



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/eng



Research Antimicrobial Resistance—Article

碳青霉烯类药物耐药性在人源和动物源NDM阳性大肠杆菌间的传播

沈应博^{a,b,#}, 胡付品^{c,#}, 王永强^{d,#}, 尹丹丹^{c,#}, 杨璐^{a,#}, 陈义强^e, 许春燕^a, 李基云^a, 蒋君瑶^a, 王雪杨^a, 付玉林^a, 邵东延^a, 刘德俊^a, 马藤菲^a, 蔡畅^f, 沈张奇^a, 王少林^a, 李娟^g, 张蝶^h, 柯跃斌ⁱ, 吴聪明^a, 沈建忠^{a,*}, Timothy R. Walsh^{j,*}, 汪洋^{a,*}

^a Beijing Key Laboratory of Detection Technology for Animal-Derived Food Safety, College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China

^b CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

^c Institute of Antibiotics & Key Laboratory of Clinical Pharmacology of Antibiotics (MoH), Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China

^d Department of Preventive Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China

^e State Key Laboratory of Animal Nutrition, College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100193, China

^f College of Animal Science and Technology, College of Veterinary Medicine, Zhejiang A and F University, Hangzhou 311300, China

^g State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, Collaborative Innovation Center for Diagnosis and Treatment of Infectious Disease, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention (CDC), Beijing 102206, China

^h The Second Affiliated Hospital of Zhejiang University, Zhejiang University, Hangzhou 310009, China

ⁱ Key Laboratory of Genetics & Molecular Medicine of Shenzhen, Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518055, China

^j Department of Zoology, University of Oxford, Oxford OX1 3SZ, UK

ARTICLE INFO

摘要

Article history:

Received 9 November 2020

Revised 25 June 2021

Accepted 6 July 2021

Available online 16 April 2022

关键词

碳青霉烯类药物

大肠杆菌

bla_{NDM-5}

全健康

抗生素耐药性传播

虽然中国禁止将碳青霉烯类药物应用于畜禽养殖业,但碳青霉烯耐药大肠杆菌(carbapenem-resistant *Escherichia coli*, CREC)尤其是产新德里金属- β -内酰胺酶(NDM)菌株,在食品动物中广泛流行。目前,仍缺乏家畜相关的CREC菌株对大规模人群影响的研究。于此,本文进行了一项回顾性横断面研究,调查来自中国22个省(直辖市)的医学临床源CREC的流行情况,并分析与其相关的社会经济因素。本文还调查了猪养殖场和鸡养殖场中 bla_{NDM} 和 bla_{KPC} 的丰度,并展示了动物和人源CREC菌株的详细基因组特征。总体上,有631/29799(2.1%)株临床大肠杆菌被鉴定为CREC。多变量逻辑回归分析揭示了男性、婴儿(1岁以下)、青少年(13~18岁)、生活于鸡和猪出栏量较高的省份人群具有更高的CREC感染概率。总体而言,73.8%($n = 45/61$)的猪养殖场和62.2%($n = 28/45$)的鸡养殖场表现为 bla_{NDM} 阳性,其丰度分别为 $1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-3}$ 和 $1 \times 10^{-3} \sim 1 \times 10^{-2}$ 。对NCBI(National Center for Biotechnology Information)数据库中来自中国的所有NDM阳性大肠杆菌($n = 463$)进行的基因组分析显示, bla_{NDM-5} 和IncX3是最主要的碳青霉烯酶基因和质粒,同时在质粒和核心基因组水平上,人源和动物源NDM阳性菌株间表现出高度的同源性。所有的结果均表明,CREC在人和动物之间存在频繁传播,提示该类菌株传播的危害,需要进一步讨论如何合理使用抗生素以杜绝该类耐药菌株的产生和扩散。

© 2022 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Corresponding authors.

E-mail addresses: sjz@cau.edu.cn (J. Shen), timothy.walsh@zoo.ox.ac.uk (T.R. Walsh), wangyang@cau.edu.cn (Y. Wang).

These authors contributed equally to this work.

2095-8099/© 2022 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

英文原文: *Engineering* 2022, 15(8): 24–33

引用本文: Yingbo Shen, Fupin Hu, Yongqiang Wang, Dandan Yin, Lu Yang, Yiqiang Chen, Chunyan Xu, Jiyun Li, Junyao Jiang, Xueyang Wang, Yulin Fu, Dongyan Shao, Dejun Liu, Tengfei Ma, Chang Cai, Zhangqi Shen, Shaolin Wang, Juan Li, Rong Zhang, Yuebin Ke, Congming Wu, Jianzhong Shen, Timothy R. Walsh, Yang Wang. Transmission of Carbapenem Resistance Between Human and Animal NDM-Positive *Escherichia coli* Strains. *Engineering*, <https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.07.030>

1. 引言

抗生素耐药性是21世纪全球最大的公共卫生挑战之一，碳青霉烯类药物是我们治疗危及生命的双重耐药菌感染的最有效抗生素之一[1]。不幸的是，碳青霉烯耐药肠杆菌（carbapenem-resistant *Enterobacteriales*, CRE）的快速传播是目前困扰住院患者和医生的主要问题，因为CRE对碳青霉烯类药物、头孢菌素类药物和青霉素类药物均表现出高水平耐药性，严重限制了治疗方案[2]。因此，CRE被称为“梦魇细菌”，同时伴随着大量的经济负担[3]，并被列为首要的公共健康威胁之一[4]以及迫切需要优先研发新抗生素的病原体[5]。

目前，世界范围内医疗机构相关的CRE菌株主要产三种碳青霉烯酶：新德里金属-β-内酰胺酶（NDM）、肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶（KPC）和可水解碳青霉烯的氧青霉烯酶-48型β-内酰胺酶（OXA-48）[6]。产NDM菌株在50多个国家广泛流行，特别是在南亚（印度、巴基斯坦和孟加拉国）和中国，而产KPC菌株更普遍在北美洲和南美洲（美国、阿根廷和巴西）以及在中国和欧洲（希腊、意大利和以色列）流行[7]。一项涉及36个欧洲国家的跨国研究显示，医院获得性碳青霉烯耐药大肠杆菌（CREC）中NDM和KPC阳性率分别为10.3%和7.2% [8]。在中国，2014—2015年在25个省份收集的产NDM和KPC临床分离株分别占有CREC的49.4%和39.6% [9]。相反，在另一项中国19个省份健康人群的研究中，46.7%的CREC中 bla_{NDM} 是唯一检测到的碳青霉烯酶基因[10]。综上所述，这些数据表明，NDM是中国大多数人源CREC菌株的碳青霉烯酶。

在世界范围内来自食品、野生和伴侣动物的CREC菌株中，NDM仍然是流行最广的碳青霉烯酶[11]。在中国，产NDM菌株正成为食品动物中最主要的产碳青霉烯酶菌株，并污染下游的肉制品[12]，其中， bla_{OXA-48} 和 bla_{KPC} 极少出现[13]。然而，尽管有一些证据表明CREC可在人与动物之间直接传播[15]，但迄今为止，动物来源的CREC还没有被普遍认为是影响人类健康的问题之一[14]。

