依据, 未来应进一步开展对野生动物源肺炎克雷伯氏菌的系统研究, 深入解析其致病机制以及在自然生态环境中的适应性演化规律, 评估其潜在的跨物种传播风险。

## 作者贡献声明

梁引龙: 进行实验及论文撰写、修改; 葛梦丽: 设计实验方案及论文修改; 徐佳俊: 数据分析与讨论; 吴飞: 监督管理, 提供技术支持; 米家伟: 实验验证; 丁琦瑛: 收集数据; 陈洪超: 提供技术支持; 周永康: 项目管理; 易平四: 提供资源; 徐前明: 获取基金, 提出概念。

## 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] 朱鹏, 周永康, 姜纪, 李佳佳, 易平四, 章松, 张雪松, 周奎厚, 王应超, 石涵, 陈洪超, 卜孝林, 王雅婷, 徐前明. 扬子鳄源粘质沙雷氏菌 XCYZE 株的分离鉴定及其致病性分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2024, 40(1): 26-30. Zhu P, Zhou YK, Jiang J, Li JJ, Yi PS, Zhang S, Zhang XS, Zhou KH, Wang YC, Shi H, Chen HC, Bu XL, Wang YT, Xu QM. Isolation, identification and pathogenicity analysis of a strain of *Serratia marcescens* from a Chinese Alligator[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2024, 40(1): 26-30 (in Chinese).
- [2] 李林俐, 胡智博, 费荣梅, 周永康. 扬子鳄雷氏普罗威登斯菌与毗邻颗粒链菌混合感染病例的分析[J]. 中国兽医科学, 2016, 46(12): 1505-1510. Li LL, Hu ZB, Fei RM, Zhou YK. Analysis of the mixed infection case with *Providencia rettgeri* and *Granulicatella adiacens* in Chinese Alligator[J]. Chinese Veterinary Science, 2016, 46(12): 1505-1510 (in Chinese).
- [3] 李华明, 项维, 卢文兵, 刘峰, 雷连成, 张付贤. 1 株猪源 ST-35 型肺炎克雷伯菌的致病性和药物敏感性分析[J]. 畜牧兽医学报, 2022, 53(12): 4356-4366. Li HM, Xiang W, Lu WB, Liu F, Lei LC, Zhang FX. Pathogenicity and drug sensitivity analysis of a porcine *Klebsiella pneumoniae* type ST-35[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2022, 53(12): 4356-4366 (in Chinese).
- [4] 郭燕, 胡付品, 朱德妹, 汪复, 蒋晓飞, 徐英春, 张小江, 张峰波, 季萍, 谢轶, 肖玉玲, 王传清, 付盼, 徐元宏, 黄颖, 孙自镛, 陈中举, 孙景勇, 陈庆, 褚云卓, 等. 2023 年 CHINET 中国细菌耐药监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2024, 24(6): 627-637. Guo Y, Hu FP, Zhu DM, Wang F, Jiang XF, Xu YC, Zhang XJ, Zhang FB, Ji P, Xie Y, Xiao YL, Wang CQ, Fu P, Xu YH, Huang Y, Sun ZY, Chen ZJ, Sun JY, Chen Q, Chu YZ, et al. Antimicrobial resistance profile of clinical isolates in hospitals across China: report from the CHINET Antimicrobial Resistance Surveillance Program, 2023[J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2024, 24(6): 627-637 (in Chinese).
- [5] 盛席静, 张凡, 刘方佳, 刘泉, 曹征征, 胡天宇, 李东华, 吴梦慧, 戴梦红. 动物源肺炎克雷伯菌致病性与耐药性研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2023, 50(7): 2966-2973. Sheng XJ, Zhang F, Liu FJ, Liu Q, Cao ZZ, Hu TY, Li DH, Wu MH, Dai MH. Research progress on pathogenicity and drug resistance of *Klebsiella pneumoniae* from animals[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2023, 50(7): 2966-2973 (in Chinese).
- [6] 蔡粮预, 苗玉蝶, 曹亚鑫, 陈雪龙. 牛源肺炎克雷伯菌的分离鉴定及主要毒力因子检测[J]. 现代畜牧科技, 2024(11): 25-27.

