

MALDI-TOF MS 方法快速鉴定大肠杆菌及 ESBLs 菌株检测探索研究

战晓微¹, 杜影², 王宏伟³, 吴远高⁴, 郑秋月^{3*}

(1. 沈阳农业大学植物保护学院, 沈阳 110866; 2. 大连市疾病预防控制中心, 大连 116021;

3. 辽宁出入境检验检疫局, 大连 116001; 4. 塔城出入境检验检疫局, 塔城 834700)

摘要: 目的 研以基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)方法检测大肠杆菌, 并利用 MALDI-TOF MS 方法鉴别 ESBLs 菌株及聚类分析法区分不同分型的 ESBLs 菌株, 探索 MALDI-TOF MS 方法鉴定大肠杆菌及 ESBLs 菌株的可行性。

方法 利用 MALDI-TOF MS 采集 47 株大肠杆菌分离株的质谱数据, 生成肽指纹图谱, 并利用 biotyper 软件进行菌种鉴定, 同时研究其耐药性鉴定结果, 并利用聚类分析法研究大肠杆菌 ESBLs 菌株, 最终确定 MALDI-TOF MS 对大肠杆菌菌种鉴定及 ESBLs 菌株鉴别的可行性。**结果** MALDI-TOF MS 方法鉴定大肠杆菌的结果与传统方法及 PCR 方法检测结果均符合, 经 MALDI-TOF MS 鉴定方法提示为 ESBLs 菌株的 10 株大肠杆菌中有 9 株为 ESBLs 菌株, 且聚类分析法对 OXA 型 ESBLs 大肠杆菌具有较好的鉴别能力。**结论** MALDI-TOF MS 方法可以快速、准确地鉴定大肠杆菌, 对 ESBLs 菌株具有一定的筛选鉴别能力。

关键词: 大肠杆菌; 超广谱 β -内酰胺酶; 检测; 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱法

Exploration and research of rapidly identifying escherichia coli and detecting ESBLs strains by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry

ZHAN Xiao-Wei¹, DU Ying², WANG Hong-wei³, WU Yuan-Gao⁴, ZHENG Qiu-Yue^{3*}

(1. College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China; 2. Dalian Municipal Center for Disease Control, Dalian 116021, China; 3. Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116001, China; 4. Tacheng Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Tacheng 834700, China)

ABSTRACT: Objective The strains of *Escherichia coli* was tested by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). ESBLs strains were distinguished, and different type ESBLs strains was differentiated by clustering analysis. Feasibility of identification was explored by MALDI-TOF MS for *E.coli* and ESBLs strains. **Methods** Peptide mass fingerprints were obtained via collecting mass spectrometric data of 47 *E.coli*. Their species were identified by biotyper software, and drug resistance results were studied. ESBLs strains of *E.coli* were researched by clustering analysis. Feasibility of identification was confirmed by MALDI-TOF MS for *E.coli* and ESBLs strains. **Results** The identification

基金项目: 质检公益性行业科研专项(201210043)

Fund: Supported by the Public Welfare Industry Scientific Research Projects of General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China (201210043)

*通讯作者: 郑秋月, 博士, 主要研究方向为生物安全检验检疫。E-mail: zhengqyciq@163.com

*Corresponding author: ZHENG Qiu-Yue, Doctor, Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116001, China. E-mail: zhengqyciq@163.com

results were coincident with conventional method and PCR method. There were 9 ESBLs stains in 10 *E.coli* that were prompted for ESBLs strains by MALDI-TOF MS. It had good distinguishing capability for OXA type ESBLs *E.coli* by cluster analysis. **Conclusion** *E.coli* strains could be rapidly, accurately identified by MALDI-TOF MS, and there was a certain screening capacity for ESBLs strains.

