

韩彦飞, 苗中秋, 张利, 等. 营口市宠物源大肠杆菌耐药性与 ESBLs、PMQR 耐药基因检测 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (3): 38-46.

HAN Y F, MIAO Z Q, ZHANG L, et al. Detection of antibiotic resistance and ESBLs, PMQR resistance genes in *Escherichia coli* isolates from pets in Yingkou city [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (3): 38-46.

营口市宠物源大肠杆菌耐药性与 ESBLs、PMQR 耐药基因检测

韩彦飞, 苗中秋, 张利, 姜仁礼, 刘琪, 李美琦, 刘正伟*

(辽宁农业职业技术学院, 辽宁 营口 115009)

摘要: 旨在探究宠物源大肠杆菌对抗菌药物的耐药情况及携带的质粒介导喹诺酮 (PMQR) 和超光谱 β -内酰胺酶 (ESBLs) 耐药基因的检测。采集营口市 307 份宠物犬、猫肛拭子样品, 分离获得 282 株大肠杆菌, 通过 K-B 药敏纸片法对分离菌株进行药敏试验; 在头孢他啶和头孢噻肟药敏纸片中加入克拉维酸来确定分离菌株是否为 ESBLs 表型耐药菌株; 应用 PCR 测定大肠杆菌菌株携带的 ESBLs 和 PMQR 耐药基因型。结果: 宠物犬源、猫源大肠杆菌对 β -内酰胺类药物耐药率分别为 21.15%~60.00% 和 22.22%~37.50%; 对喹诺酮类药物耐药率分别为 25.85%~52.73% 和 43.75%~57.50%; 对氨基糖苷类药物的耐药率分别为 7.69%~69.09% 和 16.67%~57.50%; 对四环素类药物的耐药率分别为 5.77%~39.13% 和 18.75%~37.50%; 对多肽类药物的耐药率分别为 6.52%~20.91% 和 12.50%~27.78%; 对磺胺类药物的耐药率分别为 17.31%~29.09% 和 22.22%~33.78%; 经测定, 148 株大肠杆菌检测为多重耐药菌株, 三重耐药菌株检出率最多, 共有 56 株大肠杆菌为产 ESBLs 表型; 在产 ESBLs 表型大肠杆菌中, bla_{CTX-M} 耐药基因检出率最高为 28.57% (16/56), 其次为 bla_{TEM} 耐药基因, 检出率为 17.86% (10/56); 共有 74 株大肠杆菌携带 PMQR 耐药基因, 其中 $qnrS$ 耐药基因检出率最高为 44.59% (33/74), 其次为 $aac(6')-Ib-cr$, 检出率为 18.92% (14/74)。综上, 营口地区宠物犬源、猫源大肠杆菌耐药较为严重, 携带多种耐药基因, 菌株携带的 ESBLs 耐药基因以 bla_{CTX-M} 为主; 携带的 PMQR 耐药基因以 $qnrS$ 为主。

关键词: 宠物; 大肠杆菌; 耐药性; 耐药基因

中图分类号: S855.1 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)03-0038-09

Detection of antibiotic resistance and ESBLs, PMQR resistance genes in *Escherichia coli* isolates from pets in Yingkou city

HAN Yanfei, MIAO Zhongqiu, ZHANG Li, JIANG Renli, LIU Qi, LI Meiqi, LIU Zhengwei*

(Liaoning Agricultural College, Yingkou 115009, China)

Abstract: The aim of this experiment was to investigate the resistance of pet-derived *Escherichia coli* to antibiotics and the carrying ESBLs and PMQR resistance genotypes. Anal swab samples were collected from 307 pet dogs and cats in city of Yingkou. Two hundred and eighty-two strains of *Escherichia coli* were isolated and tested for drug sensitivity using the K-B drug sensitivity paper method. To determine whether the isolated strain was ESBLs phenotype resistant, clavulanic acid was added to the ceftazidime and cefotaxime sensitive paper slides. Finally, PCR was employed to determine ESBLs and PMQR resistance genotypes carried by the *Escherichia coli* strains. The results showed that *Escherichia coli* from the pet dogs and cats had an impact on the resistance rates of β -lactams drugs ranging from 21.15% to 60.00% and from 22.22% to 37.50%, respectively. The resistance rates to quinolone drugs ranged from 25.85% to 52.73% and from 43.75% to 57.50%, respectively. The resistance rates to aminoglycoside drugs were 7.69%~69.09% and 16.67%~57.50%, respectively. The resistance rates to tetracycline drugs ranged from 5.77% to 39.13% and from 18.75% to 37.50%, respectively. The resistance rates to peptide drugs were 6.52%~20.91% and 12.50%~27.78%, respectively. And the resistance rates to sulfonamide drugs ranged from 17.31% to 29.09% and from 22.22% to 33.78%, respectively. After testing, 148 strains of *Escherichia coli* were detected as multidrug-resistant strains, with the highest detection rate of triple resistant strains. There were 56 strains of *Escherichia coli* that produced ESBLs phenotype. Among the ESBLs phenotype *Escherichia coli* isolates, the detection rate of bla_{CTX-M} resistance gene was the highest, at 28.57% (16/56), followed by the bla_{TEM} resistance gene with a detection rate of 17.86% (10/56). There were a total of 74 *Escherichia coli* strains carrying PMQR resistance genes, with the highest detection rate of $qnrS$ resistance gene being 44.59% (33/74), followed by $aac(6')-Ib-cr$ with

收稿日期: 2024-03-18; 修回日期: 2025-01-16

基金项目: 辽宁农业职业技术学院校级课题 (Lnz202212)

第一作者: 韩彦飞, 男, 硕士, 讲师

* 通信作者: 刘正伟, 副教授, 研究方向为临床兽医, E-mail: 97047777@qq.com。

a detection rate of 18.92% (14/74). In summary, the *E. coli* strains from pet dogs and cats in the Yingkou area were severely drug-resistant. These strains carried multiple resistance genes. The ESBLs resistance genes carried by the strains were mainly *bla*_{CTX-M}, and the PMQR resistance genes carried by the strains were mainly *qnrS*.