2. 材料和方法

2.1. 研究设计

图1和附录A中的图S1展示了本项研究的框架。本文

由回顾性横断面研究开始。首先，从中国细菌耐药监测网（CHINET）[†]中，获得在2016年1月1日至12月31日期间，中国30家医院的门诊患者和住院患者中收集的共计29 799株大肠杆菌分离株。这些医院多数为大型诊疗机构，共覆盖22个省（直辖市），所在省（直辖市）总人口约9亿。为了避免重复，根据患者识别代码，临床标本中每个患者仅包含一个分离株。物种鉴定采用自动化系统，如Vitek 2 Compact（bioMérieux，法国）和Phoenix-100（Becton, Dickinson and Company，美国）系统或基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱（MALDI-TOF MS; Bruker Daltonics，德国）。使用Vitek 2 Compact自动系统（bioMérieux）测定分离株对19种临床抗菌药物（头孢他啶、头孢噻肟、头孢吡肟、头孢哌酮/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦、氨基糖苷、厄他培南、亚胺培南、美罗培南、阿米卡星、庆大霉素、环丙沙星、左氧氟沙星、甲氧苄啶/磺胺甲恶唑、磷霉素、黏菌素、呋喃妥因和替加环素）的敏感性。药敏结果根据CLSI（Clinical and Laboratory Standards Institute，美国临床和实验室标准协会）标准进行判读^{††}，至少对一种碳青霉烯类药物具有抗性的菌株被定义为CREC（图1和图S1）。

其次，我们于2017年4月1日至5月31日间在辽宁、湖南和陕西三个省各收集22个猪养殖场和16个鸡养殖场的粪便样本，以评估 bla_{NDM} 和 bla_{KPC} 的总体丰度；关于样本采集和处理过程的细节已在之前的研究[16]中描述，如果提取的DNA质量不足以进行下一步分析，则排除该养殖场数据（图1和图S1）。如前所述，使用qPCR方法以16S rRNA基因为对照，评估 bla_{NDM} 和 bla_{KPC} 的相对丰度[17]。

再次，我们对全球的动物源和人源CREC菌株进行了全面的基因组研究，以确定它们在基因、质粒和菌株水平上的基因组特征和关联（图1和图S1）。详细的过程将在下文中描述。本研究于2015年11月24日获得复旦大学附属华山医院伦理委员会的道德许可（项目号：KY2015-285）。个人同意书采用普通话版本，并从所有住院患者那里通过面对面或电话交流获得同意。我们排除了不愿意参与本研究的个体，并且所有参与者都被告知他们有权在任何阶段退出本研究。

2.2. 数据来源

中国22个省（直辖市）的人口统计数据来自中国国家统计局和《中国农业年鉴》[‡]。人为因素共分为6类，包括：

[†] www.chinets.com.

^{††} https://clsi.org.

[‡] http://www.stats.gov.cn/tjsj/nds/2016/indexch.htm.

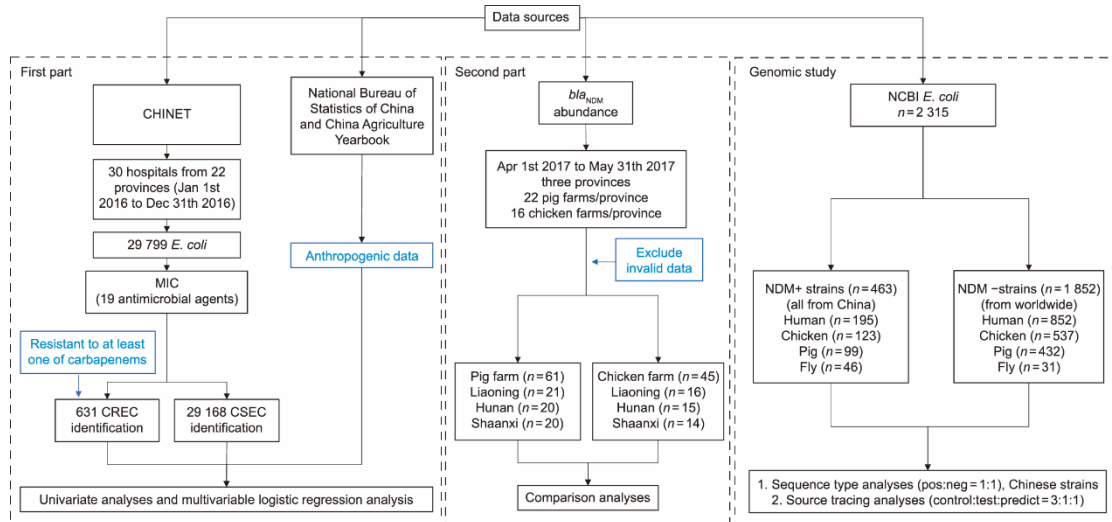


图1. 数据来源及研究流程图。MIC: 最小抑菌浓度; CSEC: 碳青霉烯敏感大肠杆菌; pos: 阳性; neg: 阴性。

国内生产总值 (GDP)、人口 (数量和密度)、抗菌药物使用、动物生产 (食品动物和淡水养殖, 主要是鱼和虾)、动物源性食品消费和每日动物源性食品摄入量。大部分数据收集于2015年, 抗菌药物使用数据来自2013年[18]。

在基因组分析中, 我们从NCBI数据库中下载了所有可用的中国 NDM 阳性大肠杆菌全基因组序列 ($n = 463$) 用于综合分析 (附录 A 中的图 1 和表 S1)。我们还从 NCBI 数据库中获得了来自 4 个宿主 (人、猪、鸡、蝇) 的 1852 株 NDM 阴性大肠杆菌的基因组序列, 相当于 NDM 阳性序列总数的 4 倍 (图 1 和表 S1)。所有菌株均给予有序自然数, 并使用 Excel 中的 RAND 函数随机选择进行相应分析。

2.3. 基因组分析

基因组序列分析包括基因组组装、多位点序列分型、质粒检测和系统发育种群预测, 具体描述见我们已发表的文章[19]。使用 Bandage (0.8.1 版) 对不含质粒复制子基因的序列片段进行分析, 以确定可能的质粒类型[†]。桑基图由 R 3.6.1 中的 networkD3 软件包 (0.4 版本) 生成^{††}。所有组装后的 NDM 阳性基因组序列用于核心基因组比对, 通过 RedDog pipeline 生成系统发育树[‡]。该树使用 Tree of Life v5 进行可视化处理^{‡‡}。

2.4. 溯源分析

我们使用 DAPC (discriminant analysis of principal components) 模型[20]来预测所有 NDM 阳性大肠杆菌的

