

DOI: 10.13907/j.cnki.nykxyj.20251013.005

奶牛乳腺炎源肺炎克雷伯菌毒力基因分布及 *kfuBC* 与耐药的相关性研究

徐 奕^{1,2}, 吴欣悦³, 徐天乐^{1,4}

(1. 扬州大学 农业科技发展研究院(国际联合实验室), 江苏 扬州 225009;

2. 扬州大学 兽医学院, 江苏 扬州 225009; 3. 高邮市龙虬镇农业农村和生态环境办公室, 江苏 高邮 225600;

4. 扬州大学 动物科学与技术学院, 江苏 扬州 225009)

摘 要:肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, KP)是奶牛乳腺炎的重要致病菌之一,为分析KP毒力基因及其耐药性,并进一步研究两者之间的相关性,利用PCR法检测KP中常见11种毒力基因的表达情况。结合K-B试验结果,根据毒力基因与耐药相关性分析筛选出毒力基因*kfuBC*;采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)方法检测*kfuBC*表达量,随机选取高表达、低表达和未表达*kfuBC*基因的KP各3株,用其感染奶牛原代乳腺上皮细胞(pbMEC)并构建小鼠致病模型;构建体外细胞及体内小鼠攻毒模型检测其致病力。结果表明:KP分离株同时携带多种毒力基因,*kfuBC*毒力基因的表达与KP耐药数、多种抗生素的耐药性呈显著或极显著负相关。细胞和小鼠试验结果提示,*kfuBC*毒力基因的表达量对pbMEC活力、促炎细胞因子及血清指标等都有不同程度影响,攻毒小鼠的严重肝损伤表明*kfuBC*高表达的KP致病力较高。试验结果揭示了KP的毒力基因分布与耐药性的相关性,有望以*kfuBC*作为关键毒力基因来调控KP毒力及其耐药,为指导牧场合理用药及乳腺炎疾病防治提供理论依据。

关键词:肺炎克雷伯菌;毒力基因;耐药性

中图分类号:S852.61

文献标志码:A

奶牛乳腺炎是奶牛自身、环境、致病因子等多种因素共同作用导致的复杂疾病^[1]。其中,病原微生物感染是引起奶牛乳腺炎最主要的原因之一^[2],且由环境性病原菌引起的乳腺炎占比增高,这引起了更多关注。其中,肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, KP)是继大肠杆菌后的第二大环境性条件致病菌,已有多篇研究报道从乳腺炎源奶样中分离出此菌^[3]。KP广泛分布于水、土壤等自然环境中,亦存在于健康动物的呼吸道和肠道^[4]。前期的流行病学调查结果表明,KP是导致江苏北部地区奶牛乳房炎的常见致病菌,检出率为15.53%,占比

最高。KP携带的多种毒力因子是导致其致病性的重要因素,主要包括荚膜多糖、脂多糖、菌毛、铁载体等^[5]。*kfuBC*作为铁载体毒力因子,可介导Fe³⁺的摄取,多存在于高毒力KP菌株中,有研究发现几乎所有K1型高毒力KP菌株均携带*kfuBC*基因^[6]。在用药、环境、饲养管理等多种因素影响下,KP能够通过自身进化表现出对抗菌药物更高的耐药特性,以适应不同环境。同时,其毒力也会随之改变,引起奶牛不同程度的乳腺炎。虽然已有许多研究针对不同地区牧场流行的KP进行耐药监测,但关于关键毒力基因*kfuBC*与耐药相关性的研究仍较为缺

收稿日期:2024-12-24

基金项目:国家自然科学基金青年项目(32202883);江苏省高等学校基础科学(自然科学)研究项目(25KJA230003);扬州大学大学生科技创新基金项目(校重点)

作者简介:徐奕(2003—),动物医学专业本科生。

通信作者:徐天乐,副教授,博士,硕士研究生导师,主要从事奶牛乳腺炎致病与抗病机制研究,电子邮箱:tl-xu@yzu.edu.cn。

引用格式:徐奕,吴欣悦,徐天乐.奶牛乳腺炎源肺炎克雷伯菌毒力基因分布及*kfuBC*与耐药的相关性研究[J].农业科学研究(中英文),2026,47(3):64-72.

Citation: Xu Yi, Wu Xinyue, Xu Tianle. Distribution of virulence genes and association of *kfuBC* with antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolated from bovine mastitis[J]. Journal of Agricultural Sciences, 2026, 47(3): 64-72.

乏。为有效应对KP高毒力与强耐药重叠的形势,阐明关键毒力基因与耐药性的相关性至关重要。因此,在前期流行病学调查及药敏试验结果的基础上,试验选取前期分离到的68株KP菌株,分析KP毒力基因与耐药性之间的相关性,从而挖掘关键毒力基因,以期调控KP的毒力与耐药性,为后续奶牛乳腺炎的防治及靶向药物的开发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

无菌生理盐水,购自四川科伦药业股份有限公司;Mueller-Hinton琼脂,购自青岛高科技工业园区海博生物技术有限公司;药敏纸片,购自杭州微生物试剂有限公司;细菌RNA提取试剂盒,CCK-8细胞计数试剂盒、 $2\times$ TaqMasterMix (DyePlus),均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;SOD(超氧化物歧化酶)、MDA(丙二醛)、ALP(碱性磷酸酶)活性检测试剂盒和IL-1 β /IL-6/TNF- α 酶联免疫吸附检测试剂盒,均购自上海碧云天生物技术有限公司;ALT/AST活性检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所有限公司;GibcoDMEM/F12培养基、胰蛋白酶-EDTA($w=0.25\%$,含酚红)消化液和PBS缓冲液,均购自北京智杰方远科技有限公司;DNAMarker和GoldView I型核酸染色剂,均购自福州飞净生物科技有限公司;多功能PCR仪和实时荧光定量PCR仪,购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;SPARK多功能酶标仪,购自上海绘吉电子科技有限公司;SPX-150生化培养箱,购自上海培因试验仪器有限公司。

