

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.05.03

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱在动物源细菌耐药性监测中的应用

丁晓妍, 崔明全, 李 霆, 朱馨乐, 张纯萍, 程 敏, 赵 琪, 王鹤佳*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2021-12-21 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 05-0020-07 [中图分类号] S852.61

[摘 要] 细菌鉴定是细菌耐药性监测过程中的重要工作环节之一, 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (Matrix-assisted laser desorption ionization time-off flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS) 能够高效鉴定细菌。为了快速监测五家养殖场来源的大肠杆菌和肠球菌的临床耐药特征, 本研究利用 MALDI-TOF MS 和微量肉汤稀释法, 快速鉴定临床分离的大肠杆菌和肠球菌, 并对其进行耐药表型检测。结果显示, MALDI-TOF MS 实现了对临床分离菌株 (31 株大肠杆菌和 34 株肠球菌) 的快速鉴定; 鸡源大肠杆菌和肠球菌的耐药情况最为严重, 其次为羊和牛。其中, 鸡源的大肠杆菌均对四环素 (100%) 和氨苄西林 (91.67%) 耐药率最高, 肠球菌对苯唑西林 (62.07%) 耐药率较高。研究结果表明, 不同动物源细菌临床耐药性表型严重程度有所不同, 与此同时, MALDI-TOF MS 技术可以同时实现对动物源大肠杆菌和肠球菌的快速鉴定, 值得在动物源细菌耐药性检测领域推广应用。

[关键词] 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱; 大肠杆菌; 肠球菌; 耐药性

Application of Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Time-off Flight Mass Spectrometry in Monitoring Drug Resistance of Animal-derived Bacteria

DING Xiao-yan, CUI Ming-quan, LI Ting, ZHU Xin-le,
ZHANG Chun-ping, CHENG Min, ZHAO Qi, WANG He-jia*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: WANG He-jia, E-mail: pharhejia@163.com

Abstract: Bacterial identification is one of the important tasks in the process of bacterial drug resistance monitoring. Matrix-assisted laser desorption ionization time-off flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) is a method to efficiently identify bacteria. In order to quickly monitor the clinical resistance characteristics of *Escherichia coli* and *Enterococcus* from five farms, MALDI-TOF MS and micro broth dilution method were used to

作者简介: 丁晓妍, 硕士研究生, 从事动物产品质量和公共卫生安全研究; 崔明全, 副研究员, 从事病原微生物药理毒理与检测技术研究。崔明全与丁晓妍对本文具有同等贡献。

通讯作者: 王鹤佳。E-mail: pharhejia@163.com

quickly identify clinically isolated suspected *Escherichia coli* and *Enterococcus*, and performed resistance phenotype detection. The results showed that MALDI – TOF MS identified rapidly clinically isolated strains (31 strains of *E. coli* and 34 strains of *Enterococcus*); chicken – derived *E. coli* and *Enterococcus* had the most serious drug resistance, followed by sheep and cattle. Chicken – derived *E. coli* had the highest resistance rates to tetracycline (100%) and ampicillin (91.67%), and *Enterococcus* had higher resistance rates to oxacillin (62.07%). In summary, the severity of the clinical drug resistance phenotypes of different animal – derived bacteria was different. At the same time, the MALDI – TOF MS technology can simultaneously realize the rapid identification of animal – derived *E. coli* and *Enterococcus*, which is worthy of promotion and application in the field of animal – derived bacterial drug resistance detection.

