

王 警, 张雪寒, 郭芸芸, 等. 江苏地区奶牛场 *bla*<sub>NDM</sub> 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.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2020.02.019

## 江苏地区奶牛场 *bla*<sub>NDM</sub> 阳性大肠杆菌的分子流行病学

王 警<sup>1,2</sup>, 张雪寒<sup>2</sup>, 郭芸芸<sup>1,2</sup>, 张碧成<sup>2</sup>, 吴庆侠<sup>1</sup>, 何孔旺<sup>2</sup>

(1. 西藏农牧学院动物科学学院, 西藏 林芝 860000; 2. 江苏省农业科学院兽医研究所, 江苏 南京 210014)

**摘要:** 为了调查江苏地区奶牛场大肠杆菌中 *bla*<sub>NDM</sub> 基因的分子流行病学特征。从江苏部分地区 3 个奶牛场采集样品 134 份, 使用 PCR 和测序的方法筛选 *bla*<sub>NDM</sub> 阳性大肠杆菌, 同时对其进行超广谱  $\beta$ -内酰胺酶类基因的检测, 采用药敏试验检测 *bla*<sub>NDM</sub> 阳性大肠杆菌对 19 种常用抗生素的敏感性, 通过多位点序列分型 (MLST) 和脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 对携带 *NDM* 基因的大肠杆菌进行亲缘关系分析, 通过质粒结合试验验证 *bla*<sub>NDM</sub> 基因的可转移性。结果显示, 从 134 份奶牛场样品中共分离 15 株 *bla*<sub>NDM</sub> 阳性大肠杆菌, 包括 *NDM-1* 和 *NDM-5* 2 种变体。15 株 *bla*<sub>NDM</sub> 阳性大肠杆菌对多种抗生素均呈现不同程度的耐药, 奶牛场 15 株 *bla*<sub>NDM</sub> 阳性大肠杆菌包括 7 种 ST 型, 分别是 ST410、ST846、ST206、ST101、ST1642、ST3076、ST1626, 同一种 ST 型在粪便样品和环境样品中同时存在, 表明相同 ST 型 *bla*<sub>NDM</sub> 阳性大肠杆菌可在动物与环境间相互传播。PFGE 试验结果表明, 15 株 *bla*<sub>NDM</sub> 阳性大肠杆菌可以分为 11 个簇, 同一样品的分离株倾向于相同的簇, 在比较小的范围内存在 PFGE 图谱相同的现象; 对 15 株菌株的结合子进行 *bla*<sub>NDM</sub> 基因的转移性试验结果表明, 15 株大肠杆菌的 *bla*<sub>NDM</sub> 耐药基因均通过质粒结合转移至受体菌 J53。表明, *bla*<sub>NDM</sub> 阳性大肠杆菌在江苏省部分地区奶牛场中流行相对较为严重, 存在多重耐药现象, 推测 *bla*<sub>NDM</sub> 基因主要通过质粒结合转移的方式进行水平传播, 这为食品源耐药菌的监测及风险评估提供了依据。

**关键词:** *NDM* 耐药基因; 大肠杆菌; 多位点序列分型; 药敏试验

**中图分类号:** S852.61<sup>+</sup>2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2020)02-0391-07

## Molecular epidemiological study on *bla*<sub>NDM</sub>-positive *Escherichia coli* in dairy farms in Jiangsu province

WANG Jing<sup>1,2</sup>, ZHANG Xue-han<sup>2</sup>, GUO Yun-yun<sup>1,2</sup>, ZHANG Bi-cheng<sup>2</sup>, WU Qing-xia<sup>1</sup>, HE Kong-wang<sup>2</sup>

(1. College of Animal Sciences, Tibet Agricultural and Animal Husbandry University, Linzhi 860000, China; 2. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** To investigate the epidemiology and molecular characteristics of *bla*<sub>NDM</sub> gene in *Escherichia coli* from dairy farms in Jiangsu province, a total of 134 samples were collected from three dairy farms in Jiangsu province. The *bla*<sub>NDM</sub>-positive *E. coli* was screened using PCR and sequencing, and the extended-spectrum  $\beta$ -lactamase gene was detected. The antimicrobial susceptibility testing was used to detect the sensitivity of *bla*<sub>NDM</sub>-positive *E. coli* to 19 commonly used antibiotics. The genetic relationship of *E. coli* carrying *NDM* gene was analyzed by multi-locus sequence typing (MLST) and pulsed-

field gel electrophoresis (PFGE). The transferability of *bla*<sub>NDM</sub> gene was verified by conjugation experiments. The results showed that fifteen strains of *bla*<sub>NDM</sub>-positive *E. coli* were isolated from 134 dairy samples, including *NDM-1* and *NDM-5*. All fifteen strains of *bla*<sub>NDM</sub>-positive *E. coli* exhibited different resistance to multiple antimicrobials and