1.2 细胞、试验动物及样品来源

奶牛原代乳腺上皮细胞(pbMEC)来源于本实验室前期分离保存的细胞株;SPF级ICR鼠,购自扬州大学比较医学院试验动物中心。从江苏北部地区4个牧场采集的208份临床/隐性乳腺炎奶样中分离得到68株KP。

1.3 K-B药敏试验

使用生理盐水配制0.5麦氏单位的KP分离菌株液,用无菌棉拭子蘸取菌液均匀涂布于Mueller-Hinton琼脂表面,室温静置3~5 min。试验选取11种药敏纸片,分别为四环素(TCY, 30 μ g)、链霉素(STR, 10 μ g)、庆大霉素(CN, 10 μ g)、环丙沙星(CIP, 5 μ g)、阿奇霉素(AZM, 15 μ g)、呋喃妥因

(NIT, 300 μ g)、头孢噻吩(KF, 30 μ g)、青霉素(PEN, 10 μ g)、阿莫西林(AMX, 20 μ g)、美罗培南(MEM, 10 μ g)和哌拉西林(PIP, 100 μ g)。将药敏纸片贴于培养基的表面,室温静置15 min,倒置于37 $^{\circ}$ C恒温培养箱培养16~18 h。使用游标卡尺测定抑菌圈直径并记录。根据CLSI(2020)标准^[7]判定肺炎克雷伯菌分离株的药物敏感性,质控菌株为大肠杆菌ATCC25922。

1.4 毒力基因检测

试验参照文献[8]~文献[10]中报道较多的11种KP携带的毒力基因:荚膜多糖相关基因(*rmpA*、*wcaG*)、尿囊素相关基因(*allS*)、铁载体相关基因(*kfuBC*、*ybtA*、*iucB*、*iroNB*)、菌毛相关基因(*fimH*)、脂多糖相关基因(*ureA*、*uge*、*wabG*),引物信息见表1。利用特异性PCR法对目的片段进行扩增,用 $w=1\%$ 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,根据成像情况确定毒力基因是否表达。

1.5 毒力基因与耐药性的相关分析

以Spearman相关系数(r)作为反映2个变量间相关程度的非参数指标,其值介于-1~1。利用SPSS 26.0软件,通过卡方检验和Spearman相关系数的计算分析毒力基因与耐药表型的相关性。

1.6 qRT-PCR扩增与定量

以本实验室先前合成的68株肺炎克雷伯菌cDNA为模板,借助16SrRNA通用引物以及优势毒力基因(*kfuBC*)引物进行qRT-PCR,利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算*kfuBC*基因的相对表达量,采用GraphPad-Prism 9.0软件中的独立样本 T 检验法分析组间差异性并绘图。

1.7 KP侵染pbMEC试验

根据PCR定量结果随机挑选出*kfuBC*高表达(KP27、KP46、KP57)、低表达(KP10、KP25、KP26)以及未表达(KP22、KP37、KP60)的KP构建感染模型。

1)CCK-8细胞活力检测。在无菌操作下,将复苏的pbMEC按照每孔终体积为100 μ L的比例于96孔板中完成接种后,置于37 $^{\circ}$ C细胞培养箱中预培养24 h。吸取5 μ L稀释好的KP菌液至孔板(每株KP菌液设置6个重复),同时设置空白组和对照组。混合均匀后至37 $^{\circ}$ C细胞培养箱培养6 h。取出已培养完成的96孔板,每孔加入10 μ L CCK-8 Solution,在37 $^{\circ}$ C细胞培养箱中培养4 h。采用酶标仪在450 nm双波长处测得相应的吸光值以检测细胞活力。

表1 试验所需引物
Tab. 1 Primers used in this study

引物名称	引物序列(5'→3')	产物长度/bp
16SrDNA27	F:AGAGTTTGGATCCTGGCTCAG	1 500
16SrDNA1492	R:TACGGCTACCTTGTTACGACT	
<i>rmpA</i>	F:ACTGGGCTACCTCTGCTTCA R:CTTGCATGAGCCATCTTTCA	516
<i>wcaG</i>	F:GGTTGGKTCAGCAATCGTA R:ACTATTCCGCCAACTTTTGC	169
<i>allS</i>	F:CCGTTAGGCAATCCAGAC R:TCTGATTTATCCCACATT	1 090
<i>kfuBC</i>	F:GAAGTGACGCTGTTTCTGGC R:TTTCGTGTGGCCAGTGACTC	797
<i>ybtA</i>	F:ATGACGGAGTCACCGCAAAC R:TTACATCACGCGTTTAAAGG	960
<i>iucB</i>	F:ATGTCTAAGGCAAACATCGT R:TTACAGACCGACCTCCGTGA	948
<i>iroNB</i>	F:GGCTACTGATACTTGACTATTC R:CAGGATACAATAGCCCATAG	992
<i>fimH</i>	F:GCTCTGGCCGATACCACCACGG R:GCGAAGTAACGTGCCTGGAACGG	423
<i>ureA</i>	F:GCTGACTTAAGAGAACGTTATG R:GATCATGGCGCTACCTCA	337
<i>uge</i>	F:GATCATCCGGTCTCCCTGTA R:TCTTCACGCCTTCCTTCACT	534
<i>wabG</i>	F:CGGACTGGCAGATCCATATC R:ACCATCGGCCATTTGATAGA	683