Keywords: pet; *Escherichia coli*; resistance; resistance genes

根据《2023—2024年中国宠物行业白皮书》显示,2023年我国宠物犬数量为5175万只,宠物猫数量为6980万只,宠物犬、猫的数量呈现出逐渐增长的趋势。抗生素的不合理应用,导致宠物源大肠杆菌耐药性日益严重,许多菌株携带多种耐药基因,其中携带质粒介导喹诺酮(PMQR)耐药基因和超光谱 β -内酰胺酶(ESBLs)耐药基因的情况较为严重^[1]。PMQR包括*qnrS*、*aac*(6')-*Ib-cr*和*qepA*基因,分别可通过调控DNA解旋酶活性、编码乙酰基转移酶修饰喹诺酮类药物和介导蛋白质主动外派机制来达到喹诺酮耐药作用^[2]。ESBLs包括*bla*_{CTX-M}、*bla*_{TEM}和*bla*_{SHV}基因,均可产生超广谱 β -内酰胺酶对 β -内酰胺类药物产生水解活性,从而达到耐药作用^[3]。犬、猫可成为耐药性大肠杆菌的储存库,并将耐药性大肠杆菌传播给人类,严重危害公共健康^[4]。本研究旨在调查辽宁省营口市地区宠物犬、猫大肠杆菌的耐药率和携带ESBLs、PMQR基因情况,为辽宁省营口市地区宠物临床用药提供依据,同时为营口市地区宠物源大肠杆菌ESBLs、PMQR基因流行情况提供可利用的流行病学信息。

1 材料与方法

1.1 试剂、药敏片

β -内酰胺类药敏纸片(头孢噻肟、氨苄西林、头孢哌酮)、喹诺酮类药敏纸片(左氧氟沙星、环丙沙星、洛美沙星)、氨基糖苷类药敏纸片(链霉素、庆大霉素、阿米卡星)、四环素类药敏纸片(四环素、多西环素)、多肽类药敏纸片(多黏菌素)、磺胺类药敏纸片(复方新诺明)、头孢他啶-克拉维酸和头孢噻肟-克拉维酸药敏纸片,均购自杭州微生物试剂有限公司。营养肉汤(NB)、伊红美蓝(EMB)、水解酪蛋白胨肉汤(MHB)和水解酪蛋白胨琼脂(MHA)培养基,均购自青岛海博生物科技有限公司。质控菌株为大肠杆菌ATCC 25922和肺炎克雷伯菌ATCC 700603,为实验室保存菌株。

1.2 试验样品

从2023年3月至10月,从辽宁省营口市3家宠物医院搜集犬、猫肛门拭子样本。肛门拭子样品分为健康宠物样品、肠道疾病宠物样品和非肠道疾病宠物样品。健康宠物样品为体检动物和接种疫苗动物的样

品;肠道疾病宠物样品为患有腹泻、消化不良等出现肠道症状宠物的样品;非肠道疾病宠物样品为患有心脏病、肿瘤等疾病的宠物样品。共搜集到307份样品,其中犬源样品224份(健康犬源49份、肠道疾病犬源116份、非肠道疾病犬源59份);猫源样品83份(健康猫源18份、肠道疾病猫源42份、非肠道疾病猫源23份)。

1.3 大肠杆菌的分离鉴定

在装有肛门拭子样品的采集管中加入2.5 mL无菌生理盐水,振荡15 min,静置5 min后,取15 μ L混悬液接种到NB培养基中,在37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中培养16 h。将培养好的菌液划线接种到EMB培养基中,在37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中培养16 h。将EMB培养基中带有金属光泽的黑色菌落进行纯培养,并进行DNA提取。参考陈亮等^[5]报道,利用大肠杆菌16S rDNA特异性引物(F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'和R:5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')进行PCR鉴定,PCR产物由吉林库美生物科技股份有限公司测序,测序结果与GenBank中登录的大肠杆菌参考株进行同源性分析,以同源性 $\geq 97\%$ 确定为大肠杆菌。扩增体系:2 \times Taq PCR Master Mix 12.5 μ L,上下游引物各0.8 μ L,DNA模板2 μ L,加双蒸水至25 μ L。扩增程序:95 $^{\circ}$ C 4 min;95 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,共30个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.4 药敏试验

采用药敏纸片法对宠物源大肠杆菌分离菌株进行敏感性试验。根据2023年美国临床和实验室标准协会(CLSI)-33版(CLSI-M100-S33)进行菌株药物敏感性判读,判读结果分为耐药、中介和敏感,判定标准如表1所示。试验质控菌株为大肠杆菌ATCC 25922。

1.5 ESBLs表型试验

根据CLSI-M100-S33进行ESBLs表型验证试验,将分离菌株分别进行头孢他啶(30 μ g)、头孢噻肟(30 μ g)、头孢他啶-克拉维酸(30 μ g-10 μ g)和头孢噻肟-克拉维酸(30 μ g-10 μ g)药敏试验。如果任何一个药物,加克拉维酸的抑菌圈直径相比较于不加克拉维酸增加 ≥ 5 mm,则分离菌株表型为产ESBLs,试验质控菌株为大肠杆菌ATCC 25922和肺炎克雷伯菌ATCC 700603。

表 1 药敏试验判定标准

药物	抑菌圈直径/mm		
	敏感	中介	耐药
头孢噻肟	≥26	23~25	≤22
氨苄西林	≥17	14~16	≤13
头孢哌酮	≥21	16~20	≤15
左氧氟沙星	≥21	17~20	≤16
环丙沙星	≥26	22~25	≤21
洛美沙星	≥22	19~21	≤18
链霉素	≥15	12~14	≤11
庆大霉素	≥18	15~17	≤14
阿米卡星	≥20	17~19	≤16
四环素	≥15	12~14	≤11
多西环素	≥14	11~13	≤10
多黏菌素	≥12	11	≤10
复方新诺明	≥16	11~15	≤10

1.6 ESBLs 基因检测

应用 DNA 提取试剂盒提取大肠杆菌基因, 根据文献 [6-9] 合成 ESBLs 基因引物, 并进行 PCR 反应, 引物序列如表 2 所示。扩增反应体系: $2 \times Taq$ Master Mix 12.5 μL , 上下游引物各 0.5 μL , DNA 模版 1 μL , ddH₂O 10.5 μL 。ESBLs 基因 PCR 扩增程序如表 3 所示。

