

國立臺灣大學獸醫專業學院獸醫學研究所



碩士論文

Graduate Institute of Veterinary Medicine

School of Veterinary Medicine

National Taiwan University

Master Thesis

分析由寵物所分離出來帶有 extended-spectrum- β -
lactamase、pAmpC 或 MCR-1 基因的大腸桿菌

Characteristics of the *Escherichia coli* That Possess
Extended-Spectrum- β -Lactamase, pAmpC, or MCR-1
Encoding Genes from Companion Animals

劉芳伶

Fang-Ling Liu

指導教授：葉光勝 博士

Advisor: Kuang-Sheng Yeh, D.V.M., Ph.D.

中華民國 110 年 6 月

June, 2021

國立臺灣大學 (碩) 博士學位論文
口試委員會審定書



分析由寵物所分離出來帶有 extended-spectrum- β -
lactamase、pAmpC 或 MCR-1 基因的大腸桿菌
Characteristics of the *Escherichia coli* That Possess
Extended-Spectrum- β -Lactamase, pAmpC, or MCR-1
Encoding Genes from Companion Animals

本論文係劉芳伶君 (R05629015) 在國立臺灣大學獸醫學
系、所完成之碩 (博) 士學位論文，於民國 110 年 6 月 18 日
承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

葉光勝

(簽名)

(指導教授)

張貴雯

陳正文

系主任、所長

張貴雯

(簽名)

誌謝



能完成這份論文，我想謝謝所有幫助過我的老師和同學，特別要感謝我的指導教授 葉光勝 老師，平常關心學生生活上與研究上的問題，對於每位學生一視同仁，並適時給予協助，讓每個人都能夠對實驗操作快速上手，並有方向地進行，葉老師是像個父親般的溫暖角色，一開始操作實驗時，有非常多不瞭解的地方，老師有耐心地親自指導，不厭其煩替學生說明，讓我進一步對細菌以及抗藥性領域更加瞭解，非常謝謝老師包容與支持我不足的地方。

對我而言，完成碩士學位的過程本身就是一種挑戰，從大學時期學習的肺癌領域到研究所跨入不同領域，這段碩士生涯經歷了懷孕、生產休學、照顧嬰兒、復學，在學期間除了照顧小孩外，還必須兼顧學業，體力上來說十分吃緊，所以我也特別感謝實驗室的成員—得亨、陳耘和和倪彝，除了在生活上的互相照應與關心，也謝謝得亨陪我一起討論實驗，讓我有不同的思考角度進行構思，與你們相處的時間感受了許多溫暖，我覺得很開心，謝謝你們！

成就這份研究的，還要感謝臺大動物醫院協助收集樣本，以及病例分享，並提供豐富的臨床資料予我閱覽、分析，還有官南綾學姐，在百忙之中，協助我進行資料分析，此外，也特別感謝兩位口試委員，陳正文教授與張惠雯教授，提出專業的建言，使我對研究題目有更多元的認識，也讓我的論文更加完善，另外，也要謝謝我的大學指導教授 蔡孟峯 老師，教導我如何閱讀期刊論文，還有一些基礎的實驗流程與技術，並讓我認識細胞功能、細胞訊號傳遞等等的癌症領域知識。

最後特別想感謝的人，是我先生，在忙碌的工作之餘支持我完成學業，令我不需擔心經濟問題，給予我許多建議使我慢慢成長，在面對生活困難、瀕臨崩潰之際，默默鼓勵和陪伴，也在我最後要寫論文之際把小孩支開，讓我可以順利進行作業。其實生活中還有許多貴人幫助，但要感謝的人太多，所以感謝上帝始終疼愛我。

劉芳伶 謹誌

國立臺灣大學 獸醫學研究所


中華民國一百一十年六月

中文摘要



近年來，細菌抗藥性，是全球所關注的議題，其中大腸桿菌更是被列為抗第三代頭孢菌素的重要監測對象之一。第三代頭孢菌素是獸醫及人醫臨床治療上常用的抗菌劑之一。而超廣譜乙內醯胺酶 (extended-spectrum- β -lactamase, ESBL) 和透過質體轉錄的 AmpC 乙內醯胺酶，卻都具有水解第三代頭孢菌素的能力。另一個值得注意的是 MCR-1 磷酸乙醇胺轉移酶，此酵素對於治療革蘭氏陰性菌的後線藥物多黏菌素 E，或稱黏桿菌素，具有抗藥性。編碼此酵素的基因 *mcr-1*，可攜帶於質體上。超廣譜乙內醯胺酶、質體轉錄的 AmpC 乙內醯胺酶，或磷酸乙醇胺轉移酶的基因編碼，皆能透過質體攜帶，而這類質體經常也包含了其他抗藥性基因，並可水平傳播至同種，甚至跨菌種的細菌，衍生更多的抗藥性細菌。雖然在國際上針對從動物分離，具有這些多重抗藥性特性的細菌，已經有許多報告，但在台灣的伴侶動物中，相關的資料仍然有限。

因此，本研究目的為分析 2020 年 6 月 29 日至 2020 年 12 月 31 日期間，於臺大動物醫院就診之犬貓，所分離的大腸桿菌，分析上述的抗藥特徵與基因，並進行這些菌株的親緣關係調查。一共分析了 50 株大腸桿菌分離株，透過 PCR 方法確認，這些分離株主要隸屬於致病性大腸桿菌的 phylogroup B2，犬為 66% (27/41)，貓為 89% (8/9)。對第三代頭孢菌素具有抗藥性的大腸桿菌共有 16 株 (16/50, 32%)，8 株具有 ESBLs，6 株有 pAmpC，2 株同時攜帶有 ESBLs 與 pAmpC。ESBLs 基因型為 TEM group、CTX-M-1 group、CTX-M-9 group。pAmpC 基因型為 CMY-2 like。帶有 ESBLs 的大腸桿菌皆屬致病性 phylogroup B2，序列分型類別為 ST131 與 ST1193，皆為高毒力流行株。其中 ST131-O25b 共有 3 株，而



ST1193 為一非乳糖發酵的新興流行株，首次發現於台灣。攜帶 pAmpC 的大腸桿菌分散於各個 phylogroup，但以共生性的 phylogroup B1 為多數，序列分型類別為 ST155、ST315、ST617、ST457、ST767、ST372 和 ST93，這些菌株皆曾發現於人類與動物之中。在藥物敏感試驗中，帶有 ESBLs 或 pAmpC 的大腸桿菌，多重抗藥性的表現，顯著高於不具有 ESBLs 或 pAmpC 的菌株。經由接合試驗，將抗藥基因轉移至大腸桿菌 J53 菌株，我們發現 ESBLs 基因僅須接合 1 小時即可完成轉移，pAmpC 基因則須 1 天才能完成轉移，唯一轉移失敗的分離株為 ST767。透過 PCR 方法偵測，並無發現 *mcr-1*，而利用最小抑菌濃度測試，也並無發現具黏桿菌素抗藥性的大腸桿菌分離株。

伴侶動物特別是犬貓，與人類接觸密切，包含親吻動作、肢體接觸、清理排泄物，都可能促使抗藥性病原交流傳播，間接導致感染與治療門檻提升。因此在獸醫學的角度，持續監測寵物來源細菌的抗藥型態、基因型，與盛行率，並深入了解細菌株的親緣背景來源，是非常重要且必須的。

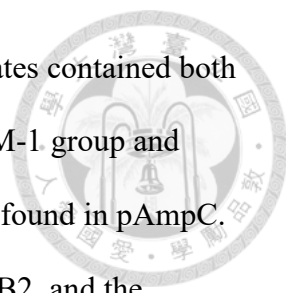
關鍵字：細菌抗藥性、大腸桿菌、超廣譜乙內醯胺酶、質體 AmpC 乙內醯胺酶、磷酸乙醇胺轉移酶、ST131-O25b、伴侶動物

Abstract



In recent years, antimicrobial resistance (AMR) has been an important issue of global concern. *Escherichia coli* has been listed as one of the pathogens that resistant to the third-generation cephalosporins and requires intensive monitoring. The third-generation cephalosporin is one of the antimicrobial agents frequently used clinically in both medicine and veterinary medicine. However, extended-spectrum β -lactamase (ESBLs) and plasmid-mediated AmpC (pAmpC) confer the ability of bacteria to hydrolyze the third-generation cephalosporins. Another noteworthy enzyme, MCR-1, is a phosphoethanolamine transferase and this enzyme enables bacteria to resist to polymyxin E, or so-called colistin, which is considered as the last resort to treat Gram-negative bacterial infections. MCR-1 encoding gene *mcr-1* is carried in a plasmid. The genes that encode ESBLs, pAmpC, or MCR-1 are all carried in plasmids and such plasmids frequently possess other drug-resistant genes and can transfer horizontally to the same or different species of bacteria, resulting in spreading of drug-resistant bacteria. The information of the multi-drug-resistant bacteria obtained from animals has been extensively reported internationally, however, such data regarding the bacteria isolated from companion animals in Taiwan is limited.

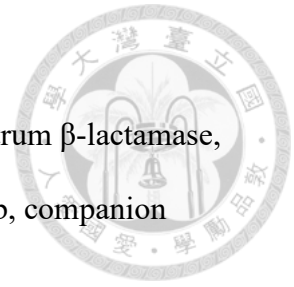
Therefore, the objective of this study is to analyze the drug resistant profiles and the phylogenetic relatedness of the *E. coli* isolates from the dogs and the cats that visited to National Taiwan University Veterinary Hospital (NTUVH) from June 29, 2020 to December 31, 2020. A total of 50 *E. coli* isolates were analyzed and they were primarily classified to the pathogenic phylogroup B2 as identified by polymerase-chain reaction (PCR). Dogs accounted for 66% (27/41), and cats 89% (8 / 9). There were 16 (16/50, 32%) *E. coli* isolates that were third-generation cephalosporins-resistant, among which



8 isolates possessed ESBLs, 6 isolates possessed pAmpC, and 2 isolates contained both enzymes. The ESBL genes detected included the TEM group, CTX-M-1 group and CTX-M-9 group, while the CMY-2 like gene was the only gene type found in pAmpC. ESBLs-producing *E. coli* all belonged to the pathogenic phylogroup B2, and the sequence types were ST131 and ST1193, both of which were highly virulent epidemic strains. Among them, 3 isolates were ST131-O25b, while ST1193 was a non-lactose-fermenting emerging epidemic strain, which was first reported in Taiwan. The pAmpC-producing *E. coli* were distributed in various phylogroups, with the commensal phylogroup B1 being the major one. The sequence types of the pAmpC-producing *E. coli* included ST155, ST315, ST617, ST457, ST767, ST372, and ST93, all of which have been reported in humans and animals. The antimicrobial susceptibility test indicated that the *E. coli* carrying ESBLs, pAmpC, or both exhibited a more significant multi-drug resistant phenotype than that of the *E. coli* that possessed neither of the enzymes. The conjugation test revealed that the ESBL-encoding genes were transferred to *E. coli* J53 strain within 1 hour, while the transfer of the pAmpC-encoding genes took 1 day. The only isolate failed to transfer was ST767. In this study, *mcr-I* was not detected by PCR, and no isolate was resistant to colistin as assayed by minimum inhibitory concentration test.

Companion animals, especially dogs and cats, are in close contact with humans. Such behaviors like kissing, physical contact, and cleaning up excrement may promote the transfer of the drug-resistant bacteria between human and companion animals, leading to infections and difficulties in treatment. Therefore, from the perspective of veterinary medicine, continuous monitoring of the drug-resistant profile, drug-resistant genes and the prevalence as well as the phylogenetic relatedness of the bacteria from companion animals is important and essential.

Keywords: antimicrobial resistance, *Escherichia coli*, extended-spectrum β -lactamase, pAmpC β -lactamase, phosphoethanolamine transferase, ST131-O25b, companion animals



目錄



口試委員會審定書	#
誌謝	ii
中文摘要	iii
Abstract.....	v
目錄	viii
表目錄	xi
圖目錄	xii
附錄	xiii
第一章 文獻檢閱.....	1
1.1 抗菌劑耐受性危機	1
1.2 抗菌劑作用機制	3
1.3 抗藥性發生與轉移	3
1.3.1 抗藥性作用機制	3
1.3.2 抗藥性基因轉移	6
1.4 乙內醯胺酶 (β -lactamase)	7
1.5 超廣譜乙內醯胺酶 (Extended-spectrum β -lactamases, ESBLs).....	10
1.6 AmpC 乙內醯胺酶 (AmpC β -lactamase, AmpC)	15
1.7 MCR-1 磷酸乙醇胺轉移酶	20
1.8 大腸桿菌介紹與分類	23
1.8.1 血清型與毒素分類	24
1.8.2 親緣系統分群 (Phylogenetic grouping)	25

1.8.3	多基因座序列分型 (Multi-locus sequence typing, MLST)	27
1.9	<i>E. coli</i> ST131-O25b (O25b : H4)	28
第二章	材料與方法	31
2.1	標準菌株來源	31
2.2	樣本收集與保存	31
2.3	分離株核酸萃取	31
2.4	親緣關係分析	32
2.4.1	親緣系統分群 (Phylogenetic grouping)	32
2.4.2	多基因座序列分型 (Multi-locus sequence typing, MLST)	33
2.5	ST131-O25b 血清型鑑定	35
2.6	ESBLs 表現型鑑定	36
2.6.1	CHOMagar™ ESBL 篩選	36
2.6.2	表現型確認紙錠擴散試驗 (Phenotypic confirmatory disc diffusion test, PCDDT)	36
2.7	ESBL / pAmpC / MCR-1 抗藥基因型鑑定	37
2.7.1	Extended-spectrum β -lactamase (ESBLs)	37
2.7.2	Plasmid-mediated AmpC (pAmpC)	38
2.7.3	MCR-1 encoding gene	39
2.8	藥物敏感性試驗	40
2.8.1	紙錠擴散試驗 (Disc diffusion test, DDT)	40
2.8.2	最小抑菌濃度測試 (Minimum inhibitory concentration test, MIC)	41

2.9	基因片段定序	42
2.10	接合試驗 (Conjugation experiment)	42
第三章	實驗結果.....	43
3.1	大腸桿菌盛行率與分離株來源	43
3.2	β -lactamase 基因型與盛行率	43
3.2.1	Extended-spectrum β -lactamase (ESBLs)	43
3.2.2	Plasmid-mediated AmpC (pAmpC)	44
3.3	ESBL/pAmpC producing <i>E. coli</i> 之親源關係	45
3.3.1	親緣系統分群 (Phylogenetic grouping)	45
3.3.2	多基因座序列分型 (Multi-locus sequence typing, MLST)	45
3.4	ESBL/pAmpC producing <i>E. coli</i> 之藥物敏感性試驗	46
3.5	ESBL/pAmpC producing <i>E. coli</i> 之親緣關係樹狀圖 (Minimal spanning tree)	
	47	
3.6	ESBL-producing <i>E. coli</i> 之 ST131 O25b 檢測結果	48
3.7	MCR-1 盛行率	48
3.8	接合試驗結果	48
第四章	討論.....	50
第五章	參考文獻.....	71



表目錄

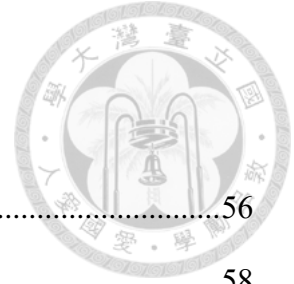


Table 1. The primers used in this study.	56
Table 2. Microorganisms isolated from this study.	58
Table 3. The <i>bla</i> genotypes, phylogroups, and ST types of the ESBL/pAmpC-producing <i>E. coli</i>	59
Table 4. PCR detection of the <i>bla</i> genes in the donor and the transconjugant after 1 hr and 1 day of conjugation.	60
Table 5. The <i>bla</i> genes transfer rate in the conjugation experiment.	61

圖目錄



Figure 1. Phylogenic groups distribution of *E. coli* isolates in companion animals. (n=50)
.....62

Figure 2. Comparison of the antimicrobial susceptibility tests of the ESBL/pAmpC
producing *E. coli* and those *E. coli* that carry no ESBL or pAmpC genes...63

Figure 3. Minimal spanning tree of ESBL/pAmpC-producing *E. coli*.....64

Figure 4. PCR detection of the *E. coli* ST131/O25b clone.65

Figure 5. PCR detection of *mcr-1* gene.66

Figure 6. PCR detection of the transfer of the ESBL gene from the donor *E. coli* isolate
031 to the recipient *E. coli* J53 strain in a conjugation test.67

Figure 7. PCR detection of the transfer of the ESBL gene from the donor *K. pneumoniae*
ATCC 700603 to the recipient *E. coli* J53 strain in a conjugation test.68

附錄



Appendix 1. Results of MLST of all ESBL/pAmpC producing *E. coli* isolates. (n=16) 69

Appendix 2. Overview ESBL/pAmpC producing *E. coli* characteristics and genotypes
isolated from companion animals. (n=16).....70




第一章 文獻檢閱

1.1 抗菌劑耐受性危機

抗菌劑耐受性 (antimicrobial resistance, AMR)，或稱細菌抗藥性，是目前全球面臨的嚴重議題之一。1928 年早期時，青黴素為首次被發現的抗生素，為黴菌所產生，可殺死細菌，成為當時的神奇特效藥，並廣泛運用於醫療中，治癒細菌感染患者[6]。但是，隨著時間與環境推演，細菌與病原體不斷進化，慢慢地能抵抗新一代藥物，近年來，開發新的藥物速度緩慢，但抗生素的使用與需求不斷增加，而細菌抗藥性問題也跟著提升。抗藥性的發展，會使細菌趨向於超級細菌 (superbug)，將難以治癒，並且可能在環境中散播開來，對人類及動物，甚至到整個大環境都影響甚遠[7]。

根據英國學者 Lord O'Neill 針對 AMR 的報告，在目前，全球每年至少有 70 萬人口因細菌抗藥性死亡，推估到 2050 年時，每年死亡人數會高達 1000 萬人數以上，其數字將超越十大死因之首的癌症死亡人數，經濟損失累積至 2050 年時，將高達 100 兆美元 (USD)，若繼續漠視，將造成不可挽回的結果[8]。

2015 年開始，世界衛生組織 (World Health Organization, WHO) 擬定、並通過了 AMR 全球行動計畫。該計畫涵蓋了全球 95% 以上人口，列為成員國的國家必須遵守，這個計畫包含了五個目標：1. 提高對 AMR 的認識 2. 監視抗菌劑耐受性情勢 3. 降低感染發生 4. 評估藥物使用的最佳時機與方案 5. 研發新的抗菌劑與診斷方式。這個計畫希望成員國家在 2015 年至 2017 年陸續開始實施[9]。



2017 年時，WHO 在全球首次發布了抗菌劑耐受性的病原體清單，將 12 種病原體按照優先程度分為三種等級：危急（3 種）、高度（6 種）、中度（3 種），其中列在危急的病原體皆屬於革蘭氏陰性菌：1. 鮑氏不動桿菌（carbapenem-resistant）、2. 綠膿桿菌（carbapenem-resistant）及 3. 腸桿菌科（carbapenem-resistant, third-generation cephalosporin-resistant），特別是肺炎克雷伯氏菌（*Klebsiella pneumoniae*）和大腸桿菌（*Escherichia coli*）[10]。而造成這些抗藥性的情形，最主要的原因是抗生素濫用、經驗性治療（empirical therapy）及不規律地使用廣效性抗生素所導致[11]。

在人醫，院內感染常獲得公眾關注，舉例來說，引起尿道感染（urinary tract infections, UTIs）的病原主要由屬於革蘭氏陰性菌的腸桿菌科所引起，特別是大腸桿菌與肺炎克雷伯氏菌。在抗生素濫用的狀況下，這些病原菌逐漸演化成成具有高度多重抗藥能力的細菌，可抵抗的藥物包含 extended-spectrum-lactamases (ESBLs)、AmpC- β -lactamase、和 carbapenemases[12]。在美國，UTI 案例的就診次數每年可達到 700 萬次以上[13]。

在獸醫，近來有「末日豬」一詞，指的是全球第一隻豬，其身上帶有耐最後線抗生素 colistin 的革蘭氏陰性菌。最後線抗生素，是用來治療具有多重抗藥性菌株的最後手段，如果連最後線抗生素也無效，幾乎就無其他治療方法了[14]。在畜牧業，抗生素已被廣泛添加於飼料中，用來預防或治療疾病。在這過程產生抗藥性的菌株，可透過進食的方式感染到人類身上，而另一個常見的途徑，則是動物與人類的直接接觸[15]。



1.2 抗菌劑作用機制

抗菌劑的作用機制可分為以下幾類：

- (1) 抑制細胞壁合成 (inhibit cell wall synthesis)
- (2) 使細胞膜去極化 (depolarize cell membrane)
- (3) 抑制蛋白質合成 (inhibit protein synthesis)
- (4) 抑制核酸合成 (inhibit nucleic acid synthesis)
- (5) 抑制代謝途徑 (inhibit metabolic pathways)

舉例說明：乙內醯胺類 β -lactam (e.g. cephalosporins) 與糖肽類 glycopeptides (e.g. vancomycin) 能抑制細菌細胞壁合成。脂肽類 lipopeptide (e.g. daptomycin) 可使細胞膜去極化。四環素類 tetracyclines (e.g. doxycycline) 與氨基糖苷類 aminoglycosides (e.g. gentamicin) 能抑制蛋白質合成。氟喹諾酮類 fluoroquinolone, FQ (e.g. ciprofloxacin) 能抑制核酸合成。磺胺類 sulfonamides (e.g. sulfamethoxazole) 能抑制參與合成 tetrahydrofolic acid 代謝途徑的酵素[15]。

1.3 抗藥性發生與轉移

1.3.1 抗藥性作用機制

透過基因突變（垂直基因轉移）與抗藥基因轉移（水平基因轉移），是細菌產生抗藥性的主因。抗藥性的機制主要分為以下四類：



1. 限制藥物攝取 (limiting drug uptake) :

不同菌種對限制藥物攝取的能力皆不同，如革蘭氏陰性菌，相較革蘭氏陽性菌而言，外膜多了一層脂多醣層 (lipopolysaccharide, LPS)，其結構能對一些較大分子的抗菌劑具有抗性，若含脂量越高，則能排斥親水性的藥物，但親水性的藥物多數能由孔蛋白進入，因此，革蘭氏陰性菌可藉由減少孔蛋白的存在，或是改變孔蛋白的選擇性通透能力，以達到限制藥物攝取的效果 [16]。

2. 修飾藥物結合位置 (modification of drug targets)

革蘭氏陰性菌中，對乙內醯胺類常見的作用，以 penicillin 為例，此藥物會與細菌細胞壁上的 penicillin-binding proteins (PBPs) 結合，使細胞壁結構瓦解，達成殺死細菌的效果。若編碼 PBPs 的基因突變，使得原來的 PBPs 結構改變，無法再與 penicillin 結合，就不能鬆動細胞壁結構，即達到抗藥效果 [17]。另一個例子，daptomycin 需要有鈣離子才能進行結合，細菌可透過基因突變 (如 *mprF*)，將細胞膜表面轉為正電荷，導致鈣離子無法接近，使得 daptomycin 無法作用 [18]。氟喹諾酮類可透過抑制細菌的 DNA 螺旋酶或拓撲異構酶達到抑菌效果，若這些與 DNA 合成有關的基因發生突變，發生引起酶的結構改變，藥物可能就無法結合在這些酵素上，致使藥物失效 [19]。磺胺類藥物，會與細菌產生 tetrahydrofolic acid 代謝途徑所需的酵素結合，致使細菌無法合成 tetrahydrofolic acid，而這個產物為細菌合成核酸及 *N*-甲醯甲硫胺酸 (*N*-formylmethionine) 所必需。而細菌對磺胺類藥物產生抗藥性，是因為參與合成 tetrahydrofolic acid 的酵素，可能因突變的關係，

導致磺胺類藥物與酵素的親和性降低，因而無法抑制細菌的生長[20]。以上都是改變藥物結合位置的例子，達到抗藥的能力。




3. 酵素使藥物失活 (drug inactivation)

使藥物失活，主要可以分為兩種形式，第一種是透過直接對藥物進行水解，第二種是在藥物接上化學基團而使藥物失效，如乙醯化是最常見的機制，可作用在氨基糖苷類、氯黴素、鏈黴菌素和氟喹諾酮類。而屬於第一種直接進行藥物水解的經典例子是乙內醯胺酶 (β -lactamase)，可針對乙內醯胺類藥物 (β -lactam) 的分子環狀結構，稱之乙內醯胺環 (β -lactam ring) 進行水解，是革蘭氏陰性菌對 β -lactam 類藥物的主要抗藥機制 [21]。

4. 藥物外排幫浦 (drug efflux pump)

藥物外排幫浦的調控基因，通常存在於染色體之中，也有一些則是透過水平轉移，使細菌獲得。它的作用是清除細菌體內的有害物質。在環境的刺激下，亦或是暴露於抗生素時，外排幫浦的基因會經由誘導方式大量被表現，合成的外排幫浦數量增加，可快速降低藥物在細菌體內的濃度。當然在不同菌種中，一些特定外排幫浦是固有的，且持續表現，對於特定的藥物具有耐受能力，例如：resistance-nodulation-cell division (RND) 轉運蛋白家族幾乎只在革蘭氏陰性菌中表現，整個幫浦結構橫跨細菌內膜與外膜，可直接由細菌體內排出多種抗生素或有毒物質，像是 *E.coli* 中的 AcrAB-TolC 幫浦，可排出青黴素，氯黴素，大環內酯類，氟喹諾酮和四環素[22]。



抗藥能力的獲得，可分為「固有存在」、「透過誘導」及「環境獲取」。固有存在的耐受性：該菌種天生就對特定的藥物具有耐受性。透過誘導的耐受性：抗藥基因存在於本身的基因體 (genome) 中，當暴露於抗菌劑時才被表現出來。環境獲取的抗藥性：抗藥基因的遺傳訊息，可透過外界水平傳播傳到自身，使自身獲得抗藥能力，主要途徑包含轉形 (transformation)、轉導 (transduction)、接合 (conjugation) 三種途徑，統稱為水平基因轉移 (horizontal gene transfer, HGT)[15]。

1.3.2 抗藥性基因轉移

抗藥基因的轉移，除了可以透過親代既有的遺傳訊息，包含抗藥性相關基因，經由複製分裂的方式，垂直遺傳給子代。但對細菌而言，抗藥基因獲得還可藉由環境中其它細菌所提供，只要是非垂直遺傳的方式，就統稱為「水平基因轉移」。

水平基因轉移形式分為以下三種：

1. 轉形 (transformation)：

轉形是一種自然發生的情況，指的是外在游離的遺傳物質，直接進入細菌體內，通常游離的遺傳物質來源，是微生物死亡後，經裂解，所釋出的遺傳物質。但細菌對這些遺傳物質的接收具有選擇性，親緣關係越接近的，越容易被接收，並有機會進行基因重組[23]。

2. 轉導 (transduction)：

轉導發生，最開始是由噬菌體 (bacteriophage) 感染細菌開始，在複製結束之後，宿主細胞會破裂，片段的遺傳物質有可能被包裹在新合成的噬菌

體中，遺傳物質可以由新合成的噬菌體再次感染另一個細菌中，而達到基因轉移目的[24]。



3. 接合 (conjugation) :

所謂接合，是指帶有質體的 donor strain 細菌，可藉由性線毛 (sex pili) 吸附 recipient strain 細菌，將彼此距離拉近後，質體可藉由 rolling circle replication 方式，由 donor strain，通過二個細菌之間暫時形成的通道 (channel)，運輸至 recipient strain，並在 recipient strain 完整複製這個質體的過程。若 donor strain 的質體帶有抗藥基因，抗藥基因就可藉由接合作用，由 donor strain 帶至 recipient strain，達到基因轉移的目的。

