

熊潘锋, 琚晓阳, 严泽琳, 等. 浙江省宠物源性大肠埃希菌感染的流行病学调查 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (12): 91-96.

XIONG P F, JU X Y, YAN Z L, et al. An epidemiological investigation of *Escherichia coli* infection in companion animals in Zhejiang Province [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (12): 91-96.

浙江省宠物源性大肠埃希菌感染的流行病学调查

熊潘锋¹, 琚晓阳², 严泽琳², 雷蕾¹, 张嵘^{1,2*}

(1. 浙江农林大学动物预防医学与公共卫生实验室, 浙江 杭州 311300;

2. 浙江大学医学院附属第二医院检验科微生物室, 浙江 杭州 310020)

摘要: 旨在了解浙江省宠物源性大肠埃希菌对抗菌药物的耐药性及流行分布特征。本研究分别从1家宠物医院和3家宠物美容院采集患病和健康宠物的肛门拭子标本分离大肠埃希菌; 采用微量肉汤稀释法进行抗菌药物敏感性试验, 使用含有美罗培南的筛选平板和胶体金试验复查耐碳青霉烯类大肠埃希菌 (CREC), PCR扩增检测 *mcr-1* 和 *bla*_{CTX-M} 型基因; 采用全基因组测序分析 CREC、*mcr-1* 阳性的大肠埃希菌 (MCRPEC) 和产ESBLs的大肠埃希菌 (ESBL-EC) 的耐药特征。结果: 共分离得到83株大肠埃希菌, 其中患病宠物中分离的大肠埃希菌对阿米卡星、环丙沙星、氟苯尼考、氯霉素、氨曲南、头孢噻肟和头孢他啶的耐药率显著高于健康宠物 ($P < 0.05$); 在83株分离株中, 检出39株产CTX-M酶的ESBL-EC, 以CTX-M-15 (16株) 和CTX-M-14 (22株) 为主; 分离到两株产NDM-5碳青霉烯酶的CREC和一株携带*mcr-1.1*基因的MCRPEC。综上, 宠物可能成为耐药菌的携带者和传播者, 对人类健康造成潜在威胁。

关键词: 大肠埃希菌; 宠物; 耐碳青霉烯类; *mcr-1.1*; CTX-M

中图分类号: 855.1 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)12-0091-06

An epidemiological investigation of *Escherichia coli* infection in companion animals in Zhejiang Province

XIONG Panfeng¹, JU Xiaoyang², YAN Zelin², LEI Lei¹, ZHANG Rong^{1,2*}

(1. Laboratory of Animal Preventive Medicine and Public Health, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, China;

2. Clinical Microbiology Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Zhejiang University School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310020, China)

Abstract: To comprehend the antimicrobial resistance and epidemiological distribution patterns of *Escherichia coli* from companion animals in Zhejiang Province, we collected anal swabs from both healthy and sick pets at three pet grooming salons and a pet hospital, respectively. Antibiotic susceptibility tests were conducted using the broth microdilution method. Carbapenem-resistant *Escherichia coli* (CREC) was screened through China Blue plates containing meropenem. Immunochromatographic CARBA-5 assay was conducted to identify carbapenemases. The PCR method was applied to the detection of the *mcr-1* and *bla*_{CTX-M} genes. Resistance genes, plasmid replicons and MLST of CREC, *mcr-1*-positive *Escherichia coli* (MCRPEC), and ESBLs-producing *Escherichia coli* (ESBL-EC) were identified using whole genome sequencing and bioinformation analysis. The results were as follows: 83 strains of *Escherichia coli* were identified. The resistance rates of *Escherichia coli* isolated from the sick pets to amikacin, ciprofloxacin, florfenicol, chloramphenicol, aztreonam, cefotaxime and ceftazidime were significantly higher than those from the healthy pets. Among the 83 isolates, 39 strains produced CTX-M enzyme, mainly CTX-M-15 and CTX-M-14. Additionally, two CREC strains producing NDM-5 and one MCRPEC strain carrying the *mcr-1.1* gene were isolated. The study highlighted the role of companion animals as carriers and spreaders of drug-resistant bacteria, potentially posing a threat to human health.

Keywords: *Escherichia coli*; companion animal; carbapenem-resistant; *mcr-1.1*; CTX-M

收稿日期: 2023-12-24; 修回日期: 2024-10-08

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFD1800403)

第一作者: 熊潘锋, 男, 硕士, 执业兽医师

* 通信作者: 张嵘, 博士, 教授, 研究方向为细菌耐药, E-mail: zhang-rong@zju.edu.cn.

