

动物、环境及饲养员多重耐药大肠杆菌的 PFGE 分型研究

杨玲丽¹, 陈杖榴¹, 刘健华¹, 曾振灵¹, 马俊英¹, 吴聪明²

(¹华南农业大学兽医学院/广东省兽药研制与安全评价重点实验室, 广州 510642; ²中国农业大学动物医学院, 北京 100094)

摘要:【目的】了解养殖场多重耐药大肠杆菌耐药性的传播机制, 探讨人、动物与环境间耐药菌垂直克隆传播的可能性。【方法】采用脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 分型方法对分离自养殖场动物、环境和饲养员的 86 株耐药谱相近多重耐药大肠杆菌进行 DNA 指纹图谱分型, 比较菌株之间的亲缘关系。【结果】37 株鸡场来源大肠杆菌可分为 20 种 PFGE 分型; 49 株猪场来源大肠杆菌可分为 24 种 PFGE 分型; 同一动物、环境或饲养员采样点分离菌株 PFGE 指纹图谱相同者较多; 同一养殖场不同动物个体、养殖场环境不同采样点、动物和环境以及饲养员和环境都存在 PFGE 指纹图谱完全相同菌株; 鸡场和猪场都发现有属同一 PFGE 分型的来自动物、饲养员和环境的菌株; 86 株菌全部对环丙沙星、氨苄西林、链霉素、四环素、多西环素和复方新诺明耐药, 相同 PFGE 分型的菌株其耐药谱型不一定相同。【结论】养殖场动物、环境及饲养员之间存在多重耐药大肠杆菌的克隆传播。

关键词: 大肠杆菌; 多重耐药; PFGE 分型; 动物; 克隆传播

Molecular Typing of Multidrug-Resistant *E.coli* Isolated from Farm Animals, Farmers and Environment by Pulsed-Field Gel Electrophoresis

YANG Ling-li¹, CHEN Zhang-liu¹, LIU Jian-hua¹, Zeng Zhen-ling¹, MA Jun-ying¹, WU Cong-ming²

(¹ College of Veterinary Medicine, Guangdong Key Laboratory for Veterinary Drug Development and Safety Evaluation, South China Agricultural University, Guangzhou 510642; ² College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract: 【Objective】 To investigate the mechanism responsible for the dissemination of multidrug-resistant *E.coli* in animal farms and the clonal relatedness of the isolates from farm animals, farmers and environment. 【Method】 86 multidrug-resistant *E.coli* isolates with similar resistance profiles were characterized by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) after *Xba*I digestion and drug susceptibility testing. 【Result】 37 *E.coli* strains from one poultry farm and 49 *E.coli* strains from one swine farm were classified into 20 and 24 different subtypes respectively according to the PFGE profiles. The PFGE patterns of strains isolated from different sources were heterogeneous, though strains from the same animal, farmer or environment sample were quite homologous. *E. coli* with an identical PFGE pattern were recovered from strains collected from different animals in the same farm, from animals and environment, and also from farmers and environment. Moreover, *E.coli* strains with very similar PFGE patterns were also isolated at both farms from animals and farmers. All isolates were resistant to ciprofloxacin, ampicillin, streptomycin, tetracycline, doxycycline and trimethoprim-sulfamethoxazole. A comparison of PFGE results with resistance results indicated that antibiotic resistance patterns varied considerably within several individual *E. coli* clones. 【Conclusion】 Vertical transmission of resistant *E. coli* clones between farm animals, environment and farmers were commonly occurs.