基因轉移，主要發生在兩個親緣關係較相近的細菌個體之間，但也可能發生在親緣關係較遠的菌種之間，尤其是透過接合反應，抗藥性基因可在不同菌種間傳播 [25]。在這些遺傳物質進入新宿主後，可能會發生幾種情形，DNA 可能被限制性內切酶切碎，或是以質體的形式存在，最後有機會將部分遺傳物質整合到染色體中，當發生同源基因重組時，外源性的 DNA 會取代現有的同源序列，並存在於染色體之中[26]。

1.4 乙內醯胺酶 (β -lactamase)

β -lactamase，顧名思義為 β -lactam 抗生素的水解酶。具有 β -lactamase 是革蘭氏陰性菌中主要的抗藥機制之一。而 2017 年，由 WHO 所發佈的抗菌劑耐受性病原體清單中，屬危急程度，並可抗第三代頭孢菌素 (Third-generation cephalosporin-

resistant, 3GC-resistant) 的腸桿菌科即為其中之一，主要是因為這些細菌攜帶有屬於 β -lactamase 類別中的超廣譜乙內醯胺酶 (extended-spectrum β -lactamase) 和質體轉錄的 AmpC 乙內醯胺酶 (plasmid-mediated AmpC β -lactamase, pAmpC) 所造成。

在詳細介紹 β -lactamase 之前，先簡單介紹 β -lactam 抗生素。 β -lactam 抗生素，在結構上以乙內醯胺環 (beta-lactam ring) 為基礎，發展為各種不同分子結構，包括了：青黴素 (penicillins)、頭孢菌素 (cephalosporins)、單醯胺環類 (monobactam)，以及碳青黴烯類 (carbapenams)。在過去的 70 年， β -lactam 廣泛運用於臨床治療，但也逐漸導致細菌產生大量與多樣性的 β -lactamase，而使治療失效。

至於 β -lactamase 分類，目前主要有兩大分類系統，分別是在 1980 年提出的 Ambler Molecular Class，此方法依據分子結構可分類為 Class A、B、C、D。其次是在 1995 年定義的 Bush Jacoby Group，這是依據生化與功能屬性作為分類，綜合兩大系統，首先可根據酵素活化位點 (enzyme active site) 分為兩群[27-29]：

1. Serine β -lactamase

- Penicillinase：為 ESBL 之 enzyme，屬於 Ambler Class A，以及 Bush Jacoby Group 2 的 subgroup 2a、2b、2be、2br、2ber、2c、2ce、2e、2f。主要可水解青黴素類 (penicillins)、一、二代頭孢菌素 (early cephalosporins)、第三代頭孢菌素 (third-generation cephalosporins, 3GC)。其中 2f 則屬於 carbapenemase，如 *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)，可水解碳青黴烯類 (carbapenems)、氧亞氨基乙內醯胺類 (oxymino- β -lactams)、以及第二代頭孢菌素頭霉素 (cephamycins)。關於乙內醯胺酶抑制劑 (β -

lactamase inhibitors) 的效果，其中 2br、2ber 不被 clavulanic acid (CLA)、sulbactam (SB)、tazobactam (TZB) 抑制。2e 不被 aztreonam 抑制，2f 則不一定。其餘 subgroup 皆可被 CLA 和 TZB 所抑制。具代表性的 enzyme groups 有 PC、TEM、SHV、CTX-M、PER、及 VEB。

- Oxacillinase：為 ESBL 之 enzyme，屬於 Ambler Class D，以及 Bush Jacoby Group 2 的 subgroup 2d、2de、2df，前二者可水解氯唑西林 (cloxacillin)、苯唑西林 (oxacillin)、第三代頭孢菌素 (third-generation cephalosporins)、氧亞氨基乙內酰胺類 (oxyimino- β -lactams)，如 OXA-10、OXA-11。而 2df 屬於 carbapenemase，可水解青黴烯類 (carbapenems)，如 OXA-23、OXA-48。乙內醯胺酶抑制劑 (β -lactamase inhibitors) 的效果對 oxacillinases 的影響則不一，其中 2df 通常不被 CLA 等抑制劑所抑制。
- Cephalosporinase：為 AmpC 之 enzyme，屬於 Ambler Class C，以及 Bush Jacoby Group 1 的 subgroup 1 和 1e，可水解頭孢菌素 (cephalosporins)、頭包它錠 (ceftazidime)、氧亞氨基乙內酰胺類 (oxyimino- β -lactams) 及超廣譜 AmpC 乙內醯胺類 (extended-spectrum AmpC, ESAC)。cephalosporinases 不會被乙內醯胺酶抑制劑的 clavulanic acid (CLA) 以及 azobactam (TZB) 所抑制。具代表性的 enzyme group 為 CMY、MOX、DHA、ACT、FOX、MIR。




2. Metallo β -lactamase (Zn^{2+})

- Carbapenemase：可水解 carbapenem 類抗生素，屬於 Ambler Class B，以及 Bush Jacoby Group 3，subclass B1 對應 subgroup 3a；subclass B2 對應 subgroup 3c；subclass B3 對應 subgroup 3b。此類別之 enzyme 可水解碳青霉烯類之抗生素 (carbapenems)，且皆不被乙內醯胺酶抑制劑的 clavulanic acid (CLA)、sulbactam (SB)、tazobactam (TZB) 所抑制，此外，subclass B1、B3 可水解 monobactams。具代表性的 enzyme group 為 IMP、VIM、IND、GOB、FEZ、NDM 等。


1.5 超廣譜乙內醯胺酶 (Extended-spectrum β -lactamases, ESBLs)

超廣譜乙內醯胺酶，英文縮寫文為 ESBLs，主要屬於 Ambler Class A (如 TEM、SHV、CTX-M)，以及部分歸類為 Ambler Class D (如 OXA-10、OXA-11)。ESBLs 能夠水解帶有 beta-lactam ring 的抗生素，其基因大多數位於質體上，主要見於革蘭氏陰性菌中，尤其是腸桿菌科的成員，此外，這些基因也能夠水平轉移到其他菌種。通常帶有 ESBLs 的菌株同時也會表現其他藥物的抗藥性，包含 aminoglycoside 和 fluoroquinolone 等。ESBLs 可將早期的頭孢菌素、第三代頭孢菌素 (Third-generation cephalosporin-resistant, 3GC-resistant) 進行水解，但並不破壞 cephamycin 和 carbapenems[30]。另外， β -lactamase inhibitors 也能抑制 ESBLs 的活性，包括 clavulanic acid (CLA)、sulbactam (SB)、以及 tazobactam (TZB)。在治療上常見將抑制劑與 β -lactam 搭配使用，例如：augmentin (amoxicillin + clavulanic acid) [31]。



ESBLs 最早出現在 1980 年代，這些可以耐第三代頭孢菌素的酶，主要由 β -lactamase 如 TEM-1、TEM-2 和 SHV-1 的活化位點發生點突變衍生而來。TEM 最早在 1965 年分離，並以患者 Temoneira 命名，是第一個在革蘭氏陰性細菌中發現，由質體轉錄而成的 β -lactamase，可水解青黴素和早期的頭孢菌素[32]。SHV 是一種與 TEM 具有類似活性的酶，1980 年代在 *K. pneumoniae* 的染色體上發現，後來也出現在質體上，能夠水解 cefotaxime (CTX) 和小程度的 ceftazidime (CAZ)，胺基酸序列與 SHV-1 相似，另外命名為 SHV-2 [33]。基於點突變影響，TEM 與 SHV 也越來越多分型、普遍，衍生出各樣的 ESBLs [34]。接著在 1989 年，於新生兒耳液中首次分離了帶有 CTX-M 的 *E. coli* [35]。CTX-M 是個異質性且複雜的酶，源自環境中的 *Kluyvera* spp.，在臨床上的發現，CTX-M 是第一個可水解「廣泛」的頭孢菌素，包含了第三代頭孢菌素 cefotaxime (CTX) 和 ceftazidime (CAZ)，以及獸醫用藥 ceftiofur 和 ceftriaxone [36]。2000 年之後，CTX-M 越來越盛行，甚至超越了 TEM 與 SHV，特別是在大腸桿菌以及肺炎克雷伯氏菌之中[37]。CTX-M 主要可分為 5 大群，分別為 CTX-M-1（源自 *Kluyvera cryocrescens* 染色體）、CTX-M-2（源自 *Kluyvera ascorbata* 染色體）、CTX-M-8、CTX-M-9、CTX-M-25（源自 *Kluyvera georgiana* 染色體），後來又新增了 2 群為 CTX-M-74 和 CTX-M-75 [38]。

以目前來說，全世界最為常見的 ESBLs 的 enzyme family 為 TEM、SHV 以及 CTX-M。目前為止，在 NCBI 資料庫中，TEM 有 192 種，SHV 有 182 種，CTX-M 有 226 種 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/>)。此外，較為少見的 ESBLs 還包含了部分的 OXA、VEB、PER、GES、TLA、IBC、SFO、BES、BEL 等[39]。



帶有 ESBLs 的細菌，主要以 *E. coli* 和 *K. pneumoniae* 為大宗，常會造成院內感染，包含了新生兒重症病房[40]、癌症患者[41]，以及小兒尿道感染[42]。由於 ESBLs 不斷變異，以及攜帶 ESBLs 的質體持續增加，再加上高毒力菌株的盛行，例如 *E. coli* ST131 與 *K. pneumoniae* ST258 [43]，在過去十多年來，全球帶有 ESBLs 的腸桿菌科發生率明顯提升。根據最新的研究指出，ESBLs 在國際間的綜合盛行率從 2003 年至 2018 年，由 2.5% 成長至 21.1%，檢體樣本皆來自健康的個體。數據也指出，ESBLs 的傳播已不再侷限於院內感染，而是在社區間盛行[44]。同時，ESBLs 也在環境中傳播。例如，在歐洲的第二大河多瑙河 (the River Danube) 也做過調查，分離出了 35 株 ESBL-producing *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, n=17; *K. pneumoniae*, n=13; *Enterobacter* spp., n=5) [45]。就算連人類活動很稀少的南、北極，也都發現帶有 ESBL 細菌的蹤跡[46]，目前在家畜與人類分離到的 ESBL-producing *E. coli*，常見的有 ST10、ST38、ST69、ST405、ST410 和 ST648 [47]。


在伴侶動物中，美國自 2009 至 2013 年，來自犬貓臨床檢體分離出 2,443 株 *E. coli*，且多數為隸屬於 phylogenetic group B2 及 D 的致病性菌株，佔了全部的 69.1%，其中有 68 株 (3.8%) 為 ESBL-producing *E. coli*。除了耐第三代頭孢菌素之外，對於其他類別的抗生素也具有顯著的抗藥性，包含：ciprofloxacin (91.2%)、doxycycline (88.2%)、enrofloxacin (82.4%)、sulfamethoxazole-trimethoprim (50%)、chloramphenicol (44.1%)、gentamicin (39.7%)、以及 amikacin (30.9%)。基因型 CTX-M 佔了 73.5%、TEM 佔了 41.2%、SHV 佔了 29.4%、CMY-2 (pAmpC) 佔了 17.6%，且主要流行菌株為 ST131 (14.7%)、ST648 (13.2%)、ST405 (13.2%)、ST38 (4.4%)、ST73 (4.4%)、ST372 (4.4%) [48]。然而，來自全球性的調查回顧中，從 2001 年至

2019 年，ESBL-producing *E. coli* 在犬貓中最常見的是 ST131 和 ST38，緊接著是 ST68、ST405、ST617 與 ST648 [49]。



令人訝異地，在健康犬的糞便中，ESBL-producing *Enterobacteriaceae* 也高達 26.5%，其中以 *E. coli* 最多數。常見的基因型為 CTX-M-1、CTX-M-14、CTX-M-15、CTX-M-27 和 CMY-2 (pAmpC)。這些 ESBL-producing *E. coli* 多數為 ST648 和 ST131 [50]。2015 年，有研究調查健康家犬身上所攜帶的 ESBL-producing *Enterobacteriaceae*，共有 352 株分離株，其中 327 株為 *E. coli*，最常發現的 ESBLs 有 CTX-M-1、CTX-M-14、CTX-M-15、SHV-12 以及 CMY-2 [51]。

在台灣的醫界報導，於 2006 年時發現 ESBLs 盛行率上升，帶有 ESBL 的 *E. coli* 由 1.5% 上升至 16.7%，而帶有 ESBL 的 *K. pneumoniae*，由 8.5% 上升至 29.8%。主要分離到的 ESBL 類型為 SHV-5，SHV-12，CTX-M-3 和 CTX-M-14 [52]。2008 年 7 月至 2009 年 12 月，在台灣北部，從尿道感染的檢體收集了 200 株帶有 ESBLs 的分離株，包含了 *E. coli* 134 株、以及 *K. pneumoniae* 66 株，並檢測可用的治療策略，imipenem（碳青黴烯類）是最好的用藥建議。針對 ESBL-producing *E. coli* 可採用 fosfomicin、nitrofuranoïn，但不建議採用 SXT (sulfamethoxazole-trimethoprim)，因具有高度抗藥性[53]。在台灣南部，調查了從 2005 年至 2010 年分離到的 ESBL-producing *E. coli*，其 ST 分型所佔的比例為 ST131 (48%)、ST405 (4%)、ST38 (10%)、ST10 (2%)、ST12 (2%)、ST69 (4%)、ST457 (4%)、其他 (26%) [54]。2017 年 1 月至 2019 年 10 月，於台灣南部的三家醫院分析成年人菌血症的案例統計，共有 499 例，平均為 74.5 歲，女性占了 53%，主要病原為 *E. coli* (62.1%)、*K. pneumoniae*



(20.8%)，對第三代頭孢菌素有抗藥性的分離株就佔了 34% (172/499) [55]。根據台灣衛生福利部疾病管制署的資料顯示，自 2016 年至 2020 年第三季，最常見的院內感染病原菌為 *K. pneumoniae* 和 *E. coli*，不論在醫學中心，或是區域醫院都位居前三名的地位，而 *E. coli* 自 2011 年起，一直都位於前三名居高不下[3]。

帶有ESBL的細菌在台灣的獸醫界，亦有報告。自2011年12月至2013年3月，從犬貓的393個尿液檢體收集到了176株病原菌，最多數的為*E. coli* 60株 (ESBL-producer n=2)，其次為*K. pneumoniae* 22株 (ESBL-producer n=5)，所測得之ESBL類型為TEM-1、SHV-11、SHV-12、SHV-28、CTX-M-14、CTX-M-15 [56]。而從犬貓分離的ESBL-producing *E. coli* 盛行率，2014年為18.2%，2015年為21.1%，2016年為34.6%，2017年為25.6%，看上去有攀升的趨勢，所鑑定出的ESBL-producing *E. coli* 有ST457 (13/65, 20.0%)、ST131 (10/65, 15.4%)、ST648 (6/65, 9.2%)、ST38 (3/65, 4.6%)、ST405 (2/65, 3.1%) [57]。2020年，在台灣南部，從299隻健康犬，分離出311株菌株，ESBL-producing *E. coli*有28株，ESBL型別測得SHV (n=7)、TEM (n=2)、OXA (n=3)、CTX-M-1 (n=19)、CTX-M-2 (n=8)、CTX-M-9 (n=9)。Phylogroup主要為B2 (n=84, 30.1%)，其次是B1 (n=73, 26.2%) 和 A (n=44, 15.8%)。在phylogroup B2最常見前三者為ST complex 372、ST complex 127、ST complex 131 [58]。在人類與動物分離的ESBL-producing *E. coli*，常見的有ST131、ST648、ST10、ST38、ST69、ST457與ST405，而這個現象說明ESBL-producing *E. coli* 在人類與伴侶動物上，有交互傳播的可能性。




1.6 AmpC 乙內醯胺酶 (AmpC β -lactamase, AmpC)

AmpC 為 cephaloporinaes，是 β -lactamase 的一員，屬於 Ambler Class C，廣義上來說，AmpC 也是 ESBLs 的範疇，和 ESBL 一樣可以水解 3GC，但因水解藥物的性質與結構不盡相同，因此分開定義。

在結構上，AmpC 類似於 Class A β -lactamase，活化區域帶有 serine，除了關鍵的殘基 Ser64 外，還有 Lys67、Tyr150、Asn152、Lys315、和 Ala318，能識別更加廣泛的頭孢菌素側鏈，當這些殘基被取代或變更時，酶的活性會大幅降低[59]。

在性質上，AmpC β -lactamase 可水解早期頭孢菌素、第三代頭孢菌素 (3GC-resistant)，並對頭孢吡肟 (cefepime，第四代頭孢菌素)、carbapenems (e.g. imipenem) 具有感受性。與 ESBLs 不同的是，AmpC 不被 cephamycin 和 β -lactamase inhibitors (如 clavulanic acid, CLA) 破壞，在治療上使用 augmentin (amoxicillin + clavulanic acid) 時，無法產生治療效果[60]。

AmpC β -lactamase 在 1940 年代發現於 *E. coli* 中，是第一個可以水解 penicillin 的酶，但在當時尚未被命名[61]。1960 年代，為分析抗藥性與遺傳的關係，將發現有漸漸增強抗藥性的 *E. coli*，分為 *ampA* strain (產生大量的 β -lactamase，暗示著 *ampA* 基因有調控功能) 與 *ampB* strain (不僅單基因座發生改變，且 envelope 發生變化) 兩群，在 *ampA* 中因發生突變，導致抗藥性降低者定義為 *ampC* strain，該 strain 幾乎不產生 β -lactamase。隨後，*ampC* 基因序列在 1981 年從 *E. coli* 被報導出來[62]。AmpC 基因廣泛分布於革蘭氏陰性菌的染色體上，例如 *Enterobacter* spp.、



Serratia marcescens、*Citrobacter freundii*、*Providencia* spp.、*Morganella morganii* 以及 *E. coli*，通常在一般情況下不太表現，但在透過基因突變，或是藥物濃度提升而被誘導出來，稱之為「chromosomally-encoded inducible AmpC β -lactamases」[63]。AmpC 的強誘導劑包含：aminopenicillins、1st cephalosporins、cefoxitin、CLA、imipenem，這些藥物除了 imipenem，會立即被 AmpC 水解。AmpC 弱誘導劑包含：carboxy-ureidopenicillins、3GC、aztreonam (monobactam)，當大量表現 AmpC 時，上述抗生素也能夠被水解[64]。


Chromosomal AmpC，簡稱 cAmpC，其調控牽涉了蛋白質 AmpD，AmpG，AmpR 和肽聚糖的循環機制，*E. coli* 原本持續低表現 cAmpC，後來因突變導致 *ampR* 缺失，也因此 cAmpC 無法被誘導表現[65]。除了 *E. coli* 之外，不具 cAmpC 而不能被誘導的細菌，也包含了 *Salmonella*、*Klebsiella* spp.和 *P. mirabilis* [66]。後來，臨床上發現 AmpC 開始有一些傳播現象，而相關的抗藥菌株主要為 cAmpC 不被誘導的菌種。這個現象最早發現於 1989 年，來自南韓 Bauernfeind 等人分離出 ESBL-producing *K. pneumoniae*，但使用 β -lactamase inhibitors 治療時，成效並不佳，並可耐各類抗生素，包含 penicillins、cephalosporins、cephamycins、aztreonam、tetracycline、chloramphenicol、sulfonamides 以及 aminoglycosides，該菌株發現可轉移的質體 pMVP-1，並可從 ESBL-producing *K. pneumoniae* 將相同的抗藥表現轉移給 *E. coli*，與 ESBLs 的特性相比，AmpC 明顯能夠多加分解 cephamycins，因此，將這樣的酶命名為「new cephamycinase (CMY-1)」，也暗示著可能為 AmpC β -lactamase，並定義為「plasmid-mediated AmpC」[67]，此現象也視為不可誘導 cAmpC 的菌株之適應機制。



Plasmid-mediated AmpC，簡稱 pAmpC，對於 AmpC 位在質體上，第一個提出證據的是 Papanicolaou 等人，他們將帶有 MIR-1 的質體從 *K. pneumoniae* 轉移到 *E. coli* 中，並對比在質體上的 MIR-1 基因與 *E. coli* 的 cAmpC 序列，發現僅有 71% 相似度，反而 MIR-1 與 *Enterobacter cloacae* 的 cAmpC 序列有 90% 相似 [68]。隨著時間過去，越來越多的 pAmpC 基因家族從腸桿菌科中，主要包含了 *E. coli*、*K. pneumoniae*、*P. mirabilis*，或是在綠膿桿菌 (*P. aeruginosa*) 中被發現 [62]。pAmpC 根據水解能力、 β -lactamase 種類或發現來源命名，如 CMY (耐 cephamycins)、FOX (耐 cefoxitin)、MOX (耐 moxalactam)、LAT (耐 latamoxef)、ATC (AmpC type)、ACC (Ambler class C)、MIR-1 (發現於美國羅德島州 Miriam Hospital)、DHA (發現於沙烏地阿拉伯 Dhahran hospital)、BIL-1 (源自患者 Bilal) [65]。在 2002 年時，發展了一套鑑別 pAmpC 的 PCR 系統，並依據宿主種類可分為五大來源 [69, 70]：

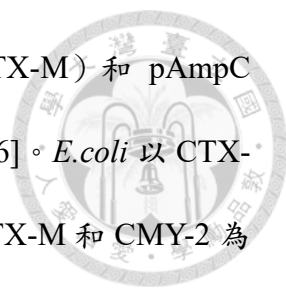
1. *Enterobacter* spp. group (EBC-F/R，檢測 MIR、ACT)
2. *Citrobacter freundii* group (CIT-M-F/R，檢測 CMY-2-like、LAT、BIL)
3. *Morganella morganii* group (DHA-F/R，檢測 DHA)
4. *Hafnia alvei* group (ACC-F/R，檢測 ACC)
5. *Aeromonas* group (FOX-F/R，檢測 FOX; MOX-F/R，檢測 CMY-1-like、MOX)

pAmpC 的盛行情況，在全球各洲都有相關報導，包括亞洲 (印度、日本、南韓)、歐洲 (英、法、德、希臘、瑞典、義大利)、北美洲、中南美洲 [66]，其中 CMY-2 是地理分布最廣泛的 pAmpC，也包含了台灣在內 [66, 71]。臨床上帶有 pAmpC 的菌株，也常發現 ESBLs 存在，這些 *bla* genes 通常位在同一個質體上，但也可以位



於不同的質體上。目前 pAmpC 雖在腸桿菌屬中傳播，但盛行率依然低於 ESBLs。在義大利，pAmpC:ESBLs 等於 1:12 [70]。2016 年，於西班牙發表的調查中，有 841 個血液感染的案例，由 3GC-resistant *E. coli* 引起，僅有 17 例 (2.02%) 為 AmpC 造成 (cAmpC 佔 0.71%，pAmpC 佔 1.31%) [72]。2013 年至 2016 年於荷蘭的研究，從患者直腸收集 AmpC-producing *E. coli* 盛行率，cAmpC 佔 1.4%，pAmpC 佔 0.9% [73]。2018 年，在澳洲血液感染的患者分離了 70 株 3GC-resistant *E. coli*，其中 95% 帶有 ESBLs，17.1% 帶有 pAmpC (主要為 CMY-2)，同時表現 ESBLs 和 pAmpC 的僅有 4%，有 61.4% 為 ST131，此外，pAmpC 更加常見於 ST131 以外的菌株 [74]。在挪威，也從健康人分離到 ESBL/pAmpC producing *E. coli* 或 *K. pneumoniae*，同時有超過 50% 的分離株耐氟喹諾酮類—ciprofloxacin [75]。

然而，在健康、與患有疾病的伴侶動物中，也有 ESBL/AmpC producing *E. coli* 相關報導 [48, 50, 76-80]。一篇歐洲於 2015 年發表的調查，來自犬貓的 608 個腸桿菌科分離株，共有 22 株耐 cefotaxime，其中 10 株 (*E. coli*, n=8、*K. pneumoniae*, n=2) 為 ESBLs (CTX-M, n=9、TEM, n=1)、10 株 (*E. coli*, n=5、*P. mirabilis*, n=4、*K. pneumoniae*, n=1) 為 pAmpC (CMY-2, n=10)、2 株 (*C. freundii*, n=1、*E. cloacae*, n=1) 為 cAmpC。分析 8 株 ESBL-producing *E. coli* 所得結果：phylogroup B2 (n=3)、D (n=3)、A (n=2)，ST 序列測得為 ST131 和 ST405。分析 5 株 pAmpC-producing *E. coli* 發現：phylogroup A (n=3)、D (n=1)、F (n=1)，ST 序列分型測得為 ST2615 和 ST2171 [81]。*E. coli* ST131，在人類已有許多報導，這些分離株很可能在人類與伴侶動物中交互傳播。



台灣在醫界方面也有相關報告。ESBLs (TEM、SHV、CTX-M) 和 pAmpC (CMY、DHA) 已經在 *E. coli* 和 *K. pneumoniae* 報導出來[82-86]。*E. coli* 以 CTX-M 和 CMY-2 為主要攜帶的酵素，而 *K. pneumoniae* 以 SHV、CTX-M 和 CMY-2 為主[87]。1993 年與 2004 年，從臨床檢體收集了 620 株 *K. pneumoniae*，其中共有 25 株 (4%) 表現 pAmpC，基因型為 *bla*_{ACT-like}、*bla*_{DHA-like} 及 *bla*_{CMY-2-like}，這些基因都位於不同的質體上。透過 conjugation 試驗發現，帶有 *bla*_{CMY-2-like} 的質體具有轉移性[2]。2011 至 2012 年，從菌血症患者身上收集了 133 株 *K. pneumoniae*，有 15 株 (11.3%) 為 pAmpC、7 株 (5.3%) 為 ESBLs，有 2 株 (1.5%) 同時表現 ESBL/pAmpC [4]。有研究指出，當大量產生 AmpC，同時缺乏孔蛋白 porin 表現，這二個條件會誘導細菌對碳青黴烯類產生抗藥性。在台灣就有發現 carbapenem-resistant *E. coli*，表現了 pAmpC (CMY-2 為主)，同時也缺乏孔蛋白 (OmpC/F 為主) [88]。


在台灣獸醫方面，2017 年在中部地區，同時收集生病的人類 (n=44) 與動物醫院 (n=95) 來源的 commensal *E. coli* 進行比較，動物來源的 *E. coli*，多數為 phylogroup A 或 B1，全部具有多重抗藥性，57.8%耐 cefotaxime (3GC)，13.6%帶有 ESBLs，基因型測得 CTX-M-1 group (CTX-M-55) 與 CTX-M-9 group (CTX-M-65)。人類來源的 *E. coli*，多數為 phylogroup B2，100%耐 cefotaxime (3GC)，100%帶有 ESBL，測得為 CTX-M-1 group (CTX-M-3) 與 CTX-M-9 group (CTX-M-14)，兩者來源皆有高比例表現 pAmpC (主要為 CMY-2)，動物部分超過了 65%，但皆沒有偵測到 SHV。另外，這些動物來源的 commensal *E. coli* 部份攜帶 *tetA*、*flo* 與 *mcr-1*，造成對 tetracyclines、phenicols 類以及 colistin 的抗藥性[1]。

到目前為止，還沒有很明確的標準方法來評估 AmpC。AmpC 表現型測試，無法區分為 cAmpC 或是 pAmpC，若菌株同時帶有 ESBLs，則提升偵測的難度，容易造成 ESBLs 偽陰性結果，因此，可透過基因檢測的方法，來檢查相關基因表現。