潜在来源。所有菌株 ($n = 2315$) 的核心基因组单核苷酸多态性 (SNP) 图谱, 包括 NDM 阴性的大肠杆菌, 均使用 snippy pipeline 生成^{‡‡}。用于 DAPC 模型的 1389 株 NDM 阴性大肠杆菌的 SNP 矩阵通过 R3.6.1 中的 Adegnet 软件包实现[18]。其余 463 株阴性菌株用于评估上述模型的拟合度。最后, 利用构建的 DAPC 模型预测了所有中国 NDM 阳性菌株 ($n = 463$) 的遗传来源。预测组: 训练组: 测试组=1:3:1。

2.5. 统计分析

将人口统计学和非临床数据输入 Excel 2016 (微软, 美国), 将变量“年龄”分为 7 个亚组 (婴儿、学龄前儿童、学龄儿童、青少年、青年、成人和老年人), 同时将变量“感染部位”分为 5 个亚组 (血液、尿液、痰液、脑脊液和其他)。此外, 基于之前对鸡生产[21]和国家猪生产计划[22]的研究, 我们根据年出栏量[23]将中国大陆分别划分为 2 个鸡生产区和 4 个猪生产区。分类数据采用 χ^2 分析检验, 连续数据采用 Mann-Whitney U 检验。在 SPSS 23.0 版本 (IBM, 美国) 中进行单变量分析, 随后使用 Cramer 系数 (Φ) 对 P 值 ≤ 0.05 的变量进行共线性评估。如果一对变量高度相关 ($\Phi > 4.0$), 我们选择更具生物逻辑合理性的变量进行多变量逻辑回归分析。单变量分析中具有显著性意义的变量将被用于多变量分析。采用向前逐步 (似然比) 方法对多变量逻辑回归分析中的混杂因素进行控制。最终模型中保留 P 值小于 0.05 的变量。逻辑回归

[†] <https://github.com/mwick/Bandage>.

^{††} <https://CRAN.R-project.org/package=networkD3>.

[‡] <https://github.com/katholt/RedDog>.

^{‡‡} <https://itol.embl.de>.

^{‡‡‡} <https://github.com/tseemann/snippy>.

模型的拟合优度采用 Hosmer-Lemeshow 检验。森林图使用 R 语言中的 forest plot 包生成[†]。

使用 R 3.6.1 对 bla_{NDM} 的丰度进行分析和可视化。当丰度值低于检测限时，添加一个伪数值 1×10^{-7} （低于最低丰度一个数量级）后再进行 \log_{10} 变换[24]。不同组间的比较采用 Mann-Whitney U 检验或 Kruskal-Wallis H 检验，取 0.05 为显著性水平。

3. 结果

3.1. CREC 与临床和非临床因素的相关性

本研究设计示意图如图 1 和图 S1 所示。在来自中国 22 个省（直辖市）的不同感染样本中共分离到 29 799 株大肠杆菌，其中，631 株（2.1%）被鉴定为 CREC。四川省的 CREC 流行率最高（4.7%），福建省无 CREC 分离株（附录 A 中的图 S2）。对 CREC 感染患者的分析显示，男女比例为 1.4 : 1，但根据单变量分析，男性 CREC 的感染率明显高于女性（ $P < 0.0001$ ）（图 2 和附录 A 中的表 S2）。婴儿（小于 1 岁）和青少年（13~18 岁）的 CREC 感染率最高分别为 3.5% 和 3.2%。尿液在阳性样本中所占比例最大（42.1%），但比值最低（OR=0.7），95% 的可信区间（CI）在 0.6~0.9 之间（表 S2）。相比之下，脑脊液占阳性样本的比例最低（0.3%），但流行率最高（5.2%）。总的

来说，26/29 个变量与 CREC 感染（ $P \leq 0.05$ ）显著相关（表 S2）。排除高度共线性变量后，6 个非临床变量和 3 个人口统计学变量被纳入多变量逻辑回归分析[图 2（b）和表 S2]。在三个临床分类变量中，男性感染 CREC 的 ORs（OR=1.6, 95% CI: 1.3~1.8）高于女性，婴儿和青少年也表现出更高的 ORs（OR=3.4, 95% CI: 1.8~6.5 和 OR=3.1, 95% CI: 1.3~7.5）。尿路感染的 ORs 最低（OR=0.8, 95% CI: 0.6~0.9）。对三种非临床分类变量而言，在 GDP 较高地区（表 S2）或更高的鸡出栏量（OR=1.4, 95% CI: 1.1~1.8；表 S2）和猪出栏量地区（OR=5.5, 95% CI: 3.5~8.7；表 S2）的人群有更高的 CREC 感染率。Hosmer-Lemeshow 检验 [$\chi^2 = 11.35$, 自由度 (d.f.) = 8, $P = 0.182 > 0.05$] 表明所选的模型适合当前的数据。

3.2. 敏感性试验

药敏试验表明，CREC（ $n = 631$ ）对头孢菌素、头孢哌酮/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦和氟喹诺酮类（58.8%~95.7%）的耐药性明显高于碳青霉烯敏感大肠杆菌（carbapenem-susceptible *E. coli*, CSEC; $n = 29\ 168$, 2.9%~59%）（ $P < 0.0001$ ）（表 1）。CREC 对阿米卡星和磷霉素的耐药率分别为 16.8% 和 28.5%，而 CSEC 对阿米卡星和磷霉素的耐药率分别为 2.7% 和 5.6%。CREC 和 CSEC 对黏菌素和替加环素的敏感性均较高（大于 96.7%）。值得注意的是，