Key words: *E.coli*; Multidrug-resistant; PFGE; Animals; Clonal spread

收稿日期: 2005-09-12; 接受日期: 2006-05-02

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (30130140)

作者简介: 杨玲丽 (1980-), 女, 浙江温岭人, 硕士, 研究方向为动物细菌耐药性, 现在深圳出入境检验检疫局工作。通讯作者刘健华 (1973-), 女, 江西宜春人, 副教授, 博士, 研究方向为兽药安全性评价和细菌耐药性。Tel: 020-85280237-808; Fax: 020-85284896; E-mail: jhliu@scau.edu.cn

0 引言

【本研究的重要意义】国内外大量的对动物源细菌耐药性监测数据表明,随着抗菌药在畜牧业上的广泛使用,细菌在抗菌药的选择性压力下产生的耐药性不断加剧和蔓延,已引起了全球的关注^[1,2]。耐药性的普遍存在不仅严重影响兽医临床的治疗效果,而且耐药性可能从动物通过食物链、环境或者动物和人的直接接触进行传递,从而给人类医疗也带来压力^[3]。【前人研究进展】尽管目前有关食品动物使用抗菌药对人类病原菌耐药性的影响还存在争议,耐药菌和耐药基因从动物到人的转移机制也还不清楚^[4,5],但有证据表明食品动物抗菌药使用与人类细菌的耐药性存在一定的联系。据报道,人类几次暴发的沙门氏菌 DT104 感染都可追踪到动物身上,其耐药性也与动物用药背景相符^[6,7]。此外, Fey 等^[8]2000 年报道了一例由牛传给人的头孢曲松耐药沙门氏菌感染病例。Van den Bogaard 等^[9,10]从荷兰农民及其饲养的火鸡体内分离到有相同 PFGE 图谱的 *E.coli* 和万古霉素耐药肠球菌,说明从火鸡到人发生了耐药菌的克隆传播。【本研究的切入点】陈杖榴等^[11]调查了分离自养殖场内动物、环境与饲养员的大肠杆菌对 21 种抗菌药物的耐药性,结果发现各类养殖场来源不同的大肠杆菌对常用抗菌药物的耐药性趋势分布有相似性,而且分离自同一养殖场动物、环境与饲养员的大肠杆菌中存在一定比例的同耐药谱多耐药菌株,推测养殖场内可能存在耐药菌的相互传播,或者是由于处于相同的药物选择压力,筛选出相似的耐药菌。这些相似耐药谱菌株的耐药性在动物、环境及饲养员之间到底是通过耐药基因的水平传播,还是通过垂直克隆传播?【拟解决的关键问题】本研究采用脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 方法,对养殖场不同来源但耐药谱相似的大肠杆菌进行分型,分析菌株之间的亲缘关系,探索人与动物、环境之间耐药菌株垂直克隆传播的可能性,为正确评估动物使用抗菌药及动物源耐药菌的危险性、指导临床合理用药提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源

本研究所用菌株分离自广东省某一猪场和鸡场,样本采集对象包括养殖场内养殖动物、环境及饲养员,其中养殖动物样本来自各年龄段随机抽取个体,环境样包括养殖场排出的污水、场内池塘水及土壤,饲养员样本来自饲养员健康志愿者。从含 $4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 环丙沙

星的伊红美兰琼脂平板上随机挑取典型大肠杆菌菌落进行纯培养,采用杭州天和微生物试剂有限公司生产的肠杆菌科细菌生化编码微量鉴定管鉴定细菌。纸片扩散法测定细菌的药物敏感性后,挑取耐 6 种以上药物的具相近耐药谱的多重耐药菌株进行本试验,其中鸡场 37 株,猪场 49 株。

1.2 主要仪器及试剂

MH 琼脂、MH 肉汤购自浙江杭州天和微生物试剂有限公司。

蛋白酶 K 为 Merck 公司产品,限制性内切酶 *Xba*I、溶菌酶和 RNA 酶购自华美生物工程公司, Lambda Ladder Plug、低熔点琼脂糖、Agarose (pulsed-field certified, PFC) 和 CHEF-MAPPER 型脉冲场电泳仪为 Bio Rad 公司产品。Brij 58、脱氧胆酸钠 (sodium deoxycholate) 和十二烷基肌氨酸钠 (sodium lauryl sarcosine, Sarkosyl) 为 Sigma 公司产品。

