

大肠埃希氏细菌中 ESBLs 耐药质粒的传播与消除研究

沈永恕^a, 张春辉^b, 荆新蕊^b, 昌莉丽^b

(郑州牧业工程高等专科学校 a. 动物医学系, b. 药物工程系, 河南 郑州 450011)

【摘要】 【目的】研究大肠埃希氏细菌中超广谱 β -内酰胺酶(Extended-spectrum β -lactamases, ESBLs)耐药质粒的传播及氯丙嗪对其的消除效果。【方法】采集河南开封和安阳疑似大肠埃希氏细菌病病死鸡、猪典型病料,经细菌学检验后,用试管二倍稀释法测定头孢噻吩和头孢曲松对致病性大肠埃希氏细菌的最小抑菌浓度(MIC),用双纸片协同法和 PCR 扩增法进行 ESBLs 检测。以安阳猪和开封鸡大肠埃希氏细菌作供体菌、DH5 α 为受体菌,进行 ESBLs 耐药质粒的接合传递试验。用氯丙嗪作消除剂,以 SDS 为对照,对大肠埃希氏细菌分离株 ESBLs 耐药质粒进行消除试验。【结果】从疑似大肠埃希氏细菌典型病料中分离到了大肠埃希氏细菌;头孢噻吩和头孢曲松对分离菌株的最小抑菌浓度分别为 32~64 和 64~128 $\mu\text{g/mL}$;检测到了 ESBLs 耐药质粒的存在,且其能在大肠埃希氏细菌间传播,氯丙嗪对其第 12 次的消除率高达 98.83%。【结论】ESBLs 耐药质粒可通过接合转移方式传递至感受态大肠埃希氏细菌中,氯丙嗪对其消除效果很好。

【关键词】 ESBLs; 耐药质粒; 大肠埃希氏细菌

【中图分类号】 S855.1; Q781

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)02-0041-06

Research on the spread and elimination of ESBLs in *Escherichia coli*

SHEN Yong-shu^a, ZHANG Chun-hui^b, JING Xin-rui^b, Chang Li-li^b

(a. Department of Animal Medicine, b. Department of Pharmacy Engineering, Zhengzhou College of Animal Husbandry Engineering, Zhengzhou, He'nan 450011, China)

Abstract: 【Objective】The spread of extended-spectrum β -lactamases resistant plasmids (ESBLs) in *Escherichia coli* and the elimination of Chlorpromazine were studied. 【Method】Suspicious materials of chicken and swine *E. coli* disease were collected from different chicken and swine flocks in 2 cities of Henan Province. After bacteria identification, the minimal inhibitory concentrations (MICs) of Cefotaxime and Ceftriaxone to the *Enterobacteriaceae* were carried out with two fold dilution method. ESBLs were detected by double-disk test and PCR method. Transformation and conjugation of *E. coli* resistant plasmids were done between donor and receptor bacteria. Elimination of resistant plasmid experiment was tested by SDS and Chlorpromazine. 【Result】*E. coli* were isolated from Suspicious materials, the minimal inhibitory concentrations (MICs) of Cefotaxime and Ceftriaxone to the *E. coli* were 32–64, 64–128 $\mu\text{g/mL}$ respectively; the ESBLs resistant plasmids were detected by double-disk test, ESBLs plasmid in *E. coli* can spread among bacteria, and the twelfth elimination rate of Chlorpromazine was 98.83%. 【Conclusion】The ESBLs resistant plasmids could be transferred to *E. coli* through conjugation and transformation. The elimination of Chlorpromazine to ESBLs resistant plasmids was good.

