

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.
YI Mengying, WANG Jing, LU Peilan, et al. Antimicrobial resistance and resistance genes of *Escherichia coli* from pets[J]. Journal of South China Agricultural University, 2019, 40(6): 15-21.

宠物源大肠埃希菌耐药性及耐药基因调查

易梦颖^{1†}, 王晶^{2†}, 卢沛兰¹, 黄馨仪¹, 夏应碧¹, 黄佳为¹,
严杰聪¹, 庄子琳¹, 刘健华¹

(1 华南农业大学 兽医学院/国家兽医微生物耐药性风险评估实验室, 广东 广州 510642;

2 农业部农产品质量安全生物性危害因子(动物源)控制重点实验室, 江苏 扬州 225009)

摘要:【目的】了解广州市宠物源大肠埃希菌 *Escherichia coli* 耐药性和耐药基因携带情况。【方法】2016 年 7 月至 2017 年 7 月从广州市 4 家宠物医院采集健康或患病犬猫样品共 319 份, 其中, 健康动物 127 份, 患病动物 192 份。采用选择性培养基分离大肠埃希菌, 利用基质辅助激光解析串联飞行时间质谱仪(MALDI-TOF MS)鉴定菌种; 采用琼脂稀释法测定大肠埃希菌对 11 种抗菌药物的敏感性, 利用 PCR 和测序检测耐药基因的携带情况。【结果】319 份样品共分离得到大肠埃希菌 203 株, 其中, 患病动物源 109 株, 健康动物源 94 株。203 株大肠埃希菌中有 179 株至少对 1 种抗生素耐药; 对氨苄西林耐药率最高 (76.85%), 对头孢噻肟、四环素、多西环素和磺胺甲噁唑-甲氧苄啶耐药率均高于 50%; 对阿米卡星最为敏感, 耐药率仅为 10.84%。患病动物源大肠埃希菌对 11 种抗菌药物的耐药率均高于健康动物源, 除阿米卡星、氟苯尼考和磷霉素外, 对其他药物的耐药性均差异极显著 ($P < 0.01$)。耐药基因检测结果显示, *floR* 检出率最高 (检出率为 34.97%), *bla*_{CTX-M-9G}、*bla*_{CTX-M-1G}、*fosA3*、*rmtB* 和 *bla*_{CMY-2} 检出率分别为 22.66%、20.19%、17.73%、10.34% 和 1.48%, 未检测到 *bla*_{CTX-M-2G} 和 *bla*_{CTX-M-25G}。【结论】广州地区宠物源大肠埃希菌耐药状况严峻, 且常携带多种重要耐药基因。应当加强对宠物源细菌耐药性的监测。

关键词: 宠物; 大肠埃希菌; 耐药性; 耐药基因; 抗生素

中图分类号: S852.61

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2019)06-0015-07

Antimicrobial resistance and resistance genes of *Escherichia coli* from pets

YI Mengying^{1†}, WANG Jing^{2†}, LU Peilan¹, HUANG Xinyi¹, XIA Yingbi¹, HUANG Jiawei¹,
YAN Jiecong¹, ZHUANG Zilin¹, LIU Jianhua¹

(1 College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University/Key Laboratory of Zoonosis of Ministry of Agricultural and Rural Affairs, Guangzhou 510642, China; 2 Key Laboratory of Prevention and Control of Biological Hazard Factors (Animal Origin) for Agri-food Safety and Quality, Ministry of Agriculture, Yangzhou 225009, China)

Abstract: 【Objective】To investigate antimicrobial resistance and resistance genes of *Escherichia coli* from pet animals in Guangzhou. 【Method】From July 2016 to July 2017, 319 samples were collected from cats and dogs at four animal hospitals in Guangzhou, including 127 samples from healthy animals and 192 samples from diseased animals. *E. coli* strains were isolated using the selective media, and were identified by MALDI-TOF mass spectrometry. The susceptibilities of *E. coli* isolates to 11 antimicrobial agents were determined by the agar

收稿日期: 2019-02-03 网络首发时间: 2019-10-28 09:20:30

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20191025.0844.018.html>

作者简介: 易梦颖 (1994—), 女, 硕士研究生, E-mail: 17722940525@163.com; 王晶 (1988—), 女, 讲师, 博士, E-mail: wj1231@yzu.edu.cn; †对本文贡献相同; 通信作者: 刘健华 (1973—), 女, 教授, 博士, E-mail: jhliu@scau.edu.cn