- Cai LY, Miao YD, Cao YX, Chen XL. Isolation and identification of bovine *Klebsiella pneumoniae* and its main virulence factors detect[J]. *Modern Animal Husbandry Science & Technology*, 2024(11): 25-27 (in Chinese).
- [7] 周晗. 黄喉拟水龟肺炎克雷伯菌的分离鉴定及荧光定量PCR检测方法的建立与应用[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2023.
- Zhou H. Isolation and identification of *Klebsiella pneumoniae* of *Mauremys mutica* and establishment and application of fluorescence quantitative PCR detection method[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2023 (in Chinese).
- [8] 蒋响轩, 杨亚, 魏凯. 一株羊源肺炎克雷伯氏菌的分离鉴定及耐药分析[J]. *山东畜牧兽医*, 2024, 45(2): 29-32.
- [9] R. E. 布坎南, N. E. 吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8版. 北京: 科学出版社, 1984.
- [10] 王群, 孙杨, 陈涛, 王芳, 王方芳, 黄春华, 叶梅毅. 携带 blaNDM-1 耐药基因高毒力肺炎克雷伯菌的耐药和毒力分析[J]. *中国消毒学杂志*, 2023, 40(10): 740-744.
- Wang Q, Sun Y, Chen T, Wang F, Wang FF, Huang CH, Ye MY. Analysis of drug resistance and virulence of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* carrying resistance gene blaNDM-1[J]. *Chinese Journal of Disinfection*, 2023, 40(10): 740-744 (in Chinese).
- [11] Jiang M, Zhang H, Lu WJ, Qiu XD, Lin CY, Zhao RQ, Li QC, Wu QP. Molecular characteristics of virulence genes in carbapenem-resistant and carbapenem-sensitive *Klebsiella pneumoniae* in relation to different capsule serotypes in Ningbo, China[J]. *Infection and Drug Resistance*, 2024, 17: 2109-2120.
- [12] Maleki NS, Babazadeh F, Arzanlou M, Teimourpour R, Dogaheh HP. Serotyping and molecular profiles of virulence-associated genes among *Klebsiella pneumoniae* isolates from teaching hospitals of Ardabil, Iran: a cross-sectional study[J]. *Health Science Reports*, 2023, 6(9): e1557.
- [13] 王奇林, 曹润来, 王威阳, 张博, 刘志杰, 王晓旭. 狐狸流产胎儿体内肺炎克雷伯菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2024, 55(8): 3640-3648.
- Wang QL, Cao RL, Wang WY, Zhang B, Liu ZJ, Wang XX. Isolation, identification and drug resistance analysis of *Klebsiella pneumoniae* in aborted fetuses of fox[J]. *Acta Veterinaria et Zootecnica Sinica*, 2024, 55(8): 3640-3648 (in Chinese).
- [14] 毕建蝶, 刘淑敏, 何秋月, 韩睿辉, 杜艳. 高毒力肺炎克雷伯菌毒力特性及其对 RAW<sub>264.7</sub> 细胞炎症反应的影响[J]. *中国抗生素杂志*, 2023, 48(4): 438-444.
- Bi JD, Liu SM, He QY, Han RH, Du Y. Virulence characteristics of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* and its effect on the inflammatory cytokine response of RAW<sub>264.7</sub> cells[J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2023, 48(4): 438-444 (in Chinese).
- [15] 张宜辉, 曹菲菲, 刘康军, 尹文兵, 李建基, 董俊升, 崔璐莹, 孟霞, 朱国强, 王亨. 肺炎克雷伯菌大鼠乳腺炎模型的建立与致病力[J]. *中国兽医学报*, 2023, 43(4): 726-732.
- Zhang YH, Cao FF, Liu KJ, Yin WB, Li JJ, Dong JS, Cui LY, Meng X, Zhu GQ, Wang H. The virulence of *Klebsiella pneumoniae* in rat mastitis model[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2023, 43(4): 726-732 (in Chinese).
- [16] 盛席静. 猪源肺炎克雷伯菌的毒力与耐药分子特征研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2023.
- Sheng XJ. Studies on molecular characteristics of virulence and resistance of *Klebsiella pneumoniae* from pigs[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2023 (in Chinese).
- [17] 周永康, 余本付, 吴孝兵, 聂继山. 我国扬子鳄种群及栖息地保护现状[J]. *动物学杂志*, 2012, 47(1): 133-136.
- Zhou YK, Yu BF, Wu XB, Nie JS. Present status of protection on Chinese *Alligator's* population and habitat[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2012, 47(1): 133-136 (in Chinese).
- [18] Beig M, Aghamohammad S, Majidzadeh N, Asforooshani MK, Rezaie N, Abed S, Khiavi EHG, Sholeh M. Antibiotic resistance rates in hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strains: a systematic review and meta-analysis[J]. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2024, 38: 376-388.
- [19] Abhinand K, Menon AM, Thomas SS, Anil AB, Parvathi Mohanan PC, Arun KB, Edison LK, Babu P, Kumar GB, Nair BG, Madhavan A. *Klebsiella pneumoniae*: host interactions, virulence mechanisms, and novel therapeutic strategies[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2025, 207: 107856.
- [20] Zhao JH, Zheng BW, Xu H, Li JF, Sun TF, Jiang XW, Liu WH. Emergence of a NDM-1-producing ST25 *Klebsiella pneumoniae* strain causing neonatal sepsis in China[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 980191.
- [21] Li LF, Xu XX, Cheng P, Yu ZY, Li MC, Yu ZD, Cheng W, Zhang WC, Sun HQ, Song XR. *Klebsiella pneumoniae* derived outer membrane vesicles mediated bacterial virulence, antibiotic resistance, host immune responses and clinical applications[J]. *Virulence*, 2025, 16(1): 2449722.
- [22] Bengoechea JA, Sa Pessoa J. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2019, 43(2): 123-144.
- [23] Kot B, Piechota M, Szweida P, Mitrus J, Wicha J, Gruzewska A, Witeska M. Virulence analysis and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolates from hospitalised patients in Poland[J]. *Scientific Reports*, 2023, 13: 4448.
- [24] 李佳华, 刘海月, 李欣南, 廖阳, 孟凡奇, 周大勇, 张利勃, 王辉暖. 狐源肺炎克雷伯菌辽宁分离株的鉴定及其致病性与耐药性分析[J]. *现代畜牧兽医*, 2025(2): 1-5.
- Li JH, Liu HY, Li XN, Liao Y, Meng FQ, Zhou DY, Zhang LB, Wang HN. Identification, pathogenicity, and drug resistance analysis of the Liaoning isolate of fox-derived *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2025(2): 1-5 (in Chinese).
- [25] Nguyen TNT, Howells G, Short FL. How *Klebsiella pneumoniae* controls its virulence[J]. *PLoS Pathogens*, 2025, 21(9): e1013499.
- [26] Xu L, Li JY, Wu WQ, Wu XW, Ren JN. *Klebsiella pneumoniae* capsular polysaccharide: mechanism in regulation of synthesis, virulence, and pathogenicity[J].