Key words: MALDI – TOF MS; *Escherichia coli*; *Enterococcus*; drug resistance

我国是畜牧业大国,涉及动物种类繁多,养殖基数大,需要兽用抗菌药物为动物健康和食品安全保驾护航。可是随着抗菌药物的广泛使用,“细菌耐药性出现→过量使用或滥用抗菌药物→耐药谱或耐药水平加重”的恶性循环仍在继续^[1]。为了遏制动物源细菌耐药性,2018 年,我国开始开展兽用抗菌药使用减量化行动试点,其中,相关养殖场细菌流行和耐药情况备受关注^[2]。大肠杆菌和肠球菌分别被认定为革兰氏阴性和革兰氏阳性耐药水平指示菌^[3],耐药性水平指示菌在一定程度上代表了该养殖场的细菌耐药水平,是细菌耐药性监测中关注的重要对象。目前,我国动物源细菌耐药性监测中细菌分离鉴定多采用生化和 PCR 鉴定方法^[4]。针对不同养殖场不同类型的细菌分别鉴定,程序不一,工作量大,迫切需求高效的细菌鉴定技术手段。基于细菌特异性蛋白图谱的基质辅助激光解析电离飞行时间质谱技术具有快速、简单、高通量、准确性高、稳定性好等特点,可以满足细菌耐药性监测中细菌鉴定的需求,而且 MALDI – TOF 鉴定微生物的方法已经成为全球临床微生物实验室细菌分离株常规鉴定的参考方法^[5]。MALDI – TOF 技术基本原理为:将微生物样品与基质分别点加在钢靶上,晾干后形成共结晶,发射激光,基质吸收激光能量帮助样品分子电离,经过飞行时间检测器进行信号检测,生成质谱图,纵坐标为离子峰,横坐标为离子质荷比(m/z)^[6]。通过采集 2000 ~ 20000 kD 区间的微生物蛋白指纹图谱,扫描每个物种的特征峰值,与大型数据库中标准图谱进

行匹配,能够鉴定细菌种属^[7-8]。本研究通过选择 MALDI – TOF 方法,快速有效地鉴定鸡、牛和羊来源的大肠杆菌和肠球菌临床分离菌株,开展细菌耐药表型检测,以期待为临床细菌耐药性监测工作提供技术支撑和参考依据。

1 材料和方法

1.1 样品 分别从五家兽用抗菌药使用减量化试点(两家鸡场来自宁夏某养殖场和湖南某养殖场,一家羊场来自浙江某养殖场,两家牛场分别来自宁夏某养牛场和河南某养牛场)进行抽样,每个养殖场 15 份样品,总共 75 份样品。标准菌株为大肠杆菌 ATCC25922 和粪肠球菌 ATCC29212。

1.2 试剂与仪器 运送培养基、大肠杆菌显色培养基、肠球菌显色培养基、普通营养琼脂(青岛海博生物有限公司);甲酸;乙腈;无水乙醇;CHCA 基质溶液;台式冷冻离心机;德国 Sigma 公司;基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪;岛津公司;VITEK – 2 全自动微生物鉴定仪、浊度仪、革兰氏阴性鉴定卡(GN)和革兰氏阳性鉴定卡(GP);梅里埃公司。

1.3 方法

1.3.1 样品采集与细菌分离 采集不同养殖场动物(鸡、牛和羊)粪便、设施表面和工人鼻腔拭子样品,立即放入无菌运输培养基中保存,低温运送至实验室。

分离纯化:将保存在运送培养基中的样品分别在大肠杆菌显色培养基和肠球菌显色培养基上划线,置于 37 ℃ 恒温培养箱中培养 18 ~ 24 h。挑取大肠杆菌显色培养基上的蓝绿色单菌落(疑似大肠杆菌)和肠

球菌显色培养基上的红色或紫色的单菌落(疑似肠球菌)再次在显色培养基上划线进行二次纯化。

将质控菌株大肠杆菌 ATCC25922 和肠球菌 ATCC29212 复苏,在普通营养琼脂上划线,37 ℃ 培养 18 ~ 24 h。

1.3.2 MALDI-TOF MS 鉴定 样品前期处理:挑取纯化后的疑似单菌落在普通营养琼脂培养基上划线培养。用无菌接种环挑取适量样品于 1.5 mL 离心管中,加入 300 μL 纯水和 900 μL 无水乙醇,混匀,12000 rpm/min,离心 2 min,弃去上清;向沉淀中加入 50 μL70% 甲酸,混匀,再加入 50 μL 乙腈,混匀,12000 rpm/min,离心 2 min,留上清。质控菌株 ATCC25922 的处理同上。