基金项目: 国家杰出青年科学基金 (31625026); 华南农业大学大学生创新创业训练计划项目 (201810564300)

dilution method. The presence of resistance genes was determined by PCR and sequencing. 【Result】 A total of 203 *E. coli* strains were isolated from 319 samples, including 109 *E. coli* isolates from diseased animals and 94 *E. coli* isolates from healthy animals. Among the 203 strains, 179 strains were resistant to at least one antimicrobial agent. The isolates showed the highest resistance rate against ampicillin (76.85%). The resistance rates against cefotaxime, tetracycline, doxycycline and sulfamethoxazole-trimethoprim were above 50%. The isolates were the most susceptible to amikacin with the resistance rate of only 10.84%. The isolates from diseased animals showed higher resistance rates against all antimicrobial agents compared with those from healthy animals. The resistance rates against all antimicrobial agents except amikacin, florfenicol and fosfomycin were significantly higher in the isolates from diseased animals compared with healthy animals ($P < 0.01$). The detection results of resistance genes showed that *floR* had the highest detection rate (34.97%), the detection rates of *bla*_{CTX-M-9G}, *bla*_{CTX-M-1G}, *fosA3*, *rmtB* and *bla*_{CMY-2} genes were 22.66%, 20.19%, 17.73%, 10.34% and 1.48% respectively. The genes *bla*_{CTX-M-2G} and *bla*_{CTX-M-25G} were not detected. 【Conclusion】 The antimicrobial resistance of *E. coli* isolates from pet animals in Guangzhou has become a serious problem, and some isolates carry several important resistance genes. Antimicrobial resistance in pet animals requires strict monitoring.

Key words: pet; *Escherichia coli*; antimicrobial resistance; resistance gene; antibiotic

抗生素耐药问题已经成为全球威胁人类和动物健康的重大问题之一,人医和兽医临床对抗菌药的长期过多使用或不合理使用加速了细菌耐药性的出现和传播。大肠埃希菌 *Escherichia coli* 是革兰阴性兼性厌氧菌,是人和动物肠道内的共生菌,同时也是最常见的环境机会致病菌之一^[1]。大肠埃希菌对抗生素压力较敏感,易产生耐药性,同时还可通过细菌之间的菌毛接触使耐药基因在菌株菌种间传播。由于抗菌药长期的不合理使用,我国大肠埃希菌的耐药问题十分严峻。据 2017 年 CHINET 中国细菌耐药性监测调查结果显示,国内主要地区临床分离大肠埃希菌对头孢噻肟、环丙沙星、左氧氟沙星、庆大霉素、哌拉西林和磺胺甲噁唑-甲氧苄啶的耐药率接近或高于 50%^[2]。国内食品动物源分离的大肠埃希菌对氨基糖苷类、四环素类等抗菌药耐药率高于 75%,对氨基糖苷类和氟喹诺酮类抗菌药耐药率高于 50%^[3],但对头孢菌素耐药率较低,低于 35%^[1,3]。大肠埃希菌对头孢菌素、氟喹诺酮类等重要药物的耐药基因常位于质粒上,易于传播扩散,促进了大肠埃希菌耐药性的发展,引起了全球关注。

宠物作为人类的伴侣动物,共同的生存环境和长期的直接接触使宠物源细菌成为耐药基因在人类和环境间传播的重要媒介。已有研究证明,宠物和人类之间的频繁或亲密接触会增加耐药细菌向人类传播的可能性^[4],携带耐药基因的大肠埃希菌能在宠物体内定植,并且在宠物与人之间传播^[5]。目前,国内外对畜牧养殖及动物源性食品、人医临

床和环境中大肠埃希菌耐药性以及耐药基因的研究较多,而关于宠物源大肠埃希菌耐药性的研究较少^[6]。因此,本研究旨在调查健康和患病宠物分离的大肠埃希菌耐药状况和重要耐药基因的流行情况,为伴侣动物临床用药和公共卫生安全发展提供参考。