1.7 MCR-1 磷酸乙醇胺轉移酶


MCR-1 是磷酸乙醇胺轉移酶 (phosphoethanolamine transferase)，能夠耐 colistin，由 *mcr* (mobile colistin resistance) 基因轉錄而來。Colistin 又稱多黏菌素 E (Polymyxin E)，是一種舊型的抗生素，於 1960 年代開始於臨床使用。Colistin 結構上具有親脂性脂肪酰基側鏈，且帶正電荷。但 colistin 對人類有神經毒性，和腎毒性的疑慮，因此鮮少使用於人類醫療[89]。Colistin 作用機制尚未完全明瞭，主要涉及了革蘭氏陰性菌外膜上的脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 和 lipid A，由於 lipid A 帶負電荷，而帶正電荷又具親脂性的 colistin 很容易吸附於上，導致細胞膜結構鬆動，進而破裂導致細菌死亡，該藥物無法作用在革蘭氏陽性菌[14]。

Colistin 已經在獸醫界使用了數十年[90]，特別是在食用動物中，主要治療感染與預防疾病[91]。有鑑於近三十年來，多重抗藥性革蘭氏陰性菌造成的醫療問題日益嚴重，加上新藥開發速度跟不上需求，因此將舊藥新用，是現今治療多重抗藥性革蘭氏陰性菌的後線抗生素[92]。但是抗生素濫用的問題，也逐漸引發細菌產生各種抗藥性，若當作最後手段的後線藥物，也在細菌中產生抗藥性，並且抗藥基因具水平傳播能力，勢必造成全球性的公共衛生問題。到 2020 年為止所發現的可移動耐 colistin 基因，計有 *mcr-1* 至 *mcr-10*，且已經從動物、人類、食品，以及環境中分離出來 [93]。在 2015 年之前，colistin 抗藥性多數與細菌染色體突變相關而



導致，然而，2015 年時，全球首次在中國地區的豬隻上，發現了由質體攜帶，並能水平傳播的 *mcr-1* 基因，從腸桿菌科分離出來。同時，在人類也觀察到 *mcr-1* 的蹤跡，「末日豬」一詞也由此而來[94]。*mcr-1* 是最主要的 *mcr* 基因型，繼 2015 年之後，在各個國家，包含美國[95]、加拿大[96]、南美洲[97, 98]、亞洲[99, 100]、歐洲的英國[101]、法國[102]、德國[103]、義大利[104]、瑞士[105]、丹麥[106]、比利時[107]等國家，陸續都有 MCR-1 的相關報告，到目前為止，一共來自六大洲（南極洲除外）60 多個國家[108]，涵蓋環境、人類、食品、食用動物、伴侶動物等，也說明了 mobile colistin resistant (*mcr*) gene 已開始在全球傳播，人類可能受到影響，導致治療難度提升。令人擔心的是，從文獻中也注意到 *mcr-1* 常與碳青黴烯類，或是 ESBLs 同時存在[97, 99, 109-112]。有研究指出，帶有 *mcr-1* 的 *E. coli*，常見的 ST 為 ST95（與血液感染和新生兒腦膜炎全球性流行株）[113]、ST648 [99]以及共生性的 ST10、ST101、ST156 [114]，另外，ST405 也曾在野生哺乳動物中發現[115]。*mcr-1* 盛行率，在大多數研究中小於 15%，在食用動物中介於 0.35%至 36%，在人類臨床上介於 0.05%至 4.73%，常分離到的細菌為 *E. coli*（0.04%至 3.5%）和 *K. pneumoniae*（0.17%至 2%），在健康的人類中介於 0.65%至 3.54% [114]。

伴侶動物的研究，目前的資料並不多，2016 年在中國一位於寵物店工作的 50 歲男性，分離到帶有 *mcr-1* 的 *E. coli*，調查後發現，其工作環境的 4 隻犬和 2 隻貓身上也帶有 *mcr-1*，說明了攜帶抗藥基因的細菌，可能會在伴侶動物與人類身相互傳播[116]。從 2012 年至 2016 年中國的調查，犬貓上帶有 *mcr-1* 的 *E. coli* 佔所有分離株的 6.1% 至 14.3% [117]。而 2019 年的報告指出，在 44 株帶有 *bla*_{CTX-M} 的 *E. coli* 中，檢測到 3 株帶有 *mcr-1* [118]，這說明了表現 CTX-M 的細菌，具多重抗



藥性之外，可能有較高機會夾帶 *mcr-1*。針對 *bla*_{CTX-M} 和 *mcr-1* 進行調查了 299 個家庭（人類與寵物），其中 3 個家庭為 *mcr-1* 陽性，9 個家庭為 CTX-M 陽性，1 個家庭為 *mcr-1* + CTX-M 陽性，以家庭為單位，*mcr-1* 盛行率為 2.7%，CTX-M 盛行率為 5.3%，看似在伴侶動物與人類間的傳播情形並不高，但仍不可輕忽[119]。其他地區，如阿根廷[112]，厄瓜多爾[120]，以及南韓[121]，*mcr-1* 盛行率在伴侶動物中低於 2%，但是在越南則高達 93% [122]。

台灣最早在 2016 年也進行相關研究，於 2010 年至 2014 年，來自零售生肉與人類患者的 4,589 株 *E.coli* 分離株，共有 32 株檢測到 *mcr-1*，且具有多重抗藥性特徵。其中有 21 株帶有 *bla*_{CTX-M}，共檢測出 18 種 ST，最常見的為 ST38 和 ST117，另外也有測得 ST131 [123]。2012 至 2016 年來自病豬分離出的大腸桿菌，帶有 *mcr-1* 的比例，從 12.5% 提升至 33.3%，當時在病禽類並無觀察到顯著增加[124]。到了 2018 年，在病豬觀察到帶有 *mcr-1* 的 *E. coli* 比例，已提升至 56.5% [125]。不料，在 2017 年時，從健康的雞隻分離出 166 株分離株，*mcr-1* 盛行率就佔 55.4% (92/166)，其中 46 株革蘭氏陰性菌同時存在 ESBLs，主要的基因型為 *bla*_{TEM}、*bla*_{CTX-M} 與較少的 *bla*_{SHV} [5]。同年，年全國性的調查，從人醫院內分離 *E. coli*、*K. pneumoniae*、*Salmonella* spp.，*mcr-1* 盛行率分別為 0.9% (6/686)、0.4% (3/673) 和 0.9% (1/116)。從豬隻分離 16 株 *E. coli*，就有 12 株可偵測到 *mcr-1* [126]。在人類的臨床樣本發現，所有帶有 *mcr-1* 的腸桿菌科分離株，皆帶有多種抗藥性基因，例如：*bla*_{CMY}、*bla*_{NDM}、*bla*_{TEM}、*bla*_{SHV} 和 *bla*_{CTX} [127]。2019 後期，從 3 名社區感染感者，和 1 名院內感染者中發現帶有 *mcr-1* 的 *E. coli*，有 3 例同時帶有 *bla*_{CTX-M} 與 *bla*_{TEM} 基因 [128]。

伴侶動物有多少比例具有攜帶 *mcr-1* 的細菌，台灣的相關報告並不多，加上 MCR-1 與 ESBLs 可能同時存在同一細菌，並且不排除與人類之間的交互傳播，因此評估在寵物分離的細菌，有多少比例攜帶 *mcr-1* 也是非常重要。



1.8 大腸桿菌介紹與分類

大腸桿菌存在於環境、食物、以及人類與動物的腸道中，屬於革蘭氏陰性菌、腸桿菌科的一員。外觀為長桿狀，是兼性厭氧菌，大多數的大腸桿菌是無害的，共生在腸道中。然而，在腸道以外的身體部位，大腸桿菌則可能引起感染而致病。大腸桿菌常分離於人類與動物的疾病中，經常攜帶 ESBLs、pAmpC 和 MCR-1 相關基因，賦予耐 3GC 和 colistin 的能力，已於世界各地報導出來。

大腸桿菌根據臨床上的致病條件，可粗略分為以下三大類[129]：

- (1) 共生性大腸桿菌 (commensal *E. coli*, comEC)：在人和動物腸道中發現的常見菌株，缺乏特定的致病因子。
- (2) 腸道內致病性大腸桿菌 (intestinal pathogenic *E. coli*, IPEC)：又稱腹瀉型大腸桿菌 (diarrheagenic *E. coli*, DEC)。
- (3) 腸道外致病性大腸桿菌 (extraintestinal pathogenic *E. coli*, ExPEC)：又可依感染部位再進行分類，例如：造成尿道感染的 uropathogenic *E. coli* (UPEC)、新生兒腦膜炎的 neonatal meningitis-associated *E. coli* (NMEC)、及敗血症的 sepsis-associated *E. coli* (SEPEC)。

然而，為了更詳細的界定大腸桿菌的來源與群體結構，包含與不同宿主間的共生環境，如何演化適應，又或如何由共生性轉化成致病性，以及預防大流行爆發，科學界專注於致病性大腸桿菌，討論出了一些分類方式，以獲得更全面的資訊。

1.8.1 血清型與毒素分類

為了描述 1940 年代時，嬰兒爆發流行性腹瀉的相關致病性菌株，最早獲得血清型的研究數據，由 Orskov 等人發表於 1976 年。他們找到了具有共通性，但有不同形態的血清抗原。而血清型主要以兩種抗原分類：O 抗原，又稱表面抗原 (somatic Ag)、H 抗原，又稱鞭毛抗原 (flagellar Ag)，後來又參考了 K 抗原，又稱莢膜抗原 (Capsule Ag)。這些基因可選擇性攜帶在質體上，並帶有獨特的毒力因子 (virulence factors)。

依據 attaching and effacing (AE) lesion 與腸毒素 (enterotoxins) 種類，包括志賀毒素 (Shiga toxins)、不耐熱毒素 (heat-labile, LT)、熱穩定毒素 (heat-stable, ST)，可將腸道內致病性大腸桿菌 (IPEC) 分類為以下亞型：

1. 腸致病性大腸桿菌 (enteropathogenic *E. coli*, EPEC)
2. 腸出血性大腸桿菌 (enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC)，又稱產志賀毒素大腸桿菌 (Shiga toxin-producing *E. coli*, STEC)，或是產 Vero 細胞毒素大腸桿菌 (Verocytotoxigenic *E. coli*, VTEC)。例如造成大規模食物中毒的 O157:H7 *E. coli* 即是一種 EHEC。
3. 腸聚合性大腸桿菌 (enteroaggregative *E. coli*, EAEC)

4. 產腸毒素大腸桿菌 (enterotoxigenic *E. coli*, ETEC)
5. 腸侵襲性大腸桿菌 (enteroinvasive *E. coli*, EIEC)
6. 瀰散黏附性大腸桿菌 (diffusely-adherent *E. coli*, DAEC)
7. 黏附侵入性大腸桿菌 (adherent invasive *E. coli*, AIEC)




上述的這些亞型，可造成腸胃道疾病、發炎，輕者腹瀉，重者會引起出血性結腸炎 [130-132]。

另一方面，腸道外致病性大腸桿菌株 (ExPEC)，根據 Johnson 等人提出的定義，帶有下列其中兩組或兩組以上基因者，則屬於 ExPEC：*sfa/foc* (S 與 FIC 菌毛之 subunit)、*papA* 與 *papC* (P 菌毛)、*afa/dra* (Dr-抗原結合黏附素)、*iutA* (aerobactin, 鐵螯合劑)、*kpsMT II* (莢膜基因) [133]。接著，Johnson 等人更指出，毒力基因如 *hly* (溶血毒素) 或 *ompT* (外膜蛋白酶 T subunit) 與 ExPEC 菌株高度相關 [134]，但 ExPEC 沒有用來定義亞型的決定性毒力因子。屬於 ExPEC 並造成大流行的 UPEC (uropathogenic *E. coli*) 之 ST131 分離株，大多數為血清型 O25b:H4，但也有部分是血清型 O16:H5 [135]。血清型並非完全不變，可透過自體突變，或是噬菌體的影響而改變，因此，不能由血清型鑑別 ExPEC *E. coli* 種類，但透過毒力基因檢測，可評估該菌株所帶來的致病能力與嚴重程度。

1.8.2 親緣系統分群 (Phylogenetic grouping)

E. coli 可根據生長的條件背景來進行系統分群。最早期，多基因酶電泳 (multi-locus enzyme electrophoresis, MLEE) 被拿來分析比較不同菌株的酶位移變化，以探



討細菌的遺傳多樣性，在 1980 年代也證實了血清型和遺傳多樣性之間沒有太大關係。親源系統分群最初透過 35 個基因酶的 MLEE 結果進行歸類，定義了 6 個親緣系統類別 (phylogenetic group / phylogroup)，分別是 A、B1、B2、C、D 和 E。到了 1990 年，組別廣義的分為四大類別，主要為 A、B1、B2、D，其中 A 和 B1 組通常不帶有致病的毒力因子，而 B2 和 D 組則多數為帶有毒力因子的腸道外致病性大腸桿菌 (ExPEC)。Clermont 等人在 2000 年時，開發出三重 PCR 方法 [136]，2013 年發展成四重 PCR，可以狹義的定義為 7 個組別 (A、B1、B2、C、D、E、F)，以及隱秘的進化分枝 I (cryptic clade I)。A、B1、C 組特徵偏向於共生性大腸桿菌 (commensal *E. coli*)。B2、D、E、F 特徵偏向於致病性大腸桿菌 (pathogenic *E. coli*)。這些分類是基於血紅素轉運基因 *chuA* (存在於 B2 和 D 組，不存在於 A 和 B1 組)、未知功能的基因 *yjaA* (存在於 B2 組，不存在於 D 組)、匿名 DNA 片段 TspE4.C2 (存在於 B1，不存在於 A) 及 *arpA* 基因 (作為內控制組，並能從 D 組中區分出 F 組，不存在於 B2、F、隱秘進化枝 II、III、IV、V 組別內) [137, 138]。

在不同宿主間，各個親緣系統組別也佔有不同的優勢，由於生物多樣性、健康狀態變化、及採樣來源差異性，較困難用以非常精確的定義，但可大致做一個廣義參考，例如：在人類中常見為 A 組 (40.5%) 和 B2 組 (25.5%)，B1 與 D 組較為少見 (各佔 17%)。而在家畜或是野生動物中，則發現常見 B1 組 (41%)、A 組 (22%)、B2 組 (21%)，較為少見 D 組 (16%)。然而，草食性與雜食性動物的腸道有利於 B2 組生長、A 組容易從消化道中發現、B1 組容易從糞便中發現。另外也發現，B2 組比例在野生動物中較多，在家畜中較少，A 組則在野生動物中較少，在家畜中較多。研究報告發現，社會經濟因素也是一個影響因素 (衛生水準、飲食


條件等)，在 1980 年到 2000 年間，法國地區分離的 B2 組由 10% 提升至 30%，而 A 組則由 60% 降至 30% [139]。



E. coli 與抗藥性和毒力基因間的關係，可以透過親緣系統的背景來參考，ExPCE 絕大多數屬於 B2 組，B2 組的菌株容易偵測到毒力因子，而 A 組中則不常發現 [140]。在 2017 年來自加拿大的一篇研究說明，對氟喹諾酮類與頭孢菌素類具有抗藥性的菌株，在 ExPEC 中超過 30% 為 ST131，是主要造成全球大流行的菌株，其中 ST131 又有 60~90% 對氟喹諾酮類具有耐受性，而有 40~80% 能產生 ESBLs [141]。D 組如 ST69、ST393、ST405 是全球常見的 ExPEC 譜系。F 組相較於 B2 組，多數缺乏了造成腸道外感染的毒力因子，如 ST648、ST354、ST3711，對氟喹諾酮類或廣譜頭孢菌素具有耐受性 [142]。E 組被檢測出血清型帶有 O157 或 O55，如 O157:57 則屬此類別，然而，*E. coli* 的親緣系統進化史被同源染色體重組影響著，較相似的組別會彼此重組，如 B2 與 D 組間有很高的重組率、A 與 B1 組有很高的重組率、E 組特別傾向於和 EHEC 或 EPEC 進行重組，另外，B2 則和 A、B1、E 組有重組上的限制 [143]。

1.8.3 多基因座序列分型 (Multi-locus sequence typing, MLST)

MLST 是一種驗證菌株譜系的方法，由 Maiden 等人在 1998 年提出。這是一種核苷酸測序的方法，透過 PCR 擴增管家基因 DNA，然後加以定序，並識別等位基因編號 (allele number)，進一步獲得該菌株的 sequence type (ST)，此篇研究選擇以腦膜炎奈瑟氏球菌 (*Neisseria meningitidis*) 開發並驗證，共分析了 11 個管家基因序列，最後驗證了 6 個管家基因與 MLEE 結果完全一致 [144]。




MLST 方法，發展於早期的多基因酶電泳 (multi-locus enzyme electrophoresis, MLEE) 基礎上，在當時，MLEE 是用來監測長期流行病學最合適的鑑定工具，但其缺點為實驗程序繁複，並且每間實驗室條件不同，做出來的結果較難有一致性標準。另外，相同的蛋白質序列，在 DNA 層次可能有不同的核酸序列，MLEE 方法難以確認分析。MLST 並非透過核苷酸序列，而是以等位基因 (allele) 進行比較，排除掉與基因型多樣性無關的點突變，而大部分的 MLST 分析系統會以 7 個基因座來分析，每個基因座都可根據其序列來鑑別 allele number，雖然這個方法可在核酸序列上鑑別不同 ST，但這方法也有一些限制，如在流行病學的研究上，更精細的亞型、分型，如精確的毒力基因、或是血清型分類，需要再藉由其他的分子分析方法來達成[145]。

1.9 *E. coli* ST131-O25b (O25b : H4)

E. coli ST131，是一種腸道外致病性大腸桿菌 (ExPEC)，在 2000 年代開始，是一株人類的重要病原體，且具有多重抗藥性的特徵，主要引起社區型的感染[146]，是於全世界大流行的毒株，在世界各地，包含歐洲、美洲、亞洲、中東、非洲、澳洲都有報導，包含人類與動物[147]。多數的 ST131 分離株，主要發現於人類的尿道感染 (UTI) 案例[43]，光是在 PubMed 資料庫鍵入「ST131」就有 1060 筆文章。*E. coli* ST131 通常耐氟喹諾酮類，並與 ESBL 產生有關，尤其是 CTX-M-15，多數屬於 phylogroup B2 [148]，但也有 phylogroup B1 的罕見例子[149]。

ST131 目前主要的兩種血清型，多數為 O25 : H4，另一種為 O16 : H5，研究發現 ST131 O16 : H5 的菌株，對於氟喹諾酮類的藥物有較高的感受性，反之 ST131



O25b:H4 的菌株有 90% 對於氟喹諾酮類的藥物有抗藥性[150]。在 2008 年時，有兩組不同的研究團隊在同個時期描述了 ST131 與血清型 O25b (O25b:H4)，該菌株的質體上夾帶了 *bla*_{CTX-M} 基因之外，同時攜帶更強大的毒力因子[151, 152]。在印度一篇報導中，分離了 16 株 ST131，發現 16 株全帶有 CTX-M-15，有 8 株附帶 TEM，有 12 株對 β -lactam 類以外的抗生素具有抗藥性，並可攜帶高達 6 個質體，從 16 株 ST131 之中，檢測 38 種毒力基因，其中有 23 種被檢測到至少 1 次，最主要包含 *chuA*、*traT*、*sitD*、*ompA*、*iucD*、*sat*、*fyuA*、*feoB* 等的黏附素、毒素、鐵轉運蛋白和保護素[153]。此外，從 2008 年至今，*E. coli* ST131 O25b，在健康的人類[154-157]、健康的伴侶動物[158, 159]，和尿道感染的犬也有報導[160]，甚至也在 ST131 中發現了攜帶 *mcr-1* 的例子[161-163]。

在台灣醫界，已有 ST131-O25b 在成人菌血症[164, 165]、嬰兒尿毒症的案例分離[166]。南部區域的河水採樣尚未側得[167]。針對 18 歲以下孩童住院治療 3 天內進行糞便分離 *E. coli*，8.3% (13/157) 為 ST131-O25b，且均攜帶 ESBLs，其中 5 株帶有 CTX-M-9、4 株為 CTX-M-14 [168]。自 2002 年至 2016 年間，共分析 2,997 株從人類尿道感染的案例所分離出的 *E. coli*，共有 542 株 ST131，盛行率由 11.2% 提升至 17.4%，對氟喹諾酮類與 3GC (ciprofloxacin / cefotaxime) 的抗藥性比例，由 33.3% 提升至 72.1% [169]。另外，在健康成人的調查，自 2016 年 4 月至 2017 年 6 月，從糞便樣本中分離到 ST131 佔 3.0% (22/724) [170]，除了盛行率與抗藥性的提升，也在健康人類中偵測到 ST131。



在台灣的獸醫界，自 2014 年至 2017 年，來自犬貓臨床樣本所分離的 ESBL-producing *E. coli* 中，ST131 佔 15.4% (10 / 65)，其中 8 株為 ST131-O25b [56]，甚至在健康犬之中也發現了 ST131，279 株 *E. coli* 分離株 (來自健康犬與患病犬)，以 phylogroup B2 為最多數 (30.11%)，其次依序為 B1 (26.2%)、A (15.8%)、F (10.8%)、D (8.6%)、E (7.2%)、C (1.4%) [58]。 *E. coli* ST131 是人類中常見的流行毒株，O25b:H4 血清型之毒力更為強盛，本研究將透過 PCR 方式檢測 ST131-O25b 高毒力流行株，藉以評估 ST131 在人類與伴侶動物之間交流傳播抗藥基因的可能。

第二章 材料與方法



2.1 標準菌株來源

本研究採用標準菌株作為品質管控標準 (Quality control, QC)，以供嚴謹實驗參照，包含 *E. coli* ATCC 25922 – 1946 年從臨床上分離於西雅圖，作為 ESBL/pAmpC/MCR-1 之陰性控制組(negative control)及藥物敏感性實驗標準參照。*E. coli* NCTC 13846 – 2013 年從臨床上分離於英國倫敦，其特性為 colistin-resistant *mcr-1*-positive 的大腸桿菌。*E. coli* J53 (ATCC BAA-2730™) 為 *E. coli* K-12 的衍生株，對疊氮化鈉 (sodium azide, NaN₃) 具有抵抗性，普遍作為接合質體轉移試驗的接受者 (recipient)。另外 *K. pneumoniae* ATCC 700603 – 1994 年從臨床檢體分離的菌株，作為表現型確認紙錠擴散試驗的陽性對照菌株以及異種接合質體轉移試驗的 ESBL positive 提供者 (donor)，此菌株帶有 *bla*_{SHV-18} 基因。

2.2 樣本收集與保存

收集檢體期間為 2020 年 6 月 29 日至 12 月 31 日止，樣本來自國立臺灣大學生物資源暨農學院附設動物醫院，凡來就診之犬貓，不論感染部位、病程輕重程度，進行細菌培養者，共有 513 個 case，有生長並培養出菌落者為 172 個 case，共分離了 249 株分離株。經由自動化鑑菌系統 Vitek 2 Compact 鑑定出 58 株 *E. coli* 分離株，排除了一些樣本流失，進行分析的共有 50 株 *E. coli* 分離株，經確認後的樣本，將菌落以接種環刮下，儲存於 Microbank™ 中，保存於 -80°C 冰箱，以利後續分析。

2.3 分離株核酸萃取

所有的細菌分離株皆採用煮沸法 (boiling method) 進行核酸萃取，方法簡述如



下：

前一天先將菌株接種於 3mL 的 Tryptic soy broth, TSB (Acumedia®, Lansing, MI, USA), 在 37°C 培養 18 至 24 小時，取出 1mL 至微量離心管，離心 12,000 ×g，3 分鐘，去除上清液，以 1 mL double-distilled water (DDW) 清洗後 vortex，離心 3 分鐘，去除上清液，加入 0.5 mL DDW，vortex 勻稱後，移至煮沸的水中，等待 10 至 15 分，以 16,000 ×g 離心 10 分鐘，將上清液取至新的微量離心管，標示後保存於-20°C 冰箱。

2.4 親緣關係分析

2.4.1 親緣系統分群 (Phylogenetic grouping)

所有的大腸桿菌分離株透過四重聚合酶鏈鎖反應 (quadruplex polymerase chain reaction, quadruplex PCR) 方式，分類為 A、B1、B2、C、D、E、F 及 clade I 八個 phylogenetic group。檢測的基因分別為 *chuA* (288bp)、*yjaA* (211bp)、*TspE4.C2* (152 bp)、以及 *arpA* (400 bp)。根據瓊脂糖凝膠電泳 (agarose gel electrophoresis) 結果，所呈現 PCR 產物分子量的不同來做分類，group C 和 E 則需要進行第二次 single PCR 進行確認，檢測基因分別為 *trpA* (219 bp) 和 *arpA* (301 bp)，關於本論文使用的所有引子資訊，請參見 Table 1。

方法簡述如下：

1. PCR 反應：在微量離心管中加入 Taq 2X master mix (Ampliqon Odense M, Denmark) 25 μL、引子 *chuA* (F/R)、*yjaA* (F/R)、*TspE4.C2* (F/R)、*arpA* (F/R) 各 1 μL (10 μM)、DDW (double-distilled water) 12 μL、lysate 5 μL。

Group C和E則加入2X master mix 25 μ L、引子Group C (F/R) or Group E (F/R) 1 μ L (10 μ M)、DDW 18 μ L、lysate 5 μ L，反應總體積為50 μ L。反應條件為：94°C、4分鐘預熱。然後以94°C、5秒，59°C (group E 57°C)、20秒，72°C、30秒，進行30次循環。最後以72°C、5分鐘完成PCR反應，將產物保存於4°C。

2. 瓊脂糖凝膠電泳：配製2.0%瓊脂糖膠體，在60 mL 1X TAE buffer (tris-acetate-EDTA buffer)，加入1.2 g agarose (Amresco®, Solon, OH, USA)，微波至溶解無顆粒、液體透明，等待冷卻至不燙手，內染劑 Fluoro Vue™ NS1000 加入6 μ L (SMOBIO, Hsinchu City, Taiwan) 混合均勻，倒至鑄膠模板，等待30分鐘冷卻凝固，將膠體放入電泳槽 Mupid®-2plus (ADVANCE, Tokyo, Japan)，補入1X TAE buffer至基準線，以100V進行30分鐘電泳，結束後，將膠體移至冷光照膠台B-Box™ Blue Light LED epi-illuminator (SMOBIO) 判讀結果。各組別 $arpA$ (400bp)， $chuA$ (288bp)， $yjaA$ (211bp)， $TspE4.C2$ (152bp)，依序表現為：A組 (+—)；B1組 (+++)；B2組：(—++、—+++、—++)；F組 (—++)；A或C (+—)；D或E (++—、+++)；E或進化枝I (+++—)。

2.4.2 多基因座序列分型 (Multi-locus sequence typing, MLST)

本實驗將ESBL/pAmpC producing *E. coli* 的分離株進行多基因座序列分析，共有16株，透過PCR方法，檢測七個管家基因 (housekeeping genes)： adk (583 bp)、 $fumC$ (806 bp)、 $gyrB$ (911 bp)、 icd (878 bp)、 mdh (932 bp)、 $purA$ (816 bp)、 $recA$ (780 bp)，進行這些菌株的親緣分型。

