

桶装水中铜绿假单胞菌耐药性分析及 RAPD-PCR 分型研究

曾晓琮, 苏妙贞, 韩志杰, 陈丹霞, 周露

(广东省食品检验所, 广东省酒类检测中心, 广东广州 510435)

摘要: 采用 Kirby-Bauer 纸片扩散法和随机扩增多态性 DNA (Random Amplified Polymorphic, RAPD) 分型法对 23 株水源性铜绿假单胞菌进行耐药性及遗传多样性研究。药敏实验结果显示, 23 株分离株对磺胺甲基异恶唑/甲氧苄氨嘧啶(SXT)、四环素(TE)、米诺环素(MH)的耐药率分别为 69.4%、13.2%和 39.2%, 对另外 13 种抗生素的敏感性几乎 100%。RAPD-PCR 指纹图谱聚类分析显示, 在相对系数为 62%时, 引物 208 将 24 株菌分为 5 簇 (A~E), 其中 C 为主要的簇, 引物 272 将 24 株菌分为 4 簇 (F~I), 其中 I 和 G 簇为主要的簇。23 株分离株中无耐药菌株主要集中在 B 簇, 3 株多重耐药菌株集中在 D 簇, 对 SXT、MH 耐药菌株主要集中在 I 簇。本研究发现水源性铜绿假单胞菌具有较高的遗传多样性, 且存在多重耐药, 为水源性铜绿假单胞菌的污染溯源和控制提供了相应的数据支持。

关键词: 铜绿假单胞菌; 耐药性; 随机扩增多态性 DNA 聚合酶链式反应

文章编号: 1673-9078(2017)4-114-119

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.4.018

Antibiotic Resistance and Random Amplified Polymorphic DNA PCR

Typing of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Barreled Water

ZENG Xiao-cong, SU Miao-zhen, HAN Zhi-jie, CHEN Dan-xia, ZHOU Lu

(Guangdong Provincial Institute of Food Inspection, Guangdong Provincial Liquor Testing Center, Guangzhou 510435, China)

Abstract: The Kirby-Bauer disk diffusion method and random amplified polymorphic DNA (RAPD) typing were used to study the antibiotic resistance and the genetic diversity of 23 waterborne *Pseudomonas aeruginosa* strains. The susceptibility test showed that the drug resistance rates of the 23 *P. aeruginosa* isolates to sulfamethoxazole/trimethoprim (SXT), tetracycline (TE), and minocycline hydrochloride (MH) were 69.4%, 13.2%, and 39.2%, respectively, while they showed an almost 100% susceptibility to the other 13 antibiotics tested. Cluster analysis of the RAPD-polymerase chain reaction (PCR) fingerprints showed that at a similarity coefficient of 62%, the strains were grouped into five clusters (A~E, cluster C as the dominant cluster) and four clusters (F~I, clusters I and G as the dominant clusters) by primers 208 and 272, respectively. Among 23 strains, those with no drug resistance were mostly grouped into cluster B, three multidrug-resistant isolates were grouped into cluster D, and cluster I contained most of the isolates that were resistant to SXT and MH. The results from this study revealed that waterborne *P. aeruginosa* strains have a high genetic diversity and multiple drug resistance, and provide corresponding supporting data for the tracking and control of waterborne *P. aeruginosa* contamination.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; antibiotic resistance; random amplified polymorphic deoxyribonucleic acid polymerase chain reaction

据世界卫生组织(WHO)统计, 人类 70%~80%的疾病都与不洁净的饮用水有关。铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)是一种重要的食源性和水源

收稿日期: 2016-04-11

项目基金: 国家自然科学基金项目 (31301478)