点样:先在干净的钢靶上点 1 μL 上清,放干后再点 2 μL CHCA 基质溶液,晾干后送入上样系统。

MALDI-TOF 鉴定:选择仪器运行模式 Linear_saramis,设置扫描范围 2000 ~ 20000,激光频率 20;激光能量 66,采集谱图数 Profiles 100,shot 2,Blank 1500, PμLsed Extraction 8330;利用 Auto quality 自动获得谱图。设置好参数后开始采集质控菌株 ATCC25922 的数据,进行校准。校准完成后开始进行样品数据采集。

数据处理:将导出 txt 格式的数据拷贝到数据库电脑的鉴定软件中自动读取数据并鉴定。鉴定结果给出科、属、种三个水平。

1.3.3 VITEK 2 生化鉴定 挑取适量的分离纯培养的菌株于 3 mL 的 0.45% 无菌盐水中混匀,用

VITEK 2 比浊仪配置相当于 0.5 ~ 0.63 麦氏单位的菌悬液。将悬浮液管及 GN、GP 卡置于载卡台上,连接菌液管和鉴定卡,放入仪器中,按照 VITEK 全自动生化鉴定系统操作流程进行样品鉴定。

1.3.4 细菌耐药表型检测 采用微量肉汤稀释法测定大肠杆菌和肠球菌对抗菌药物的耐药性,测定大肠杆菌对氨苄西林、阿莫西林/克拉维酸、庆大霉素、四环素、磺胺异噁唑、复方新诺明、头孢他啶、氧氟沙星、美罗培南、黏菌素的耐药表型,肠球菌对青霉素、红霉素、万古霉素、苯唑西林、多西环素、利奈唑胺的耐药表型。参照美国临床实验室标准化委员会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 标准^[9]进行结果判定。大肠杆菌和肠球菌分别用 ATCC25922 和 ATCC29212 进行质控。

2 结果与分析

2.1 细菌鉴定结果 针对湖南、宁夏、河南和浙江地区进行样品采集的 75 份样品(鸡养殖场采集 30 份,牛养殖场 30 份,羊养殖场 15 份样品),将棉签拭子样本分别在大肠杆菌显色平板和肠球菌显色平板划线过夜培养。大肠杆菌典型菌落为蓝色,边缘整齐,表面湿润的圆形菌落,肠球菌典型菌落为红色至紫色,边缘整齐,表面湿润的针尖样菌落。针对上述疑似大肠杆菌或肠球菌进行 MALDI-TOF MS 鉴定,大肠杆菌分离率为 41.33% (31/75),肠球菌分离率为 45.33% (34/75)(粪肠球菌 14 株,屎肠球菌 18 株、海氏肠球菌 2 株)(图 1 和表 1)。