Key words: ESBLs; resistant plasmid; *Escherichia coli*

* [收稿日期] 2009-06-25

[基金项目] 河南省教育厅资助项目(2009A230009); 河南省科技厅资助项目(072102130009)

[作者简介] 沈永恕(1962—), 男, 河南罗山人, 副教授, 主要从事兽医临床研究。E-mail: shenyongshu@sohu.com

[通信作者] 张春辉(1975—), 女, 河南漯河人, 讲师, 博士, 主要从事新兽药研发及安全性评价研究。E-mail: chunhuizhang@126.com

质粒是共价闭合环状的小型 DNA 分子,作为独立于染色体外能够自主复制的遗传因子,质粒在细菌细胞内普遍存在。细菌的某些表型特征,包括抗性、代谢能力、致病性、共生现象、接合转移等往往由质粒控制^[1]。有研究表明,革兰氏阴性埃希氏菌对第 3 代头孢菌素和新的 β -内酰胺环类抗生素耐药的主要机制,是产生了超广谱 β -内酰胺酶(Extend spectrum β -lactamases, ESBLs)和 AmpC 酶(AmpC β -lactamase)^[2]。产生 ESBLs 细菌表现的多重耐药性,给临床感染性疾病的治疗带来了严重威胁。含质粒的细菌经某些物理、化学方法处理后,由于质粒的复制受到抑制而染色体的复制仍继续进行,故可使子代细菌中的质粒消除,其消除频率比自发消除高 $10^2 \sim 10^5$ 倍。近 30 年来,国内外许多研究者都在积极寻找消除耐药质粒的有效方法,以逆转细菌耐药性。目前,已报道的质粒消除方法有物理方法、化学方法、抗生素法和非抗生素法等,其中非抗生素法研究最多的是三环类精神药物氯丙嗪^[3]。

为了更好地控制产生 ESBLs 细菌的耐药性,防止耐药菌株的传播和流行,制定更好的感染控制策略,本试验对大肠埃希氏细菌中 ESBLs 耐药质粒的传播及氯丙嗪对其的消除效果进行了研究,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及药品 大肠埃希氏细菌标准菌株:猪源 C₈₃₉₀₇ 和鸡源 C₈₃₈₄₅,均购于中国兽药监察所。

盐酸氯丙嗪注射液,南通第三制药厂产品;阿莫西林/棒酸(阿莫西林 30 μg /片,棒酸 10 μg /片)、头孢曲松(CRO, 30 μg /片)、头孢噻肟(CTX, 30 μg /片)、头孢他啶(CAZ, 30 μg /片)药敏纸片,北京天坛生物技术公司产品。

1.1.2 主要试剂及仪器 十二烷基磺酸钠(Sodium dodecyl sulfate, SDS),上海盛众精细化工有限公司产品。麦康凯、营养肉汤、M-H 等培养基,杭州天河微生物试剂有限公司产品;远滕氏培养基、伊红美蓝琼脂,由北京奥博星生物技术责任有限公司生产。微量质粒提取试剂盒、DNA 片段凝胶回收试剂盒,北京三博远志生物技术有限责任公司产品;GoldView 型核酸染色剂、D2000 DNA ladder,北京索莱宝科技有限公司产品;dNTP、*Taq* 酶,宝生物工程(大连)有限公司产品。

DYY-12 型电脑三恒多用电泳仪、水平微型电泳

槽,北京市六一仪器厂产品;MILLIPORE-21JO 纯水机,美国 MILLIPORE 公司产品;UVI 紫外凝胶成像系统,英国 UVIttec ST John's Innovation Centre 产品;YEAR2000 PCR 仪,德国 Biometra 公司产品;3K30 高速冷冻离心机,美国 SIGMA 公司产品。

1.2 致病性大肠埃希氏细菌的分离培养与鉴定

参照文献[4],对来自河南开封鸡场、安阳猪场,经临床诊断为大肠埃希氏细菌病的病死动物进行无菌操作采取典型病料心、肝,分别划线接种于远滕氏培养基和伊红美蓝琼脂平板上,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。对部分典型菌落进行抹片、革兰氏染色、镜检后约菌,分别接种于五糖微量发酵管、蛋白胨水、葡萄糖磷酸盐蛋白胨水和西蒙氏枸橼酸盐微量生化鉴定管,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2~3 d,进行生化鉴定。