KEY WORDS: *Escherichia coli*; extended spectrum β -Lactamases; detection; matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry

1 引言

大肠埃希菌(*Escherichia coli*), 通常被称为大肠杆菌, 具有致病性、条件致病性及非致病性等多样性特征。其中, 致病性大肠杆菌已经成为医学和动物医学临床感染中最常见的病原菌之一, 此外, 该菌是人、动物肠道内共生菌, 也是细菌耐药因子的重要传播介体^[1]。近年来, 由于畜牧养殖中的抗生素大量使用或滥用造成动物源性细菌耐药率上升, 该趋势不但可能造成致病性的大肠杆菌耐药菌株感染难以治疗甚至无法治愈, 也可能使人或动物体内的非致病性大肠杆菌“富集”或传播耐药因子, 甚至造成严重危害^[2,3]。超广谱 β -内酰胺酶(extended spectrum β -lactamase, ESBLs)是一类由质粒介导的能赋予细菌对多种 β -内酰胺类抗生素耐药的酶, 是大肠杆菌对 β -内酰胺类抗生素耐药的主要机制, 常见的有 CTX-M 型、OXA 型、TEM 型、SHV 型等^[4], 该类菌株常呈现多重耐药性, 对人类及动物饲养的治疗造成巨大的危害或经济损失。

目前, 对大肠杆菌耐药性的检测仍以针对细菌耐药表型检测的纸片扩散法为主^[5], 且对于耐药基因研究的 PCR 技术^[6]等也逐渐被应用于检测中, 但每种检测方法都各有其利弊。因此, 为探索不同方法检测大肠杆菌耐药菌株, 弥补单一方法的片面性及传统方法操作繁琐、耗时长等不足, 本试验利用近年来新发展起来的基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)方法, 针对肽指纹图谱分析鉴定大肠杆菌及 ESBLs 菌株, 探索 MALDI-TOF MS 方法鉴别大肠杆菌耐药菌株 ESBLs 菌株。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 菌株

47 株大肠杆菌野生分离株(分别从养殖生猪中分

离、从动物源性食品中分离株, 从食物患者及食品加工人员中分离); 大肠杆菌标准菌株 ATCC51446。

2.1.2 试剂及培养基

ESBLs 表型鉴定纸片头孢噻肟(CTX)、头孢他啶(CAZ)、头孢噻肟/克拉维酸(CTX/CA)、头孢他啶/克拉维酸(CAZ/CA)(购自于杭州天和微生物)

基质 α -氰-4-羟基肉桂酸(α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid, CHCA)(购自布鲁克公司)。基质溶剂-乙腈(Acetonitrile, ACN): 三氟乙酸(Trifluoroacetic acid, TFA): 水的比例为 50:2.5:47.5。标准品-肽标准品、蛋白标准品(购自布鲁克公司)。标准品配制溶剂 ACN:TFA:水的比例为 30:0.1:69.9。

培养基: 营养琼脂(NA), TSB 肉汤(美国, BD 公司)。

2.1.3 仪器

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(布鲁克·道尔顿公司); PHOENIX-100 微生物自动鉴定系统(美国, BD 公司)。

2.2 方法

2.2.1 大肠杆菌分离鉴定及耐药表型检测方法

根据食品安全国家标准《食品微生物学检验: 大肠埃希氏菌计数》GB 4789.38-2012 法^[7]分离鉴定大肠杆菌, 并利用全自动微生物自动鉴定系统对分离菌株进行确认。根据《动物及其制品中细菌耐药性的测定-纸片扩散法》SN/T1944-2007, 并参考美国临床实验室标准化协会(clinical and laboratory standards institute, CLSI)推荐标准进行耐药性判断。纸片扩散法检测 ESBLs 的判断方法^[5]为: 用头孢他啶(CAZ, 30 μ g/片)和头孢他啶+克拉维酸(CCA/CA, 30 μ g/10 μ g)组合、头孢噻肟(CTX, 30 μ g/片)和头孢噻肟+克拉维酸(CTX/CA, 30 μ g/10 μ g)组合, 分别测量两种纸片加 CA 后的抑菌环直径。对 2 个中任何一个药物加 CA 后抑菌环的直径差 ≥ 5 时, 可确认为产 ESBLs 菌株。

2.2.2 大肠杆菌 PCR 鉴定及耐药基因检测方法

2.2.2.1 DNA 提取方法

以 prepman ultra 细菌提取方法提取细菌 DNA,

使用紫外分光光度计测定 260 nm、280 nm 的 OD 值, 根据 A_{260} (260 nm 处的吸光值) 计算 DNA 浓度, 并确定细菌 DNA 的 A_{260}/A_{280} 的比值在 1.7~1.9 之间适于 PCR 扩增, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.2.2.2 PCR 检测方法

