

doi: 10.7541/2013.89

## 一株多重耐药鳗源肺炎克雷伯菌的分离鉴定

谭爱萍<sup>1</sup> 邓玉婷<sup>1</sup> 姜兰<sup>1</sup> 吴雅丽<sup>1,2</sup> 薛慧娟<sup>1,2</sup>  
王伟利<sup>1</sup> 罗理<sup>1</sup> 赵飞<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业部渔药创制重点实验室, 广州 510380;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

**摘要:** 从患病花鳗鲡(*Anguilla marmorata*)的肝脏分离纯化到一株革兰氏阴性杆菌 HM2。人工感染试验结果显示, HM2 具有较强的致病力, 96h 的  $LD_{50}$  为  $9.98 \times 10^7$  CFU/mL。经细菌培养特性、生理生化特性和 ATB Expression 半自动细菌鉴定仪鉴定, 结果符合肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)的特征。以细菌 16S rRNA 基因通用引物进行 PCR 扩增, 获得大小为 1393 bp 的部分 16S rRNA 基因序列(Genbank 登录号为 JX282908), 将所测序列与 GenBank 中的序列进行 BLAST 比对并构建系统进化树, 结果表明其与肺炎克雷伯菌的同源性最高(100%), 在系统发育树上与肺炎克雷伯菌聚为一簇, 进一步确定菌株 HM2 为肺炎克雷伯菌。药物敏感性试验显示, HM2 对亚胺培南、链霉素、阿米卡星 3 种药物敏感, 对氨苄西林、阿莫西林/克拉维酸、头孢噻吩、头孢曲松、头孢噻肟、头孢西丁、复合磺胺、磺胺甲氧嘧啶/甲氧苄啶、利福平、萘啶酸、环丙沙星、诺氟沙星、氧氟沙星、呋喃妥因、四环素、多西环素、氯霉素 17 种药物具有耐药性。研究结果为指导临床合理用药提供了科学依据。

**关键词:** 花鳗鲡; 肺炎克雷伯菌; 致病性; 鉴定; 耐药

中图分类号: S941.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2013)04-0744-07

花鳗鲡(*Anguilla marmorata*)俗称鳢王、花锦鳢, 属鳗鲡目鳗鲡科, 是鳗鲡类中体型较大的一种, 体长一般为 331—615 mm, 体重 250 g 左右, 最重的可达 30 kg 以上。由于其肉味鲜美, 肉和肝的维生素 A 含量特别高, 营养丰富, 具有相当高的营养价值, 且价格昂贵, 历来被视为上等滋补食品, 有“水中人参”之美誉。但是, 由于工业有毒污水对河流的严重污染和捕捞过度, 以及毒、电渔法对鱼资源的毁灭性破坏, 拦河建坝修水库及水电站等阻断了花鳗鲡的正常洄游通道等原因, 致使花鳗鲡的资源量急剧下降, 因此, 花鳗鲡成为濒危物种, 是我国国家 II 级保护野生动物。

肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*), 属于肠杆菌科(*Enterobacteriaceae* spp.), 是人类呼吸道和

肠道的常居菌, 可引起人类肺炎、尿路感染、菌血症等感染<sup>[1]</sup>。除引起人类感染发病外, 现已从禽类<sup>[2, 3]</sup>、两栖类和鱼类<sup>[4-7]</sup>等多种动物体内分离到这种细菌, 因此, 该菌作为人畜共同致病病原已被广泛重视。

近年来, 花鳗鲡在广东的养殖规模逐渐增大。但随着养殖密度的不断提高, 各种病害频发。除常见的寄生虫病外, 由病原菌引起的鳗鲡烂鳃病、赤鳍病和爱德华氏菌病也尤为常见<sup>[8-10]</sup>, 因此, 不同种类的抗菌药物常用于各种细菌性疾病的防治。而目前, 抗菌药物已在水产养殖中普遍试验, 但由于不合理用药与滥用药物, 导致细菌耐药性日渐增加, 水产动物源耐药菌株的研究开始引起广大学者的关注。国内已报道从鱼、虾、龟等多种水产动物中分离到多重耐药的气单胞菌、弧菌、假单胞菌等水产

收稿日期: 2012-07-16; 修订日期: 2013-03-19

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201203085); 广东省科技计划项目(2011B020307001); 中国水科院基本科研业务费(2012 A0507)资助

作者简介: 谭爱萍(1979—), 女, 广东高明人; 本科; 主要从事水产动物病害研究。E-mail: aipingtan2004@126.com

通信作者: 姜兰, 女, 研究员; E-mail: jianglan2@tom.com

病原菌<sup>[11-16]</sup>,这不仅给水产养殖动物疾病防治造成了困难,同时也严重影响了水产品质量乃至水环境的安全。本项研究针对从花鳃鲷分离的对多种抗菌药物耐药的菌株 HM2 的致病性和分类地位开展了研究。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

