

卢姊豪, 贡 嘎, 常 攀, 等. 西藏牦牛肠出血性大肠杆菌 HPI 基因调查及耐药性分析[J]. 江苏农业科学, 2022, 50(7): 51-58.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.07.007

西藏牦牛肠出血性大肠杆菌 HPI 基因调查及耐药性分析

卢姊豪, 贡 嘎, 常 攀, 武 琦, 李天骄, 吴 丹, 罗润波, 索朗斯珠

(西藏农牧学院动物科学学院, 西藏林芝 860000)

摘要:为明确西藏牦牛源肠出血性大肠杆菌强毒力岛(HPI)基因以及ESBLs耐药基因携带情况,复壮笔者所在实验室保存的14株牦牛源肠出血性大肠杆菌,采用麦康凯培养基和伊红美蓝培养基进行筛选,镜检确定复壮成功后,应用PCR方法检测HPI携带情况,并对HPI相关毒力基因进行克隆与序列分析,测序结果同时采用K-B纸片法对被检菌株进行药敏试验和ESBLs表型检测,最后应用PCR方法进行ESBLs耐药基因检测。结果显示,14株被检菌株中HPI标志基因 *fyuA* 的携带率最高,达42.86% (6/14),其次分别为 *ybtA*、*irp2* 和 *irp8* 基因,携带率均为21.43% (3/14), *irp3* 携带率为14.2% (2/14),而未检测到 *irp5* 阳性基因。分离菌株对青霉素、苯唑西林、氨苄西林、头孢氨苄、头孢唑林、头孢拉定、阿米卡星的耐药率均 $\geq 57.14\%$,对派拉西林、羧苄西林、头孢他啶、环丙沙星耐药率均 $\geq 21.43\%$,并存在多种耐药现象,耐药谱集中在3~10耐,其中6耐菌株最多,有5株,其次为8耐3株、7耐2株、10耐、9耐、5耐和3耐均1株。对被检菌株进行14种ESBLs类基因检测,结果发现被检菌株只携带1种ESBLs类基因,为 *bla*_{TEM} 基因,携带率21.43% (3/14)。综上,西藏牦牛源肠出血性大肠杆菌中存在HPI基因。对常用抗菌药产生较高的耐药性并存在多种耐药现象,但对ESBLs类药物具有较高的敏感性。

关键词:肠出血性大肠杆菌;强毒力岛;耐药性;西藏牦牛

中图分类号: S855.1⁺2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2022)07-0051-08

目前,出血性大肠杆菌(enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC)是6种大肠杆菌中重要的食源性病原菌,给食品健康带来前所未有的挑战。牛

源EHEC是引起人类大肠杆菌病的主要来源之一。据报道,国外健康牛以及牛肉中分离出EHEC(O46血清型)并给人类健康带来一定的危害^[1-2]。赵燕娟等2019年从西藏牦牛体内分离鉴定出牦牛源肠出血性大肠杆菌并确定主要毒力基因为 *ehxA*^[3],提示西藏牦牛群中确实存在肠出血性大肠杆菌。

强毒力岛(high pathogenicity island, HPI)也称为耶尔森菌强毒力岛。它的核心基因主要有6种,分别为 *fyuA*、*irp2*、*irp8*、*irp5*、*ybtA* 和 *irp3* 组成,其中 *irp2* 和 *fyuA* 是HPI基因簇的核心基因^[4]。耶尔森菌强毒力岛在大肠杆菌和耶尔森菌之间进行水平传播的相关报道很多,并与致病性大肠杆菌的毒力

收稿日期:2021-07-04

基金项目:国家肉牛/牦牛产业技术体系建设专项(编号:CARS-37);西藏自治区科技厅2019年度重点项目(编号:201901)。

作者简介:卢姊豪(1998—),女,北京人,硕士研究生,主要从事高原动物传染病研究,E-mail:670630168@qq.com;共同第一作者:贡嘎(1983—),男,西藏拉萨人,博士研究生,主要从事高原动物传染病研究,E-mail:xzlgg@163.com。

通信作者:索朗斯珠,博士,教授,主要从事高原动物传染病研究。E-mail:xzslsz@163.com。

Cas9-FLP/FRT-based gene editing system[J]. Plant Biotechnology Journal, 2020, 18(3): 845-858.

[19] Endo A, Masafumi M, Kaya H, et al. Efficient targeted mutagenesis of rice and tobacco genomes using Cpf1 from *Francisella novicida* [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 38169.

[20] Daccord N, Celton J M, Linsmith G, et al. High-quality de novo assembly of the apple genome and methylome dynamics of early fruit development[J]. Nature Genetics, 2017, 49(7): 1099-1106.

[21] Zhang L Y, Hu J A, Han X L, et al. A high-quality apple genome assembly reveals the association of a retrotransposon and red fruit colour[J]. Nature Communications, 2019, 10: 1494.

[22] Alsuwaiyel M H. Algorithms: design techniques and analysis (revised edition) [M]. Singapore: World Scientific Publishing, 2016: 20-34.

[23] Koonin E V, Makarova K S, Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems [J]. Current Opinion in Microbiology, 2017, 37: 67-78.

[24] Nykky J, Vuento M, Gilbert L. Role of mitochondria in parvovirus pathology[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e86124.

[25] Waters M T, Langdale J A. The making of a chloroplast[J]. The EMBO Journal, 2009, 28(19): 2861-2873.

