



新疆地区奶牛乳腺炎肺炎克雷伯菌的分离鉴定与耐药性分析

蔡扩军^{1,2}, 徐敏^{1,3}, 孙鹏亮³, 夏利宁², 赵红琼^{2*}

(1. 乌鲁木齐市动物疾病控制与诊断中心, 乌鲁木齐 830063; 2. 新疆农业大学动物医学学院, 乌鲁木齐 830052;
3. 新疆维吾尔自治区奶业协会, 乌鲁木齐 830063)

摘要: 旨在了解新疆地区奶牛乳腺炎肺炎克雷伯菌的流行情况与耐药特性。本研究从新疆奶牛集约化养殖集中的9个地区采集15个规模奶牛养殖场奶牛2 083份临床乳腺炎和隐性乳腺炎奶样, 对样品中的肺炎克雷伯菌进行分离培养、革兰染色, 并采用PCR及16S rRNA测序进行鉴定, 对分离菌株采用微量肉汤稀释法检测耐药情况。结果表明, 从奶样中分离出266株肺炎克雷伯菌, 分离率为12.8%(266/2 083), 临床乳腺炎和隐性乳腺炎奶样肺炎克雷伯菌分离率无显著差异($P>0.05$)。采用微量肉汤稀释法测定266个分离株对16种抗菌药物的敏感性, 结果显示分离株对四环素、头孢噻吩、头孢吡肟、头孢噻肟和头孢唑林的耐药率较高(23.7%~41.0%)。16.9%(45/266)的分离株为多重耐药菌, 6.4%(17/266)的分离株产ESBLs。结果提示, 新疆15家规模化奶牛场乳腺炎肺炎克雷伯菌平均分离率在全国处于相对较低水平。分离株对四环素和头孢类抗菌药物具有较强的耐药性, 本研究为掌握奶牛乳腺炎肺炎克雷伯菌的流行特征及指导临床用药提供了依据。

关键词: 奶牛乳腺炎; 肺炎克雷伯菌; 分离鉴定; 耐药特性

中图分类号: S857.26; S852.614

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)01-0464-12

Isolation, Identification and Drug Resistance Analysis of *Klebsiella pneumoniae* from Dairy Cow Mastitis in Xinjiang

CAI Kuojun^{1,2}, XU Min^{1,3}, SUN Pengliang³, XIA Lining², ZHAO Hongqiong^{2*}

(1. Urumqi Animal Disease Control and Diagnosis Center, Urumqi 830063, China;

2. College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China;

3. Xinjiang Dairy Association, Urumqi 830063, China)

Abstract: The purpose of this study was to understand the prevalence and drug resistance characteristics of *Klebsiella pneumoniae* in dairy cow mastitis in Xinjiang. Two thousand and eighty-three milk samples of dairy cows with clinical mastitis or subclinical mastitis were collected from 15 large-scale dairy farms in 9 areas of intensive dairy farming in Xinjiang. *Klebsiella pneumoniae* in the samples was isolated and cultured, Gram stained. PCR and 16S rRNA sequencing were conducted to identify the isolated strains, and the drug resistance of the isolated strains was detected by micro-broth dilution method. The results showed that 266 strains of *Klebsiella pneumoniae* were isolated from the milk samples, and the isolation rate was 12.8% (266/2 083). There was no

收稿日期: 2025-01-14

基金项目: 新疆维吾尔自治区“天山英才”培养计划(2022TSYCJC0019); 新疆维吾尔自治区奶产业技术体系(XJARS-11)

作者简介: 蔡扩军, 正高级兽医师, 博士, 主要从事动物疫病防控及奶业研究, E-mail: 646274982@qq.com

* 通信作者: 赵红琼, 主要从事生物活性物质结构和功能研究, E-mail: zhaohongqiong@sina.com

significant difference in the isolation rate of *Klebsiella pneumoniae* between clinical mastitis and subclinical mastitis ($P>0.05$). The sensitivity of 266 isolates to 16 antimicrobial agents and the production of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) were determined by broth microdilution method. The results showed that the resistance rates of the isolates to tetracycline, ceftiofur, cefepime, cefotaxime and cefazolin were high (23.7%-41.0%). And 16.9% (45/266) of the isolates were multidrug-resistant bacteria, and 6.4% (17/266) of the isolates produced ESBLs. The results suggest that the average separation rate of mastitis *Klebsiella pneumoniae* in 15 large-scale dairy farms in Xinjiang is at a relatively low level in the whole country. The isolated strains had strong resistance to tetracycline and cephalosporin antibiotics. This study provided a basis for mastering the epidemiological characteristics of *Klebsiella pneumoniae* in dairy cow mastitis and guiding clinical medication.

Keywords: dairy cow mastitis; *Klebsiella pneumoniae*; isolation and identification; drug resistance characteristics

* **Corresponding author:** ZHAO Hongqiong, E-mail: zhaohongqiong@sina.com

奶牛乳腺炎是造成奶牛产业重大经济损失的疾病之一,不仅可导致奶牛产奶量下降、奶品质降低和淘汰率升高,还可能通过乳制品危害人的健康^[1-2]。肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, *Kpn*)是一种重要的条件性人畜共患病原菌,广泛存在于自然界中,可引起人和动物的肺炎、脑膜炎、脓肿等多种疾病^[3]。近年来,由于*Kpn*感染而引起奶牛乳腺炎不断被报道,已经成为引起奶牛乳腺炎的重要病原菌^[4]。目前尚未见新疆地区规模化牧场奶牛乳腺炎*Kpn*的相关报道,为了解新疆地区规模化牧场奶牛乳腺炎*Kpn*的流行、耐药及生物被膜形成能力等情况,本研究从新疆奶牛集约化养殖集中的地区采集规模奶牛养殖场奶牛乳腺炎奶样,拟对样品中的*Kpn*进行分离培养、革兰染色、PCR及16S rRNA测序鉴定,对分离菌株采用微量肉汤稀释法检测耐药情况,采用结晶紫染色法对*Kpn*生物被膜形成能力进行评价,为本地区奶牛乳腺炎*Kpn*的防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 样品来源 2021年12月—2024年6月,样品来源于新疆乌鲁木齐市2家、昌吉回族自治州4家、石河子市3家、克拉玛依市1家、塔城地区1家、伊犁哈萨克自治州1家、巴州1家、阿克苏地区1家以及喀什地区1家共15家规模化奶牛场。这15家规模化奶牛场均参加每月1次的奶牛生产性能测定(Dairy Herd Improvement, DHI),牛奶样品的体细胞计数由新疆