1.3 大肠埃希氏细菌最小抑菌浓度(MIC)的测定

用试管二倍稀释法^[5]测定头孢噻肟和头孢曲松对大肠埃希氏细菌标准株及开封鸡、安阳猪分离株的 MIC 值。

1.4 大肠埃希氏细菌 ESBLs 耐药质粒的检测

1.4.1 产生 ESBLs 菌株的双纸片协同法^[6]初筛

将贴上药敏纸片的大肠埃希氏细菌平板于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜后观察,若有上下左右任一 CRO、CTX、CAZ 纸片与中间阿莫西林/棒酸药敏纸片出现协同现象(在靠近复合剂纸片一侧的边缘出现扩大或增强),判定为产生 ESBLs 可疑菌株。

1.4.2 可疑菌株的 PCR 检测^[7] 取可疑菌株,用微量质粒提取试剂盒提取质粒,提取物在 10 g/L 琼脂糖凝胶(含 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 核酸染色剂)中电泳后,用 UVI 紫外凝胶成像系统观察。以提取的质粒为模板,用 TEM 型引物(上游引物:5'-GAGTATTCAA-CATTTCCGTGTCGC -3',下游引物:5'-TACCAAT-GCTTAATCAGTGAGGC -3',引物由宝生物工程(大连)有限公司合成)进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 50 μL :10 $\times$ buffer 5 μL ,dNTP 4 μL ,上游引物 1 μL ,下游引物 1 μL ,质粒 0.5 μL ,*Taq* 酶 0.5 μL ,无菌超纯水补足 50 μL 。PCR 反应程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min,共 35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 8 min。PCR 反应结束后,取 5 μL 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶(含 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 核酸染色剂)进行电泳检测。

1.5 感受态大肠埃希氏细菌的制备

参照文献[8],用 CaCl_2 制备新鲜的大肠埃希氏细菌感受态细胞 DH5 α 。挑取单菌落 DH5 α 于 5 mL LB 液体培养基中孵育 5~6 h,取 2 mL 加入 50 mL

LB液体培养基中,37℃培养2 h,使 OD_{600} 值在0.35~0.40。将培养物转移至无菌预冷的聚丙烯管中,冰置10 min冷却至0℃;4℃、4 000 r/min离心12 min,回收细胞;彻底倒出培养液,每50 mL初始培养液加30 mL预冷的 $CaCl_2$ 溶液重悬细胞沉淀物;4℃、4 000 r/min离心12 min,回收细胞;完全倒出培养液,每50 mL初始培养液加2 mL预冷的 $CaCl_2$ 溶液重悬细胞沉淀物,冰置15~30 min;4℃、4 000 r/min离心12 min,加2 mL预冷的 $CaCl_2$ 溶液重悬细胞沉淀物,4℃放置12~24 h,以备转化使用。

1.6 大肠埃希氏细菌ESBLs耐药质粒的转化、接合及传递试验

1.6.1 转化 按照文献[9]的方法进行,质粒受体菌为感受态大肠埃希氏细菌DH5 α ,质粒供体菌为临床分离株的产生ESBLs的安阳猪和开封鸡大肠埃希氏细菌。取200 μ L感受态大肠埃希氏细菌菌液,无菌条件下加入10 μ L质粒(约0.1 g),混合振荡均匀,在冰上放置30 min,42℃水浴热激120 s,快速冰浴3 min使之冷却。加入800 μ L预热至37℃的LB培养液(含30 mg/mL头孢氨苄),37℃振荡(112 r/min)温育45 min,5 000 r/min离心5 min。无菌操作,弃去部分上清液,将剩余细菌(约100 μ L)混匀,用无菌棉签涂布含30 mg/L头孢氨苄的LB平板,再取未加质粒的大肠埃希氏细菌DH5 α 100 μ L,涂布在另一个含30 mg/L头孢氨苄的LB平板作阴性对照,37℃孵育过夜。在前一平板上出现的单个菌落即为转化后的大肠埃希氏细菌DH5 α 。