宠物,尤其是犬和猫,已成为许多现代家庭不可或缺的一部分。随着宠物数量和饲养人数的迅速增长,人们不仅关注宠物的生理和行为健康,也关注宠物作为潜在传播途径所带来的公共卫生问题。大肠埃希菌(*Escherichia coli*)广泛存在于动物和人的肠道内,是条件致病菌。在机体免疫功能低下时,可能引发动物或人的胃肠道感染或尿道、生殖道等多种肠外组织器官的感染^[1]。研究发现,在宠物中已经检测到了产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)、产碳青霉烯酶^[2]和携带黏菌素耐药基因*mcr-1*大肠埃希菌的存在^[3]。耐药细菌可以在家庭内的多个宠物之间进行传播^[4],也可能通过宠物与人之间频繁的亲密互动传递给人^[5]。为了解浙江省宠物源性大肠埃希菌的流行情况,本研究从浙江省3家宠物美容院和1家宠物医院中采集健康和患病宠物的肛门拭子,对大肠埃希菌进行筛查和抗菌药物耐药性检测。

1 材料与方法

1.1 样本收集

2022年3月,分别从浙江省1家宠物医院和3家宠物美容院中采集31份患病宠物的肛门拭子(包含15份猫样本和16份犬样本)和82份健康宠物的肛门拭子(包含24份猫样本和58份犬样本)。在采样过程中,接受体检且无明显临床表现的宠物记录为健康组宠物,出现体温升高、食欲不振、精神萎靡、呕吐腹泻或粪便异常等临床症状的宠物记录为患病组宠物^[6]。

1.2 主要试剂与仪器

中国蓝琼脂培养基、水解酪蛋白(M-H)琼脂培养基及LB肉汤购于杭州滨和微生物试剂有限公司;eSwab运送培养基购于意大利Copan公司;NG-Test[®] CARBA5碳青霉烯酶检测试剂盒购自复星诊断科技(上海)有限公司;PCR扩增试剂盒购于日本TaKaRa公司;革兰阴性杆菌药敏试剂板购于珠海迪尔生物科技有限公司;美罗培南购于山东罗欣药业集团股份有限公司。生化培养箱购于上海精宏实验设备有限公司;MOLDI-TOF质谱仪购于德国Bruker公司;紫外成像与分析系统仪器、核酸扩增仪购于德国Biometra公司;DYCP-31DN型电泳仪购于北京六一生物科技有限公司。大肠埃希菌EC600由本实验室保存。

1.3 菌株的分离与鉴定

将采集的肛门拭子标本接种到5 mL的LB肉汤中,置于37℃的CO₂培养箱中增菌培养。18 h后取5 μ L的LB肉汤接种到含有0.3 μ g/mL美罗培南和无抗菌药物添加的中国蓝平板上,18 h后,挑选中国

蓝平板上疑似大肠埃希菌的菌株进行MOLDI-TOF质谱鉴定,分离纯化后将其放在-80℃的甘油肉汤中保存。

1.4 动物分组及抗菌药物敏感性试验

根据宠物的健康状况,将其分成健康组和患病组。使用微量肉汤稀释法对分离到的大肠埃希菌进行抗菌药物敏感性试验。检测药物为16种临床常用抗菌药物,包括阿米卡星、环丙沙星、庆大霉素、氟苯尼考、美罗培南、氯霉素、氨苄西林、四环素、氨基糖苷类、黏菌素(多黏菌素E)、头孢噻肟、替加环素、头孢他啶、头孢他啶/阿维巴坦、头孢哌酮/舒巴坦、复方新诺明。最小抑菌浓度(MIC)结果依照美国临床和实验室标准协会(CLSI)和美国食品药品监督管理局(FDA)制定的解释标准进行判定。质控菌株为大肠埃希菌ATCC25922。

1.5 胶体金检测碳青霉烯酶

对于从筛选平板上得到的大肠埃希菌,使用试剂盒快速检测碳青霉烯酶的型别。挑取大肠埃希菌的单个菌落加入到缓冲液中进行研磨处理,10 min后将制备好的细菌悬液加入CARBA5试剂盒对应的小孔内。试剂盒可以检测的碳青霉烯酶包括肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶(KPC)、新德里金属 β -内酰胺酶(NDM)、苯唑西林酶(OXA-48)、维罗纳整合子编码金属 β -内酰胺酶(VIM)和亚胺培南酶(IMP)。15 min后根据颜色变化及沉淀的形成判断是否存在碳青霉烯酶。所有操作及判读按照厂家提供的说明书执行。