畜牧科学院奶业研究所DHI测定中心完成,隐性乳腺炎判断参照NY/T 800—2004生鲜牛乳中体细胞的测定方法和NY/T 2692—2015奶牛隐性乳房炎快速诊断技术,无肉眼可见的病理变化,乳汁中体细胞数高于50万个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 。临床乳腺炎判断依据主要为:体温升高、乳房红肿疼痛、奶中混有血液和凝乳块等。奶牛场常用治疗药物包括头孢噻唑、头孢唑啉、头孢唑肟、阿莫西林/克拉维酸钾、四环素、林可霉素、氟苯尼考、卡那霉素、庆大霉素、复方新诺明等(表1)。从15家规模化奶牛场采集奶牛乳腺炎奶样2 083份,其中隐性乳腺炎1 755份,临床乳腺炎328份。

1.1.2 主要试剂 本章研究使用的主要试剂为:麦康凯肌醇阿东醇羧苄青霉素琼脂及配套羧苄青霉素(MIAC, 20220123)、胰酪大豆琼脂(TSA, 20221109)、胰酪胨大豆肉汤培养基(TSB, 20221210)为青岛海博生物技术有限公司产品;1%结晶紫染色液(20220427)、革兰染色液(20220528)为北京索莱宝科技有限公司产品;2 $\times$ PCR Mix (AM6061791A)、DNA Marker (AM91913)为宝日医生物技术(北京)有限公司产品;非苛养菌耐药性检测试剂盒(240106-B028,一诺康科技发展有限公司);电镜固定液(CR2307065,武汉赛维尔生物科技有限公司);琼脂糖(111860, Biowest);标准菌株*Kpn* ATCC 700603、大肠杆菌 ATCC 25922为中国工业微生物菌种保藏管理中心产品。

1.1.3 主要仪器与设备 本研究使用的主要仪器设备有:PCR仪(Veriti 96 well, 购自美国ABI)、

表 1 养殖场用药情况统计表

Table 1 Statistics of drugs used in farms

地区 Region	养殖场 编号 Farm number	头孢噻吩 Ceftiofur	头孢唑啉 Cefazolin	头孢喹肟 Cefquinome	阿莫西林/ 克拉维酸钾 Amoxicillin and clavulanate potassium	四环素 Tetracycline	林可霉素 lincomycin	氟苯尼考 Florfenicol	卡那霉素 kanamycin	庆大霉素 Gentamicin	链霉素 Streptomycin	复方新诺明 Sulfamethoxazol
乌鲁木齐市 Urumqi	A	●	●	●	●		●	●				●
	B	●		●				●				
	C	●		●				●	●			●
	D	●		●			●					●
昌吉回族自治州 Changji Hui Autonomous Prefecture	E	●		●		●		●	●			
	F	●	●	●			●	●		●		
	G	●	●	●			●	●	●			●
	H	●		●			●					
石河子市 Shihezi	I		●	●		●						●
	J	●	●	●		●		●				●
	K	●		●	●	●		●		●		●
	L	●	●		●	●		●	●	●		
巴州 Bayingolin Mongolian Autonomous Prefecture	M	●	●			●		●			●	
	N		●	●		●	●					●
	O		●	●	●	●			●	●		●

●表示养殖场使用了该药物,无●表示未使用该药物
● indicates that the drug is used in the farm, and no ● indicates that the drug was not used

凝胶成像系统(GelDoc Go, Bio-Rad)、电泳仪(JY600C,北京六一生物科技有限公司)、透射电镜(HT7700, HITACHI 公司)、显微镜(EVOS XL Core,赛默飞世尔科技公司)、电子天平(FA2104N,上海精密科学仪器公司)、生物安全柜购(HFsafe-1200LC,上海力申科学仪器公司)、麦氏比浊仪(Phoenix 100,BD公司)、超低温冰箱(DW-86L386,海尔集团)、高压蒸汽灭菌器(HVE-50,日本HIRAYAMA)、恒温振荡培养箱(THZ-92B,上海博讯医疗生物仪器公司)、恒温培养箱(BPC-250F,上海一恒科学仪器有限公司)、纯水仪(Master-RUV,上海和泰仪器公司)。

1.2 方法

1.2.1 肺炎克雷伯菌的分离鉴定

1.2.1.1 牛奶样品的采集:采样时先用温水清洗乳房,然后用5%聚维酮碘对乳腺炎奶牛乳头药浴消毒,在每次清洗或消毒乳头后均用清洁纸巾擦干,弃前3把乳汁,无菌取患有乳腺炎乳区的奶共80 mL左右于100 mL离心管,车载冰箱4℃保存运输至实验室。

1.2.1.2 细菌的分离培养纯化:用无菌棉拭子蘸取奶样品在MIAC选择培养基上进行划线,置37℃培养箱中培养18~24 h,观察菌落生长、形态、显色情况。用接种环挑选紫红色、光滑、湿润、圆凸、有沉淀环的单一菌落,划线接种于TSA平板上进行纯化培养。

1.2.1.3 革兰染色及镜检:取一张洁净载玻片,滴

加1滴无菌生理盐水,用无菌接种环挑取TSA平板上的单菌落在生理盐水中均匀涂开,将载玻片于酒精灯火焰处加热至烤干水分,使细菌固定在载玻片上。按照革兰染色液试剂盒说明书中初染、媒染、脱色、复染四个步骤进行革兰染色,晾干后在10×100倍显微镜下观察细菌形态。

1.2.1.4 肺炎克雷伯菌的PCR及16S rRNA基因测序鉴定:DNA模板制备。采用煮沸法提取分离菌株的DNA。在生物安全柜中将形态学符合*Kpn*的菌株接种于装有5 mL TSB液体培养基的试管中,在37℃、300 r·min⁻¹条件下恒温震荡培养18~24 h进行增菌。吸取1 mL的浑浊增菌液于1.5 mL离心管中,放入离心机中10 000 r·min⁻¹离心5 min,弃去上清溶液,吸取200 μL无菌水使离心管中的沉淀悬浮,100℃煮沸10 min,冰浴5 min,于离心机中12 000 r·min⁻¹离心5 min,收集上清溶液作为样本的DNA模板,-20℃保存备用。