1.7 PMQR 基因检测

根据文献 [10-13] 合成 PMQR 基因引物, 并进行 PCR 反应, 引物序列如表 4 所示。扩增反应体系: $2 \times Taq$ Master Mix 10 μL , 上下游引物各 0.5 μL , DNA 模版 1 μL , ddH₂O 8 μL 。PMQR 基因 PCR 扩增程序如表 5 所示。

表 2 ESBLs 基因引物序列

引物名称	引物序列 (5'→3')	片段大小/bp	参考文献
<i>bla</i> _{TEM}	F: CATTTCGGTGTGCCCTTATTC R: CGTTCATCCATATGTTGCCCTGAC	800	[6]
<i>bla</i> _{CTX-M}	F: TTTGCGATGTGCAGTACCTGTAA R: TTTGCGATGTGCACTACCAGTAA	544	[6]
<i>bla</i> _{SHV}	F: ATGCGTTATATTCGCTGTG R: TGCTTTGTTATTCGGCCAA	747	[7]
<i>bla</i> _{CMY-2}	F: ATGATGAAAAATCGTTATGC R: TTGCAGCTTTTCAAGAAATGCC	1 143	[8]
<i>bla</i> _{DHA}	F: AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT R: CCGTACGCATACTGGCTTTGC	387	[8]
<i>bla</i> _{OXA}	F: GGCACCAGATTCAACTTTCAAG R: GACCCCAAGTTTCTGTAAGTG	564	[9]

表 3 ESBLs 基因 PCR 扩增程序

目的基因	扩增程序					
	预变性	变性	退火	延伸	循环个数	延伸
<i>bla</i> _{TEM}	94 °C 7 min	94 °C 30s	55 °C 30 s	72 °C 30 s	35	72 °C 10 min
<i>bla</i> _{CTX-M}	94 °C 5 min	94 °C 40 s	56 °C 40 s	72 °C 45 s	30	72 °C 7 min
<i>bla</i> _{SHV}	94 °C 5 min	94 °C 35 s	57 °C 30 s	72 °C 40 s	30	72 °C 7 min
<i>bla</i> _{CMY-2}	94 °C 5 min	94 °C 45 s	55 °C 45 s	72 °C 45 s	30	72 °C 10 min
<i>bla</i> _{DHA}	94 °C 5 min	94 °C 45 s	56 °C 45 s	72 °C 45 s	30	72 °C 10 min
<i>bla</i> _{OXA}	94 °C 5 min	94 °C 40 s	56 °C 40 s	72 °C 45 s	30	72 °C 7 min

表 4 PMQR 基因引物序列

引物名称	引物序列 (5'→3')	片段大小/bp	参考文献
<i>qnrS</i>	F: ACGACATTGCTCAACTGCAA R: TAAATTGGCACCCCTGTAGGC	417	[10]
<i>qnrB</i>	F: CCTGAGCGGCACTGAATTTAT R: GTTTGCTGCTCGCCAGTCGA	617	[10]
<i>qnrD</i>	F: CGAGATCAATTTACGGGGAATA R: AACAAAGCTGAAGCCCTG	581	[11]
<i>aac (6') -Ib-cr</i>	F: TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA R: CTCGAATGCTTGGCGCGTTT	482	[12]
<i>oqxAB</i>	F: CTCGGCGGGATGATGCT R: CCACTCTTCACGGGAGACGA	392	[12]
<i>qepA</i>	F: CCAGCTCGGCAACTTGATAC R: ATGCTCGCCTTCCAGAAAA	570	[13]

表 5 PMQR 基因扩增程序

目的基因	扩增程序					
	预变性	变性	退火	延伸	循环个数	延伸
<i>qnrS</i>	95 °C 5 min	94 °C 1 min	58 °C 1 min	72 °C 1 min	30	72 °C 7 min
<i>qnrB</i>	95 °C 5 min	94 °C 1 min	58 °C 1 min	72 °C 1 min	30	72 °C 7 min
<i>qnrD</i>	94 °C 5 min	94 °C 30 s	56 °C 30 s	72 °C 45 s	30	72 °C 10 min
<i>aac (6') -Ib-cr</i>	95 °C 5 min	94 °C 1 min	58 °C 1 min	72 °C 1 min	30	72 °C 7 min
<i>oqxAB</i>	95 °C 5 min	94 °C 1 min	58 °C 1 min	72 °C 1 min	30	72 °C 7 min
<i>qepA</i>	95 °C 5 min	94 °C 35 s	60 °C 35 s	72 °C 45 s	32	72 °C 10 min

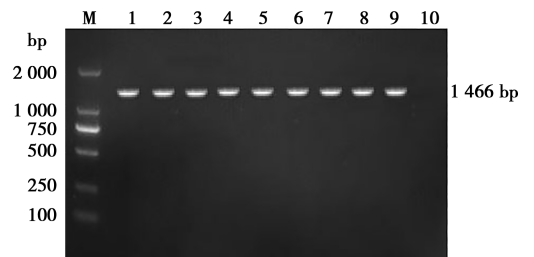
1.8 数据统计与分析

采用 IBM SPSS 26.0 软件进行数据分析，因素分析采用卡方检验或 Fisher 精确分析， $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 大肠杆菌分离培养

通过 16S rDNA 基因 PCR 扩增及测序，从 307 份宠物源肛拭子样品中共分离出 282 株大肠杆菌。从犬源肛拭子样品中共分离出 208 株，健康犬源、肠道疾病犬源和非肠道疾病犬大肠杆菌分离率分别为 93.88% (46/49)、94.83% (110/116) 和 88.16% (52/59)。从猫源肛拭子样品中分离出 74 株大肠杆菌，健康猫源、肠道疾病猫源和非肠道疾病猫源大肠杆菌分离率分别为 88.89% (16/18)、95.24% (40/42) 和 78.26% (18/23)。部分阳性菌株 16S rDNA 基因 PCR 扩增结果如图 1 所示，EMB 培养基上的菌落形态如图 2 所示。