1.6.2 质粒接合传递试验^[10] 质粒受体菌为感受态大肠埃希氏细菌DH5 α ,质粒供体菌为临床分离的2株大肠埃希氏细菌,将供体菌、受体菌分别接种于LB平板上,37℃孵育过夜。取单个菌落分别接种于1 mL LB培养液中,37℃孵育5~6 h;取0.5 mL培养液于无菌离心管中,同时加供、受体菌培养液各20 μ L混匀,37℃接合2 h,吸取100 μ L涂布于LB平板(含30 mg/mL头孢氨苄),37℃孵育12 h。在上述平板上同时作供、受体菌的对照;在未加头孢氨苄的LB平板上接种大肠埃希氏细菌DH5 α 作为对照。对在含药LB平板上出现的较小、透明、边缘不整齐的灰白色菌落进行生化鉴定,鉴定为大肠埃希氏细菌的菌落,质粒接合传递呈阳性;鉴定为非大肠埃希氏细菌的菌落,质粒接合传递呈阴性。

1.7 大肠埃希氏细菌ESBLs耐药质粒的体外消除试验

1.7.1 氯丙嗪MIC的测定 采用试管二倍稀释法

测定氯丙嗪的MIC。

1.7.2 质粒的消除 参照文献[11],将大肠埃希氏细菌接种于营养琼脂平板复苏后,转接于5 mL营养肉汤中,37℃振荡培养24 h。取50 μ L培养物加入10 mL含亚抑菌浓度氯丙嗪的营养肉汤中(含氯丙嗪74 mg/mL),37℃振荡培养24 h,然后分别取出10份培养液(10 μ L/份),分别涂布在10块含74 mg/mL氯丙嗪的营养琼脂固体培养基上,37℃培养24 h后,分离100~500个单菌落,用影印培养法依次接种于含10 g/L氨苄西林的琼脂平板上,以接种于不含药物的琼脂平板上的菌落为对照,37℃培养24~48 h。

1.7.3 消除子的筛选 选择在含抗生素的选择平板培养基上不生长、而在不含抗生素的普通平板培养基上生长的菌落,即为ESBLs质粒消除子,再用相应的AP选择平板培养基复试加以确认,并计算质粒消除率。

1.7.4 质粒消除子的检测 取在抗生素选择培养基上不生长的原始菌落(即接种在含74 mg/mL氯丙嗪的营养琼脂培养基上的菌落),接种于10 mL营养肉汤培养基中,37℃振荡培养48 h,用微量质粒提取试剂盒提取质粒(具体操作参考试剂盒说明书),进行PCR扩增,产物进行10 g/L琼脂糖凝胶电泳(含1 μ g/mL核酸染色剂),UVI紫外凝胶成像系统分析质粒消除情况^[12]。

1.7.5 对照试验 选用传统消质剂SDS(终质量浓度为5 g/L),45℃水浴进行ESBLs质粒消除,作为对照。同时设不经任何消质剂消除(细菌质粒自然消除)的大肠埃希氏细菌作为空白对照。

消除试验中,用氯丙嗪和SDS对大肠埃希氏细菌开封和安阳分离株ESBLs耐药质粒连续进行12次消除,在第1,3,6,9和12次后,计算消除率。

2 结果与分析

2.1 致病性大肠埃希氏细菌的分离培养与鉴定

病死鸡、猪的病料在远滕氏培养基上均长出深红色、有金属光泽的中等大小的菌落;在伊红美蓝琼脂平板上均长出紫黑色、有金属光泽的中等大小的菌落。对典型菌落进行抹片、染色、镜检,均见到革兰氏阴性中等大小的杆菌。2株分离菌在五糖微量发酵管试验中,对葡萄糖、乳糖、麦芽糖和甘露醇均产酸产气;靛基质试验和MR试验结果均为阳性;VP试验和枸橼酸盐试验均为阴性,以上结果均符合大肠埃希氏细菌的菌落特征,故判定为大肠埃希

氏细菌。

2.2 大肠埃希氏细菌 MIC 的测定

头孢噻呋和头孢曲松对产生 ESBLs 的大肠埃希氏细菌的 MIC 值见表 1,由表 1 可知,头孢噻呋对临床大肠埃希氏细菌安阳和开封分离株的 MIC 值分别为 32 和 64 $\mu\text{g/mL}$,远远标准菌株 C₈₃₉₀₇ 和