2)细胞因子检测。通过ELISA方法检测各组细胞培养液中细胞因子IL-1 β 、IL-6及TNF- α 的表达量来反映KP感染所引起的炎症程度。根据试剂说明步骤进行,利用酶标仪检测各孔在450 nm处的吸光值并绘制标准曲线。

1.8 KP攻毒小鼠试验

ICR鼠在感染性疾病研究中广泛应用,其成熟的免疫系统,能在细菌感染过程中表现出典型的免疫反应。此外,ICR鼠具有良好的遗传稳定性和一致性,且其适应性强,能够在不同环境下保持稳定的生理状态,这也有助于减少外部因素对试验结果的影响,提高试验数据的可靠性。本试验选择ICR鼠作为细菌攻毒模型。吸取50 μ L挑出的9株KP冻存菌液接种于肉汤培养基中进行复苏纯化培养,将KP菌液用无菌生理盐水稀释至 1×10^8 CFU $\cdot$ mL $^{-1}$ 进行攻毒^[11]。将33只8周龄的健康且体质量相近的SPF级ICR鼠随机分成11个小组(A~K组),每组3只,采用腹腔注射的方式攻毒。其中,A至C组分

别注射KP22、KP37、KP60菌液,D至F组分别注射KP10、KP25、KP26菌液,G至I组分别注射KP27、KP46、KP57菌液,J组注射等量无菌生理盐水作为阴性对照,K组注射等量肺炎克雷伯菌ATCC 4352作为阳性对照。

1)血清指标检测。对攻毒小鼠眼眶取血,将采集的血液在室温下静置40 min后于4 $^{\circ}$ C条件下2 000 $\times$ g离心10 min取上清透明血清,分装样品于一20 $^{\circ}$ C保存。按照上海碧云天生物技术有限公司及南京建成生物工程研究所有限公司检测试剂盒的使用说明测定小鼠血清中SOD(超氧化物歧化酶)、MDA(丙二醛)、ALP(碱性磷酸酶)、ALT(丙氨酸氨基转移酶)、AST(天门冬氨酸氨基转移酶)的含量,以反映KP感染所引起肝损伤程度。

2)小鼠组织学测定。通过颈椎脱臼处死小鼠,无菌采集10组小鼠的肝脏与脾脏组织,交由科学指南针科研机构制作病理切片,之后进一步观察小鼠肝脏与脾脏的病变情况。

1.9 生物统计学分析

试验数据符合正态分布,利用 GraphPad Prism 9.0 软件中的独立样本 *T* 检验及多因素方差分析法分析不同 *kfuBC* 表达组间的差异($P<0.05$ 表示差异具有统计学意义、 $P<0.01$ 表示差异具有高度统计学意义)。

2 结果与分析

2.1 KP 分离株的耐药性

由表 2 可知,68 株 KP 分离株对试验选取的 6

类(共 11 种)抗生素表现出不同程度的耐药。所有 KP 对环丙沙星、呋喃妥因和美罗培南耐药率为 0%,呈强敏感性;KP 对青霉素耐药率最高,为 85.3% (58/68),其次对阿莫西林耐药率较高,为 67.6% (46/68);相较于庆大霉素(5.9%),KP 对链霉素的耐药率更高,为 41.2% (28/68);KP 对头孢噻吩(11.8%)和哌拉西林(10.3%)这 2 种 β -内酰胺类抗生素表现出相似的耐药水平。

表 2 KP 株耐药表型统计

Tab. 2 Statistics of drug resistance phenotypes in KP strains

药物名称	敏感		中介		耐药	
	KP/株	占比/%	KP/株	占比/%	KP/株	占比/%
四环素 TC	49	72.1	7	10.3	12	17.6
链霉素 STR	35	51.5	5	7.4	28	41.2
庆大霉素 CN	63	92.6	1	1.5	4	5.9
环丙沙星 CIP	68	100	0	0	0	0
阿奇霉素 AZM	51	75.0	13	19.1	4	5.9
呋喃妥因 NIT	68	100	0	0	0	0
头孢噻吩 KF	60	88.2	0	0	8	11.8
青霉素 PEN	0	0	10	14.7	58	85.3
阿莫西林 AMX	3	4.4	19	27.9	46	67.6
美罗培南 MEM	68	100	0	0	0	0
哌拉西林 PIP	61	89.7	0	0	7	10.3

2.2 KP 分离株毒力基因表达情况

采用 PCR 方法对 11 种毒力基因的检测结果见表 3,结果显示在 68 株 KP 分离株中未检测出 *allS*;而 *fimH*、*ureA*、*uge*、*wabG* 基因检出率为 100%;*rmpA*、*wcaG* 基因的检出率分别为 4.4% 和 11.8%;*kfuBC*、*ybtA*、*iucB*、*iroNB* 基因的检出率分别为 50.0%、23.5%、52.9%、4.4%。68 株 KP 分离株同时携带多种毒力基因,见图 1,分离株中最少同时携带 4 种毒力基因,最多同时携带 8 种毒力基因,绝大多

数 KP 同时携带 5 种毒力基因。

表 3 KP 分离株毒力基因检测结果统计

Tab. 3 Statistics of virulence genes in KP isolates

分类	毒力基因	KP/株	毒力基因检出率/%
荚膜多糖	<i>rmpA</i>	3	4.4
	<i>wcaG</i>	8	11.8
尿囊素	<i>allS</i>	0	0.0
铁载体	<i>kfuBC</i>	34	50.0
	<i>ybtA</i>	16	23.5
	<i>iucB</i>	36	52.9
	<i>iroNB</i>	3	4.4
菌毛	<i>fimH</i>	68	100.0
脂多糖	<i>ureA</i>	68	100.0
	<i>uge</i>	68	100.0
	<i>wabG</i>	68	100.0