M. DL2000 Marker; 1. 阳性对照; 2~9. 阳性分离菌株; 10. 阴性对照。

图 1 部分阳性菌株 16 S rDNA 基因 PCR 扩增

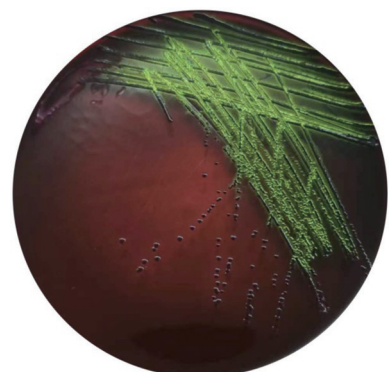


图 2 EMB 培养基上的菌落形态

2.2 药敏试验

宠物犬源大肠杆菌药敏试验结果如表 6 所示。分离出的大肠杆菌菌株对 13 种药物均表现出耐药性。宠物犬源大肠杆菌对 β -内酰胺类药物头孢噻肟、氨苄西林和头孢哌酮的耐药率在 21.15%~58.18%；对喹诺酮类药物左氧氟沙星、环丙沙星和洛美沙星的耐药率在 25.85%~52.73%；对氨基糖苷类药物链霉素、庆大霉素和阿米卡星的耐药率在 7.69%~69.09%；对四环素类药物四环素、多西环素的耐药率在 5.77%~39.13%；对多肽类药物多黏菌素的耐药率在 6.52%~20.91%；对于磺胺类药物复方新诺明的耐药率在 17.31%~29.09%。对于头孢噻肟、头孢哌酮、多黏菌素，肠道疾病犬源大肠杆菌耐药率显著高于健康犬源和非肠道疾病犬源 ($P<0.05$)；对于氨苄西林、左氧氟沙星、洛美沙星、环丙沙星、链霉素和多西环素，健康犬源大肠杆菌和肠道疾病犬源大肠杆菌之间耐药率差异不显著 ($P>0.05$)，两者的耐药率皆显著高于非肠道疾病犬源大肠杆菌 ($P<0.05$)；对于多西环素，健康犬源大肠杆菌耐药率显著高于肠道疾病犬源大肠杆菌 ($P<0.05$)；对于四环素，健康犬源大肠杆菌耐药率显著高于肠道疾病犬源和非肠道疾病犬源大肠杆菌 ($P<0.05$)；对于多黏菌素，肠道疾病犬源大肠杆菌耐药率要显著高于健康犬和非肠道疾病犬 ($P<0.05$)；对于庆大霉素和阿米卡星，健康犬、肠道疾病犬和非肠道疾病犬源大肠杆菌之间耐药率差异不显著 ($P>0.05$)。

宠物猫源大肠杆菌药敏试验结果如表 7 所示。宠物猫源大肠杆菌对 β -内酰胺类药物头孢噻肟、氨苄西林和头孢哌酮的耐药率在 22.22%~37.50%；对喹诺酮类药物左氧氟沙星、环丙沙星和洛美沙星的耐药率在 43.75%~57.50%；对氨基糖苷类药物链霉素、庆大霉素和阿米卡星的耐药率在 16.67%~57.50%；对四环素类药物四环素、多西环素的耐药率在 18.75%~37.50%；对多肽类药物多黏菌素的耐药率在 12.50%~27.78%；对于磺胺类药物复方新诺明的耐药率在 22.22%~33.78%。对于氨苄西林、头孢哌酮、阿米卡星和复方新诺明，健康猫源大肠杆菌耐药率显著高于肠道疾病猫源和非肠道疾病猫源大肠杆菌 ($P<0.05$)；对于左氧氟沙星、环丙沙星、洛美沙星、链霉素、四环素、多西环素，健康猫、肠道疾病猫和非肠道疾病猫源大肠杆菌之间耐药率差异不显著 ($P>0.05$)；对于头孢哌酮和庆大霉素，健康猫源和肠道疾病猫源大肠杆菌耐药率显著高于非肠道疾病猫源大肠杆菌 ($P<0.05$)。

多重耐药菌株情况如图 3 所示。多重耐药菌株检出率为 50.48% (148/282)。宠物犬源三重耐药大肠

杆菌检出率在 25.45%~32.61%；四重耐药大肠杆菌检出率在 13.04%~15.38%；五重耐药菌株检出率在 6.52%~10.97%。宠物猫源三重耐药菌株检出率为 15.00%~18.75%；四重耐药大肠杆菌检出率在 7.50%~16.67%；五重耐药菌株检出率在 5.56%~12.50%。六重耐药菌株在健康犬源大肠杆菌、肠道疾病犬源大肠杆菌和肠道疾病猫源大肠杆菌中检出，检出率分别为 4.34%、5.45%和 2.50%。

表 6 宠物犬源大肠杆菌耐药率 %

药物	不同来源大肠杆菌分离株			合计 (n=208)
	肠道疾病犬 (n=110)	健康犬 (n=46)	非肠道疾病犬 (n=52)	
头孢噻肟	57.27 ^a	47.83 ^b	23.07 ^c	46.15
氨苄西林	58.18 ^a	54.35 ^b	26.92 ^c	49.52
头孢哌酮	60.00 ^a	50.00 ^b	21.15 ^c	48.08
左氧氟沙星	48.18 ^a	45.65 ^b	25.85 ^c	42.79
环丙沙星	50.00 ^a	47.83 ^b	32.69 ^c	45.19
洛美沙星	52.73 ^a	52.17 ^b	30.77 ^c	47.12
链霉素	69.09 ^a	65.22 ^b	55.77 ^c	64.90
庆大霉素	10.00 ^a	13.04 ^b	9.62 ^c	10.58
阿米卡星	9.09 ^b	10.87 ^a	7.69 ^c	9.13
四环素	28.18 ^b	39.13 ^a	15.38 ^c	27.40
多西环素	8.18 ^b	13.04 ^a	5.77 ^c	8.65
多黏菌素	20.91 ^a	6.52 ^c	11.54 ^b	15.38
复方新诺明	29.09 ^a	21.74 ^b	17.31 ^c	24.52