有关系^[5]。Schubert 等早在 1997 年就从大肠杆菌中检测到 *irp2* 和 *fyuA*。但目前西藏牦牛肠出血性大肠杆菌 HPI 基因检测鲜有报道。

大肠杆菌引起的腹泻病是西藏牦牛的主要疾病之一,但由于抗菌药物的不合理使用,造成牦牛大肠杆菌耐药现象不断增多,给牦牛大肠杆菌病的防治带来严峻挑战。贡嘎等 2014 年报道西藏牦牛大肠杆菌耐药率较高且存在多重耐药现象^[6],2020 年王刚等报道西藏牦牛源肠产毒性大肠杆菌的 ESBLs 阳性率为 55.3%,说明西藏牦牛大肠杆菌的耐药现象较为严重^[7]。但目前未见检测西藏牦牛肠出血性大肠杆菌耐药性以及碳青霉烯类药物耐药性的相关报道。因此,本研究对笔者所在实验室保存的 14 株牦牛源肠出血性大肠杆菌进行首次 HPI 标志基因检测、耐药性检测及碳青霉烯类药物耐药性检测以明确西藏牦牛源肠出血性大肠杆菌 HPI 基因及 ESBLs 耐药基因携带情况。

1 材料与方法

1.1 材料

14 株牦牛源肠出血性大肠杆菌株由笔者所在实验室于 2019 年鉴定保存。其中,西藏阿里 8 株、日喀则 3 株、林芝 2 株、昌都 1 株,按以上顺序分别命名为 TBY1、TBY2、TBY3、TBY3、TBY4、TBY5、

TBY6、TBY7、TBY8、TBY9、TBY10、TBY11、TBY12、TBY13、TBY14^[4]。

1.2 主要试剂

大肠杆菌鉴别培养基由笔者所在实验室自制^[8];常用抗菌药敏纸片购自杭州天和微生物试剂有限公司。Green Taq Mix、PCR 试剂、核酸染料 Gel View 等购自丰科生物科技有限公司(昆明)。

1.3 细菌复苏培养及鉴定

待复苏的菌株接种在普通营养肉汤培养基上,在 37 ℃ 振荡培养箱中培养 18 h,观察培养特性,同时进行细菌革兰氏染色镜检观察。普通肉汤上生长的菌液划线接种至琼脂平板上,在 37 ℃ 培养 18 h 后挑取单个菌落接种至麦康凯琼脂平板和伊红美蓝平板上,37 ℃ 培养,观察。

1.4 HPI 相关基因 PCR 检测

提取细菌基因组 DNA,根据文献[9]中报道的 HPI 基因引物进行 PCR 鉴定,引物序列见表 1。PCR 反应体系为:Green Taq Mix 25 μL,上游及下游引物各 2 μL,模板 DNA 4 μL、dd H₂O 17 μL,50 μL 体系。PCR 扩增反应为:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 30 s,退火温度见表 1,72 ℃ 1 min,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。最后采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳观察扩增结果。

表 1 HPI 基因引物信息

基因	引物序列(5'→3')	片段大小 (bp)	退火温度 (℃)
<i>irp2</i>	F:CTGTTACCGACAACCGC;R:GGGCAGCTGTTCTTCTTC	297	55
<i>fyuA</i>	F:CCGTCTTACAGGACTCACAACAAT;R:GGTACAGCCCAAACACCATATCAAC	1 071	58
<i>ybtA</i>	F:CATGATGGATGCCCTGCAAACGATGGCAATAATCCT;R:CATGATCTCGAGTTACATCCCCGGTTTAAAGGTCTGA	846	65
<i>irp3</i>	F:CGGAATCCCATGGACCCGAGAACACGTTATG;R:GCTCTAGATCACAGCCCTCTTATCATC	1 139	64
<i>irp5</i>	F:CGCGGATCCGGTACCAGGTGACGCATGAATTCCTC;R:AACTGCAGTCAACCTGTTTCGGGTCGG	1 636	67
<i>irp8</i>	F:TGTCATCAGTTCTCTTGCCG;R:CTGGTATCGGCGTCTCTAT	1 176	55

1.5 药敏试验、ESBLs 表型及 ESBLs 耐药基因检测

取成功复苏的菌液涂布接种至普通琼脂上,将临床常用 17 种抗生素药敏纸片和 1 种碳青霉烯类(亚胺培南)纸片贴于琼脂平板表面中央,倒置平皿,放于 37 ℃ 培养箱中培养 18~24 h 后观察结果。抑菌结果参照美国临床实验室标准委员会(NCCLS)2013 年公布的标准作出判定,具体见表 2。

提取细菌基因组 DNA,根据文献[9]中报道的 ESBLs 类基因引物进行 PCR 鉴定,引物序列见表 3。PCR 反应体系和程序见“1.4”节。

2 结果与分析

2.1 菌株复壮结果

由图 1 可知,被检菌株在伊红美蓝上生长为黑色带金属光泽的湿润圆形菌落,在麦康凯上生长边缘整齐、表面光滑的典型红色菌落,革兰氏染色染色结果为两端略圆的红色短杆菌。