1.6 PCR扩增检测耐药基因

针对从不含抗菌药物的平板上分离的大肠埃希菌,通过PCR扩增检测*mcr-1*基因和常见CTX-M基因(包括CTX-M-1G和CTX-M-9G)。耐药基因的引物序列见表1。煮沸法提取大肠埃希菌的基因组DNA,依照PCR扩增试剂盒的详细步骤进行操作。PCR扩增结束后,取PCR产物混合6 \times Loading buffer进行浓度为1%的琼脂糖凝胶电泳。扩增的DNA条带经GelRed染色后采用紫外光观察分析。PCR阳性的基因组送往杭州生工生物工程有限公司进行Sanger测序,测序完成的序列使用BLAST工具比较得到*bla*_{CTX-M}基因的确切亚型基因。

表1 耐药基因的引物信息

基因	引物序列(5'→3')	片段长度/bp
<i>mcr-1</i>	F: AGTCCGTTTGTCTTCTGTGGC R: AGATCCTTGGTCTCGGCTTG	320
CTX-M-1G	F: CTTCCAGAATAAGGAATCCC R: CGTCTAAGCGGATAAACAAA	949
CTX-M-9G	F: GTGACAAAGAGACTGCAACGG R: ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC	857

1.7 接合试验

采用对利福平天然耐药的大肠埃希菌 EC600 作为受体菌, 携带 *bla*_{NDM-5} 基因和 *mcr-1* 基因的大肠埃希菌 (本研究分离) 分别作为供体菌进行接合试验。首先, 挑选单个菌落溶解于 5 mL 的 LB 肉汤中并将其置于 200 r/min 的摇床上增菌培养。4 h 后, 将 30 μ L 的供体菌肉汤和受体菌 EC600 肉汤接种到 3 cm \times 3 cm 的滤纸上。培养 18 h 后, 将滤纸上的细菌使用 800 μ L 的 LB 肉汤进行溶解并涡旋混匀。随后, 稀释菌悬液并均匀涂布在筛选平板上。针对携带 *bla*_{NDM-5} 基因的接合子, 使用含有 0.3 μ g/mL 美罗培南和 600 μ g/mL 利福平的 M-H 平板进行筛选。对于携带 *mcr-1* 基因的接合子, 筛选平板的药物浓度为 1 μ g/mL 黏菌素和 600 μ g/mL 利福平。PCR 方法和 Sanger 测序进一步确定耐药基因的存在。

1.8 全基因组测序及生物信息学分析

挑选耐碳青霉烯类大肠埃希菌 (CREC)、*mcr-1* 阳性的大肠埃希菌 (MCRPEC) 和产 ESBLs 的大肠埃希菌 (ESBL-EC) 提取细菌基因组, 送往华大基因公司进行全基因组测序。测序平台为 Illumina DNBseq PE150。应用 SPAdes v3.1.1 软件拼接测序结果的短读序列。使用在线网站 Center for Genomic Epidemiology 的 Resfinder v4.4.1、PlasmidFinder v2.1 以及多位点序列 (MLST) v2.0 软件分析测序菌株的耐药基因、质粒类型和细菌 MLST 分型。

1.9 数据统计与分析

使用 SPSS 26.0 统计软件采用卡方检验比较患病组和健康组大肠埃希菌对抗菌药物耐药率的差异, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 菌株的分离及鉴定

在 113 份宠物肛门拭子样本中, 通过 MOLDI-TOF 共检测到 83 株大肠埃希菌, 分离率为 73.45%。其中包括 21 株来自健康猫样本, 36 株来自健康犬样本, 15 株来自患病猫样本和 11 株来自患病犬样本。通过筛选平板和胶体金检测, 共鉴定到两株产 NDM 碳青霉烯酶的大肠埃希菌, 这两株来自同一家宠物医院的不同患病猫个体。PCR 扩增检测到一株携带 *mcr-1* 基因的大肠埃希菌, 来自患病犬样本。在健康组的宠物样本中, 并未检测到 CREC 和 MCRPEC 菌株。此外, 通过 PCR 检测 ESBLs 中常见的 CTX-M 的亚型基因, 共发现 39 株产 CTX-M 的 ESBL-EC, 其中 17 株为 CTX-M-1G 基因阳性, 22 株为 CTX-M-9G 基因阳性。Sanger 测序结合 BLAST 在线比对得到 22 株菌株携带 *bla*_{CTX-M-14} 基因, 16 株携带 *bla*_{CTX-M-15} 基因