收稿日期: 2019-11-26

基金项目: “十三五”国家重点研发计划项目 (2018YFD0500504)

作者简介: 王 警 (1993-), 女, 河南周口人, 硕士研究生, 主要从事食源性病原菌分离、鉴定和遗传进化分析。

通讯作者: 吴庆侠, (E-mail) goodwqx@163.com; 何孔旺, (E-mail) kwh2003@263.net

belonged to seven STs, namely ST410, ST846, ST206, ST101, ST1642, ST3076, ST1626. The same ST was involved in both fecal and environmental samples, indicating that *bla*<sub>NDM</sub>-positive *E. coli* with the same type of ST could be transmitted from animals to environment. The results of PFGE showed that fifteen strains of *bla*<sub>NDM</sub>-positive *E. coli* could be divided into 11 clusters, isolates of the same sample tended to have the same PFGE cluster, and the same PFGE pattern existed in a relatively small range. The *bla*<sub>NDM</sub> gene of fifteen strains of *E. coli* was transferred to receptor bacterium J53 by binding with plasmids. The *bla*<sub>NDM</sub>-positive *E. coli* is relatively more prevalent in dairy farms in Jiangsu, and there is multi-drug resistance. The *bla*<sub>NDM</sub> gene is mainly transmitted by means of combined transfer, which provides a basis for monitoring and risk assessment of drug-resistant bacteris.

**Key words:** drug-resistant gene *NDM*; *Escherichia coli*; multi-locus sequence typing (MLST); antimicrobial susceptibility testing

新德里金属 $\beta$ -内酰胺酶(*NDM*)能够水解除单环 $\beta$ -内酰胺酶类外的所有金属内酰胺酶(*MBL*)<sup>[1-2]</sup>,包括碳青霉烯酶。碳青霉烯酶是治疗许多革兰氏阴性细菌引起的严重感染的主要抗微生物剂<sup>[3-4]</sup>,是在临床治疗中的最后一道防线。目前临床上无法获得*NDM*酶水解内酰胺类药物的抑制剂,包括克拉维酸,他唑巴坦和舒巴坦。*NDM-1*最初是在2008年从印度新德里住院的瑞典患者中分离出的肺炎克雷伯菌中鉴定出来的,此后陆续在肠杆菌科、不动杆菌属和假单胞菌的各种物种中发现*NDM-1*,并已鉴定出24种*NDM*变体,其中肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌是*bla*<sub>NDM</sub>基因主要携带者,对于大肠杆菌,其ST410、ST167、ST617是最流行的<sup>[5]</sup>。*NDM*阳性菌株已在世界范围内传播并被发现,在印度次大陆,中东和巴尔干各岛地区的流行率最高,对临床管理和公共卫生构成了重大挑战<sup>[6-7]</sup>。

不仅在医院,这种携带*bla*<sub>NDM</sub>基因的菌株在社区和环境也有发现。近些年来,已在食品源动物、伴侣动物、野生动物中发现*NDM*阳性菌<sup>[8]</sup>。2017年Wang等<sup>[9]</sup>对肉鸡产业链中*bla*<sub>NDM</sub>基因进行流行病学调查研究,发现*NDM*阳性大肠杆菌来源于商品鸡场,并可在商品鸡场的鸡、狗、人、家燕和苍蝇等不同生物间传播。2019年Liu等<sup>[10]</sup>在鹅场的水样中发现了ST48型的携带*bla*<sub>NDM-5</sub>的大肠杆菌,这是第一次在水禽环境中发现*NDM*阳性大肠杆菌。2017年He等<sup>[11]</sup>首次在江苏省奶牛粪便和生牛乳中发现携带*bla*<sub>NDM-5</sub>的肺炎克雷伯菌。在国外,2013年Ghatak等<sup>[12]</sup>在牛奶样品中发现了携带有*bla*<sub>NDM</sub>的大肠杆菌,同年欧洲科学家分别在野生鸟类和宠物狗中分离得到*NDM*阳性沙门氏菌和*NDM*阳性大肠杆菌<sup>[13-14]</sup>。这些都表明伴侣动物和食品动物已成为携带*bla*<sub>NDM</sub>