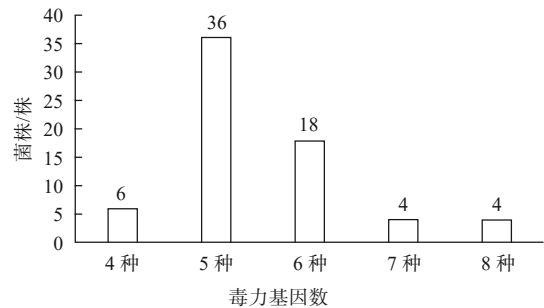


图 1 KP 分离株同时携带多种毒力基因概况

Fig. 1 Co-occurrence of multiple virulence genes among KP isolates

2.3 肺炎克雷伯菌株毒力基因与耐药性的关系

由表 4 和表 5 可知,*kfuBC* 基因与 KP 耐药数呈极显著负相关(-0.318)。*rmpA*、*iroNB* 基因均与四环素的耐药性呈极显著正相关(0.336)。*kfuBC* 基

因与四环素的耐药性呈极显著负相关(-0.463),与链霉素的耐药性呈显著负相关(-0.305),与哌拉西林的耐药性呈显著负相关(-0.242)。 *iucB* 基因与四

环素、链霉素的耐药性呈极显著正相关(0.445 、 0.356)。

2.4 肺炎克雷伯菌毒力基因 *kfuBC* 表达情况

根据 KP 毒力基因 *kfuBC* 与多种抗菌药物耐药性显著负相关这一独特性,筛选 *kfuBC* 进行下一步研究。根据 *kfuBC* 的定量结果,将 68 株 KP 分离株分为高表达组、低表达组、未表达组,并于每组随机挑选 3 株进行致病性试验。图 2 表明了各组随机选择的 3 株 KP 分离株携带的 *kfuBC* 基因转录水平的差异。其中 KP22, KP37, KP60 为 *kfuBC* 未表达组;

表 4 毒力基因与耐药数的相关性统计

Tab. 4 Correlations between virulence genes and the number of antimicrobial resistance

耐药性	毒力基因					
	<i>rmpA</i>	<i>wcaG</i>	<i>kfuBC</i>	<i>ybtA</i>	<i>iucB</i>	<i>iroNB</i>
耐药数	0.221	-0.152	-0.318**	0.128	0.304	0.221

注:**表示呈极显著相关。

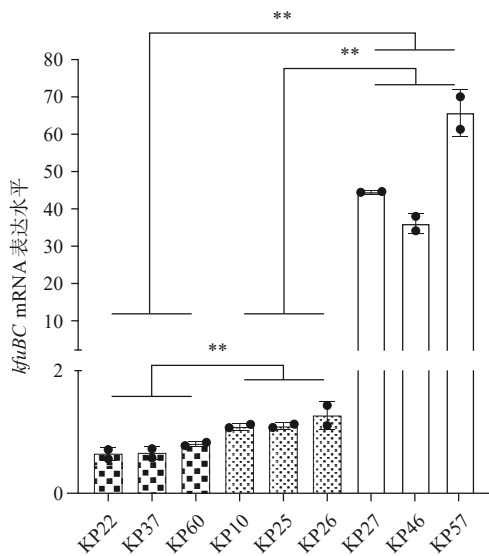
表 5 毒力基因与耐药表型的相关性统计

Tab. 5 Correlations between virulence genes and antimicrobial resistance phenotypes

抗菌药物		毒力基因检出数(株)/检出率(%)					
		<i>rmpA</i>	<i>wcaG</i>	<i>kfuBC</i>	<i>ybtA</i>	<i>iucB</i>	<i>iroNB</i>
四环素 TC	R	2(16.67)	1(8.33)	0(0.00)	2(16.67)	11(91.67)	2(16.67)
	S	0(0.00)	7(14.29)	32(65.31)	12(24.49)	19(38.78)	0(0.00)
	P值	0.017	0.504	0.000	0.803	0.001	0.017
	r	0.336**	-0.134	-0.463**	-0.025	0.445**	0.336**
链霉素 STR	R	3(10.71)	1(3.57)	9(32.14)	8(28.57)	21(75.00)	3(10.71)
	S	0(0.00)	6(17.14)	23(65.71)	7(20.00)	12(34.29)	0(0.00)
	P值	0.106	0.211	0.027	0.714	0.005	0.106
	r	0.184	-0.137	-0.305*	0.071	0.356**	0.184
庆大霉素 CN	R	0(0.00)	0(0.00)	1(25.00)	0(0.00)	2(50.00)	0(0.00)
	S	3(4.76)	8(12.70)	33(52.38)	16(25.40)	33(52.38)	3(4.76)
	P值	0.883	0.698	0.343	0.436	0.634	0.883
	r	-0.060	-0.103	-0.171	-0.156	0.043	-0.060
阿奇霉素 AZM	R	0(0.00)	0(0.00)	4(100.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
	S	1(1.96)	4(7.84)	26(50.98)	14(27.45)	28(54.90)	1(1.96)
	P值	0.099	0.055	0.051	0.342	0.084	0.099
	r	0.225	0.234	-0.069	-0.150	-0.036	0.225
头孢噻吩 KF	R	0(0.00)	1(12.50)	2(25.00)	3(37.50)	3(37.50)	0(0.00)
	S	3(5.00)	7(11.67)	32(53.33)	13(21.67)	33(55.00)	3(5.00)
	P值	0.518	0.945	0.132	0.321	0.352	0.518
	r	-0.078	0.008	-0.183	0.120	-0.113	-0.078
青霉素 PEN	R	3(5.17)	7(12.07)	29(50.00)	15(25.86)	33(56.90)	3(5.17)
	S	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
	P值	0.462	0.851	0.633	0.275	0.116	0.462
	r	-0.089	-0.023	0.000	-0.132	-0.191	-0.089
阿莫西林 AMX	R	3(6.52)	5(10.87)	20(43.48)	13(28.26)	27(58.70)	3(6.52)
	S	0(0.00)	0(0.00)	2(66.67)	1(33.33)	2(66.67)	0(0.00)
	P值	0.472	0.694	0.296	0.284	0.245	0.472
	r	-0.107	0.095	0.126	-0.189	-0.201	-0.107
哌拉西林 PIP	R	0(0.00)	0(0.00)	1(14.29)	3(42.86)	3(42.86)	0(0.00)
	S	3(4.92)	8(13.11)	33(54.10)	13(21.31)	33(54.10)	3(4.92)
	P值	0.548	0.308	0.046	0.203	0.573	0.548
	r	-0.073	-0.124	-0.242*	0.154	-0.068	-0.073