Kpn PCR鉴定。参考文献已有引物序列合成*Kpn*特异性基因溶血毒素基因(*khe*)引物及16S rRNA(表2)^[5-6],引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。以提取的样品DNA为模板进行PCR扩增,PCR反应体系按说明书配制。*khe*基因及16S rRNA扩增反应条件:预变性均为95℃,5 min;变性均为95℃,30 s;退火分别为60℃,30 s和53℃,30 s;延伸分别为72℃,30 s和72℃,90 s;均为35个循环;总延伸均为72℃,10 min。

表2 引物序列及片段大小

Table 2 Primer sequence and fragment size

引物 Primer	引物序列(5'→3') Primer sequences (5'→3')	产物/bp Product
<i>Kpn</i> 的溶血毒素基因(<i>khe</i>)	F: TGATTGCATTGCGCACTGG R: GGTCAACCCAACGATCCTG	428
16S rRNA	16S-27F: AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG 16S-1492R: GGTTACCTTGTTACGACTT	1 466

RCR反应结束后经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物,照胶记录PCR反应结束后经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物。将PCR阳性产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。测序结果经NCBI网站上的BLAST数据库(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)比对,同源性大于99.0%的结果即判定为该菌株的鉴定结果。

1.2.1.5 菌种保藏:取PCR鉴定阳性的*Kpn*菌液

600 μL和600 μL的50%甘油生理盐水混合液到冻存管中,混匀,于-70℃超低温冰箱冻存备用。

1.2.2 肺炎克雷伯菌分离株药物敏感性的检测

根据美国临床和试验标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)推荐的微量肉汤稀释法,采用商业化的非苛养菌耐药性检测试剂盒测定*Kpn*对16种常见抗菌药物的最小抑菌浓度(Minimum inhibitory concentration, MIC)。同时以

Kpn ATCC 700603 和大肠杆菌 ATCC 25922 作为质控菌株。菌液制备:直接挑取 TAS 培养基上纯新鲜菌落,均匀悬浮于 3 mL 样本稀释液中,将菌液浓度调整到 0.5 麦氏浓度(McFarland, McF)待用。阴性对照孔制备:将配套使用的 12 mL M-H 显色肉汤缓慢倾倒入 V 型无菌槽内,用移液器吸取 100 μ L 参照稀释范围表加入阴性对照孔中。菌液稀释:再使用 V 型槽内 M-H 显色肉汤按照 1:200 的比例稀释上述 0.5 McF 菌液,轻轻晃动 V 型槽并使用多道移液器使菌液充分混匀。接种:用微量移液器按照 100 μ L $\cdot$ 孔⁻¹的量将稀释好的菌液加入到药敏板中,使菌液最终接种浓度约为 5×10^5 CFU $\cdot$ mL⁻¹,接种时需从药物低浓度至高浓度依次加入。孵育条件:菌液接种完成后,将药敏板置于 35 $^{\circ}$ C 恒温箱中孵育。孵育时间:16~20 h;判读标准:凡有细菌生长的小孔中,孔内呈弥散状浑浊或小孔底部有圆形沉淀;在无细菌生长的孔内所含最低抗菌药物浓度即为 MIC;判定标准:多黏菌素参考中国专家共识, MIC ≤ 2 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 判断为敏感^[7-8],其余 15 种抗菌药物折点参考 CLSI M100-S31 抗微生物药物敏感性试验执行标准,具体见表 4。对 ≥ 3 类药物耐药的菌株定义为多重耐药菌株(multi-drug resistant, MDR);对常用抗菌药物几乎全部耐药,革兰阴性杆菌仅对黏菌素和替加环素敏感定义为泛耐药菌株(Extensively drug-resistant, XDR);对所有药物耐药的菌株定义为全耐药菌株(Pandrug-resistant, PDR)。

1.2.3 ESBLS 表型的筛选 根据 CLSI 标准(2022),采用微量肉汤稀释法测定头孢他啶、头孢他啶/克拉维酸、头孢噻肟、头孢噻肟/克拉维酸对菌株的 MIC。根据单独用药和联合用药的 MIC 来确定其是否为产 ESBLS 菌株。若细菌单独用药的 MIC 和联合用药的 MIC 相差 3 倍,即可认定为产 ESBLS 菌株(如,头孢他啶 MIC=8 μ g $\cdot$ mL⁻¹,头孢他啶/克拉维酸的 MIC=1 μ g $\cdot$ mL⁻¹)。

1.2.4 数据分析 采用 IBM SPSS Statistics 26.0 进行数据分析。单因素分析采用卡方检验或 Fisher 精确检验, $P < 0.05$ 为差异显著, $P > 0.05$ 差异不显著。

2 结果

2.1 肺炎克雷伯菌在培养基上菌落形态

Kpn 在 MIAC 培养基上呈红色、光滑、湿润、圆凸、有沉淀环、黏液状的菌落;在 TSA 培养基上呈半

透明、浅白色、光滑、圆凸、表面湿润、黏液状的菌落。

2.2 革兰染色镜检

从平板上挑取疑似菌落进行革兰染色,染色结果显示:*Kpn* 为革兰阴性菌,显微镜下呈红色短杆菌,单个、成双或短链状排列,有荚膜,无芽孢。

2.3 肺炎克雷伯菌 *khe* 及 16S rRNA PCR 鉴定结果

以分离菌株基因组 DNA 为模板,PCR 扩增 *Kpn khe* 基因,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳,结果显示,400 bp 与 500 bp 之间可见 *khe* 基因预期(428 bp)的条带,初步证实菌株为 *Kpn*。用细菌 16S rRNA 通用引物 PCR 扩增的产物经琼脂糖凝胶电泳可见一条约 1 466 bp 的条带,对 PCR 产物进行 Sanger 测序,结果无重叠峰,NCBI-blast 结果显示,与 GenBank 数据库中的 *Kpn* 参考株核苷酸同源性在 99.0% 以上,进一步确定 266 株分离株为 *Kpn*。

2.4 肺炎克雷伯菌分离率

从新疆 9 个地州(市)的 15 个奶牛规模养殖场采集了 2 083 份乳腺炎奶样,根据 2.3 *Kpn khe* 基因及 16S rRNA PCR 鉴定和测序分析结果,从 266 份 *Kpn* 阳性奶样中分离出 266 株 *Kpn*,分离率为 12.8%(表 3)。其中隐性乳腺炎奶样 1 755 份,分离出 217 株 *Kpn*,分离率为 12.4%;临床乳腺炎奶样 328 份,分离出 49 株 *Kpn*,分离率为 14.9%,隐性乳腺炎和临床乳腺炎牛的乳汁中分离率没有显著性差异($P > 0.05$)。B 场(21.8%)和 I 场(21.6%)的 *Kpn* 的流行率显著高于其他养殖场($P < 0.05$)。