的细菌储库,对公共卫生安全造成潜在威胁。

对于*NDM*阳性细菌来说,优势克隆菌株的扩散传播或质粒在动物、动物性食品和人之间进行快速传播是导致*NDM*基因流行的主要分子机制。中国作为食品动物大国,加强对食品源动物中碳青霉烯酶耐药基因*NDM*流行状况的监测显的尤为重要,对国家控制细菌耐药性具有重要的意义。本研究从江苏部分地区奶牛场中采集样品,分离碳青霉烯酶耐药大肠杆菌,对*bla*<sub>NDM</sub>耐药基因在食品动物源大肠杆菌中的流行状况和传播特征进行了调查研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品和菌株来源

2018年6月从江苏淮安2个奶牛养殖场采集样品104份,包括粪便样品和环境样品,2018年5月在徐州某奶牛养殖场采集粪便样品和环境样品共30份,其中环境样品包括皮肤擦拭子和环境水样品。3个奶牛养殖场均使用过 $\beta$ -内酰胺酶制剂来处理牛乳腺炎,例如阿莫西林和头孢噻唑。大肠埃希菌ATCC25922和J53均由江苏省农业科学院农产品质量与安全营养研究所何涛博士提供。

### 1.2 主要试剂及培养基

头孢噻唑、头孢他啶、亚胺培南、美罗培南和氨曲南均购自北京索莱宝科技有限公司,EC肉汤、麦康凯培养基、MH琼脂以及MH肉汤购自青岛海博生物技术有限公司,PCRmix购自广州东盛生物技术有限公司,限制性核酸内切酶*Xba*I购自大连宝生物工程(TaKaRa)有限公司,引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

### 1.3 *bla*<sub>NDM</sub>阳性大肠杆菌的分离与鉴定

将粪便样品和环境擦拭子用PBS处理后,以1%的比例加入到100 ml含新生霉素的EC肉汤中

37~40 ℃ 增菌 8~12 h, 然后在含有 1 μg/ml 美罗培南的麦康凯琼脂板上划线, 37 ℃ 培养 16~24 h, 挑取平板上的红色单菌落用 16S rRNA 引物和微生物鉴定仪 (Aris2x) 来鉴定菌属, 煮沸法制取模板。鉴定成功的大肠杆菌用 PCR 方法扩增 *bla*<sub>NDM</sub> 基因, *NDM* 特异性引物按照参考文献 [15] 合成, 对扩增的阳性 *NDM* 进行测序, 测序结果使用 DNAMAN 软件进行比对确定 *NDM* 变体。

#### 1.4 耐药基因的检测

对携带有 *bla*<sub>NDM</sub> 基因的大肠杆菌进行其他 ES-BL 类基因的检测, 引物按参考文献 [16] 合成, 分别检测了 *bla*<sub>SHV</sub>、*bla*<sub>TEM</sub>、*bla*<sub>CTX-M-1</sub>、*bla*<sub>CTX-M-2</sub>、*bla*<sub>CTX-M-9</sub>、*bla*<sub>CTX-M-25</sub>、*bla*<sub>PER-1</sub>、*bla*<sub>PER-2</sub>、*bla*<sub>VEB</sub>、*bla*<sub>GES</sub>、*bla*<sub>KPC</sub>、*bla*<sub>OXA-2-group</sub>、*bla*<sub>OXA-10-group</sub>。

#### 1.5 毒力基因的检测

对携带有 *bla*<sub>NDM</sub> 基因的大肠杆菌进行相关毒力基因的检测, 三重 PCR 检测 *stx1*、*stx2*、*hly* 基因, 二重 PCR 检测 *stx2v*、*eae* 基因, 引物由本实验室保存。

#### 1.6 药敏试验

按照美国临床实验室标准委员会 CLSI (2013)

推荐的琼脂稀释法测定大肠杆菌对临床感染常用的抗感染药物 β-内酰胺酶类药物 (头孢他啶、头孢噻呋、美罗培南、亚胺培南和氨曲南) 以及四环素、氨基糖苷类药物 (庆大霉素)、氟喹诺酮类 (环丙沙星) 等几类药物的敏感性。大肠埃希菌 ATCC25922 作为质控菌株, 同时设 MH 肉汤为阴性对照。每株菌株做 2 个重复。操作步骤及结果判定按照标准药敏实验标准进行。