注：不同来源大肠杆菌分离株同行数据肩标不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)。下同。

表 7 宠物猫源大肠杆菌耐药率 %

药物	不同来源大肠杆菌分离株			合计 (n=74)
	健康猫 (n=16)	肠道疾病猫 (n=40)	非肠道疾病猫 (n=18)	
头孢噻肟	31.25 ^a	30.00 ^a	22.22 ^b	28.38
氨苄西林	37.50 ^a	27.50 ^b	27.78 ^b	29.73
头孢哌酮	31.25 ^a	25.00 ^b	27.78 ^b	27.02
左氧氟沙星	56.25 ^a	57.50 ^a	44.44 ^b	54.05
环丙沙星	50.00 ^a	52.50 ^a	50.00 ^a	51.35
洛美沙星	43.75 ^a	55.00 ^a	55.56 ^a	52.70
链霉素	50.00 ^a	57.50 ^a	44.44 ^a	52.70
庆大霉素	25.00 ^a	22.50 ^a	16.67 ^b	21.62
阿米卡星	31.25 ^a	25.00 ^b	27.78 ^b	27.02
四环素	18.75 ^a	20.00 ^a	22.22 ^a	20.27
多西环素	37.50 ^a	30.00 ^a	33.33 ^a	32.43
多黏菌素	12.50 ^b	22.50 ^a	27.78 ^a	21.62
复方新诺明	31.25 ^a	25.00 ^b	22.22 ^b	33.78

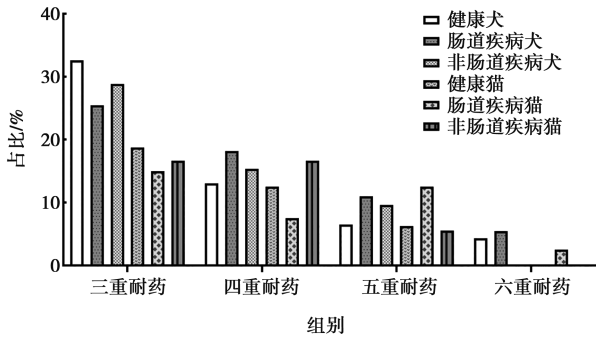


图3 宠物源大肠杆菌菌株多重耐药率

2.3 ESBLs 表型及基因型检测

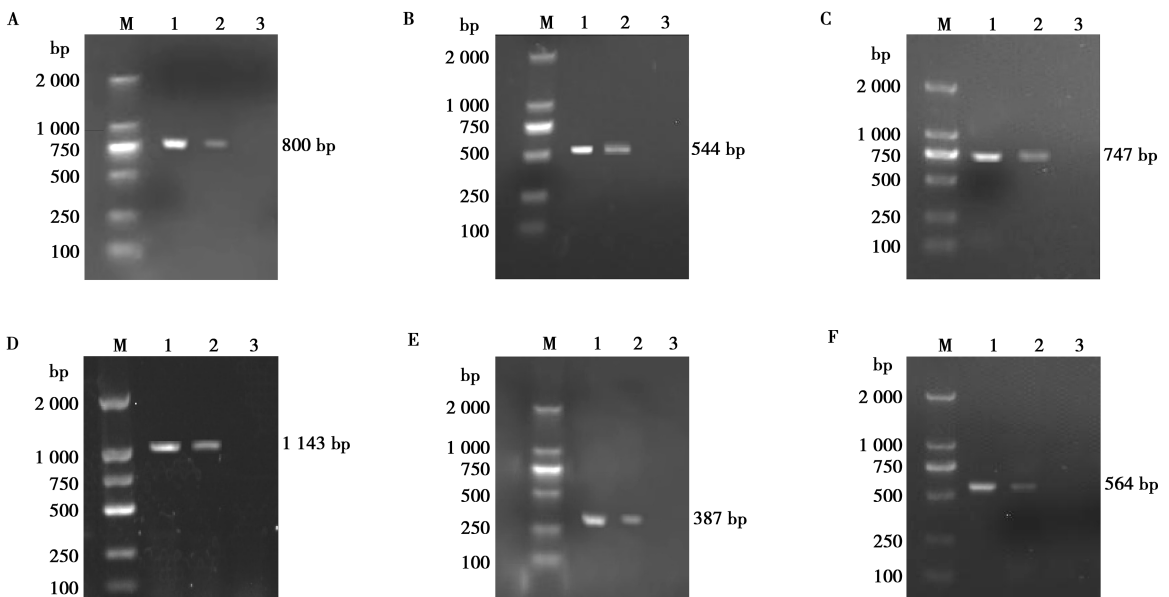
通过 ESBLs 表型试验，发现宠物犬、猫分离出

的 282 株大肠杆菌中，共有 56 株大肠杆菌表型为产 ESBLs 大肠杆菌，其中健康犬源 6 株、肠道疾病犬源 27 株、非肠道疾病犬源 5 株；健康猫源 2 株、肠道疾病猫源 12 株、非肠道疾病猫源 4 株。对表型确定为 ESBLs 大肠杆菌进行基因型检测，结果如表 8 和图 4 所示。在表型为产 ESBLs 大肠杆菌中，*bla*_{CTX-M} 耐药基因检出率最高为 28.57%；其次为 *bla*_{TEM}，检出率为 17.86%；第三为 *bla*_{SHV}，检出率为 16.07%。对于 *bla*_{CMY-2}、*bla*_{DHA} 和 *bla*_{OXA} 耐药基因，分别在肠道疾病猫、非肠道疾病猫和肠道疾病犬源大肠杆菌中各检出 1 株；携带 *bla*_{TEM}+*bla*_{CTX-M} 耐药基因菌株共有 3 株，分别在健康犬、肠道疾病犬和肠道疾病猫中各检出 1 株。

表 8 携带 ESBLs 基因分离菌株的检出率

%

样品来源	ESBLs 基因分离菌株						
	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CMY-2}	<i>bla</i> _{DHA}	<i>bla</i> _{OXA}	<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{CTX-M}
健康犬 (n=6)	16.67	33.33	16.67	0	0	0	16.67
肠道疾病犬 (n=27)	7.41	25.93	25.93	0	0	3.70	3.70
非肠道疾病犬 (n=5)	40.00	20.00	0	0	0	0	0
犬携带率 (n=38)	13.16	26.32	21.05	0	0	2.63	5.26
健康猫 (n=2)	50.00	50.00	0	0	0	0	0
肠道疾病猫 (n=12)	33.33	25.00	0	8.33	0	0	8.33
非肠道疾病猫 (n=4)	0	50.00	25.00	0	25.00	0	0
猫携带率 (n=18)	27.78	33.33	5.56	5.56	5.56	0	5.56
总携带率 (n=56)	17.86	28.57	16.07	1.79	1.79	1.79	5.36