方法簡述如下：



1. PCR反應：在微量離心管中加入2X master mix 25 μL 、引子(F/R) 1 μL (10 μM)、double-distilled water (DDW)18 μL 、lysate 5 μL ，反應總體積為50 μL 。反應條件為：95°C、5分鐘，95°C、30秒，annealing溫度隨不同基因而有所不同 (*adk*、*fumC*、*icd*、*purA* = 54，*gyrB*、*mdh* = 60，*recA* = 58)、20秒，72°C、30秒，進行35次循環，72°C、5分鐘，最終保存於4°C。
2. 瓊脂糖凝膠電泳：配製2.0 %瓊脂糖膠體，在60 mL 1X TAE buffer (tris-acetate-EDTA buffer)，加入1.2 g agarose (Amresco®)，微波至溶解無顆粒、液體透明，等待冷卻至不燙手，內染劑 Fluoro Vue™ NS1000 加入6 μL (SMOBIO) 混合均勻，倒至鑄膠模板，等待30分鐘冷卻凝固，將膠體放入電泳槽 Mupid®-2plus (ADVANCE)，補入1X TAE buffer至基準線，以100 V進行30分鐘電泳，結束後，將膠體移至冷光照膠台 B-Box™ Blue Light LED epi-illuminator (SMOBIO) 判讀結果。
3. 序列定序：將預期片段的 PCR 產物自膠體上切下，委外定序 (請參照 2.9)，定序結果利用 DNASTAR software (DNA Star Inc., Madison, WI,USA) 分析，並將序列結果上傳至 PubMLST (<https://pubmlst.org/>) 資料庫進行比對，得到 7 個管家基因的 allele number 後，再透過 EnteroBase 資料庫 (<http://enterobase.warwick.ac.uk/>) 比對 sequence types。

2.5 ST131-O25b 血清型鑑定

具備O25b血清型之ST131擁有更強的毒力及抗藥性，因此擬對本實驗所分離的ST131菌株進行O25b血清型的鑑定。可以透過PCR方法，檢測*trpA* (427 bp) 及 *pabB* (347 bp) 基因。

方法簡述如下：

1. PCR反應：在微量離心管中加入2X master mix 25 μ L、引子(F/R) 1 μ L (10 μ M)、double-distilled water (DDW) 18 μ L、lysate 5 μ L，反應總體積為50 μ L。反應條件為：94 $^{\circ}$ C、4分鐘，94 $^{\circ}$ C、5秒，65 $^{\circ}$ C、10秒，72 $^{\circ}$ C、30秒，進行30次循環、72 $^{\circ}$ C、5分鐘，最終保存於4 $^{\circ}$ C。
2. 瓊脂糖凝膠電泳：配製2.0%膠體，在60 mL 1X TAE buffer (tris-acetate-EDTA buffer)，加入1.2 g agarose (Amresco[®])，微波至溶解無顆粒、液體透明，等待冷卻至不燙手，內染染劑 Fluoro Vue[™] NS1000 加入6 μ L (SMOBIO) 混合均勻，倒至鑄膠模板，等待30分鐘冷卻凝固，將膠體放入電泳槽 Mupid[®]-2plus (ADVANCE)，補入1X TAE buffer至基準線，以100 V進行30分鐘電泳，結束後，將膠體移至冷光照膠台B-Box[™] Blue Light LED epi-illuminator (SMOBIO) 判讀結果。
3. 判讀結果：*trpA*基因作為control，屬於ESBL producing *E. coli*皆會測得此DNA片段，若為血清型O25b之ST131大腸桿菌，則能額外測得*pabB*基因的PCR產物，因此ESBL producing *E. coli*又為血清型O25b之ST131，則同時可偵測到*trpA*與*pabB*。



2.6 ESBLs 表現型鑑定


2.6.1 CHROMagar™ ESBL 篩選

此培養基的特性，是利用特殊呈色劑以及內含有第三代頭孢子菌素，可快速篩選產生 ESBL 的革蘭氏陰性菌。若為 *E. coli* 會呈現粉色或略帶紅色。*Klebsiella* spp.、*Enterobacter* spp.、*Citrobacter* spp. 呈現金屬藍。*Proteus* spp. 則帶有棕色光環。有海報測試，此培養基的敏感性為 98 %、特異性為 97 % (*G. Klysova and al. ECCMID 2016*)。

操作前一天，會先將保存於-80°C 的分離株活化於 Trypticase soy agar (TSA) plate，經過 37°C 培養 18 至 24 小時之後，挑起單一菌落，劃在 CHOMagar™ ESBL plate，若從畫線開始到最後細菌都有生長，則初步判定為 ESBL positive，反之，則判定為 negative。

2.6.2 表現型確認紙錠擴散試驗 (Phenotypic confirmatory disc diffusion test, PCDDT)

為再次驗證 ESBL positive 的結果，進一步進行表現型確認紙錠擴散試驗，參照美國臨床實驗室標準協會 (Clinical & Laboratory Standards Institute, CLSI) 的研究方法進行操作與判讀，該試驗使用 Mueller-Hinton Agar (MHA) 和兩組抗生素藥片。第一組：頭孢他啶 (Ceftazidime, CAZ) 30 μg 和頭孢他啶+克拉維酸 (Ceftazidime/Clavulanic acid, CAZ-CLA) 30/10 μg。第二組：頭孢噻肟 (Cefotaxime, CTX) 和頭孢噻肟+克拉維酸 (Cefotaxime /Clavulanic acid, CTX-CLA) 30/10 μg，標準菌株 *E. coli* ATCC 29522 及 *K. pneumoniae* ATCC 700603 分別作為陰性及陽性對照菌株。操作方法簡述如下：

- 
1. 第一天將待測試之菌株活化，接種於 TSA，於 37°C 培養 18 至 24 小時。
 2. 將菌落以接種環挑起，以 0.9% NaCl 之溶液，將濁度調至 0.5 McFarland[®] (1-2 × 10⁸ CFU/mL)，之後以無菌棉棒沾取，均勻塗至 Mueller-Hinton Agar (MHA)。
 3. 拿取乾淨的鑷子，沾取 75% 酒精，並過酒精燈，等待鑷子溫度冷卻。
 4. 貼上第一與第二組藥片於 MHA plate 上，每夾取一片抗生素藥片都皆須重複步驟 3。
 5. 貼完兩組藥片，於 37°C 培養 16 至 18 小時後進行判讀。
 6. *E. coli* ATCC 29522 作為陰性對照，在兩組中的抑菌圈直徑差 ≤ 2mm，然而所測試之樣本，至少其中一組直徑差 ≥ 5mm，才判定為 ESBL positive。陽性對照 *K. pneumoniae* ATCC 700603 也應呈現同樣的表現型。

2.7 ESBL / pAmpC / MCR-1 抗藥基因型鑑定

2.7.1 Extended-spectrum β-lactamase (ESBLs)

為了鑑別 ESBLs 的基因型，針對最為常見的 Ambler Class A 測定 *bla*_{TEM}、*bla*_{SHV}、*bla*_{CTX-M} groups (包含 CTX-M-1、CTX-M-2、CTX-M-8、CTX-M-9、CTX-M-25)。

方法簡述如下：

1. PCR 反應：在微量離心管中加入 2X master mix 25 μL、引子 (F/R) 1 μL (10 μM)、double-distilled water (DDW) 18 μL、DNA 5 μL，反應總體積為 50 μL。反應條件為：95°C、5 分鐘，95°C、30 秒，annealing 溫度隨不同



基因而有所不同 (TEM、CTX-M-9 = 55, SHV、CTX-M-1 = 54, CTX-M-2、CTX-M-8、CTX-M-25 = 52)、40秒, 72°C、1分, 進行35次循環, 72°C、10分鐘, 最終保存於4°C。

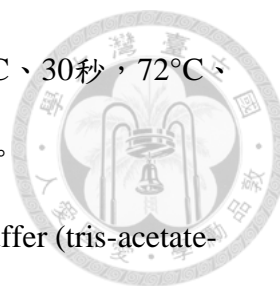
2. 瓊脂糖凝膠電泳：配製2.0%膠體, 在60 mL 1X TAE buffer (tris-acetate-EDTA buffer), 加入1.2 g agarose (Amresco®), 微波至溶解無顆粒、液體透明, 等待冷卻至不燙手, 內染劑 Fluoro Vue™ NS1000 加入6μL (SMOBIO) 混合均勻, 倒至鑄膠模板, 等待30分鐘冷卻凝固, 將膠體放入電泳槽 Mupid®-2plus (ADVANCE), 補入1X TAE buffer至基準線, 以100V進行30分鐘電泳, 結束後, 將膠體移至冷光照膠台 B-Box™ Blue Light LED epi-illuminator (SMOBIO) 判讀結果。
3. 序列定序：將預期片段自膠體上切下, 送往定序 (請參照 2.9), 定序結果透過 SeqMan software 處理, 並將序列於 Beta-Lactamase DataBase - Structure and Function (<http://www.bldb.eu/>) 資料庫進行分析比對, 即可得到基因型編號。

2.7.2 Plasmid-mediated AmpC (pAmpC)

所測定的基因為 Ambler Class C 的 *bla*_{AmpC} 包含 CIT-M、DHA, 以及 MOX 三個常見的 group。

方法簡述如下：

1. PCR反應：在微量離心管中加入2X master mix 25μL、引子(F/R) 1μL (10μM)、double-distilled water (DDW) 18μL、DNA 5μL, 反應總體積為




- 50 μ L。反應條件為：94 $^{\circ}$ C、3分鐘，94 $^{\circ}$ C、30秒，64 $^{\circ}$ C、30秒，72 $^{\circ}$ C、1分，進行30次循環，72 $^{\circ}$ C、10分鐘，最終保存於4 $^{\circ}$ C。
2. 瓊脂糖凝膠電泳：配製2.0%膠體，在60 mL 1X TAE buffer (tris-acetate-EDTA buffer)，加入1.2 g agarose (Amresco[®])，微波至溶解無顆粒、液體透明，等待冷卻至不燙手，內染劑 Fluoro Vue[™] NS1000 加入6 μ l (SMOBIO) 混合均勻，倒至鑄膠模板，等待30分鐘冷卻凝固，將膠體放入電泳槽 Mupid[®]-2plus (ADVANCE)，補入1X TAE buffer至基準線，以100V進行30分鐘電泳，結束後，將膠體移至冷光照膠台B-Box[™] Blue Light LED epi-illuminator (SMOBIO) 判讀結果。
 3. 序列定序：將預期片段自膠體上切下，送往定序(請參照 2.9)，定序結果透過 SeqMan software 處理，並將序列於 Beta-Lactamase DataBase - Structure and Function (<http://www.bldb.eu/>) 資料庫進行分析比對，即可得到基因型編號。

2.7.3 MCR-1 encoding gene

檢測 *mcr-1*，並以 ATCC 25922 為陰性對照組，NCTC 13846 為陽性對照組。

方法簡述如下：

1. PCR反應：在微量離心管中加入2X master mix 25 μ L、引子CLR-5(F/R) 1 μ L (10 μ M)、double-distilled water (DDW) 18 μ L、DNA 5 μ L，反應總體積為50 μ l。反應條件為：95 $^{\circ}$ C、5分鐘，95 $^{\circ}$ C、30秒，58 $^{\circ}$ C、40秒，72 $^{\circ}$ C、1分，進行30次循環，72 $^{\circ}$ C、10分鐘，最終保存於4 $^{\circ}$ C。



2. 瓊脂糖凝膠電泳：配製2.0%膠體，在60 mL 1X TAE buffer (tris-acetate-EDTA buffer)，加入1.2 g agarose (Amresco®)，微波至溶解無顆粒、液體透明，等待冷卻至不燙手，內染劑 Fluoro Vue™ NS1000 加入6μL (SMOBIO) 混合均勻，倒至鑄膠模板，等待30分鐘冷卻凝固，將膠體放入電泳槽 Mupid®-2plus (ADVANCE CO)，補入1X TAE buffer至基準線，以100V進行30分鐘電泳，結束後，將膠體移至冷光照膠台B-Box™ Blue Light LED epi-illuminator (SMOBIO) 判讀結果。

2.8 藥物敏感性試驗

2.8.1 紙錠擴散試驗 (Disc diffusion test, DDT)

參照美國臨床實驗室標準協會 (Clinical & Laboratory Standards Institute, CLSI) 的研究方法進行操作與判讀，操作前一天先將欲分析之菌株活化於 Trypticase soy agar (TSA) plate，於37°C 培養 18 至 24 小時，以 0.9% NaCl 調整濁度為 0.5 McFarland ($1-2 \times 10^8$ CFU/mL)，之後以無菌棉棒沾取，均勻塗至 Mueller-Hinton Agar (MHA)，貼上抗生素紙錠於 plate 上，於 37°C 培養 16 至 18 小時後進行判讀。

本實驗所測定的抗生素包含乙內醯胺類 (β -lactams)：ampicillin (AM) 2 μ g、augmentin (AMC，含 amoxicillin 20 μ g/ clavulanic acid 10 μ g)、cefixime (CFM) 5 μ g、ceftiofur (XNL) 30 μ g、imipenem (IPM) 10 μ g；氟喹諾酮類 (fluoroquinolone, FQ)：ciprofloxacin (CIP) 5 μ g、enrofloxacin (ENO) 5 μ g；四環素類 (tetracyclines)：doxycycline (D) 30 μ g；胺基配糖體類 (aminoglycosides)：gentamicin (GM) 10 μ g；磺胺類 (sulfonamides)：sulfamethoxazole 23.75 μ g with trimethoprim 1.25 μ g (SXT)。

2.8.2 最小抑菌濃度測試 (Minimum inhibitory concentration test, MIC)

本實驗所檢測之抗生素為多黏菌素，又稱 colistin 或 polymyxin E。

操作方法簡述如下：

1. 參照 European Committee on Antimicrobial Testing (EUCAST-v11.0 2021) 的建議做法，操作前一天預先將分離株與標準菌株 ATCC 25922 (quality control) 及 NCTC 13846 (positive control) 接種於 MacConkey agar，37°C 培養 16 至 24 小時。
2. 將每隻菌株以 0.9%NaCl 調整濁度至 0.5 McFarland，再從中取 100 μ L，加入 10 mL Mueller-Hinton Broth (MHB) 稀釋 100 倍，此時菌落量落在 10^5 CFU/mL。
3. 配製 colistin sulfate (BioVision, Milpitas, Amarica) 至 MHB 中 (512 μ g/mL)，並加入 200 μ L 至 U 型 96 孔盤第 1 欄，第 2 至第 12 欄補入 100 μ L Mueller-Hinton Broth (MHB)，再進一步以八爪微量分注器以 100 μ L 進行連續稀釋。
4. 最後補入 100 μ L 的 10^5 CFU/mL 的相應菌液到第 1 欄至第 10 欄，最終濃度由左至右依序為 256、128、64、32、16、8、4、2、1、0.5、0 (μ g/mL)、negative control。
5. 於 37°C 培養 18 至 20 小時判讀結果，沉澱物 \geq 2mm 視為 resistant，前一個濃度即視為最小抑菌濃度。根據 EUCAST 標準，colistin MIC \geq 2 μ g/mL 即視為 resistant。



2.9 基因片段定序

所有預期的片段序列，委託源資國際生物科技有限公司 (Tri-I Biotech, Inc.) 進行定序工作，使用系統為 ABI 3730 DNA Analyzer System。



2.10 接合試驗 (Conjugation experiment)

以帶有 ESBL/pAmpC 之 16 株來自臨床檢體的 *E. coli* 作為抗藥基因提供者，帶有抗 sodium azide 特性的 *E. coli* J53 作為抗藥基因的接受者。異種接合測試則採用 *K. pneumoniae* ATCC 700603 為提供者。所使用的選擇性培養基為 MacConkey agar (sodium azide 150 mg/L, cefotaxime 2 mg/L)，此實驗參考 Tamang 等人提出之方法，採用液體接合 (broth mating) 法，並加以調整[171]。此實驗目的為測試 ESBL 及 pAmpC 是否由質體所攜帶，並可藉由接合作用，平行傳遞抗藥基因。方法簡述如下：

1. 第一天先將提供者 (donor) 與接受者 (recipient) 菌株從 -80°C 移出，接種於 5mL 的 Tryptic soy broth (TSB)，於 37°C 培養 18-24 小時。
2. 第二天將 donor 0.5mL 和 recipient 0.5mL (1:1) 混和在養菌管中，於 37°C 靜置培養 1 hr。
3. 將每一組樣本快速震盪 (vortex) 1 min 以終止接合作用。
4. 取 0.5mL 之菌液，均勻滴在培養基表面上，並將多餘的液體移除，讓培養基乾燥 5 至 15 分鐘。
5. 於 37°C 培養 18 至 24 小時，可生長於培養基的菌落應該是已成功接受 ESBL/pAmpC 基因的 J53 菌株。後續可進一步透過 PCR 檢測 ESBL/pAmpC 基因，再將所測得之抗藥基因與進行接合前的 donor 菌株做比較。

第三章 實驗結果



3.1 大腸桿菌盛行率與分離株來源

所有細菌分離株來自國立臺灣大學生農學院附設動物醫院就診，並進行細菌分離之犬貓。分離期間為 2020 年 6 月 29 日起，至 2020 年 12 月 31 日止。在 513 個病例中，有 172 個病例分離出病原菌，一共分離了 249 株細菌。其中最常見的是 *E. coli*，占了 58 株 (58/249, 23.3%)，其中從犬科動物分離出 46 株 (46/58, 79.3%)、貓科動物分離出 12 株 (12/58, 20.7%)，詳細微生物分離的結果列於 Table 2。

在排除一些樣本流失後，最終進行分析的 *E. coli* 共有 50 株 (犬 n=41、貓 n=9)。這些 *E. coli* 最常分離的檢體或部位依序為：尿液 (38/50, 76%)、肛周部位 (3/50, 6%)、手術部位 (2/50, 4%)、鼻涕 (2/50, 4%)、口腔腫塊 (1/50, 2%)、腹水 (1/50, 2%)、子宮蓄膿 (1/50, 2%)、體液 (1/50, 2%)、以及未標示 (1/50, 2%)。

3.2 β -lactamase 基因型與盛行率

3.2.1 Extended-spectrum β -lactamase (ESBLs)

分析的 50 株 *E. coli* (犬 n=41、貓 n=9)，先透過 CHOMagar™ ESBL 進行初步篩選，再進行表現型確認紙錠擴散試驗。共有 10 株 (犬 n=7、貓 n=3) 為 ESBL-producing *E. coli*，盛行率為 20% (10/50)，最後進行 ESBL 基因型 PCR 檢測，分別皆檢測了 *bla*_{TEM}、*bla*_{SHV}、*bla*_{CTX-M-1}、*bla*_{CTX-M-2}、*bla*_{CTX-M-8}、*bla*_{CTX-M-9} 以及 *bla*_{CTX-M-25} 等 7 種 ESBL 基因型別，結果如下：ESBL-producing *E. coli* 所測得 *bla*_{TEM} n=5 (5/50, 10%)、*bla*_{CTX-M-1} n=6 (6/50, 12%)、*bla*_{CTX-M-9} n=5 (5/50, 10%)，然而 *bla*_{SHV}、*bla*_{CTX-M-2}、*bla*_{CTX-M-8}、*bla*_{CTX-M-25} 皆無發現。



PCR 產物經過定序後，參照資料庫比對序列 (Beta-Lactamase DataBase - Structure and Function, <http://www.bldb.eu/>)，屬於 *bla*_{TEM} group 的基因型有 TEM-215 (3/50, 6%) 與 TEM-243 (2/50, 4%)。 *bla*_{CTX-M-1} group 的基因型有 CTX-M-55 (2/50, 4%)、CTX-M-199 (1/50, 2%)、CTX-M-211 (1/50, 2%)、CTX-M-238 (2/50, 4%)。 *bla*_{CTX-M-9} group 的基因型有 CTX-M-235 (5/50, 10%)。ESBL-producing *E. coli* 可同時帶有多種類的 ESBL 基因，在這 10 株中有 2 株同時帶有 CMY-2 基因。結果 3.2 至 3.3，請參見 Table 3。

3.2.2 Plasmid-mediated AmpC (pAmpC)

將 50 株 *E. coli* (犬 n=41、貓 n=9) 全數進行 PCR 檢測 *bla*_{pAmpC} 相關基因，包含 CIT-M、MOX、DHA group，結果如下： pAmpC producing *E. coli* 所測得 8 株 (犬 n=7、貓 n=1)，全數為 CIT-M group，n=8 (8/50, 16%)，MOX 與 DHA 則皆無發現。

本實驗判定為 CIT-M 的 PCR 片段經定序後，參照資料庫比對序列 (Beta-Lactamase DataBase - Structure and Function, <http://www.bldb.eu/>)，確認序列為 CMY-2 family，基因型為 CMY-171 (8/8, 100%)。透過 NCBI 的 Basic Local Alignment Search Tool，BLST 資料庫 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi/>) 比對 CMY-2 與 CMY-171 之核苷酸序列，Identities 為 1145/1146 (99%)。

在這 8 株帶有 *bla*_{CMY-2} 的 *E. coli*，其中有 2 株同時也表現 ESBL，1 株為 TEM-243，另一株為 CTX-M-55。



3.3 ESBL/pAmpC producing *E. coli* 之親源關係

3.3.1 親緣系統分群 (Phylogenetic grouping)

所有收集到的 50 株 *E. coli*，透過檢測 *chuA* (288bp)、*yjaA* (211bp)、*TspE4.C2* (152bp)、以及 *arpA* (400bp) 這四個片段，可分為 A、B1、B2、C、D、E、F 及 cladeI 八個 phylogroup，這些來自臨床所分離到的 *E. coli* 最多數為 B2 group (35/50, 70%) 其次依序為 B1 group (6/50, 12%)、F group (4/50, 8%)、E group (2/50, 4%)、A group (1/50, 2%)、C group (1/50, 2%)、D group (1/50, 2%)，見 Figure 1。

ESBL/pAmpC producing *E. coli* 共有 16 株，最多數者為 B2 group (9/16, 56.25%) 其次依序為 B1 group (3/16, 18.75%)、A group (1/16, 6.25%)、C group (1/16, 6.25%)、D group (1/16, 6.25%)、F group (1/16, 6.25%)。從實驗結果中，發現了 8 株 ESBL producing *E. coli* 皆為 B2 group 的成員，而 6 株 pAmpC producing *E. coli* 幾乎在各種分群中都有發現 (B1、B2、C、D、F)，此外，2 株同時表現 ESBL/pAmpC 的 *E. coli* 皆分離自犬隻，且為共生性類別 (A 和 B1)。不論在犬或貓，分離株主要為 B2 group。

3.3.2 多基因座序列分型 (Multi-locus sequence typing, MLST)

本實驗將 ESBL/pAmpC producing *E. coli* 共 16 株，進行 MLST 分析，檢測七個管家基因 (housekeeping genes)：*adk* (583 bp)、*fumC* (806 bp)、*gyrB* (911 bp)、*icd* (878 bp)、*mdh* (932 bp)、*purA* (816 bp)、*recA* (780 bp)，定序比對後，可得到 7 個管家基因的 allele number，再到 EnteroBase 資料庫 (<http://enterobase.warwick.ac.uk/>) 比對 sequence types (STs)。所測得的 STs type 最多數為 ST131 (7/16, 43.75%)，其

次為 ST767 (2/16, 12.5%)，還有 ST93 (1/16, 6.25%)、ST155 (1/16, 6.25%)、ST315 (1/16, 6.25%)、ST372 (1/16, 6.25%)、ST457 (1/16, 6.25%)、ST617 (1/16, 6.25%)、ST1193 (1/16, 6.25%)。其中 ST131 均為 ESBL-producing *E. coli*，但不帶有 pAmpC。

所有的 ST131、ST372、ST1193 皆屬於 phylogroup B2。ST767 與 ST155 屬於 phylogroup B1。ST93 屬於 phylogroup A、ST617 屬於 phylogroup C、ST315 屬於 phylogroup D、ST457 屬於 phylogroup F，此 16 株 *E. coli* 詳細管家基因定序結果，請參見 Appendix 1。

3.4 ESBL/pAmpC producing *E. coli* 之藥物敏感性試驗

本實驗使用臨床上常見的十種抗菌藥物紙錠進行 50 株 *E. coli* 的藥物敏感性試驗。所採用的藥物包含乙內醯胺類 (β -lactams)：ampicillin、augmentin、cefixime、ceftiofur、imipenem。氟喹諾酮類 (fluoroquinolone, FQ)：ciprofloxacin、enrofloxacin。四環素類 (tetracyclines)：doxycycline。胺基配糖體類 (aminoglycosides)：gentamycin。磺胺類 (sulfonamides)：sulphamethoxazole/trimethoprim (SXT)。

本實驗一共有 16 株 ESBL/pAmpC producing *E. coli*，不帶有 ESBL/pAmpC 的則有 34 株。ESBL/pAmpC producing *E. coli* 對於乙內醯胺類抗生素，具有明顯較高的抗藥性，特別是 ampicillin 與 cefixime (16/16, 100%)。同是乙內醯胺類的 augmentin 為 (14/16, 87.5%)，ceftiofur 為 (11/16, 68.8%)。在其他類別的抗生素也具有較高的抗藥性，如胺基配糖體類的 gentamycin (11/16, 68.8%)，磺胺類的 SXT (11/16, 68.8%)，接著是四環素類的 doxycycline (10/16, 62.5%)，氟喹諾酮類的 enrofloxacin

(10/16, 62.5%) 及 ciprofloxacin (8/16, 50%)。此外，屬於乙內醯胺類的 imipenem 可歸類為碳青黴烯類 (carbapenem)，所有受檢測的 50 株 *E.coli*，不論是否帶有 ESBL/pAmpC，對此藥物都具有感受性，抗藥比例為 0%。

對所有測試的藥物而言，ESBL/pAmpC producing *E.coli* 遠比不帶有 ESBL/pAmpC 的 *E.coli* 還要有更高的抗藥比例，藥敏試驗結果請參見 Figure 2。

3.5 ESBL/pAmpC producing *E. coli* 之親緣關係樹狀圖 (Minimal spanning tree)

透過 BioNumerics Software 畫出 ESBL/pAmpC producing *E. coli* 的親緣樹狀圖。一個圓圈為獨立一 ST，連接兩個 ST 的直線上數字為 7 個管家基因中的 allele 差異數，數字越大，代表親緣關係越遠。反之，數字越小，則代表親緣關係越近。同一個圓圈內若有分割，則代表此 ST 出現不只一株，分成多少部分就代表多少株。此描述了 ESBL/pAmpC producing *E. coli* 之 ST 與 phylogroup 的關係。

被分到的 ESBL/pAmpC producing *E. coli*，最多數為 phylogroup B2，包含 ST131、ST372、ST1193。其次為 phylogroup B1，包含 ST767、ST155。而 phylogroup A，包含了 ST93。Phylogroup C，包含 ST617。Phylogroup D，包含 ST315。Phylogroup F，包含 ST457。

其中親緣關係最相近的為 ST155 與 ST767，僅相差了 2 個 allele，再來是 ST767 與 ST93，差了 4 個 allele，接著 ST93 與 ST617 差了 5 個 allele。回到 ST155 與 ST315 差了 6 個 allele。ST155 分別與 ST131、ST372、ST457、ST1193 相差最遠，皆差了 7 個 allele，請參見 Figure 3。



3.6 ESBL-producing *E. coli* 之 ST131 O25b 檢測結果

在 MLST 分析中，得出了 7 株 ST131 的 *E. coli*，這些 ST131 僅帶有 ESBL 基因，而不帶有 pAmpC。透過 PCR 方法檢測 *trpA* (427bp) 及 *pabB* (347bp) 基因，*E. coli* ST131 又為血清型 O25b 者，可同時偵測到 *trpA* 與 *pabB*，其中就有 3 株為血清型 O25b (3/7, 42.9%)。PCR 結果，請參見 Figure 4。