1.3 药物敏感性试验

采用微量肉汤稀释法测定环丙沙星、氨苄西林、阿莫西林、头孢噻唑、链霉素、庆大霉素、卡那霉素、阿米卡星、安普霉素、四环素、多西环素、氯霉素和复方新诺明对菌株的最小抑菌浓度。判定标准参照美国国家临床实验室标准化委员会 (NCCLS) M100-S15^[12]和文献^[13]。

1.4 脉冲场凝胶电泳^[14]

(1) 染色体 DNA 模板的制备: 1 ml 细菌悬液离心沉淀 (10 min, 7 000 r/min), 沉淀用 1 ml 细胞稀释液 ($10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, pH 7.2) 冲洗 3 次后再用 1 ml 细胞稀释液混匀。取上述细菌悬液 96 μl 加入 4 μl 溶菌酶 ($25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), 50°C 温育。然后与等体积、经 50°C 温育的 1.2% 低熔点琼脂糖混匀, 50°C 温育。200 μl 注入模具 (reusable plug mold), 4°C 凝固 10 min。模块置入 1 ml 溶菌酶缓冲液 ($10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 0.5% Brij58, 0.2% 脱氧胆酸钠, 0.5% 十二烷基肌氨酸钠, pH 8.0), 加入 20 μl 溶菌酶 ($25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 2 μl RNA 酶 ($10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), 37°C 水浴 2 h。缓冲液 A 清洗模块 1 次, 再加入 980 μl 蛋白酶 K 裂解溶液 ($100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, 0.2% 脱氧胆酸钠, 0.5% 十二烷基肌氨酸钠, pH 8.0) 及 20 μl 蛋白酶 K ($50 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), 50°C 水浴 36 h。用含 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PMSF 的缓冲液 A 作用模块 1 h, 然后再用缓冲液 A 冲洗模块 3 次, 每次 30 min。(2) 酶切及电泳: 将模块切成小块放置于 100 μl 内切酶缓冲液中, 室温静置 1.5 h。吸出内切酶缓冲液, 加入 100 U *Xba*I/500 μl 内切酶缓冲液

/90 μl 模块, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴消化 20 h。最后将凝胶块在 0.5 \times TBE 中平衡 15 min, 以终止消化作用。将消化好的凝胶块以及事先切成小块的 Ladder Marker 贴附于制胶梳子末端, 置于水平放置的倒胶模具上, 将 50 $^{\circ}\text{C}$ 已熔化的 1% 脉冲凝胶电泳琼脂糖 (1%PFC) 倒入电泳槽, 室温凝固 1 h。将电泳胶块放入电泳槽中, 电泳条件为: 14 $^{\circ}\text{C}$, 120 $^{\circ}$, 脉冲时间 2~60s, 电泳时间 22 h, 电压 6V/cm。取出电泳凝胶放入 EB 溶液 (0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), 染色 2 h, 去离子水冲洗 1~5 min。用紫外成像系统照相并保存图像。

1.5 脉冲场凝胶电泳分型标准

通过目测判定各带型之间的关系, PFGE 结果按照美国疾病预防和控制中心 Tenover 等^[15]推荐的方法判读: PFGE 图谱条带大小和数量相近的为同一型别; 3 个及以下条带出现差异的为同一型别的不同亚型, 分别称为 A1、A2 和 A3; 3 条以上差异者为不同型别。同一型的各亚型间认为在基因上有相关性, 来源于同一亲代, 而不同型的菌株认为在流行病学上无相关性。

