

呈上升趋势。因此,对男女农村居民均应进行宣传教育和采取相应的干预措施。本研究中 25 岁 ~ 农村居民发生伤害所占比例为 27.29%,提示该年龄组是农村居民伤害的高发年龄段,应给予足够重视,这可能与青壮年是从事农业生产活动的主体,接触危险因素的机会较多有关。

随着农村经济的快速发展,摩托车及其他机动车辆作为运输工具和代步工具被广泛使用,由此带来交通秩序混乱,导致农村交通事故频频发生<sup>(5-6)</sup>,与本研究中甘肃省农村居民的主要伤害类型为交通事故伤害(34.38%)的结果一致,因此相关部门应加强农村交通道路和管理,增强农村居民安全意识。本研究中居于第 2 位的伤害类型为意外跌落伤害(27.62%)。这可能与青壮年农村居民进城打工人数增多,对家中的儿童和老人疏于照顾,而儿童和老人均为意外跌落的高发人群有关<sup>(7-8)</sup>。因此,应积极开展对农村居民相关危险因素的宣传教育以及加强对农村留守儿童和老人的照顾等以减少伤害发生的危险性。

#### 参考文献

- (1) 陈培发. 我国伤害预防控制研究现状与展望[J]. 中国慢性病预防与控制, 2007, 15(3): 297-298, F0003.
- (2) 北京协和医院世界卫生组织疾病分类合作中心. 疾病和有关健康问题的国际统计分类第十次修订本(ICD-10) [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 307-321.
- (3) Kannus P, Niemi S, Palvanen M, et al. Secular trends in rates of unintentional injury deaths among adult Finns [J]. Injury, 2005, 36(11): 1273-1276.
- (4) 杨功焕, 周脉耕, 黄正京, 等. 中国人群 1991 ~ 2000 年伤害死亡的流行趋势和疾病负担[J]. 中华流行病学杂志, 2004, 25(3): 193-198.
- (5) 温惠英, 曾文创. 农村公路摩托车交通事故原因分析与对策[J]. 农村经济与科技, 2009, 20(9): 65-66.
- (6) 徐来荣. 农村居民伤害研究[J]. 海峡预防医学杂志, 2003, 9(3): 14-16.
- (7) 嵇红, 黄建萍, 杨自力, 等. 南通市居民意外伤害死亡原因分析[J]. 中国公共卫生, 2009, 25(3): 353-355.
- (8) 刘娜, 杨功焕, 马杰民, 等. 392 例意外跌落流行病学分析[J]. 中国公共卫生, 2004, 20(7): 854-855.

收稿日期: 2010-09-29

(郭薇编辑 解学魁校对)

#### 【综述】

## 沙门菌分子分型方法研究进展\*

张东方<sup>1,2</sup>, 袁飞<sup>1</sup>, 陈颖<sup>1</sup>, 葛毅强<sup>2,3</sup>, 杨海荣<sup>1</sup>, 暴书婵<sup>1</sup>, 赵勇胜<sup>1</sup>

关键词: 沙门菌; 分子分型方法; 综述

中图分类号: R 446.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)01-0117-04

沙门菌引起的食源性疾病是危害人类健康的重大隐患,被列为首选控制的食源性致病菌<sup>(1)</sup>。沙门菌属型别复杂,传统的分型方法大多是通过表型鉴定,如依据菌体表面脂多糖、鞭毛抗原分别携带的 O、H 抗原等,包括生化反应、耐药性、血清学、噬菌体分型等方法,直接体现了菌株的不同来源、不同致病性或表观特征差异,但是这些分型方法存在分型率低、重复性差、操作繁琐,以及分辨能力不强等缺点,存在较大的局限性。近年来,随着分子生物学手段的不断发展,从分子水平(核酸、蛋白质)对细菌进行分型鉴定已经成为可能,可以根据细菌在核酸、蛋白质等生物大分子结构上的差异,分析不同时期、不同地域、甚至不同流行事件中菌株间基因组的相似程度。本文对近年来常用的沙门菌分子分型技术进行比较并对这些技术的研究进展作一综述,旨在为食品中沙门菌的快速分型提供一些参考。