#### 1.7 多位点序列分型 (MLST)

本研究对 15 株 *bla*<sub>NDM</sub> 阳性大肠杆菌进行 MLST 分型, 7 对管家基因引物 [17] 详见表 1, PCR 扩增后进行琼脂糖凝胶电泳, 再送南京思普金公司进行测序。把一代测序的结果参照 *E. coli* MLST 的数据库 ([https://pubmlst.org/bigsdb?db=pubmlst\\_escherichia\\_seqdef](https://pubmlst.org/bigsdb?db=pubmlst_escherichia_seqdef)) 进行分型。

#### 1.8 脉冲场凝胶电泳试验 (PFGE)

参照美国 CDC (Centers for disease control and prevention) Pulse Net 大肠杆菌标准 PFGE 操作规程, 对携带有 *bla*<sub>NDM</sub> 基因的大肠杆菌进行 PFGE 分型。

表 1 7 对管家基因序列

Table 1 Sequences of seven housekeeping genes

管家基因	引物序列 (5'→3')	退火温度 (℃)	片段大小 (bp)
<i>adk</i>	P1: ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG	54	536
	P2: CCGTCAACTTTCGCGTATTT		
<i>fumC</i>	P1: TCACAGGTCGCCAGCGCTTC	54	469
	P2: GTACGCAGCGAAAAAGATTC		
<i>gyrB</i>	P1: TCGGCGACACGGATGACGGC	60	460
	P2: ATCAGGCCTTCACGCGCATC		
<i>icd</i>	P1: ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA	54	518
	P2: GGACGCAGCAGGATCTGTT		
<i>mdh</i>	P1: ATGAAAGTCGAGTCTCGGCGCTGCTGGCGG	60	452
	P2: TTAACGAACCTCGCCCCAGAGCGATATCTTTCTT		
<i>purA</i>	P1: CGCGCTGATGAAAGAGATGA	54	478
	P2: CATACGGTAAGCCACGCAGA		
<i>recA</i>	P1: AGCGCGAAGGTAAAACCTGTG	55	510
	P2: ACCTTTGTAGCTGTACCACG		

#### 1.9 质粒结合试验

使用膜接合转移的方法对 *bla*<sub>NDM</sub> 基因的传播方

式进行验证, 分别以携带 *bla*<sub>NDM</sub> 基因大肠杆菌和 J53 作供体菌和受体菌, 用含 1 mg/L 的美罗培南和 100

mg/L的叠氮化钠的麦康凯平板筛选携带 *bla<sub>NDM</sub>* 基因阳性接合子,通过 PCR 方法验证结合子 *bla<sub>NDM</sub>* 基因是否被成功结合转移。

## 2 结果

### 2.1 *NDM* 阳性大肠杆菌的分离与鉴定

2018年5月至6月在江苏省淮安市和徐州市奶牛场134份样品中共分离出15株 *bla<sub>NDM</sub>* 阳性大肠杆菌,经测序,并在 DNAMAN 上与24种 *NDM* 变体比对,发现包括 *NDM-1* 和 *NDM-5* 2种变体(13株 *NDM-1*,2株 *NDM-5*),其中有5份来自环境样品,10份来自粪便样品。*bla<sub>NDM</sub>* 样品阳性率达7.23%(9/134),*bla<sub>NDM</sub>* 阳性大肠杆菌的阳性率为25.00%(15/60)。

### 2.2 耐药基因检测结果统计

对15株 *bla<sub>NDM</sub>* 阳性大肠杆菌进行13种 ESBL 类基因的检测,结果发现所有 *bla<sub>NDM</sub>* 阳性大肠杆菌携带一种或多种 ESBL 类基因,有1株从粪便样品中分出的菌株同时携带 *NDM* 基因和多黏菌素耐药基因 *mcr-1*,由表2可知,环境样品比粪便样品含有 ESBL 类基因种类多。

表2 不同来源 *bla<sub>NDM</sub>* 阳性大肠杆菌中耐药基因阳性率

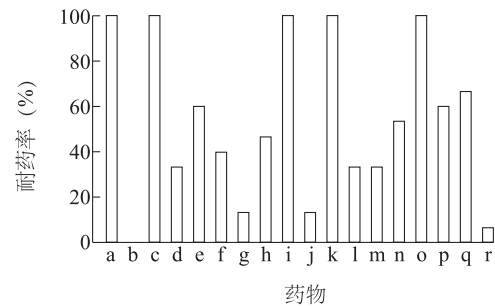
Table 2 Positive rates of drug-resistant genes in different sources of *bla<sub>NDM</sub>*-positive *Escherichia coli*