参考文献^[8-11], 合成 ESBLs 耐药基因引物(见表 1), 经 PCR 扩增后, 利用琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果。电泳条件: 取 PCR 产物 10 μL 上样, 3% 琼脂糖电泳, 电压为 200 V, 电流 190 mA, 电泳时间为 20 min, 电泳结束后, 将胶置于凝胶成像系统下鉴定。

2.2.3 MALDI-TOF MS 检测大肠杆菌方法

2.2.3.1 样品处理方法

在 Eppendorf 管中加入 300 μL 纯净水, 分别挑取适量(5~10 mg)新鲜细菌, 混匀, 再加入 900 μL 无水乙醇, 混匀后以 13000 r/min 离心 2 min, 弃去上清液, 加入 50 μL 70% 甲酸, 混匀, 再加入 50 μL 乙腈, 混匀, 同样以 13000 r/min 离心 2 min, 吸取上清液点样。

2.2.3.2 MALDI-TOF MS 检测鉴定与数据库建立

质谱采用 337 nm 氮源激光, 正离子检测模式, 加速电压 20 kV, 并在采集质谱的质量范围内(1000-13000 Da), 用校准肽进行质量校正, 校正完后再进行质谱图数据的采集。通过 BioTyper 软件进行分析鉴定并聚类分析, 分析 MALDI-TOF MS 方法检

测耐药性菌株的可行性。

MALDI-TOF MS 结果判断标准: 通过 BioTyper 软件进行分析鉴定, 鉴定出的结果是数据库中 with 样品最为匹配的几个细菌种属, 并给出相对应的分数, 分数在 2.300~3.000 之间, 表示菌种鉴定的可信度较高; 在 2.000~2.299 之间, 表示保守的菌属鉴定或可能的菌种鉴定; 在 1.700~1.999 之间, 表示可能的菌属鉴定; 在 0.000~1.699 之间, 表示不可信的鉴定。

2.2.3.3 MALDI-TOF MS 聚类分析

将全部 48 株大肠杆菌经 MALDI-TOF MS 检测并采集数据, 每株菌培养三个平行样品, 每个平行培养样品点三个平行孔, 在误差允许范围内采集 10 张基线平整, 信息峰多, 杂质峰少的质谱图作为该菌株的质谱数据(如单株菌组内采集质谱图差异较大, 重新培养检测), 利用软件对此 48 株大肠杆菌进行聚类分析。

3 结果与分析

3.1 大肠杆菌鉴定及耐药表型检测结果

大肠杆菌经分离鉴定后, 进行全自动微生物鉴定及药敏系统确认并检测其耐药性, 同时根据 SN/T1944-2007 方法进行纸片扩散法检测金黄色葡萄

表 1 大肠杆菌鉴定及 ESBLs 基因 PCR 引物序列
Table 1 PCR primer sequence of identification and ESBLs genes for *E.coli*

目的基因 Target gene	序列(5'-3') Primer sequences(5'-3')	扩增片段 Amplified fragment	退火温度 Annealing temperature	参考文献 References
CTX-M-1-F	F-AGGCTGGGTGAAGTAAGTGA	781 bp	57 $^{\circ}\text{C}$	[8]
CTX-M-1-R	R-AAGACTGGGTGTGGCATTGA			
CTX-M-2-F	CGA CGC TAC CCC TGC TAT T	552 bp	52 $^{\circ}\text{C}$	[9]
CTX-M-2-R	CCA GCG TCA GAT TTT TCA GG			
CTX-M-9-F	F-TCACAGCCCTTCGGCGATGATTCT	876 bp	57 $^{\circ}\text{C}$	[8]
CTX-M-9-R	R-ATGGTGACAAAAGAGAGTGCAACGG			
CTX-M-8-F	ACA TCG CGT TAA GCG GAT	677 bp	52 $^{\circ}\text{C}$	[9]
CTX-M-25/26-F	GCA CGA TGA CAT TCG GG	327 bp	52 $^{\circ}\text{C}$	[9]
CTX-M-8/25/26-R	AAC CCA CGA TGT GGG TAG C			
OXA	F-GCAGCGCCAGTGCATCAAC R-CCGCATCAAATGCCATAAGTG	198 bp	57 $^{\circ}\text{C}$	[10]
<i>E.coli</i>	Eco223-ATCAACCGAGATTCCCCCAGT	232 bp	57 $^{\circ}\text{C}$	[11]
16S~23SrRNA	Eeo455-TCACTATCGGTCAGTCAGGAG			