M. DL2000 Marker; 1. 阳性对照; 2. 大肠杆菌分离菌株; 3. 阴性对照。

图 4 *bla*_{TEM} (A)、*bla*_{CTX-M} (B)、*bla*_{SHV} (C)、*bla*_{CMY-2} (D)、*bla*_{DHA} (E)、*bla*_{OXA} (F) 基因扩增情况

2.4 PMQR 基因型检测

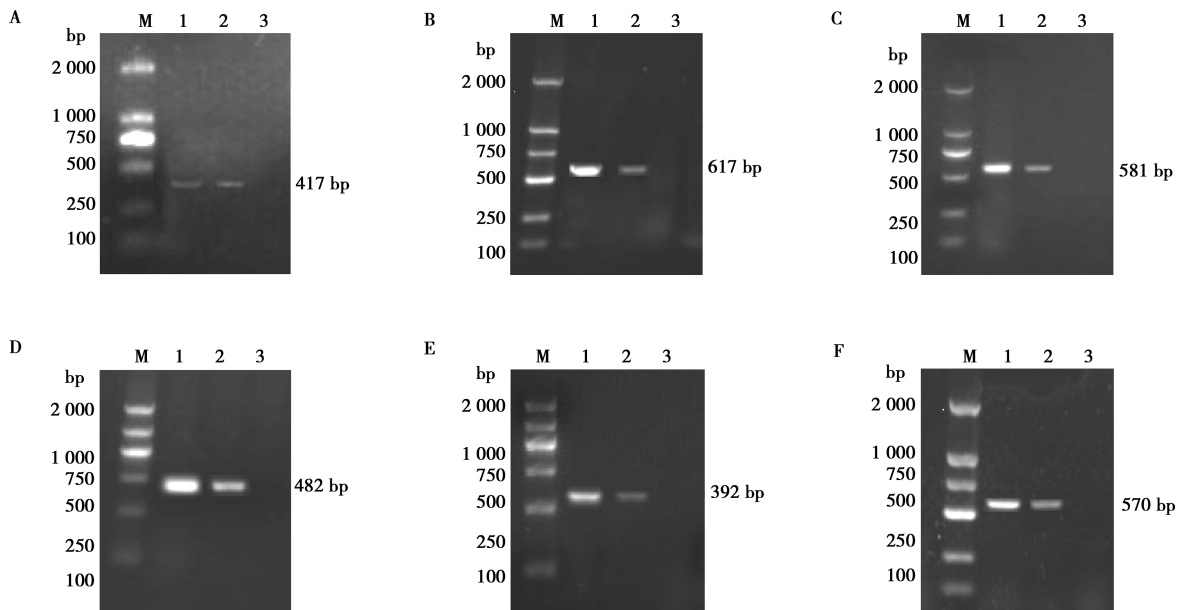
通过 PMQR 基因检测, 发现共有 74 株大肠杆菌携带 PMQR 耐药基因。宠物犬源携带 PMQR 基因的大肠杆菌共有 52 株, 其中健康犬源 12 株、肠道疾病犬源 31 株、非肠道疾病犬源 9 株; 宠物猫源携带 PMQR 大肠杆菌 22 株, 其中健康猫源 6 株、肠道疾病猫源 11 株、非肠道疾病猫源 5 株。结果如表 9 和图 5 所示, 在携带 PMQR 耐药基因的菌株中, *qnrS*

耐药基因携带菌株做多, 检出率为 44.59% (33/74); 其次为 *aac(6')-Ib-cr*, 检出率为 18.92% (14/74); *qnrB*、*qnrD*、*oqxAB* 和 *qepA* 耐药基因检出率分别为 8.11% (6/74)、10.81% (8/74)、5.41% (4/74) 和 12.16% (9/74)。从肠道疾病犬源、非肠道疾病犬源和肠道疾病猫源大肠杆菌中共检测 3 株携带 *qnrS+aac(6')-Ib-cr* 耐药基因的大肠杆菌。

表 9 携带 PMQR 基因分离菌株的检出率

%

样品来源	PMQR 基因分离菌株						
	<i>qnrS</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrD</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>oqxAB</i>	<i>qepA</i>	<i>qnrS+aac(6')-Ib-cr</i>
健康犬 (n=12)	41.67	0	16.67	25.00	0	16.67	0
肠道疾病犬 (n=31)	58.06	9.68	6.45	9.68	9.68	6.45	3.23
非肠道疾病犬 (n=9)	22.22	11.11	11.11	33.33	0	22.22	11.11
犬携带率 (n=52)	48.08	7.69	9.62	17.31	5.77	11.54	3.85
健康猫 (n=6)	50.00	0	0	33.33	16.67	0	0
肠道疾病猫 (n=11)	27.27	18.18	18.18	18.18	0	18.18	9.09
非肠道疾病猫 (n=5)	40.00	0	20.00	20.00	0	20.00	0
猫携带率 (n=22)	36.36	9.09	13.64	22.73	4.55	13.64	0
总携带率 (n=74)	44.59	8.11	10.81	18.92	5.41	12.16	4.05



M. DL2000 Marker; 1. 阳性对照; 2. 大肠杆菌分离菌株; 3. 阴性对照。

图 5 *qnrS* (A)、*qnrB* (B)、*qnrD* (C)、*aac(6')-Ib-cr* (D)、*oqxAB* (E)、*qepA* (F) 基因扩增情况

2.5 ESBLs 和 PMQR 共有耐药基因型检测

ESBLs 和 PMQR 共有耐药基因检测结果如表 10 所示, ESBLs 基因和 PMQR 基因共检测到 8 种组合形

式, 其中 *bla_{TEM}+qnrS* 的组合检出最多, 共检出 3 株大肠杆菌, 其次是 *bla_{CTX-M}+qnrS*, 共检测到 2 株大肠杆菌, 其余组合形式均检测到 1 株大肠杆菌。

表 10 共有耐药基因检测结果

共同耐药基因	菌株数
<i>bla</i> _{TEM} + <i>qnrS</i>	3
<i>bla</i> _{CTX-M} + <i>qnrS</i>	2
<i>bla</i> _{SHV} + <i>qnrS</i>	1
<i>bla</i> _{TEM} + <i>aac</i> (6') - <i>Ib-cr</i>	1
<i>bla</i> _{SHV} + <i>aac</i> (6') - <i>Ib-cr</i>	1
<i>bla</i> _{TEM} + <i>qepA</i>	1
<i>bla</i> _{CTX-M}	1
<i>bla</i> _{TEM} + <i>bla</i> _{CTX-M} + <i>aac</i> (6') - <i>Ib-cr</i>	1