2.5 肺炎克雷伯菌分离株对 16 种抗生素的敏感性

采用微量肉汤稀释法测定了 *Kpn* 分离株对 16 种抗生素的敏感性,药敏试验结果显示,266 株 *Kpn* 分离株对 16 种抗生素呈现了不同程度的耐药和敏感(表 4)。耐药性抗菌药物中,四环素的耐药率最高,耐药率为 41.0%,其次为头孢噻肟耐药率 28.9%,头孢吡肟耐药率 28.2%,头孢噻肟耐药率 26.3%,头孢唑林耐药率 23.7%。敏感性抗菌药物中,美罗培南敏感率最高,敏感率 96.6%,其次为庆大霉素 91.7%,头孢西丁 89.1%,氯霉素 88.0%,替加环素 86.1%。临床乳腺炎 *Kpn* 分离株耐药性高于隐性乳腺炎 *Kpn* 分离株,差异不显著($P > 0.05$)。

266 株 *Kpn* 分离株中,45 株菌为 MDR 菌株,多重耐药率 16.9%,未发现 XDR 和 PDR 菌株。在多重耐药菌株中,3 耐到 12 耐均有分布,其中 3 耐占比最高,为 10.2%;其次为 7 耐和 6 耐,占比分别为 9.8%、7.5%。

表 3 不同奶牛场肺炎克雷伯菌分离情况

Table 3 Isolation of *Klebsiella pneumoniae* from different dairy farms

地区 Region	养殖场编号 Farm number	养殖规模/头 Breeding scale	隐性乳腺炎分离率 Isolation rate of subclinical mastitis	临床乳腺炎分离率 Isolation rate of clinical mastitis	总分离率 Total isolation rate
乌鲁木齐市 Urumqi	A	1 600	14.6%(14/96)	18.8%(3/16)	15.2%(17/112)
	B	850	22.4%(19/85)	20.6%(7/34)	21.8%(26/119)
昌吉回族自治州 Changji Hui Autonomous Prefecture	C	5 400	8.6%(14/162)	7.4%(2/27)	8.5%(16/189)
	D	4 200	10.0%(21/210)	11.8%(2/17)	10.1%(23/227)
	E	3 500	7.9%(11/140)	11.4%(4/35)	8.6%(15/175)
	F	1 100	12.1%(12/99)	20.0%(2/10)	12.8%(14/109)
石河子市 Shihezi	G	2 600	11.5%(15/130)	15.0%(3/20)	12.0%(18/150)
	H	1 800	13.0%(14/108)	11.1%(2/18)	12.7%(16/126)
	I	1 100	21.6%(19/88)	22.2%(2/9)	21.6%(21/97)
克拉玛依市 Karamay	J	3 500	10.0%(14/140)	17.9%(5/28)	11.3%(19/168)
伊犁哈萨克自治州 Ili Kazakh Autonomous Prefecture	K	1 200	16.7%(16/96)	25.0%(3/12)	17.6%(19/108)
塔城地区 Tarbagatay Prefecture	L	3 000	10.7%(16/150)	16.7%(5/30)	11.7%(21/180)
巴州 Bayingolin Mongolian Autonomous Prefecture	M	1 400	13.3%(13/98)	14.3%(3/21)	13.4%(16/119)
阿克苏地区 Aksu Prefecture	N	1 800	13.3%(12/90)	11.1%(4/36)	12.7%(16/126)
喀什地区 Kashgar Prefecture	O	2 100	11.1%(7/63)	13.3%(2/15)	11.5%(9/78)
总计 Total		35 150	12.4%(217/1755)	14.9%(49/328)	12.8%(266/2083)

2.6 产ESBLs肺炎克雷伯菌的流行情况

对 266 株 *Kpn* 分离株进行 ESBLs 测定试验,共筛选出 17 株产 ESBLs 的 *Kpn*,阳性率 6.4%;非产 ESBLs 的 *Kpn* 249 株。

3 讨 论

Kpn 是一种常见的条件性人畜共患病原菌,广泛分布于世界各地的自然界中,是院内感染的第二大病原菌,当人和动物的免疫力下降时,该菌在体内大量增殖,导致肺炎、脑膜炎、尿道感染、肝脓肿等多种组织脏器的炎症及血流感染^[9]。近年来由 *Kpn* 引起的奶牛乳腺炎不断被报道,感染奶牛引起的临床乳腺炎通常表现为乳房肿胀、发烧、食欲不振、产奶量大幅下降,持续时间长,治疗效果差,淘汰率高,给奶牛养殖业带来了严重的经济损失^[10]。

新疆地区规模奶牛场奶牛乳腺炎 *Kpn* 的流行病学信息未见报道,因此,在本地区开展规模奶牛场乳腺炎 *Kpn* 的分离鉴定、耐药分析具有重要意义。

3.1 新疆地区奶牛乳腺炎肺炎克雷伯菌的分离率与流行病学特征

吴香云^[11]对湖北省 5 个奶牛场流调结果显示,隐性乳腺炎和临床乳腺炎牛的乳汁中 *Kpn* 的分离率分别为 24.5% 和 25.4%。买尔哈巴·吾斯曼^[12]从北京、天津、广东、湖北、江苏、山东、宁夏、安徽、河北、福建、河南、云南、浙江、甘肃地区的 495 份奶牛乳腺炎样品中,分离鉴定了 131 株 *Kpn*,分离率为 26.46%。吴欣悦^[13]在苏北地区 4 个牧场奶牛乳腺炎中 *Kpn* 的分离率为 15.53%。曹菲菲^[14]在福建、江苏、广东、河北、安徽、山西、内蒙古和浙江地区 11 个规模化牧场中乳腺炎中 *Kpn* 为 14.55%。冯小慧

表 4 肺炎克雷伯菌分离株对 16 种抗菌药物的耐药检测结果

Table 4 Results of resistance testing of *Klebsiella pneumoniae* isolates to 16 antimicrobial drugs