基因	耐药基因阳性率(%)	
	粪便样品	环境样品
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	100	100
<i>bla<sub>SHV</sub></i>	0	20
<i>bla<sub>CTX-M-9</sub></i>	20	40
<i>bla<sub>OXA-2</sub></i>	0	20
<i>bla<sub>OXA-10</sub></i>	0	40
<i>mcr-1</i>	10	0

### 2.3 药敏试验

由图1可看出,15株 *bla<sub>NDM</sub>* 阳性大肠杆菌对头孢类(头孢噻唑、头孢他啶、头孢唑啉)、四环素、氨苄西林都呈现100%的耐药率,对氨基糖苷类(庆大霉素、妥布霉素和阿米卡星)的耐药率分

别为53.3%(8/15)、33.3%(5/15)和6.7%(1/15);对四环素类抗生素米诺环素的耐药率达66.7%(10/15);对喹诺酮类药物环丙沙星和左氧沙星的耐药率分别为60%(9/15)和33.3%(5/15)。



a: 头孢噻唑; b: 氨基糖苷; c: 头孢他啶; d: 美罗培南; e: 亚胺培南; f: 亚胺硫霉素; g: 呋喃妥因; h: 哌拉西林; i: 四环素; j: 头孢吡肟; k: 头孢唑啉; l: 左氧沙星; m: 妥布霉素; n: 庆大霉素; o: 氨苄西林; p: 环丙沙星; q: 米诺环素; r: 阿米卡星。

图1 15株 *bla<sub>NDM</sub>* 阳性大肠杆菌对不同抗生素的耐药率

Fig.1 Resistance rates of 15 *bla<sub>NDM</sub>*-positive *E. coli* to different antibiotics

### 2.4 多位点序列分型结果

通过多位点序列分型将15株 *bla<sub>NDM</sub>* 阳性大肠杆菌共分成7种 ST 型,包括 ST206(2株)、ST846(4株)、ST410(1株)、ST1626(1株)、ST101(1株)、ST3076(1株)、ST1642(1株),以 ST206 和 ST846 较为流行(表3)。

### 2.5 PFGE 分型结果

如图2所示,将15株 *bla<sub>NDM</sub>* 阳性大肠杆菌使用 *Xba* I 酶进行 PFGE 分型,根据 PFGE 聚类结果,15株大肠杆菌可以分为11个簇,菌株1-28-139和菌株1-28-144具有相同的 PFGE 型别。菌株 M3-1、M3-21 和菌株 M3-27 具有相同的 PFGE 型别。菌株 M1-41 和菌株 1-5-106 具有相同的 PFGE 型别。其他8个型别分别只包含1株菌株。同一样品的分离株倾向于相同的 PFGE 型别,在小范围内存在相同的 PFGE 图谱。

### 2.6 质粒结合试验

通过 PCR 方法对结合子进行 *bla<sub>NDM</sub>* 基因的验证,15株大肠杆菌的 *bla<sub>NDM</sub>* 耐药基因全部结合转移至大肠杆菌 J53 中。这表明 *NDM* 耐药基因可能会在不同的 ST 型大肠杆菌中以质粒转移的方式进行传播扩散。



表 3 15 株 *bla*<sub>NDM</sub> 阳性菌的 ST 型及耐药表型  
Table 3 ST and resistance phenotype of 15 *bla*<sub>NDM</sub>-positive *E. coli*