3 讨论

细菌耐药性问题目前是全球主要关注的问题之一，世界卫生组织将其列为 2019 年全球十大公共卫生威胁之一^[15]。近些年，多重耐药细菌的流行率逐渐增加，对于细菌感染治疗难度逐渐增大^[16]。宠物因与人类、环境密切接触，宠物源细菌耐药性问题正在受到国内外研究人员的广泛关注^[17]。周一帆^[18]对东北地区犬、猫源大肠杆菌耐药性进行探究，发现 84.51% 的受试菌株具有耐药性，68.75% 的受试菌株为多重耐药菌株，41.03% 的菌株为产 ESBLs 菌株。韩婧娥等^[19]对上海地区宠物犬源沙门菌的耐药情况进行调查，发现分离的沙门菌株对阿莫西林-克拉维酸完全耐药，对头孢氨苄耐药率高达 83.30%。Pahlavanzadeh 等^[20]对 20 株宠物源分离的金黄色葡萄球菌进行药物敏感性试验，发现菌株 β -内酰胺类药物的耐药率高达 78.50%。Yaovi 等^[21]对非洲地区犬源细菌耐药性情况进行 meta 分析，发现犬源大肠杆菌的多重耐药性最为严重，多重耐药率高达 98%，且对 β -内酰胺类药物、喹诺酮类药物、氨基糖苷类和四环素类药物高度耐药。本研究，多重耐药大肠杆菌的检出率为 50.48%，略高于佟盼盼等^[22]在乌鲁木齐市宠物源大肠杆菌中测定的 48.30%，低于郑荣嘉等^[23]在郑州地区测定的 59.00%。本研究，多重耐药菌株的模式多集中于三重耐药至五重耐药，并且大多数菌株同时对 β -内酰胺类药物、喹诺酮类药物和链霉素耐药，这可能是本地宠物医院多年来的用药习惯造成的。

产 ESBLs 菌株可有效破坏 β -内酰胺类药物的结构，从而使细菌产生耐药性^[24]。宠物源携带的产 ESBLs 菌株可能会传播给人类，对公共卫生安全造成威胁^[25]。ESBLs 耐药基因 *bla*_{CTX-M}、*bla*_{TEM}、*bla*_{CMY} 和 *bla*_{SHV} 等为主要流行基因^[26]。在中国，耐药基因 *bla*_{CTX-M} 检出率高，为主要 ESBLs 耐药基因^[27]。本研

究，表型为产 ESBLs 菌株共有 56 株。在表型为产 ESBLs 菌株中，耐药基因 *bla*_{CTX-M} 的检出率最高为 28.57%，低于 Chen 等^[28]在北京地区宠物源大肠杆菌中测定的 34.65%，高于易梦颖等^[29]在广州地区宠物源大肠杆菌中测定的 22.66%。耐药基因 *bla*_{TEM} 检出率为 17.86%，低于佟盼盼等^[22]在乌鲁木齐地区宠物源大肠杆菌中测定的 34.30%，低于在邓翔文等^[30]在福州地区宠物犬源大肠杆菌中测定的 24.00%。本研究，耐药基因 *bla*_{CMY-2}、*bla*_{DHA} 和 *bla*_{OXA} 检出率低，可能因为这 3 种基因非营口地区流行 ESBLs 耐药基因。

喹诺酮类药物在兽医临床上应用多年，常用的喹诺酮类药物包括恩诺沙星、环丙沙星和左氧氟沙星等。多年的不合理应用造成喹诺酮类药物耐药性较为严重。喹诺酮类耐药机制包括多种，其中质粒介导的喹诺酮耐药检出较多^[31]。质粒介导的喹诺酮类药物机制包括 Qnr 家族蛋白、氨基糖苷类乙酰转移酶 *Aac* (6') -*Ib-cr* 以及外排泵 *Qep* 和 *OqxAB*^[32]。本研究对营口地区宠物源大肠杆菌进行 PMQR 基因检测，发现 *qnrS* 检出率最高为 44.59%，高于孟楠等^[12]在扬州地区犬源大肠杆菌中测定的 25.00%，高于宋超慧等^[6]在乌鲁木齐地区宠物猫源大肠杆菌中测定的 34.00%。*qnrS* 基因可保护细菌 DNA 免受喹诺酮类药物的破坏^[33]。本研究中，耐药基因 *aac* (6') -*Ib-cr* 检出率为 18.92%，低于赵勇等^[34]在昆明地区宠物源大肠杆菌中测定的 26.67%。*aac* (6') -*Ib-cr* 能够编码两种不同氨基糖苷 6'-N-乙酰转移酶，可使喹诺酮类药物乙酰化，从而使药物失去抗菌活性^[35]。

4 结论

营口地区宠物源大肠杆菌耐药情况较为严重，存在大量的多重耐药和携带耐药基因的菌株。面对如此严峻的情况，应更加重视抗生素的合理使用，并且加强对宠物源细菌的耐药性监测，遏制耐药性愈发严重的趋势。

参考文献：

- [1] TENG L, FENG M, LIAO S, et al. A cross-sectional study of companion animal-derived multidrug-resistant *Escherichia coli* in Hangzhou, China [J]. *Microbiol Spectr*, 2023, 11 (2): e0211322-e0211335.
- [2] 郭晶晶, 侯思梦, 刘连杰, 等. 猪源大肠埃希菌中质粒介导喹诺酮耐药 (PMQR) 基因的多样性研究 [J]. *西北农业学报*, 2021, 30 (11): 1611-1617.
- [3] NAEEM U, THADCHAPORN A, YUKIHIRO A, et al. Detection of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates by isothermal amplification and association of their virulence