1 材料与方法

1.1 样品来源

2016 年 7 月至 2017 年 7 月从广州市 4 家宠物医院采集健康动物和患病动物样品共 319 份,包括粪便 251 份、鼻液 25 份、尿液 23 份、皮肤 6 份、耳分泌物 6 份、唾液 4 份、眼分泌物 2 份、血液 1 份和脓肿渗出物 1 份。其中健康动物 127 份,患病动物 192 份。质控菌株大肠埃希菌 ATCC25922 由华南农业大学广东省兽药研制与安全评价重点实验室保存。

1.2 药物

氨苄西林 (Ampicillin, AMP)、头孢噻肟 (Cefotaxime, CTX)、头孢他啶 (Ceftazidime, CAZ)、庆大霉素 (Gentamicins, GEN)、阿米卡星 (Amikacin, AMI)、盐酸四环素 (Tetracycline, TET)、多西环素 (Doxycycline, DOX)、氟苯尼考 (Florfenicol, FFC)、环丙沙星 (Ciprofloxacin, CIP)、磷霉素 (Fosfomycin, FOS) 和磺胺甲噁唑-甲氧苄啶 (Sulfadimidine-Trimethoprim, SMZ-TMP) 均购自大连美仑生物技术有限公司。

1.3 培养基及试剂

麦康凯琼脂、伊红美蓝琼脂、LB 肉汤、LB 琼脂购自青岛海博生物技术试剂有限公司;水解酪蛋白

琼脂、水解酪蛋白肉汤购自广州环凯微生物有限公司; *rTaq* DNA 聚合酶、dNTP Mixture、DL2000 DNA Marker 均购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.4 细菌分离鉴定

将样品接种于 LB 肉汤, 37 °C 震荡培养过夜; 蘸取菌液划线接种于麦康凯琼脂板上, 37 °C 静置培养 16~18 h; 挑取麦康凯板上红色、不透明、中等大小的可疑单菌落划线接种于伊红美蓝琼脂板上, 37 °C 静置培养 16~18 h; 挑取黑绿色带有金属光泽、中等大小的可疑单菌落均匀涂布于 LB 琼脂板上, 进行培养和鉴定。

利用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪(Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS) 进行菌种鉴定。用接种环在 LB 琼脂板上取适量菌苔加入 300 μ L 去离子水中, 混匀后加入 900 μ L 无水乙醇, 混匀后 10 000 r/min 离心 2 min, 倒去上清液, 晾干后加 50 μ L 体积分数为 70% 的甲酸溶液混匀, 加入 50 μ L 乙腈, 混匀后 10 000 r/min 离心 2 min, 取 1 μ L 上清液均匀点样到靶板上, 室温干燥后将 1 μ L 基质液涂敷于点上, 室温干燥。最后, 取 1 μ L 标准品滴加到 MALDI 靶板, 室温晾干后将 1 μ L 基质液涂敷于样品点上, 室温干燥, 将金属靶板上机检测。

1.5 药物敏感性试验

参照美国临床实验室标准化委员会(Clinical

and Laboratory Standards Institute, CLSI) 推荐的操作方法, 用琼脂稀释法测定大肠埃希菌对 β -内酰胺类、氨基糖苷类、四环素类、氯霉素类、磷霉素类、磺胺类和喹诺酮类等 7 类共 11 种抗菌药物的最小抑菌浓度(Minimum inhibitory concentration, MIC), 以大肠埃希菌 ATCC 25922 为质控菌株, 依据 CLSI 的标准^[1]判断大肠埃希菌对 11 种抗生素的耐药性, 分为耐药、中介和敏感。利用 Excel 整理数据, 运用卡方检验进行耐药率差异显著性比较分析。

1.6 DNA 模板提取

将-80 °C 保存的大肠埃希菌划线于麦康凯琼脂板上, 37 °C 培养 16~18 h, 挑取单菌落均匀涂布于 LB 琼脂板上, 37 °C 培养 16~18 h, 取适量菌苔重新悬浮于 500 μ L 1 \times TE 中, 100 °C 加热 15 min, 冰浴 10 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 上清液为制备好的 DNA 模板, 将其放于 4 °C 保存备用。