作者简介: 曾晓琮 (1987-), 男, 硕士, 研究方向: 食源性致病菌研究

通讯作者: 周露 (1982-), 女, 博士, 高级工程师, 研究方向: 食品微生物安全

性致病菌, 因其能够在低营养的水环境中生存而广泛存在于各类型水中, 是化脓性感染的重要致病菌之一^[1]。近年来, 桶装水因其便利的特点在家庭和公共场所得到广泛的使用, 然而, 关于铜绿假单胞菌污染桶装水的报道也逐渐增多, 甚至引起食物中毒^[2,3]。此外, 由于抗菌药物的使用, 铜绿假单胞菌耐药现象逐渐成为国内乃至全球性问题, 给临床感染治疗带来巨大挑战。2010年美国 CAITAL 监测计划报道了 2722 株铜

绿假单胞菌的耐药率,其中亚胺培南与美罗培南的耐药率分别为 21.9%与 15.4%,且发现多药耐药菌株比例达 14.8%^[4]。根据我国 2013 年细菌耐药监测数据,铜绿假单胞菌对碳青霉烯类的耐药率达到了 25%以上,且出现了广泛耐药株^[5]。季京淑^[6]2010 年收集了来自全国 22 个省市,65 家医院的 2818 株铜绿假单胞菌,体外药敏试验结果显示亚胺培南、美罗培南和头孢他啶的耐药率分别为 23.1%、18.1%和 15.3%,而其他主要内酰胺类抗菌药物的耐药率在 15~25%左右。徐立群^[7]报道了 68 株铜绿假单胞菌对除多黏菌素外的抗菌药物耐药率为 16.3%~35.2%。

目前,对临床中获得的铜绿假单胞菌的耐药性研究较多,而对于食品尤其是饮用水中分离得到的铜绿假单胞菌,其抗药性情况亟待研究。此外,对耐药菌进行分型研究可以了解耐药菌之间的关系,进而分析出传播来源和途径,制定出有效的控制措施和预防策略^[8,9]。随机扩增多态性 DNA (Random Amplified Polymorphic, RAPD) 分型是采用基因组遗传标记作为单一引物,长度约为 10 bp,确保引物与模板的稳定配对且允许一定程度的错配,通过随机 PCR 扩增产生 DNA 指纹图谱的一种遗传多样性分析技术^[10]。RAPD 操作简单、成本较低,但重复性稍差,因而当只采用 RAPD 作为分型方法时,则需要采用两条以上的引物

进行 RAPD 分型^[11]。尽管如此,RAPD 在诸多微生物,如单增李斯特氏菌^[11]、利什曼虫原虫^[12]、白色念珠菌^[13]、肺炎克雷伯菌^[14]和大肠埃希菌^[15]等研究均有采用,在铜绿假单胞菌的流行病学调查研究上也得到广泛应用^[16~18]。

因此,在前期桶装水抽检的基础上,本研究对 23 株铜绿假单胞菌进行 16 种抗生素药敏性实验,及 RAPD-PCR 分型研究,以期为水源性铜绿假单胞菌污染的溯源和控制提供相应的数据支持。

1 材料与方法

1.1 原料

1.1.1 样品来源

实验所用菌株为 1 株铜绿假单胞标准菌株 ATCC 27853、1 株大肠杆菌标准菌株 ATCC 25922 (购自广东环凯生物技术有限公司)及 23 株野生型菌株。23 株野生型铜绿假单胞菌均来自日常桶装水抽检,依据 GB/T 8538-2008《饮用天然矿泉水检验方法》、GB 19298-2014《食品安全国家标准 包装饮用水》筛查所得,且经过 16S rRNA 基因序列分析法复核鉴定。实验所用菌株相关信息如表 1 所示。

表 1 实验所用菌株

Table 1 Strains used in this study

序号	菌株来源	序号	菌株来源	序号	菌株来源	序号	菌株来源
1	佛山	7	东莞	13	江门-1 厂	19	中山
2	湛江	8	广州-1 厂	14	江门-1 厂	20	汕头
3	韶关	9	河源-1 厂	15	广州-2 厂	21	惠州
4	茂名	10	河源-2 厂	16	广州-2 厂	22	揭阳
5	云浮	11	肇庆	17	广州-3 厂	23	清远
6	梅州	12	江门-1 厂	18	中山	24	ATCC 27853