### 1 基于蛋白质水平的沙门菌分子分型方法

1.1 全细胞蛋白电泳 蛋白质是基因表达的产物,通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)的全细胞蛋白电泳,

可将细菌中及菌体表面各种蛋白质进行分离。早期,很多学者利用 SDS-PAGE 对不同的菌株进行聚类<sup>(2)</sup>,但是,基于全细胞进行蛋白电泳,与表观分型方法相似,均无法对菌株的亲缘关系及致病性特征进行深入分析,故近年来该方法使用较少。

### 1.2 多位点酶电泳(multilocus enzyme electrophoresis, MLEE)

MLEE 是一种早在 20 世纪 60 年代就已经建立的方法,根据细菌内部多种代谢相关酶的电泳迁移率的不同来描述细菌的变异。由于蛋白电泳的泳动度是由蛋白质的氨基酸序列(分子量和电荷)和结构所决定,而一种酶的序列结构变化与决定该酶的遗传结构位点上的等位基因直接相关,通过检测酶蛋白的电泳多态性反映基因位点的多态性,从而达到细菌分型鉴定的目的。研究表明,MLEE 分型方法具有特异性好、方法简便、分辨力高的优点<sup>(3)</sup>。随着测序技术的发展,逐步形成了基于直接测定核苷酸序列的多位点序列分型技术方法,后者在细菌品种鉴定和分型中应用越来越广泛。

### 1.3 基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)

MALDI-TOF-MS 是近几年发展起来的一种全新的用于微生物鉴定和分型技术。MALDI-TOF-MS 能分析细菌体内的多种成分,包括蛋白质、脂类、脂多糖、DNA、多肽及其它能被离子化的分子。利用该方法,针对细菌蛋白质组进行研究,对获得的特征性蛋白点进行质谱分析,作为生物标志分子特异鉴定细菌,现已越来越多地用于微生物的检测与鉴定<sup>(4)</sup>。

\* 基金项目: 国家科技支撑计划项目(2009BAD9B06); 国家质检总局项目(2009IK312; 2010IK178)

作者单位: 1. 中国检验检疫科学研究院,北京 100123; 2. 中国农业大学食品科学与营养工程学院; 3. 中国农村技术开发中心

作者简介: 张东方(1987-),女,河北人,硕士在读,主要从事食品微生物及分子生物学研究。

通讯作者: 陈颖, E-mail: yqy.chen@yahoo.com.cn; 葛毅强, E-mail: 68511009@163.com

王晔茹等<sup>[5]</sup>利用 MALDI-TOF-MS 方法对 88 株沙门菌进行检测和鉴定分型,并与血清学分型、耐药分型和脉冲场凝胶电泳技术分型结果进行比较。结果表明 MALDI-TOF-MS 在沙门菌分型中具有很好的分型能力,具有稳定、重复性好的特点,可成为食源性致病细菌分析鉴定的重要工具。中国检验检疫科学研究院已采用 MALDI-TOF-MS 方法对阪崎肠杆菌进行分型研究,通过全细胞分析,作为食源性病原菌快速溯源的一种手段,该技术用于微生物研究虽刚刚起步,但前景十分广阔。