3.7 MCR-1 盛行率

將 50 株 *E. coli* (犬 n=41、貓 n=9) 全數進行 PCR 檢測 *mcr-1* 基因，並以 *E. coli* NCTC 13846 作為陽性對照組，*E. coli* ATCC 25922 作為陰性對照組，在 50 株 *E. coli* 中皆無發現 *mcr-1* 基因，Figure 5 呈現作為代表的電泳結果。

在抗藥表現，透過最小抑菌濃度測試來檢測多黏菌素 (colistin, polymyxin E) 對於所有從臨床檢體收集的 50 株 *E. coli*，測試其抗藥情形，根據 EUCAST 標準，colistin MIC $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ 即視為 resistant。本實驗結果，所有菌株之 colistin MIC 皆為 $\leq 0.5 \mu\text{g/mL}$ ，與 PCR 結果相符。

3.8 接合試驗結果

ESBL/pAmpC producing *E. coli* 共 16 株，該 16 株作為抗藥基因的提供者 (donor)，帶有抗疊氮化鈉 (sodium azide, NaN₃) 特性的 *E. coli* J53 則為為抗藥基因的接受者 (recipient)，抗藥基因成功轉移完成的 J53 菌株則稱為接合者 (transconjugants)。本實驗採用了 PCR 方式，分別檢測 donor、recipient、transconjugants 之抗藥基因轉移情形，並以 *E. coli* isolate 031 為代表，PCR 電泳結果呈現於 Figure 6。



當 mating 時間為 1 小時，屬於 ESBL 基因的 TEM 轉移成功率為 (4/5, 80%)、CTX-M-1 轉移成功率為 (5/6, 83.3%)、CTX-M-9 轉移成功率為 (5/5, 100%)。屬於 pAmpC 基因的 CMY-2 轉移成功率為 (3/8, 37.5%)。若將 mating 時間延長為 1 天，屬於 ESBL 基因的 TEM 轉移成功率為 (4/5, 80%)、CTX-M-1 轉移成功率為 (5/6, 83.3%)、CTX-M-9 轉移成功率為 (5/5, 100%)，屬於 pAmpC 基因的 CMY-2 轉移成功率為 (7/8, 87.5%)。從結果看來，ESBL 基因很容易就可在短時間內水平轉移出去，而 pAmpC 基因則須要花費較長的時間轉移，結果請參見 Table 4 與 Table 5。

異種接合試驗則採用 *K. pneumoniae* – ATCC 700603 (帶有 ESBL 基因 SHV-18) 作為抗藥基因的提供者 (donor)，J53 作為其接受者 (recipient)，在進行 1 小時的 mating 後也成功將 SHV-18 轉移給 J53，PCR 電泳結果呈現於 Figure 7。


上述結果說明了 ESBLs 基因很容易藉由質體水平傳播出去，pAmpC 則需花上較長的時間，在同屬於腸桿菌科的不同種的細菌間，也可藉由質體傳播 ESBLs 基因。

第四章 討論



在台灣現代的少子化社會，許多人選擇飼養小動物作陪伴，特別是犬貓，但隨著抗生素的濫用導致抗藥性問題頻頻出現，令人擔憂地是犬貓與人類親近程度，會增加抗藥細菌在其中交互傳播的機會。根據調查，源自台灣伴侶動物分離自糞便的 commensal *E. coli* 多是 phylogroup A 或 B1 [1]，有研究表示，人類糞便分離之 *E. coli* 多數為 phylogroup B2 [172]，本研究所分離的 *E. coli* 以 B2 為主，其次為 B1，結果似乎暗示著使犬貓致病的病原有很大機會是來自於人類，而原本就在伴侶動物中佔多數的 B1，似乎也有潛力發展為致病型態。雖然 pathogenic *E. coli* (包含 B2、D、E、F) 有 84%，佔了大多數，但也有 16% 傾向於 commensal *E. coli* (包含 A、B1、C) 也足以致病，致病能力很可能是接收了外源性的基因而獲得，透過質體，不但可以獲取毒力基因以及抗藥基因，更重要的是，還可以跨菌種傳播[173]。

ESBLs、pAmpC、MCR-1 三者的抗藥基因，都可攜帶於質體上。在這半年的臨床調查中，ESBL-producing *E. coli*，大部分集中在致病性 group B2，盛行率為 20%，與我們實驗室過去幾年所調查的盛行率相差並不大，2014 年至 2017 年平均盛行率為 23.0% [57]，但在 2011 年 12 月至 2013 年 3 月期間，盛行率僅有 3.3% [56]。TEM、CTX-M-1、CTX-M-9 幾乎各佔 1/3。ESBL-producing *E. coli* 以 ST131 為主，以及 ST1193，這些菌株皆耐氟喹諾酮類，皆為 group B2，這兩個菌株也曾在健康的人類中發現[174]。ST131 為攜帶 CTX-M 的流行毒株，85.7% (6/7) 分離自尿道感染的案例，42.9% (3/7) 為血清型 O25b，並且對 ceftazidime 和氟奎諾酮類具有更顯著的抗藥性，相反地，在非 O25b 的血清型中，則對 ceftazidime 和氟奎諾酮類具有感受性。本研究中，ST131-O25b 佔所有 *E. coli* 分離株的 6% (3/50)。



ST1193 僅 1 株，分離自口腔腫塊，ST1193 的來源涉及了人類尿毒症中的 ST complex 14 與耐氟喹諾酮類的 ST10 發生同源重組，是一株新出現的大流行毒株，不具乳糖發酵特性，和 ST131 一樣，ST1193 具有多重抗藥性特徵[175]。這是在台灣首次發現 ST1193 的報告，目前亞洲地區包含越南[176]、韓國、中國[177]，以及日本的伴侶動物中也有發現 ST1193 [178]，目前在 PubMed 搜尋的結果僅有 43 筆資料，討論次數還不算高，但已有開始流行的趨勢。

本研究結果顯示，pAmpC 在臨床上分離的 *E. coli* 中盛行率為 16%，基因型全部為 CMY-2-like，與文獻結果雷同，雖然全球都有 pAmpC 的報導，但是歐洲的盛行率普遍較低，介於 0.9%至 1.31%之間[70, 72, 73]，在澳洲反而盛行率有 17.1%，與本研究結果較為接近，推測很可能有地緣性的影響，台灣與澳洲為亞熱帶氣候，相較於位在中高緯度的歐洲溫暖許多，更利於細菌生長。我們所分離到 pAmpC-producing *E. coli* 主要為 ExPEC，並分散於各個 phylogroup 中 (group E 沒有發現)，以 group B1 出現最多次，與 ESBL-producing *E. coli* 不同，pAmpC-producing *E. coli* 並未集中在致病性的 group B2 中。這部分所測得之 ST 為 ST155、ST315、ST617、ST457、ST767、ST372 和 ST93，其中有兩株同時表現 ESBL，一為 TEM-243，另一為 CTX-M-55。ST315 與 ST617 各別屬於 ST complex 38 和 ST complex 10。

在人類中常見的 ExPEC 包括：ST131、ST1193、ST38、ST10 [179]，這些菌株常常在人類臨床上分離出來，但在健康的人類也曾分離到 ST131、ST38 和 ST1193 [47, 174]。以上 ST 除了在人類中發現，也曾在動物中分離出來，另外 ST10、ST38、ST93、ST457 等被列為人畜共通的菌株[180]，在台灣人醫部分也檢測到了 ST131、

ST38、ST10、ST457 [54]，本研究與台灣人醫的調查雷同，ESBL/pAmpC-producing *E. coli* 主要攜帶 CTX-M 和 CMY-2 [87]。




ST372，屬於 ExPEC 的 UPEC，並具有多重抗藥性，為 phylogroup B2，是一株犬隻臨床相關的主要分離株，常見於尿道感染（UTI）的例子，但在人類身上有曾找到 ST372 的案例，經常帶有 ESBLs 或 pAmpC，對 3GC 有抗藥性[181-183]。

ST155 為 phylogroup B1，曾分離於健康的人類，帶有 CTX-M-1[184]，在禽類也有 ST155 帶著 CTX-M-1 的報告，並同時具有四環素與磺胺類的抗藥性[185-187]，在法國的馬身上也有發現 ST155 [188]，該菌株在禽類較常見，並也能在人類身上引起腸道外的感染[189]。

ST767 屬於 ST complex 155，為 phylogroup B1。在中國的牛乳頭上獲取樣本，測得血清型為 O5:H32，其質體為 pEC3-tetX4，屬於 IncFIB κ /FIA (HI1) / X1 質體，該質體的特性無法透過 conjugation 來轉移[190]，在本研究的結果，049 編號的 *E. coli* ST767 帶有 CMY-2，在進行 conjugation 後，並沒有把 CMY-2 基因轉到 recipient *E. coli* J53 上面，這是所有 ESBL/pAmpC-producing *E. coli* 中，唯一抗藥基因轉移失敗的菌株。這個結果與上述 Zhang 等人的 conjugation 結果相符，但確切原因仍待研究 [190]。

ST617 屬於 ST complex 10，為 phylogroup C，在美國的病豬中發現，耐氟喹諾酮類與頭孢菌素類[191]，在人類患者中，ST617 經常帶有碳青黴烯類抗藥基因




NDM-5，但並非所有的 ST617 都會帶有 NDM-5 [192]。本研究獲取的 ST617 就對 imipenem 具有感受性。在食用動物中，帶有 ESBL 的也包含 ST617，並也測得 *mcr-1* [193]。在南韓於 81 歲人類患者發現 ST617，特徵為血清型 O89/162:H10，並測得 ESBL、碳青黴烯類，及 *mcr-1* 基因，並有高達 7 種質體在內，包括：IncB、IncFII、IncI2、IncN、IncY、IncR 和 IncX1 [194]。

ST93 屬於 ST complex 168，為 phylogroup A，曾在墨西哥的健康犬中發現，並帶有 CMY-2 [195]。巴基斯坦發現的 ST93 帶有 CTX-M-15[196]。在禽類與 UTI 人類患者皆有分離出 ST93 [197, 198]。更值得注意的是在人類中發現 ST93，並找到了 plasmid-mediated *mcr-1* 基因[199, 200]。在中國地區的犬貓中，也發現了帶有 *mcr-1* 的 *E. coli*，序列分型為 ST93 [201]。ST93 似乎是一株可容納多樣抗藥基因的菌株，並在禽類、伴侶動物、人類中可進行傳播。

ST457 為 phylogroup F，曾於巴西犬貓中的 ESBL/pAmpC-producing *E. coli* 發現 ST457，攜帶了 CMY-2 或 CTX-M-2 [202]。在非洲地區的患者也曾發現 ST457 存在[203]。有多篇研究指出該菌株是攜帶 *mcr-1* 的常見流行毒株之一[204-207]。

ST315 屬於 ST complex 38，為 phylogroup D，在加拿大地區曾在分析人類菌血症相關的 ESBL-producing *E. coli* 中發現 ST315，樣本取自血液，多數患者表現社區型態的尿毒症，經常帶有 CTX-M-14、CTX-M-15、TEM-52 [208]。在澳洲地區，曾發現 ST315 帶有 CMY-2 的例子[209]。



上述這些 ESBL/pAmpC- producing *E. coli* ST 都曾在人類中發現，今天在台灣患病的犬貓身上也被偵測到，雖然無法確定傳播方向性，但這些 ESBL/pAmpC 相關的抗藥基因很可能在人類與伴侶動物中循環傳播。此外，在藥物敏感的試驗中，我們對各種類型的抗生素測試，包含 ampicillin、augmentin、cefixime、ceftiofur、imipenem、ciprofloxacin、enrofloxacin、doxycycline、gentamicin、SXT 十種，在 ESBL/pAmpC 的組別，抗藥能力顯著高於非 ESBL/pAmpC 組別。對於 ampicillin、cefixime 則達 100% resistance，而氟喹諾酮組別的 ciprofloxacin 也有 50% resistance，但對於碳青黴烯類的 imipenem，不論組別為何，都不具抗藥性，還是可以達到預期的療效，碳青黴烯類一般是用來治療重症病人所使用的後線藥物，例如革蘭氏陰性菌所引起的菌血症、肺炎或是尿道感染等。在台灣犬貓臨床上，碳青黴烯類依然可作為一個治療的選擇，但須留意在台灣法規上，碳青黴烯類並非合法的動物用藥，必須斟酌使用。

Conjugation 試驗，時間設定為一天即是參考 Zhong 等人做法[210]，我們發現 ESBLs 的相關基因轉移率高達 80%至 100%，所需時間僅 1 小時，即可將抗藥基因從 donor strain 轉移至 recipient strain；另外，pAmpC (CMY-2) 則需耗費較多時間完成，在 conjugation 1 小時的轉移率為僅為 37.5% (3/8)，conjugation 1 天的轉移率提升至 87.5% (7/8)，唯一轉移未成功的菌株為 ST767，有文獻說明其質體無法透過 conjugation 轉移[190]，但真正的原因須經調查釐清。根據結果，我們推測 ESBL 與 pAmpC 兩者的基因，可能位於不同的質體上，而有文獻指出，*bla*_{CMY-2} 由 IncA / C2、IncI1 和 IncI2 質體攜帶，*bla*_{CTX-M} 由 IncF、IncHI2 和 IncN 質體攜帶[191]，但在本研究中尚未進行證實，不過，我們驗證了 ESBL 基因是可以跨菌種傳播的

(由 *K. pneumoniae* 轉移到 *E. coli*)。



MCR-1 的基因在台灣曾發現於零售生肉，盛行率小於 9%，在人類，盛行率小於 1% [123, 126, 127]，但在食用動物的豬與雞之中，*mcr-1* 盛行率則已超過了 50% [5, 124-126]，在伴侶動物中僅一篇報告說明曾經測得 *mcr-1* [1]。而在本研究中並未檢測到 *mcr-1*，colistin MIC 試驗也沒有發現具抗藥性的 *E. coli*，不排除是樣本數不足，而未被檢測出來的可能性，因資料有限，還無法說明台灣伴侶動物中的實際情況，建議在未來繼續追蹤。然而，在其他國家曾經發現帶有 MCR-1 的 ST95、ST648、ST10、ST405、ST457、ST93、ST617 可作為需留意的 *E. coli* ST。

根據本研究結果，並參考台灣源自伴侶動物的共生性大腸桿菌調查[1]，可以觀察到 ESBLs 有較高機率存在於致病性大腸桿菌之中，而 pAmpC 似乎更常發現於共生性大腸桿菌；另外，*mcr-1* 則在共生性大腸桿菌中偵測到 24.2%盛行率[1]，但在致病性大腸桿菌中，則尚未發現，除了繼續監控臨床上 *mcr-1* 的盛行情況外，此現象是否與飲食習慣或飼料添加物有關？或許是值得深入探討的另一個領域。

Table 1. The primers used in this study.

Primer name	Target gene	Sequence 5'→3'	PCR product (bp)	References	
chuA-F	<i>chuA</i>	ATGGTACCGGACGAACCAAC	288		
chuA-R		TGCCGCCAGTACCAAAGACA			
yjaA-F	<i>yjaA</i>	CAAACGTGAAGTGTCAGGAG	211		
yjaA-R		AATGCGTTCCTCAACCTGTG			
TspE4.C2-F	TspE4.C2	CACTATTCGTAAGGTCATCC	152		
TspE4.C2-R		AGTTTATCGCTGCGGGTCGC			
arpA-F	<i>arpA</i>	AACGCTATTCGCCAGCTTGC	400		
arpA-R		TCTCCCCATAACCGTACGCTA			
groupC-F	<i>trpA</i>	AGTTTTATGCCCAGTGCGAG	219		[137]
groupC-R		TCTGCGCCGGTACGCCC			
groupE-F	<i>arpA</i>	GATTCCATCTTGTCAAATATG CC	301		
groupE-R		GAAAAGAAAAAGAATTCCCAA GAG			
internal control-F	<i>trpA</i>	CGGCGATAAAGACATCTTCAC	489		
internal control-R		GCAACGCGGCCTGGCGGAAG			
TEM-F	<i>bla_{TEM}</i>	TCGGGGAAATGTGCGCG	972		
TEM-R		TGCTTAATCAGTGAGGCACC			
SHV-F	<i>bla_{SHV}</i>	GCCTTTATCGGCCCTCACTCAA	819		
SHV-R		TCCCGCAGATAAATCACCACAA TG			
CTX-M-1-F	<i>bla_{CTX-M-1}</i> group	CCCATGGTTAAAAAATCACTGC	942		
CTX-M-1-R		CAGCGCTTTTGCCGTCTAAG			
CTX-M-2-F	<i>bla_{CTX-M-2}</i> group	CGACGCTACCCCTGCTATT	552	[57]	
CTX-M-2-R		CCAGCGTCAGATTTTTCAGG			
CTX-M-8-F	<i>bla_{CTX-M-8}</i> group	TCGCGTTAAGCGGATGATGC	666		
CTX-M-8-R		AACCCACGATGTGGGTAGC			
CTX-M-9-F	<i>bla_{CTX-M-9}</i> group	ATGGTGACAAAGAGAGTGCAA C	876		
CTX-M-9-R		TTACAGCCCTTCGGCGATGATT			
CTX-M-25-F	<i>bla_{CTX-M-25}</i> group	GCACGATGACATTCGGG	327		
CTX-M-25-R		AACCCACGATGTGGGTAGC			
CIT-M-F	<i>bla_{pAmpC}</i>	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA	462	[69]	
CIT-M-R		TTTCTCCTGAACGTCGCTGGC			

MOX-F		GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT	520	
MOX-R	<i>bla_{pAmpC}</i>	CACATTGACATAGGTGTGGTGC		
DHA-F		AACTTTCACAGCTGTGCTGGGT	405	
DHA-R	<i>bla_{pAmpC}</i>	CCGTACGCATACTGGCTTTGC		
CLR5-F		CGGTCAGTCCGTTTGTTC	309	
CLR5-R	<i>mcr-1</i>	CTTGGTCGGTCTGTAGGG		
adk-F		ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG	583	
adk-R	<i>adk</i>	CCGTCAACTTTCGCGTATTT		
fumC-F		TCACAGGTCCGCGCAGCGCTTC	806	
fumC-R	<i>fumC</i>	GTACGCAGCGAAAAAGATTC		
gyrB-F		TCGGCGACACGGATGACGGC	911	
gyrB-R	<i>gyrB</i>	ATCAGGCCTTCACGCGCATC		
icd-F		ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTT		
icd-R	<i>icd</i>	CCGGCACA	878	[211]
mdh-F		GGACGCAGCAGGATCTGTT		
mdh-R	<i>mdh</i>	AGCGCGTTCTGTTCAAATGC	932	
purA-F		CAGGTTCAGAACTCTCTCTGT		
purA-R	<i>purA</i>	CGCGCTGATGAAAGAGATGA	816	
recA-F		CATACGGTAAGCCACGCAGA		
recA-R	<i>recA</i>	CGCATTCGCTTTACCCTGACC	780	
		TCGTCAAATCTACGGACCGG		
		A		
O25b-F		TCCAGCAGGTGCTGGATCGT	347	
O25b-R	<i>pabB</i>	GCGAAATTTTTCGCCGTACTGT		
trpA-F		GCTACGAATCTCTGTTTGCC	427	
trpA-R	<i>trpA</i>	GCAACGCGGCCTGGCGGAAG		[212]





Table 2. Microorganisms isolated from this study.

microorganisms	N
<i>E. coli</i>	58
<i>Staphylococcus</i> spp.	46
<i>Klebsiella</i> spp.	23
<i>Pseudomonas</i> spp.	22
<i>Proteus</i> spp.	15
<i>Streptococcus</i> spp.	13
<i>Enterococcus</i> spp.	13
<i>Pasteurella</i> spp.	8
<i>Acinetobacter</i> spp.	5
<i>Enterobacter cloacae</i>	4
<i>Micrococcus</i> spp.	4
<i>Moraxella</i> spp.	3
<i>Prevotella</i> spp.	3
<i>Clostridium</i> spp.	3
<i>Corynebacterium</i> spp.	2
<i>Fungus</i>	3
<i>Serratia marcescens</i>	2
<i>Gardnerella vaginalis</i>	2
<i>Citrobacter</i> spp.	2
<i>Neisseria</i> spp.	2
Others	11
Unknown	5
Total	249

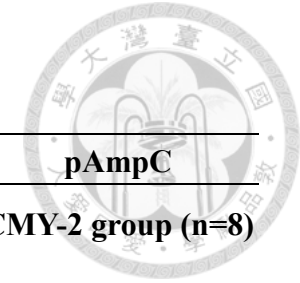


Table 3. The *bla* genotypes, phylogroups, and ST types of the ESBL/pAmpC-producing *E. coli*.

No.	Case no.	Species	Phylogroups	ST type	ESBLs			pAmpC
					TEM group (n=5)	CTX-M-1 group (n=6)	CTX-M-9 group (n=5)	CMY-2 group (n=8)
1	001	Cat	B2	ST131	TEM-215	-- ^a	CTX-M-235	--
2	002	Dog	A	ST93	--	CTX-M-55	--	CMY-171
3	004	Cat	B2	ST131	--	--	CTX-M-235	--
4	008	Dog	B1	ST155	--	--	--	CMY-171
5	010	Dog	D	ST315	--	--	--	CMY-171
6	011	Cat	B2	ST131	TEM-215	CTX-M-55	CTX-M-235	--
7	025	Dog	B1	ST767	TEM-243	--	--	CMY-171
8	031	Dog	B2	ST131	TEM-215	CTX-M-211	CTX-M-235	--
9	032	Cat	C	ST617	--	--	--	CMY-171
10	034	Dog	B2	ST131	--	CTX-M-238	--	--
11	038	Dog	F	ST457	--	--	--	CMY-171
12	040	Dog	B2	ST131	--	--	CTX-M-235	--
13	042	Dog	B2	ST131	--	CTX-M-238	--	--
14	049	Dog	B1	ST767	--	--	--	CMY-171
15	050	Dog	B2	ST1193	TEM-215	CTX-M-199	--	--
16	051	Dog	B2	ST372	--	--	--	CMY-171

^a: not detected.



Table 4. PCR detection of the *bla* genes in the donor and the transconjugant after 1 hr and 1 day of conjugation.

Case no.	Donor	Transconjugant (1hr)	Transconjugant (1day)
001	TEM, M9	TEM, M9	TEM, M9
002	M1, CMY-2	M1	M1, CMY-2
004	M9	M9	M9
008	CMY-2	-- ^a	CMY-2
010	CMY-2	--	CMY-2
011	TEM, M1, M9	TEM, M9	TEM, M9
025	TEM, CMY-2	CMY-2	CMY-2
031	TEM, M1, M9	TEM, M1, M9	TEM, M1, M9
032	CMY-2	--	CMY-2
034	M1	M1	M1
038	CMY-2	CMY-2	CMY-2
040	M9	M9	M9
042	M1	M1	M1
049	CMY-2	--	--
050	TEM, M1	TEM, M1	TEM, M1
051	CMY-2	CMY-2	CMY-2

^a: not detected



Table 5. The *bla* genes transfer rate in the conjugation experiment.

conjugation time	TEM group (n=5)	CTX-M-1 group (n=6)	CTX-M-9 group (n=5)	CMY-2 group (n=8)
1 hr	80% (4/5)	83.3% (5/6)	100% (5/5)	37.5% (3/8)
1 day	80% (4/5)	83.3% (5/6)	100% (5/5)	87.5% (7/8)

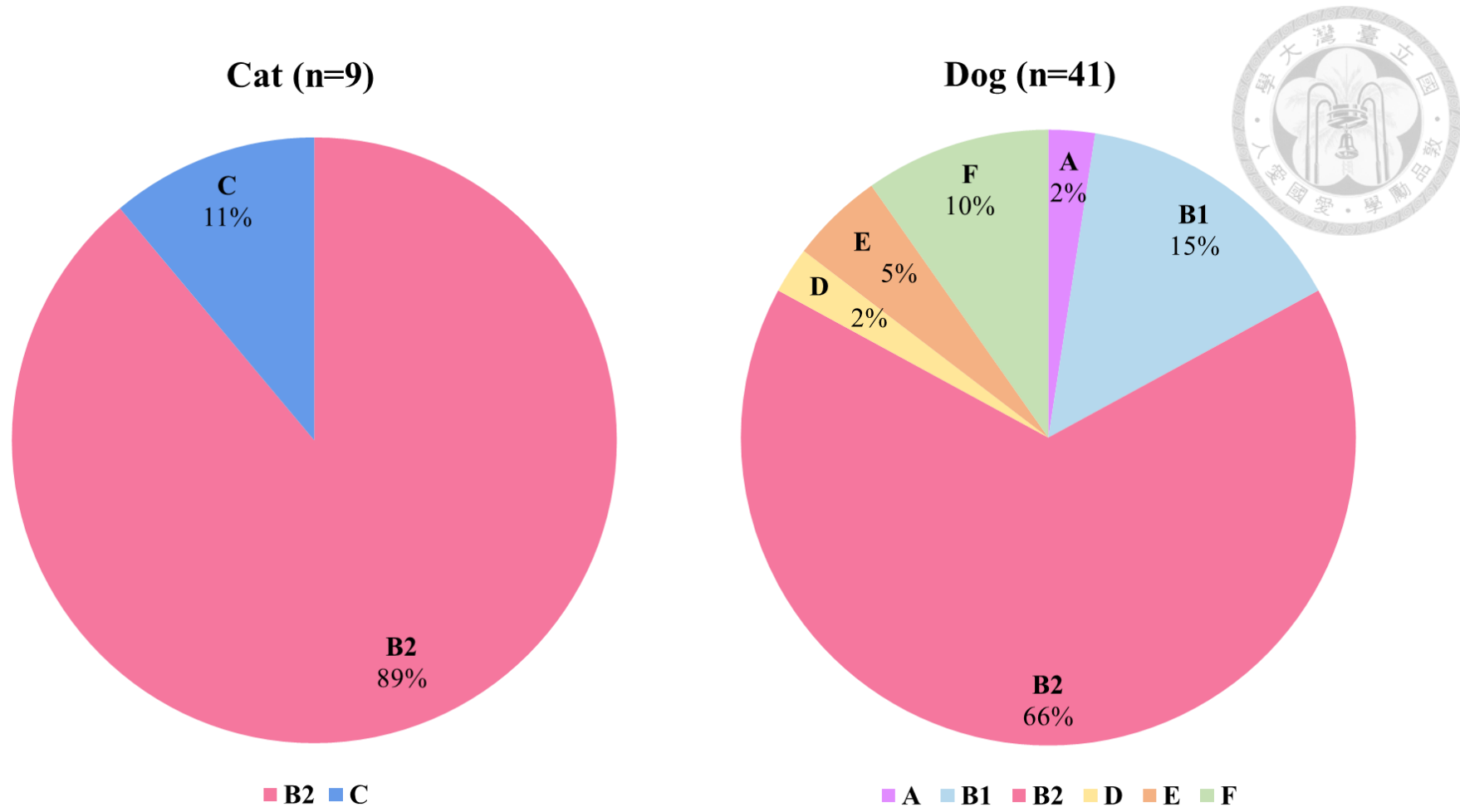


Figure 1. Phylogenetic groups distribution of *E. coli* isolates in companion animals. (n=50)

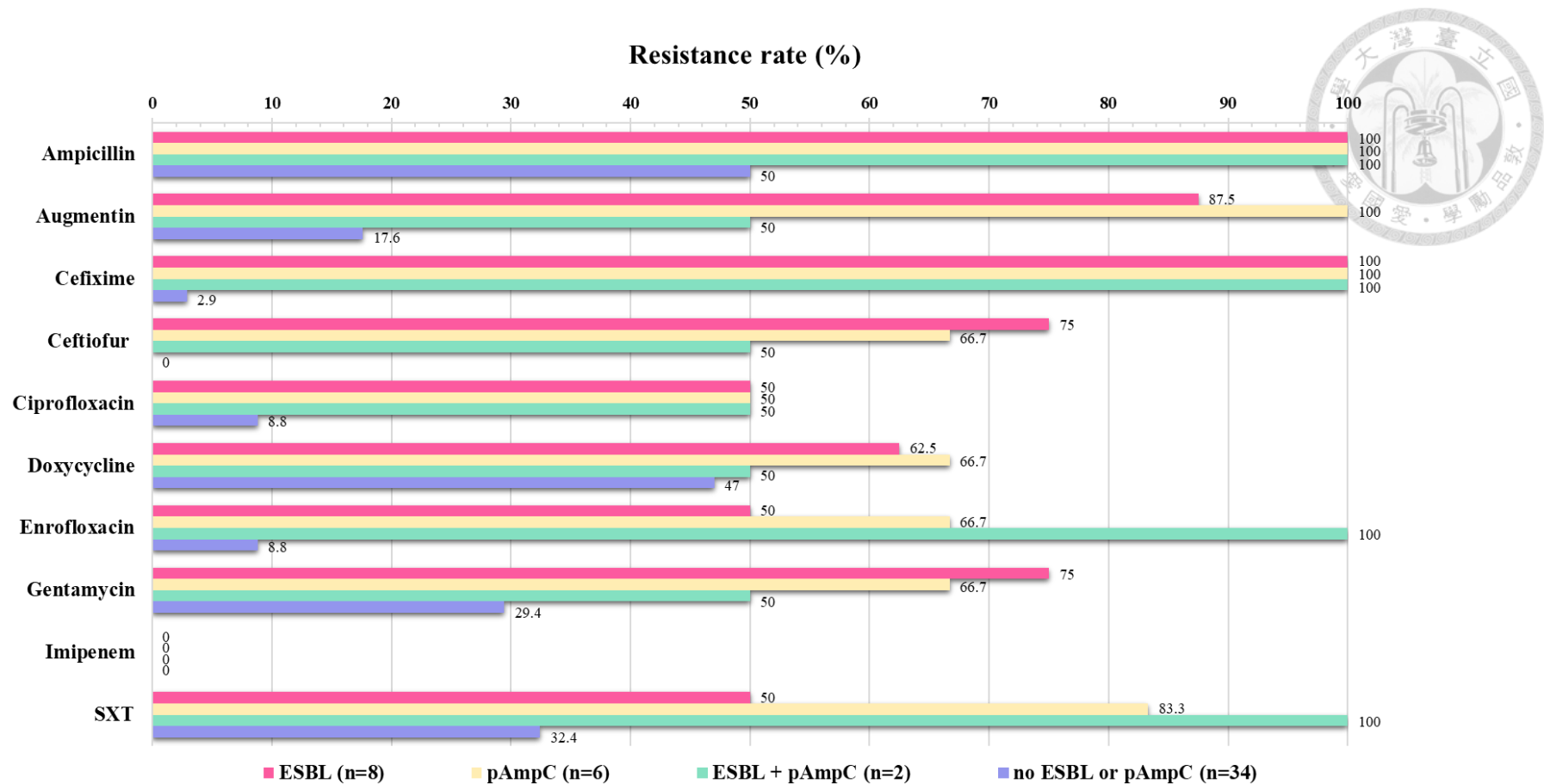


Figure 2. Comparison of the antimicrobial susceptibility tests of the ESBL/pAmpC producing *E. coli* and those *E. coli* that carry no ESBL or pAmpC genes.