患病花鳃鲷及人工感染用花鳃鲷来源于广东顺德某花鳃鲷养殖场,体长 10—12 cm,体重 5—6 g。患病花鳃鲷其体色暗黑,红头,体表溃烂,腹部膨大,鳃丝充血肿胀,肝脏充血肿大。

胰蛋白胨大豆琼脂、MH 琼脂和肉汤、麦康凯琼脂、微量生化管及相关试剂购自广东环凯微生物科技有限公司, ID 32 E 肠杆菌细菌鉴定试剂条为法国生物-梅里埃公司出品,药敏试纸为英国 Oxoid 公司产品,PCR 所用试剂等均为康为世纪生物有限公司产品。

### 1.2 细菌分离培养

采用无菌操作取患病花鳃鲷肝脏,接种在胰蛋白胨大豆琼脂上,于 28℃ 恒温培养 18—20h,挑取优势菌落划线纯化后,获得一株菌,编号为 HM2,并用脱脂牛奶作保护剂真空冻干,-20℃ 低温保存备用。

### 1.3 人工感染试验

采用静水式浸泡方法进行,实验期间水温(28±2)℃,采用 2 倍稀释法设定 6 个浓度梯度组,各组别细菌浓度分别为  $1.2 \times 10^9$ 、 $6 \times 10^8$ 、 $3 \times 10^8$ 、 $1.5 \times 10^8$ 、 $7.5 \times 10^7$ 、 $3.75 \times 10^7$  CFU/mL,同时设不加菌液的阴性对照组,每组实验鱼 30 尾。所用 HM2 菌液于 MH 肉汤 28℃ 恒温振荡培养 20h。人工感染后,连续饲养 7d,观察、记录花鳃鲷的发病症状和死亡情况,并从濒死花鳃鲷的肝脏进行细菌再分离和鉴定。采用改良寇氏法计算 96h 的  $LD_{50}$ 。

### 1.4 细菌生化鉴定及分子生物学鉴定

采用细菌常规鉴定方法,包括培养特性和生理生化试验,并同时进行了 16S rRNA 基因序列分析。

**培养特性** 将 HM2 分别划线于胰蛋白胨大豆琼脂和麦康凯琼脂平皿上,于 28℃ 恒温培养 18—20h,观察细菌的生长情况和菌落形态;同时从麦康凯琼脂平皿挑取单菌落制成涂片,革兰氏染色后,光学显微镜观察细菌的形态和染色特性。

**生理生化试验** 参照文献[17, 18]将在麦康

凯琼脂平皿上,于 28℃ 恒温培养 18—20h 的 HM2 分别接种于吡啶、动力、VP、MR 等细菌微量生化管,28℃ 恒温培养 18—48h,定时检查反应结果;同时将 HM2 接种于 ID 32 E 肠杆菌细菌鉴定试剂条,28℃ 恒温培养 24h 后使用 ATB Expression 半自动细菌鉴定仪(法国生物-梅里埃 bio merieux 公司)进行生化指标的测定。

**16S rRNA 基因序列分析** 将 HM2 接种至 MH 营养肉汤中 28℃ 培养过夜,离心收集菌体,按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取细菌总 DNA。根据文献[19]设计合成 16S rRNA 引物,正向引物 P1: F-AGAGTTTGATCATGGCTCAG;反向引物 P2: R-GGTTACCTTGTTACGACTT,由上海博尚生物技术有限公司合成。16S rRNA 基因 PCR 反应体系(50 μL):  $2 \times Taq$  MasterMix 25 μL, P1 和 P2 引物(10 μmol/L)各 2 μL, DNA 模板 2 μL,最后以双蒸水补足,进行 PCR 扩增。反应条件为 95℃ 预变性 5min,然后 95℃ 变性 30s,55℃ 退火 30s,72℃ 延伸 1min,共 35 个循环,最后 72℃ 再延伸 10min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,阳性样品直接送博尚生物公司测序,测序结果与 GenBank 中相应序列进行同源性分析及系统进化树的构建。

### 1.5 药敏试验

采用纸片扩散法以大肠埃希菌(ATCC25922)作为质控菌进行药敏试验。在麦康凯琼脂平板上挑取单个菌落接种于 2 mL MH 肉汤中,28℃ 振荡培养 3—4h,用无菌生理盐水稀释菌液,使稀释菌液达到 0.5 麦氏比浊管的浊度,再按 1:100 稀释菌液至含菌量约为  $1 \times 10^6$  CFU/mL。用无菌棉拭子均匀涂抹至 MH 培养基上,贴上药敏纸片,正置 28℃ 培养 18—20h 后观察,并根据美国临床实验室标准化委员会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)标准判断结果<sup>[20, 21]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 人工感染试验