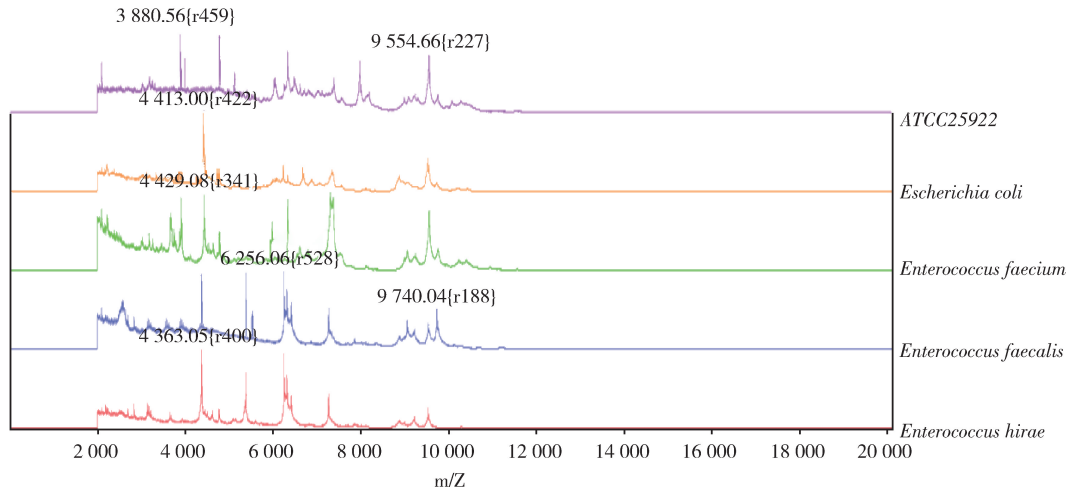


图 1 样品的 MALDI-TOF MS 谱图

Fig 1 MALDI-TOF MS spectrum of the samples

表 1 不同动物来源的细菌分离情况

Tab 1 Isolation of bacteria from different animal sources

动物来源	分离菌数(株)				
	大肠杆菌	屎肠球菌	粪肠球菌	海氏肠球菌	总计
鸡	12	5	12	0	29
羊	8	4	2	0	14
牛	11	9	0	2	22
总计	31	18	14	2	65

VITEK 生化鉴定结果中,31 株被鉴定为大肠杆菌,34 株被鉴定为肠球菌,结果与 MALDI – TOF MS 结果一致。

2.2 细菌耐药性结果

2.2.1 大肠杆菌耐药性检测结果 药敏试验结果显示(图2),三种动物来源分离获得的大肠杆菌均

对四环素高度耐药(100%);鸡、牛和羊源大肠杆菌对氨苄西林(91.67%、27.27%、75%)、阿莫西林/克拉维酸(58%、0、37.5%)、磺胺异恶唑(83.33%、18.18%、75%)表现出不同程度耐药性,而且鸡源大肠杆菌的 10 种抗菌药物中的 5 种药物(阿莫西林/克拉维酸、庆大霉素、四环素、磺胺异恶唑、复方新诺明)的 MIC₅₀比牛或羊源的大肠杆菌高。鸡源、牛源和羊源大肠杆菌多重耐药率分别为 90.9%、36.36% 和 87.5%,鸡和羊源大肠杆菌表现五重耐药性(β – 内酰胺类、氨基糖苷类、四环素类、磺胺类抗、喹诺酮类),牛源大肠杆菌表现四重耐药性(β – 内酰胺类、四环素类、磺胺类抗、喹诺酮类)。由此可见,鸡源大肠杆菌耐药情况最为严重。

02	APPA —	03	ADO +	04	PyrA —	05	IARL —	07	dCEL —	09	BGAL +	10	H2S —	11	BNAG —	12	AGLTp —
13	dGLU +	14	GGT +	15	OFF +	17	BGLU —	18	dMAL +	19	dMAN +	20	dMNE +	21	BXYL —	22	BAlap —
23	ProA —	26	LIP —	27	PLE —	29	TyrA +	31	URE —	32	dSOR +	33	SAC —	34	dTAG —	35	dTRE +
36	CIT —	37	MNT —	39	SKG —	40	ILATk —	41	AGLU —	42	SUCT +	43	NAGA —	44	AGAL +	45	PHOS —
46	GlyA +	47	ODC —	48	LDC +	53	I-HISa —	56	CMT +	57	BGUR +	58	O129R +	59	GGAA —	61	IMLTa —
62	ELLM +	64	ILATa —														