2.2 *fyuA* 基因携带情况及进化分析

通过 PCR 检测、测序并在 NCBI 上进行比对,发现被检 14 株菌株中有 6 株与 GenBank 上 *fyuA* 基

表2 药敏试验判断标准

药物种类	药物名称	抑菌圈直径 (mm)		
		耐药	中介	敏感
青霉素类	青霉素	≤28	28 ~ 29	≥29
	苯唑西林	≤10	11 ~ 12	≥13
	氨苄西林	≤13	13 ~ 17	≥17
	哌拉西林	≤18	18 ~ 20	≥20
	羧苄西林	≤19	19 ~ 23	≥23
头孢菌素类	头孢噻肟	≤15	15 ~ 23	≥23
	头孢氨苄	≤14	15 ~ 17	≥17
	头孢唑啉	≤14	14 ~ 18	≥18
	头孢他啶	≤18	18 ~ 20	≥20
	头孢呋辛	≤16	17 ~ 19	≥20
	头孢曲松	≤24	24 ~ 27	≥27
	头孢哌酮	≤16	16 ~ 20	≥20
	头孢拉定	≤14	15 ~ 17	≥17
	环丙沙星	≤15	16 ~ 21	≥21
喹诺酮类	环丙沙星	≤15	16 ~ 21	≥21
多黏菌素类	多黏菌素 B	≤8	8 ~ 12	≥12
氨基糖苷类	阿米卡星	≤15	15 ~ 16	≥16
头霉素类	头孢西丁	≤14	14 ~ 18	≥18
碳青霉烯类	亚胺培南	≤13	13 ~ 16	≥16

表3 ESBLs 类基因引物信息

ESBLs 基因	引物序列(5'→3')	片段大小 (bp)	退火温度 (°C)
<i>bla</i> _{SHV}	F: ATGCGTTATATTTCGCCTGTGTATT; R: GCGTTGCCAGTGCCTCGATCAGCGC	858	57
<i>bla</i> _{TEM}	F: GAGTATTCAACATTTCCTGTGC; R: TAATCAGTGAGGCACCTATCTC	848	52
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	F: GGTAAAAAATCACTGCGTC; R: TTGGTGACGATTTTAGCCGC	876	52
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	F: ATGATGACTCAGAGCATTTCG; R: TGGGTTACGATTTTCGCCGC	866	55
<i>bla</i> _{CTX-M-9}	F: ATGGTGACAAAAGAGAGTGCA; R: CCCTTCGGCGATGATTCTC	870	55
<i>bla</i> _{CTX-M-25}	F: ATGATGAGAAAAAGCGTAAG; R: ATAACCGTCGGTGACAATTC	873	50
<i>bla</i> _{PER1}	F: ATGAATGTCATTATAAAAAGC; R: AATTTGGGCTTAGGGCAGAA	925	48
<i>bla</i> _{PER2}	F: TGTGTTTTACCGCTTCTGCTCTG; R: AGCTCAAAGTATAAGCCGCTTG	878	59
<i>bla</i> _{VEBI}	F: CGACTTCCATTTCGGATGC; R: GGACTCTGCAACAAATACGC	643	55
<i>bla</i> _{GES1}	F: ATGCGCTTCATTACGCAC; R: CTATTTGTCCGTGCTCAGG	864	55
<i>bla</i> _{KPC}	F: ATGTCACTGTATCGCCGT; R: CCTTACTGCCCGTTGACC	884	55
<i>bla</i> _{OXA-2}	F: ATGGCAATCCGAATCTTCGC; R: ATAGAGCGAAGGATTCGCCG	779	56
<i>bla</i> _{OXA-10}	F: TTTTCGAGTACGGCATTAGCT; R: GAATGGATTTCTTAGCGGC	723	52

因同源性 98% 以上,确定为 *fyuA* 基因阳性,阳性率最高,达 42.86% (6/14),分别为 TBY3 ~ TBY8,均来自西藏阿里;TBY10 和 TBY11,来自西藏日喀则。系统进化分析(图 2、图 3)显示,6 株菌株与韩国人源 CP026473 和巴西人源 CP0196 的 *fyuA* 基因聚成一簇,亲缘关系较近。