C₈₃₈₄₅ 的 MIC 值;头孢曲松对临床大肠埃希氏细菌安阳和开封分离株的 MIC 值均在 128 $\mu\text{g/mL}$ 以上,是标准菌株 C₈₃₉₀₇ 和 C₈₃₈₄₅ 的数百倍。结果表明,2 株大肠埃希氏细菌分离株对头孢曲松和头孢噻呋明显耐药。

表 1 头孢噻呋和头孢曲松对产生 ESBLs 的大肠埃希氏细菌的 MIC 值

Table 1 MIC of Cetiofur and Ceftriaxone to *E. coli* producing ESBLs $\mu\text{g/mL}$

药物 Drug	开封鸡大肠埃希氏细菌 <i>E. coli</i> from Kaifeng	安阳猪大肠埃希氏细菌 <i>E. coli</i> from Anyang	C ₈₃₉₀₇	C ₈₃₈₄₅
头孢噻呋 Cetiofur	64	32	0.40	0.20
头孢曲松 Ceftriaxone	128	64	0.04	0.02

2.3 大肠埃希氏细菌 ESBLs 耐药质粒的检测

表型检测发现,致病性大肠埃希氏细菌分离株均可产生 ESBLs 耐药质粒。对 2 株大肠埃希氏细菌临床菌株进行质粒提取,结果均得到了 ESBLs 耐药质粒。以提取的 ESBLs 耐药质粒为模板,进行 PCR 扩增,在所有样品中均扩增出 1 条与预期长度一致的约 860 bp 的 TEM 型 ESBLs 片段(图 1)。

2.4 大肠埃希氏细菌 ESBLs 耐药质粒的转化、接合及传递

以头孢氨苄作为选择抗生素,以大肠埃希氏细菌 DH5 α 为受体菌,进行接合转移试验,结果表明,分离自猪、鸡的大肠埃希氏细菌均能转移 ESBLs 耐药质粒至受体菌中(图 2)。

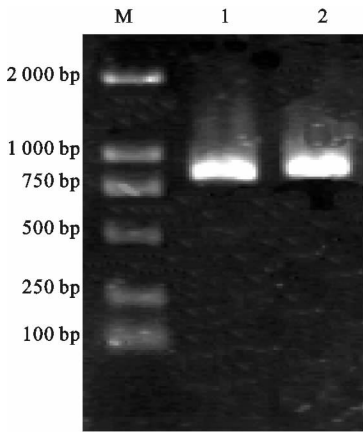


图 1 大肠埃希氏细菌 ESBLs 质粒提取物的 PCR 扩增

M. DL2000 Marker;1,2. 分别为大肠埃希氏细菌开封和安阳株的 PCR 扩增产物

Fig.1 PCR amplification of plasmid extracted from ESBLs in *E. coli*

M. DL2000 Marker,1,2. PCR amplification of TEM primer of ESBLs in *E. coli* from Kaifeng and Anyang

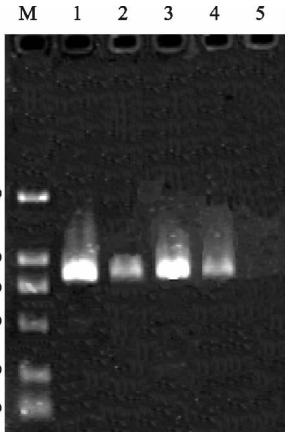


图 2 大肠埃希氏细菌 ESBLs 质粒转化的 PCR 检测

M. DL2000 Marker;1,2. 分别为开封株转化前、后的 PCR 产物;3,4. 分别为安阳株转化前、后的 PCR 产物;5. DH5 α 的质粒提取物

Fig.2 Results of PCR amplification of plasmid of *E. coil* of ESBLs

M. DL2000 Marker;1,2. PCR amplification of plasmid and plasmid transformation of ESBLs in *Enterobacteriaceae* from Kaifeng; 3,4. PCR amplification of plasmid and plasmid transformation of ESBLs in *Enterobacteriaceae* from Anyang;5. Plasmid of DH5 α