和一株携带 *bla*_{CTX-M-55} 基因。其中, 20 株来自于健康组宠物样本 (猫 9 份、犬 11 份), 19 份来自患病组宠物样本 (猫 12 份、犬 7 份)。总体而言, 宠物中 CREC、MCRPEC 和 ESBL-EC 的携带率分别为 1.77% (2/113)、0.88% (1/113) 和 34.51% (39/113)。

2.2 抗菌药物敏感性

患病组宠物分离到的大肠埃希菌对阿米卡星、环丙沙星、氟苯尼考、氯霉素、氨曲南、头孢噻肟和头孢他啶的耐药率显著高于健康组宠物中分离得到的大肠埃希菌对其的耐药率。此外, 所有大肠埃希菌均未对黏菌素和替加环素表现耐药。具体结果详见表 2。

2.3 生物信息学分析

总共选取 5 株大肠埃希菌为代表进行了全基因组测序分析, 包括两株 CREC、一株 MCRPEC 和两株 ESBL-EC, 分析耐药基因和质粒复制子类型。携带 *bla*_{NDM-5} 基因的大肠埃希菌同时对美罗培南、头孢他啶/阿维巴坦和头孢哌酮/舒巴坦表现高水平的耐药。携带 *mcr-1* 基因的大肠埃希菌对黏菌素呈现中介表型。详见表 3。

在两株 CREC 中, *bla*_{NDM-5} 基因周围环境完全相同。上游分布着截短的插入序列 IS_{Aba125}, 作为 -35 区域的启动子调控 *bla*_{NDM-5} 基因的表达^[7]。下游分布着一连串基因, 包括 *ble*_{MBL}、*trpF* 和 *dsbC*。MCRPEC 菌株携带 *mcr-1.1* 基因。通过在线工具 BLAST 比较, 发现与含有 *mcr-1.1* 的序列匹配度最佳的是来自于大肠埃希菌 EC113PM2 的 p113PM2-IncX4-*mcr-1* 质粒骨架 (登录号: CP064023.1), 这表明本研究中的 *mcr-1.1* 基因很可能位于 IncX4 质粒上。ESBL-EC 菌株中, *bla*_{CTX-M-14} 的上游分布着许多耐药基因, 比如 *aac* (6') -*Ib3*、*cmlA1*、*qacEdelta1*, 共同介导多种抗菌药物的耐药性。由于 *bla*_{CTX-M-55} 基因所在拼接序列过短, 并未在其上下游检测到其他耐药基因。

MLST 结果显示, 两株 CREC 均属于 ST410 型大肠埃希菌, 一株 MCRPEC 属于 ST58 型, 两株 ESBL-EC 则分别属于 ST75 和 ST457 型。

2.4 接合试验情况

使用滤纸法, 成功将 *bla*_{NDM-5} 基因和 *mcr-1.1* 基因转移至受体菌 EC600。如表 4 所示, 携带 *bla*_{NDM-5} 基因的接合子对美罗培南表现出显著的耐药性, 携带 *mcr-1.1* 基因的接合子相比受体菌 EC600 对黏菌素的 MIC 值升高, 呈现中介表型。这表明宠物中 *bla*_{NDM-5} 和 *mcr-1.1* 基因位于可移动质粒, 随着质粒在不同菌株之间的转移, 耐药基因可以进行水平传播。