细菌编号	NDM 型	耐药基因及毒力基因	ST 型	耐药表型
M16-194	NDM5	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	ST1624	CEF/TAZ/MEM/IPM/IMI/PIP/TET/CPD/CZ/LVX/TOB/GM/AM/CIP/MIN
M18-195	NDM1	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	ST410	CEF/TAZ/IPM/PIP/TET/CZ/LVX/AM/CIP
M3-1	NDM1	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	ST206	CEF/TAZ/MEM/IMI/TET/CZ/AM/MIN
M1-21	NDM1	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	ST846	CEF/TAZ/IMI/PIP/TET/CPD/CZ/LVX/TOB/GM/AM/CIP/MIN
1-28-139	NDM1	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	未知	CEF/TAZ/IPM/PIP/TET/CZ/AM
M1-41	NDM1	<i>eae bla</i> <sub>TEM</sub>	ST846	CEF/TAZ/IPM/TET/CZ/AM/MIN
M3-57	NDM1	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	未知	CEF/TAZ/TET/CZ/LVX/GM/AM/CIP
M3-63	NDM1	<i>bla</i> <sub>TEMblaCTX-M-9</sub>	ST846	CEF/TAZ/TET/CZ/GM/AM/MIN
1-28-144	NDM1	<i>bla</i> <sub>TEMblaCTX-M-9blaOXA-10</sub>	ST3076	CEF/TAZ/IPM/PIP/TET/CZ/AM
M3-76	NDM1	<i>bla</i> <sub>TEMblaCTX-M-9</sub>	ST1626	CEF/TAZ//NIT/TET/CZ/GM/AM/CIP
1-5-106	NDM1	<i>bla</i> <sub>TEMblaOXA-2</sub>	ST206	CEF/TAZ/MEM/IPM/IMI/NIT/TET/CZ/AM/CIP/MIN
1-9-111	NDM1	<i>bla</i> <sub>TEMblaSHV</sub>	未知	CEF/TAZ/MEM/IPM/IMI/NIT/PIP/TET/CZ/LVX/TOB/GM/AM/CIP/MIN/AN
1-6-118	NDM5	<i>bla</i> <sub>TEMblaCTX-M-9</sub>	ST101	CEF/TAZ/MEM/IPM/IMI/NIT/PIP/TET/CZ/TOB/GM/AM/CIP/MIN
M15-182	NDM1	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	未知	CEF/TAZ/IPM/TET/CZ/TOB/GM/AM/CIP/MIN
M1-27	NDM1	<i>bla</i> <sub>TEMmcr-1</sub>	ST846	CEF/TAZ/TET/CZ/AM/MIN

CEF: 头孢噻吩; AZT: 氨基糖苷; TAZ: 头孢他啶; MEM: 美罗培南; IPM: 亚胺培南; IMI: 亚胺硫霉素; NIT: 呋喃妥因; PIP: 哌拉西林; TET: 四环素; CPD: 头孢吡肟; CZ: 头孢唑啉; LVX: 左氧沙星; TOB: 妥布霉素; GM: 庆大霉素; AM: 氨苄西林; CIP: 环丙沙星; MIN: 米诺环素; AN: 阿米卡星。

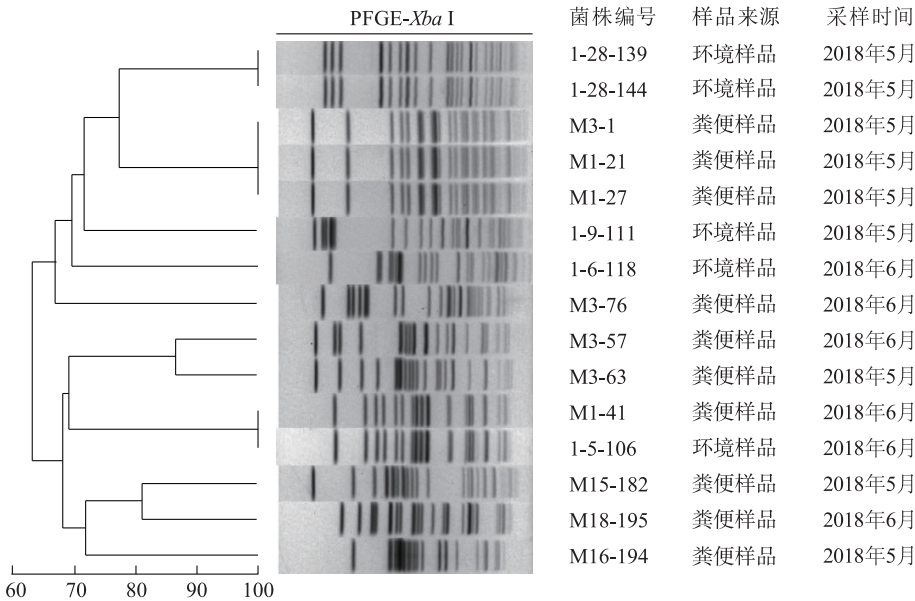


图 2 15 株 *bla*<sub>NDM</sub> 阳性大肠杆菌的 PFGE 分型  
Fig.2 Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing of 15 *bla*<sub>NDM</sub>-positive *E. coli*