图 2 大肠杆菌的生化反应结果

Fig 2 The respLt of the biochemical reaction of E. coli

a																	
02	AMY +	04	PIPLC —	05	dXYL —	08	ADH1 +	09	BGAL —	11	AGLU +	13	APPA —	14	CDEX +	15	AspA (=)
16	BGAR —	17	AMAN —	19	PHOS —	20	LeuA —	23	ProA —	24	BGURr —	25	AGAL +	26	PyrA +	27	BGUR —
28	AlaA —	29	TyrA —	30	dSOR +	31	URE —	32	POLYB +	37	dGAL +	38	dRIB +	39	ILATk —	42	LAC —
44	NAG +	45	dMAL —	46	BACI +	47	NOVO +	50	NC6.5 —	52	dMAN +	53	dMNE —	54	MBdG +	56	PUL —
57	dRAF —	58	O129R —	59	SAL +	60	SAC +	62	dTRE +	63	ADH2s +	64	OPTO +				
b																	
02	AMY —	04	PIPLC —	05	dXYL +	08	ADH1 +	09	BGAL —	11	AGLU —	13	APPA —	14	CDEX —	15	AspA (=)
16	BGAR —	17	AMAN —	19	PHOS —	20	LeuA —	23	ProA —	24	BGURr —	25	AGAL +	26	PyrA +	27	BGUR —
28	AlaA —	29	TyrA (=)	30	dSOR —	31	URE —	32	POLYB +	37	dGAL +	38	dRIB +	39	ILATk —	42	LAC +
44	NAG +	45	dMAL —	46	BACI +	47	NOVO +	50	NC6.5 +	52	dMAN +	53	dMNE +	54	MBdG +	56	PUL —
57	dRAF —	58	O129R +	59	SAL +	60	SAC +	62	dTRE +	63	ADH2s +	64	OPTO +				
c																	
02	AMY +	04	PIPLC —	05	dXYL —	08	ADH1 +	09	BGAL +	11	AGLU —	13	APPA —	14	CDEX +	15	AspA +
16	BGAR —	17	AMAN —	19	PHOS —	20	LeuA —	23	ProA —	24	BGURr —	25	AGAL +	26	PyrA +	27	BGUR —
28	AlaA —	29	TyrA +	30	dSOR —	31	URE —	32	POLYB +	37	dGAL +	38	dRIB +	39	ILATk —	42	LAC +
44	NAG +	45	dMAL —	46	BACI +	47	NOVO +	50	NC6.5 +	52	dMAN —	53	dMNE —	54	MBdG +	56	PUL —
57	dRAF —	58	O129R +	59	SAL +	60	SAC +	62	dTRE +	63	ADH2s +	64	OPTO +				

图 3 肠球菌的生化反应结果(a:粪肠球菌;b:屎肠球菌;c:海氏肠球菌)

Fig 3 The respLt of the biochemical reaction of Enterococcus

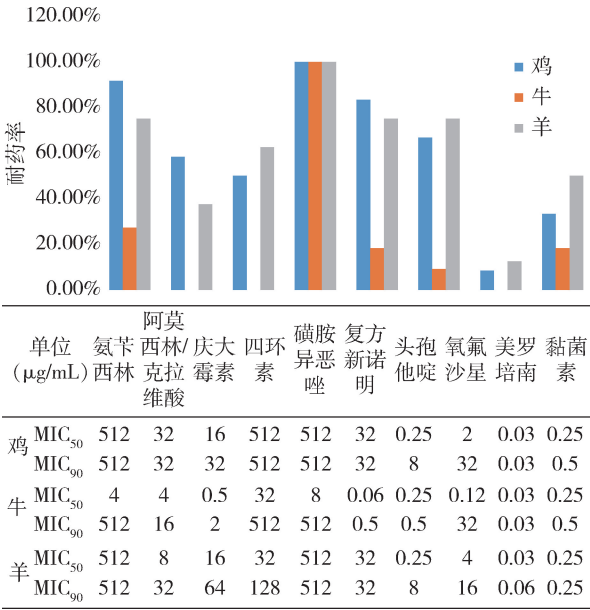


图 4 不同动物来源的大肠杆菌耐药情况

Fig 4 Resistance of *E. coli* from different animal sources

2.2.2 肠球菌耐药性检测结果 从药敏试验结果得出,鸡源、牛源和羊源肠球菌对青霉素(3.45%、0、0)、红霉素(55.17%、22.73%、28.57%)、多西环素(51.72%、4.55%、9.09%)、苯唑西林(62.07%、36.36%、9.09%)和利奈唑胺(27.59%、0、21.43%)表现出不同程度的耐药性,鸡源肠球菌对上述5种抗菌药物的耐药率普遍高于牛和羊源肠球菌的耐药率。而且鸡源肠球菌的6种药物中的3种抗菌药物(红霉素、多西环素、利奈唑胺)的MIC₅₀比牛或羊源的肠球菌高。三种动物来源均表现多重耐药现象。其中,鸡源肠球菌多重耐药率为100%,对β-内酰胺类、大环内酯和四环素三类抗菌药物耐药,牛源和羊源肠球菌多重耐药率分别为77.78%和66.67%,均对大环内酯、四环素和β-内酰胺类三类抗菌药物耐药。药敏试验结果显示鸡源肠球菌耐药性最为严重。