1.1.2 培养基及主要试剂

营养肉汤、Mueller-Hinton (MH) 琼脂培养基购自广东环凯生物技术有限公司;16 种抗生素纸片(阿米卡星、庆大霉素、头孢吡肟、头孢他啶、头孢哌酮、头孢哌酮/舒巴坦(2:1)、安曲南、环丙沙星、多粘菌素 B、亚胺培南、美罗培南、哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦、磺胺甲基异恶唑/甲氧苄氨嘧啶、四环素和米诺环素)购自 Oxid 公司;DNA 提取试剂盒和 DNA marker 5000 购自 Takara 公司;电泳级琼脂糖购自 Biowest (西班牙);超纯水、50×TAE、Gold View 购自广州民塞生物科技有限公司;Dream Taq™ Green PCR Master mix (2×)购自 Fermentas 公司;RAPD-PCR 引物由华大基因合成。以上试剂均在有效期内使用。

1.1.3 主要仪器设备

冷冻离心机:SIGMA 1-15;Biometra DNA 扩增循环仪(T-professional thermocycler):德国 Biometra 公司;UVP 凝胶成像仪(ImageQuant 350 system):美国 GE Healthcare 公司;微量核酸测定仪(Bio Spec-nano spectrophotometer):日本岛津公司;全自动灭菌锅(ES-215):日本 Tomy Digital Biology 公司;超净工作台:中国苏净安泰公司;生物安全柜(新加波,ESCO);电热恒温培养箱:广东环凯微生物科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 Kirby-Bauer 纸片扩散法

参照美国临床实验室标准化协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 抗菌药物敏感性试验执行标准推荐的纸片扩散法及判定标准进行。以 *P.aeruginosa* ATCC 27853 为阳性对照, *E. coli* ATCC 25922 为质控菌株, 选取 16 种临床常用的抗生素测试, 药片浓度和判断标准见表 2。根据抑菌圈直径判断是属于敏感 (S)、中介 (I) 还是耐药 (R)。具有三种

或三种以上抗生素抗性的菌株定义为多重药耐药性菌株。由于 CLSI 未提供铜绿假单胞菌对头孢哌酮/舒巴坦、头孢哌酮、四环素、复方新诺明及米诺环素的折点标准, 故此五种药物结果的判读参照肠杆菌科细菌在 CLSI (头孢哌酮、四环素、复方新诺明及米诺环素; 头孢哌酮/舒巴坦的折点参考头孢哌酮) 的折点标准。

表 2 铜绿假单胞菌药敏试验抗生素信息

Table 2 Antibiotics used in *P. aeruginosa* antimicrobial susceptibility tests

分类	抗生素名称	英文名(缩写)	药片浓度/(μg /片)	抑菌圈直径/mm		
				敏感(S)	中介(I)	耐药(R)
氨基糖苷类	阿米卡星	Amikacin(AK)	30	≥ 17	15~16	≤ 14
	庆大霉素	Gentamicin(CN)	10	≥ 15	13~14	≤ 13
头孢类	头孢吡肟	Cefepime(FEP)	30	≥ 18	15~17	≤ 14
	头孢他啶	Ceftazidime(CZA)	30	≥ 18	15~17	≤ 14
	头孢哌酮	Cefoperazone(CFP)	30	≥ 21	16~20	≤ 15
	头孢哌酮/舒巴坦 (2:1)	Cefoperazone/sulbactam 2:1(SCF)	105	≥ 21	16~20	≤ 15
单环内酰胺类	氨曲南	Aztreonam(ATM)	30	≥ 22	16~21	≤ 15
氟喹诺酮类	环丙沙星	Ciprofloxacin(CIP)	5	≥ 21	16~20	≤ 15
脂肽类	多粘菌素 B	Polymyxin B Sulfate(PB)	300units	≥ 12	-	≤ 11
碳青霉烯类	亚胺培南	Imipenem(IPM)	10	≥ 19	16~18	≤ 15
	美罗培南	Meropenem(MEM)	10	≥ 19	16~18	≤ 15
青霉素类	哌拉西林	Piperacillin(PRL)	100	≥ 21	15~20	≤ 14
β -内酰胺/ β -内酰胺酶抑制复合物	哌拉西林/他唑巴坦	Piperacillin /tazobactam(TZP)	100	≥ 21	15~20	≤ 14
磺胺类	磺胺甲基异恶唑/甲氧苄氨嘧啶	Sulphamethoxazole with trimethoprim (SXT)	23.75/1.25	≥ 16	11~15	≤ 10
	四环素	Tetracycline(TE)	30	≥ 15	12~14	≤ 11
四环素类	米诺环素	Minocycline(MH)	30	≥ 16	13~15	≤ 12