3 讨论

本研究对江苏省部分地区奶牛场的 *bla*<sub>NDM</sub> 耐药基因的流行状况及其传播规律进行了研究。本研究从 3 个不同的奶牛场共采集样品 134 份, 其中 *bla*<sub>NDM</sub> 样品阳性率达 7.23% (9/134), *bla*<sub>NDM</sub> 阳性大肠杆菌的阳性率 25.00% (15/60), 主要流行 *NDM-1* 和 *NDM-5* 2 种变体, 在粪便样品和环境样品中均检

测到这 2 种变体的存在, 表明 *bla*<sub>NDM</sub> 基因可能在动物与环境间相互传播, 并存在从动物向人群扩散的风险。*bla*<sub>NDM-5</sub> 阳性大肠杆菌相比 *bla*<sub>NDM-1</sub> 阳性大肠杆菌对以美罗培南为代表的碳青霉烯酶类抗生素, *MIC* 高出 14 倍, 推测 *NDM-5* 变体的酶活性高于 *NDM-1*, 可诱导菌株产生更强的耐药能力; 同时发现在环境样品分离的菌株中携带有比较多种类的  $\beta$ -内酰胺酶基因。

碳青霉烯酶类药物作为治疗肠杆菌科细菌感染效果最好的抗菌药物之一,治疗效果都好于三、四代头孢<sup>[18]</sup>,从本研究结果看,*bla<sub>NDM</sub>*阳性大肠杆菌除对单环 $\beta$ -内酰胺酶类抗生素氨曲南耐药率为 0 外,几乎对所有的碳青霉烯酶类抗生素都表现为不同水平的耐药性,对头孢类药物已达到比较高的耐药水平,对亚胺培南和美罗培南的耐药率分别达 60.0% 和 33.3%,这与报道一致<sup>[19]</sup>。不仅如此,15 株 *bla<sub>NDM</sub>* 阳性大肠杆菌对氨基酸糖苷类药物、四环素类抗生素、喹诺酮类药物都有不同水平的耐药性;作为在兽医临床上使用率较高的药物,本研究中 15 种 *bla<sub>NDM</sub>* 阳性大肠杆菌对庆大霉素和环丙沙星的耐药率分别为 53.3% 和 60.0%,这可能跟牛场的饲养管理有关,3 个奶牛养殖场的养殖方式均是农户散养,饲养管理水平比较落后,使得奶牛源大肠杆菌存在多重耐药性,这也更有利于 *bla<sub>NDM</sub>* 基因从动物扩散到环境。

15 株 *bla<sub>NDM</sub>* 阳性大肠杆菌共分成 7 种 ST 型,包括 ST410、ST206、ST846、ST1626、ST101、ST3076、ST1642,奶牛场以 ST206 和 ST846 较为流行。除 ST410 外,其余都鲜少在奶牛中报道,只在人医临床中有报道。不同 ST 型对各种药物的最小抑菌浓度无明显差异,但当携带相同 *bla<sub>NDM</sub>* 基因时,大肠杆菌 ST206 对美罗培南 MIC 值比大肠杆菌 ST846 高出 4 倍。15 株 *bla<sub>NDM</sub>* 阳性大肠杆菌使用 *Xba* I 酶进行 PFGE 分型,根据 PFGE 聚类结果,15 株大肠杆菌可以分为 11 个簇,小范围内存在相同的 PFGE 图谱<sup>[20-21]</sup>。从质粒结合转移试验结果中看出,15 株大肠杆菌的 *bla<sub>NDM</sub>* 耐药基因可全部结合转移至大肠杆菌 J53 中,推测 *NDM* 耐药基因可在不同的 ST 型中以质粒转移的方式进行传播,为确定 *NDM* 耐药基因位于哪种质粒以哪种方式进行的传播,后续需要做 S1-PFGE 和 Southernblot 进行验证。

近年来,随着抗菌药物在人医临床及动物养殖中的广泛使用,多重耐药现象普遍存在。2017 年世界经济全球风险报告指出,病菌对抗生素的耐药性已经成为人类健康的最大威胁之一,同时也给环境微生物平衡以及养殖产业的健康发展带来了巨大损害<sup>[22]</sup>。本研究通过在江苏部分地区奶牛场采集 134 份样品,分离到 15 株碳青霉烯酶耐药大肠杆菌,对 *bla<sub>NDM</sub>* 耐药基因在奶牛场的流行状况和传播特征进行了调查研究,为食品动物源 *bla<sub>NDM</sub>* 阳性大