2.5 大肠埃希氏细菌 ESBLs 耐药质粒的体外消除

2.5.1 ESBLs 耐药质粒的消除情况 ESBLs 质粒被氯丙嗪消除前后的 PCR 扩增结果见图 3。由图 3 可以看出,消除子均未扩增出 ESBLs 片段。

2.5.2 ESBLs 耐药质粒的消除率 以 SDS 作对照,用氯丙嗪对大肠埃希氏细菌开封和安阳分离株

进行连续 12 次的耐药质粒 ESBLs 消除试验,结果见表 2。由表 2 可知,SDS 和氯丙嗪对 ESBLs 耐药质粒的第 1 次消除率均在 20% 以下,第 3 次消除率在 40%~50%,第 6 次消除率均>60%,第 9 次消除率均>80%,第 12 次消除率均>90%,氯丙嗪对开封分离株的第 12 次消除率高达 98.83%。

表 2 氯丙嗪和 SDS 对大肠埃希氏细菌 ESBLs 耐药质粒的消除率

Table 2 Elimination rate of Chlorpromazine and SDS to resistance plasmid of ESBLs of <i>E. coli</i>							%
药物 Drug	细菌 Bacterium	第 1 次 The first	第 3 次 The third	第 6 次 The sixth	第 9 次 The ninth	第 12 次 The twelfth	
氯丙嗪 Chlorpromazine	K	14. 53	47. 53	60. 37	80. 63	98. 83	
	A	11. 25	42. 34	63. 25	87. 31	92. 45	
SDS	K	11. 05	42. 13	62. 75	87. 25	92. 37	
	A	16. 72	48. 26	61. 29	81. 28	97. 75	
空白对照 Blank control	K			0. 05			
	A			0. 06			

注:K. 大肠埃希氏细菌开封分离株;A. 大肠埃希氏细菌安阳分离株。

Note:K. *E. coli* in chicken from Kaifeng;A. *E. coli* in swine from Anyang.

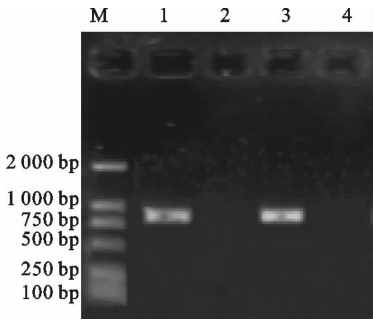


图 3 大肠埃希氏细菌 ESBLs 质粒经氯丙嗪消除前后的 PCR 检测

M. DL2000 Marker;1,2. 分别为安阳株消除前、后的 PCR 产物;
3,4. 分别为开封株消除前、后的 PCR 产物

Fig. 3 PCR products of plasmid before/after elimination
M. DL2000 Marker;1,2. Before and after elimination
of ESBLs in Anyang *E. coli*;3,4. Before and after
elimination of ESBLs in Kaifeng *E. coli*

3 讨论与结论

细菌耐药性是一个公共卫生问题,近年来有关 ESBLs 产生菌的耐药性问题,在国内已引起高度重视。张春辉等^[13]报道,用双纸片协同法检测细菌 ESBLs 的产生,具有较高的可靠性。本研究用双纸片协同法和 PCR 扩增法,对大肠埃希氏细菌安阳和开封分离株的 ESBLs 进行检测,结果完全一致。

细菌耐药性有天然性耐药和获得性耐药 2 种,获得性耐药指抗菌药多次与细菌接触后,表现出的敏感性下降或消失等现象。耐药菌株可通过耐药质粒把耐药基因传递给其他细菌。本研究质粒转化、接合传递试验中,耐药质粒转化子的条带与供体菌一致,表明分离的大肠埃希氏细菌携带的 ESBLs 耐药质粒能传递给受体菌,这与梁军等^[14]报道的结果一致。