球菌对 47 株大肠杆菌进行分离鉴定及耐药性测定, 参照美国临床实验室标准化协会(CLSI)推荐标准判定结果, 47 株大肠杆菌中检出产 ESBL 菌株 27 株(如图 1)。

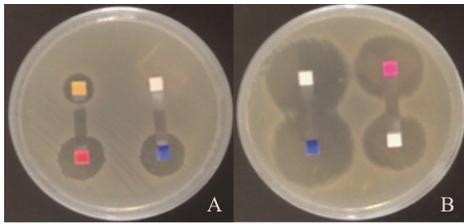


图 1 产 ESBLs 大肠杆菌(A)和非产 ESBLs(B)大肠杆菌药敏试验结果

Fig. 1 The results of positive(A,C) and negative (B,D) ESBLs *E.coli* by disk diffusion method

3.2 大肠杆菌耐药基因检测结果

经 PCR 扩增及琼脂糖凝胶电泳检测结果显示, 全部 47 株大肠杆菌均检测到 *E.coli*16S~23S rRNA 基因, 其中检测到 17 株 CTX-M-1 型 ESBLs 菌株, 16 株 CTX-M-9 型 ESBLs 菌株, 7 株 OXA 型 ESBLs 菌株, 未检测到 CTX-M-2 型、CTX-M-8 型及 CTX-M-25/26 型 ESBLs 菌株。且其中一株 CTX-M-1 型 ESBLs 菌株和一株 CTX-M-9 型 ESBLs 菌株的耐药表型检测结果为 ESBLs 阴性(表 2)。

3.3 大肠杆菌 MALDI-TOF MS 鉴定结果及产 ESBLs 菌株鉴别结果

47 株菌经前处理后, 经 MALDI-TOF MS 检测并

表 2 大肠杆菌 ESBLs 菌株纸片扩散法和 PCR 法检测结果
Table 2 The results of testing ESBLs strains of *E.coli* by disk diffusion and PCR

菌株编号 No.	耐药表型 Drug-resistant phenotype	耐药基因型 Drug-resistant genotype	菌株 No.	耐药表型 Drug-resistant phenotype	耐药基因型 Drug-resistant genotype
1	+	CTX-M-9	25	+	CTX-M-9
2	+	CTX-M-1	26	+	CTX-M-1
3			27		
4			28	+	CTX-M-1
5			29	+	CTX-M-9
6			30	+	CTX-M-9
7	+	CTX-M-1	31	+	CTX-M-9, OXA
8	+	CTX-M-1, CTX-M-9	32	+	CTX-M-9
9	+	CTX-M-1, CTX-M-9	33	+	CTX-M-9
10			34	+	CTX-M-1
11			35		
12			36		
13			37	+	CTX-M-9, OXA
14	+	CTX-M-9	38	+	CTX-M-1, CTX-M-9
15	+	CTX-M-1, OXA	39		CTX-M-1, OXA
16			40	+	CTX-M-1, OXA
17	+	CTX-M-1, CTX-M-9	41	+	CTX-M-1
18			42	+	CTX-M-1, OXA
19			43	+	CTX-M-9
20			44		
21		CTX-M-9	45	+	CTX-M-1, CTX-M-9
22			46	+	CTX-M-1, OXA
23			47		
24	+	CTX-M-1			

收集质谱数据, 仪器通过菌株的肽指纹图谱(见图 2) 与数据库中细菌微生物的质谱数据比对分析, 找到每株菌的匹配微生物并给出匹配程度分值, MALDI-TOF MS 对该 47 株菌的最匹配鉴定结果均为大肠杆菌, 且可信度分值分布于 1.9~2.5 之间, 该鉴定结果与常规方法分离大肠杆菌的鉴定结果一致, 可信度分值存在 0.6 的差异说明该 47 株大肠杆菌存在显著差异。

经鉴定结果分析, 全部菌株中第一匹配结果除 8 株菌外均未给出明确耐药性结果, 这与数据库中大肠杆菌仅有 10 株, 除 3 株标准菌株, 1 株为产 ESBLs 菌株外, 其余菌株耐药性数据不完善有关。因此, 根据第一、二匹配结果对大肠杆菌不同耐药性结果进行分析。其中有 10 株大肠杆菌在第二匹配结果中给出鉴定结果为产 ESBLs 菌株, 分别为 1、5、20、21、25、28、29、39、42、50 号菌株, 该 10 株菌中 21 和 39 号菌株耐药表型检测为非产 ESBL 菌株, 耐药基因型分别为 CTX-M-9 型、CTX-M-1 型和 OXA 型;