3 讨论

本研究采用MALDI-TOF MS鉴定细菌的方法,减少了不同细菌不同的检测程序和步骤,高效地实现了对不同动物源的大肠杆菌和肠球菌的临床鉴定。目前,MALDI-TOF MS作为快速鉴定的热点应用技术被广泛采纳应用于国内外临床微生物临床

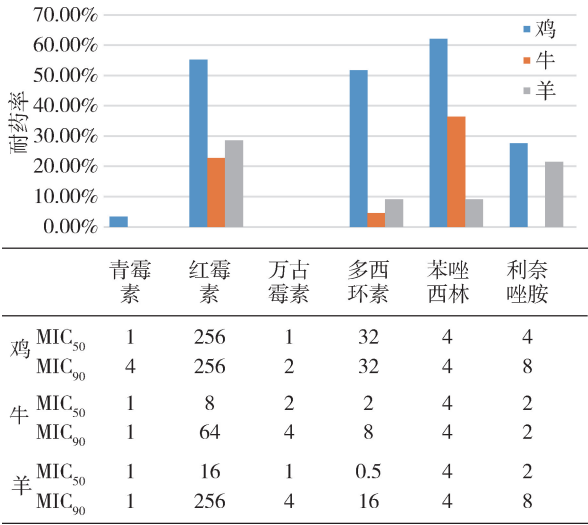


图 5 不同动物来源的肠球菌耐药情况

Fig 5 Resistance of *Enterococcus* from different animal sources

检测研究。国家标准委发布了《GB/T 33682-2017 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱鉴别微生物方法通则》,美国临床和实验室标准协会发布《Methods for the Identification of Cultured Microorganisms Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry》,表明MALDI-TOF MS已经成为微生物菌种鉴定的标准方法。利用已知菌种建立数据库,通过质谱检测获得蛋白指纹图谱,与数据库中的参考图谱对比后得到鉴定结果,这种方法已经广泛应用到临床上微生物的物种水平鉴定。Rychert等^[10]对1146份革兰氏阳性菌的样品进行处理,经MALDI-TOF鉴定出1063份样品,种水平准确率为92.8%,属水平准确率达95.5%;Faron等^[11]采集2263份革兰氏阴性菌进行MALDI-TOF鉴定,结果表明种属水平分别为98.2%、99.8%。这说明MALDI-TOF MS在革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌中都具有很高的准确性和可信性。Koziel等^[12]结合MALDI-TOF和16S rRNA鉴定出猕猴粪便中存在CIT 045(T)解脲弯曲杆菌。MALDI-TOF MS也可以作为溯源分析手段,Jadhav等^[13]将MALDI-TOF MS作为检测食品和食品加工环境中的单核细胞增生性李斯特菌的

鉴定和溯源手段,溯源结果与金标准脉冲电场技术具有良好的一致性。除此之外, MALDI - TOF MS 也可以直接被应用于临床耐药菌株相关的特征峰鉴定,从而实现对耐药菌株的直接检测。Wang 等^[14]利用耐药相关特征峰值的不同来检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌,通过直接寻找 MRSA 与 MSSA 对比的特征峰 (m/z 891、1140、1165、1229、2127),确定其为 MRSA。Lau 等^[15]利用 MALDI - TOF MS 分析耐药性相关质粒(携带碳青霉烯酶基因 bla_{KPC} 的 pKpQIL 质粒),结合蛋白质组学和分子生物学技术鉴定表征了与 pKpQIL 质粒的基因产物相对应的 m/z 11109 Da 峰,实现耐药菌的快速鉴定。