人工浸泡感染结果显示,在感染后 24h,大部分组别花鳃鲷开始出现发病症状或死亡,表现为体色暗黑,体表充血,腹部膨大,鳃丝充血肿胀;其中  $1.2 \times 10^9$  CFU/mL 组别的死亡率达 80%,  $7.5 \times 10^7$  CFU/mL 组别也出现死亡,死亡率为 10%;48h 时  $3 \times 10^8$  CFU/mL 及以上组别的死亡率达 100%,对照组

和  $3.75 \times 10^7$  CFU/mL 组别的死亡率为 0。根据改良寇氏法计算, 96h 的  $LD_{50}$  为  $9.98 \times 10^7$  CFU/mL(表 1)。

## 2.2 细菌分类鉴定

**细菌的形态与生化特性** HM2 为革兰氏阴性杆菌, 在胰蛋白胨大豆琼脂平板上生长, 菌落呈黄白色, 在麦康凯琼脂平板上菌落呈浅粉色, 边缘整齐, 有黏性易成拉丝状; 氧化酶、MR 阴性, VP 阳

性; ATB Expression 半自动细菌鉴定仪鉴定结果显示, HM2 为肺炎克雷伯菌, ID 为 99.9%,  $T$  值为 0.75, 具体测定结果和其他生化特性测定结果(表 2)。常规鉴定结果显示, 所分离的 HM2 菌株的培养特性和生理生化特性与文献[17, 18]标准菌株基本一致, 说明所分离的 HM2 菌株符合肺炎克雷伯菌的特征。从人工感染发病显症的华鳊鲃肝脏再分离的细菌也符合

表 1 人工感染试验结果  
Tab. 1 Results of bath challenge trial

菌液浓度 Bacterial concentration (CFU/mL)	试验尾数 Number of tested fish	死亡率 Mortality (%)			
		24h	48h	72h	96h
		Mortality	Mortality	Mortality	Mortality
$1.2 \times 10^9$	30	80	100	100	100
$6 \times 10^8$	30	10	100	100	100
$3 \times 10^8$	30	30	100	100	100
$1.5 \times 10^8$	30	0	10	100	100
$7.5 \times 10^7$	30	10	10	10	10
$3.75 \times 10^7$	30	0	0	0	0
对照 control	30	0	0	0	0
$LD_{50}$ (CFU/mL)		$9.98 \times 10^7$			

表 2 分离菌 HM2 的生理生化试验  
Tab. 2 Physiological and biochemical characteristics of the strain HM2

测定项目 Test item	HM2	肺炎克雷伯菌 <i>K. pneumoniae</i>	测定项目 Test item	HM2	肺炎克雷伯菌 <i>K. pneumoniae</i>
氧化酶 Oxidase	-	-	$\alpha$ -葡萄糖苷酶 $\alpha$ -Glucosidase	-	-
动力 Mobility	-	-	L-阿拉伯糖 L-Arabinose	+	+
VP Voges-Proskauer	+	+	吲哚 Indol	-	-
MR Methyl red	-	-	$\alpha$ -甘露醇 $\alpha$ -Mannitol	+	+
酯酶 Lipase	-	-	酚红 Phenolrot	-	-
N-乙酰- $\beta$ -葡萄糖苷酶 N-Acetyl- $\beta$ -Glucosaminidase	-	-	5-酮基葡萄糖酸盐 5-Keto-Gluconat	-	-
D-麦芽糖 D-Maltose	+	+	L-阿拉伯糖醇 L-Arabitol	-	-
D-葡萄糖 D-Glucose	+	+	$\beta$ -葡萄糖苷酶 $\beta$ -Glucosidase	+	+
蔗糖 Saccharose	+	+	丙二酸盐 Malonate	+	+
D-半乳糖酸盐同化 D-Galacturonsaure	+	+	D-山梨醇 D-Sorbitol	+	+
尿素酶 Urease	+	+	$\beta$ -葡萄糖醛酸酶 $\beta$ -Glucuronidase	-	-
精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	-	-	侧金盏花醇 Adonitol	-	+
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxyla	-	-	L-鼠李糖 L-Rhamnose	+	+
赖氨酸脱羧酶 Lysin decarboxylase	+	+	$\alpha$ -半乳糖苷酶 $\alpha$ -Galactosidase	+	+
肌醇 Inositol	+	+	D-阿拉伯糖醇 D-Arabitol	+	+
$\alpha$ -麦芽糖 $\alpha$ -Maltosidase	-	+	古老糖 Palatinose	+	-
D-纤维二糖 D-Cellobiose	+	+	L-天冬氨酸芳胺酶 L-Aspartat-Arylamidase	-	-
D-海藻糖 D-Trehalose	+	+	$\beta$ -半乳糖苷酶 $\beta$ -Galactosidase	+	+
葡萄糖产气 Glucose gas	+	+			