The *E. coli* isolates that possess only ESBL, only pAmpC, both ESBL and pAmpC, and neither of the ESBL and pAmpC genes are represented by different colors. The numbers adjacent to the end of the bars denote the percentage of resistance.

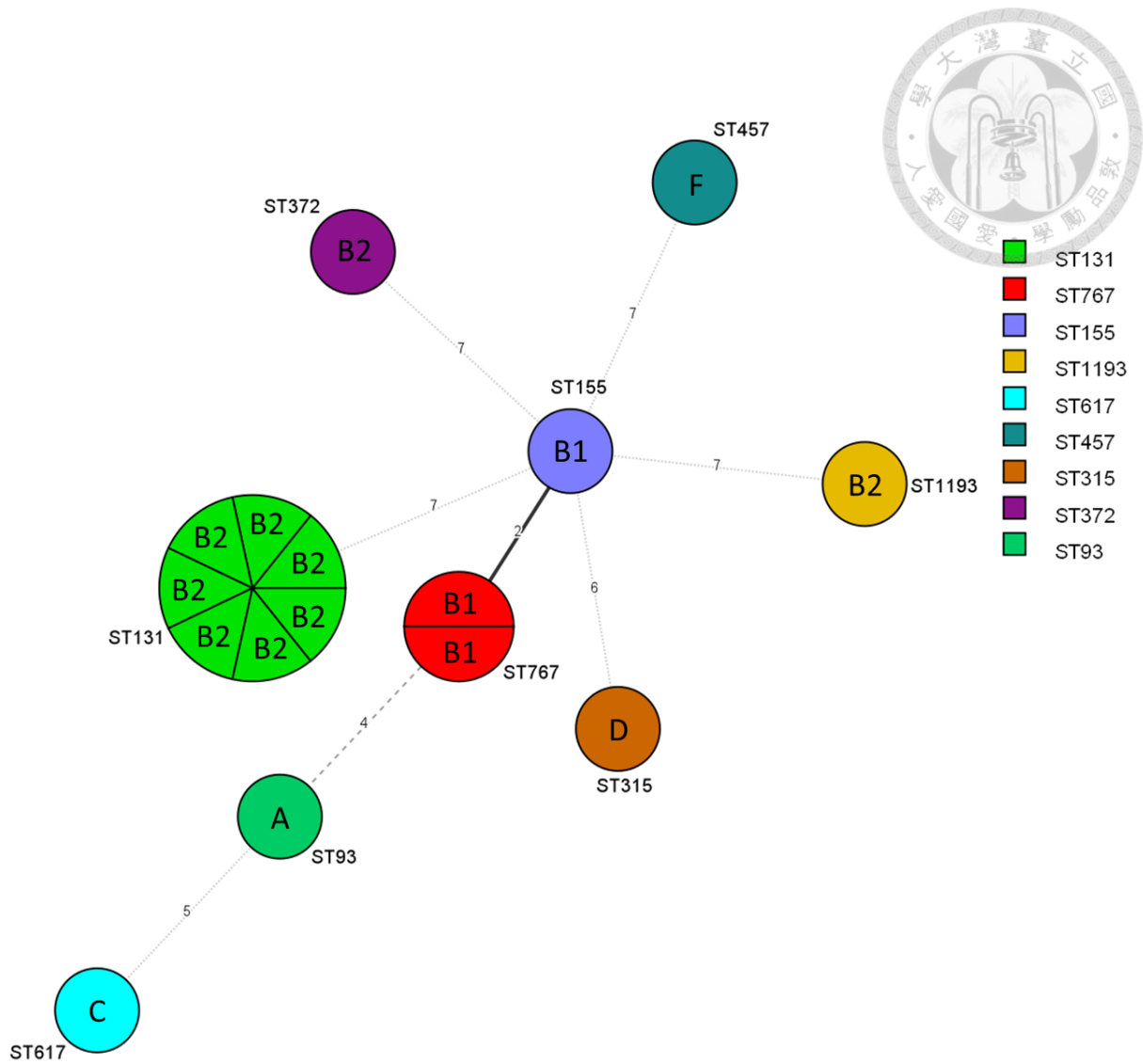


Figure 3. Minimal spanning tree of ESBL/pAmpC-producing *E. coli*.

Each circle indicates one ST, subdivided into one sector for each isolate. The phylogenetic group is designated within the sector and each circle is bordered by the ST number. The numbers on the connecting line between STs within the MSTree indicate the number of different alleles. Solid lines represent an allele difference of three or fewer, whereas dotted lines and faint lines indicate an allele difference of four or more.

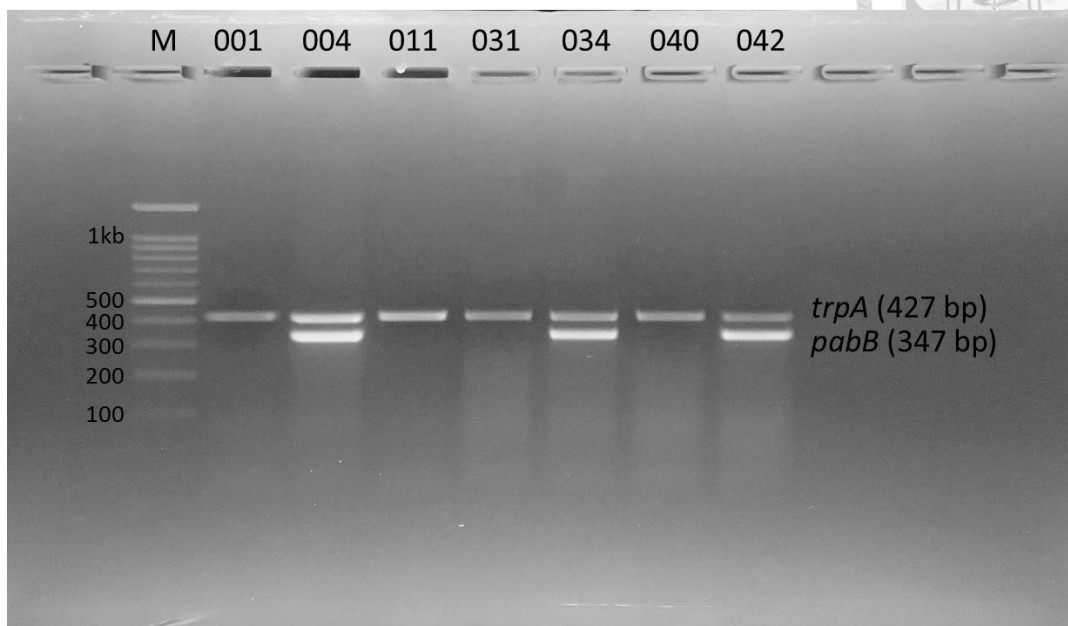


Figure 4. PCR detection of the *E. coli* ST131/O25b clone.

All ST131 isolates exhibit the *trpA* band with the molecular size of 427 bp, whereas the O25b clone possesses an additional 347-bp *pabB* band. Three ST131 isolates 004, 034, and 042 are confirmed to be O25b clones. M, molecular weight marker, 100 bp DNA ladder.

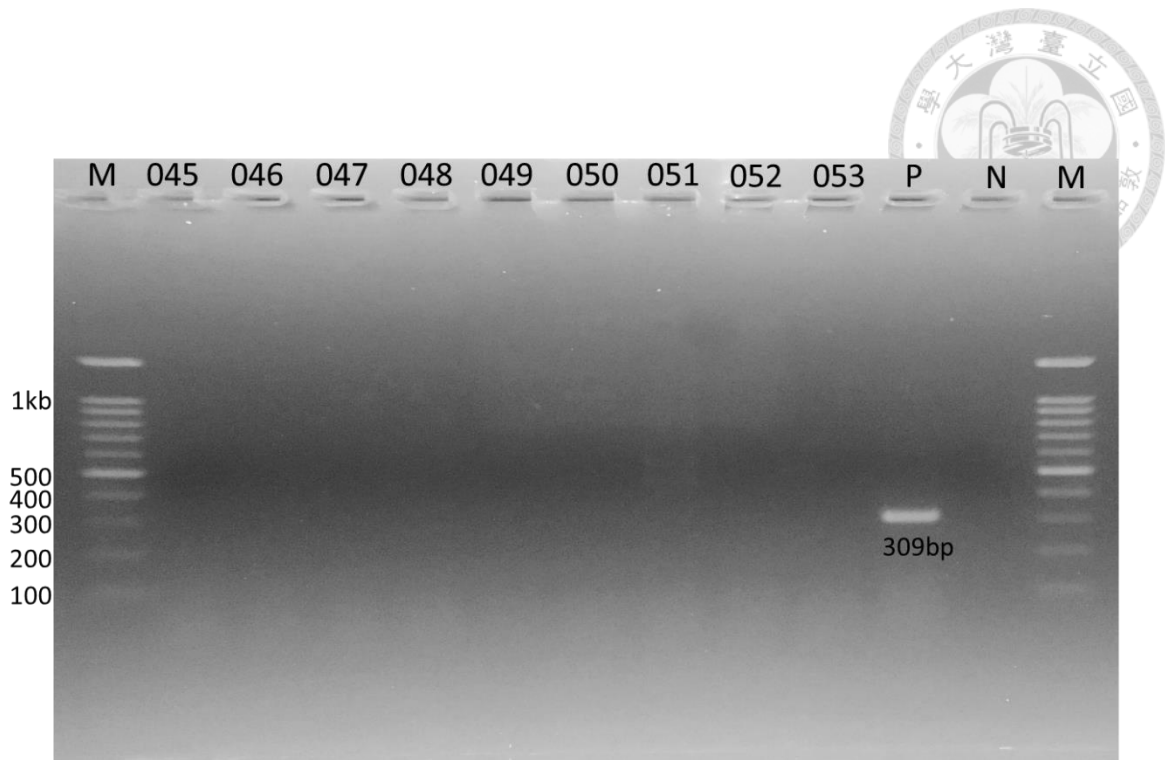


Figure 5. PCR detection of *mcr-1* gene.

A representative agarose gel showing PCR detection of *mcr-1* gene. A 309-bp product would appear from an *E. coli* isolate that possesses the *mcr-1* gene. Neither of the nine *E. coli* isolates (from 045 to 053) in this gel contains the *mcr-1* gene. M, molecular weight marker, 100 bp DNA ladder; P, *E. coli* NCTC 13846 as a positive control; N, *E. coli* ATCC 25922 as a negative control.

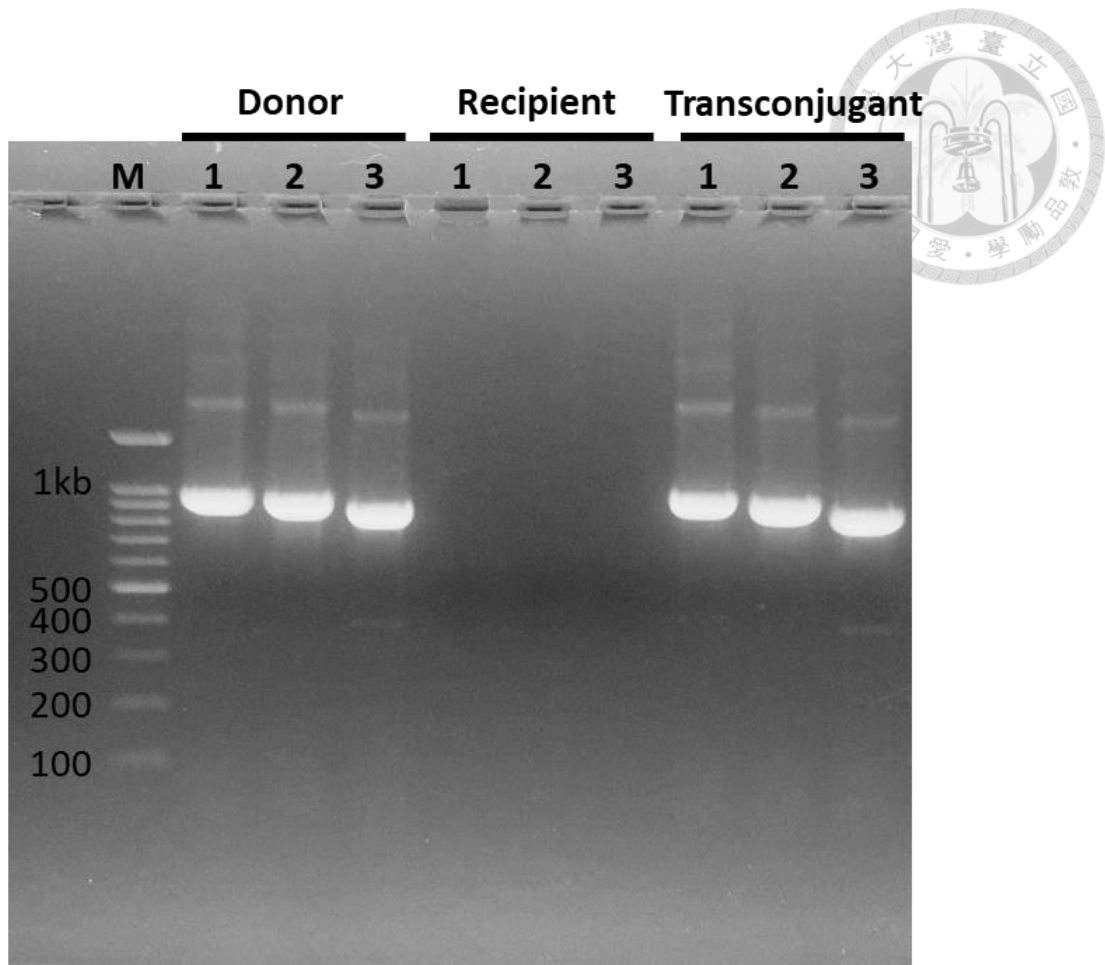


Figure 6. PCR detection of the transfer of the ESBL genes from the donor *E. coli* isolate 031 to the recipient *E. coli* J53 strain in a conjugation test.

Cell lysates from the donor, recipient and a transconjugant were prepared after 1 hr of conjugation and used as the templates in a PCR where the primers to amplify *bla*_{TEM} (972bp), *bla*_{CTX-M-1} (942bp), *bla*_{CTX-M-9} (876bp) were added. PCR products were detected in the donor *E. coli* isolate 031 and the transconjugant, but not in the recipient *E. coli* J53 strain. M, molecular weight marker, 100 bp DNA ladder; 1, *bla*_{TEM}; 2, *bla*_{CTX-M-1}; 3, *bla*_{CTX-M-9}.

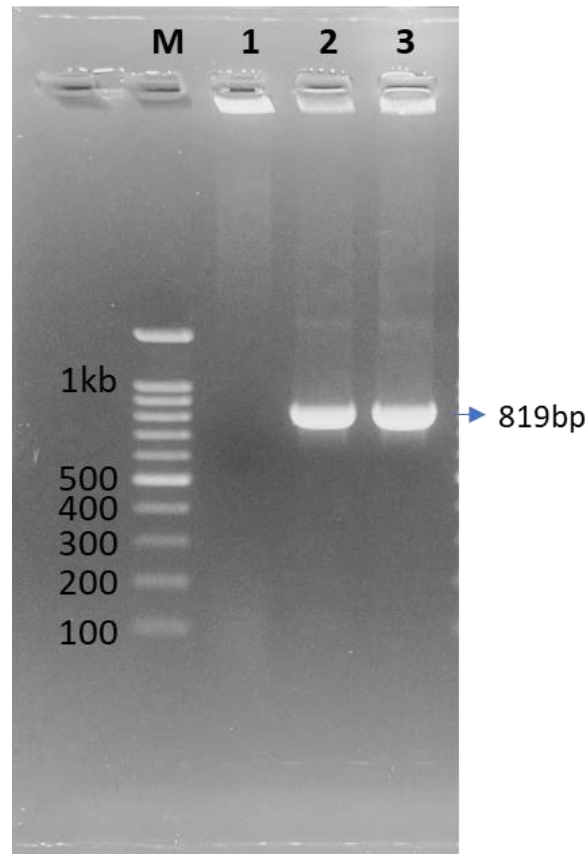


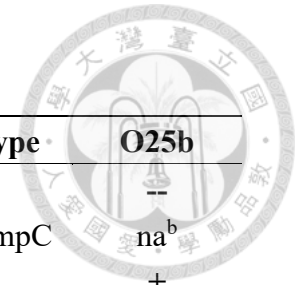
Figure 7. PCR detection of the transfer of the ESBL gene from the donor *K. pneumoniae* ATCC 700603 to the recipient *E. coli* J53 strain in a conjugation test.

Cell lysates from the donor, recipient and a transconjugant were prepared after 1 hr of conjugation and used as the templates in a PCR where the primers to amplify *bla*_{SHV-18} were added. A PCR product with the molecular weight of 819 bp was detected in the donor *K. pneumoniae* ATCC 700603 and the transconjugant, but not in the recipient *E. coli* J53 strain. M, molecular weight marker, 100 bp DNA ladder; 1, *E. coli* J53 strain; 2, *K. pneumoniae* ATCC 700603; 3, a transconjugant obtained from the MacConkey agar medium supplemented with sodium azide and cefotaxime.

Appendix 1. Results of MLST of all ESBL/pAmpC producing *E. coli* isolates. (n=16)

Case no.	phylogroups	<i>adk</i>	<i>fumC</i>	<i>gyrB</i>	<i>icd</i>	<i>mdh</i>	<i>purA</i>	<i>recA</i>	ST type	ST complex	resistance type	O25b
001	B2	53	40	47	13	36	28	29	ST131	ST131	ESBLs	--
002	A	6	11	4	10	7	8	6	ST93	ST168	ESBLs + pAmpC	na ^b
004	B2	53	40	47	13	36	28	29	ST131	ST131	ESBLs	+
008	B1	6	4	14	16	24	8	14	ST155	ST155	pAmpC	na
010	D	4	26	2	25	5	8	19	ST315	ST38	pAmpC	na
011	B2	53	40	47	13	36	28	29	ST131	ST131	ESBLs	--
025	B1	6	4	4	16	24	8	104	ST767	ST155	ESBLs + pAmpC	na
031	B2	53	40	47	13	36	28	29	ST131	ST131	ESBLs	--
032	C	10	11	4	8	8	13	73	ST617	ST10	pAmpC	na
034	B2	53	40	47	13	36	28	29	ST131	ST131	ESBLs	+
038	F	101	88	97	108	26	79	2	ST457	-- ^a	pAmpC	na
040	B2	53	40	47	13	36	28	29	ST131	ST131	ESBLs	--
042	B2	53	40	47	13	36	28	29	ST131	ST131	ESBLs	+
049	B1	6	4	4	16	24	8	104	ST767	ST155	pAmpC	na
050	B2	14	14	10	200	17	7	10	ST1193	ST14	ESBLs	na
051	B2	88	103	19	36	23	44	26	ST372	--	pAmpC	na

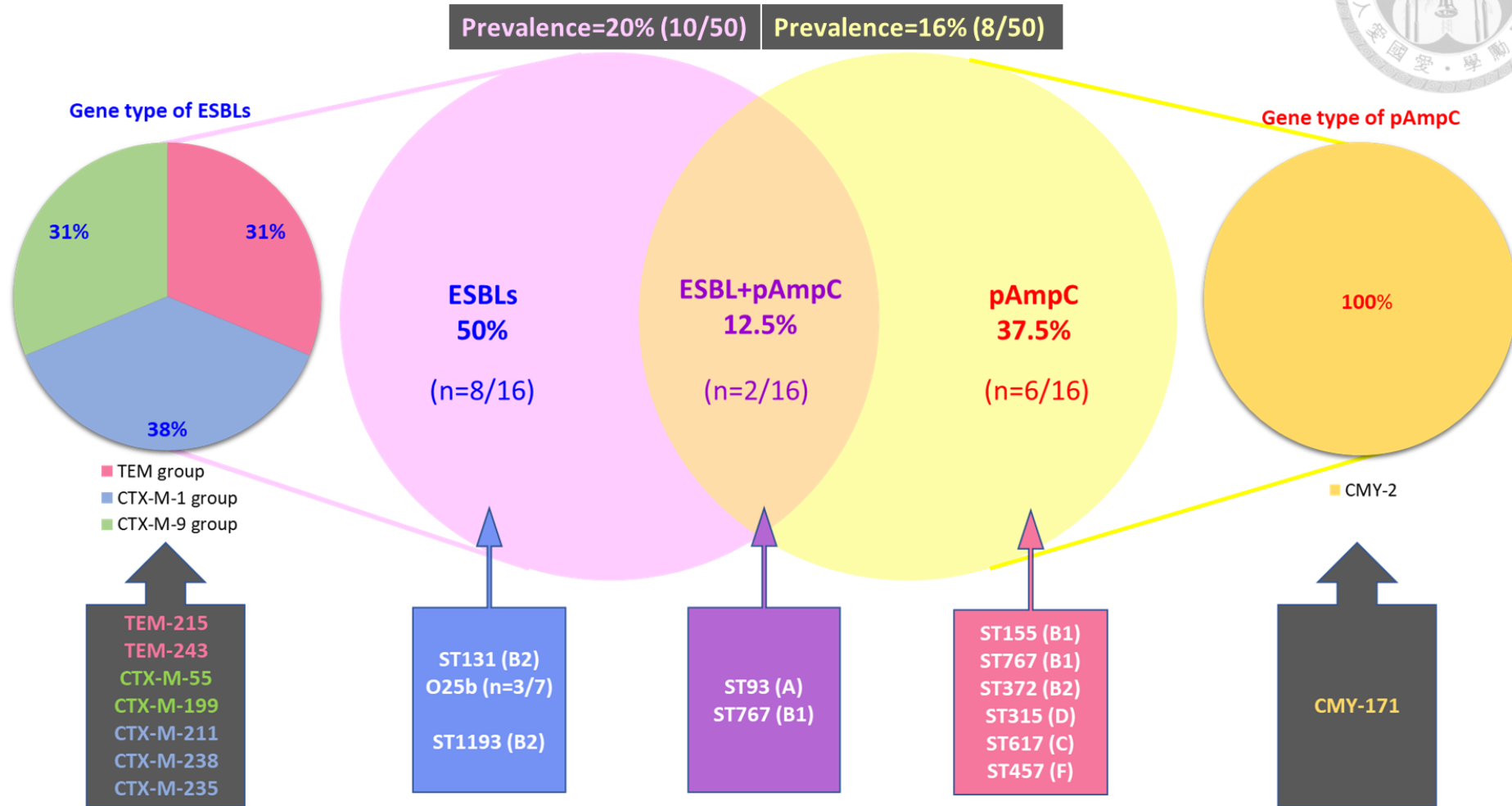
^a: not detected, ^b: not available.





Appendix 2. Overview ESBL/pAmpC producing *E. coli* characteristics and genotypes. (n=16)

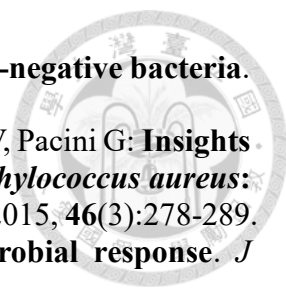
16 out of 50 isolates resistant to 3GC.