- genes and phylogroups with extraintestinal infection [J]. *Sci Rep*, 2023, 13 (1): 12022–12036.
- [4] 刘学莉. 成都市部分宠物诊疗场所、宠物市场环境中大肠埃希菌及肠球菌的耐药性分析 [D]. 成都: 西南民族大学, 2022.
- [5] 陈亮, 刘雪松, 沈思思, 等. 齐齐哈尔地区致仔猪腹泻产肠毒素大肠杆菌毒力及耐药基因的检测 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2023, 6 (1): 76–83.
- [6] 宋超慧, 胡燕, 吴慧敏, 等. 乌鲁木齐市宠物猫源大肠杆菌耐药性及耐药基因检测 [J]. *畜牧与兽医*, 2022, 54 (1): 43–48.
- [7] 纪亚楠. 牛源性大肠杆菌耐药基因流行病学调查及耐药突变选择窗的应用 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2017.
- [8] 曾莉. 不同来源大肠杆菌 ESBLs 基因分子流行病学研究 [D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
- [9] 矫薇薇. 猪源致病大肠杆菌耐药性及质粒介导 ESBLs 耐药基因检测 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2015.
- [10] 王宏栋. 黑龙江地区猪源致病性大肠杆菌耐药性分析及 PMQR 基因检测 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2016.
- [11] CAVACO L M, HASMAN H, XIA S, et al. *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar kentucky and bovismorbificans strains of human origin [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53 (2): 603–608.
- [12] 孟楠, 洪佳欣, 戴宇琪, 等. 扬州市流浪犬肺炎克雷伯菌和大肠埃希菌耐药性分析及 PMQR 基因检测 [J]. *扬州大学学报*, 2023, 44 (1): 68–74.
- [13] 底丽娜. 新疆不同动物源大肠杆菌耐药性调查及其相关耐药基因检测 [D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2015.
- [14] MARCO-FUERTES A, MARIN C. Antimicrobial resistance in companion animals: a new challenge for the one health approach in the european union [J]. *Vet Sci*, 2022, 9 (5): 208–219.
- [15] FROST I, KAPOOR G, CRAIG J, et al. Status, challenges and gaps in antimicrobial resistance surveillance around the world [J]. *J Glob Antimicrob Resist*, 2021, 25 (1): 222–226.
- [16] 唐欣悦, 周煜博, 张玉珠, 等. 伴侣动物源细菌质粒介导的黏菌素耐药机制研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2023, 44 (1): 117–121.
- [17] SILVA J M D, MENEZES J, MARQUES C, et al. Companion animals—an overlooked and misdiagnosed reservoir of carbapenem resistance [J]. *Antibiotics*, 2022, 11 (4): 533–542.
- [18] 周一帆. 东北地区犬猫大肠埃希菌耐药性与毒力研究 [D]. 长春: 东北师范大学, 2023.
- [19] 韩婧娥, 李晓, 赵文鹏, 等. 上海地区宠物犬源沙门菌的分离鉴定和耐药性分析 [J]. *中国兽医杂志*, 2022, 58 (11): 54–58.
- [20] PAHLAVANZADEH S, KHOSHBAKHT R, KABOOSI H, et al. Antibiotic resistance and phylogenetic comparison of human, pet animals and raw milk *Staphylococcus aureus* isolates [J]. *Compa Immunol Microbiol Infect Dis*, 2021, 79 (1): 101717–101729.
- [21] YAOVI A B, SESSOU P, TONOUHEWA A B N, et al. Prevalence of antibiotic-resistant bacteria amongst dogs in Africa: a meta-analysis review [J]. *Onderstepoort J Vet Res*, 2022, 89 (1): e1–e12.
- [22] 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.
- [23] 韩荣嘉, 陈上将, 范钟琇, 等. 郑州地区宠物犬体内常见细菌的分离鉴定及药敏试验 [J]. *家畜生态学报*, 2023, 44 (6): 65–70.
- [24] 王浩然, 赵建梅, 刘娜, 等. 我国 5 省区部分猪、鸡源产 ESBLs 沙门菌的耐药差异及 MLST 流行特征 [J]. *中国兽医学报*, 2023, 43 (12): 2525–2533.
- [25] CARVALHO I, ALONSO C A, SILVA V, et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from healthy and sick gogs in portugal [J]. *Microbial Drug Resist*, 2020, 26 (6): 709–715.
- [26] CASTANHEIRA M, SIMNER P J, BRADFORD P A. Extended-spectrum β -lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection [J]. *JAC Antimicrob Resist*, 2021, 3 (3): 92–108.
- [27] 吴雨珊, 孙冰清, 姜芹, 等. 城市宠物源细菌耐药性研究进展 [J]. *中国动物传染病学报*, 2024 (3): 227–236.
- [28] CHEN Y, LIU Z, ZHANG Y, et al. Increasing prevalence of esbl-producing multidrug resistance *Escherichia coli* from diseased Pets in beijing, China from 2012 to 2017 [J]. *Front Mbiol*, 2019, 10 (1): 2852–2867.
- [29] 易梦颖, 王晶, 卢沛兰, 等. 宠物源大肠埃希菌耐药性及耐药基因调查 [J]. *华南农业大学学报*, 2019, 40 (6): 15–21.
- [30] 邓翔文, 郑婷婷, 陈璐, 等. 福州地区宠物犬源大肠杆菌耐药性及耐药基因调查 [J]. *福建农林大学学报*, 2022, 51 (6): 815–821.
- [31] YASSINE I, RAFEI R, OSMAN M, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance: mechanisms, detection, and epidemiology in the arab countries [J]. *Infect Genet Evol*, 2019, 76 (1): 104020–104035.
- [32] VIEIRA D C, LIMA W G, PAIVA M C D. Plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) among enterobacteriales in latin america: a systematic review [J]. *Mol Biol Rep*, 2020, 47 (2): 1471–1483.
- [33] ZHAO Y, CAO Z Z, CUI L Q, et al. Enrofloxacin promotes plasmid-mediated conjugation transfer of fluoroquinolone-resistance gene *qnrS* [J]. *Front Microbiol*, 2022, 12 (1): 773664–773681.
- [34] 赵勇, 杨丁龙, 高感, 等. 宠物源性大肠杆菌分离鉴定和耐药性分析 [J]. *山东农业大学学报*, 2023, 54 (4): 530–538.
- [35] 刘艳艳. 携带 *aac* (6')-Ib-cr 及 *aac* (6')-Ib-cr+bla_{CTX-M-27} 基因菌株的适应性研究 [D]. 广州: 华南农业大学, 2020.