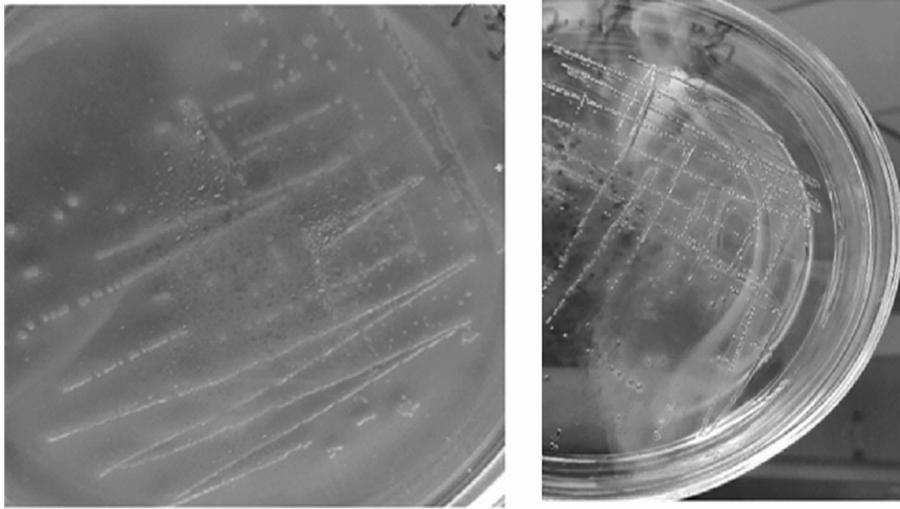
2.3 *irp2* 基因携带情况及进化分析

通过 PCR 检测、测序并在 NCBI 上进行比对,发现被检的 14 株菌株中有 3 株与 GenBank 上 *irp2* 基

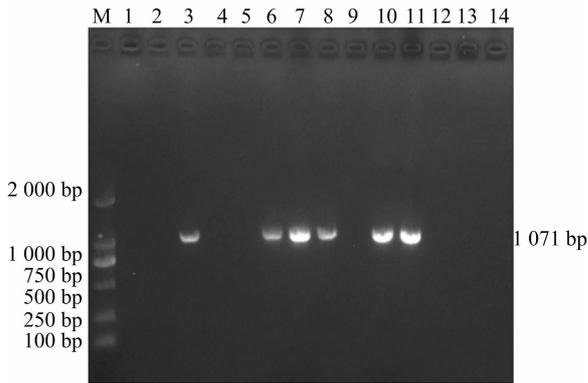
因同源性 99% 以上,确定为 *irp2* 基因阳性,阳性率最高,达 21.43% (3/14),分别为 TBY7 来自西藏阿里,TBY10 和 TBY11 来自西藏日喀则。系统进化分析(图 4、图 5)显示,3 株菌株单独聚成一个小簇,与荷兰人源 CP068990、美国鸡源 CP056077、中国合肥鸭源 CP045206 及日本人源 AP02411 的 *irp2* 基因聚成一个大簇,亲缘关系相对较近。

2.4 *irp3* 基因携带情况及进化分析

通过 PCR 检测、测序并在 NCBI 上进行比对,发



A. 麦康凯平板 B. 伊红美蓝平板
图1 肠出血性大肠杆菌菌落形态



M—DNA分子量标记(DL2000 DNA marker);
1~14—分别代表菌株号 TBY1~TB Y14。图4、
图6、图8、图10、图12、图13同

图2 *fyuA* 基因 PCR 扩增电泳图示

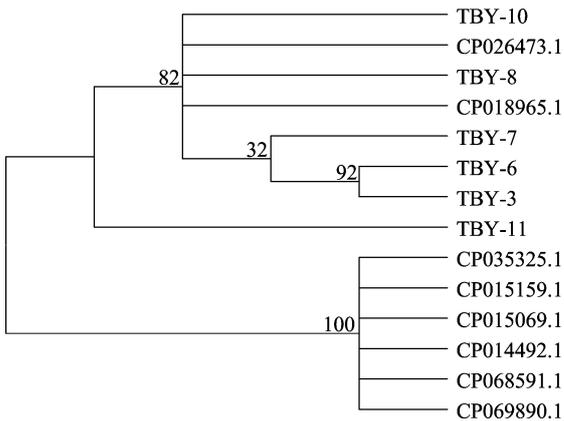


图3 大肠杆菌 *fyuA* 基因片段核苷酸序列系统发育树

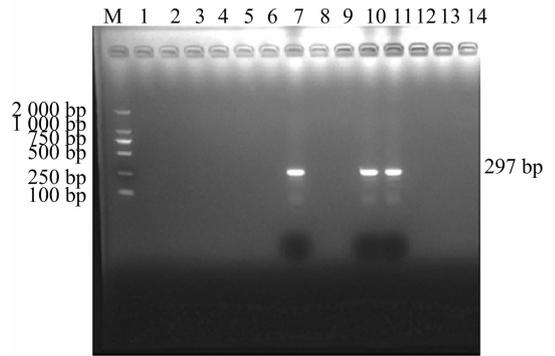


图4 *irp2* 基因 PCR 扩增电泳图示

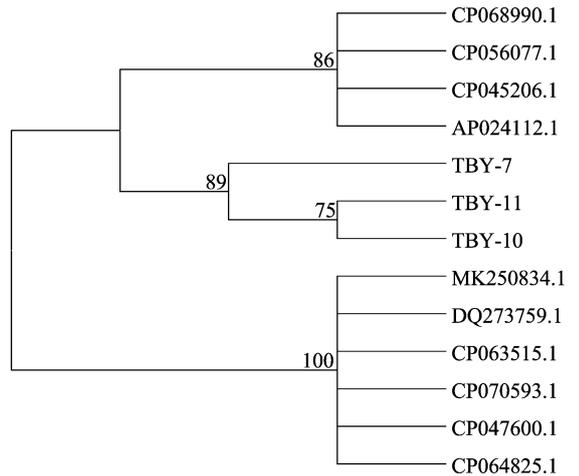


图5 大肠杆菌 *irp2* 基因片段核苷酸序列系统发育树

现被检的 14 株菌株中有 2 株与 GenBank 上 *irp3* 基因同源性 98% 以上,确定为 *irp3* 基因阳性,阳性率最高,达 14.29% (2/14),分别为 TB Y7 来自西藏阿里,TB Y10 来自西藏日喀则。系统进化分析(图 6、图 7)显示,2 株菌株与美国人源 CP054379 和