注: $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义; $P<0.01$ 表示差异具有高度统计学意义;*表示呈显著相关,**表示呈极显著相关。

KP10, KP25, KP26 为 *kfuBC* 低表达组; KP27, KP46, KP57 为 *kfuBC* 高表达组。3 组 KP 分离株之间 *kfuBC* 基因表达量的差异均具有高度统计学意义 ($P < 0.01$)。



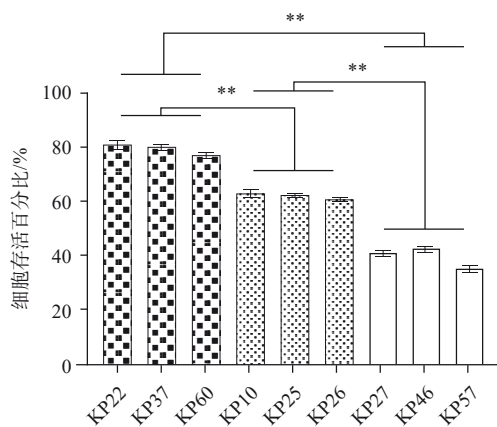
注:**代表组间差异具有高度统计学意义 ($P < 0.01$)。

图2 KP分离株*kfuBC*基因转录水平差异

Fig. 2 Differences in *kfuBC* transcript levels among KP isolates

2.5 肺炎克雷伯菌对pbMEC活力的影响

由图3可知,3组KP分离株分别感染pbMEC 6 h后pbMEC的存活情况。经*kfuBC*高表达组KP感染后的细胞存活率极显著低于*kfuBC*低表达组和未表达组 ($P < 0.01$)。



注:**代表组间差异具有高度统计学意义 ($P < 0.01$)。

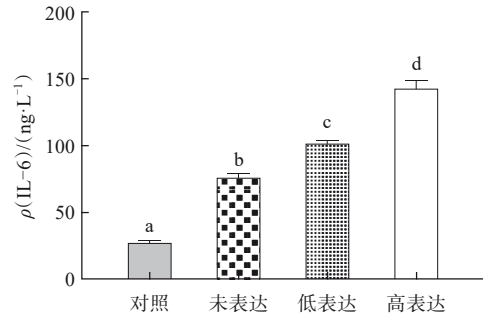
图3 KP分离株对pbMEC活力的影响

Fig. 3 Effects of KP isolates on pbMEC viability

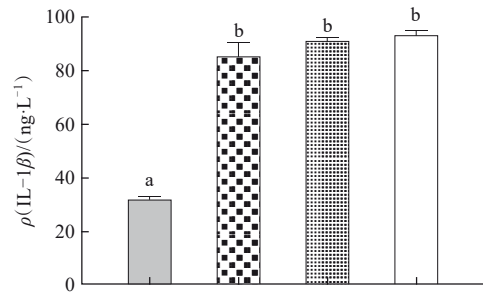
2.6 细胞因子检测结果

由图4可知3组KP感染pbMEC后各组细胞培养液中炎症因子IL-6、IL-1 β 、TNF- α 质量浓度的

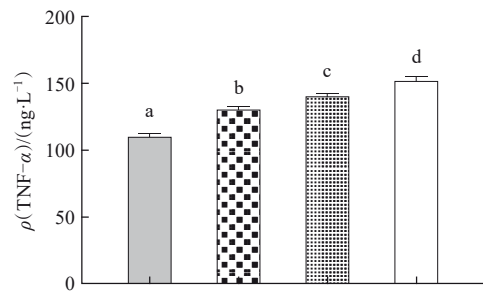
高低。*kfuBC*高表达组炎症因子IL-6、TNF- α 质量浓度显著高于低表达组与未表达组 ($P < 0.05$),具有统计学意义;而各组炎症因子IL-1 β 质量浓度的差异不具有统计学意义 ($P > 0.05$)。



(a) IL-6



(b) IL-1 β



(c) TNF- α

注:不同小写字母表示组间差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

图4 各组细胞培养液中炎症因子质量浓度

Fig. 4 Concentrations of pro-inflammatory cytokines in the cell culture supernatants of each group