注: R 表示 Resistant; S 表示 Susceptible; I 表示 Intermediate.

1.2.2 RAPD-PCR 分型

RAPD 引物 208 (ACGGCCGACC) 和 272 (AGCGGGCCAA) 参考文献^[16]。PCR 反应体积为 25 μL , 其成分为: 2 μL DNA 模板 (浓度 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 2 μL 引物 (浓度 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$), 12.5 μL Dream TaqTM Green PCR Master mix (2 \times), 超纯水补足 25 μL 。扩增程序为: 首先 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min 30 s, 共进行 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。扩增产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳分离 (100 V, 40 min)。利用 UVP 凝胶成像仪拍照并保存 TIFF 格式, 并采用 Gel-ProAnalyzer 软件和 Ntsys 软件处理分析。

2 结果与讨论

2.1 分离株抗药性测定

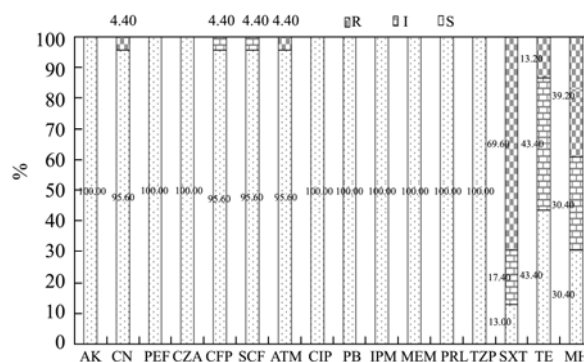


图 1 23 株铜绿假单胞菌体外药物敏感性

Fig.1 Resistance 23 *P. aeruginosa* isolates

注: R 表示耐药; I 表示中介; S 表示敏感; AK 表示阿米

卡星; CN 表示庆大霉素; FEP 表示头孢吡肟 CZA, 头孢他啶; CFP 表示头孢哌酮; SCF 表示头孢哌酮/舒巴坦 (2:1); ATM 表示安曲南; CIP 表示环丙沙星; PB 表示多粘菌素 B; IPM 表示亚胺培南; MEM 表示美罗培南; PRL 表示哌拉西林; TZP 表示哌拉西林/他唑巴坦; SXT 表示磺胺甲基异恶唑/甲氧苄氨嘧啶; TE 表示四环素; MH 表示米诺环素。

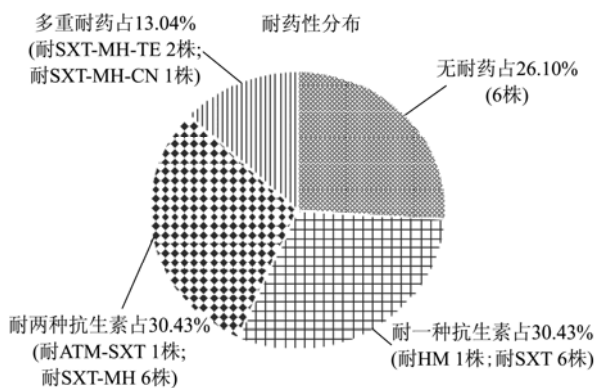


图2 23株铜绿假单胞菌体外药物敏感性分布

Fig.2 Resistance patterns of 23 *P. aeruginosa* isolates

如图1药敏实验结果所示, 23株铜绿假单胞菌对AK、FEP、CZA、CIP、PB、IPM、MEM、PRL和TZP有100%敏感性; 对CFP和SCF有4.40%的中介率; 对CN和ATM有4.40%的抗性; 而对SXT、TE和MH的敏感性与其他13种抗生素有较大差异; 对SXT、TE和MH的抗性为69.60%、13.20%和39.20%, 中介率为17.40%、43.40%和30.40%, 敏感性为13.00%、43.40%和30.40%。图2显示, 23株分离株中, 无耐药菌株6株, 耐1种抗生素7株, 耐2种抗生素7株, 耐3种抗生素3株。菌株耐药性存在一定多样性。