1.7 耐药基因的检测

利用 PCR 和测序技术对大肠埃希菌进行耐药基因的检测, 包括 *bla*_{CTX-M-1G}、*bla*_{CTX-M-2G}、*bla*_{CTX-M-9G}、*bla*_{CTX-M-25G}、*bla*_{CMY-2}、*rmtB*、*fosA3* 和 *floR*, 引物序列和扩增片段长度见表 1, 引物由华大基因有限公司合成。设置 25 μ L 的反应体系, 包括模板 DNA 1 μ L、上下游引物各 0.5 μ L、10 \times *rTaq* Buffer 2.5 μ L、dNTP Mixture 2 μ L、*rTaq* 0.125 μ L、灭菌双蒸水 18.375 μ L, 对目的基因进行扩增, 同时设置阳性和

表 1 检测耐药基因的引物序列

Table 1 Sequences of primers used to screen resistance genes

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequence	片段大小/bp Segment size	参考文献 Reference
<i>bla</i> _{CTX-M-1G}	F:CTTCCAGAATAAGGAATCCC R:CGTCTAAGGCGATAAACAAA	949	[7]
<i>bla</i> _{CTX-M-2G}	F:ATGATGACTCAGAGCATTTCG R:TCAGAAACCGTGGGTTACGA	857	[8]
<i>bla</i> _{CTX-M-9G}	F:TGACCGTATTGGGAGTTTG R:ATGATGACTCAGAGCATTTCG	902	[7]
<i>bla</i> _{CTX-M-25G}	F:AATGTTCAGGGGATTAGGA R:ATCACTCCACATGGTGAGTA	876	[7]
<i>bla</i> _{CMY-2}	F:TGGCCGTTGCCGTTATCTAC R:CCCGTTTTATGCACCCATGA	870	[9]
<i>fosA3</i>	F:GCGTCAAGCCTGGCATT R:GCCGTCAGGGTCGAGAAA	282	[10]
<i>floR</i>	F:CTGAGGGTGTCGTCATCTAC R:GTCCCACAATGCTGACTAT	673	[9]
<i>rmtB</i>	F:ATATCAACGATGCCCTCAC R:AAGTTCTGTTCCGATGGTC	725	[11]

阴性对照。PCR 产物由上海生工生物工程有限公司进行测序分析。

2 结果与分析

2.1 菌株分离鉴定结果分析

根据 MALDI-TOF MS 的检测结果确定从广州市宠物医院 319 份样品中分离到大肠埃希菌 203 株, 分离率为 63.64%, 从粪便、尿液、耳分泌物和皮肤中分别分离出 178 株 (分离率为 70.91%)、12 株 (分离率为 48.00%)、8 株 (分离率为 34.78%)、3 株 (分离率 50.00%) 和 2 株 (分离率

33.33%)。其中健康动物样品中分离出 94 株, 分离率为 74.02%; 患病动物 109 株, 分离率为 56.77%。

2.2 药物敏感性结果分析

大肠埃希菌对各种抗菌药的耐药率如表 2 所示, 其中对氨苄西林的耐药率最高, 达到 76.85%; 其次是头孢噻肟、四环素、多西环素和磺胺甲噁唑-甲氧苄啶, 耐药率均高于 50%; 耐药率最低的为阿米卡星, 仅为 10.84%。患病动物源大肠埃希菌对全部受测药物的耐药率均高于健康动物, 除阿米卡星、氟苯尼考和磷霉素外, 其他药物均差异极显著 ($P < 0.01$)。

表 2 203 株大肠埃希菌耐药率
Table 2 Antimicrobial resistance rates of 203 *Escherichia coli* isolates

药物 Drug	健康动物源($n=94$) Strains from healthy animals	患病动物源 ¹⁾ ($n=109$) Strains from sick animals	全部菌株($n=203$) Total strains	%
氨苄西林 AMP	65.96	86.24**	76.85	
头孢噻肟 CTX	42.55	67.89**	56.16	
头孢他啶 CAZ	12.77	31.19**	22.66	
庆大霉素 GEN	28.72	46.79**	38.42	
阿米卡星 AMI	7.45	13.76	10.84	
四环素 TET	48.94	82.57**	67.00	
多西环素 DOX	36.17	66.06**	52.22	
氟苯尼考 FFC	35.11	44.95	40.39	
环丙沙星 CIP	29.79	59.63**	45.81	
磷霉素 FOS	32.98	34.86	33.99	
磺胺甲噁唑-甲氧苄啶 SMZ-TMP	38.30	74.31**	57.64	