表 2 健康组宠物与患病组宠物中分离的大肠埃希菌对抗菌药物耐药率比较

抗菌药物	健康宠物				患病宠物				卡方值	P 值
	MIC 范围/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	MIC ₅₀ / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	MIC ₉₀ / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	耐药率/ %	MIC 范围/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	MIC ₅₀ / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	MIC ₉₀ / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	耐药率/ %		
阿米卡星	≤2~>64	≤2	4	3.51	≤2~>64	4	>64	34.62	12.444	<0.005
环丙沙星	≤0.125~>4	0.25	0.5	8.77	≤0.125~>4	0.25	>4	46.15	15.32	<0.005
庆大霉素	≤1~>32	≤1	>32	31.58	≤1~>32	≤1	>32	42.31	0.904	0.342
氟苯尼考	2~>16	4	>16	43.86	4~>16	>16	>16	76.92	7.864	0.005
美罗培南	≤0.5	≤0.5	≤0.5	0.00	≤0.5~>64	≤0.5	≤0.5	7.69	--	0.096*
氯霉素	4~>64	8	>64	22.81	4~>64	>64	>64	69.23	16.445	<0.005
氨苄西林	≤2~>64	>64	>64	75.44	≤2~>64	>64	>64	80.77	0.287	0.592
四环素	≤1~>32	16	32	66.67	≤1~>32	32	>32	65.38	0.013	0.909
氨基曲南	≤1~>32	≤1	16	10.53	≤1~>32	8	>32	46.15	13.345	<0.005
黏菌素	≤0.25~2	≤0.25	0.5	0.00	≤0.25~2	≤0.25	0.5	0.00	--	--
头孢噻肟	≤0.5~>16	≤0.5	>16	47.37	≤0.5~>16	>16	>16	80.77	8.168	0.004
替加环素	≤0.5	≤0.5	≤0.5	0.00	≤0.5	≤0.5	≤0.5	0.00	--	--
头孢他啶	≤2~64	≤2	8	7.02	≤2~>64	8	>64	50.00	17.701	<0.005
头孢他啶/ 阿维巴坦	≤1/4	≤1/4	≤1/4	0.00	≤1/4~>32/4	≤1/4	≤1/4	7.69	--	0.096*
头孢哌酮/ 舒巴坦	≤4/2~ 32/16	≤4/2	16/8	0.00	≤4/2~ >128/4	16/8	32/16	7.69	--	0.096*
复方新诺明	≤1/19~ >16/304	≤1/19	>16/304	42.11	≤1/19~ >16/304	16/304	>16/304	57.69	1.742	0.187

注：* 采用 Fisher 确切概率法。

表 3 送测大肠埃希菌的质粒复制子类型、耐药基因以及抗菌药物药敏表型

菌株 编号	耐药 类型	宿主 来源	MLST 分型	质粒类型	抗菌药物耐药基因	抗菌药物表型
C25	ESBL-EC	患病猫	ST75	Col (MG828), IncB/ O/K/Z, IncFIB, IncF- IC	<i>aac</i> (6') - <i>Ib3</i> , <i>aph</i> (3') - <i>Ia</i> , <i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{TEM-1A} , <i>fosA7</i> , <i>cmlA1</i> , <i>floR</i> , <i>aac</i> (6') - <i>Ib-cr</i> , <i>tet</i> (A)	氟苯尼考 [R], 氯霉素 [R], 氨苄西林 [R], 头孢噻肟 [R]
C68	CREC	患病猫	ST410	Col (BS512), IncFIB, IncFIC, IncN, IncX3	<i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>aph</i> (3') - <i>Ia</i> , <i>bla</i> _{CMY-2} , <i>bla</i> _{NDM-5} , <i>cmlA1</i> , <i>sul3</i> , <i>tet</i> (A), <i>dfrA12</i>	环丙沙星 [R], 庆大霉素 [R], 氟苯尼考 [R], 美罗培南 [R], 氯霉素 [R], 氨苄西 林 [R], 四环素 [R], 头孢噻肟 [R], 头 孢他啶 [R], 头孢他啶/阿维巴坦 [R], 头 孢哌酮/舒巴坦 [R], 复方新诺明 [R]
C8	CREC	患病猫	ST410	Col (BS512), IncFIB, IncFIC, IncN, IncX3	<i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>aph</i> (3'') - <i>Ib</i> , <i>aph</i> (3') - <i>Ia</i> , <i>aph</i> (6) - <i>Id</i> , <i>bla</i> _{CMY-2} , <i>bla</i> _{NDM-5} , <i>cmlA1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i> , <i>tet</i> (A), <i>dfrA12</i>	环丙沙星 [R], 庆大霉素 [R], 氟苯尼考 [R], 美罗培南 [R], 氯霉素 [R], 氨苄西 林 [R], 四环素 [R], 氨基曲南 [R], 头孢 噻肟 [R], 头孢他啶 [R], 头孢他啶/阿维 巴坦 [R], 头孢哌酮/舒巴坦 [R], 复方新 诺明 [R]
D36	MCRPEC	患病犬	ST58	IncFIB, IncFII, IncX4	<i>mcr-1.1</i> , <i>qnrS1</i> , <i>tet</i> (A)	氟苯尼考 [R], 四环素 [R], 黏菌素 [I]
D78	ESBL-EC	健康犬	ST457	IncFIA, IncFIB, IncFII, IncI1	<i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> , <i>aadA22</i> , <i>ant</i> (3'') - <i>Ia</i> , <i>aph</i> (3') - <i>Ila</i> , <i>aph</i> (3') - <i>Ia</i> , <i>bleO</i> , <i>rmtB</i> , <i>bla</i> _{CTX-M-55} , <i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>fo</i> - <i>sA3</i> , <i>erm</i> (42), <i>mph</i> (A), <i>cmlA1</i> , <i>floR</i> , <i>sul2</i> , <i>tet</i> (A), <i>tet</i> (M), <i>dfrA12</i>	阿米卡星 [R], 环丙沙星 [R], 庆大霉素 [R], 氟苯尼考 [R], 氯霉素 [R], 氨苄西 林 [R], 四环素 [R], 氨基曲南 [R], 头孢 噻肟 [R], 头孢他啶 [R], 复方新诺明 [R]