注: +, 表示阳性; -, 表示阴性

Note: +, Positive; -, Negative

肺炎克雷伯菌的特征。

**16S rRNA 基因序列分析** PCR 扩增出分离菌株 HM2 的 16S rRNA 基因片段约为 1500 bp, PCR 产物直接测序, 获得的片段大小为 1393 bp, GenBank 登录号为 JX282908。将获得的序列与 GenBank 数据库中已报道的 16S rRNA 基因序列进行 Blast、同源性分析及构建系统发育树。HM2 与肺炎克雷伯菌的同源性最高, 同等片段长度同源性高达 100%, 在系统发育树上与肺炎克雷伯菌聚为一簇(图 1), 说明所分离的菌株 HM2 为肺炎克雷伯菌。

### 2.3 药敏试验

测定分离菌株 HM2 对 20 种常见抗菌药物的敏感性, 结果显示, HM2 除对亚胺培南、链霉素、阿米卡星 3 种药物敏感外, 对氨苄西林、阿莫西林/克拉维酸、头孢噻吩、头孢曲松、头孢噻肟、头孢西丁、复合磺胺、磺胺甲基异恶唑/甲氧苄啶、利福平、萘啶酸、环丙沙星、诺氟沙星、氧氟沙星、呋喃妥因、四环素、多西环素、氯霉素 17 种药物均耐药(表 3)。

## 3 讨论

### 3.1 肺炎克雷伯菌在水产养殖中的分布与致病性

Singh, *et al.*<sup>[22]</sup>于 1992 年在鱼、虾、蟹等水产类

食品中检测到肺炎克雷伯菌; 唐毅等<sup>[5]</sup>发现在鲢鱼上分离的肺炎克雷伯菌能正常存在于养殖水体和鱼体的肠道内, 并在鱼体受伤、水质恶化、气候变化等外在条件改变时才可能导致鱼体致病; 此外, 通过肺炎克雷伯菌回归感染实验发现被感染鱼的症状与自然发病一致, 表现为鳃丝溃烂、肝胰脏充血、腹部肿大等。邓国成等<sup>[7]</sup>于 2008 年首次报道从鳊鱼成鱼分离到一株有致病性的肺炎克雷伯菌, 被感染鱼也表现为体色暗黑、腹部膨大、肝脏出血、肠道腹水等。本实验从花鳊鱼苗所分离的 HM2 菌株经人工感染试验证实具有致病性, 感染发病鱼的症状与自然发病的相似, 表现为体色暗黑, 体表充血, 腹部膨大, 鳃丝充血肿胀, 与上述肺炎克雷伯菌感染的鲢鱼及鳊鱼的症状相似, 表明肺炎克雷伯菌对花鳊鱼苗和鳊鱼成鱼均具有致病性, 但具体的致病机理还有待进一步研究。

本实验分离的菌株 HM2 经革兰氏染色、细菌培养特性及生理生化特性测定后, 初步鉴定为革兰氏阴性杆菌; 在胰蛋白胨大豆琼脂平板上生长, 菌落呈黄白色, 在麦康凯琼脂平板上菌落呈浅粉色, 边缘整齐, 有黏性易成拉丝状; 氧化酶、MR、吡啶、鸟氨酸脱羧酶、精氨酸双水解酶阴性, VP、脲酶、

赖氨酸脱羧酶、葡萄糖产气、蔗糖、L-阿拉伯糖阳性, 具有肺炎克雷伯菌的特性, 其结果与其他报道基本一致<sup>[4-7, 22]</sup>。为进一步确定菌株 HM2 分类学地位, 在传统生化鉴定的基础上, 测定了该菌株 16S rRNA 基因的部分序列, 并进行系统进化树的构建和同源性分析。从构建的系统进化树和 Blast 同源性分析结果看, 菌株 HM2 与肺炎克雷伯菌聚为一类, 与相应基因序列的同源性均大于 99%。综合细菌培养特性、生理生化特性和 16S rRNA 基因序列测定分