2 结果与分析

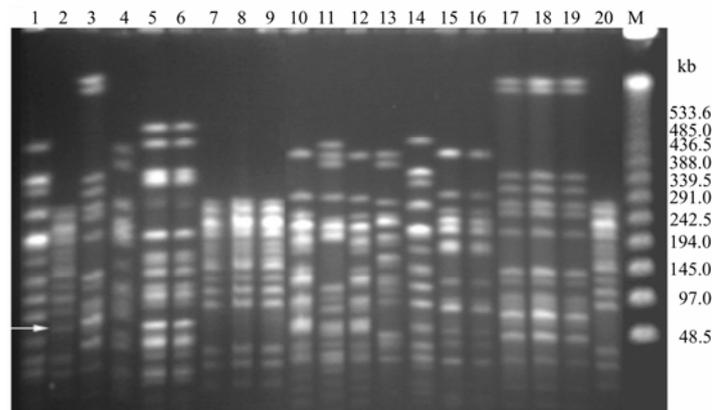
2.1 PFGE 指纹图谱分析

86 株菌的 DNA 经 *Xba*I 限制性内切酶酶切后电泳, 产生 12~18 条大小不同的片段, 大部分片段介于 30~500 kb 之间。图 1 和图 2 分别显示了鸡场和猪场部分菌株的 PFGE 电泳图谱。通过目测判定各菌株带

型之间的关系, 采用 Tenover 等推荐的判断标准, 可将 37 株鸡场来源大肠杆菌分为 20 种 PFGE 分型, 49 株猪场来源大肠杆菌分为 24 种 PFGE 分型。此外, 同一动物、环境或饲养员采样点分离菌株 PFGE 指纹图谱相同者较多; 同一养殖场不同动物个体、养殖场环境不同采样点、动物和环境以及饲养员和环境都存在 PFGE 指纹图谱完全相同菌株 (图 1、图 2 及表)。图 1 的第 2 泳道为一 9 周龄大鸡来源菌株的图谱, 与第 7、8、9 泳道 (饲养员) 和第 20 泳道 (鸡场环境-池塘水) 相比, 仅有 1 个条带的差别 (箭头所指), 它们属于同一 PFGE 分型的不同亚型。图 2 的第 9 泳道 (饲养员) 与第 8 (怀孕母猪) 和第 10 (猪场环境--母猪运动场污泥) 泳道相比, 有 3 个条带的差别 (箭头所指), 它们也属于同一 PFGE 分型的不同亚型。说明鸡场和猪场都存在有属同一 PFGE 分型的来自动物、饲养员和环境的菌株。

2.2 耐药谱型和 PFGE 分型之间的关系

86 株菌全部对环丙沙星、氨苄西林、链霉素、四环素、多西环素和复方新诺明耐药, 85 株耐阿莫西林, 6 株耐头孢噻唑, 70 株耐庆大霉素, 72 株耐卡那霉素, 69 株耐新霉素, 22 株耐阿米卡星, 7 株耐安普霉素, 53 株耐氯霉素。对细菌的 PFGE 分型和 MIC 测定结果进行比较可以看出 (表), 相同 PFGE 分型的菌株其耐药谱型不一定相同, 而不同 PFGE 分型的菌株也可拥有完全相同的耐药谱型。

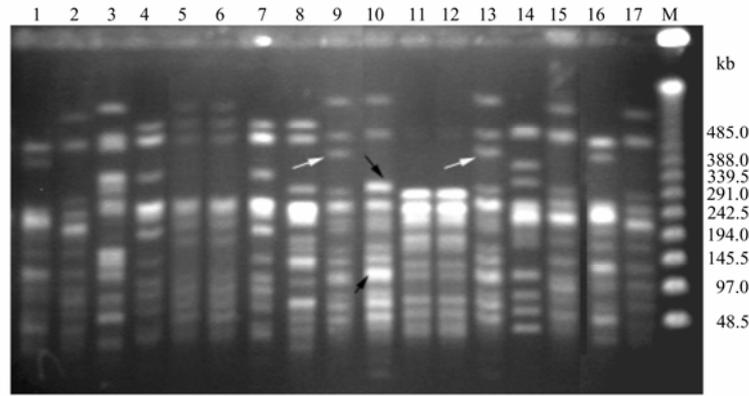


1~4. 分离自鸡的大肠杆菌 (Df5-5, D9-5, D12-1, D12-3); 5~9. 分离自饲养员的大肠杆菌 (D35-1, D35-3, D38-1, D38-2, D38-3); 10~20. 分离自环境的大肠杆菌 (D13-1, D13-3, D13-5, D14-1, D8-3, D8-4, D29-1, D29-2, D29-3, D29-4, D28-4); M. Lambda ladder DNA standard; 箭头所指为鸡源菌株 (D9-5) 比饲养员源菌株 (D38-1, D38-2, D38-3) 和环境源菌株 (D28-4) 多出的一条带