抗菌药物种类 Antibiotic type	抗菌药物 Antibiotic	折点判断标准/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) MIC Breakpoints				敏感(S) Sensitive		中介(I) Intermediate		耐药(R) Resistance	
		敏感(S) Sensitive	中介(I) Intermediate	耐药(R) Resistance	菌株数 Number of isolates	百分比 Percentage	菌株数 Number of isolates	百分比 Percentage	菌株数 Number of isolates	百分比 Percentage	菌株数 Number of isolates
头孢类 Cephalosporin	头孢唑林 Cefazolin	≤ 2	4	≥ 5	184	69.2%	19	7.1%	63	23.7%	
	头孢噻肟 Cefotaxime	≤ 1	2	≥ 4	196	73.7%	0	0.0%	70	26.3%	
	头孢噻吩 Cefiofur	≤ 2	4~8	≥ 16	189	71.1%	0	0.0%	77	28.9%	
	头孢他啶 Ceftazidime	≤ 4	8	≥ 16	222	83.5%	6	2.3%	38	14.3%	
	头孢吡肟 Cefepime	≤ 2	4~8	≥ 16	177	66.5%	14	5.3%	75	28.2%	
	头孢西丁 Cefoxitin	≤ 8	16	≥ 32	237	89.1%	8	3.0%	21	7.9%	
碳青霉烯类 Carbapenem	美罗培南 Meropenem	≤ 1	2	≥ 4	257	96.6%	3	1.1%	6	2.3%	
	氯霉素 Chloramphenicol	≤ 8	16	≥ 32	234	88.0%	5	1.9%	27	10.2%	
磺胺类 Sulfonamide	氯苯尼考 Florfenicol	≤ 4	8	≥ 16	170	63.9%	45	16.9%	51	19.2%	
	复方新诺明 Sulfamethoxazole	$\leq 2/38$	无	$\geq 4/76$	215	80.8%	无	无	51	19.2%	
氨基糖苷类 Aminoglycoside	庆大霉素 Gentamicin	≤ 4	8	≥ 16	244	91.7%	0	0.0%	22	8.3%	
	链霉素 Streptomycin	≤ 16	无	≥ 32	228	85.7%	无	无	38	14.3%	
四环素类 Tetracycline	四环素 Tetracycline	≤ 4	8	≥ 16	149	56.0%	8	3.0%	109	41.0%	
	替加环素 Tegacyclin	≤ 2	无	≥ 4	229	86.1%	无	无	37	13.9%	
喹诺酮类 Quinolone	环丙沙星 Ciprofloxacin	≤ 0.25	0.5	≥ 1	215	80.8%	13	4.9%	38	14.3%	
	多黏菌素 E Polymyxin E	≤ 2	无	≥ 4	218	82.0%	无	无	48	18.0%	

等^[15]分离鉴定了上海和河北地区奶牛乳腺炎中 *Kpn*, 分离率分别为 18% 和 14%。杜琳等^[16]为了解我国部分地区奶牛乳腺炎克雷伯氏菌的流行及耐药情况, 从内蒙古、河北、黑龙江、上海和山东等省市自治区的 497 份乳腺炎奶样中分离出 46 株克雷伯氏菌, 分离率为 9.26%, 且分离菌株具有较高的耐药性。石玉祥等^[17]从河北省某大型奶牛养殖场无菌采集患乳腺炎奶牛的乳样 245 份, 分离获得 45 株奶牛乳腺炎源性 *Kpn*, 分离率为 18.4%。Cheng 等^[18]从中国西部和南部 2 个大型奶牛场采集了临床乳腺炎、隐性乳腺炎奶样及环境样品 1 354 份, *Kpn* 分离率分别为 34%、23% 和 37%。本研究自 2021 年 12 月—2024 年 6 月从新疆的乌鲁木齐市、昌吉回族自治州、石河子市等 9 个地州市的 15 家规模奶牛场共收集 2 083 份乳腺炎牛奶样品, 分离出 266 株 *Kpn*, 分离率为 12.77%, 高于杜琳等^[16]研究结果, 低于以上其他人员研究结果中奶牛乳腺炎中 *Kpn* 的分离率。另外, 本研究中 15 家牧场奶牛乳腺炎 *Kpn* 的检出率也不同, B 牧场和 I 牧场高于其他牧场。*Kpn* 作为一种环境性病原菌, 在环境中普遍存在, 经常从牧场环境、牛鼻拭子、肛拭子、乳头拭子和乳腺炎牛奶样本中检测出来^[4,19], 不同地区、不同牧场奶牛乳腺炎 *Kpn* 的分离率不同, 这可能与当地气候、采样季节、牧场环境、饲养管理、卫生条件、养殖密度有关^[20]。本研究发现, 奶牛临床乳腺炎和阴性乳腺炎奶样 *Kpn* 流行率没有显著差异, 一方面, 可能是由于本研究中大部分临床乳腺炎牛正处于用药治疗期或恢复期, 另一方面, *Kpn* 可能并不是引起奶牛患发乳腺炎的唯一致病菌。虽然不同地区 *Kpn* 的分离率存在差异, 但 *Kpn* 已经成为感染奶牛乳腺导致炎症的重要病原菌之一, 在牧场奶牛养殖过程中, 应做好环境、人员、用具的消毒工作, 加强圈舍、挤奶厅卫生管理, 勤换垫料, 控制 *Kpn* 感染与传播。

本研究中, 新疆地区临床型乳腺炎和隐性乳腺炎奶样中 *Kpn* 的分离率并无显著差异, 这一结果提示, 应对这两种类型乳腺炎中其他常见病原菌展开进一步探究。遗憾的是本研究主要聚焦于 *Kpn*, 未对样品中的大肠杆菌、停乳链球菌和乳房链球菌等常见病原菌进行检测。这些细菌是奶牛乳腺炎中广为人知的病原体, 若在所研究的奶样中检测到这些原菌, *Kpn* 有可能作为协同病原菌通过多种机制与其他病原体协同。例如, 它可能分泌某些物质改变乳腺局部微环境, 使其更有利于其他细菌的定植

和生长。或者它可能在分子层面与其他病原体相互作用, 比如共享毒力因子, 或共同促进对宿主免疫系统的逃避。若 *Kpn* 确实是协同病原菌, 那么治疗策略就不应仅针对 *Kpn*, 还需考虑多种病原体的综合影响。预防措施也应着重于破坏细菌间可能存在的协同作用。因此, 进一步研究多种致病菌的协同作用及其对乳腺炎的影响, 将有助于更全面地理解乳腺炎的病因学, 并为临床治疗和防控策略提供科学依据。