CP003034 的 *irp3* 基因聚成一簇,亲缘关系相对较近,而其他物种鸡源、旱濼源、鸭源等 *irp3* 的基因亲缘性较远。

2.5 *irp8* 基因携带情况及进化分析

通过 PCR 检测、测序并在 NCBI 上进行比对,发

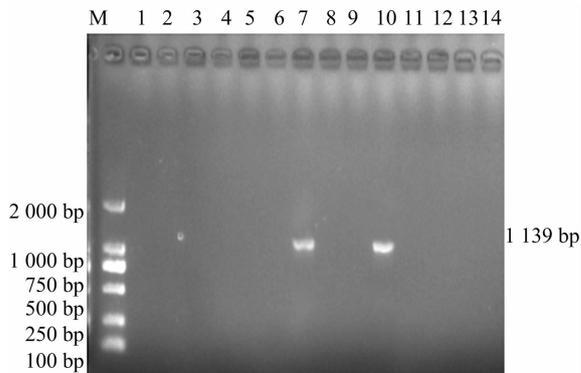


图6 *irp3* 基因 PCR 扩增电泳图示

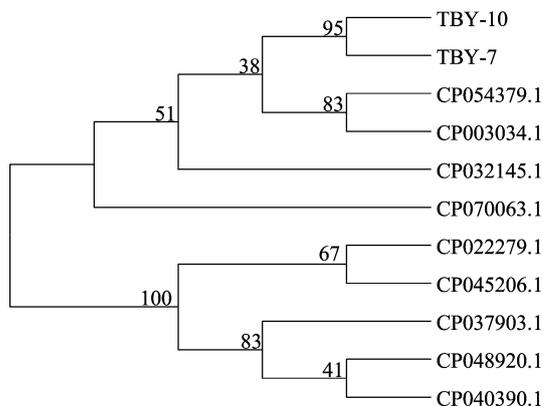


图7 大肠杆菌 *irp3* 基因片段核苷酸序列系统发育树

现被检的 14 株菌株中有 3 株与 GenBank 上 *irp8* 基因同源性 98% 以上, 确定为 *irp8* 基因阳性, 阳性率最高, 达 21.43% (3/14), 分别为 TBY7 来自西藏阿里, TBY10 和 TBY11 来自西藏日喀则。系统进化分析(图 8、图 9)显示, 3 株菌株与美国入源 CP054353 和中国杭州入源 CP04101 的 *irp8* 基因亲缘关系相对较近。

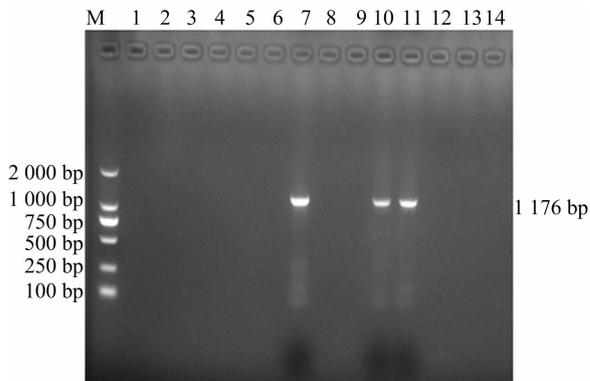


图8 *irp8* 基因 PCR 扩增电泳图示

2.6 *ybtA* 基因携带情况及进化分析

通过 PCR 检测、测序并在 NCBI 进行比对, 结果发现, 被检的 14 株菌株中有 3 株与 GenBank 上 *ybtA*

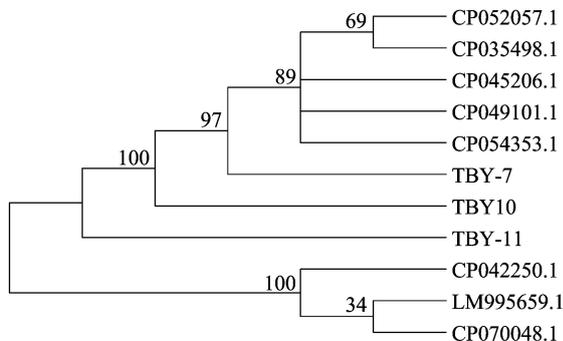


图9 大肠杆菌 *irp8* 基因片段核苷酸序列系统发育树

基因同源性 98% 以上, 确定为 *ybtA* 基因阳性, 阳性率最高, 达 21.43% (3/14), 分别为 TBY7 来自西藏阿里, TBY10 和 TBY11 来自西藏日喀则。系统进化分析(图 10、图 11)显示, 3 株菌株与澳大利亚智人源 CP058574 的 *ybtA* 基因亲缘关系相对较近。

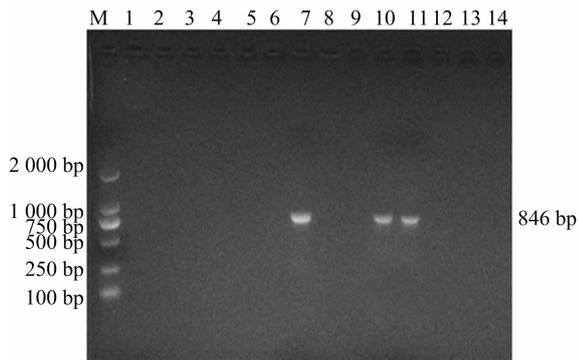


图10 *ybtA* 基因 PCR 扩增电泳图示

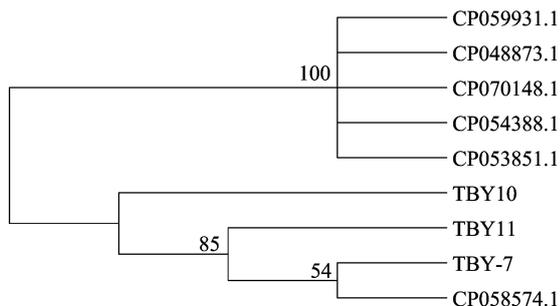


图11 大肠杆菌 *ybtA* 基因片段核苷酸序列系统发育树

2.7 耐药表型结果

由药敏试验结果(表 4)可知, 本研究对牦牛源肠出血性大肠杆菌进行 7 类 18 种抗菌药物耐药表型检测, 结果耐药率达到 50% 以上的有 7 种药物, 耐药最严重的是青霉素(100%), 其次是头孢唑林、头孢氨苄、苯唑西林、阿米卡星、头孢拉定和氨苄西林, 耐药率分别为 92.86%、85.71%、71.43%、71.43%、57.14% 和 57.14%。并且存在多重耐药现象, 其中, 6 耐 5 株、8 耐 3 株、7 耐 2 株、10 耐、9 耐、5 耐和 3