2.2 分离株 RAPD-PCR 分型

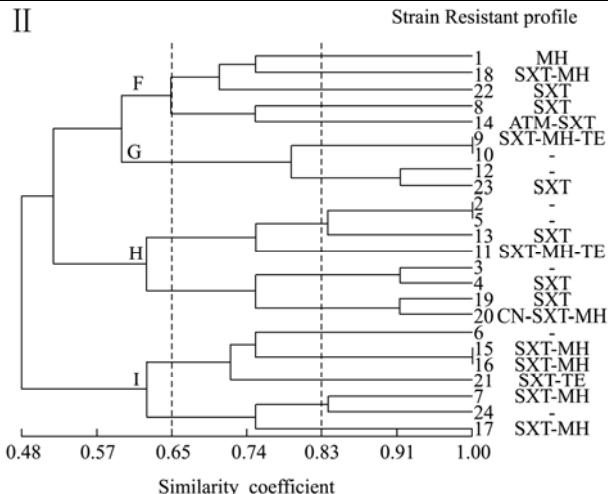
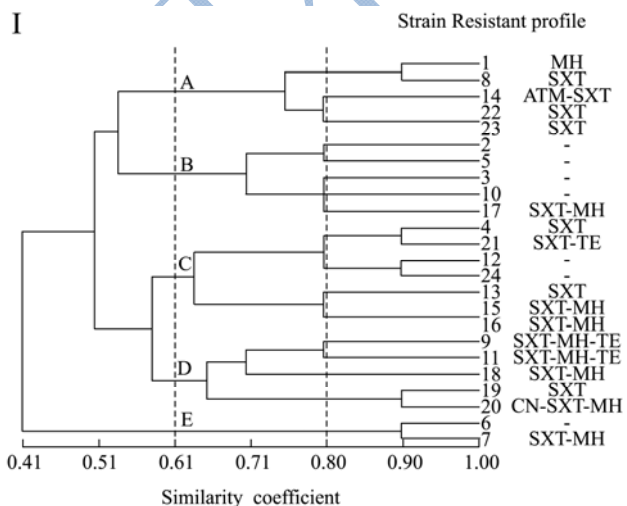


图3 桶装水铜绿假单胞菌分离株 RAPD 聚类分析

Fig.3 Dendrograms of *P. aeruginosa* strains from barreled water based on primers

注: I 表示引物为 208; II 表示引物为 272。

利用 208 和 272 两条引物对 23 株分离株和 1 株标准菌株进行 RAPD 分型, 结果经 Gel-Pro Analyzer 软件和 Ntsys 软件处理后如图 3, 在相似系数为 62% 时, 引物 208 将 24 株菌分为 5 簇 (A~E), 其中 C 为主要的簇, 同一相似系数下, 引物 272 将 24 株菌分为 4 簇 (F~I), 其中 I 和 G 簇为主要的簇。

3 结论

3.1 本研究对前期桶装水抽检中收集的 23 株铜绿假单胞菌进行了 16 种抗生素药敏实验, 发现有 6 株无耐药, 7 株对 1 种抗生素耐药, 7 株对 2 种抗生素耐药, 3 株对 3 种抗生素耐药。其中, 分离株对磺胺类 (磺胺甲基异恶唑/甲氧苄氨嘧啶) 和四环素类 (四环素、米诺环素) 耐药的耐药率分别达到 69.60%、13.20% 及 39.20%。而分离株对氨基糖苷类 (阿米卡星、庆大霉素)、头孢类 (头孢吡肟、头孢他啶、头孢哌酮、头孢哌酮/舒巴坦)、单环内酰胺类 (氨曲南)、氟喹诺酮类 (环丙沙星)、脂肽类 (多粘菌素 B)、碳青霉烯类 (亚胺培南、美罗培南)、青霉素类 (哌拉西林)、β-内酰胺/β-内酰胺酶抑制复合物 (哌拉西林/他唑巴坦) 的敏感性则远高于磺胺类和四环素类抗生素, 敏感率范围在 95.60%~100%。