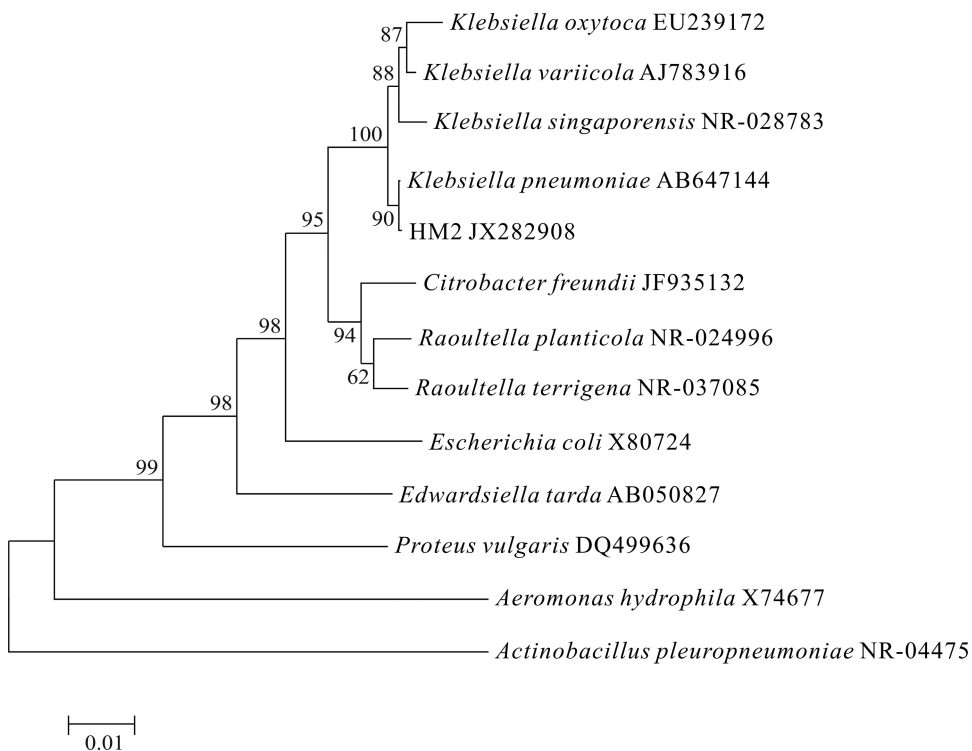


图1 菌株HM2的聚类分析

Fig. 1 The cluster analysis of the strain HM2 based on the 16S rRNA

表 3 HM2 菌株的药敏试验结果  
Tab. 3 Susceptibility of HM2 strain to antimicrobial agents

抗菌药物 Antimicrobial agents	药物含量 Disk content ( $\mu\text{g}$ )	抑菌圈直径折点 Zone diameter Breakpoint (mm)			抑制圈大小 Inhibition zone size (mm)		HM2 的耐药 判定结果 Resis- tance determina- tion of HM2
		耐药 Resistance	敏感 Susceptible		HM2	ATCC 25922	
氨苄西林 Ampicillin	10	$\leq 13$	$\geq 17$		0	0	R
阿莫西林/克拉维酸 Amoxicillin/Clavulanic acid	30	$\leq 13$	$\geq 18$		12	11	R
头孢噻吩 Cefalotin	30	$\leq 14$	$\geq 18$		0	9	R
头孢曲松 Ceftriaxone	30	$\leq 19$	$\geq 23$		0	33	R
头孢西丁 Cefoxitin	30	$\leq 14$	$\geq 18$		0	16	R
头孢噻肟 Cefotaxime	30	$\leq 22$	$\geq 26$		0	35	R
亚胺培南 Imipenem	10	$\leq 13$	$\geq 16$		22	19	S
复合磺胺 Sulfonamides	300	$\leq 12$	$\geq 17$		0	19	R
磺胺甲基异恶唑/甲氧苄啶 Sulfamethoxazole/Trimethoprim	23.75/1.25	$\leq 10$	$\geq 16$		0	23	R
利福平 Rifampin	5	$\leq 16$	$\geq 20$		0	16	R
萘啶酸 Nalidixic acid	30	$\leq 13$	$\geq 19$		0	31	R
环丙沙星 Ciprofloxacin	5	$\leq 15$	$\geq 21$		0	32	R
诺氟沙星 Norfloxacin	10	$\leq 12$	$\geq 17$		0	30	R
氧氟沙星 Ofloxacin	5	$\leq 12$	$\geq 16$		0	30	R
呋喃妥因 Nitrofurantoin	300	$\leq 14$	$\geq 17$		10	24	R
四环素 Tetracycline	30	$\leq 14$	$\geq 19$		0	28	R
多西环素 Doxycycline	30	$\leq 10$	$\geq 14$		0	27	R
链霉素 Streptomycin	10	$\leq 11$	$\geq 15$		16	19	S
阿米卡星 Amikacin	30	$\leq 14$	$\geq 17$		21	21	S
氯霉素 Chloramphenicol	30	$\leq 12$	$\geq 18$		0	30	R