3.2 新疆地区奶牛乳腺炎肺炎克雷伯菌的耐药性特征

近年来, *Kpn* 的耐药问题日益严重, 一直威胁着全球公共卫生健康。世卫组织建议将抗微生物药物耐药性监测作为《抗微生物药物耐药性全球行动计划》的关键部分。根据中国细菌耐药监测网 (CHINET) 公布的 2005—2023 年的监测数据, *Kpn* 的耐药性逐年上升, 耐药谱逐渐变广, 对亚胺培南和美罗培南的耐药率从 2005 年 3% 和 2.9% 增长到 2023 年的 29% 和 30%, 增长了 10 倍。世界卫生组织《2024 年细菌类重点病原体目录》中把耐第三代头孢菌素类 *Kpn* 列为关键优先级重点病原体^[21]。人源 *Kpn* 通常对氨苄西林、碳青霉烯类、氟喹诺酮类、氨基糖苷类、黏菌素或四环素耐药严重^[22]。奶牛乳腺炎需要兽用抗菌药物治疗, 逐步导致 *Kpn* 耐药菌株的出现, 与人源 *Kpn* 的耐药谱有所差异。不同国家和地区从奶牛中分离出的 *Kpn* 的抗菌药物耐药性率有所不同^[23]。从纽约州牛乳腺炎中分离出的 *Kpn* 菌株对链霉素、四环素和庆大霉素的耐药率分别为 29.4%、5.6% 和 4.2%^[24]。在欧洲和美国的部分地区, 从临床乳腺炎病例中分离出的菌株对四环素 (5.6%~19.5%) 和 β -内酰胺类抗生素 (0%~6.9%) 的耐药性水平较低^[23]。中国奶牛场 *Kpn* 对头孢唑肟、卡那霉素、头孢噻唑、多黏菌素 B 和四环素的耐药率为 10.0%~32.0%^[25]。本研究利用 CLSI 推荐的微量肉汤稀释法检测了 *Kpn* 对 8 类 16 种抗生素的耐药性, 发现 *Kpn* 对四环素的耐药性最高 (41.0%), 高于其他国家感染 CM 奶牛的 *Kpn* 对四环素的耐药性^[26-28]。头孢噻唑的耐药率 (28.95%) 高于中国部分大型奶牛群中分离的 *Kpn* (21.0%)^[25]。*Kpn* 分离株对美罗培南高度敏感, 这可能是由于碳青霉烯类药物被严格禁止用于动物。

在新疆地区 15 家奶牛场中, 不同地区的养殖场由于养殖规模、管理制度、兽医建议以及成本考虑

等因素,在奶牛乳腺炎治疗药物的选择上有所不同,*Kpn*分离株的耐药性也存在一定差异。头孢噻唑、头孢唑啉和头孢噻肟作为 β -内酰胺类抗生素,在多个奶牛场广泛应用。部分奶牛场长期且大量使用头孢噻唑,在这些养殖场分离出的*Kpn*对头孢噻唑的耐药率明显偏高。这表明持续高剂量使用同一类型的头孢类药物,为细菌提供了强大的选择压力,促使细菌通过产生 β -内酰胺酶等机制来抵抗药物作用,从而导致耐药菌株的大量繁殖。相比之下,一些偶尔轮换使用头孢唑啉和头孢噻肟的奶牛场,肺炎克雷伯菌对头孢类药物的整体耐药性相对较低,这说明合理轮换使用不同种类的头孢类抗生素,可能有助于延缓耐药性的产生。选择用庆大霉素的奶牛场只有3家,这3家*Kpn*分离株明显对庆大霉素耐药。选择用链霉素的奶牛场有6家,而这6家*Kpn*分离株对链霉素耐药性明显较高。本研究发现,新疆地区不同奶牛场的用药情况与*Kpn*耐药性之间存在紧密联系。不合理、长期且大量使用单一药物或同一类药物,会加速耐药性的产生;而合理轮换用药、规范使用复方制剂以及适当控制用药频率,有助于延缓*Kpn*耐药性的发展。

3.3 新疆地区奶牛乳腺炎肺炎克雷伯菌多重耐药与产ESBLs菌株的流行情况

MDR细菌感染导致高死亡率,被CDC评为对公共卫生的严重威胁。其中最关键的MDR细菌之一就是*Kpn*,能够“逃避”抗生素治疗的杀菌作用,其治疗非常具有挑战性^[29]。Saddam等^[26]、Borin等^[27]研究表明巴西、巴基斯坦部分地区奶牛源*Kpn*的MDR率为7.7%、44.4%。冯小慧等^[15]于2017年对上海、河北地区奶牛乳腺炎*Kpn*分离鉴定及耐药性分析药敏试验结果表明,分离得到的*Kpn*对临床常用的抗生素存在不同程度的耐药性,MDR菌株占53.13%。本研究中MDR率为16.92%,多药耐药集中在3耐、6耐和7耐,介于以上研究结果之间。不同养殖场奶牛乳腺炎*Kpn*的耐药谱型与耐药程度存在差异,这与不同地区、不同养殖场用药不同有关,加上对抗菌药物的过度使用,对*Kpn*产生了选择性压力,可能导致MDR菌株的出现。MDR菌株可以通过奶、粪便、污水等进行传播、扩散,严重危害公共卫生安全,所以牧场应该科学合理使用抗菌药物,在确诊的基础上,选用具有较高敏感性的抗菌药物,在提高治疗效果降低经济成本的同时,遏制耐药菌株的产生。