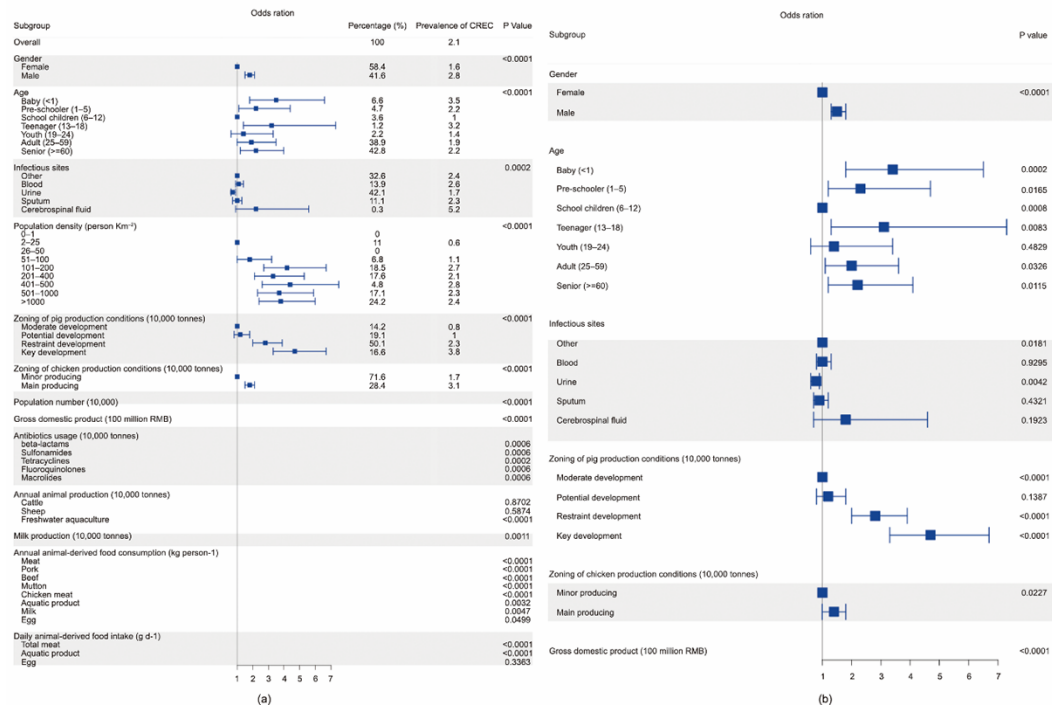


图 2. 单变量 (a) 和多变量 (b) 分析的森林图。

[†] <http://gforge.se/packages/>.

59%的CSEC对头孢噻肟表现出耐药性（表1）。虽然无法获得CHINET分离株的耐药基因型，但可利用NCBI数据库中中国临床大肠杆菌分离株（NDM阳性菌株和阴性菌株分别为195株和494株）的序列检测两组间的耐药基因阳性率。总的来说，除*mcr*和*oqxAB*基因外，NDM阳性菌中大多数抗菌药物的耐药基因，特别是 β -内酰胺耐药基因（*bla*_{CTX-M}、*bla*_{OXA}和*bla*_{CMY}）的阳性率显著高于阴性菌株（附录A中的图S3）。最近上传至NCBI的不携带NDM的*mcr*阳性菌株数量的增加可能是导致NDM阴性菌株中*mcr*基因阳性率更高的原因；该结果与我们的药敏试验结果相一致——NDM阴性菌株对黏菌素的耐药性高于阳性菌株。

表1 临床CREC和CSEC分离株的药敏数据

Antimicrobial agents	CREC (<i>n</i> = 631)	CSEC (<i>n</i> = 29 168)	<i>P</i> value
Cefoperazone/sulbactam	413 (65.5%)	1313 (4.5%)	<0.0001
Piperacillin/tazobactam	371 (58.8%)	846 (2.9%)	<0.0001
Ceftazidime	536 (84.9%)	7380 (25.3%)	<0.0001
Cefotaxime	604 (95.7%)	17209 (59.0%)	<0.0001
Cefepime	483 (76.5%)	7671 (26.3%)	<0.0001
Cefoxitin	413 (65.5%)	3413 (11.7%)	<0.0001
Aztreonam	481 (76.2%)	10150 (34.8%)	<0.0001
Ertapenem	569 (90.2%)	0	<0.0001
Imipenem	395 (62.6%)	0	<0.0001
Meropenem	487 (77.2%)	0	<0.0001
Amikacin	106 (16.8%)	788 (2.7%)	<0.0001
Gentamicin	339 (53.7%)	12367 (42.4%)	<0.0001
Ciprofloxacin	482 (76.4%)	16247 (55.7%)	<0.0001
Levofloxacin	454 (71.9%)	15459 (53.0%)	<0.0001
Trimethoprim/sulfamethoxazole	414 (65.6%)	16392 (56.2%)	<0.0001
Fosfomycin	180 (28.5%)	1633 (5.6%)	<0.0001
Colistin	11 (1.7%)	700 (2.4%)	0.2849
Nitrofurantoin	107 (17.0%)	1108 (3.8%)	<0.0001
Tigecycline	21 (3.3%)	117 (0.4%)	<0.0001

Data indicate the number of CREC isolates (resistance rates, %). *P* values were calculated by χ^2 analysis.

3.3. 畜禽养殖场样本中*bla*_{NDM}的丰度

由于临床CREC感染与省份间畜禽生产规模有很强的相关性，我们通过收集湖南、辽宁、陕西的猪、鸡养殖场粪便样本（每省份各22家猪养殖场和16家鸡养殖场），以确定*bla*_{NDM}和*bla*_{KPC}的丰度。剔除无效DNA提取物后，对61个猪养殖场和45个鸡养殖场的样本进行分析[附录A中的图S4（a）和表S3]。所有养殖场均为*bla*_{KPC}阴性；然而，分别有73.8%（*n* = 45）和62.2%（*n* = 28）的猪养殖场和鸡养殖场检测到*bla*_{NDM}，基因相对丰度范围分别为 $1 \times$

$10^{-5} \sim 1 \times 10^{-3}$ 和 $1 \times 10^{-3} \sim 1 \times 10^{-2}$ （*bla*_{NDM}/16S rRNA）[附录A中的图S4（b）和表S3]。总体而言，鸡养殖场和猪养殖场中*bla*_{NDM}丰度的中位数相似（*P* = 0.0758）；然而，湖南省一个猪养殖场和辽宁省一个鸡养殖场的*bla*_{NDM}丰度值异常高，分别为0.2467和0.2465 [图S4（c）和表S3]。

3.4. 动物源和人源NDM阳性大肠杆菌间的保守序列分型

由于NDM是CREC菌株中主要的碳青霉烯酶，因此我们利用生物信息学手段进一步研究了动物源和人源NDM阳性大肠杆菌间的关系。用463株NDM阳性大肠杆菌和463株随机选择匹配的NDM阴性大肠杆菌（1:1）构建了基于序列分型（sequencing types, STs）的最小生成树，其菌株来源组成为人（195 vs 217）、猪（99 vs 110）、鸡（123 vs 136）和苍蝇（46 vs 0）。由于数据库中没有苍蝇来源的阴性菌株，因此该部分菌株按其他来源比例分配。总体而言，NDM阳性大肠杆菌共有96种ST类型，其中，ST167（*n* = 62, 13.4%）、ST156（*n* = 34, 7.3%）和ST48（*n* = 31, 6.7%）最多。相比之下，NDM阴性的大肠杆菌属于158种ST类型，包括ST10（*n* = 47, 10.2%）、ST101（*n* = 16, 3.5%）和ST48（*n* = 15, 3.2%）（附录A中的图S5和表S1）。分别有16（*n* = 111）、11（*n* = 90）和10（*n* = 96）种STs在人源NDM阳性大肠杆菌与鸡、猪和苍蝇源NDM阳性大肠杆菌中同时存在，而在人源NDM阴性菌中，分别有25（*n* = 93）和19（*n* = 77）种STs与鸡和猪的相关STs重叠（附录A中的图S6）。在所有4个来源中均检出了属于ST167、ST206、ST10和ST48的NDM阳性菌株。其中，85.9%的（55/64）ST167和62.1%（18/29）的ST10分别来自人和猪（图S6和表S1）。