表 4 药敏试验结果

药物名称	药敏结果													
	TBY1	TBY2	TBY3	TBY4	TBY5	TBY6	TBY7	TBY8	TBY9	TBY10	TBY11	TBY12	TBY13	TBY14
青霉素	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
苯唑西林	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R
氨苄西林	R	R	R	S	I	R	R	R	R	R	I	I	I	I
哌拉西林	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S	I	R
羧苄西林	I	I	S	S	R	R	R	R	I	I	I	S	R	I
头孢噻肟	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
头孢氨苄	R	R	R	I	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R
头孢唑啉	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R
头孢他啶	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R	R	I	R
头孢呋辛	S	I	I	I	S	I	S	S	I	I	S	S	S	I
头孢曲松	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
头孢哌酮	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
头孢拉定	R	R	R	R	R	R	S	I	I	S	R	R	I	I
环丙沙星	S	S	S	S	I	R	S	I	R	R	S	I	S	I
多黏菌素 B	S	I	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S
阿米卡星	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S
头孢西丁	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
亚胺培南	S	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	I

注:R 表示耐药; I 表示中介; S 表示敏感。

耐均为 1 株。14 株被检菌株对碳青霉烯类(亚胺培南)、头孢噻肟、头孢呋辛、头孢曲松、头孢哌酮、多黏菌素 B 和头孢西丁等 7 种药物敏感率 100%。

2.8 ESBLs 基因检测结果

对 14 株牦牛源肠出血性大肠杆菌进行 14 种 ESBLs 类基因的检测, 结果发现被检菌株只携带 1 种 ESBLs 类基因, 为 *bla*_{TEM} 基因, 携带率 21.43% (3/14)。PCR 扩增电泳图见图 12、图 13。

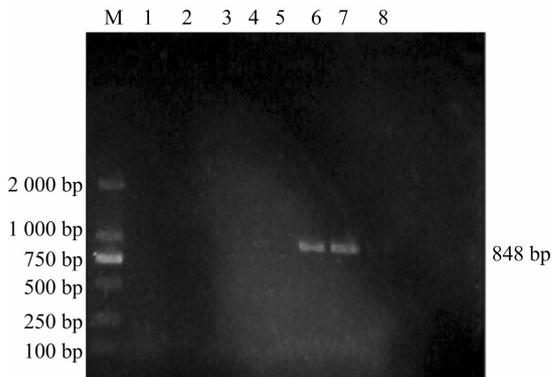


图 12 *bla*_{TEM} 基因 PCR 扩增电泳图示

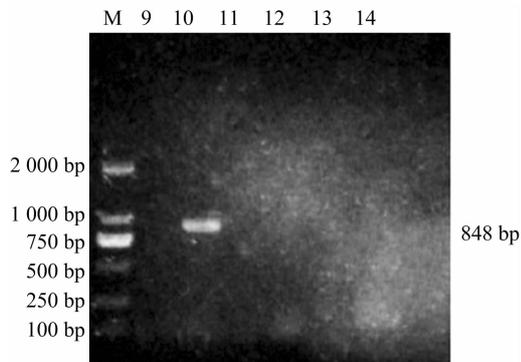


图 13 *bla*_{TEM} 基因 PCR 扩增电泳图示

的能力直接相关。强毒力岛(HPI)基因是致病性大肠杆菌的重要毒力因子, 具有保守的核心区域, 致病性大肠杆菌在宿主体内获得这些毒力因子并生存在宿主体内, 最终导致宿主发病。此外, 这些毒力因子可在人和动物间发生水平转移, 因此, 存在一定的公共卫生安全问题。

耶尔森菌强毒力岛是牛源、兔源、人源致泻性大肠杆菌的重要毒力因子^[10-13], 但有关西藏地区牦牛源大肠杆菌 HPI 毒力岛的检测尚未见报道。本研究复苏笔者所在实验室保存的牦牛源肠出血大肠杆菌 14 株, 通过 PCR 方法检测其强毒力岛基因 *fyuA*、*irp2*、*irp3*、*irp8*、*ybtA*、*irp5*。结果发现, 14 株牦牛

3 讨论

致病性大肠杆菌毒力的强弱与从宿主摄取铁

源肠出血性大肠杆菌中检出 5 种 HPI 基因,分别为 *fyuA*、*irp2*、*irp3*、*irp8* 和 *ybtA*,检出率分别为 42.86% (6/14)、21.43% (3/14)、14.2% (2/14)、21.43% (3/14) 和 21.43% (3/14),其中 *fyuA* 基因检出率最高。

fyuA 和 *irp2* 基因是 HPI 基因簇的主要结构基因之一,编码产物对于细菌在低铁环境下的生存具有重要的意义。本研究中 *fyuA* 基因携带率最高,为 42.86% (6/14),远低于高海慧等报道的宁夏犊牛大肠杆菌的阳性率 82.67% (62/75)^[8]、朱利霞等报道的河北肉牛溶血性大肠埃希菌的阳性率 95.7% (22/23)^[13] 和元振杰等报道的新疆致犊牛腹泻大肠杆菌的阳性率 91.67% (11/12)^[14],而高于王姣姣等报道的吉林省犊牛腹泻大肠杆菌的检出率 30% (10/33)^[15] 和徐继英等报道的中国北京等 7 个省份奶牛乳腺炎源大肠杆菌的阳性率 18.94% (36/190)^[16]。与不同种动物(猪源、禽源)相比,本次结果与云南撒坝猪源大肠杆菌的检测率 43.18% (19/44)^[17] 基本相一致,辽宁锦州地区鸡大肠杆菌的检测率 18.7% (28/150)^[18] 明显低于本次结果。不同地域、不同品种的动物之间 *fyuA* 基因检出率的差异原因有待进一步研究。有研究表明,*irp2* 基因仅在强致病性大肠杆菌中才能存在,本研究中被检的 14 株菌株中 *irp2* 基因的检出率为 21.43% (3/14)^[19]。此外,14 株被检菌株对 6 种毒力基因组合模式进行分析发现,携带 5 种基因的菌株 3 株,分别为 TBY7、TBY10 和 TBY11,毒力基因组合模式为:*irp2* + *irp3* + *irp8* + *fyuA* + *ybtA*,占阳性菌株的 35.71%。与孙武文研究的携带 5 种基因的模式^[20] 一致,这是否成为牛种动物致病性大肠杆菌的 HPI 毒力基因的组合模式需要更多数据的支撑。