革兰阴性菌及少数革兰阳性菌对 β -内酰胺类抗生素耐药的最重要机制是产生各种 β -内酰胺酶。根据 β -内酰胺酶的底物、生化特性及是否被酶抑制剂所抑制的功能分类法,其将 β -内酰胺酶分为青霉素酶、ESBLs、头孢菌素酶(AmpC酶)和碳青霉烯酶等。产ESBLs*Kpn*的流行严重影响全球卫生健康^[30]。ESBLs不仅表现出对第三代头孢菌素等大多数 β -内酰胺类抗生素产生耐药,还对其他多种抗菌药物呈现出多重耐药的表型,使临床常用抗菌药物无法产生理想效果,增加病死率。本研究在266株分离株中共筛选出17株产ESBLs的*Kpn*,检出率为6.4%,与Mariem等^[31]的研究结果(6/77,7.79%)相似,而低于Yan等^[32]研究结果中的中国人源分离株(438/2 774,15.79%)。266株*Kpn*对三代头孢头抗生素头孢他啶、头孢噻肟、头孢噻唑的耐药率分别为14.3%、26.3%和28.9%,高于产ESBLs*Kpn*的检出率,而检出ESBLs的*Kpn*全部对三代头孢抗生素头孢他啶、头孢噻肟、头孢噻唑耐药,说明*Kpn*对三代头孢抗生素的耐药机制除了ESBLs外,还存在其他耐药机制,如*Kpn*可通过获得质粒介导的AmpC酶对三代头孢产生耐药性,还可通过产生碳青霉烯酶水解三代头孢菌素。此外,外膜孔蛋白的改变、主动外排系统、靶位点修饰、生物被膜的形成也可使*Kpn*对三代头孢抗生素产生耐药性。

3.4 新疆地区奶牛乳腺炎肺炎克雷伯菌防控建议

*Kpn*作为条件性致病菌,其在奶牛乳腺炎中的致病性可能与环境因素和宿主免疫状态密切相关。圈舍卫生条件差、通风不良、湿度过高以及粪便污染等因素可能为*Kpn*的繁殖和传播提供有利条件。本研究中的养殖场B和I,养殖环境相对较差,*Kpn*的分离率相对较高,证实了这一点。此外,奶牛免疫功能的强弱直接影响其对病原菌的抵抗力。免疫抑制或免疫功能低下的奶牛更容易感染*Kpn*,进而发展为临床乳腺炎或隐性乳腺炎。因此,*Kpn*导致的乳腺炎可能是环境压力和宿主免疫状态共同作用的结果。为了有效防控*Kpn*引起的奶牛乳腺炎,建议采取以下措施:一是改善圈舍卫生条件,定期清理圈舍,确保通风良好,减少湿度和粪便污染,降低病原菌的滋生和传播风险;二是加强奶牛营养管理,提供均衡的饲料,确保奶牛摄入足够的维生素和矿物质,增强免疫功能;三是定期健康监测,通过定期检测奶牛的乳腺健康状况,及时发现隐性乳腺炎,并采取针对性治疗措施;四是合理使用抗菌

药物,根据药敏试验结果,科学使用抗生素,避免滥用导致耐药性增加。同时,探索替代疗法,如益生菌、中草药等,以减少抗生素依赖。

4 结 论

本研究从新疆地区15家规模化奶牛场的2 083份乳腺炎奶样中分离出266株肺炎克雷伯菌,分离率为12.8%。药敏试验结果显示,分离株对四环素耐药率最高(41.0%),对头孢噻唑、头孢吡肟、头孢噻肟和头孢唑林的耐药率为23.7%~28.9%。16.9%的菌株为多重耐药,6.4%的菌株产超广谱 β -内酰胺酶。结果表明,新疆地区奶牛乳腺炎源肺炎克雷伯菌的分离率处于国内相对较低水平,但耐药性问题需密切关注,尤其对四环素和头孢类药物的耐药情况。本研究为当地奶牛乳腺炎肺炎克雷伯菌的防控和临床合理用药提供了依据。

参考文献(References):

- [1] KÄPPELI N, MORACH M, ZURFLUH K, et al. Sequence types and antimicrobial resistance profiles of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis[J]. *Front Vet Sci*, 2019, 6: 234.
- [2] LIABIN L, XIULI C, ZESHI C. Identification of key candidate genes in dairy cow in response to *Escherichia coli* mastitis by bioinformatical analysis [J]. *Front Genet*, 2019, 10: 1251.
- [3] GAMAL W, HEINRICH N. The Animal-foods-environment interface of *Klebsiella pneumoniae* in Germany: an observational study on pathogenicity, resistance development and the current situation [J]. *Vet Res*, 2021, 52(1): 16.
- [4] SADDAM M, MUDDASIR K, MUHSIN J, et al. Nutritional analysis and characterization of carbapenemase producing- *Klebsiella pneumoniae* resistant genes associated with bovine mastitis infected cow's milk [J]. *PloS one*, 2023, 18(10): e0293477.
- [5] NEUBERGER A, OREN I, SPERCHER H. Clinical impact of a PCR assay for rapid identification of *Klebsiella pneumoniae* in blood cultures [J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(1): 377-379.
- [6] CLARRIDGE J E. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2004, 17(4): 840-862.
- [7] 王 辉. 多黏菌素类与替加环素及头孢他啶/阿维巴坦药敏方法和报告专家共识[J]. 中华检验医学杂志, 2020, 43(10): 964-972.
- WANG H. Expert consensus on drug sensitivity methods and reports of polymyxins, tigecycline and ceftazidime/avibactam [J]. *Chinese Journal of Laboratory Medicine*, 2020, 43 (10): 964-972. (in Chinese)
- [8] 杨启文, 马筱玲, 胡付品, 等. 多黏菌素药物敏感性检测及临床解读专家共识[J]. 协和医学杂志, 2020, 11(5): 559-570.
- YANG Q W, MA X L, HU F P, et al. Expert consensus on polymyxin antimicrobial susceptibility testing and clinical interpretation [J]. *Medical Journal of Peking Union Medical College Hospital*, 2020, 11(5): 559-570. (in Chinese)
- [9] HOLT K E, WERTHEIM H, ZADOKS R N. et al. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(27): E3574-E3581.
- [10] FUENZALIDA M, RUEGG P. Negatively controlled, randomized clinical trial to evaluate intramammary treatment of nonsevere, gram-negative clinical mastitis [J]. *J Dairy Sci*, 2019, 102(6): 5438-5457.
- [11] 吴香云. 湖北地区奶牛乳房炎源肺炎克雷伯菌毒力和耐药分子特征研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2022.
- WU X Y. Study on virulence and drug resistance molecular characteristics of *Klebsiella pneumoniae* from dairy cow mastitis in Hubei [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2022. (in Chinese)
- [12] 买尔哈巴·吾斯曼. 国内部分地区奶牛乳腺炎源肺炎克雷伯菌生物学特性研究[D]. 阿拉尔: 塔里木大学, 2022.
- MERKHABA USMAN. Study on the biological characteristics of *Klebsiella pneumoniae* from mastitis in dairy cows in some parts of China [D]. Allar: Tarim University, 2022. (in Chinese)
- [13] 吴欣悦. 苏北部分牧场奶牛乳腺炎源肺炎克雷伯菌流行病学调查及其毒力基因与耐药性相关性分析[D]. 扬州: 扬州大学, 2023.