注：[R] 代表耐药，[I] 代表中介。

表4 受体菌 EC600、供体菌及其接合子的抗菌药物敏感性

药物类型	EC600	C8	C8 接合子	C68	C68 接合子	D36	D36 接合子
阿米卡星	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2
环丙沙星	≤0.125	>4	0.25	>4	0.25	0.25	0.25
庆大霉素	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1
氟苯尼考	≤0.5	>16	4	>16	4	8	8
美罗培南	≤0.5	>64	16	>64	8	≤0.5	≤0.5
氯霉素	≤2	>64	8	>64	8	8	8
氨苄西林	≤2	>64	>64	>64	>64	≤2	≤2
四环素	≤1	>32	≤1	>32	≤1	32	≤1
氨曲南	≤1	16	≤1	8	≤1	≤1	≤1
黏菌素	≤0.25	≤0.25	≤0.25	≤0.25	≤0.25	2	2
头孢噻肟	≤0.5	>16	>16	>16	>16	≤0.5	≤0.5
替加环素	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5
头孢他啶	≤2	>64	>64	>64	>64	≤2	≤2
头孢他啶/阿维巴坦	≤1/4	>32/4	>32/4	>32/4	>32/4	≤1/4	≤1/4
头孢哌酮/舒巴坦	≤4/2	>128/4	>128/64	>128/4	>128/64	≤4/2	≤4/2
复方新诺明	≤1/19	>16/304	≤1/19	>16/304	≤1/19	≤1/19	≤1/19

3 讨论

本研究以浙江省宠物医院和宠物美容院中的患病宠物和健康宠物作为调查对象,从113份宠物样本中分离到了83株大肠埃希菌,总共检测到两株携带 *bla*_{NDM-5} 和1株携带 *mcr-1.1* 基因的大肠埃希菌,分别对碳青霉烯类和黏菌素产生耐药性或者表现不敏感。这两种药物被认为是目前人类临床上对抗严重革兰阴性杆菌感染的“最后一道防线”药物^[8-9]。值得关注的是,这3株细菌均来自患病宠物,两株 *bla*_{NDM-5} 阳性的 CREC 来自两只患病猫,一株携带 *mcr-1.1* 基因的 MCRPEC 分离自患病犬。尽管宠物医院采取的是单个隔间笼养的方式,但是 CREC 和 MCRPEC 的检出表明宠物医院的环境存在交叉感染的风险。笼子的交叉使用、交叉喂食或是医疗环境消毒不到位等原因可能造成耐药菌在宠物间传播。有文献报道,伴侣动物犬和猫可以在住院后的短时间内获得产 OXA-181 碳青霉烯酶大肠埃希菌^[2],强调了宠物就医环境确实存在风险。宠物医院的环境与人类医院的环境是很相似的,宠物就诊时暴露的风险与人类患者就诊时暴露的风险相似,因此更加严格的消毒对于宠物医院的管理是必需的。

抗菌药物敏感性结果显示患病宠物中对于阿米卡星、环丙沙星、氟苯尼考、氯霉素、氨曲南、头孢噻肟和头孢他啶的耐药率显著高于健康宠物,这表明患病宠物相较于健康宠物更有可能携带抗菌药物的耐药