新德里金属 β -内酰胺酶(NDM)能够水解所有金属内酰胺酶(除单环 β -内酰胺酶类外)^[22-23],在革兰氏阴性细菌临床治疗中碳青霉烯酶是最后一道防线^[24-25]。世界范围内传播的 NDM 阳性菌株已发现,给临床管理和公共卫生带来了严重的影响^[26]。*bla*_{NDM} 基因可随着优势克隆株或质粒在动物、动物性食品和人之间快速传播^[27]。因此,即便碳青霉烯类药物被禁用于动物养殖和动物临床,在动物中也会出现 NDM 阳性细菌的报道,首次报道是 2009 年^[28],随后全球多个国家和地区相继报道了 *bla*_{NDM} 基因的发现^[29]。近几年,我国个别地区动物群中 NDM 阳性细菌报道较多^[30-32]。2020 年王

刚等首次报道西藏地区存在产 ESBLs 大肠杆菌菌株^[7]。本研究对牦牛源出血性大肠杆菌进行 7 类 18 种抗菌药物耐药表型检测,结果耐药率达到 50% 以上的有 7 种药物,其中青霉素耐药率最高,达到 100%。14 株被检菌株对碳青霉烯类(亚胺培南)、头孢噻肟、头孢呋辛、头孢曲松、头孢哌酮、多黏菌素 B 和头孢西丁等 7 种药物敏感率 100%。本次检测的奎诺酮类药物、头霉素类及大部分头孢菌素类的耐药表型结果与王刚等报道西藏牦牛源肠产毒性大肠杆菌的耐药检测结果^[7] 一致,但头孢噻肟的耐药性结果完全相反,这可能与被检大肠杆菌的种类不同有一定的关系。另外,测试了 14 株分离菌 ESBLs 基因携带情况,发现仅有 3 株大肠杆菌携带 *bla*_{TEM} 基因,携带率 21.43% (3/14),其余菌株均未检测到 ESBLs 基因,这与本次试验耐药表型结果一致。

王刚等报道西藏牦牛源肠产毒性大肠杆菌 ESBLs 基因检出率为 55.3%,其中,TEM 检出率为 78.9%^[7],王警等报道江苏奶牛源大肠杆菌 ESBLs 基因检出率为 11.2%,其中 TEM 检出率为 100%^[9]。本次西藏牦牛源肠出血性大肠杆菌 ESBLs 基因检出率 7.14%,TEM 检出率为 21.43%,检出率远低于以上报道的结果。而佟盼盼等报道新疆牛源产志贺毒素大肠杆菌 ESBLs 基因鉴定,结果 ESBLs 检出率为 1.91%,并说明检测到的主要是 *bla*_{TEM} 和 *bla*_{CTX-M}^[33],本次结果与之一致。

HPI 是一个强毒力岛,含有 HPI 的大肠杆菌毒力要高于不含 HPI 的大肠杆菌,因此,HPI 可能增强细菌的致病力。牦牛腹泻病是西藏地区牦牛主要传染病之一,对牦牛的生产带来很大的危害。其中,大肠杆菌是牦牛腹泻病的主要病原菌。本研究首次对西藏地区分离鉴定的 14 株牦牛源肠出血性大肠杆菌进行 HPI 的主要基因检测,填补了这一研究数据空白。此外,监测了西藏地区牦牛源肠出血性大肠杆菌 ESBLs 基因的携带情况,可为西藏牦牛致病性大肠杆菌引起的腹泻病防治提供理论支撑。

参考文献:

- [1] Janezic K J, Ferry B, Hendricks E W, et al. Phenotypic and genotypic characterization of *Escherichia coli* isolated from untreated surface waters[J]. The Open Microbiology Journal, 2013, 7(1): 9-19.
- [2] 于学辉, 李 键, 程安春, 等. 鸭出血性大肠杆菌 O46 分离株实验病理模型的建立[J]. 中国农业科学, 2013, 46(24): 5217-5227.