5 号菌株未检测到本试验中的 ESBLs 耐药基因, 且耐药表型检测为非产 ESBLs 菌株; 1、20、25、28、29、42、50 号菌株与耐药表型及基因型均符合。

3.4 大肠杆菌 MALDI-TOF MS 聚类分析结果与其耐药性分析

对此 48 株大肠杆菌(包括大肠杆菌 ATCC51446) 进行聚类分析, 差异程度 0-1000 表示菌株之间的同源性程度高低, 在此 48 株菌中, 当差异程度为 1000 时, 表示两株菌同源性最低, 而当差异程度接近 0 时, 表示两株菌同源性最高。经 MALDI-TOF MS 分析全部大肠杆菌在差异程度为 500-600 时, 可大致分为 17 株型(图 3 中 A 类型), 7 株型(图 3 中 B 型), 23 株型(图 3 中 C 型)三种类型, 从耐药性的分析结果来看, CTX 型 ESBLs 菌株菌株在三种类型中均有分布, 无显著区分差异, 而 OXA 型 ESBLs 耐药菌株均分布在 23 株型(图 3 中 C 型)中, 说明该方法对此类耐药性菌株具有较好的分型能力。

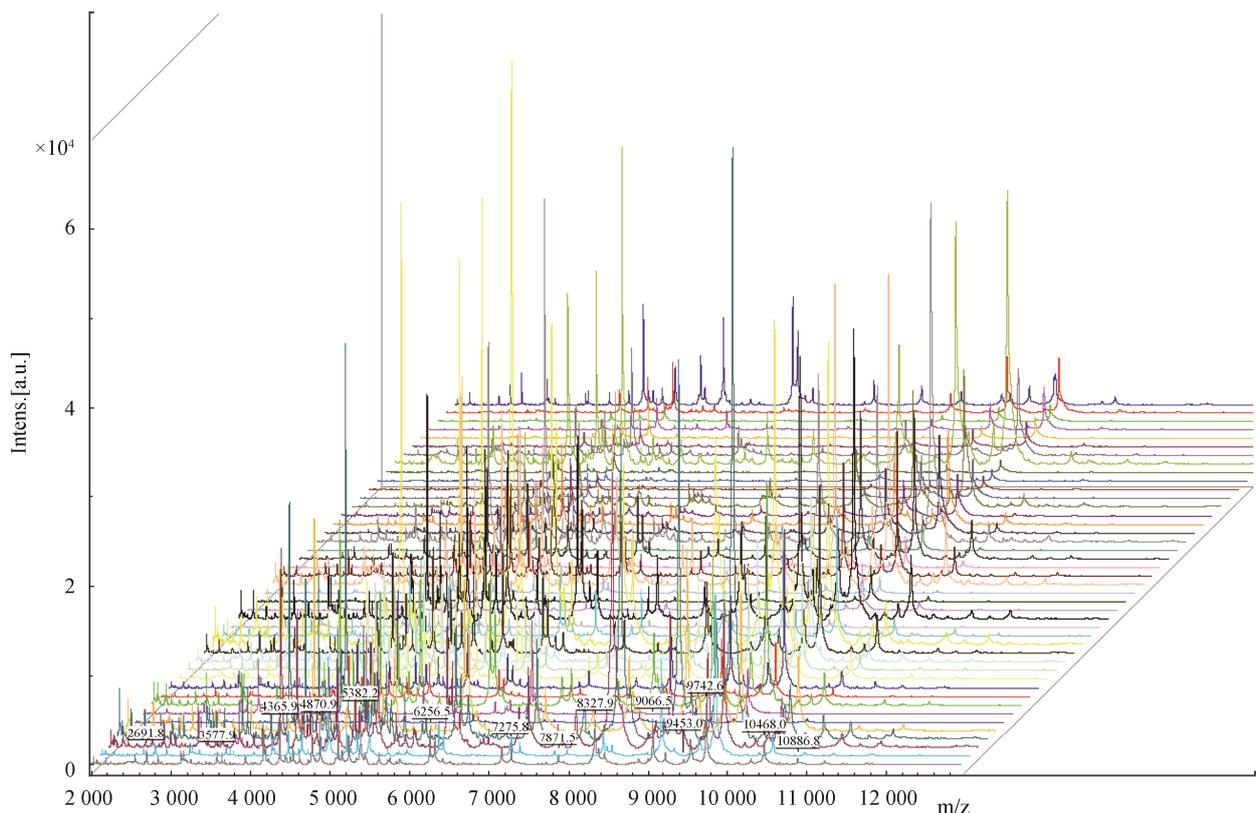


图 2 47 株大肠杆菌肽指纹图谱

Fig. 2 Peptide mass fingerprints of 47 strains of *E. coli*

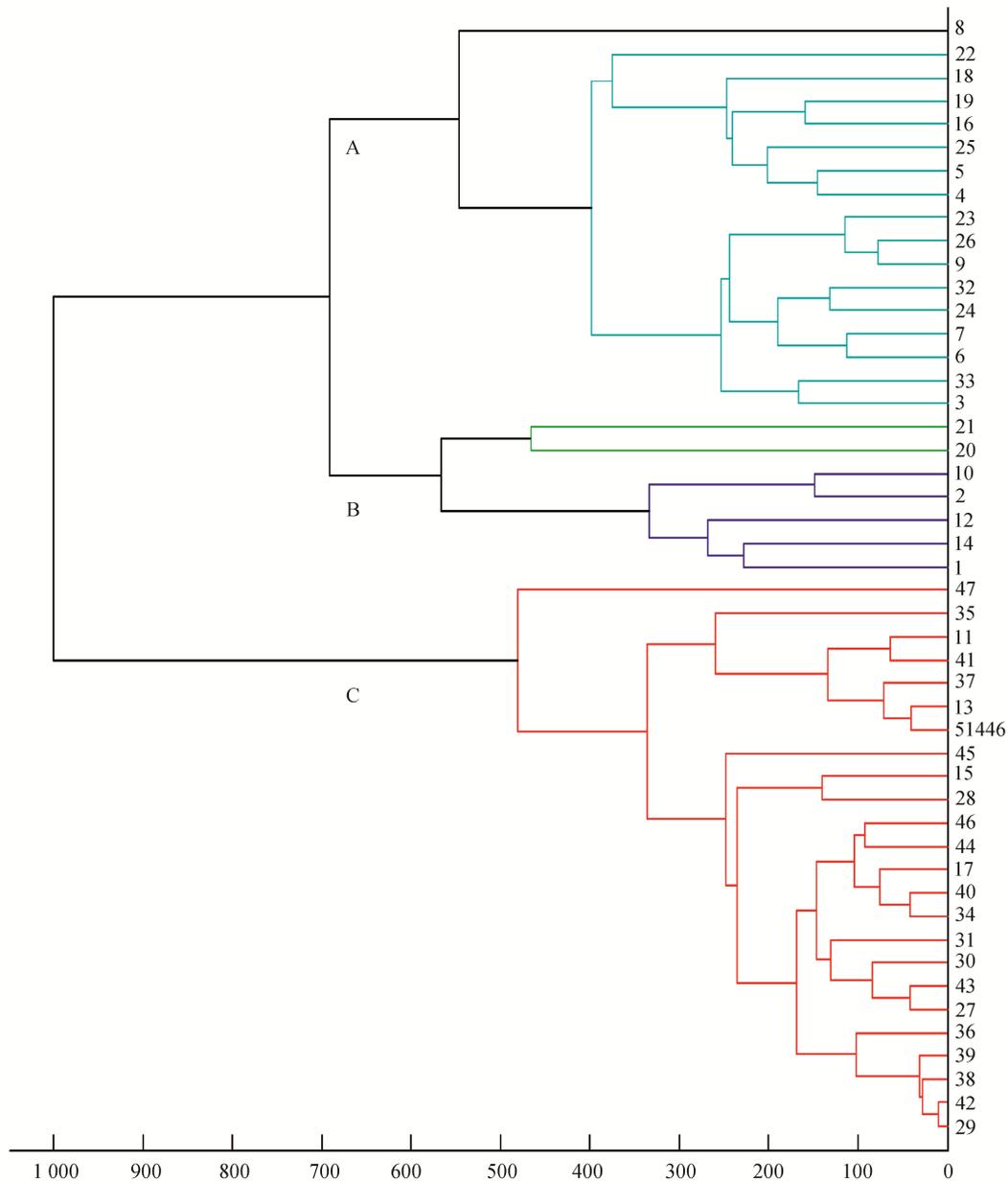