1-4. *E. coli* isolated from chickens; 5-9, *E. coli* isolated from poultry farmers; 10-20. *E. coli* isolated from farm environment; M. Lambda ladder DNA standard. White arrow indicated a unique band that was found in one chicken isolate D9-5 compared with three farmers isolates D38-1, D38-2, D38-3 and one environmental isolate D28-4

图 1 部分鸡场来源大肠杆菌 PFGE 图谱

Fig. 1 Representative PFGE patterns of *E. coli* isolated from poultry farm after digestion of total DNA with *Xba*I



1~9. 分离自猪的大肠杆菌 (W4-3, W6-5, Wf11-1, wf11-3, W13-2, W13-5, W18-4, W26-5, Wf13-1); 10~12. 分离自饲养员的大肠杆菌 (W32-2, W36-3, W36-4); 13~17. 分离自环境的大肠杆菌 (W19-5, W21-1, W21-2, W39-4, W40-4); M: Lambda ladder DNA standard。箭头所指为饲养员菌株 W32-2 与猪源菌株 Wf13-1 和环境菌株 W19-5 不同的条带
 1-9. *E.coli* isolated from pigs(W4-3, W6-5, Wf11-1, wf11-3, W13-2, W13-5, W18-4, W26-5, Wf13-1); 10-12. *E.coli* isolated from swine farmers(W32-2, W36-3, W36-4); 13-17. *E.coli* isolated from farm environment(W19-5, W21-1, W21-2, W39-4, W40-4); M: Lambda ladder DNA standard. Arrows indicated different bands of farmer isolate W32-2 compared with pig isolate Wf13-1 and environmental isolate W19-5

图 2 部分猪场来源大肠杆菌 PFGE 图谱

Fig. 2 Representative PFGE patterns of *E.coli* isolated from swine farm after digestion of total DNA with *Xba* I

表 部分菌株的耐药谱型、PFGE 基因分型和来源

Table Resistance patterns, PFGE types and sources of some strains

鸡场 Poultry farm				猪场 Swine farm			
菌株 Strain	耐药谱型 Resistance pattern	PFGE	来源 Source	菌株 Strain	耐药谱型 Resistance pattern	PFGE	来源 Source
D3-2	CipApAxSKGNTetDTsu	B1	Chi3	W4-3	CipApAxSKGNTetDChITsu	C	Pig4
D12-1	CipApAxCefSKGNTetDChITsu	B2	Chi12	W39-4	CipApAxSKGNAKTetDChITsu	C	Env39
D29-2	CipApAxCefSKGNTetDChITsu	B1	Env29	W2-4	CipApAxSKGNTetDChITsu	B	Pig2
Df5-5	CipApAxSKNAKTetDChITsu	M	Chi5	W13-2	CipApAxSGTetDChITsu	B	Pig13
D8-3	CipApAxSKNAKTetDChITsu	M	Env8	W13-5	CipApAxSKGAKArTetDChITsu	B	Pig13
D9-5	CipApAxSKGNTetDChITsu	N1	Chi9	W6-5	CipApAxSKGNAKTetDChITsu	D	Pig6
D38-1	CipApAxSGTetDChITsu	N2	Far38	W21-2	CipApAxSKGNTetDChITsu	D	Env21
D38-2	CipApAxSGTetDChITsu	N2	Env38	W40-4	CipApAxSKNTetDChITsu	D	Env40
D38-3	CipApAxSGTetDChITsu	N2	Far38	W40-3	CipApAxSKGNTetDTsu	T	Env40
D28-4	CipApAxSGTetDChITsu	N2	Env28	W19-1	CipApAxCeffSKGNAKTetDTsu	T	Env19
D26-1	CipApAxSKGNTetDTsu	J	Env26	W38-1	CipApAxSKGNTetDTsu	T	Far38
D28-5	CipApAxSTetDTsu	J	Env28	W36-3	CipApAxSKGArTetDChITsu	L	Far36
D13-1	CipApAxSKNAKArTetDChITsu	S	Env13	W36-4	CipApAxSKGAKArTetDChITsu	L	Far36
D13-4	CipApAxSKNTetDChITsu	S	Env13	Wf13-1	CipApAxSKGAKArTetDChITsu	H1	Pig13
D8-4	CipApAxSKNTetDChITsu	V	Env8	W19-5	CipApSKNArTetDChITsu	H1	Env19
D29-1	CipApAxSKGNTetDChITsu	V	Env29	W32-2	CipApAxSKGNArTetDChITsu	H2	Far32