三环类精神药物可以消除溶血素转运蛋白的编码质粒,增加细菌细胞膜的通透性,抑制质粒 DNA 螺旋酶,使质粒难以形成超螺旋,从而抑制质粒的复

制^[15-16]。本研究中氯丙嗪对 ESBLs 耐药质粒的第 12 次消除率高达 98.83%,因此在兽医临床中,应该重视并研究氯丙嗪在克服耐药性方面的作用。

[参考文献]

[1] 吴乃虎. 基因工程原理(上册) [M]. 2 版. 北京:科学出版社, 1998:176-179.
Wu N H. Principles of genetic engineering (The first volume) [M]. 2nd Edition. Beijing: Science Press, 1998: 176-179. (in Chinese)

[2] Jacoby G A, Archer G L. New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agent [J]. Neng Med B, 1991, 324: 601-612.

[3] Kristansen J E, Amara L. The potential of resistant infection with non-antibiotics [J]. Antimicrobio Chemother, 1997, 40 (3): 319-327.

[4] 陆承平. 兽医微生物学 [M]. 3 版. 北京:中国农业出版社, 2001:27-29.
Lu C P. Veterinary microbiology [M]. 3rd edition. Beijing: China Agriculture Press, 2001: 27-29. (in Chinese)

[5] 张春辉,周青云,胡功政. 舒巴坦与常见 β -内酰胺环类抗生素的体外抑菌试验 [J]. 中兽医医药杂志, 2005(5): 36-37.
Zhang C H, Zhou Q Y, Hu G Z, et al. Antibacterial test of sulbactam combined with common β -lactam antibiotics *in vitro* [J]. Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine, 2005 (5): 36-37. (in Chinese)

[6] Thomson K S, Sanders C C. Detection of extend-spectrum β -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the double-disk and three-dimensional tests [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1992, 36: 1877-1882.

[7] 胡功政,孙亚伟,陈红英,等. 鸡志贺氏菌产超广谱 β -内酰胺酶 (ESBLs) 的分子进化 [J]. 中国农业科学, 2008, 41(2): 593-598.
Hu G Z, Sun Y W, Chen H Y, et al. Molecular evolution of the extended spectrum β -lactamase (ESBLs) produced by the *Shigella* isolated from the fowl [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2008, 41(2): 593-598. (in Chinese)

[8] Joseph S, David W. Molecular cloning: A laboratory manual [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

[9] 院 良,徐秀华,文细毛. 克雷伯氏菌 β -内酰胺酶的测定及其与

耐药质粒的关系 [J]. 中华医院感染学杂志, 1997, 7(2): 72-74.

Yuan L, Xu X H, Wen X M. Investigation relation between detection of β -lactamase and resistant plasmids of *Klebsiella pneumoniae* [J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 1997, 7(2): 72-74. (in Chinese)

[10] 管希周, 刘又宁, 罗燕萍, 等. 临床产多种 β -内酰胺酶肺炎克雷伯菌的生物学研究 [J]. 中华医院感染学杂志, 2005, 15(7): 820.

Guan X Z, Liu Y N, Luo Y P, et al. Multiple β -lactamases producing clinical isolates of *Escherichia coli* [J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2005, 15(7): 820. (in Chinese)

[11] 雷连成, 韩文瑜, 王兴龙, 等. 大肠埃希氏细菌与喹诺酮耐药性关系的研究 [J]. 吉林农业大学学报, 2001, 23(2): 89-92.

Lei L C, Han W Y, Wang X L, et al. Relation between plasmids and quinolone resistance of *Escherichia coli* [J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2001, 23(2): 89-92. (in Chinese)

[12] 林平, 边宝华, 汪旭明, 等. 克痢沙对志贺氏菌耐药性质粒消除作用的实验研究 [J]. 时珍国医国药, 2005, 16(5): 372-373.

Lin P, Bian B H, Wang X M, et al. Examination of drug resistance plasmids from *Shigella* by Kelisha [J]. Lishizhen Medicine and Material Medica Research, 2005, 16(5): 372-373. (in Chinese)

[13] 张春辉, 张晓根, 张华. 兽医临床超广谱 β -内酰胺酶的表型检测方法 [J]. 中兽医医药杂志, 2006(6): 68-69.