1) “**” 表示与健康动物源大肠埃希菌的耐药性差异极显著 ($P < 0.01$, 卡方检验)

1) “**” indicates significant difference from drug resistance rate of *Escherichia coli* of healthy animals ($P < 0.01$, chi-square test)

203 株大肠埃希菌中有 179 株菌 (88.18%) 至少对 1 种抗生素耐药, 1~2 耐为 29 株 (14.29%), 3~5 耐为 52 株 (25.62%), 6~8 耐为 64 株 (31.53%), 9~10 耐为 29 株 (14.29%), 有 5 株 (2.46%) 菌对 11 种药物均耐药。所有耐药菌中, 耐 3 种和 6 种药物的菌株最多, 均有 25 株 (12.32%), 其次是耐 8 种药的菌株, 共有 23 株 (11.33%)。24 株大肠埃希菌对 11 种药物均敏感, 其中健康动物源 19 株, 患病动物源 5 株。健康动物源大肠埃希菌中耐药菌株占 79.79%, 耐 1 种药物的菌株最多, 占 12.77%, 耐 9 种及以上药物的菌株占 13.82%; 患病动物源大肠埃希菌中耐药菌株占 95.41%, 耐 6 种药物的菌株最多, 占 18.35%, 耐 9 种及以上药物的菌株占 19.27% (表 3), 表明患病动物源大肠埃希菌多药耐药情况较健康动物源菌更为严重。

2.3 耐药基因检测结果分析

耐药基因的检测结果显示如表 4 所示, 其中 bla_{CTX-M} 检出率最高, 共有 78 株菌携带 bla_{CTX-M} , 主要为 $bla_{CTX-M-1G}$ 群和 $bla_{CTX-M-9G}$ 群, 分别检出 41 株和 46 株, $bla_{CTX-M-1G}$ 包括 $bla_{CTX-M-55}$ ($n=23$)、 $bla_{CTX-M-15}$ ($n=10$)、 $bla_{CTX-M-64}$ ($n=7$) 和 $bla_{CTX-M-123}$ ($n=1$), $bla_{CTX-M-9G}$ 包括 $bla_{CTX-M-14}$ ($n=19$)、 $bla_{CTX-M-27}$ ($n=19$) 和 $bla_{CTX-M-65}$ ($n=8$); 健康动物源大肠埃希菌中 $bla_{CTX-M-55}$ 最为流行, 检出率为 9.57%, 患病动物源菌中 $bla_{CTX-M-55}$ 和 $bla_{CTX-M-27}$ 最为流行, 检出率均为 12.84%; 未检测到 $bla_{CTX-M-2G}$ 和 $bla_{CTX-M-25G}$ 。 $floR$ 、 $fosA3$ 、 $rmtB$ 、和 bla_{CMY-2} 分别检出 71 株、36 株、21 株和 3 株。78 株携带 bla_{CTX-M} 菌株中, 有 55 株 (70.51%) 同时携带 $floR$ 、 $fosA3$ 、 $rmtB$ 或 bla_{CMY-2} 等其他耐药基因。

表 3 大肠埃希菌多重耐药情况

Table 3 Multi-drug resistance of *Escherichia coli*

耐药数 Number of drug resistance	健康动物源(n=94)		患病动物源(n=109)		所有菌株(n=203)	
	Strains from healthy animals		Strains from sick animals		Total strains	
	菌株数 Number of strains	耐药率/% Drug resistance rate	菌株数 Number of strains	耐药率/% Drug resistance rate	菌株数 Number of strains	耐药率/% Drug resistance rate
0	19	20.21	5	4.59	24	11.82
1	12	12.77	1	0.92	13	6.40
2	11	11.70	5	4.59	16	7.88
3	8	8.51	17	15.60	25	12.32
4	10	10.64	5	4.59	15	7.39
5	5	5.32	7	6.42	12	5.91
6	5	5.32	20	18.35	25	12.32
7	7	7.45	9	8.26	16	7.88
8	4	4.26	19	17.43	23	11.33
9	9	9.57	10	9.17	19	9.36
10	3	3.19	7	6.42	10	4.93
11	1	1.06	4	3.67	5	2.46