- Virulence, 2024, 15(1): 2439509.
- [27] Osman EA, El-Amin N, Adrees EAE, Al-Hassan L, Mukhtar M. Comparing conventional, biochemical and genotypic methods for accurate identification of *Klebsiella pneumoniae* in Sudan[J]. Access Microbiology, 2020, 2(3): acmi000096.
- [28] Wang XD, Wang JW, Jiang XD, Huang ZY, Huang LJ, Wei Q, Zhang LN. Molecular epidemiological analysis and research on resistance and virulence of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary hospital from 2016 to 2023[J]. BMC Microbiology, 2025, 25(1): 217.
- [29] 夏培雯. 一株ST25型高毒力肺炎克雷伯菌的耐药性、毒力传播机制及进化途径研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2023.
- Xia PW. Study on resistance, mechanism of virulence transmission, and evolutionary pathway of a hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strain of sequence type 25[D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2023 (in Chinese).
- [30] Liao YQ, Gong JJ, Yuan XL, Wang XL, Huang YH, Chen XH. Virulence factors and carbapenem-resistance mechanisms in hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*[J]. Infection and Drug Resistance, 2024, 17: 1551-1559.
- [31] Alraey Y, Assiry MM, Ahmad I, Alqahtani A, Basheer N, Alasiri MAM, Alshehri SAM, Alhamhhum SMS, Alhefdi SM, Khan MS, Saleem M, Bawazeer AAS. Antimicrobial resistance and beta-lactamase gene distribution among clinical isolates: a two-year cohort study[J]. Scientific Reports, 2025, 15: 23951.
- [32] 赵飞宇. 猪源肺炎克雷伯菌毒力和耐药分析及噬菌体的分离鉴定[D]. 郑州: 河南农业大学, 2025.
- Zhao FY. Virulence and antimicrobial resistance profiling of porcine *Klebsiella pneumoniae* and bacteriophage isolation and identification[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2025 (in Chinese).
- [33] Albarracin L, Ortiz Moyano R, Vargas JM, Andrade BGN, Cortez Zamar J, Dentice Maidana S, Fukuyama K, Kurata S, Jure MÁ, Kitazawa H, Villena J. Genomic and immunological characterization of hypermucoviscous carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST25 isolates from northwest Argentina[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(13): 7361.