注: R, 耐药; S, 敏感

Note: R, Resistant; S, Susceptible

析结果, 将分离纯化的菌株 HM2 确定为肺炎克雷伯菌。

### 3.2 肺炎克雷伯菌的耐药性

徐海圣等<sup>[4]</sup>、陶锦华等<sup>[6]</sup>在浙江和广西从龟鳖分离的肺炎克雷伯菌对喹诺酮类、四环素类及磺胺类药物等耐药, 而邓国成等<sup>[7]</sup>在广东从鳊鱼分离的致病菌对喹诺酮类、氨基糖苷类、四环素类及头孢菌素类药物中度敏感或高度敏感, 而只对青霉素类耐药; 本研究分离的 HM2 对亚胺培南及氨基糖苷类的链霉素、阿米卡星 3 种药物敏感, 对头孢类、磺胺类、喹诺酮类以及四环素类等 17 种药物均耐药, 表现为多重耐药, 其耐药程度亦比上述报道的严重。肺炎克雷伯菌不仅是一种重要的病原菌, 而且还是我国 CHINET 细菌耐药性监测系统定期监测的耐药菌之一<sup>[23, 24]</sup>。本实验首次从养殖的花鳊鱼分离到对头孢类等多种药物耐药的肺炎克雷伯菌, 应引

起广大养殖者和科研工作者的高度重视。

有研究表明<sup>[2-4]</sup>, 肺炎克雷伯菌对氯霉素最敏感, 而本实验结果却高度耐药; 氯霉素已在水产养殖上禁用, 但菌株 HM2 却表现出很强的耐药性, 可能与水产养殖业的用药历史有关。头孢类药物是人医临床治疗细菌感染的一线抗感染药物, 也常用于畜牧养殖和小动物临床上使用, 动物源肺炎克雷伯菌对头孢类药物的耐药率远高于人医临床分离株<sup>[25, 26]</sup>, 水产养殖上较少使用头孢类药物, 但本实验所分离的 HM2 却对人医临床常用抗菌药头孢曲松、头孢西丁及头孢噻肟产生了耐药性。目前关于肺炎克雷伯菌耐药机制的研究在人医临床报道中较多, 主要包括产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶、生物被膜形成、外膜孔蛋白缺失、染色体基因突变、主动外排作用以及质粒介导的耐药机制, 等等<sup>[27]</sup>, 而在水产动物源中报道相对较少。因此, 水产源多重耐药菌株产生及其传播

机制还有待进一步研究。

水产动物源多重耐药菌株随水产养殖污水流入江河后, 其耐药因子是否会转入临床致病菌, 经过食物、水等途径感染人体, 使人源肺炎克雷伯菌的耐药现象更严重; 或者耐药菌株是否会残留在水产动物体内通过食物链作用富集到人体内, 在临床上产生耐药性, 这将对人类生存健康造成巨大威胁。因此有必要开展对水产动物源细菌耐药性监测和研究工作, 以指导水产养殖合理用药。