肠杆菌的流行病学调查研究提供依据,加强了兽医临床动物中 *bla<sub>NDM</sub>* 基因的流行监测,对控制耐药性的扩散具有重要意义。

#### 参考文献:

- [1] NORDMANN P, POIREL L, WALSH T R, et al. The emerging *NDM* carbapenemases [J]. Trends in Microbiology, 2011, 19 (12): 588-595.
- [2] YONG D, TOLEMAN M A, GISKE C G, et al. Characterization of a new metallo-beta-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]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53 (12): 5046-5054.
- [3] 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.
- [4] NICOLAU DP. Carbapenems: a potent class of antibiotics [J]. Expert Opinion on Pharmacotherapy, 2008, 9 (1): 23-37.
- [5] KHAN A U, MARYAM L, ZARRILLI R. Structure, genetics and worldwide spread of new delhi metallo- $\beta$ -lactamase (*NDM*): a threat to public health [J]. BMC Microbiology, 2017, 17 (1): 101.
- [6] MOELLER R C J. *NDM-1* - a cause for worldwide concern. [J]. N Engl J Med, 2010, 363 (25): 2377-2379.
- [7] DORTET L, POIREL L, NORDMANN P. Worldwide dissemination of the *NDM*-type carbapenemases in Gram-negative bacteria [J]. Biomed Research International, 2014, 2014 (350): 249856.
- [8] GUERRA B, FISCHER J, HELMUTH R. An emerging public health problem: acquired carbapenemase-producing microorganisms are present in food-producing animals, their environment, companion animals and wild birds [J]. Veterinary Microbiology, 2014, 171 (3/4): 290-297.
- [9] 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.
- [10] LIU Z Y, XIAO X, LI Y, et al. Emergence of IncX3 plasmid-harboring *bla<sub>NDM-5</sub>* dominated by *Escherichia coli* ST48 in a goose farm in Jiangsu, China [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2002.
- [11] HE T, WANG Y, SUN L C, et al. Occurrence and characterization of *bla<sub>NDM-5</sub>*-positive *Klebsiella pneumoniae* isolates from dairy cows in Jiangsu, China [J]. J Antimicrob Chemother, 2016, 72 (1): 90-94.
- [12] GHATAK S, SINGHA A, SEN A, et al. Detection of new delhi metallo-beta-lactamase and extended-spectrum beta-lactamase genes in *Escherichia coli* isolated from mastitic milk samples [J]. Transbound Emerg Dis, 2013, 60 (5): 385-389.
- [13] FISCHER J, SCHMOGER S, JAHN S, et al. *NDM-1* carbapenemase-producing *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Corval-

- lis isolated from a wild bird in Germany[J]. J Antimicrob Chemother, 2013, 68(12):2954-2956.
- [14] SHAHEEN B W, NAYAK R, BOOTHE D M. Emergence of a new delhi metallo- $\beta$ -lactamase (*NDM-1*)-encoding gene in clinical *Escherichia coli* isolates recovered from companion animals in the United States[J]. Antimicrobial Agents & Chemotherapy, 2013, 57(6):2902-2903.
- [15] 周萌萌. *NDM-4* 和 *NDM-5* 型金属  $\beta$ -内酰胺酶在肠杆菌科细菌中传播流行的分子机制[D]. 郑州:郑州大学, 2017.
- [16] GARREC H, DRIEUX-ROUZET L, GOLMARD J L, et al. Comparison of nine phenotypic methods for detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production by enterobacteriaceae[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2011, 49(3):1048-1057.
- [17] WIRTH T, FALUSH D, LAN R T, et al. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective[J]. Molecular Microbiology, 2006, 60(5):1136-1151.
- [18] 顾红燕. 我院住院病房 2008-2010 年碳青霉烯类抗生素应用分析[J]. 中国药房, 2011(22):35-37.
- [19] JOHNSON A P, WOODFORD N. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (*NDM*)-mediated carbapenem resistance[J]. Journal of Medical Microbiology, 2013, 62(4):499-513.
- [20] CHENG P, LI F, YANG Y, et al. Prevalence and molecular epidemiology characteristics of carbapenem-resistant *Escherichia coli* in Heilongjiang province, China[J]. Infection and Drug Resistance, 2019, 12:2505-2518.
- [21] 朱家杭, 蔡润茂, 卢跃激, 等. 家禽中 *bla*<sub>NDM</sub> 阳性大肠杆菌的筛查和传播特征分析[J]. 中国兽医学报, 2019, 39(9):1735-1743.
- [22] 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):51-63.

(责任编辑:陈海霞)