3.2 铜绿假单胞菌在临床上是一种重要的机会致病菌, 可引发尿道感染、呼吸道感染、皮肤炎和菌血症, 尤其对于烧伤者、癌症患者和以及免疫功能不全的艾滋病患者能引发一系列的 systemic 感染, 该菌能够通过医护工作者的手或者被污染的水等环境传播 [19,20]。过去数十年, 人类在医疗和牲畜治疗上广泛使

用抗生素,导致了水中抗生素的残留和耐药菌株的进化,从而导致严重的环境和公共健康问题^[21]。近年来关于水源性铜绿假单胞菌耐药性的报道逐渐增多。2012年李飞^[22]及2013年魏磊^[23]分别进行了广东省及全国9个省的矿泉水和山泉水污染调查,筛查所得的79株铜绿假单胞菌未发现耐药性,这可能与采样地点为人口稀疏的偏远地区及水源水均为地下水所受外界作用较少有关。2012~2013年徐励琴^[24]对惠州市80份桶装水中分离出的8株铜绿假单胞菌则对氨基青霉素、氨基青霉素/舒巴坦、复方新诺明、头孢三嗪、头孢唑啉、头孢替坦、呋喃妥因的耐药率达100%。巴西Silva M.E.Z^[25]等对从自来水、瓶装矿泉水和井水中分离得到的30株铜绿假单胞菌进行药敏试验,分离株普遍对氯霉素、庆大霉素和甲氧苄氨嘧啶磺胺甲基异恶唑具有抗性,少量菌株对氨基糖苷类抗生素具有抗性。而在临床上,2010年季京淑^[6]曾报道2818株铜绿假单胞菌对磺胺甲基异恶唑/甲氧苄氨嘧啶、四环素、米诺环素的耐药率分别为92.1%、63.8%和76.2%,对阿米卡星等13种抗生素也有4.2%~28.8%的抗性,与本研究结果比较,临床分离株的耐药率普遍高于水源性分离株,这与医院经常使用抗生素必然相关。Ce'line Slekovec^[26]等评估了耐药性铜绿假单胞菌通过废水系统从医院传播到环境中的危害,得出结论是耐药性铜绿假单胞菌在废水处理系统下游及污泥中出现,对环境污染产生了潜在的危害,因为污泥有可能作为肥料,废水则可能进入江河,通过食物链进入人体。

3.3 本研究推测,从桶装水中分离得到的铜绿假单胞菌有向多重耐药发展的趋势。来自医院的耐药菌株可能随水的传播进入到自然环境,使得水源性铜绿假单胞菌的耐药性增强,从而危害人类和动物的健康。这不仅提示我们应该合理使用抗生素,还警示桶装水厂家须从水处理工艺、水桶清洁、生产过程控制等方面加强监管,防止铜绿假单胞菌污染。时刻监测饮用水中铜绿假单胞菌的耐药情况对保障人们饮水安全具有重要意义。

3.4 本研究通过RAPD对铜绿假单胞菌的多样性进行研究。引物208将菌株分为5簇,引物272将菌株分为4簇,相似系数在0.62~1.00,反应出具有较高的遗传多样性。相关研究发现^[27]同一份样品中收集到的菌株应该具有较高的相似性,从同一城市应该更能分出型别相近或相同菌株(如本研究中编号15和16菌株),而不同城市分离株则会表现出遗传多样性。但本研究RAPD分型显示不同来源地域的菌株在不同的簇中均有分布,来源同一地域的菌株也不一定在同一簇(如编号12、13和14菌株),这一方面显示了分离菌