3.5. 动物源和人源NDM阳性菌株/质粒之间的基因组关联

本研究利用463株NDM阳性大肠杆菌间的362 650个SNPs构建了核心基因组系统发育树，研究了菌株与质粒水平上的关联性（图3和图4）。通过种群结构贝叶斯分析（BAPS），将4个来源的菌株划分为11个谱系。人源菌株分布在所有谱系中，其中，L4谱系（*n* = 19）只有人源菌株（图3）。L8谱系中含有的NDM阳性大肠杆菌数量最多，共111株（24.0%），其中33（29.7%）、35（31.5%）、23（20.7%）和20株（18.0%）分别来自人、猪、鸡和苍蝇（图3）。L11谱系中的87株菌来自上述4个来源，其中，63株（72.4%）来自人（图3）。同一来源的菌株通常形成相似性极高的分支（大于99.95%，图4中以粉红色三角形表示），而在C1~C5分支中存在来自两个或两个以上不同来源的亲缘关系紧密的菌株（图4）。

除 105 个不确定质粒类型的 bla_{NDM} 短序列和一个位于染色体上的 $bla_{\text{NDM-5}}$ 序列外, 其余 357 个菌株中 bla_{NDM} 的质粒属于 19 种不同的 Inc 类型 (图 3 和表 S1); 其中, $bla_{\text{NDM-5}}$ (332, 71.7%) 为最常见 NDM 亚型, 主要位于 IncX3 型质粒上 (255, 76.8%)。值得注意的是, IncB/O/K/Z 型质粒 ($n = 40$, 8.6%) 只携带 $bla_{\text{NDM-9}}$ 。总体而言, IncX3 (275, 59.4%) 是所有来源和谱系的主要质粒类型, 在 117 (42.5%)、74 (26.9%)、50 (18.2%) 和 34 株 (12.4%) 分别来自人、猪、鸡和苍蝇的菌株中发现。NDM 阳性的 IncB/O/K/Z 质粒主要在鸡源菌株中发现 (35, 87.5%), 而人源菌株中不存在该类型质粒 (图 3 和表 S1)。

3.6. NDM 阳性大肠杆菌的来源预测

我们采用 DAPC 方法预测 463 株 NDM 阳性分离株的来源, 其中, 测试组共 463 株 NDM 阴性株, 训练组共 1389 株 NDM 阴性株 (比例为 1:1:3, 图 S1)。虽然 DAPC 模型预测了来自人、鸡和猪的菌株之间存在密切的遗传关系, 但仍可观察到一个可区分的边界[图 5 (a)], 随后选择了代表结果预测效果最好的前 600 个主成分 (共 1200 个) 进行分析[图 5 (b)]。在测试组中该模型预测的菌株来自鸡、苍蝇、人和猪的准确率分别为 87.4%、83.9%、88.3% 和 83.5% [图 5 (c) 和附录 A 中的表 S4]。通过该模型, 19.5% ($n = 24$)、8.1% ($n = 10$) 和 1.6% ($n = 2$) 的鸡源 NDM 阳性大肠杆菌 ($n = 123$) 可能来自人、猪和苍蝇, 而 27.3% (27/99) 的猪源 NDM 阳性大肠杆菌可能来自人[图 5 (d) 和表 S5 附录]。虽然 30.8% (60/195) 的人源分离株似乎没有改变宿主, 但预计分别有 53.8% ($n = 105$) 和 14.9% ($n = 29$) 的菌株分别来自鸡和猪[图 5 (d) 和表 S5]。所有苍蝇源菌株 ($n = 46$) 分别来自人 ($n = 5$, 10.9%)、鸡 ($n = 22$, 47.8%) 和猪 ($n = 19$, 41.3%) [图 5 (d) 和表 S5]。

4. 讨论

我们的数据涵盖来自 22 个省 (直辖市) 的样本, 代表了中国最大的临床 CREC 监测研究。来自中国 30 家医院的感染相关大肠杆菌分离株中 CREC 的总流行率 (2.1%, 631/29799, CHINET, 2016) 高于欧洲 (0.1%, 未提供/121582, EARS-Net, 2016) [25] 和美国 (0.3%, 5/1916, 30 家医院, 2015—2017 年) [26]。本研究中 CREC 感染与男性存在正相关, 这与之前的报道一致[27]。在我们目前的研究中发现, 婴儿 (<1 岁) 被 CREC 感染的概率最高, 近期一篇关于美国儿童中有较高 CRE 感染率的报道也印证

了这一点[28]。婴儿的微生物群落变化较大, 容易受到抗生素的干扰, 这可能为 CRE 定植提供了机会, 这已被证明是老年重症监护室 (ICU) 患者内源性感染的风险因素 [29]。有趣的是, 人类和动物[18]中使用的 β -内酰胺类药物的排放与 CREC 感染没有显著相关性, 这意味着 β -内酰胺类药物向环境中的排放可能不是 CREC 传播的主要驱动因素。研究表明, β -内酰胺类药物在室温[30]下会迅速降解, 这可能导致它们在环境中几乎不产生选择压力。

本研究首次确定了畜禽养殖量与人类 CREC 感染之间的正相关关系。我们的微观基因组分析提供了几个支持这种联系的证据。首先, 我们观察到在中国三个省的畜禽养殖场粪便样本中, bla_{NDM} 的丰度很高, 而不含有 bla_{KPC} 。其次, 从人、鸡、猪和苍蝇分离株中鉴定出具有相似的携带 bla_{NDM} 的 IncX3 质粒, 然而在目前和以前的研究中 bla_{KPC} 很少在动物中被发现[11]。第三, 我们鉴定了来自人和动物源 NDM 阳性大肠杆菌核心基因组序列之间的密切关系。第四, 溯源分析显示, 人和动物源的 NDM 阳性大肠杆菌之间的分界模糊。综上所述, 这些观察表明 NDM 阳性 CREC 菌株在动物和人类之间存在显著的传播风险。值得注意的是, 动物源性食品的消费与 CREC 感染间的关系仅在单变量分析时呈现显著相关, 在多变量逻辑回归分析中则无显著相关, 表明其他可能的传播途径 (如污染物传播) 也是 bla_{NDM} 质粒或 CREC 扩散的一个因素。例如, 在包括医院污水、废水、饮用水、自然水道和其他来源的多个环境样本中均检测到 bla_{NDM} [31], 以及伴侣动物、苍蝇和野生动物中也分离到携带 NDM 的菌株[11]。此外, 先前研究报道了 CREC 通过环境在动物和人类之间传播[12, 32]。以上证据均表明环境污染物是潜在的传播驱动因素。

bla_{NDM} 在动物和人类之间的成功传递可能包括以下证据。首先, bla_{NDM} -IncX3 质粒的流行率为 76.8%, 出现在各主要谱系的 CREC 内 (图 3), 提示该质粒可能是非宿主特异性质粒; 此外, 本研究中可能低估了 bla_{NDM} -IncX3 质粒的流行率, 因为大量携带 NDM ($n = 105$) 的序列太短, 无法确认其质粒类型, 许多可能是 IncX3 型质粒。其次, 携带 bla_{NDM} 的质粒——特别是 bla_{NDM} -IncX3——对宿主细菌几乎没有适应性代价, 增加了其在不同生态系统中的稳定性和持续性[33–34]。第三, 除了兽医禁用的碳青霉烯类药物外, 包括青霉素和头孢菌素在内的 β -内酰胺类药物, 是中国 (2018 年 3192 t) 和其他 116 个世界动物健康组织成员国 (2015—2017 年间占总抗菌使用量的 16.1%) [36] 用于食品动物养殖的第二大类抗菌药物[35]。这些常用的 β -内酰胺药物主要被用于饮用水中, 可能对畜禽中 NDM 阳性细菌的选择和持续存在发挥重要作用。