图 3 48 株大肠杆菌 MALDI-TOF MS 指纹图谱的聚类分析

Fig. 3 Cluster analysis of mass spectral finger prints of 48 *E. coli* strains

4 结果与讨论

目前, CTX-M 型 ESBLs 在我国流行较为广泛^[12], 而对于 OXA 型 ESBLs 的报道较少, 但也存在经由动物传播给人类的潜在危害^[13]。国内外针对大肠杆菌产 ESBLs 菌株的检测除耐药表型检测外, 主要是针对耐药基因进行检测的 PCR 检测方法^[14,15], 然而每种方法都具有一定的局限性, 因此, 本试验利用 MALDI-TOF MS 法对大肠杆菌进行鉴定, 并针对

CTX-M 型和 OXA 型 ESBLs 大肠杆菌耐药性菌株进行检测, 通过与纸片扩散法检测的耐药表型结果, PCR 法检测的耐药基因型检测结果进行比较, 研究 MALDI-TOF MS 法检测大肠杆菌及 CTX-M 型和 OXA 型 ESBLs 菌株的可行性, 探索快速检测大肠杆菌及其 ESBLs 菌株的新方法。试验结果表明, 本研究利用该方法鉴定大肠杆菌的结果与传统鉴定方法及 PCR 鉴定方法均符合, 说明本方法可用于鉴定大肠杆菌, MALDI-TOF MS 法对大肠杆菌具有良好的