2.7 血清指标检测结果

由图5可知攻毒后各组小鼠血清中SOD、MDA、ALP、ALT及AST的含量。*kfuBC*高表达组KP攻毒的血清中SOD含量与其他组相比显著下降 ($P < 0.05$),MDA、ALP、ALT和AST含量较其他组均显著升高 ($P < 0.05$)。结果提示不同*kfuBC*基因表达量的KP分离株感染可对肝脏造成不同程度的损伤。

2.8 肺炎克雷伯菌对小鼠的致病情况

无菌采取A~I组小鼠的肝脏与脾脏组织进行细菌培养,确定分离出KP。取J组与A~I组小鼠的

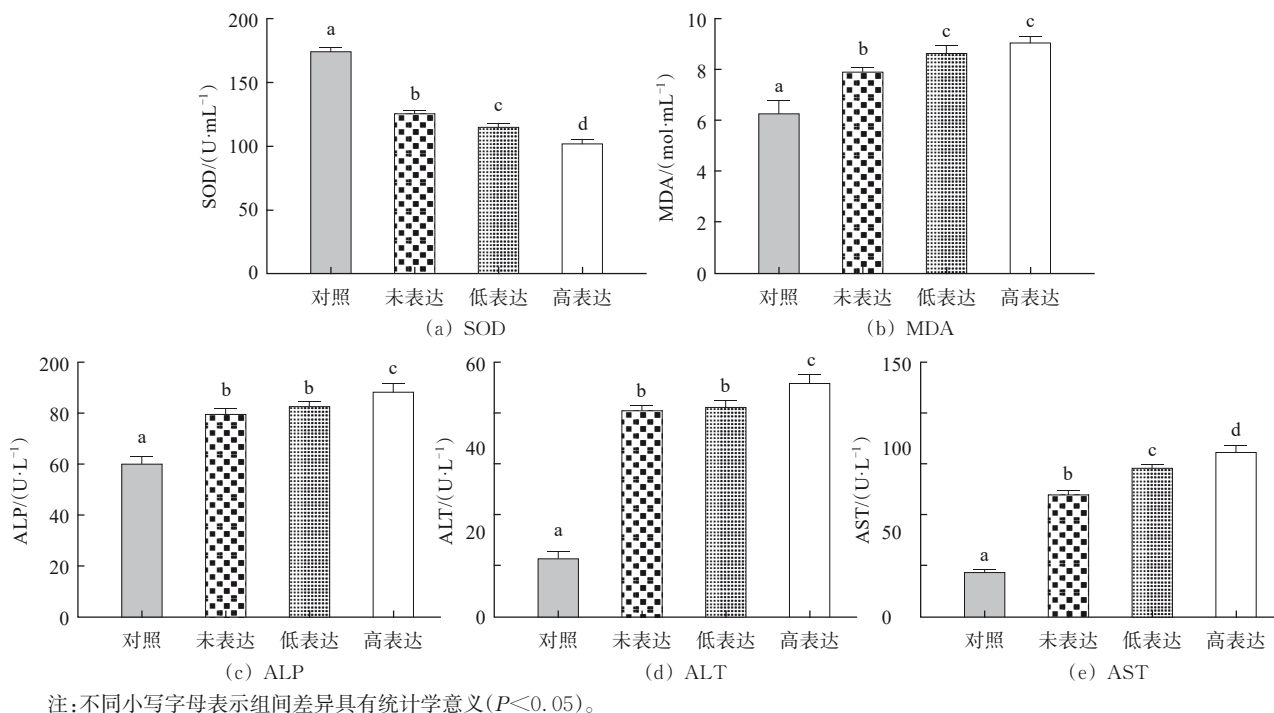


图5 小鼠血清指标含量

Fig. 5 Serum indicator levels in mice

肝脏与脾脏组织,病理切片结果如图6所示,其中阴性对照为无菌生理盐水处理组;阳性对照为肺炎克雷伯菌 ATCC 4352 处理组;(-)为 *kfuBC* 基因未表达的 KP 处理组;(+)为 *kfuBC* 基因低表达的 KP 处理组;((+))为 *kfuBC* 基因高表达的 KP 处理组。本试验中,肝脏与脾脏组织病理切片的评判标准主要基于组织结构的完整性及病理变化的类型。对于肝脏组织,观察指标包括肝窦充血、肝细胞变性以及肝脏间质增生或炎症细胞浸润。对于脾脏组织,观察指标包括白髓与红髓界限、脾脏出血或增生反

应。所有切片均在显微镜下观察,根据病理特征进行相应描述,保证观察的客观性和可重复性。结果显示,阴性对照组小鼠肝脏组织结构完整且清晰,肝静脉未见充血、水肿等现象;脾脏组织白髓与红髓界限清晰,未见出血。阳性对照组小鼠肝脏与脾脏有出血等炎症反应。*kfuBC* 低表达组处理后的小鼠肝脏可见肝静脉部分充血、大量核深染淋巴细胞;脾脏白髓界限不清。*kfuBC* 高表达组处理后的小鼠肝脏可见肝窦和肝脏间质大量充血,脾脏弥漫性出血。