第五章 參考文獻



1. 吳欣霞: 動物和人分離之共生性大腸桿菌多重抗藥性的比較研究。中國醫藥大學生物醫學研究所碩士班碩士論文, 台中市。取自 <https://hdl.handle.net/11296/wzc7ys>. 2017.
2. 吳孟庭: 分析克雷白氏肺炎桿菌中質體媒介之 AmpC 乙內醯胺酶。高雄醫學大學醫學研究所碩士論文, 高雄市。取自 <https://hdl.handle.net/11296/g75v5k>. 2008.
3. 台灣衛生福利部疾病管制署: 台灣醫院感染管制與抗藥性監測管理系統 (THAS 系統) 2020 年第三季 監視報告. In.; 2020.
4. 許文謙: 臺灣北部某醫學中心菌血症克雷白氏肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 菌株之 AmpC β -lactamase 其流行病學以及抗藥特性之研究。臺北醫學大學醫學檢驗暨生物技術學系所碩士論文, 台北市。取自 <https://hdl.handle.net/11296/7s9q43>. 2014.
5. 莊易潔: 中台灣地區雞隻腸道桿菌多黏菌素抗藥性基因 *mcr-1* 與廣效性乙醯胺酶基因抗藥性之盛行率調查。國立中興大學獸醫學系暨研究所碩士論文, 台中市。取自 <https://hdl.handle.net/11296/dpr973>. 2020.
6. Hutchings MI, Truman AW, Wilkinson B: **Antibiotics: past, present and future.** *Curr Opin Microbiol* 2019, **51**:72-80.
7. Christaki E, Marcou M, Tofarides A: **Antimicrobial resistance in bacteria: mechanisms, evolution, and persistence.** *J Mol Evol* 2020, **88**(1):26-40.
8. Tunstall T, Portelli S, Phelan J, Clark TG, Ascher DB, Furnham N: **Combining structure and genomics to understand antimicrobial resistance.** *Comput Struct Biotechnol J* 2020, **18**:3377-3394.
9. Inoue H: **Strategic approach for combating antimicrobial resistance (AMR).** *Glob Health Med* 2019, **1**(2):61-64.
10. Asokan GV, Ramadhan T, Ahmed E, Sanad H: **WHO global priority pathogens list: A bibliometric analysis of medline-PubMed for knowledge mobilization to infection prevention and control practices in Bahrain.** *Oman Med J* 2019, **34**(3):184-193.
11. Aly M, Balkhy HH: **The prevalence of antimicrobial resistance in clinical isolates from Gulf Corporation Council countries.** *Antimicrob Resist Infect Control* 2012, **1**(1):26.
12. Bader MS, Loeb M, Brooks AA: **An update on the management of urinary tract infections in the era of antimicrobial resistance.** *Postgrad Med* 2017, **129**(2):242-258.
13. Mazzariol A, Bazaj A, Cornaglia G: **Multi-drug-resistant Gram-negative bacteria causing urinary tract infections: A review.** *J Chemother* 2017, **29**(sup1):2-9.
14. Venter H, Henningsen ML, Begg SL: **Antimicrobial resistance in healthcare, agriculture and the environment: the biochemistry behind the headlines.** *Essays Biochem* 2017, **61**(1):1-10.
15. Reygaert WC: **An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria.** *AIMS Microbiol* 2018, **4**(3):482-501.
16. Kumar A, Schweizer HP: **Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake.** *Adv Drug Deliv Rev* 2005, **57**(10):1486-1513.

- 
17. Spratt BG, Cromie KD: **Penicillin-binding proteins of gram-negative bacteria.** *Rev Infect Dis* 1988, **10**(4):699-711.
 18. Stefani S, Campanile F, Santagati M, Mezzatesta ML, Cafiso V, Pacini G: **Insights and clinical perspectives of daptomycin resistance in *Staphylococcus aureus*: A review of the available evidence.** *Int J Antimicrob Agents* 2015, **46**(3):278-289.
 19. Hawkey PM: **Mechanisms of quinolone action and microbial response.** *J Antimicrob Chemother* 2003, **51** Suppl 1:29-35.
 20. Vedantam G, Guay GG, Austria NE, Doktor SZ, Nichols BP: **Characterization of mutations contributing to sulfathiazole resistance in *Escherichia coli*.** *Antimicrob Agents Chemother* 1998, **42**(1):88-93.
 21. Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ: **Molecular mechanisms of antibiotic resistance.** *Nat Rev Microbiol* 2015, **13**(1):42-51.
 22. Blair JM, Richmond GE, Piddock LJ: **Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance.** *Future Microbiol* 2014, **9**(10):1165-1177.
 23. Mell JC, Redfield RJ: **Natural competence and the evolution of DNA uptake specificity.** *J Bacteriol* 2014, **196**(8):1471-1483.
 24. Lang AS, Beatty JT: **Importance of widespread gene transfer agent genes in alpha-proteobacteria.** *Trends Microbiol* 2007, **15**(2):54-62.
 25. Wiedenbeck J, Cohan FM: **Origins of bacterial diversity through horizontal genetic transfer and adaptation to new ecological niches.** *FEMS Microbiol Rev* 2011, **35**(5):957-976.
 26. Daubin V, Szöllösi GJ: **Horizontal gene transfer and the history of life.** *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2016, **8**(4):a018036.
 27. Bush K: **Past and present perspectives on β -Lactamases.** *Antimicrob Agents Chemother* 2018, **62**(10).
 28. Wilson H, Török ME: **Extended-spectrum β -lactamase-producing and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*.** *Microb Genom* 2018, **4**(7).
 29. Sawa T, Kooguchi K, Moriyama K: **Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance.** *J Intensive Care* 2020, **8**:13.
 30. Paterson DL, Bonomo RA: **Extended-spectrum beta-lactamases: A clinical update.** *Clin Microbiol Rev* 2005, **18**(4):657-686.
 31. Drawz SM, Bonomo RA: **Three decades of beta-lactamase inhibitors.** *Clin Microbiol Rev* 2010, **23**(1):160-201.
 32. Datta N, Kontomichalou P: **Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*.** *Nature* 1965, **208**(5007):239-241.
 33. Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S: **Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*.** *Infection* 1983, **11**(6):315-317.
 34. Lermينياux NA, Cameron ADS: **Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments.** *Can J Microbiol* 2019, **65**(1):34-44.
 35. Bauernfeind A, Holley M, Jungwirth R, Mangold P, Röhnisch T, Schweighart S, Wilhelm R, Casellas J, Goldberg M: **A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*.** *Infection* 1992, **20**(3):158-163.
 36. Kojima A, Ishii Y, Ishihara K, Esaki H, Asai T, Oda C, Tamura Y, Takahashi T, Yamaguchi K: **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.**

- Antimicrob Agents Chemother* 2005, **49**(8):3533-3537.
37. Peirano G, Pitout JD: **Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: Update on molecular epidemiology and treatment options.** *Drugs* 2019, **79**(14):1529-1541.
 38. Lahlaoui H, Ben Haj Khalifa A, Ben Moussa M: **Epidemiology of *Enterobacteriaceae* producing CTX-M type extended spectrum β -lactamase (ESBL).** *Médecine et Maladies Infectieuses* 2014, **44**(9):400-404.
 39. Falagas ME, Karageorgopoulos DE: **Extended-spectrum β -lactamase-producing organisms.** *Journal of Hospital Infection* 2009, **73**(4):345-354.
 40. Stapleton PJ, Murphy M, McCallion N, Brennan M, Cunney R, Drew RJ: **Outbreaks of extended spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in neonatal intensive care units: A systematic review.** *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2016, **101**(1):F72-78.
 41. Alevizakos M, Karanika S, Detsis M, Mylonakis E: **Colonisation with extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* and risk for infection among patients with solid or haematological malignancy: A systematic review and meta-analysis.** *Int J Antimicrob Agents* 2016, **48**(6):647-654.
 42. Wragg R, Harris A, Patel M, Robb A, Chandran H, McCarthy L: **Extended spectrum beta lactamase (ESBL) producing bacteria urinary tract infections and complex pediatric urology.** *J Pediatr Surg* 2017, **52**(2):286-288.
 43. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JD: **The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*.** *Clin Microbiol Rev* 2015, **28**(3):565-591.
 44. Bezabih YM, Sabiiti W, Alamneh E, Bezabih A, Peterson GM, Bezabhe WM, Roujeinikova A: **The global prevalence and trend of human intestinal carriage of ESBL-producing *Escherichia coli* in the community.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2020, **76**(1):22-29.
 45. Kittinger C, Lipp M, Folli B, Kirschner A, Baumert R, Galler H, Grisold AJ, Luxner J, Weissenbacher M, Farnleitner AH *et al*: ***Enterobacteriaceae* isolated from the river danube: Antibiotic resistances, with a focus on the presence of ESBL and carbapenemases.** *PLoS One* 2016, **11**(11):e0165820.
 46. Hernández J, González-Acuña D: **Anthropogenic antibiotic resistance genes mobilization to the polar regions.** *Infect Ecol Epidemiol* 2016, **6**:32112.
 47. Kawamura K, Nagano N, Suzuki M, Wachino JI, Kimura K, Arakawa Y: **ESBL-producing *Escherichia coli* [SEP] and its rapid rise among healthy people.** *Food Saf (Tokyo)* 2017, **5**(4):122-150.
 48. Liu X, Thungrat K, Boothe DM: **Occurrence of OXA-48 carbapenemase and other β -Lactamase genes in ESBL-producing multidrug resistant *Escherichia coli* from dogs and cats in the United States, 2009-2013.** *Front Microbiol* 2016, **7**:1057.
 49. Salgado-Caxito M, Benavides JA, Adell AD, Paes AC, Moreno-Switt AI: **Global prevalence and molecular characterization of extended-spectrum β -lactamase producing-*Escherichia coli* in dogs and cats - a scoping review and meta-analysis.** *One Health* 2021, **12**:100236.
 50. Zhang PLC, Shen X, Chalmers G, Reid-Smith RJ, Slavic D, Dick H, Boerlin P: **Prevalence and mechanisms of extended-spectrum cephalosporin resistance in clinical and fecal *Enterobacteriaceae* isolates from dogs in Ontario, Canada.** *Vet Microbiol* 2018, **213**:82-88.
 51. Baede VO, Wagenaar JA, Broens EM, Duim B, Dohmen W, Nijse R, Timmerman

- AJ, Hordijk J: **Longitudinal study of extended-spectrum- β -lactamase- and AmpC-producing *Enterobacteriaceae* in household dogs.** *Antimicrob Agents Chemother* 2015, **59**(6):3117-3124.
52. Yu WL, Chuang YC, Walther-Rasmussen J: **Extended-spectrum beta-lactamases in Taiwan: Epidemiology, detection, treatment and infection control.** *J Microbiol Immunol Infect* 2006, **39**(4):264-277.
53. Liu HY, Lin HC, Lin YC, Yu SH, Wu WH, Lee YJ: **Antimicrobial susceptibilities of urinary extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* to fosfomycin and nitrofurantoin in a teaching hospital in Taiwan.** *J Microbiol Immunol Infect* 2011, **44**(5):364-368.
54. Hung WT, Cheng MF, Tseng FC, Chen YS, Shin-Jung Lee S, Chang TH, Lin HH, Hung CH, Wang JL: **Bloodstream infection with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: The role of virulence genes.** *J Microbiol Immunol Infect* 2019, **52**(6):947-955.
55. Lin TC, Hung YP, Lee CC, Lin WT, Huang LC, Dai W, Kuo CS, Ko WC, Huang YL: **Clinical impact and risk factors of nonsusceptibility to third-generation cephalosporins among hospitalized adults with monomicrobial *Enterobacteriaceae* bacteremia in Southern Taiwan: A multicenter study.** *Infect Drug Resist* 2021, **14**:689-697.
56. Kuan N-L, Chang C-W, Lee C-A, Yeh K-S: **Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from the urine of dogs and cats suspected of urinary tract infection in a Veterinary Teaching Hospital.** *Taiwan Vet J* 2016, **42**(03):143-148.
57. Huang YH, Kuan NL, Yeh KS: **Characteristics of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from dogs and cats admitted to a Veterinary Teaching Hospital in Taipei, Taiwan from 2014 to 2017.** *Front Vet Sci* 2020, **7**:395.
58. Chen JW, Huang HH, Chang SM, Scaria J, Chiu YL, Chen CM, Ko WC, Wang JL: **Antibiotic-resistant *Escherichia coli* and sequence type 131 in fecal colonization in dogs in Taiwan.** *Microorganisms* 2020, **8**(9).
59. Chen Y, Minasov G, Roth TA, Prati F, Shoichet BK: **The deacylation mechanism of AmpC beta-lactamase at ultrahigh resolution.** *J Am Chem Soc* 2006, **128**(9):2970-2976.
60. Oteo J, Cercenado E, Cuevas O, Bautista V, Delgado-Iribarren A, Orden B, Pérez-Vázquez M, García-Cobos S, Campos J: **AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli*: emergence of CMY-2-producing virulent phylogroup D isolates belonging mainly to STs 57, 115, 354, 393, and 420, and phylogroup B2 isolates belonging to the international clone O25b-ST131.** *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010, **67**(3):270-276.
61. Abraham EP, Chain E: **An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940.** *Rev Infect Dis* 1988, **10**(4):677-678.
62. Jacoby GA: **AmpC beta-lactamases.** *Clin Microbiol Rev* 2009, **22**(1):161-182, Table of Contents.
63. Juan C, Torrens G, González-Nicolau M, Oliver A: **Diversity and regulation of intrinsic β -lactamases from non-fermenting and other Gram-negative opportunistic pathogens.** *FEMS Microbiol Rev* 2017, **41**(6):781-815.
64. Mizrahi A, Delerue T, Morel H, Le Monnier A, Carbonnelle E, Pilmis B, Zahar JR: **Infections caused by naturally AmpC-producing *Enterobacteriaceae*: Can we use third-generation cephalosporins? A narrative review.** *Int J Antimicrob*

- Agents* 2020, **55**(2):105834.
65. Honoré N, Nicolas MH, Cole ST: **Inducible cephalosporinase production in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* is controlled by a regulatory gene that has been deleted from *Escherichia coli*.** *Embo j* 1986, **5**(13):3709-3714.
 66. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA: **Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases.** *Antimicrob Agents Chemother* 2002, **46**(1):1-11.
 67. Bauernfeind A, Chong Y, Schweighart S: **Extended broad spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins.** *Infection* 1989, **17**(5):316-321.
 68. Papanicolaou GA, Medeiros AA, Jacoby GA: **Novel plasmid-mediated beta-lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and alpha-methoxy beta-lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*.** *Antimicrob Agents Chemother* 1990, **34**(11):2200-2209.
 69. Perez-Perez FJ, Hanson ND: **Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR.** *J Clin Microbiol* 2002, **40**(6):2153-2162.
 70. Meini S, Tascini C, Cei M, Sozio E, Rossolini GM: **AmpC β -lactamase-producing *Enterobacteriales*: what a clinician should know.** *Infection* 2019, **47**(3):363-375.
 71. Bauernfeind A, Chong Y, Lee K: **Plasmid-encoded AmpC beta-lactamases: How far have we gone 10 years after the discovery?** *Yonsei Med J* 1998, **39**(6):520-525.
 72. Pascual V, Alonso N, Simó M, Ortiz G, Garcia MC, Xercavins M, Rivera A, Morera MA, Miró E, Espejo E *et al*: **Bloodstream infections caused by *Escherichia coli* producing AmpC β -lactamases: epidemiology and clinical features.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2016, **35**(12):1997-2003.
 73. den Drijver E, Verweij JJ, Verhulst C, Oome S, Soer J, Willemsen I, Schrauwen EJA, Kluytmans-van den Bergh MFQ, Kluytmans J: **Decline in AmpC β -lactamase-producing *Escherichia coli* in a Dutch teaching hospital (2013-2016).** *PLoS One* 2018, **13**(10):e0204864.
 74. Harris PNA, Ben Zakour NL, Roberts LW, Wailan AM, Zowawi HM, Tambyah PA, Lye DC, Jureen R, Lee TH, Yin M *et al*: **Whole genome analysis of cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from bloodstream infections in Australia, New Zealand and Singapore: High prevalence of CMY-2 producers and ST131 carrying blaCTX-M-15 and blaCTX-M-27.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2017, **73**(3):634-642.
 75. Ulstad CR, Solheim M, Berg S, Lindbæk M, Dahle UR, Wester AL: **Carriage of ESBL/AmpC-producing or ciprofloxacin non-susceptible *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* in healthy people in Norway.** *Antimicrob Resist Infect Control* 2016, **5**:57.
 76. Gandolfi-Decristophoris P, Petrini O, Ruggeri-Bernardi N, Schelling E: **Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in healthy companion animals living in nursing homes and in the community.** *Am J Infect Control* 2013, **41**(9):831-835.
 77. Sanchez S, McCrackin Stevenson MA, Hudson CR, Maier M, Buffington T, Dam Q, Maurer JJ: **Characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates associated with nosocomial infections in dogs.** *Journal of Clinical Microbiology* 2002, **40**(10):3586-3595.
 78. Rubin JE, Pitout JDD: **Extended-spectrum β -lactamase, carbapenemase and**

- AmpC producing *Enterobacteriaceae* in companion animals.** *Veterinary Microbiology* 2014, **170**(1):10-18.
79. Bortolami A, Zendri F, Maciucă EI, Wattret A, Ellis C, Schmidt V, Pinchbeck G, Timofte D: **Diversity, virulence, and clinical significance of extended-spectrum β -Lactamase- and pAmpC-producing *Escherichia coli* from companion animals.** *Front Microbiol* 2019, **10**:1260.
80. Shaheen BW, Nayak R, Foley SL, Kweon O, Deck J, Park M, Rafii F, Boothe DM: **Molecular characterization of resistance to extended-spectrum cephalosporins in clinical *Escherichia coli* isolates from companion animals in the United States.** *Antimicrob Agents Chemother* 2011, **55**(12):5666-5675.
81. Bogaerts P, Huang TD, Bouchahrouf W, Bauraing C, Berhin C, El Garch F, Glupczynski Y: **Characterization of ESBL- and AmpC-producing *Enterobacteriaceae* from diseased companion animals in Europe.** *Microb Drug Resist* 2015, **21**(6):643-650.
82. Yan JJ, Ko WC, Wu HM, Tsai SH, Chuang CL, Wu JJ: **Complexity of *Klebsiella pneumoniae* isolates resistant to both cephamycins and extended-spectrum cephalosporins at a teaching hospital in Taiwan.** *J Clin Microbiol* 2004, **42**(11):5337-5340.
83. Chang FY, Siu LK, Fung CP, Huang MH, Ho M: **Diversity of SHV and TEM beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae*: Gene evolution in Northern Taiwan and two novel beta-lactamases, SHV-25 and SHV-26.** *Antimicrob Agents Chemother* 2001, **45**(9):2407-2413.
84. Yan JJ, Wu SM, Tsai SH, Wu JJ, Su IJ: **Prevalence of SHV-12 among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases and identification of a novel AmpC enzyme (CMY-8) in Southern Taiwan.** *Antimicrob Agents Chemother* 2000, **44**(6):1438-1442.
85. Yan JJ, Ko WC, Tsai SH, Wu HM, Jin YT, Wu JJ: **Dissemination of CTX-M-3 and CMY-2 beta-lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* in Southern Taiwan.** *J Clin Microbiol* 2000, **38**(12):4320-4325.
86. Yan JJ, Ko WC, Jung YC, Chuang CL, Wu JJ: **Emergence of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing inducible DHA-1 beta-lactamase in a university hospital in Taiwan.** *J Clin Microbiol* 2002, **40**(9):3121-3126.
87. Yan JJ, Hsueh PR, Lu JJ, Chang FY, Shyr JM, Wan JH, Liu YC, Chuang YC, Yang YC, Tsao SM *et al*: **Extended-spectrum beta-lactamases and plasmid-mediated AmpC enzymes among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from seven medical centers in Taiwan.** *Antimicrob Agents Chemother* 2006, **50**(5):1861-1864.
88. Ma L, Siu LK, Lin JC, Wu TL, Fung CP, Wang JT, Lu PL, Chuang YC: **Updated molecular epidemiology of carbapenem-non-susceptible *Escherichia coli* in Taiwan: First identification of KPC-2 or NDM-1-producing *E. coli* in Taiwan.** *BMC Infect Dis* 2013, **13**:599.
89. El-Sayed Ahmed MAE, Zhong LL, Shen C, Yang Y, Doi Y, Tian GB: **Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: An extended review (2000-2019).** *Emerg Microbes Infect* 2020, **9**(1):868-885.
90. Kempf I, Jouy E, Chauvin C: **Colistin use and colistin resistance in bacteria from animals.** *Int J Antimicrob Agents* 2016, **48**(6):598-606.
91. Rhouma M, Beaudry F, Thériault W, Letellier A: **Colistin in pig production: Chemistry, mechanism of antibacterial action, microbial resistance emergence, and one health perspectives.** *Front Microbiol* 2016, **7**:1789.

92. Gao R, Hu Y, Li Z, Sun J, Wang Q, Lin J, Ye H, Liu F, Srinivas S, Li D *et al*: **Dissemination and mechanism for the MCR-1 colistin resistance.** *PLoS Pathog* 2016, **12**(11):e1005957.
93. Hussein NH, Al-Kadmy IMS, Taha BM, Hussein JD: **Mobilized colistin resistance (*mcr*) genes from 1 to 10: A comprehensive review.** *Molecular Biology Reports* 2021, **48**(3):2897-2907.
94. Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X *et al*: **Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study.** *The Lancet Infectious Diseases* 2016, **16**(2):161-168.
95. Meinersmann RJ, Ladely SR, Plumblee JR, Hall MC, Simpson SA, Ballard LL, Scheffler BE, Genzlinger LL, Cook KL: **Colistin resistance *mcr-1*-gene-bearing *Escherichia coli* strain from the United States.** *Genome Announc* 2016, **4**(5).
96. Walkty A, Karlowsky JA, Adam HJ, Lagacé-Wiens P, Baxter M, Mulvey MR, McCracken M, Poutanen SM, Roscoe D, Zhanel GG: **Frequency of MCR-1-mediated colistin resistance among *Escherichia coli* clinical isolates obtained from patients in Canadian hospitals (CANWARD 2008-2015).** *CMAJ Open* 2016, **4**(4):E641-e645.
97. Delgado-Blas JF, Ovejero CM, Abadia-Patiño L, Gonzalez-Zorn B: **Coexistence of *mcr-1* and *bla*NDM-1 in *Escherichia coli* from Venezuela.** *Antimicrob Agents Chemother* 2016, **60**(10):6356-6358.
98. Ortega-Paredes D, Barba P, Zurita J: **Colistin-resistant *Escherichia coli* clinical isolate harbouring the *mcr-1* gene in Ecuador.** *Epidemiol Infect* 2016, **144**(14):2967-2970.
99. Zhang H, Seward CH, Wu Z, Ye H, Feng Y: **Genomic insights into the ESBL and MCR-1-producing ST648 *Escherichiacoli* with multi-drug resistance.** *Sci Bull (Beijing)* 2016, **61**:875-878.
100. Pham Thanh D, Thanh Tuyen H, Nguyen Thi Nguyen T, Chung The H, Wick RR, Thwaites GE, Baker S, Holt KE: **Inducible colistin resistance via a disrupted plasmid-borne *mcr-1* gene in a 2008 Vietnamese *Shigella sonnei* isolate.** *J Antimicrob Chemother* 2016, **71**(8):2314-2317.
101. Doumith M, Godbole G, Ashton P, Larkin L, Dallman T, Day M, Day M, Muller-Pebody B, Ellington MJ, de Pinna E *et al*: **Detection of the plasmid-mediated *mcr-1* gene conferring colistin resistance in human and food isolates of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* in England and Wales.** *J Antimicrob Chemother* 2016, **71**(8):2300-2305.
102. Perrin-Guyomard A, Bruneau M, Houée P, Deleurme K, Legrandois P, Poirier C, Soumet C, Sanders P: **Prevalence of *mcr-1* in commensal *Escherichia coli* from French livestock, 2007 to 2014.** *Euro Surveill* 2016, **21**(6).
103. Irrgang A, Roschanski N, Tenhagen BA, Grobbel M, Skladnikiewicz-Ziemer T, Thomas K, Roesler U, Käsbohrer A: **Prevalence of *mcr-1* in *E. coli* from livestock and food in Germany, 2010-2015.** *PLoS One* 2016, **11**(7):e0159863.
104. Di Pilato V, Arena F, Tascini C, Cannatelli A, Henrici De Angelis L, Fortunato S, Giani T, Menichetti F, Rossolini GM: ***mcr-1.2*, a new *mcr* variant carried on a transferable plasmid from a colistin-resistant KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strain of sequence type 512.** *Antimicrob Agents Chemother* 2016, **60**(9):5612-5615.
105. Nordmann P, Assouvie L, Prod'Hom G, Poirel L, Greub G: **Screening of plasmid-mediated MCR-1 colistin-resistance from bacteremia.** *Eur J Clin Microbiol*

- Infect Dis* 2016, **35**(11):1891-1892.
106. Skov RL, Monnet DL: **Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1* gene): Three months later, the story unfolds.** *Euro Surveill* 2016, **21**(9):30155.
 107. Malhotra-Kumar S, Xavier BB, Das AJ, Lammens C, Butaye P, Goossens H: **Colistin resistance gene *mcr-1* harboured on a multidrug resistant plasmid.** *Lancet Infect Dis* 2016, **16**(3):283-284.
 108. Anyanwu MU, Okpala COR, Chah KF, Shoyinka VS: **Prevalence and traits of mobile colistin resistance gene harbouring isolates from different ecosystems in Africa.** *Biomed Res Int* 2021, **2021**:6630379.
 109. Poirel L, Kieffer N, Liassine N, Thanh D, Nordmann P: **Plasmid-mediated carbapenem and colistin resistance in a clinical isolate of *Escherichia coli*.** *Lancet Infect Dis* 2016, **16**(3):281.
 110. Falgenhauer L, Waezsada SE, Yao Y, Imirzalioglu C, Käsbohrer A, Roesler U, Michael GB, Schwarz S, Werner G, Kreienbrock L *et al*: **Colistin resistance gene *mcr-1* in extended-spectrum β -lactamase-producing and carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Germany.** *Lancet Infect Dis* 2016, **16**(3):282-283.
 111. Zhang P, Wang J, Wang X, Bai X, Ma J, Dang R, Xiong Y, Fanning S, Bai L, Yang Z: **Characterization of five *Escherichia coli* isolates co-expressing ESBL and MCR-1 resistance mechanisms from different origins in China.** *Front Microbiol* 2019, **10**:1994.
 112. Rumi MV, Mas J, Elena A, Cerdeira L, Muñoz ME, Lincopan N, Gentilini É R, Di Conza J, Gutkind G: **Co-occurrence of clinically relevant β -lactamases and MCR-1 encoding genes in *Escherichia coli* from companion animals in Argentina.** *Vet Microbiol* 2019, **230**:228-234.
 113. Forde BM, Zowawi HM, Harris PNA, Roberts L, Ibrahim E, Shaikh N, Deshmukh A, Sid Ahmed MA, Al Maslamani M, Cottrell K *et al*: **Discovery of *mcr-1*-mediated colistin resistance in a highly virulent *Escherichia coli* lineage.** *mSphere* 2018, **3**(5).
 114. Xiaomin S, Yiming L, Yuying Y, Zhangqi S, Yongning W, Shaolin W: **Global impact of *mcr-1*-positive *Enterobacteriaceae* bacteria on "one health".** *Crit Rev Microbiol* 2020, **46**(5):565-577.
 115. Bachiri T, Lalaoui R, Bakour S, Allouache M, Belkebla N, Rolain JM, Touati A: **First report of the plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-1* in *Escherichia coli* ST405 isolated from wildlife in Bejaia, Algeria.** *Microb Drug Resist* 2018, **24**(7):890-895.
 116. Zhang XF, Doi Y, Huang X, Li HY, Zhong LL, Zeng KJ, Zhang YF, Patil S, Tian GB: **Possible transmission of *mcr-1*-harboring *Escherichia coli* between companion animals and human.** *Emerg Infect Dis* 2016, **22**(9):1679-1681.
 117. Lei L, Wang Y, Schwarz S, Walsh TR, Ou Y, Wu Y, Li M, Shen Z: ***mcr-1* in *Enterobacteriaceae* from companion animals, Beijing, China, 2012-2016.** *Emerg Infect Dis* 2017, **23**(4):710-711.
 118. Chen Y, Liu Z, Zhang Y, Zhang Z, Lei L, Xia Z: **Increasing prevalence of ESBL-producing multidrug resistance *Escherichia coli* from diseased pets in Beijing, China from 2012 to 2017.** *Front Microbiol* 2019, **10**:2852.
 119. Lei L, Wang Y, He J, Cai C, Liu Q, Yang D, Zou Z, Shi L, Jia J, Wang Y *et al*: **Prevalence and risk analysis of mobile colistin resistance and extended-spectrum β -lactamase genes carriage in pet dogs and their owners: A population based cross-sectional study.** *Emerg Microbes Infect* 2021,