Ak, 阿米卡星 Amikacin; Ax, 阿莫西林 Amoxicillin; Ap, 氨苄西林 Ampicillin; Ar, 安普霉素 Apramycin; Cef, 头孢噻吩 Cefotiofur; Chl, 氯霉素 chloramphenicol; Cip, 环丙沙星 Ciprofloxacin; D, 多西环素 Doxycycline; G, 庆大霉素 Gentamicin; K, 卡那霉素 Kanamycin; N, 新霉素 Neomycin; S, 链霉素 Streptomycin; Tet, 四环素 Tetracycline; Tsu, 复方新诺明 Trimethoprim-sulfamethoxazole; Chi, 鸡 Chicken; Env, 环境 Environment; Far, 饲养员 Farmer; Pig, 猪 Pig

3 讨论

非人类 (畜牧业、水产业) 使用抗菌药导致耐药菌株的出现和传播对人类健康的影响近年成为全世界关注的焦点。中国是畜牧业大国, 抗菌药的使用种类

和数量都非常大, 但由此导致的对人体健康和公共卫生的影响有多大还不甚清楚。为明确畜禽养殖场大肠杆菌耐药性的传播途径及其方式, 探索人与动物间耐药菌垂直克隆传播的可能性, 本研究采用被公认为许多细菌基因分型金标准的 PFGE 方法^[16], 对分离自养

殖场动物、环境和饲养员的 86 株耐药谱相近多重耐药大肠杆菌进行 DNA 指纹图谱分型, 比较菌株之间的亲缘关系。结果发现同一养殖场不同动物个体、养殖场环境不同采样点、动物和环境以及饲养员和环境都存在 PFGE 指纹图谱完全相同菌株, 说明同一养殖场不同动物之间、动物与环境之间以及环境与饲养员之间存在着耐药大肠杆菌的克隆传播。

同时, 鸡场和猪场都发现有属同一 PFGE 分型的来自动物、饲养员和环境的菌株。鸡场一 9 周龄大鸡分离菌株 D9-5 的 PFGE 图谱与 3 株鸡场饲养员分离菌 (D38-1、D38-2 和 D38-3) 和 1 株鸡场环境 (池塘水) 分离菌 D28-4 相比, 仅有 1 个条带的差别。猪场 1 饲养员分离菌株 W32-2 的 PFGE 图谱与 1 猪怀孕母猪分离菌 Wf13-1 和 1 母猪运动场污泥分离菌 W19-5 相比有 3 个条带的差别。1995 年美国疾病预防控制中心 Tenover 等^[15]提出了菌株同源性的 PFGE 判别标准, 即由于单个基因在酶切位点处发生突变、插入或缺失的遗传改变导致在电泳带型上与主要表型有 2~3 个差别的菌株被认为是主要型中的亚型, 菌株间有相近关系; 如有两个独立基因发生遗传改变将导致 4~6 条带的变化, 可认为菌株间可能有相近关系; 如菌株间有 6 条或更多带型变化, 说明有 3 个或更多基因发生变化, 被视为无相关性。由此可见, 以上菌株间有很近的亲缘关系, 充分说明养殖场动物、环境及饲养员之间存在多重耐药大肠杆菌的克隆传播。台湾最近的研究也表明人和猪之间存在氟喹诺酮耐药猪霍乱沙门氏菌的克隆传播^[17]。