#### 参考文献:

- [1] Wang L F, Wang X D. Advances in the mechanism of drug resistance of *Klebsiella pneumonia* [J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2004, **29**(6): 324—328 [王林峰, 王选锭. 肺炎克雷伯菌耐药机制研究进展. 中国抗生素杂志, 2004, **29**(6): 324—328]
- [2] Huang Y Y, Wan Y, Chen X Z, *et al.* Study on the pathogenicity and biological character of chicken *Klebsiellosis pneumonia* [J]. *Fujian Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 1996, **18**(2): 4—5 [黄印尧, 万沅, 陈信忠, 等. 鸡源肺炎克雷伯菌的致病性和生物学特性研究. 福建畜牧兽医, 1996, **18**(2): 4—5]
- [3] Peng Y Y, Liu H Y, Wang H J, *et al.* Study on the biological characteristics of *Klebsiella pneumonia* from chicken [J]. *Journal of Southwest Agricultural University*, 1995, **17**(4): 330—333 [彭远义, 刘华英, 王豪举, 等. 鸡肺炎克雷伯菌的生物学特性研究. 西南农业大学学报, 1995, **17**(4): 330—333]
- [4] Xu H S, Shu M A. Studies on the pathogens of the *Klebsiella pneumoniae* disease of *Trionyx sinensis* [J]. *Journal of Zhejiang University (Science Edition)*, 2002, **29**(6): 702—706 [徐海圣, 舒妙安. 中华鳖肺炎克雷伯菌病的病原研究. 浙江大学学报(理学版), 2002, **29**(6): 702—706]
- [5] Tang Y, Zhang F, Sun H C, *et al.* Isolation and identification of *Klebsiella pneumoniae* from silver carp [J]. *Journal of Southwest University (Natural Science Edition)*, 2007, **29**(6): 73—76 [唐毅, 张芬, 孙翰昌, 等. 白鲢肺炎克雷伯菌的分离鉴定. 西南大学学报(自然科学版), 2007, **29**(6): 73—76]
- [6] Tao J H, Li K R, Wei P. Diagnosis and metaphylaxis of *Klebsiella pneumonia* isolated from *Mauremys mutica* [J]. *Guangxi Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2002, **18**(6): 20—21 [陶锦华, 李康然, 韦平. 石龟肺炎克雷伯菌感染的诊断与防治. 广西畜牧兽医, 2002, **18**(6): 20—21]
- [7] Deng G C, Luo X, Jiang X Y, *et al.* Separation and identification of the eel *Klebsiella pneumonia* [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2009, **18**(2): 2193—2197 [邓国成, 罗霞, 江小燕, 等. 鳃肺炎克雷伯菌的分离与鉴定. 上海海洋大学学报, 2009, **18**(2): 2193—2197]
- [8] Chen C F, Wu Z X, Gao H J. Isolation and identification of pathogenic bacteria causing edwardsiellosis in eel (*Anguilla japonica*) [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 1998, **17**(4): 382—388 [陈昌福, 吴志新, 高汉娇. 日本鳃鳃爱德华氏菌病原菌的分离与鉴定. 华中农业大学学报, 1998, **17**(4): 382—388]
- [9] Chen H B, Lin Y D, Weng Y L, *et al.* Isolation, identification and drug resistance of the pathogens of red fin disease in eels [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1992, **16**(1): 40—46 [陈会波, 林阳东, 翁燕玲, 等. 鳃鳃赤鳍病原菌的分离鉴定和耐药性的研究. 水生生物学报, 1992, **16**(1): 40—46]
- [10] Fan H P, Xu J E, Huang X F. Investigation and control for the bacterial diseases of cultured eels in Fujian province [J]. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 1996, **2**: 67—70 [樊海平, 徐娟儿, 黄晓讽. 福建省养殖鳃鳃细菌性疾病的调查与防治. 海洋湖沼通报, 1996, **2**: 67—70]
- [11] Shen J Y, Qian D, Liu W, *et al.* Studies on the pathogens of bacterial diseases of *Macrobrachium nipponens* [J]. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 2000, **19**(3): 222—224 [沈锦玉, 钱冬, 刘问, 等. 养殖青虾“红鳃病”病原的研究. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2000, **19**(3): 222—224]
- [12] Chu W H. Studies on the pathogens, prevention and cure of Bacterial septicemia of *Carassius auratus gibelio* [J]. *Reservoir Fisheries*, 2000, **20**(1): 27—28 [储卫华. 异育银鲫细菌性败血症病原及防治研究. 水利渔业, 2000, **22**(1): 27—28]
- [13] Shen J Y, Yin W L, Qian D, *et al.* Studies on the pathogens of bacterial diseases of *Eriocheir sinensis* [J]. *Fishery Sciences of China*, 2000, **7**(3): 89—92 [沈锦玉, 尹文林, 钱冬, 等. 中华绒螯蟹“腹水病”及“抖抖病”并发病原的研究. 中国水产科学, 2000, **7**(3): 89—92]
- [14] Tang X C, Xue C F, Gao Z H. Studies on the pathogens of *Rana gryllo Mejnery* [J]. *Reservoir Fisheries*, 2000, **20**(1): 27—28 [汤显春, 薛翠峰, 高智慧. 沼泽绿牛蛙致病细菌的研究. 水利渔业, 2000, **20**(1): 27—28]
- [15] Tian T, Hu H G, Chen C F. Identification and Pathogenicity of bacterial pathogens isolated in an outbreak of bacterial disease of bluntnose black bream, *Megalobrama amblycephala* [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2010, **29**(3): 341—345 [田甜, 胡火庚, 陈昌福. 团头鲂细菌性败血症病原菌分离鉴定及致病力研究. 华中农业大学学报, 2010, **29**(3): 341—345]
- [16] Li A H. Detection and properties of transferable R<sup>+</sup> plasmid in fish-pathogenic bacteria [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1998, **22**(4): 319—324 [李爱华. 鱼类病原菌中 R<sup>+</sup> 质粒的检出及其特性. 水生生物学报, 1998, **22**(4): 319—324]
- [17] Dong X Z, Cai M Y. *Manual of Systematic and Determinative Bacteriology* [M]. Beijing: Science Press. 2001, 91—92; 349—398 [东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社. 2001, 91—92; 349—398]
- [18] Krieg N R, Holt J G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (volume 1)* [M]. Baltimore: Williams & Wilkins. 1984,