- WU X Y. Epidemiological investigation and correlation analysis of virulence genes and drug resistance of *Klebsiella pneumoniae* from dairy cow mastitis in some pastures in northern Jiangsu [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2023. (in Chinese)
- [14] 曹菲菲. 规模化牧场奶牛乳腺炎病原菌分离鉴定及肺炎克雷伯菌耐药性和致病力研究[D]. 扬州:扬州大学, 2020.
- CAO F F. Isolation and identification of pathogens causing mastitis in dairy cows on large-scale ranches and study on drug resistance and pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae* [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2020. (in Chinese)
- [15] 冯小慧, 杜琳, 王丽芳, 等. 2017年上海、河北地区奶牛乳房炎克雷伯菌分离鉴定及耐药性分析[J]. 畜牧与饲料科学, 2019, 40(1): 108-112.
- FENG X H, DU L, WANG L F, et al. Isolation, identification and drug resistance analysis of *Klebsiella pneumoniae* from dairy cows in Shanghai and Hebei in 2017[J]. *Animal husbandry and feed science*, 2019, 40(1): 108-112. (in Chinese)
- [16] 杜琳, 王丽芳, 冯小慧, 等. 奶牛乳房炎克雷伯氏菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2019, (01): 77-80, 180.
- DU L, WANG L F, FENG X H, et al. Isolation, identification and drug sensitivity test of *Klebsiella pneumoniae* in dairy cow mastitis [J]. *Heilongjiang Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2019, (01): 77-80, 180. (in Chinese)
- [17] 石玉祥, 赵文鹏, 刘洋, 等. 奶牛乳房炎源性肺炎克雷伯杆菌的分离鉴定和耐药性分析[J]. 中国兽医杂志, 2020, 56(3): 95-98, 136.
- SHI Y X, ZHAO W P, LIU Y, et al. Isolation, identification and drug resistance analysis of *Klebsiella pneumoniae* from bovine mastitis [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2020, 56(03): 95-98, 136. (in Chinese)
- [18] CHENG J, ZHOU M, NOBREGA D B, et al. Genetic diversity and molecular epidemiology of outbreaks of *Klebsiella pneumoniae* mastitis on two large Chinese dairy farms [J]. *Journal of Dairy Science*, 2020, 104(1): 762-775.
- [19] 李家任, 郭亚男, 王建东, 等. 宁夏地区牛支原体、溶血性曼氏杆菌、多杀性巴氏杆菌和肺炎克雷伯菌感染监测与分析[J/OL]. 畜牧兽医学报, 1-17 [2025-10-28]. <https://link.cnki.net/urlid/11.1985.S.20250912.1950.006>.
- LI J R, GUO Y N, WANG J D, et al. Surveillance and analysis of *Mycoplasma bovis*, *Mannheimia hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida* and *Klebsiella pneumoniae* in Ningxia region [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 1-17 [2025-10-28]. <https://link.cnki.net/urlid/11.1985.S.20250912.1950.006>. (in Chinese)
- [20] ROWBOTHAM R, RUEGG P. Associations of selected bedding types with incidence rates of subclinical and clinical mastitis in primiparous Holstein dairy cows [J]. *J Dairy Sci*, 2016, 99(6): 4707-4717.
- [21] 翟若南, 吴安华. 世界卫生组织《2024年细菌类重点病原体目录》[J]. 中国感染控制杂志, 2024, 23(6): 782-783.
- ZHAI R N, WU A H. World Health Organization “2024 Bacterial Key Pathogens Catalogue” [J]. *Chinese Journal of Infection Control*, 2024, 23(6): 782-783. (in Chinese)
- [22] ZHENG Z, GORDEN P J, XIA X et al. Whole-genome analysis of *Klebsiella pneumoniae* from bovine mastitis milk in the U. S [J]. *Environ Microbiol*, 2022, 24(3): 1183-1199.
- [23] JONG D A, GARCH E F, SIMJEE S, et al. Monitoring of antimicrobial susceptibility of udder pathogens recovered from cases of clinical mastitis in dairy cows across Europe: VetPath results [J]. *Vet Microbiol*, 2018, 213: 73-81.
- [24] YANG Y, HIGGINS H C, REHMAN I, et al. Genomic diversity, virulence, and antimicrobial resistance of *Klebsiella pneumoniae* strains from cows and humans [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2019, 85(6): e02654-18.
- [25] CHENG J, QU W, BARKEMA W H, et al. Antimicrobial resistance profiles of 5 common bovine mastitis pathogens in large Chinese dairy herds [J]. *J Dairy Sci*, 2019, 102(3): 2416-2426.
- [26] SADDAM S, MUDDASIR K, MUHSIN J, et al. Multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* reservoir and their capsular resistance genes in cow farms of district Peshawar, Pakistan [J]. *PLoS One*, 2023, 18(2): e0282245-e0282245.
- [27] BORIN D N, PAROLIN A C, COSTA L N, et al.

- Molecular characterization of antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolated from Brazilian dairy herds[J]. *J Dairy Sci*, 2021, 104(6):7210-7224.
- [28] JONATHAN M, SIMON D, MARIE A. Characterization of *Klebsiella* isolates obtained from dairy cattle clinical mastitis cases[J]. *Journal of Dairy Science*, 2019, 103(4):3392-3400.
- [29] ANAND T, VIRMANI N, KUMAR S, et al. Phage therapy for treatment of virulent *Klebsiella pneumoniae* infection in a mouse model [J]. *J Glob Antimicrob Resist*, 2020, 21:34-41.
- [30] CHONG Y, SHIMODA S, SHIMONO N. Current epidemiology, genetic evolution and clinical impact of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Infect Genet Evol*, 2018, 61:185-188.
- [31] MARIEM S, LILIA M, ALYA S, et al. Epidemiology, antimicrobial resistance, and extended-spectrum beta-lactamase- producing Enterobacteriaceae in clinical bovine mastitis in Tunisia[J]. *Microb Drug Resist*, 2018, 24(8):1242-1248.
- [32] YAN W, QINGHUA Z, YUFEN J, et al. Epidemiology and antimicrobial susceptibility profiles of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in China[J]. *Braz J Microbiol*, 2019, 50(3):669-675.
- (编辑 范子娟)