## 2 基于核酸水平的沙门菌分子分型方法

从核酸水平对沙门菌进行分型及鉴定,能更深刻揭示细菌种内基因类型的多样性,提高相关微生物菌株的分型水平。早期常用的分子分型方法有:依据菌株携带质粒的多少及大小对细菌进行分型的质粒指纹图谱分析方法<sup>[6]</sup>,基于细菌核糖体基因(16sRNA)在进化中比较保守的原理进行分型的核糖体分型技术<sup>[7]</sup>;后来,有学者利用限制性内切酶对菌株基因组 DNA 进行酶切,结合 PCR 方法,在限制性酶切片长度多态性技术基础上,逐渐建立了扩增片段长度多态性方法。现在世界各实验室主要使用的脉冲场凝胶电泳技术也是基于该原理;随着 PCR 技术不断成熟,逐渐出现随机扩增多态性 DNA 分析技术、低频限制性切割位点 PCR 等技术,针对沙门菌,出现了以细菌基因组重复序列进行分型的 PCR 技术,最常用的是基因外重复回文序列和肠细菌基因间共有重复序列;随着测序手段的不断提高,在多位点酶电泳基础上,逐渐出现了多位点序列分型等技术<sup>[8]</sup>。各种方法各有优势,在微生物分型鉴定中得到不同程度的应用。利用以上这些技术,能够分析不同时期、地区,甚至不同流行事件中菌株间基因组的相似程度,结合流行病学分析,能够进一步解释流行病学的内在规律,鉴别传染源与追踪传播途径。

### 2.1 扩增片段长度多态性分析技术(amplified fragment length polymorphism, AFLP)

AFLP 是 1992 年由荷兰科学家 Zabeau 和 Vos Pete 发展建立的一种检测 DNA 多态性的新方法。AFLP 结合了限制性酶切片长度多态性技术和 PCR 技术特点,具有限制性酶切片长度多态性技术的可靠性和 PCR 的高效性,该方法的基本原理是:基因组 DNA 用可产生粘性末端的限制性内切酶消化,产生大小不同的酶切片段,再与含有共同粘性末端的人工接头连接,作为进一步扩增的模板,然后把扩增的酶切片段在高分辨率的顺序分析胶上电泳,产生扩增片段长度不同的多态性带型,通过带型的差异可对细菌进行分型和鉴定<sup>[9]</sup>。

Torpdahl 等<sup>[10]</sup>利用 3 种方法对 110 株肠炎沙门菌进行分子分型,认为脉冲场凝胶电泳技术、AFLP 比多位点序列分型技术方法显示了更高的分辨率,脉冲场凝胶电泳技术和 AFLP 2 种方法分型能力相当,但脉冲场凝胶电泳技术图谱更易比对和阐释,且比 AFLP 操作更省时,故脉冲场凝胶电泳技术更适于大范围监视和调查沙门菌感染疫情,AFLP 更适于沙门菌地区性疫情调查。陈智等<sup>[11]</sup>建立伤寒沙门菌 AFLP-银染体系,认为在对伤寒沙门菌的分型能力上比基因探针技术和脉冲场凝胶电泳技术更高,同时,采用银染法检测 DNA 指纹,避免通过危险又耗时的放射性同位素进行检测,既安全又节省时间,显示了 AFLP-银染体系有望在伤寒沙门菌的多态性研究和流行病学调查中发挥重要作用。

AFLP 方法具有高效性、稳定、可重复性强的特点,同时具

有很高的分辨率,能够从全基因组角度获得丰富而稳定的遗传信息。但是 AFLP 方法对模板质量要求较高,对某些不引起酶切位点改变的细小碱基序列差异敏感性不强。同时该方法已经申请专利保护,市售试剂盒价格昂贵,不利于实验室间交流共享数据,未能在暴发疫情的流行病学分析上得到广泛的应用。

### 2.2 脉冲场凝胶电泳技术(pulse-field gel electrophoresis, PFGE)

PFGE 是在琼脂糖凝胶上外加正交的变脉冲电场,其方向、时间与电流大小交替改变,通过选择合适的脉冲时间及其他条件,使各种分子量大小不同的 DNA 分子在凝胶中能得到有效分离。利用 PFGE 进行细菌鉴定及分型,先将细菌包埋于琼脂块中,再利用限制性核酸内切酶对细菌全基因组 DNA 进行酶切,酶切片段进行脉冲场凝胶电泳,最终利用聚类分析软件对电泳结果进行分析,通过比较各个菌株的限制性内切酶图谱,确定菌株的亲缘关系。