- 461—465
- [19] Borrell N, Acinas S G, Figueras M J, *et al.* Identification of *Aeromonas* clinical isolates by restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 16S rRNA genes [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, **35**: 1671—1674
- [20] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard [M]. 3rd ed. Wayne, PA. CLSI, 2008a, M31-A3
- [21] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Eighteenth Informational Supplement [M]. Wayne, PA, CLSI. 2008, M100-S18
- [22] Singh B R, Kulshreshtha S B. Preliminary examinations on the enterotoxigenicity of isolates of *Klebsiella pneumoniae* from seafoods [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1992, **16**(4): 349—352
- [23] Ye S J, Yang Q, Yu Y S. CHINET 2005 surveillance of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Chinese Journal of Infection Chemotherapy*, 2007, **7**(4): 283—286 [叶素娟, 杨青, 俞云松. 2005 年中国 CHINET 大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌耐药性分析. 中国感染与化疗杂志, 2007, **7**(4): 283—286]
- [24] Zhuo C, Su D H, Ni Y X, *et al.* CHINET 2009 surveillance of antimicrobial resistance in *E. coli* and *Klebsiella* spp. in China [J]. *Chinese Journal of Infection Chemotherapy*, 2010, **10**(6): 430—435 [卓超, 苏丹虹, 倪语星, 等. 2009 年中国 CHINET 大肠埃希菌和克雷伯菌属细菌耐药性监测. 中国感染与化疗杂志, 2010, **10**(6): 430—435]
- [25] Zou L K, Wang H N, Zeng B, *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of  $\beta$ -lactam resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolated from swine [J]. *Veterinary Microbiology*, 2011 **149**(1—2): 139—146
- [26] Ma J, Zeng Z, Chen Z, *et al.* High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr*, *aac(6)-Ib-cr*, and *qepA* among ceftiofur-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from companion and food-producing animals [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, **53**(2): 519—524
- [27] Wang Y H, Deng M, Zeng J. Advances in the mechanism of drug resistance of *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Chinese Journal of Nosocomiology*, 2007, **17**(4): 478—480 [王玉红, 邓敏, 曾吉. 肺炎克雷伯菌耐药机制研究进展. 中华医院感染学杂志, 2007, **17**(4): 478—480]

## ISOLATION AND IDENTIFICATION OF A MULTIPLE-DRUG RESISTANT *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* FROM *ANGUILLA MARMORATA*

TAN Ai-Ping<sup>1</sup>, DENG Yu-Ting<sup>1</sup>, JIANG Lan<sup>1</sup>, WU Ya-Li<sup>1, 2</sup>, XUE Hui-Juan<sup>1, 2</sup>,  
WANG Wei-Li<sup>1</sup>, LUO Li<sup>1</sup> and ZHAO Fei<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China; 2. College of Fishery and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** A strain of gram-negative bacteria, named HM2, was isolated from the liver of a diseased *Anguilla marmorata*. The  $LD_{50}$  of 96h was  $9.98 \times 10^7$  CFU/mL. HM2 was identified as *Klebsiella pneumoniae* according to its culture specific and physio-biochemical characteristics as well as ATB Expression systematic identification. By using the general primers of 16S rRNA, the gene fragments were amplified by PCR with a size of 1393 bp (GenBank No. JX282908). The amplified gene was sequenced and compared with those related sequences in GenBank and the phylogenetic tree was constructed on the basis of the sequences of 16S rRNAs. The BLAST result showed that HM2 had the highest homologies (100%), with sequence of *K. pneumoniae*, and the phylogenetic tree result revealed further that this strain clustered together with *K. pneumoniae*. On the other hand, the results of artificial infection experiments revealed that HM2 had a strong ability of the diseases induction. By testing with twenty antimicrobial agents, HM2 was found to be with high sensitivity to imipenem, streptomycin and amikacin; while it was resistant to seventeen other antimicrobial agents, including ampicillin, amoxicillin-clavulanic acid, cefalotin, ceftriaxone, cefotaxime, cefoxitin, sulfonamides, trimethoprim-sulfamethoxazole, rifampin, nalidixic acid, ciprofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, nitrofurantoin, tetracycline, doxycycline and chloramphenicol. The guidelines for the rational use of drugs are urgently needed to prevent the progress of antimicrobial resistance in aquaculture in future.

**Key words:** *Anguilla marmorata*; *Klebsiella pneumoniae*; Pathogenicity; Identification; Antimicrobial resistance