株的遗传多样性,另一方面也提示我们今后仍需要不断加强饮用水中铜绿假单胞菌的检测,以获取更多的菌株,建立更完善的铜绿假单胞菌分型数据库,进而对本省饮用水安全进行风险评估。此外,综合本次菌株耐药性和RAPD-PCR分型研究,我们发现,对SXT、MH耐药菌株主要集中在I簇,无耐药菌株则主要集中在B簇,3株多重耐药(编号9、11和20)集中在D簇,这提示我们本次筛查的铜绿假单胞菌耐药性菌株可能具有较近的亲缘性。进行菌种耐药机理、耐药亲缘性和毒力基因分布研究将是下一步工作的重点。

参考文献

- [1] 张淑红,吴清平,徐晓可,等.桶装水中铜绿假单胞菌检测方法的比较[J].现代食品科技,2011,27(11):1403-1405
ZHANG Shu-hong, WU Qing-ping, XU Xiao-ke, et al. Comparison of detection of *Pseudomonas aeruginosa* in bottled water [J]. Modern Food Science and Technology, 2011, 27(11): 1403-1405
- [2] 王燕梅,唐震,乔昕,等.江苏省桶装饮用水中铜绿假单胞菌污染情况调查[J].中国卫生检验检疫,2015,25(16):2019-2020
WANG Yan-mei, TANG Zhen, QIAO Xin, et al. Survey of *Pseudomonas aeruginosa* contamination in barreled water in Jiangsu province [J]. Chin. J. Health Lab. Tec., 2015, 25(16): 2019-2020
- [3] 闫芳,隋英杰,孙静,等.桶装饮用水污染引起学生食物中毒的调查分析[J].中国卫生检验杂志,2011,21(8):2082-2084
YAN Fang, SUI Ying-jie, SUN Jing, et al. The investigation and analysis of students food poisoning that caused by bottled drinking water pollution [J]. Chin. J. Health Lab. Tec., 2011, 21(8): 2082-2084
- [4] Morrow B J, Pillar C M, Deane J, et al. Activities of carbapenem and comparator agents against contemporary US *Pseudomonas aeruginosa* isolates from CAPITAL surveillance program [J]. Diagn. Microbiol. Infect Dis., 2013, 75(4): 412-416
- [5] 胡付品,朱德妹,汪复,等.2013年中国CHINET细菌耐药性监测[J].中华感染与化疗杂志:2014,14(5):365-374
HU Fu-pin, ZHU De-mei, WANG Fu, et al. CHIENT 2013 surveillance of bacterial resistance in China [J]. Chin. J. Infect Chemother, 2014, 14(5): 365-374
- [6] 季京淑.铜绿假单胞菌MLST分型及耐药机制研究[D].杭州:浙江大学,2015
JI Jing-shu. Multilocus sequence typing and drug resistant mechanism study of *Pseudomonas aeruginosa* [D].