值得注意的是,本研究中鸡源大肠杆菌和肠球菌对多数药物耐药程度明显高于牛和羊场分离的大肠杆菌和肠球菌相应药物的耐药程度,提示不同动物来源的细菌对抗菌药物的耐药性有所不同。其他相关文献报道中也有类似的实验现象。唐标等^[16]对鸡、鸭、猪源大肠杆菌耐药性调查结果显示,鸡源大肠杆菌的耐药率高于鸭和猪源;Ibekwe 等^[17]对不同动物源产 ESBL 的大肠杆菌调查,结果发现产 ESBL 的大肠杆菌在不同动物源中分布广泛,但猪和奶牛粪便中检测到的 ESBL 菌数量明显高于其他动物;王熙楚等^[18]对不同动物来源的肠球菌进行耐药性分析,研究表明鸡源肠球菌耐药性较其他动物来源更为严重。其中,鸡源大肠杆菌对四环素和氨苄西林高耐药率现象与我国不同区域鸡源大肠杆菌耐药表型结果相一致^[19]。同时也类似于韩国地区大肠杆菌对四环素和氨苄西林的高耐药性率^[20]。鸡源肠球菌对多西环素和红霉素的高耐药率现象与我国其他地区肠球菌的高耐药率也相一致^[21-22]。

综上所述,为了有效地控制细菌耐药性,持续地针对不同地区不同动物来源的大批量细菌鉴定工作将是常态化技术工作,高效的细菌鉴定技术 MALDI - TOF MS 可以提高监测效率,值得在动物源细菌耐药性监测领域推广应用。与此同时,应该密切关注不同动物源细菌耐药性不同的现象,利用

高效检测技术,探索不同动物源细菌耐药性不同的问题原因。

参考文献:

- [1] 吴聪明,汪洋. 动物源细菌耐药性监测与流行病学研究[J]. 中国兽药杂志, 2010,44(01):23-25.
Wu C M, Wang Y. The Surveillance for the Antimicrobial Resistance of Animals Origin and Research on epidemiological [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2010,44(01):23-25.
- [2] 农业农村部. 关于开展兽用抗菌药使用减量化行动试点工作的通知[J]. 中华人民共和国农业农村部公报, 2018,(05):51-53.
Ministry of Agriculture and Rural Affairs. Circular of the General Office of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs on launching pilot program of cutting use of veterinary antibacterial drugs[J]. Gazette of the Ministry of Agriculture and Affairs of the People's Republic of China, 2018,(05):51-53.
- [3] National Food Institute, Technical University of Denmark. DAN-MAP 2020: Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark[J]. Statens Serum Institut, 2020:95-101.
- [4] 农业农村部. 2019 年动物源细菌耐药性监测计划[J]. 中华人民共和国农业农村部公报, 2019,(09):18-19.
Ministry of Agriculture and Rural Affairs. Circular of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs on printing and distributing the 2019 plan for monitoring antimicrobial resistance in animals [J]. Gazette of the Ministry of Agriculture and Affairs of the People's Republic of China, 2019,(09):18-19.
- [5] Oviano M, Rodriguez - Sanchez B. MALDI - TOF mass spectrometry in the 21 st century clinical microbiology laboratory[J]. Enferm Infecc Microbiol Clin (Engl Ed), 2021, 39 (4): 192 - 200.
- [6] Anderson N W, Buchan B W, Riebe K M, et al. Effects of solid - medium type on routine identification of bacterial isolates by use of matrix - assisted laser desorption ionization - time of flight mass spectrometry [J]. J Clin Microbiol, 2012,50(3):1008-1013.
- [7] Hou T Y, Chiang - Ni C, Teng S H. Current status of MALDI - TOF mass spectrometry in clinical microbiology[J]. J Food Drug Anal, 2019,27(2):404-414.
- [8] 赵贵明,刘洋,陈颖,等. 克罗诺杆菌 MALDI - TOF - MS 数据库的建立及应用 [J]. 食品科学, 2014, 35 (08): 105 - 110.