- [3] 赵燕娟, 王刚, 索朗斯珠. 西藏牦牛源肠出血性大肠杆菌毒力基因检测与进化分析[J]. 中国农业大学学报, 2019, 24(2): 107-114.
- [4] Carniel E, Guilvout I, Prentice M. Characterization of a large chromosomal “high-pathogenicity island” in biotype 1B *Yersinia enterocolitica* [J]. Journal of Bacteriology, 1996, 178(23): 6743-6751.
- [5] Smati M, Magistro G, Adiba S, et al. Strain-specific impact of the high-pathogenicity island on virulence in extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* [J]. International Journal of Medical Microbiology, 2017, 307(1): 44-56.
- [6] 贡嘎, 王刚, 拉珍, 等. 西藏牦牛大肠杆菌对常用抗菌药物的耐药性分析[J]. 中国兽医杂志, 2014, 50(8): 80-82.
- [7] 王刚, 赵燕娟, 索朗斯珠, 等. 38株西藏牦牛源肠产毒性大肠杆菌ESBLs基因型检测及耐药性分析[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(14): 211-214.
- [8] 高海慧, 黎玉琼, 高小斐, 等. 犍牛腹泻源大肠杆菌耐药情况及HPI相关基因的检测[J]. 中国畜牧兽医, 2020, 47(6): 1942-1951.
- [9] 王警, 张雪寒, 郭芸芸, 等. 江苏地区奶牛场 bla_{NDM} 阳性大肠杆菌的分子流行病学[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(2): 391-397.
- [10] Bach S, de Almeida A, Carniel E. The *Yersinia* high-pathogenicity island is present in different members of the family Enterobacteriaceae [J]. FEMS Microbiology Letters, 2000, 183(2): 289-294.
- [11] Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. The *Yersinia* high-pathogenicity island is highly predominant in virulence-associated phylogenetic groups of *Escherichia coli* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2001, 196(2): 153-157.
- [12] Penteado A S, Ugrinovich L A, Blanco J, et al. Serotypes and virulence genes of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits in Brazil [J]. Veterinary Microbiology, 2002, 89(1): 41-51.
- [13] 朱利霞, 王洪彬, 赵希艳, 等. 肉牛溶血性大肠埃希菌分离鉴定和毒力与耐药基因检测及药敏试验[J]. 动物医学进展, 2019, 40(7): 128-133.
- [14] 元振杰, 王燕, 夏晨阳, 等. 致犍牛腹泻大肠杆菌对小鼠致病性及LEE、HPI毒力岛的检测[J]. 西南农业学报, 2014, 27(5): 2212-2215.
- [15] 王皎姣, 孙武文, 陈龙, 等. 吉林省部分地区犍牛腹泻大肠杆菌的分离鉴定与强毒力岛(HPI)相关序列分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016(9): 58-61.
- [16] 徐继英, 杨志强, 陈化琦, 等. 奶牛乳腺炎源大肠杆菌中耶尔森菌强毒力岛相关基因的检测及序列分析[J]. 中国农业科学, 2012, 45(6): 1199-1205.
- [17] 刘超英, 蒋欢, 单春兰, 等. 云南撒坝猪源大肠杆菌优势血清型强毒力岛的检测及其致病性[J]. 中国兽医学报, 2019, 39(8): 1484-1489.
- [18] 蒋月, 盛鹏飞. 鸡源大肠杆菌中HPI和LEE毒力岛相关基因的检测[J]. 中国家禽, 2014, 36(21): 54-56.
- [19] Magistro G, Magistro C, Stief C G, et al. The high-pathogenicity island (HPI) promotes flagellum-mediated motility in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* [J]. PLoS One, 2017, 12(10): e0183950.
- [20] 孙武文. 我国北方地区犍牛腹泻大肠杆菌HPI分子结构组成及其菌蜕的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2016: 1-103.
- [21] Yong D, Toleman M A, Giske C G, et al. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, *bla* (NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009, 53(12): 5046-5054.
- [22] Marrs E C L, Day K M, Perry J D. *In vitro* activity of mecillinam against Enterobacteriaceae with NDM-1 carbapenemase [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2014, 69(10): 2873-2875.
- [23] Nicolau D P. Carbapenems; a potent class of antibiotics [J]. Expert Opinion on Pharmacotherapy, 2008, 9(1): 23-37.
- [24] Moellering R C Jr. NDM-1: a cause for worldwide concern [J]. The New England Journal of Medicine, 2010, 363(25): 2377-2379.
- [25] Wang Y, Zhang R M, Li J Y, et al. Comprehensive resistome analysis reveals the prevalence of NDM and MCR-1 in Chinese poultry production [J]. Nature Microbiology, 2017, 2: 16260.
- [26] 王刚, 赵燕娟, 索朗斯珠, 等. 38株西藏牦牛源肠杆菌ESBLs基因型检测及耐药性分析[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(14): 211-214.
- [27] Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae [J]. Emerging Infectious Diseases, 2011, 17(10): 1791-1798.
- [28] 孙坚, 刘雅红, 冯友军. 动物源细菌耐药性研究现状与对策[J]. 生物工程学报, 2018, 34(8): 1246-1258.
- [29] Liu B T, Song F J, Zou M, et al. High incidence of *Escherichia coli* strains coharboring *mcr-1* and *bla_{NDM}* from chickens [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2017, 61(3): e02347-16.
- [30] Kong L H, Lei C W, Ma S Z, et al. Various sequence types of *Escherichia coli* isolates coharboring *bla_{NDM}-5* and *mcr-1* genes from a commercial swine farm in China [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2017, 61(3): e02167-16.
- [31] Lin D C, Xie M M, Li R C, et al. IncFII conjugative plasmid-mediated transmission of *bla_{NDM}-I* elements among animal-borne *Escherichia coli* strains [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2016, 61(1): e02285-16.
- [32] He T, Wang Y, Sun L C, et al. Occurrence and characterization of *bla_{NDM}-5*-positive *Klebsiella pneumoniae* isolates from dairy cows in Jiangsu, China [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2016, 72(1): 90-94.
- [33] 佟盼盼, 杨银萍, 谢金鑫, 等. 乌鲁木齐市宠物犬、猫粪源大肠杆菌耐药性分析与ESBLs基因型检测[J]. 中国农业大学学报, 2020, 25(11): 90-98.