表 4 203 株大肠埃希菌耐药基因检出率

Table 4 Detection rates of resistance genes from 203 *Escherichia coli* isolates

耐药基因 Resistance gene	健康动物源(n=94)		患病动物源(n=109)		所有菌株(n=203)	
	Strains from healthy animals		Strains from sick animals		Total strains	
	菌株数 Number of strains	检出率/% Detection rate	菌株数 Number of strains	检出率/% Detection rate	菌株数 Number of strains	检出率/% Detection rate
<i>bla</i> _{CTX-M-1G}	11	11.70	30	27.52	41	20.19
<i>bla</i> _{CTX-M-9G}	14	14.89	32	29.36	46	22.66
<i>bla</i> _{CTX-M-2G}	0	0	0	0	0	0
<i>bla</i> _{CTX-M-25G}	0	0	0	0	0	0
<i>floR</i>	26	27.66	45	41.28	71	34.97
<i>fosA3</i>	14	14.89	22	20.28	36	17.73
<i>rmtB</i>	6	6.38	15	13.76	21	10.34
<i>bla</i> _{CMY-2}	2	2.13	1	0.92	3	1.48

3 讨论与结论

大肠埃希菌是人类和动物最常见的病原体之一, 极易产生耐药性, 并且能将耐药基因在不同菌种间扩散, 宠物作为耐药基因的“储存库”, 可将耐药基因传播至人, 给人类的健康带来潜在的威胁^[12]。本研究在 2016 年 7 月至 2017 年 7 月间从广州市 4 家宠物医院的宠物源样品中分离得到 203 株大肠埃希菌。从药物敏感性试验结果来看, 203 株菌中有 179 株 (88.18%) 对 11 种抗生素有不同程度的耐药性, 对头孢噻肟、四环素、多西环素和环丙沙星的耐药率在 45%~67% 之间, 结果与何柳等^[13]

2007—2008 年从广州市健康或患病犬猫分离的宠物源大肠埃希菌耐药率相似; 对氨苄西林、磺胺甲噁唑-甲氧苄啶、庆大霉素和阿米卡星的耐药率分别为 76.85%、57.64%、38.42% 和 10.84%, 明显低于何柳等^[13] 前期报道的结果, 氟苯尼考耐药率为 40.39%, 明显高于何柳等^[13] 报道的对宠物源大肠埃希菌的耐药率 (18.80%)^[13]。与国内其他地区相比, 氨苄西林、头孢噻肟、四环素和磺胺甲噁唑-甲氧苄啶的耐药率与河南地区、青海地区和吉林地区所报道的宠物源大肠埃希菌耐药率相似, 耐药率均高于 50%^[14-17]; 庆大霉素和阿米卡星的耐药率与江苏省扬州地区宠物源大肠埃希菌相似^[18]; 氟苯尼考耐药

率低于其他地区^[14-18]。目前国外已有不少关于宠物源大肠埃希菌耐药性的研究,澳大利亚 2017 年报道的犬源大肠埃希菌对氨苄西林的耐药率不足 30%,对头孢噻肟和四环素的耐药率不足 15%,对环丙沙星的耐药率低于 10%^[6];美国报道的健康伴侣动物大肠埃希菌对氨苄西林、头孢噻肟和四环素的耐药率在 6% 左右,对氟喹诺酮类的耐药率低于 0.5%^[19],远低于国内宠物源大肠埃希菌耐药率。本研究分离的 203 株宠物源大肠埃希菌有 150 株菌(73.89%)存在多重耐药现象,健康动物源菌和患病动物源菌多重耐药率分别为 55.31% 和 89.91%,与国内其他报道相似,但比国外宠物源大肠埃希菌多重耐药情况严重,健康动物源菌耐药在 20% 以下^[5, 19-21],新加坡报道的患病动物多重耐药率为 67%^[22],远低于本研究。此外,11 种抗菌药的药敏试验结果显示患病动物源大肠埃希菌的耐药率均高于健康动物源,除阿米卡星、氟苯尼考和磷霉素外,其他药物均差异极显著 ($P < 0.01$),提示动物患病后抗菌药物的使用显著增加了细菌对抗生素的耐药性。