鉴定能力; 利用数据库比对的方式检测 ESBLs 菌株, 其中肽指纹图谱比对方法鉴别出的 10 株 ESBLs 菌株中有 7 株与纸片扩散法符合, 有 9 株与 PCR 法符合, 说明该方法对鉴别出的 ESBLs 菌株与 PCR 法检测的耐药基因更符合。经质谱提示为产 ESBLs 菌株的大肠杆菌除一株外, 均与耐药基因型符合, 说明本方法对部分产 ESBLs 菌株具有较好的鉴别能力。尽管该方法目前尚不能直接准确判断 ESBLs 菌株, 但 MALDI-TOF MS 法对 ESBLs 菌株具有一定的筛选能力。另外, 对本试验中的其他产 ESBL 菌株无法直接通过数据库比对鉴定获得鉴别结果分析原因, 可能与产 ESBLs 菌株种类繁多且复杂, 且数据库中可供鉴定的产 ESBLs 菌株数据过少有关。

另外, 在耐药性聚类分析中, 由于 CTX 型 ESBLs 菌株数量大于 17 株型与 7 株型的样本数量总和, 同时也大于 23 株型样本数量, 没有明确区分耐药性可在未来的研究中扩大样本数量继续探索。OXA 型 ESBLs 菌株利用聚类分析法研究中, 全部分布在同一分型中, 说明聚类分析法对 OXA 型 ESBLs 菌株具有良好的鉴别能力。可用于实际样品检测分析中。由于 MALDI-TOF MS 方法的高灵敏度, 及其软件的自定义功能, 该方法能达到单株鉴定的水平, 因此, 在对野生分离株进行数据库建立的基础上, 理论上只要数据库的样本量足够, MALDI-TOF MS 方法即可准确地区分出不同耐药性的菌株。在未来的研究中, 进一步添加大肠杆菌质谱数据, 扩大数据库样本量, 确定 MALDI-TOF MS 方法鉴定 ESBLs 菌株的能力。