菌株 W32-2、Wf13-1 和 W19-5 间 PFGE 图谱条带的差异可以用单个基因在 *Xba* I 酶切位点处发生突变来解释, 即 W32-2 的基因组 DNA 在某处发生突变, 增加了 1 个酶切位点, 导致缺少 1 个 400 kb 左右的条带 (图 2 白箭头所指), 而增加 1 个 290 kb 和 110 kb 左右的条带 (图 2 黑箭头所指)。但菌株 D9-5 的 PFGE 图谱与 D38-1、D38-2、D38-3 和 D28-4 相比, 增加了 1 个 60 kb 左右的条带, 这有可能是质粒的条带。Fey 等^[8]报道从牛和儿童分离的头孢曲松耐药沙门氏菌间不同的 PFGE 条带来自质粒, 本研究菌株 D9-5 增加的 60 kb 左右的条带是否为质粒还有待进一步研究证实。

对细菌的 PFGE 分型和耐药谱型进行比较可以看出, 相同 PFGE 分型的菌株其耐药谱型不一定相同, 而不同 PFGE 分型的菌株也可拥有完全相同的耐药谱型。提示同一克隆型的菌株在增殖播散的过程中存在耐药质粒的获取或丢失, 导致耐药性的改变, 而不同克隆株之间可能通过耐药质粒水平传播耐药性。

Donabedian 等^[18]从人和超市鸡肉中分离到 PFGE 图谱完全一致的庆大霉素耐药肠球菌, 说明耐药菌可通过食物链传递到人。本研究发现养殖场不同环境采样点分离菌株的 PFGE 指纹图谱也有完全相同的, 说明克隆传播的耐药菌在养殖场环境广泛传播和分布。另外有较多养殖场环境分离大肠杆菌与动物或饲养员分离大肠杆菌拥有相同的 PFGE 图谱, 如从鸡场工作人员的食堂污水中分离的菌株 D29-2 与动物分离菌 D3-2 的 PFGE 图谱一致, 提示这些多重耐药菌通过污染周围环境、水源或食物, 经食物链可能传播给人, 但这尚需深入的流行病学研究加以证实。

由于即使是同一个体内寄殖的大肠杆菌的 PFGE 指纹图谱也是不尽相同, 所以从不同个体上找到指纹图谱相同的大肠杆菌, 这种筛选效率是非常低的^[9]。但本研究还是从少量的样本中找到了有亲缘关系但来源不同 (自动物、饲养员和环境) 的菌株, 说明耐药菌在养殖场内的动物、环境及饲养员间进行克隆传播是相当普遍的。这一点应引起高度注意, 因为通过养殖场扩散的多重耐药菌非常有可能通过各种途径传播到普通人群, 从而对人体健康和公共卫生产生很大危害。

4 结论

尽管样本量不大, 但本研究还是从鸡场和猪场都找到了属同一 PFGE 分型的分别来自养殖场动物、环境及饲养员的多重耐药大肠杆菌, 充分说明耐药菌在养殖场内的动物、环境及饲养员之间进行克隆传播是相当普遍的。对细菌的 PFGE 分型和耐药谱型进行比较可以看出, 相同 PFGE 分型的菌株其耐药谱型不一定相同, 而不同 PFGE 分型的菌株也可拥有完全相同的耐药谱型。本研究结果还提示, 从养殖场扩散的多重耐药菌非常有可能通过各种途径传播到普通人群, 从而对人体健康和公共卫生产生很大危害, 所以在养殖业应小心谨慎使用抗菌药物, 并加强动物源细菌耐药性的监测。

References

- [1] Saenz Y, Zarazaga M, Brinas L, Lantero M, Ruiz-Larrea F, Torres C. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from animals, foods and humans in Spain. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2001, 18: 353-358.
- [2] Yang H, Chen S, White D G, Zhao S, McDermott P, Walker R, Meng J. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. *Journal of*