自 1998 年西班牙首次在宠物源中发现产超广谱 β -内酰胺水解酶 (Extended spectrum beta-lactamases, ESBLs) 大肠埃希菌以来,关于宠物源产 ESBLs 大肠埃希菌的报道越来越多,目前宠物已被公认为全球 ESBL 的重要来源之一,而且可能也是人类获得 ESBL 的来源^[23]。ESBLs 耐药基因包括 bla_{CTX-M} 、 bla_{OXA} 、 bla_{TEM} 和 bla_{SHV} 等,介导对头孢菌素耐药,其中 bla_{CTX-M} 流行最为广泛,在中国,最广泛的为 $bla_{CTX-M-1}$ 群和 $bla_{CTX-M-9}$ 群基因^[24];质粒介导的 AmpC β -内酰胺酶 (pAmpC),也能介导对 β -内酰胺类药物耐药,最流行的耐药基因为 bla_{CMY-2} ^[25],本研究对分离到的所有菌株进行 $bla_{CTX-M-1G}$ 、 $bla_{CTX-M-9G}$ 和 bla_{CMY-2} 的 PCR 检测,结果表明, bla_{CMY-2} 的检出率较低,介导头孢菌素类药物耐药的耐药基因主要为 $bla_{CTX-M-1G}$ 和 $bla_{CTX-M-9G}$,其中 $bla_{CTX-M-55}$ 和 $bla_{CTX-M-14}$ 是主要的基因型,与 bla_{CTX-M} 在国内动物源中的流行情况相符^[26]。氟苯尼考是一种广谱的动物专用的氯霉素类抗生素,质粒编码的耐药基因 $floR$ 是介导氟苯尼考耐药的主要因素之一,本研究中 $floR$ 检出率为 34.97%,低于贺志沛等^[14]报道的河南地区 $floR$ 检出率 (45.00%)。磷霉素是一种传统的广谱抗菌药,用于治疗产 ESBL 肠杆菌和氟喹诺酮类耐药肠杆菌, $fosA3$ 是流行最广泛的质粒介导的磷霉素耐药基因之一, Hou 等^[11]前期发现广东省 2006—2010 年分离的宠物源

大肠埃希菌中 $fosA3$ 检出率为 9.00%,低于本研究中的 17.73%。 $rmtB$ 编码 16S 甲基化酶,介导对阿米卡星等氨基糖苷类药物耐药,本研究中共有 21 株菌株携带 $rmtB$ 。值得注意的是,有 70.51% 携带 bla_{CTX-M} 基因的菌株还同时携带有 $floR$ 、 $fosA3$ 和 $rmtB$ 等其他耐药基因,由于多种耐药基因共同存在同一菌株中,使得一种药物的使用可以筛选出多个耐药基因。磷霉素未被批准用于宠物临床, $fosA3$ 的流行可能是头孢菌素、氨基糖苷类、氟喹诺酮类药物等其他药物在宠物临床的使用中共同筛选的结果。

从本研究可以看出,广州地区宠物源大肠埃希菌的耐药情况与国内不同地区报道的宠物源大肠埃希菌耐药率相似,但比国外宠物源大肠埃希菌耐药情况严重许多,并且患病动物耐药情况明显比健康动物严重。宠物因其与人类直接接触的时间较长,可以作为耐药基因的“宿主”将其传给人类,同时也能接受来自人类的耐药基因;宠物源细菌是耐药性传播的重要环节之一,然而国内对宠物源细菌耐药性的研究却远远少于食品动物源,所以应当加强对宠物源菌的耐药性监测,合理选择抗菌药物治疗细菌感染,减缓细菌耐药性的发展。

参考文献:

- [1] 植婵萍,郭小婷,姚旭,等. 有机农场鸡、猪源大肠杆菌耐药性研究[J]. 中国畜牧兽医, 2015, 42(12): 3351-3357.
- [2] 胡付品,郭燕,朱德妹,等. 2017 年 CHINET 中国细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2018, 18(3): 241-251.
- [3] 宋立,宁宜宝,沈建忠,等. 中国不同年代食品动物大肠杆菌耐药性调查研究[J]. 中国科学C辑(生命科学), 2009, 39(7): 692-698.
- [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] ZHANG X F, DOI Y, HUANG X, et al. Possible transmission of mcr-1-harboring *Escherichia coli* between companion animals and human[J]. *Emerg Infect Dis*, 2016, 22(9): 1679-1681.
- [6] SAPUTRA S, JORDAN D, MITCHELL T, et al. Antimicrobial resistance in clinical *Escherichia coli* isolated from companion animals in Australia[J]. *Vet Microbiol*, 2017, 211: 43-50.
- [7] LIU J H, WEI S Y, MA J Y, et al. Detection and characterisation of CTX-M and CMY-2 beta-lactamases among *Escherichia coli* isolates from farm animals in Guangdong Province of China[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2007, 29(5): 576-581.