参考文献

- [1] 刘书亮, 张晓利, 韩新锋, 等. 动物性食品源大肠杆菌耐药性研究[J]. 中国食品学报, 2011, 11(7): 163-167.
Liu SL, Zhang XL, Han XF, et al. Drug Resistance of *Escherichia Coli* Strains Isolated from Animal Food [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2011, 11(7): 163-167.
- [2] 朱力军. 动物大肠杆菌耐药性的变化趋势[J]. 中国兽药杂志, 2001, 35(2): 16-18.
Zhu LJ. Changes of antimicrobial resistance of *E.coli* [J]. Chin J Vet Drug, 2001, 35(2): 16-18.
- [3] 隋慧, 杨金生. 动物源性多重耐药大肠杆菌的分离与鉴定[J]. 中国兽医杂志, 2013, 49(6): 48-50.
Sui H, Yang JS. Isolation and identification of animal derived multiresistant *Escherichia coli* [J]. Chin J Vet Med, 2013, 49(6): 48-50.
- [4] 徐灵彬, 刘原. 超广谱 β -内酰胺酶流行病学研究进展及检测[J]. 陕西医学杂志, 2003, 32(7): 625-628.
Xu LS, Liu Y. Progress and detection of epidemiological study of extended spectrum β -lactamases [J]. Shaanxi Med J, 2003, 32(7): 625-628.
- [5] SN/T1944-2007. 动物及其制品中细菌耐药性的测定-纸片扩散法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
SN/T1944-2007. Detection of antimicrobial resistance of the bacteria in animal and animal products-Disk diffusion testing [S]. Beijing: Chinese Standard Publishing Company, 2008.
- [6] 许瑞, 刘建华, 胡功政, 等. 鸭源大肠杆菌 3 种 *tet* 基因的多重 PCR 检测[J]. 江西农业学报, 2011, 23(3): 150-152.
Xu R, Liu JH, Hu GZ, et al. Multiplex PCR for detection of threetetracycline-resistant genes in *E coli* Isolated from duck [J]. Acta Agric Jiangxi, 2011, 23(3): 150-152.
- [7] GB 4789.38-2012. 食品安全国家标准 食品微生物学检验: 大肠埃希氏菌计数[S].
GB 4789.38-2012. National food safety standard Food microbiological examination: *Escherichia coli* count [S].
- [8] Li L, Jiang ZG, Xia LN, et al. Characterization of antimicrobial resistance and molecular determinants of beta-lactamase in *Escherichia coli* isolated from chickens in China during 1970-2007 [J]. Vet Microbiol, 2010, 144: 505-510.
- [9] 陈东科, 孙长贵. 实用临床微生物学检验与图谱[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011, 798.
Chen DK, Sun CG. Practical diagnosis and illustration of clinical microbiology[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2011, 798.
- [10] Van TTH, Chin J, Chapman T, et al. Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: an analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes [J]. Int J Food Microbiol. 2008, 124, 217-223.
- [11] 唐一鸣. 猪源大肠杆菌和沙门氏菌耐药表型与基因型的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2010.
Tang YM. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in porcine pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella* [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2010.
- [12] 李浩, 刘岚. CTX-M 型超广谱 β -内酰胺酶耐药性特点分析[J]. 检验医学与临床, 2012, 9(7): 848-850.
Liu H, Liu L. CTX-M type ESBLs drug resistance characteristics analysis [J]. Lab Med Clin, 2012, 9(7): 848-850.
- [13] 苑丽, 莫娟, 胡功政, 等. 49 株鸡大肠杆菌 OXA 型-内酰胺酶的检测[J]. 江西农业学报, 2009, 21(8): 1-3.
Yuan L, Mo J, Hu GZ. Detection of OXA - type - lactam ases among 49 strains of *Escherichia coli* isolated from chickens [J]. Acta Agric Jiangxi, 2009, 21(8): 1-3.
- [14] 田国宝, 王红宁, 张安云, 等. 大肠杆菌 β -内酰胺酶耐药基因 *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}* 三重 PCR 检测方法建立[J]. 中国兽医

杂志, 2013, 1(49): 3-5.

Tian GB, Wang HN, Zhang AY, *et al.* Development of multiplex PCR for detection of β -Lactamases *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} in *Escherichia coli* [J]. Chin J Vet Med, 2013, 1(49): 3-5.

- [15] 宋晓红, 尹亚非, 黄源芳, 等. 产 ESBLs 革兰阴性菌的 TEM、SHV、CTX-M 基因分型研究[J]. 四川生理科学杂志, 2011, 33(4): 154-156.

Song XH, Yin YF, Huang YF, *et al.* Detection of TEM, SHV and CTX-M genotype of ESBLs-producing gram-negative bacteria [J]. Sichuan J Physiol Sci, 2011, 33(4): 154-156.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



战晓微, 博士生, 主要研究方向为有害生物检测。

E-mail: zhanxiaoweimail@163.com



郑秋月, 博士, 主要研究方向为生物安全检验检疫。

E-mail: zhengqyciq@163.com