- Zhao G M, Liu Y, Chen Y, *et al.* Establishment and application of an analytical database for Cronobacter spp. by Matrix – Assisted Laser Desorption Ionization – time of Flight Mass Spectrometry [J]. Food Science, 2014, 35(08):105 – 110.
- [9] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. supplement M100. CLSI, Wayne, PA, USA, 2018.
- [10] Rychert J, Burnham C A, Bythrow M, *et al.* M μ Lticenter evaluation of the Vitek MS matrix – assisted laser desorption ionization – time of flight mass spectrometry system for identification of Gram – positive aerobic bacteria [J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(7):2225 – 2231.
- [11] Faron M L, Buchan B W, Hyke J, *et al.* M μ Lticenter Evaluation of the Bruker MALDI Biotyper CA System for the Identification of Clinical Aerobic Gram – Negative Bacterial Isolates [J]. PLoS One, 2015, 10(11):e141350.
- [12] Koziel M, O'Doherty P, Vandamme P, *et al.* Campylobacter corcagiensis sp. nov., isolated from faeces of captive lion – tailed macaques (Macaca silenus) [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2014, 64(Pt 8):2878 – 2883.
- [13] Jadhav S, G μ Lati V, Fox E M, *et al.* Rapid identification and source – tracking of Listeria monocytogenes using MALDI – TOF mass spectrometry [J]. Int J Food Microbiol, 2015, 202:1 – 9.
- [14] Wang H Y, Chung C R, Wang Z, *et al.* A large – scale investigation and identification of methicillin – resistant Staphylococcus aureus based on peaks binning of matrix – assisted laser desorption ionization – time of flight MS spectra [J]. Brief Bioinform, 2021, 22(3).
- [15] Lau A F, Wang H, Weingarten RA, *et al.* A rapid matrix – assisted laser desorption ionization – time of flight mass spectrometry – based method for single – plasmid tracking in an outbreak of carbapenem – resistant Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. 2014, 52(8):2804 – 12.
- [16] 唐 标, 陈怡飞, 陈 聪, 等. 2019 年湖南省部分地区鸡、鸭、猪源大肠杆菌耐药性调查 [J]. 畜牧与兽医, 2021, 53(04): 54 – 60.
- Tang B, Chen Y F, Chen C, *et al.* Investigation of antimicrobial resistance of Escherichia coli from chickens, ducks and pigs in some areas of Hunan Province in 2019 [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2021, 53(04):54 – 60.
- [17] Ibekwe A, Durso L, Ducey T F, *et al.* Escherichia coli Diversity of Plasmids and Genes Encoding Resistance to Extended – Spectrum β – Lactamase in from Different Animal Sources. [J]. Microorganisms, 2021, 9(5):1057.
- [18] 王熙楚, 王世旗, 王波臻, 等. 不同动物来源肠球菌的分离 · 鉴定及耐药性研究 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40(23): 11688 – 11690.
- Wang X C, Wang S Q, Wang B Z, *et al.* Study on the Isolation, Identification and Drug Resistance of Enterococcus from Different Animal Sources [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2012, 40(23):11688 – 11690.
- [19] 高玉斌, 赵 格, 邹 明, 等. 我国不同区域鸡源大肠杆菌的致病性与耐药性分析 [J]. 中国兽医杂志, 2019, 55(03): 81 – 84.
- Gao Y B, Zhao G, Zhou M, *et al.* Analysis of pathogenicity and drug resistance of E. coli from chickens in different regions of my country [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2019, 55(03):81 – 84.
- [20] Kim D G, Kim K, Bae S H, *et al.* Comparison of antimicrobial resistance and molecular characterization of Escherichia coli isolates from layer breeder farms in Korea. Pop μ Lt Sci. 2021 Oct 29; 101(1):101571. doi: 10.1016/j.psj.2021.101571. Epub ahead of print. PMID: 34844113.
- [21] 章 婧, 蔡 萍, 贺奕卓, 等. 广东省养禽场肠球菌耐药性及毒力因子流行分布特征 [J]. 畜牧兽医学报, 2021, 52(09): 2650 – 2659.
- Zhang J, Cai P, He Y Z, *et al.* Epidemiological characteristics of enterococci resistance and virulence factors in pop μ Ltry farms in Guangdong Province [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2021, 52(09):2650 – 2659.
- [22] 刘 雨. 泰安地区禽源粪肠球菌的分离鉴定及耐药性研究 [D]. 山东农业大学, 2021.
- Liu Y. Isolation, Identification and Drug Resistance of Pop μ Ltry – origin Enterococcus Faecalis in Taian Area [D]. Shandong Agricultural University, 2021.

(编辑:侯向辉)