- [8] KOJIMA A, ISHI Y, ISHIHARA K, et al. Extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from farm animals from 1999 to 2002: Report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program[J]. *Antimicrob Agents Ch*, 2005, 49(8): 3533-3537.
- [9] CHEN S, ZHAO S H, WHITE D G, et al. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant salmonella serovars isolated from retail meats[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(1): 1-7.
- [10] CHEN L, CHEN Z, LIU J H, et al. Emergence of *rmtB* methylase-producing *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* isolates from pigs in China[J]. *J Antimicrob Chemoth*, 2007, 59(5): 880-885.
- [11] HOU J X, HUANG X H, DENG Y T, et al. Dissemination of the fosfomycin resistance gene *fosA3* with CTX-M β -lactamase genes and *rmtB* carried on IncFII plasmids among *Escherichia coli* isolates from pets in China[J]. *Antimicrob Agents Ch*, 2012, 56(4): 2135-2138.
- [12] 贺丹丹, 黄良宗, 陈孝杰, 等. 不同动物源大肠杆菌的耐药性调查[J]. *中国畜牧兽医*, 2013, 40(10): 211-215.
- [13] 何柳, 孙艳, 雷涛, 等. 宠物源大肠杆菌耐药性调查[J]. *中国兽医杂志*, 2009, 45(8): 28-30.
- [14] 贺志沛, 王玲飞, 刘建华, 等. 宠物犬源大肠杆菌氟苯尼考耐药基因 *floR* 的检测及药物敏感性分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2013, 40(6): 211-215.
- [15] 兰亚莉. 郑州市宠物源大肠杆菌生物被膜表型与耐药谱型分析[J]. *河南农业科学*, 2016, 45(1): 135-137.
- [16] 文英, 贺国顺. 百株宠物源大肠杆菌耐药谱型分析[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2014(7): 116-117.
- [17] 赵相胜. 犬源大肠杆菌耐药性及分子流行病学初步研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2014.
- [18] 吴立婷. 扬州地区宠物源大肠杆菌耐药性分析及耐药基因检测[D]. 扬州: 扬州大学, 2017.
- [19] DAVIS J A, JACKSON C R, FEDORKA-CRAY P J, et al. Anatomical distribution and genetic relatedness of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* from healthy companion animals[J]. *J Appl Microbiol*, 2011, 110(2): 597-604.
- [20] MARQUES C, GAMA LT, BELAS A, et al. European multicenter study on antimicrobial resistance in bacteria isolated from companion animal urinary tract infections[J]. *BMC Vet Res*, 2016, 12(1): 213.
- [21] THUNGRAT K, PRICE S B, CARPENTER D M, et al. Antimicrobial susceptibility patterns of clinical *Escherichia coli* isolates from dogs and cats in the United States: January 2008 through January 2013[J]. *Vet Microbiol*, 2015, 179(3/4): 287-295.
- [22] HARTANTYO S H P, CHAU M L, FILLON L, et al. Sick pets as potential reservoirs of antibiotic-resistant bacteria in Singapore[J]. *Antimicrob Resist Infect Control*, 2018, 7: 106.
- [23] MELO L C, ORESCO C, LEIGUE L, et al. Prevalence and molecular features of ESBL/pAmpC-producing *Enterobacteriaceae* in healthy and diseased companion animals in Brazil[J]. *Vet Microbiol*, 2018, 221: 59-66.
- [24] POMBA C, RANTALA M, GREKO C, et al. Public health risk of antimicrobial resistance transfer from companion animals[J]. *J Antimicrob Chemoth*, 2017, 72(4): 957-968.
- [25] PÉREZ-PÉREZ F J, HANSON N D. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR[J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(6): 2153-2162.
- [26] RAO L L, LV L C, ZENG Z L, et al. Increasing prevalence of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* in food animals and the diversity of CTX-M genotypes during 2003-2012[J]. *Vet Microbiol*, 2014, 172(3/4): 534-541.

【责任编辑 庄 延】