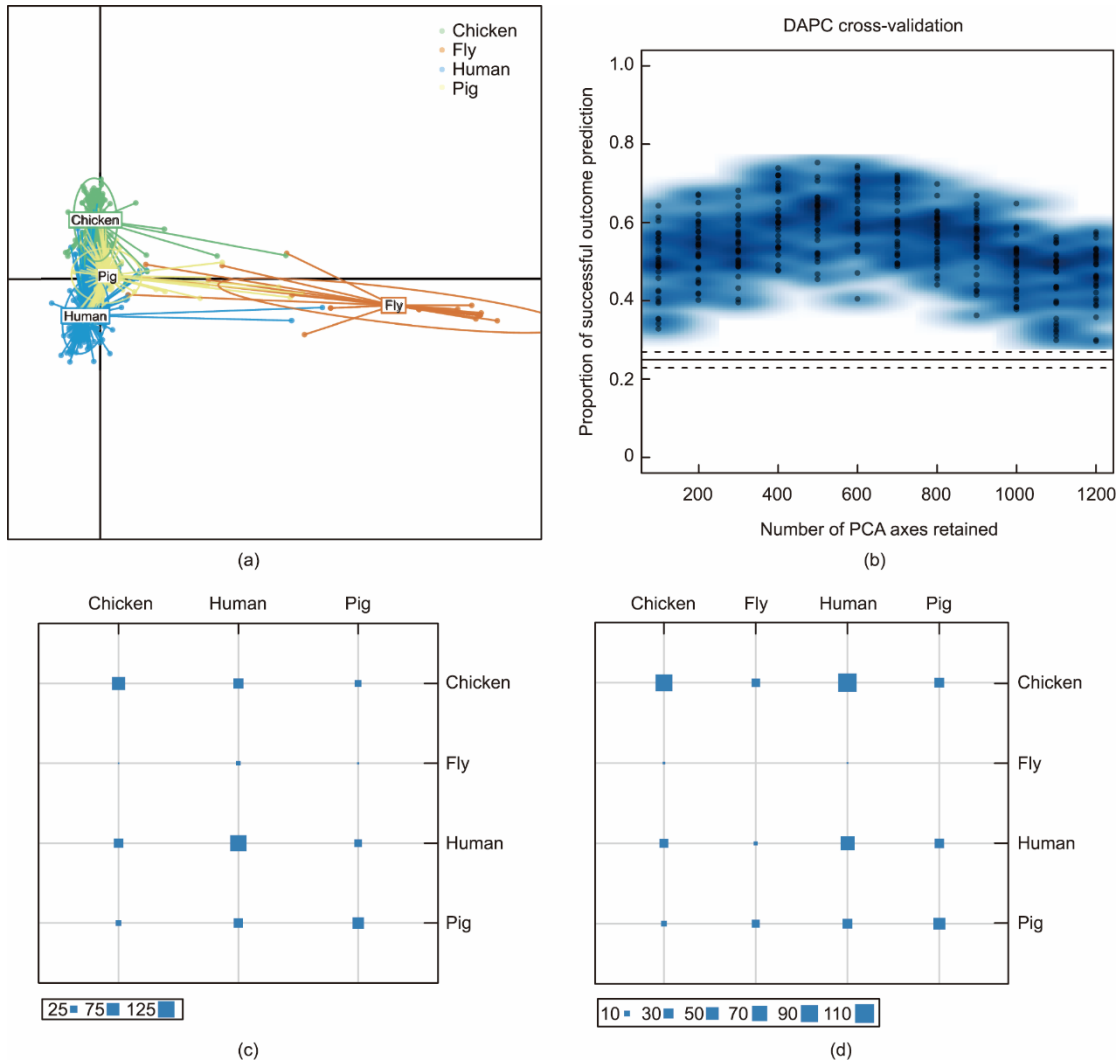


图5. 使用DAPC模型对NDM阳性大肠杆菌溯源。(a) 训练集的散点图。每个点代表一个菌株，不同的颜色表示不同的来源。椭圆表示每个原点的95% CI。(b) DAPC模型的交叉验证。(c) 测试集的表格图。(d) 预测集的表格图。行和列分别表示报告的来源和预测的来源，每个正方形的大小表示相应的菌株数量。PCA：主成分分析。

第四， bla_{NDM} 和包括 *mcr-1* [10]、*floR* 和 *tet(A)*等其他耐药基因在可转移质粒上共存[37]，可分别通过使用黏菌素、氟苯尼考和四环素将 bla_{NDM} 共同筛选出来。

尽管我们的研究证据表明了 CREC 在动物和人类之间的传播，但仍存在一些局限性。第一，我们的采样方案可能在时间跨度方面不完全一致；然而，该研究的数据集足够大，并通过流行病学和基因组学分析，提供了 CREC 在动物和人类之间传播的有力证据。第二，尽管以前的大规模监测表明 NDM 可能是大肠杆菌中最普遍的碳青霉烯酶类型 [8,10]，但本研究中仍缺少临床 CREC 菌株中碳青霉烯酶类型的数据。第三，我们直接分析了动物和人类感染之间的关联，但没有分析患者的肠道定植情况和相应的动物源性食品。然而，先前的研究表明，血液和尿路感染的病原体经常来自肠道共生菌或食源性致病菌[38–39]。第四，包括

大肠杆菌、肺炎克雷伯菌和梭状芽孢杆菌在内的肠杆菌类细菌是临床感染菌中 bla_{NDM} 的主要宿主。本研究只关注了 NDM 阳性的大肠杆菌，没有关注其他宿主菌，因为它是动物中主要的碳青霉烯耐药细菌[11]。第五，部分基因组数据来自其他研究，存在信息缺失的情况（例如，分离时间和地点、真实来源和报告来源之间不一致等），可能给我们的 DAPC 模型引入了系统误差。然而，在系统发育树的几个簇中发现了菌株间的强关联，并且在不同的宿主中发现了相同的质粒，表明了 CREC 在动物和人类之间的传播。