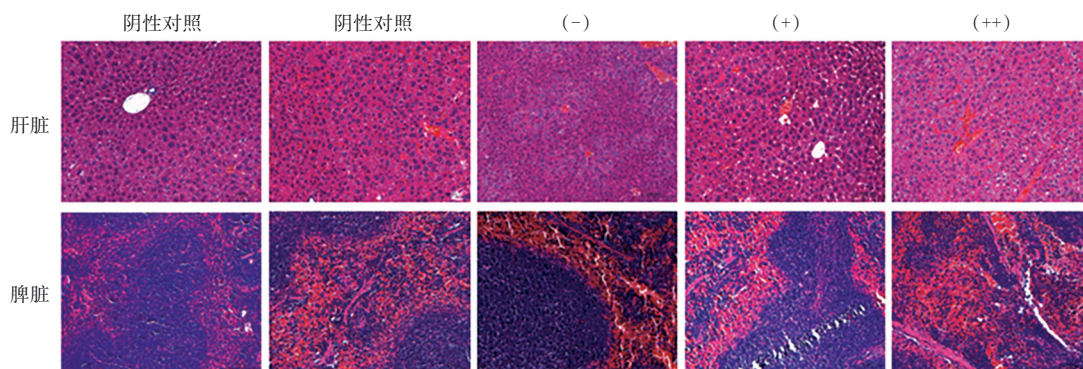


图6 小鼠肝脏及脾脏病理切片图(H. E. 染色,40×)

Fig. 6 Histopathological sections of mouse liver and spleen (H. E. staining, 40)

3 讨论

本试验对 KP 分离株毒力基因与耐药性进行相

关性分析,毒力基因 *rpmA*、*kfuBC*、*iucB*、*iroNB* 的携带率与抗生素耐药性表现出不同程度的相关性。荚膜多糖类毒力基因 *rpmA*,铁载体类毒力基因 *iucB*、

*iroNB*均与四环素的耐药性呈极显著正相关,同时*iucB*还与链霉素的耐药性呈极显著正相关,而*kfuBC*与KP耐药数、四环素、链霉素及哌拉西林均呈不同程度的显著负相关。*kfuBC*的高携带率与其分离株对多种抗菌药物耐药性的显著负相关,揭示了其作为KP致病力关键基因,可有效调控致病菌多重耐药。

试验随机挑选出*kfuBC*基因高表达、低表达及未表达的KP各3株分别感染pbMEC,检测各组细胞存活率,结果表明,与*kfuBC*基因低表达组相比,*kfuBC*基因高表达的KP分离株可明显降低细胞活力,抑制细胞生长。致病菌感染会引起组织细胞不同程度炎症反应,诱发多种炎症因子参与的“炎症风暴”。本试验通过检测炎症因子IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的浓度来揭示病原菌感染所引起的炎症反应程度。IL-6是一种具有多种生物活性的炎症介质,同时参与多种细胞的增殖分化^[12],亦被视为与炎症相关的重要细胞因子^[13],其表达水平的高低可反映宿主感染炎症水平。IL-1 β 是由先天免疫系统细胞释放后经胱天蛋白酶1裂解加工产生的多功能细胞因子,与炎症反应、自身免疫密切相关^[14]。TNF- α 作为一种关键的促炎因子能够介导多种炎症发生^[15],可依据其表达水平的高低判断疾病治疗的进展。试验检测各组细胞培养液中炎症因子IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的含量,结果显示IL-1 β 在三个处理组中含量均无显著差异,IL-6、TNF- α 在*kfuBC*高表达组含量显著高于低表达组与未表达组,提示高表达*kfuBC*毒力基因的KP分离株可表现更强的毒力,引起更强的炎症反应。该结果与何蕾^[16]报道的高毒力表型肺炎克雷伯菌诱导的小鼠血清中IL-6和TNF- α 含量更高的结果相符,提示高毒力表型肺炎克雷伯菌致病力更强。

SOD与MDA作为氧化应激指标,可有效评估细胞、组织的氧化损伤^[17]。SOD在机体内以自由基为靶向清除物,能有效平衡机体氧化与抗氧化水平,增强机体免疫力的同时减少肝损伤等多种疾病的发生;脂质过氧化物MDA的堆积易对细胞膜造成破坏,其含量高低能够间接反映肝脏等组织受损程度^[18]。此外,血清指标ALP、ALT、AST活性的升高,常用来提示肝细胞受到损伤^[19]。试验对各组攻毒小鼠血清指标进行测定,并对其肝脏及脾脏进行组织病理学检测,结果显示MDA在*kfuBC*基因表达组含量显著高于未表达组,*kfuBC*高表达组中,

除SOD活性显著下降外,ALP、ALT及AST含量均显著上调,说明高表达*kfuBC*毒力基因的KP可更大程度上使机体氧化与抗氧化水平失衡,并引发更严重的肝损伤,同时组织学分析所得的严重肝、脾组织损伤的病理学变化与血清学结果相对应,提示毒力基因*kfuBC*可作为KP高毒力的分子标志物,这与徐水宝等^[20]报道的结果相符。

4 结论

试验通过分析KP分离株毒力基因分布与耐药性的相关性,发现毒力基因*kfuBC*与KP耐药数呈极显著负相关。此外,通过细胞感染、小鼠攻毒并进行炎症因子及血清学指标检测,发现高表达*kfuBC*的KP毒力更强。结果表明,毒力基因*kfuBC*存在与耐药性之间的互作关系,且与KP毒力显著相关,结果揭示*kfuBC*可作为KP毒力与耐药性调控的关键基因。

参考文献:

- [1] 申纪饶,武小虎,张惠婷,等.奶牛乳腺炎细胞模型的建立及中药治疗作用机制研究进展[J].黑龙江动物繁殖,2021,29(6):14-19.
- [2] Ashraf A, Imran M. Causes, types, etiological agents, prevalence, diagnosis, treatment, prevention, effects on human health and future aspects of bovine mastitis[J]. Animal Health Research Reviews,2020,21(1):36-49.
- [3] 胡付品,郭燕,朱德妹,等.2021年CHINET中国细菌耐药监测[J].中国感染与化疗杂志,2022,22(5):521-530.
- [4] Wang G Y, Zhao G, Chao X Y, et al. The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae*[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health,2020,17(17):6278.
- [5] 席健峰,刘效伊,姜良勇,等.高毒力肺炎克雷伯菌的研究进展[J].山东化工,2019,48(24):54-56.
- [6] Fang C T, Lai S Y, Yi W C, et al. *Klebsiella pneumoniae* genotype K1: an emerging pathogen that causes septic ocular or central nervous system complications from pyogenic liver abscess[J]. Clinical Infectious Diseases,2007,45(3):284-293.
- [7] Humphries R, Bobenchik A M, Hindler J A, et al. Overview of changes to the clinical and laboratory standards institute performance standards for antimicrobial susceptibility testing, M100, 31st edition[J]. Journal of Clinical Microbiology,2021,59(12):e0021321.
- [8] 杭修兵,肖晓,储雯雯,等.血流感染肺炎克雷伯菌临床

- 特征、毒力基因及分子流行病学研究[J]. 中国抗生素杂志, 2022, 47(8): 839-844.
- [9] 杨朋, 旷凌寒, 罗美, 等. 376株肺炎克雷伯菌的毒力基因分析[J]. 华西医学, 2021, 36(8): 1037-1043.
- [10] 宋国滨, 王刚, 黄颖, 等. 肺炎克雷伯菌整合子携带情况及与毒力基因和耐药性的关系[J]. 中华医院感染学杂志, 2021, 31(3): 321-325.
- [11] McConnell M J, Actis L, Pachón J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2013, 37(2): 130-155.
- [12] 尹柏双, 王秋竹, 付连军, 等. 隐性乳房炎病牛乳清中 IL-1 β 及 IL-6 变化研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017(2): 117-118.
- [13] Ghasemi H. Roles of IL-6 in ocular inflammation: a review[J]. Ocular Immunology and Inflammation, 2018, 26(1): 37-50.
- [14] 林玉玲, 李杰玉, 李曾一, 等. 血清 IL-6 及 IL-1 β 水平和基因多态性与 2 型糖尿病合并肺部感染及其预后的关联[J]. 中华医院感染学杂志, 2023, 33(7): 1030-1034.
- [15] 马作明, 朱珊玲, 邵红征. 血清 TNF- α 、HMGB1 在溃疡性结肠炎患者中的表达及其临床意义[J]. 中外医学研究, 2023, 21(4): 80-83.
- [16] 何蕾. 高黏液表型肺炎克雷伯菌的临床特征及毒力分析[D]. 镇江: 江苏大学, 2021.
- [17] 周程, 吴南翔, 范宏亮, 等. TCS 和 PCB153 联合暴露对斑马鱼肝脏 SOD 和 MDA 的影响[J]. 预防医学, 2019, 31(4): 330-334.
- [18] 刘钺利, 高鹏飞. 益气活血化痰通络法联合硝苯地平治疗老年痰瘀阻滞型高血压的效果及对患者 8-OHdG、SOD、MDA 水平的影响[J]. 临床医学研究与实践, 2022, 7(34): 152-154.
- [19] 谢海燕. 脂肪肝临床诊断中 ALT、AST 肝功能指标与 TG、TC 血脂指标的临床价值[J]. 黔南民族医学学报, 2022, 35(4): 259-261.
- [20] 徐水宝, 杨思宇, 翁珊珊, 等. 高毒力肺炎克雷伯菌血清型、毒力基因分布及分子标志物探索[J]. 微生物与感染, 2019, 14(6): 338-344.

Distribution of virulence genes and association of *kfuBC* with antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolated from bovine mastitis

Xu Yi^{1,2}, Wu Xinyue³, Xu Tianle^{1,4}

- (1. Institutes of Agricultural Science and Technology Development (Joint International Research Laboratory of Agriculture & Agri-Product Safety), Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;
2. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;
3. Agriculture and Rural Affairs and Ecological Environment Office of Longqiu Town, Gaoyou 225600, China;
4. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: *Klebsiella pneumoniae* (KP) is one of the major pathogens causing bovine mastitis. To characterize the virulence genes and antimicrobial resistance of KP and further investigate the relationship between them, PCR was used to detect 11 common virulence genes in KP isolates. Based on the results of the Kirby-Bauer disk diffusion test and the correlation analysis between virulence genes and antimicrobial resistance, the virulence gene *kfuBC* was selected for further investigation, and its transcript levels were determined using reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR). Three KP isolates each with high, low, or undetectable *kfuBC* expression were randomly selected to infect primary bovine mammary epithelial cells (pbMECs) and to establish a mouse infection model. These in vitro cell and in vivo mouse challenge models were used to evaluate the pathogenicity of the isolates. The results showed that the KP isolates simultaneously harbored multiple virulence genes. The expression level of *kfuBC* was significantly or highly significantly negatively correlated with both the number of antimicrobial agents to which the isolates were resistant and their resistance phenotypes for multiple antimicrobial agents. The cell and mouse experiments indicated that *kfuBC* expression levels affected pbMEC viability, pro-inflammatory cytokine levels, and serum indices to varying degrees. Severe liver injury in mice challenged with KP isolates exhibiting high *kfuBC* expression indicated that these isolates were more pathogenic. This study revealed associations between the distribution of virulence genes and antimicrobial resistance in KP and suggests that *kfuBC* may serve as a key virulence-associated gene for modulating KP virulence and antimicrobial resistance. These findings provide a theoretical basis for guiding the rational use of antimicrobial agents on dairy farms and for the prevention and control of bovine mastitis.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*; virulence gene; antimicrobial resistance

(责任编辑 魏 乐)