- Clinical Microbiology*, 2004, 42: 3483-3489.
- [3] Van den Bogaard A E, Stobberingh E E. Epidemiology of resistance to antibiotics links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2000, 14:327-335
- [4] Turnidge J. Antibiotic use in animals-prejudices, perceptions and realities. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2004, 53:26-27.
- [5] Phillips I, Casewell M, Cox T, Groot B D, Friis C, Jones R, Nightingale C, Preston R, Waddell J. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2004, 53:28-52.
- [6] Molbak K, Baggesen D L, Aarestrup F M, Ebbesen J M, Engberg J, Frydendahl K, Gerner-Smith P, Petersen A M, Wegener H C. An outbreak of multi-drug resistant, quinolone resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104. *New England Journal of Medicine*, 1999, 341:1420-1425.
- [7] Walker R A, Lawson A J, Lindsay E A, Ward L R, Wright P A, Bolton F J, Wareing D R, Corkish J D, Davies R H, Threlfall E J. Decreased susceptibility to ciprofloxacin in outbreak associated multiresistant *Salmonella typhimurium* DT104. *Veterinary Record*, 2000, 147: 395-396.
- [8] Fey P D, Safranek T J, Rupp M E, Dunne E F, Ribot E, Iwen P C, Bradford P A, Angulo F J, Hinrichs S H. Ceftriaxone-resistant salmonella infection acquired by a child from cattle. *New England Journal of Medicine*, 2000, 342:1242-1249.
- [9] Van den Bogaard A E, London N, Driessen C, Stobberingh E E. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *Journal of Antimicrobial Agents*, 2001, 47: 763-771.
- [10] Van den Bogaard A E, Willems R, London N, Top J, Stobberingh E E. Antibiotic resistance of faecal enterococci in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *Journal of Antimicrobial Agents*, 2002, 49:497-505.
- [11] 陈杖榴, 吴聪明, 蒋红霞, 廖晓萍, 魏秀丽, 丁焕中, 曾振灵. 兽用抗菌药物耐药性研究. *四川生理科学杂志*, 2003, 25(3): 121-123.
- Chen Z L, Wu C M, Jiang H X, Liao X P, Wei X L, Ding H Z, Zeng Z L. Studies on resistance of veterinary antimicrobial agents. *Sichuan Journal of Physiological Sciences*, 2003, 25(3): 121-123.(in Chinese)
- [12] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; fifteenth informational supplement. Document M100-S15. NCCLS, Wayne, Pa. 2005.
- [13] Poppe C, Martin L C, Gyles C L, Reid-Smith R, Boerlin P, McEwen S A, Prescott J F, and Forward K R. Acquisition of resistance to extended-spectrum cephalosporins by *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar newport and *Escherichia coli* in the turkey poul intestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71: 1184-1192.
- [14] Gautom R K. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, 35:2977-2980.
- [15] Tenover F C, Arbeit R D, Goering R V, Mickelsen P A, Murray B E, Persing D H. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 1995,33: 2233-2239.
- [16] Olive D M, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, 37:1661-1669.
- [17] Chang C C, Lin Y H, Chang C F, Yeh K S, Chiu C H, Chu C, Chien M S, Hsu Y M, Tsai L S, Chiou C S. Epidemiologic relationship between fluoroquinolone-resistant *Salmonella enterica* Serovar Choleraesuis strains isolated from humans and pigs in Taiwan (1997 to 2002). *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43: 2798-2804.
- [18] Donabedian S M, Thal L A, Hershberger E, Perri M B, Chow J W, Bartlett P, Jones R, Joyce K, Rossiter S, Gay K, Johnson J, Mackinson C, Debess E, Madden J, Angulo F, Zervos M J. Molecular characterization of gentamicin-resistant *Enterococci* in the United States: evidence of spread from animals to humans through food. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41:1109-1113.

(责任编辑 林鉴非)