从“全健康”的理念出发，为对抗 CREC 在动物和人类之间的传播，应该考虑以下的行动：①由于撤销抗菌药物已被证明可以减少细菌耐药性的流行率[16,40]，因此可以通过更合理地使用 β -内酰胺类药物和其他可能产生共筛选效应的抗菌药物，进而减少畜禽养殖场携带 bla_{NDM} 细

菌的流行。②中国畜禽养殖业正向大规模集约化养殖转变，并逐渐减少农村后院养殖系统[†]，这将有助于加强对卫生、抗菌药物消费和感染控制措施的监管。此外，还应减少仅为促生长或预防疾病使用的药物量。③食物供应链、环境和医院在耐药病原体的传播中发挥着重要作用；因此，建立完善的动物（农场和周围环境）和人类（定植、感染和生活环境）耐药菌/耐药基因的监测体系是限制CREC传播的必要前提。④在动物和人源菌株中，有很大比例的 bla_{NDM} 基因（>70%）与IncX3质粒相关（图3）；因此，需进一步研究宿主的偏好性、持久性以及消除 bla_{NDM} -IncX3质粒的干预措施。⑤农场、屠宰场、食品加工和零售店应通过有效的清洁和消毒程序切断CREC传播途径，以减少CREC对非生物表面的污染。此外，由于苍蝇和鸟类在CREC的传播中发挥着重要作用，需要了解它们对CREC传播的贡献[12]。最后，中国农业农村部于2020年7月停止使用所有抗生素作为促生长剂之后，其他替抗方法如CRISPR-Cas9 [41]、噬菌体[42]和传统中药[43]是有可能对抗这种无处不在的病原体的新武器。

5. 结论

本研究揭示了全国范围内临床CREC感染和地区畜禽养殖产量间的显著相关性，同时揭示了鸡、猪养殖场粪便样本中 bla_{NDM} 丰度的普遍性。此外，我们在猪养殖场发现了长期存在的 bla_{NDM} 阳性大肠杆菌，并阐明了不同宿主来源菌株基因组间的界限模糊。综上所述，这些证据表明了CREC在动物和人类之间的关联和传播。综合所有证据，我们假设CREC首先出现在医学临床中，然后被引入至畜禽养殖业中，而猪和鸡正是CREC持续存在的有利宿主，这导致了CREC通过食物链或通过环境载体[生物和（或）非生物]在人类和动物之间的循环传播。

致谢

本研究感谢国家自然科学基金(81991535、81861138051、8181871690)和英国医学研究理事会项目DETER-XDR-China-HUB (Mr/S013768/1)的资助。

作者贡献

汪洋、胡付品、沈建忠和Timothy R. Walsh设计了这

项研究。沈应博、胡付品、尹丹丹、杨璐、陈义强、许春燕、李基云、蒋君瑶、王雪杨、付玉林、邵东延、沈张奇、王少林、李娟、张嵘、柯跃斌、吴聪明收集了本研究中所用到的数据。沈应博、胡付品、王永强、杨璐、刘德俊、马藤菲、蔡畅、Timothy R. Walsh、沈建忠、汪洋对本研究数据进行了分析和解释。沈应博、汪洋和Timothy R. Walsh撰写了手稿。所有作者都对稿件进行了审核、修改并同意最终发表。

Compliance with ethics guidelines

Yingbo Shen, Fupin Hu, Yongqiang Wang, Dandan Yin, Lu Yang, Yiqiang Chen, Chunyan Xu, Jiyun Li, Junyao Jiang, Xueyang Wang, Yulin Fu, Dongyan Shao, Dejun Liu, Tengfei Ma, Chang Cai, Zhangqi Shen, Shaolin Wang, Juan Li, Rong Zhang, Yuebin Ke, Congming Wu, Jianzhong Shen, Timothy R. Walsh, and Yang Wang declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.07.030>.

References

- [1] El-Gamal MI, Brahim I, Hisham N, Aladdin R, Mohammed H, Bahaeldin A. Recent updates of carbapenem antibiotics. *Eur J Med Chem* 2017;131:185–95.
- [2] Potter RF, D' Souza AW, Dantas G. The rapid spread of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Drug Resist Updat* 2016;29:30–46.
- [3] Stewardson AJ, Marimuthu K, Sengupta S, Allignol A, El-Bouseary M, Carvalho MJ, et al. Effect of carbapenem resistance on outcomes of bloodstream infection caused by Enterobacteriaceae in low-income and middle-income countries (PANORAMA): a multinational prospective cohort study. *Lancet Infect Dis* 2019;19(6):601–10.
- [4] CDC. Antibiotic resistance threats in the United States, 2019 [Internet]. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC; 2019 Dec [cited 2020 Nov 1]. Available from: <https://www.cdc.gov/drugresistance/Biggest-Threats.html>.
- [5] WHO. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2017 Feb 27 [cited 2020 Nov 1]. Available from: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.
- [6] Iovleva A, Doi Y. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Clin Lab Med* 2017;37(2):303–15.
- [7] Wu W, Feng Y, Tang G, Qiao F, McNally A, Zong Z. NDM Metallo-beta-lactamases and their bacterial producers in health care settings. *Clin Microbiol Rev* 2019;32(2):e00115–18.
- [8] Grundmann H, Glasner C, Albiger B, Aanensen DM, Tomlinson CT,