基因,传播耐药性。患病宠物在接受抗菌药物治疗时,可能对肠道菌群具有选择作用,多重耐药性的大肠埃希菌可能更容易保留。健康宠物也具有传播多重耐药大肠埃希菌的风险。比如,近四分之一的健康宠物肠道内分离到了 ESBL-EC,携带多种抗菌药物耐药基因。有研究报道在宠物医院的健康宠物犬肠道中发现携带 *bla*_{NDM-5} 基因的大肠埃希菌^[10]。这些研究表明宠物可能不仅仅是家庭成员,其还可能成为耐药菌的潜在携带者和传播者。

此前,国外一项关于宠物的研究发现在肠杆菌目和假单胞菌属的菌株中检测到 *mcr-1* 基因的存在^[11]。国内也报道过在临床患病宠物中检出到 *mcr-1* 阳性的肺炎克雷伯菌^[12]。此外,也有文献报道在宠物犬中分离到过产 ESBLs 且携带 *mcr-1* 基因的大肠埃希菌^[3]。显然,宠物可能已经成为 *mcr-1* 基因的潜在宿主。

综上,本研究对浙江省宠物医院和宠物美容院的患病和健康宠物中的大肠埃希菌进行了筛查,共检出到两株含有 *bla*_{NDM-5} 基因的 CREC、一株携带 *mcr-1.1* 基因的 MCRPEC 以及 39 株产 CTX-M 的 ESBL-EC,并深入分析了这些菌株的基因组特征,强调了宠物犬、猫作为跨物种传播宿主的潜在风险。研究表明需要更加关注宠物中耐药菌株的存在、传播与控制,避免对动物和人类的健康造成严重威胁。

参考文献:

- [1] VILA J, SAEZ-LOPEZ E, JOHNSON J R, et al. *Escherichia coli*: an old friend with new tidings [J]. FEMS Microbiol Rev, 2016, 40 (4): 437-463.
- [2] NIGG A, BRILHANTE M, DAZIO V, et al. Shedding of OXA-181 carbapenemase-producing *Escherichia coli* from companion animals after hospitalisation in Switzerland: an outbreak in 2018 [J]. Euro Surveill, 2019, 24 (39): 1900071.
- [3] YASUGI M, HATOYA S, MOTOOKA D, et al. Genetic and phenotypic analyses of mcr-harboring extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from companion dogs and cats in Japan [J]. Vet Microbiol, 2023, 280: 109695.
- [4] JOHNSON J R, MILLER S, JOHNSTON B, et al. Sharing of *Escherichia coli* sequence type ST131 and other multidrug-resistant and urovirulent *E. coli* strains among dogs and cats within a household [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47 (11): 3721-3725.
- [5] WANG M G, FANG C, LIU K D, et al. Transmission and molecular characteristics of bla_{NDM}-producing *Escherichia coli* between companion animals and their healthcare providers in Guangzhou, China [J]. J Antimicrob Chemother, 2022, 77 (2): 351-355.
- [6] 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.
- [7] WU W, FENG Y, TANG G, et al. NDM Metallo-β-Lactamases and their bacterial producers in health care settings [J]. Clin Microbiol Rev, 2019, 32 (2): e00115-18.
- [8] PAPP-WALLACE K M, ENDIMIANI A, TARACILA M A, et al. Carbapenems: past, present, and future [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55 (11): 4943-4960.
- [9] EL-SAYED AHMED M A E, ZHONG L L, SHEN C, et al. Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000-2019) [J]. Emerg Microbes Infect, 2020, 9 (1): 868-885.
- [10] WANG J, XIA Y B, HUANG X Y, et al. Emergence of bla_{NDM-5} in enterobacteriaceae isolates from companion animals in Guangzhou, China [J]. Microb Drug Resist, 2021, 27 (6): 809-815.
- [11] MARTINS E, MABONI G, BATTISTI R, et al. High rates of multidrug resistance in bacteria associated with small animal otitis: a study of cumulative microbiological culture and antimicrobial susceptibility [J]. Microb Pathog, 2022, 165: 105399.
- [12] ZHANG Z, LEI L, ZHANG H, et al. Molecular investigation of *Klebsiella pneumoniae* from clinical companion animals in Beijing, China, 2017-2019 [J]. Pathogens, 2021, 10 (3): 271.