Zhang C H, Zhang X G, Zhang H. The method for phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamases in veterinary clinical [J]. Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine, 2006(6): 68-69. (in Chinese)

[14] 梁军, 匡秀华, 苑丽, 等. 鸡志贺氏菌 β -内酰胺酶的测定及其与耐药质粒的关系 [J]. 河南农业大学学报, 2006, 40(5): 510-515.

Liang J, Kuang X H, Yuan L, et al. Detection of the β -lactamase of *S. flexneri* from chicken and its relation with the resistant plasmids [J]. Journal of Henan Agricultural University, 2006, 40(5): 510-515. (in Chinese)

[15] Molnar J, Foldeak S, Nakamura M J, et al. Antiplasmid activity; loss of bacterial resistance to antibiotics [J]. APMIS, 1992, 30(Suppl.): 24-31.

[16] Kristiansen J E, Hendricks O, Delvin T, et al. Reversal of resistance in microorganisms by help of non-antibiotics [J]. J of Antimicrob Chemother, 2007, 59: 1271-1279.

(上接第 35 页)

[13] Ehrlich M, Gamasosa M A, Huang L H, et al. Amount and distribution of 5-methylcysotine in human DNA from different types of tissues or cells [J]. Nucleic Acids Res, 1982, 10: 2709-2721.

[14] Gamasosa M A, Migett R M, Slagel V A, et al. Tissue-specific differences in DNA methylation in various mammals [J]. Biochem Biophys Acta, 1983, 740: 212-219.

[15] Elmaarri O, Becker T, Junen J, et al. Gender specific differences in levels of DNA methylation at selected loci from human total blood; a tendency toward higher methylation levels in males [J]. Hum Genet, 2007, 122(5): 505-14.

[16] Vanyushin B F, Tkacheva S G, Belozersky A N. Rare bases in animal DNA [J]. Nature, 1970, 225: 948-949.

[17] Romanov G A, Vanyushin B F. Intragene specificity of DNA methylation in animals. Tissue differences and changes in the methylation of reiterated sequences during aging, carcinogenesis and hormonal induction [J]. Mol Biol, 1980, 2: 357-367.

[18] Vanyushin B F, nemirovsky L E, Klimenko V V, et al. The 5-methylcytosine in DNA of rats. Tissue and age specificity and the changes induced by hydrocortisone and other agents [J]. Gerontologia, 1973, 19: 138-152.

[19] Golbus J, Palella T D, Richardson I B C. Quantitative changes in T cell DNA methylation occur during differentiation and ageing [J]. Eur J Immunol, 1990, 20: 1869-1872.

[20] 尹慧, 黄代新, 翟仙敦, 等. HPLC 法检测人外周血 5-mC 含量及其与年龄相关性研究 [J]. 中国法医学杂志, 2007, 22(1): 8-11.

Ying H, Huang D X, Zhai X D, et al. Age related changes in 5-methylcytosine content in human peripheral leukocytes by HPLC [J]. Chinese Journal of Forensic Medicine, 2007, 22(1): 8-11. (in Chinese)

[21] Bollati V, Schwartz J, Wright R, et al. Decline in genomic DNA methylation through aging in a cohort of elderly subjects [J]. Mechanisms of ageing and development, 2009, 30(4): 234-9.

[22] 梁秋菊, 刘丽娜, 彭健, 等. 猪血液和肌肉组织 DNA 甲基化含量的测定 [J]. 中国农业科学, 2007, 40(8): 1774-177.

Liang Q J, Liu L N, Peng J, et al. Determination of DNA methylation contents both in the blood and muscle tissue of pigs and significant difference analysis [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2007, 40(8): 1774-177. (in Chinese)

[23] 唐韶青, 张沅, 徐青, 等. 不同动物部分组织基因组甲基化程度的差异分析 [J]. 农业生物技术学报, 2006, 14(14): 507-510.

Tang S Q, Zhang Y, Xu Q, et al. Analysis of methylation level of genome in various tissues of different animal species [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2006, 14(4): 507-510. (in Chinese)