[†] <http://baogao.chinabaogao.com/xumuye/291653291653.html>

- Andrasević AT, et al. Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE): a prospective, multinational study. *Lancet Infect Dis* 2017;17(2):153–63.
- [9] Zhang R, Liu L, Zhou H, Chan EW, Li J, Fang Y, et al. Nationwide surveillance of clinical carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) strains in China. *EBioMedicine* 2017;19:98–106.
- [10] Shen Z, Hu Y, Sun Q, Hu F, Zhou H, Shu L, et al. Emerging carriage of NDM-5 and MCR-1 in *Escherichia coli* from healthy people in multiple regions in China: a cross sectional observational study. *EClinicalMedicine* 2018;6:11–20.
- [11] Köck R, Daniels-Haardt I, Becker K, Mellmann A, Friedrich AW, Mevius D, et al. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in wildlife, food-producing, and companion animals: a systematic review. *Clin Microbiol Infect* 2018;24(12):1241–50.
- [12] Wang Y, Zhang R, Li J, Wu Z, Yin W, Schwarz S, et al. Comprehensive resistome analysis reveals the prevalence of NDM and MCR-1 in Chinese poultry production. *Nat Microbiol* 2017;2(4):16260.
- [13] Liu X, Liu H, Wang L, Peng Q, Li Y, Zhou H, et al. Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing multidrug resistant *Escherichia coli* from swine in Northwest China. *Front Microbiol* 2018;9:1756.
- [14] Poirel L, Stephan R, Perreten V, Nordmann P. The carbapenemase threat in the animal world: the wrong culprit. *J Antimicrob Chemother* 2014;69(7):2007–8.
- [15] Gronthal T, Osterblad M, Eklund M, Jalava J, Nykasenoja S, Pekkanen K, et al. Sharing more than friendship—transmission of NDM-5 ST167 and CTX-M-9 ST69 *Escherichia coli* between dogs and humans in a family, Finland, 2015. *Euro Surveill* 2018;23(27):1700497.
- [16] Wang Y, Xu C, Zhang R, Chen Y, Shen Y, Hu F, et al. Changes in colistin resistance and *mcr-1* abundance in *Escherichia coli* of animal and human origins following the ban of colistin-positive additives in China: an epidemiological comparative study. *Lancet Infect Dis* 2020;20(10):1161–71.
- [17] Shi X, Li Y, Yang Y, Shen Z, Cai C, Wang Y, et al. High prevalence and persistence of carbapenem and colistin resistance in livestock farm environments in China. *J Hazard Mater* 2021;406:124298.
- [18] Zhang QQ, Ying GG, Pan CG, Liu YS, Zhao JL. Comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of China: source analysis, multimedia modeling, and linkage to bacterial resistance. *Environ Sci Technol* 2015;49(11):677–82.
- [19] Shen Y, Zhou H, Xu J, Wang Y, Zhang Q, Walsh TR, et al. Anthropogenic and environmental factors associated with high incidence of *mcr-1* carriage in humans across China. *Nat Microbiol* 2018;3(9):1054–62.
- [20] Jombart T, Devillard S, Balloux F. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genet* 2010;11(1):94.
- [21] Wang JX, Xu F, Liu RM, Dong GX. Hotspot analysis and estimation of the main pollutants from livestock in China. *J Agro-Environ Sci* 2017;36(7):1316–22.
- [22] Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People’s Republic of China. Ministry of Agriculture on printing and distributing “National pig production development plan” [Internet]. Beijing: Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People’s Republic of China; 2017 Nov 27 [cited 2020 Nov 1]. Available from: http://www.moa.gov.cn/nybgb/2016/diwuqi/201711/t20171127_5920859.htm.
- [23] Ministry of Agriculture of the People’s Republic of China. China agriculture Yearbook 2016. Beijing: China Agriculture Press; 2017.
- [24] Pärnänen K, Karkman A, Hultman J, Lyra C, Bengtsson-Palme J, Larsson DGJ, et al. Maternal gut and breast milk microbiota affect infant gut antibiotic resistome and mobile genetic elements. *Nat Commun* 2018;9(1):3891.
- [25] ECfDPAControl. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018. Stockholm: ECDC; 2019.
- [26] Sader HS, Castanheira M, Streit JM, Flamm RK. Frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from patients hospitalized with bloodstream infections in United States medical centers (2015–2017). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2019;95(3):114850.
- [27] Zhang L, Zhai W, Lin Q, Zhu X, Xiao Z, Yang R, et al. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in hematological patients: outcome of patients with carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infection and risk factors for progression to infection after rectal colonization. *Int J Antimicrob Agents* 2019;54(4):527–9.
- [28] Logan LK, Renschler JP, Gandra S, Weinstein RA, Laxminarayan R. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in children, United States, 1999–2012. *Emerg Infect Dis* 2015;21(11):2014–21.
- [29] Mittal G, Gaiand R, Kumar D, Kaushik G, Gupta KB, Verma PK, et al. Risk factors for fecal carriage of carbapenemase producing Enterobacteriaceae among intensive care unit patients from a tertiary care center in India. *BMC Microbiol* 2016;16(1):138.
- [30] D’ Cunha R, Bach T, Young BA, Li P, Nalbant D, Zhang J, et al. Quantification of cefepime, meropenem, piperacillin, and tazobactam in human plasma using a sensitive and robust liquid chromatography-tandem mass spectrometry method, part 2: stability evaluation. *Antimicrob Agents Chemother* 2018;62(9):e00859–18.
- [31] Mills MC, Lee J. The threat of carbapenem-resistant bacteria in the environment: evidence of widespread contamination of reservoirs at a global scale. *Environ Pollut* 2019;255(Pt 1):113143.
- [32] Li J, Bi Z, Ma S, Chen B, Cai C, He J, et al. Inter-host transmission of carbapenemase-producing *Escherichia coli* among humans and backyard animals. *Environ Health Perspect* 2019;127(10):107009.
- [33] Ma T, Fu J, Xie N, Ma S, Lei L, Zhai W, et al. Fitness cost of *bla_{NDM-5}*-carrying p3R-IncX3 plasmids in wild-type NDM-free Enterobacteriaceae. *Microorganisms* 2020;8(3):377.
- [34] Zhai R, Fu Bo, Shi X, Sun C, Liu Z, Wang S, et al. Contaminated in-house environment contributes to the persistence and transmission of NDM-producing bacteria in a Chinese poultry farm. *Environ Int* 2020;139.
- [35] Ministry of Agriculture and Rural Affairs of People’s Republic of China. Report on the use of veterinary antibiotics of China in 2018. In: Official veterinary bulletin. 2019. p. 57.
- [36] OIE. OIE Annual report on antimicrobial agents intended for use in animals [Internet]. Paris: OIE; 2018 [cited 2020 Nov 1]. Available from: <https://www.woah.org/app/uploads/2021/03/annual-report-amr-3.pdf>.
- [37] Peng Z, Li X, Hu Z, Li Z, Lv Y, Lei M, et al. Characteristics of carbapenem-resistant and colistin-resistant *Escherichia coli* co-producing NDM-1 and MCR-1 from pig farms in China. *Microorganisms* 2019;7(11):558.
- [38] Tamburini FB, Andermann TM, Tkachenko E, Senchyna F, Banaei N, Bhatt AS. Precision identification of diverse bloodstream pathogens in the gut microbiome. *Nat Med* 2018;24(12):1809–14.
- [39] Nordstrom L, Liu CM, Price LB. Foodborne urinary tract infections: a new paradigm for antimicrobial-resistant foodborne illness. *Front Microbiol* 2013;4:29.
- [40] Shen C, Zhong LL, Yang Y, Doi Y, Paterson DL, Stoesser N, et al. Dynamics of *mcr-1* prevalence and *mcr-1*-positive *Escherichia coli* after the cessation of colistin use as a feed additive for animals in China: a prospective cross-sectional and whole genome sequencing-based molecular epidemiological study. *Lancet Microbe* 2020;1(1):e34–43.
- [41] Citorik RJ, Mimeo M, Lu TK. Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases. *Nat Biotechnol* 2014;32(11):1141–5.
- [42] Kortright KE, Chan BK, Koff JL, Turner PE. Phage therapy: a renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria. *Cell Host Microbe* 2019;25(2):219–32.
- [43] Liu S, Zhang J, Zhou Y, Hu N, Li J, Wang Y, et al. Pterostilbene restores carbapenem susceptibility in New Delhi metallo-beta-lactamase-producing isolates by inhibiting the activity of New Delhi metallo-beta-lactamases. *Br J Pharmacol* 2019;176(23):4548–57.