- 10(1):242-251.
120. Loayza-Villa F, Salinas L, Tijet N, Villavicencio F, Tamayo R, Salas S, Rivera R, Villacis J, Satan C, Ushiña L *et al*: **Diverse *Escherichia coli* lineages from domestic animals carrying colistin resistance gene *mcr-1* in an Ecuadorian household.** *J Glob Antimicrob Resist* 2020, **22**:63-67.
121. Moon DC, Mechesso AF, Kang HY, Kim SJ, Choi JH, Kim MH, Song HJ, Yoon SS, Lim SK: **First report of an *Escherichia coli* strain carrying the colistin resistance determinant *mcr-1* from a dog in South Korea.** *Antibiotics (Basel)* 2020, **9**(11).
122. Bich VTN, Thanh LV, Thai PD, Van Phuong TT, Oomen M, Driessen C, Beuken E, Hoang TH, van Doorn HR, Penders J *et al*: **An exploration of the gut and environmental resistome in a community in northern Vietnam in relation to antibiotic use.** *Antimicrob Resist Infect Control* 2019, **8**:194.
123. Kuo SC, Huang WC, Wang HY, Shiao YR, Cheng MF, Lauderdale TL: **Colistin resistance gene *mcr-1* in *Escherichia coli* isolates from humans and retail meats, Taiwan.** *J Antimicrob Chemother* 2016, **71**(8):2327-2329.
124. Liu JY, Liao TL, Huang WC, Liu YM, Wu KM, Lauderdale TL, Tsai SF, Kuo SC, Kuo HC: **Increased *mcr-1* in pathogenic *Escherichia coli* from diseased swine, Taiwan.** *J Microbiol Immunol Infect* 2020, **53**(5):751-756.
125. Hsueh SC, Lai CC, Huang YT, Liao CH, Chiou MT, Lin CN, Hsueh PR: **Molecular evidence for intra- and inter-farm spread of porcine *mcr-1*-carrying *Escherichia coli* in Taiwan.** *Front Microbiol* 2020, **11**:1967.
126. Lai CC, Lin YT, Lin YT, Lu MC, Shi ZY, Chen YS, Wang LS, Tseng SH, Lin CN, Chen YH *et al*: **Clinical characteristics of patients with bacteraemia due to the emergence of *mcr-1*-harbouring *Enterobacteriaceae* in humans and pigs in Taiwan.** *Int J Antimicrob Agents* 2018, **52**(5):651-657.
127. Chen CW, Tang HJ, Chen CC, Lu YC, Chen HJ, Su BA, Weng TC, Chuang YC, Lai CC: **The microbiological characteristics of carbapenem-resistant enterobacteriaceae carrying the *mcr-1* gene.** *J Clin Med* 2019, **8**(2).
128. Wang CH, Lin JC, Yu CM, Wu RX: **Emergence of multiple drug-resistant *Escherichia coli* harboring *mcr-1* in immunocompetent patients from the community.** *J Microbiol Immunol Infect* 2020, **53**(4):663-664.
129. Mirsepasi-Lauridsen HC, Vallance BA, Krogfelt KA, Petersen AM: ***Escherichia coli* Pathobionts Associated with Inflammatory Bowel Disease.** *Clin Microbiol Rev* 2019, **32**(2).
130. Astley DJ, Masters N, Kuballa A, Katouli M: **Commonality of adherent-invasive *Escherichia coli* isolated from patients with extraintestinal infections, healthy individuals and the environment.** *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2020.
131. Gomes TA, Elias WP, Scaletsky IC, Guth BE, Rodrigues JF, Piazza RM, Ferreira LC, Martinez MB: **Diarrheagenic *Escherichia coli*.** *Braz J Microbiol* 2016, **47** Suppl 1:3-30.
132. Robins-Browne RM, Holt KE, Ingle DJ, Hocking DM, Yang J, Tauschek M: **Are *Escherichia coli* pathotypes still relevant in the Era of whole-genome sequencing?** *Front Cell Infect Microbiol* 2016, **6**:141.
133. Johnson JR, Gajewski A, Lesse AJ, Russo TA: **Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* as a cause of invasive nonurinary infections.** *J Clin Microbiol* 2003, **41**(12):5798-5802.
134. Johnson JR, Russo TA: **Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic**

- (uropathogenic) *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol* 2005, **295**(6-7):383-404.
135. Nicolas-Chanoine MH, Bertrand X, Madec JY: ***Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group**. *Clin Microbiol Rev* 2014, **27**(3):543-574.
136. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E: **Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group**. *Appl Environ Microbiol* 2000, **66**(10):4555-4558.
137. Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM: **The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups**. *Environ Microbiol Rep* 2013, **5**(1):58-65.
138. Chaudhuri RR, Henderson IR: **The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny**. *Infection, Genetics and Evolution* 2012, **12**(2):214-226.
139. Tenailon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E: **The population genetics of commensal *Escherichia coli***. *Nat Rev Microbiol* 2010, **8**(3):207-217.
140. Salipante SJ, Roach DJ, Kitzman JO, Snyder MW, Stackhouse B, Butler-Wu SM, Lee C, Cookson BT, Shendure J: **Large-scale genomic sequencing of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains**. *Genome Res* 2015, **25**(1):119-128.
141. Pitout JD, DeVinney R: ***Escherichia coli* ST131: A multidrug-resistant clone primed for global domination**. *F1000Res* 2017, **6**.
142. Vangchhia B, Abraham S, Bell JM, Collignon P, Gibson JS, Ingram PR, Johnson JR, Kennedy K, Trott DJ, Turnidge JD *et al*: **Phylogenetic diversity, antimicrobial susceptibility and virulence characteristics of phylogroup F *Escherichia coli* in Australia**. *Microbiology (Reading)* 2016, **162**(11):1904-1912.
143. Zude I, Leimbach A, Dobrindt U: **Prevalence of autotransporters in *Escherichia coli*: What is the impact of phylogeny and pathotype?** *Int J Med Microbiol* 2014, **304**(3-4):243-256.
144. Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA *et al*: **Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**(6):3140-3145.
145. Urwin R, Maiden MC: **Multi-locus sequence typing: A tool for global epidemiology**. *Trends Microbiol* 2003, **11**(10):479-487.
146. Muller A, Gbaguidi-Haore H, Cholley P, Hocquet D, Sauget M, Bertrand X: **Hospital-diagnosed infections with *Escherichia coli* clonal group ST131 are mostly acquired in the community**. *Sci Rep* 2021, **11**(1):5702.
147. Rogers BA, Sidjabat HE, Paterson DL: ***Escherichia coli* O25b-ST131: A pandemic, multiresistant, community-associated strain**. *J Antimicrob Chemother* 2011, **66**(1):1-14.
148. Peirano G, Pitout JD: **Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M beta-lactamases: The worldwide emergence of clone ST131 O25:H4**. *Int J Antimicrob Agents* 2010, **35**(4):316-321.
149. Matsumura Y, Yamamoto M, Nagao M, Hotta G, Matsushima A, Ito Y, Takakura S, Ichiyama S: **Emergence and spread of B2-ST131-O25b, B2-ST131-O16 and D-ST405 clonal groups among extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan**. *J Antimicrob Chemother* 2012, **67**(11):2612-2620.
150. Matsumura Y, Yamamoto M, Nagao M, Ito Y, Takakura S, Ichiyama S: **Association of fluoroquinolone resistance, virulence genes, and IncF plasmids with extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* sequence type 131 (ST131) and ST405 clonal groups**. *Antimicrob Agents Chemother* 2013,

- 57(10):4736-4742.
151. Nicolas-Chanoine MH, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso MP, Caniça MM, Park YJ, Lavigne JP, Pitout J, Johnson JR: **Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15.** *J Antimicrob Chemother* 2008, **61**(2):273-281.
 152. Coque TM, Novais A, Carattoli A, Poirel L, Pitout J, Peixe L, Baquero F, Cantón R, Nordmann P: **Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15.** *Emerg Infect Dis* 2008, **14**(2):195-200.
 153. Hussain A, Ewers C, Nandanwar N, Guenther S, Jadhav S, Wieler LH, Ahmed N: **Multiresistant uropathogenic *Escherichia coli* from a region in India where urinary tract infections are endemic: Genotypic and phenotypic characteristics of sequence type 131 isolates of the CTX-M-15 extended-spectrum- β -lactamase-producing lineage.** *Antimicrob Agents Chemother* 2012, **56**(12):6358-6365.
 154. Leflon-Guibout V, Blanco J, Amaqdouf K, Mora A, Guize L, Nicolas-Chanoine MH: **Absence of CTX-M enzymes but high prevalence of clones, including clone ST131, among fecal *Escherichia coli* isolates from healthy subjects living in the area of Paris, France.** *J Clin Microbiol* 2008, **46**(12):3900-3905.
 155. Li B, Sun JY, Liu QZ, Han LZ, Huang XH, Ni YX: **High prevalence of CTX-M β -lactamases in faecal *Escherichia coli* strains from healthy humans in Fuzhou, China.** *Scand J Infect Dis* 2011, **43**(3):170-174.
 156. Hu YY, Cai JC, Zhou HW, Chi D, Zhang XF, Chen WL, Zhang R, Chen GX: **Molecular typing of CTX-M-producing *Escherichia coli* isolates from environmental water, swine feces, specimens from healthy humans, and human patients.** *Appl Environ Microbiol* 2013, **79**(19):5988-5996.
 157. Nagaoka H, Hirai S, Morinushi H, Mizumoto S, Suzuki K, Shigemura H, Takahashi N, Suzuki F, Mochizuki M, Asanuma M *et al*: **Coinfection with human norovirus and *Escherichia coli* O25:H4 harboring two chromosomal *bla*CTX-M-14 genes in a foodborne norovirus outbreak in shizuoka prefecture, Japan.** *J Food Prot* 2020, **83**(9):1584-1591.
 158. Massella E, Reid CJ, Cummins ML, Anantanawat K, Zingali T, Serraino A, Piva S, Giacometti F, Djordjevic SP: **Snapshot study of whole genome sequences of *Escherichia coli* from healthy companion animals, livestock, wildlife, humans and food in Italy.** *Antibiotics (Basel)* 2020, **9**(11).
 159. Liakopoulos A, Betts J, La Ragione R, van Essen-Zandbergen A, Ceccarelli D, Petinaki E, Koutinas CK, Mevius DJ: **Occurrence and characterization of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae* in healthy household dogs in Greece.** *J Med Microbiol* 2018, **67**(7):931-935.
 160. Thompson MF, Litster AL, Platell JL, Trott DJ: **Canine bacterial urinary tract infections: new developments in old pathogens.** *Vet J* 2011, **190**(1):22-27.
 161. Paiva Y, Nagano DS, Cotia ALF, Guimarães T, Martins RCR, Perdigão Neto LV, Côrtes MF, Marchi AP, Corscadden L, Machado AS *et al*: **Colistin-resistant *Escherichia coli* belonging to different sequence types: Genetic characterization of isolates responsible for colonization, community- and healthcare-acquired infections.** *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2021, **63**:e38.
 162. Sonnevend Á, Ghazawi A, Alqahtani M, Shibl A, Jamal W, Hashmey R, Pal T: **Plasmid-mediated colistin resistance in *Escherichia coli* from the Arabian Peninsula.** *Int J Infect Dis* 2016, **50**:85-90.

163. Ewers C, Göttig S, Bülte M, Fiedler S, Tietgen M, Leidner U, Heydel C, Bauerfeind R, Semmler T: **Genome sequence of avian *Escherichia coli* strain IHIT25637, an extraintestinal pathogenic *E. coli* strain of ST131 encoding colistin resistance determinant MCR-1.** *Genome Announc* 2016, 4(5).
164. Wu YH, Cheng MF, Lai CH, Lin HH, Hung CH, Wang JL: **The role of sequence type (ST) 131 in adult community-onset non-ESBL-producing *Escherichia coli* bacteraemia.** *BMC Infect Dis* 2014, 14:579.
165. Wang JL, Lee CC, Lee CH, Lee NY, Hsieh CC, Hung YP, Tang HJ, Ko WC: **Clinical impact of sequence type 131 in adults with community-onset monomicrobial *Escherichia coli* bacteremia.** *J Clin Med* 2018, 7(12).
166. Cheng MF, Chen WL, Hung WY, Huang IF, Chiou YH, Chen YS, Lee SS, Hung CH, Wang JL: **Emergence of extended spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* O25b-ST131: A major community-acquired uropathogen in infants.** *Pediatr Infect Dis J* 2015, 34(5):469-475.
167. Chen PA, Hung CH, Huang PC, Chen JR, Huang IF, Chen WL, Chiou YH, Hung WY, Wang JL, Cheng MF: **Characteristics of CTX-M extended-spectrum β -Lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from multiple rivers in Southern Taiwan.** *Appl Environ Microbiol* 2016, 82(6):1889-1897.
168. Huang IF, Lee WY, Wang JL, Hung CH, Hu HH, Hung WY, Hung YJ, Chen WC, Shen YT, Cheng MF: **Fecal carriage of multidrug-resistant *Escherichia coli* by community children in southern Taiwan.** *BMC Gastroenterol* 2018, 18(1):86.
169. Wang JL, Ko WC, Hung CH, Cheng MF, Wang HY, Shiau YR, Lai JF, Huang IW, Hsieh LY, Lauderdale TY *et al*: **Temporal trend of ST131 clone among urinary *Escherichia coli* isolates in the community: A Taiwan national surveillance from 2002 to 2016.** *Microorganisms* 2021, 9(5).
170. Wu PC, Wang JL, Hsueh PR, Lin PH, Cheng MF, Huang IF, Chen YS, Lee SS, Guang-Yuan M, Yu HC *et al*: **Prevalence and risk factors for colonization by extended-spectrum β -lactamase-producing or ST 131 *Escherichia coli* among asymptomatic adults in community settings in Southern Taiwan.** *Infect Drug Resist* 2019, 12:1063-1071.
171. Tamang MD, Nam H-M, Jang G-C, Kim S-R, Chae MH, Jung S-C, Byun J-W, Park YH, Lim S-K: **Molecular characterization of extended-spectrum- β -lactamase-producing and plasmid-mediated AmpC β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from stray dogs in South Korea.** *Antimicrob Agents Chemother* 2012, 56(5):2705-2712.
172. Massip C, Oswald E: **siderophore-microcins in *Escherichia coli*: Determinants of digestive colonization, the first step toward virulence.** *Front Cell Infect Microbiol* 2020, 10:381.
173. Koraimann G: **spread and persistence of virulence and antibiotic resistance genes: A ride on the F plasmid conjugation module.** *EcoSal Plus* 2018, 8(1).
174. Tchesnokova VL, Rechkina E, Chan D, Haile HG, Larson L, Ferrier K, Schroeder DW, Solyanik T, Shibuya S, Hansen K *et al*: **Pandemic uropathogenic fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* have enhanced ability to persist in the gut and cause bacteriuria in healthy women.** *Clin Infect Dis* 2020, 70(5):937-939.
175. Tchesnokova V, Radey M, Chattopadhyay S, Larson L, Weaver JL, Kisiela D, Sokurenko EV: **Pandemic fluoroquinolone resistant *Escherichia coli* clone ST1193 emerged via simultaneous homologous recombinations in 11 gene loci.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019, 116(29):14740-14748.

176. Nguyen MN, Hoang HTT, Xavier BB, Lammens C, Le HT, Hoang NTB, Nguyen ST, Pham NT, Goossens H, Dang AD *et al*: **Prospective One Health genetic surveillance in Vietnam identifies distinct bla(CTX-M)-harbouring *Escherichia coli* in food-chain and human-derived samples.** *Clin Microbiol Infect* 2021.
177. Kim B, Seo MR, Kim J, Kim Y, Wie SH, Ki M, Cho YK, Lim S, Lee JS, Kwon KT *et al*: **molecular epidemiology of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* isolated from community-acquired urinary tract infections in Korea.** *Infect Chemother* 2020, **52**(2):194-203.
178. Maeyama Y, Taniguchi Y, Hayashi W, Ohsaki Y, Osaka S, Koide S, Tamai K, Nagano Y, Arakawa Y, Nagano N: **Prevalence of ESBL/AmpC genes and specific clones among the third-generation cephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae* from canine and feline clinical specimens in Japan.** *Vet Microbiol* 2018, **216**:183-189.
179. Manges AR: ***Escherichia coli* and urinary tract infections: The role of poultry-meat.** *Clin Microbiol Infect* 2016, **22**(2):122-129.
180. Nesporova K, Valcek A, Papagiannitsis C, Kutilova I, Jamborova I, Davidova-Gerzova L, Bitar I, Hrabak J, Literak I, Dolejska M: **multi-drug resistant plasmids with ESBL/AmpC and *mcr-5.1* in Paraguayan poultry farms: The linkage of antibiotic resistance and hatcheries.** *Microorganisms* 2021, **9**(4).
181. Flament-Simon SC, Toro M, García V, Blanco JE, Blanco M, Alonso MP, Goicoa A, Díaz-González J, Nicolas-Chanoine MH, Blanco J: **Molecular characteristics of extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC), uropathogenic *E. coli* (UPEC), and multidrug resistant *E. coli* isolated from healthy dogs in Spain. Whole genome sequencing of canine ST372 isolates and comparison with human isolates causing extraintestinal infections.** *Microorganisms* 2020, **8**(11).
182. Valat C, Drapeau A, Beurlet S, Bachy V, Boulouis HJ, Pin R, Cazeau G, Madec JY, Haenni M: **Pathogenic *Escherichia coli* in dogs reveals the predominance of ST372 and the human-associated ST73 extra-intestinal lineages.** *Front Microbiol* 2020, **11**:580.
183. Izdebski R, Baraniak A, Fiett J, Adler A, Kazma M, Salomon J, Lawrence C, Rossini A, Salvia A, Vidal Samsó J *et al*: **Clonal structure, extended-spectrum β -lactamases, and acquired AmpC-type cephalosporinases of *Escherichia coli* populations colonizing patients in rehabilitation centers in four countries.** *Antimicrob Agents Chemother* 2013, **57**(1):309-316.
184. Ben Sallem R, Ben Slama K, Estepa V, Jouini A, Gharsa H, Klibi N, Sáenz Y, Ruiz-Larrea F, Boudabous A, Torres C: **Prevalence and characterisation of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolates in healthy volunteers in Tunisia.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012, **31**(7):1511-1516.
185. Börjesson S, Bengtsson B, Jernberg C, Englund S: **Spread of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* isolates in Swedish broilers mediated by an *incl* plasmid carrying bla(CTX-M-1).** *Acta Vet Scand* 2013, **55**(1):3.
186. Ferreira JC, Penha Filho RA, Andrade LN, Berchieri A, Jr., Darini AL: **Detection of chromosomal bla(CTX-M-2) in diverse *Escherichia coli* isolates from healthy broiler chickens.** *Clin Microbiol Infect* 2014, **20**(10):O623-626.
187. Dandachi I, Sokhn ES, Dahdouh EA, Azar E, El-Bazzal B, Rolain JM, Daoud Z: **Prevalence and characterization of multi-drug-resistant Gram-negative**

- Bacilli isolated from Lebanese poultry: A nationwide study.** *Front Microbiol* 2018, **9**:550.
188. Sadikalay S, Reynaud Y, Guyomard-Rabenirina S, Falord M, Ducat C, Fabre L, Le Hello S, Talarmin A, Ferdinand S: **High genetic diversity of extended-spectrum β -lactamases producing *Escherichia coli* in feces of horses.** *Vet Microbiol* 2018, **219**:117-122.
189. Fernandes MR, Sellera FP, Moura Q, Esposito F, Sabino CP, Lincopan N: **Identification and genomic features of halotolerant extended-spectrum- β -lactamase (CTX-M)-producing *Escherichia coli* in urban-impacted coastal waters, Southeast Brazil.** *Mar Pollut Bull* 2020, **150**:110689.
190. Zhang R, Dong N, Zeng Y, Shen Z, Lu J, Liu C, Huang ZA, Sun Q, Cheng Q, Shu L *et al*: **Chromosomal and plasmid-borne tigecycline resistance genes tet(X3) and tet(X4) in dairy cows on a Chinese farm.** *Antimicrob Agents Chemother* 2020, **64**(11).
191. Hayer SS, Lim S, Hong S, Elnekave E, Johnson T, Rovira A, Vannucci F, Clayton JB, Perez A, Alvarez J: **Genetic determinants of resistance to extended-spectrum cephalosporin and fluoroquinolone in *Escherichia coli* isolated from diseased pigs in the United States.** *mSphere* 2020, **5**(5).
192. Bibbolino G, Di Lella FM, Oliva A, Lichtner M, Del Borgo C, Raponi G, Trancassini M, Mengoni F, Arcari G, Antonelli G *et al*: **Molecular epidemiology of NDM-5-producing *Escherichia coli* high-risk clones identified in two Italian hospitals in 2017-2019.** *Diagn Microbiol Infect Dis* 2021, **100**(4):115399.
193. Zając M, Sztromwasser P, Bortolaia V, Leekitcharoenphon P, Cavaco LM, Ziętek-Barszcz A, Hendriksen RS, Wasyl D: **Occurrence and characterization of *mcr-1*-positive *Escherichia coli* isolated from food-producing animals in Poland, 2011-2016.** *Front Microbiol* 2019, **10**:1753.
194. Nguyen LP, Pinto NA, Vu TN, Mai H, Pham AH, Lee H, Cho YL, Byun JH, D'Souza R, Yong D: **Resistome profiles, plasmid typing, and whole-genome phylogenetic tree analyses of *bla*(NDM-9) and *mcr-1* co-harboring *Escherichia coli* ST617 from a patient without a history of farm exposure in Korea.** *Pathogens* 2019, **8**(4).
195. Rocha-Gracia RC, Cortés-Cortés G, Lozano-Zarain P, Bello F, Martínez-Laguna Y, Torres C: **Faecal *Escherichia coli* isolates from healthy dogs harbour CTX-M-15 and CMY-2 β -lactamases.** *Vet J* 2015, **203**(3):315-319.
196. Mohsin M, Raza S, Schaufler K, Roschanski N, Sarwar F, Semmler T, Schierack P, Guenther S: **High Prevalence of CTX-M-15-type ESBL-producing *E. coli* from migratory avian species in Pakistan.** *Front Microbiol* 2017, **8**:2476.
197. Borges CA, Tarlton NJ, Riley LW: ***Escherichia coli* from commercial broiler and backyard chickens share sequence types, antimicrobial resistance profiles, and resistance genes with human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*.** *Foodborne Pathog Dis* 2019, **16**(12):813-822.
198. Maluta RP, Logue CM, Casas MR, Meng T, Guastalli EA, Rojas TC, Montelli AC, Sadatsune T, de Carvalho Ramos M, Nolan LK *et al*: **Overlapped sequence types (STs) and serogroups of avian pathogenic (APEC) and human extraintestinal pathogenic (ExPEC) *Escherichia coli* isolated in Brazil.** *PLoS One* 2014, **9**(8):e105016.
199. Gröndahl-Yli-Hannuksela K, Lönnqvist E, Kallonen T, Lindholm L, Jalava J, Rantakokko-Jalava K, Vuopio J: **The first human report of mobile colistin resistance gene, *mcr-1*, in Finland.** *Apmis* 2018, **126**(5):413-417.

200. Papa-Ezdra R, Grill Diaz F, Vieytes M, García-Fulgueiras V, Caiata L, Ávila P, Brasesco M, Christophersen I, Cordeiro NF, Algorta G *et al*: **First three *Escherichia coli* isolates harbouring *mcr-1* in Uruguay.** *J Glob Antimicrob Resist* 2020, **20**:187-190.
201. Wang J, Huang XY, Xia YB, Guo ZW, Ma ZB, Yi MY, Lv LC, Lu PL, Yan JC, Huang JW *et al*: **Clonal Spread of *Escherichia coli* ST93 carrying *mcr-1*-harboring IncN1-IncHI2/ST3 plasmid among companion animals, China.** *Front Microbiol* 2018, **9**:2989.
202. Melo LC, Oresco C, Leigue L, Netto HM, Melville PA, Benites NR, Saras E, Haenni M, Lincopan N, Madec JY: **Prevalence and molecular features of ESBL/pAmpC-producing *Enterobacteriaceae* in healthy and diseased companion animals in Brazil.** *Vet Microbiol* 2018, **221**:59-66.
203. Seni J, Peirano G, Okon KO, Jibrin YB, Mohammed A, Mshana SE, DeVinney R, Pitout JDD: **The population structure of clinical extra-intestinal *Escherichia coli* in a teaching hospital from Nigeria.** *Diagn Microbiol Infect Dis* 2018, **92**(1):46-49.
204. Hayashi W, Tanaka H, Taniguchi Y, Iimura M, Soga E, Kubo R, Matsuo N, Kawamura K, Arakawa Y, Nagano Y *et al*: **Acquisition of *mcr-1* and cocarriage of virulence genes in avian pathogenic *Escherichia coli* isolates from municipal wastewater influents in Japan.** *Appl Environ Microbiol* 2019, **85**(22).
205. Zhong YM, Liu WE, Zheng ZF: **Epidemiology and molecular characterization of *mcr-1* in *Escherichia coli* recovered from patients with bloodstream infections in Changsha, Central China.** *Infect Drug Resist* 2019, **12**:2069-2076.
206. Merida-Vieyra J, De Colsa-Ranero A, Arzate-Barbosa P, Arias-de la Garza E, Méndez-Tenorio A, Murcia-Garzón J, Aquino-Andrade A: **First clinical isolate of *Escherichia coli* harboring *mcr-1* gene in Mexico.** *PLoS One* 2019, **14**(4):e0214648.
207. Zhang H, Miao M, Yan J, Wang M, Tang YW, Kreiswirth BN, Zhang X, Chen L, Du H: **Expression characteristics of the plasmid-borne *mcr-1* colistin resistance gene.** *Oncotarget* 2017, **8**(64):107596-107602.
208. Peirano G, van der Bij AK, Gregson DB, Pitout JD: **Molecular epidemiology over an 11-year period (2000 to 2010) of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* causing bacteremia in a centralized Canadian region.** *J Clin Microbiol* 2012, **50**(2):294-299.
209. Nesporova K, Wyrsh ER, Valcek A, Bitar I, Chaw K, Harris P, Hrabak J, Literak I, Djordjevic SP, Dolejska M: ***Escherichia coli* sequence type 457 is an emerging extended-spectrum- β -lactam-resistant lineage with reservoirs in wildlife and food-producing animals.** *Antimicrob Agents Chemother* 2020, **65**(1).
210. Zhong Y, Guo S, Seow KLG, Ming GOH, Schlundt J: **Characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from Jurong Lake, Singapore with whole-genome-sequencing.** *Int J Environ Res Public Health* 2021, **18**(3).
211. Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler LH, Karch H, Reeves PR, Maiden MC, Ochman H *et al*: **Sex and virulence in *Escherichia coli*: An evolutionary perspective.** *Mol Microbiol* 2006, **60**(5):1136-1151.
212. Clermont O, Dhanji H, Upton M, Gibreel T, Fox A, Boyd D, Mulvey MR, Nordmann P, Ruppé E, Sarthou JL *et al*: **Rapid detection of the O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* encompassing the CTX-M-15-producing strains.** *J Antimicrob Chemother* 2009, **64**(2):274-277.