- Hangzhou: Zhejiang University, 2015
- [7] 徐立群,吴立燕,丁汀,等.铜绿假单胞菌耐药率与多位点序列分型研究[J].中华医院感染学杂志,2015,25(3):501-504
XU Li-qun, WU Li-yan, DING Ding, et al. Antibiotic resistance rate and multilocus sequence typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates [J]. Chin. J. Nosocomiol., 2015, 25(3): 501-504
- [8] Tenover F C, Arbeit R D, Goering R V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists [J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 1997, 18(6): 426-39
- [9] MacCannell D. Bacterial strain typing [J]. Clin. Lab Med., 2013, 33(3): 629-50
- [10] Caetanoanollés G, Bassam B J, Gresshoff P M. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers [J]. Bio-Technology, 1991, 9(6): 553-557
- [11] 陈谋通.食源性单核细胞增生李斯特菌遗传多样性分析和群体感应研究[D].广州:华南理工大学,2015
CHEN Mou-tong. Study on the genetic diversity and quorum sensing of foodborne listeria monocytogenes [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2015
- [12] Mkada-Driss I, Lahmadi R, Chakroun A S, et al. Screening and characterization of RAPD markers in viscerotropic *Leishmania parasites* [J]. Plos One, 2014, 9(10): e109773
- [13] Araujo Paulo de Medeiros M, Vieira de Melo A P, Goncalves S S, et al. Genetic relatedness among vaginal and anal isolates of *Candida albicans* from women with vulvovaginal candidiasis in north-east Brazil [J]. J. Med. Microbiol., 2014, 63(Pt 11): 1436-45
- [14] Podder M P, Rogers L, Daley P K, et al. Klebsiella species associated with bovine mastitis in Newfoundland [J]. Plos One, 2014, 9(9): e106518
- [15] Abraham S, Trott D J, Jordan D, et al. Phylogenetic and molecular insights into the evolution of multidrug-resistant porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* in Australia [J]. Int. J. Antimicrob Agents, 2014, 44(2): 105-11
- [16] Mahenthiralingam E, Campbell M E, Foster J, et al. Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis [J]. J. Clin. Microbiol., 1996, 34(5): 1129-35
- [17] Hall A J, Fothergill J L, Kaye S B, et al. Intracolon genetic diversity amongst cystic fibrosis and keratitis isolates of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. J. Med. Microbiol., 2013, 62(Pt2): 208-16
- [18] Da Silva Filho L V, Levi J E, Bento C N, et al. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a cystic fibrosis outpatient clinic [J]. J. Med. Microbiol., 2001, 50(3): 261-7
- [19] Kolmos H J, Thuesen B, Nielsen S V, et al. Outbreak of infection in a burns unit due to *Pseudomonas aeruginosa* originating from contaminated tubing used for irrigation of patients [J]. J. Hosp. Infect, 1993, 24: 11-21
- [20] Richard P, Le Floch R, Chamoux C, et al. Pseudomonas aeruginosa outbreak in a burn unit: role of antimicrobials in the emergence of multiply resistant strains [J]. J. Infect Dis., 1994, 170: 377-383
- [21] Amador P P, Fernandes R M, Prudêncio M C, et al. Antibiotic resistance in waste water: occurrence and fate of *Enterobacteriaceae* producers of class A and class C β -lactamases [J]. J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng., 2015, 50(1): 26-39
- [22] Li fei. The distribution regularity and genetic diversity of food-borne pathogens in packaging drinking nature spring water [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2013
- [23] 魏磊,吴清平,张菊梅,等.矿泉水和山泉水中铜绿假单胞菌污染调查及分离菌株毒力基因与耐药性分析[J].微生物通报,2015,42(1):125-132
WEI Lei, WU Qing-ping, ZHANG Ju-mei, et al. The pollution survey of *Pseudomonas aeruginosa* in mineral water and spring water and the analyses of virulence genes and antibiotic resistance of the isolates [J]. Microbiology China, 2015, 42(1): 125-132
- [24] 徐励琴,薛计泉,罗泽燕,等.桶装饮用水铜绿假单胞菌检测及耐药性分析[J].海峡预防医学杂志,2015,21(3):56-57
XU Li-qin, XUE Ji-quan, LUO Ze-yan, et al. The contamination investigation and antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from barreled water [J]. Strait J Prev Med., 2015, 21(3): 56-57
- [25] Silva M E, Filho I C, Endo E H, et al. Characterisation of potential virulence markers in *pseudomonas aeruginosa* isolated from drinking water [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2008, 93(4): 323-34
- [26] Slekovec C, Plantin J, Cholley P, et al. Tracking down antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a waste water Network [J]. Plos One, 2012, 7(12): e49300
- [27] 胡惠娟,吴清平,张菊梅,等.食品中小肠结肠炎耶尔森氏菌污染调查和 ERIC-PCR 分型研究[J].现代食品科技,2014,

30(6):294-300

HU Hui-juan, WU Qing-ping, ZHANG Ju-mei, et al. The contamination investigation and ERIC-PCR typing of *Yesinia*

enterocolitica in foods [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(6): 294-300

现代食品科技