PFGE 电泳结果是条带图谱,分离到的 DNA 片段大,谱型简单,与表型鉴定结果一致性较高<sup>[12]</sup>;同一血清型之间的 PFGE 图谱也有差异,表明可以应用于细菌同一血清型内进一步的菌株分型及溯源。PFGE 是世界各实验室的细菌主要分型方法,在沙门菌多起暴发疫情及流行病学调查中已得到广泛应用<sup>[13-14]</sup>。

PFGE 方法中限制性内切酶的选用至关重要,不同的内切酶的识别位点不同,得到的电泳图谱也有差异;做一次 PFGE 基因分型技术需花费 48h 左右,比传统的表型分型方法费时,在突发疫情出现时,能对病原菌进行快速检测及溯源显得尤为重要。

### 2.3 随机引物扩增多态性 DNA 分析技术(randomly amplified polymorphic DNA analysis, RAPD)

RAPD 是由 Williams 和 Welsh 等<sup>[15-16]</sup>于 1990 年在 PCR 技术基础上建立的一种高效的 DNA 分析技术,它是以庞大的 DNA 基因组中较短序列重复出现的频率为理论依据,选择较短的随机引物,来扩增未知序列染色体 DNA,通过比较扩增产物的多态性,在克隆水平上比较 DNA 的差异。细菌经 RAPD 扩增、琼脂糖电泳后,利用聚类分析软件,对菌株的带型关系建立系统树状图,确定菌株间亲缘关系,从而对细菌进行分型鉴定。

该技术目前广泛应用于微生物的分子分型和鉴定、物种亲缘关系的确定及种群遗传学等领域的研究。高瞻等<sup>[17]</sup>认为如果将噬菌体分型结果同 RAPD 分型结果结合起来分析,能从分子水平上确定引起伤寒流行的沙门菌基因型,从而达到预报和检测疫情的目的。郭爱玲等<sup>[16]</sup>利用 RAPD 技术对不同来源的 71 株沙门菌进行聚类分析,得到的同源性结果与血清学鉴定的结果有 90% 吻合率,认为 RAPD 检测技术可用于肠炎沙门菌食源性疾病的流行病学调查和溯源。Hyungkun 等<sup>[18]</sup>针对 57 株沙门菌分别进行了 RAPD,共有重复序列,核糖体分型和单链构象多态性分型,结果表明,将 RAPD 与共有重复序列分型方法相结合,可以将 57 株沙门菌分成 57 个型,分型效率高,有望应用于沙门菌的分离菌株分型和流行病学调查。

RAPD 技术无需预知被研究的生物基因组核苷酸顺序,具有简便易行、成本低、对样品 DNA 的质和量要求不高等优点,但这也反映了该方法的随机性较强,RAPD 结果与血清学鉴定结果是否一致,与随机引物的设计和筛选密切相关,同时 RAPD 技术易受模板量、 $Mg^{2+}$  浓度和 DNA 聚合酶质量等多种

因素影响,造成了 RAPD 的可比性、可重复性较差,这给实验结果的解释造成很大困难。

2.4 细菌基因组重复序列 PCR 技术(repetitive element PCR, rep-PCR) 基因外重复回文序列和肠细菌基因间共有重复序列是 2 个典型的原核细胞基因组散在重复序列,它们在进化过程中具有较强的保守性,同时在细菌基因组中存在着菌株、种、属水平上的分布和拷贝数量的差异。用它们的互补序列作为引物,以细菌基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增反应,利用琼脂糖电泳图谱既可对各种微生物进行快速分型及鉴定,又可对它们进行 DNA 水平上的遗传多样性分析。

DiversiLab 系统是基于 rep-PCR 技术进行 DNA 指纹图谱和分析的工具,它可以跟踪自然的和人为的微生物感染、污染或流行病的传播和来源,该系统可以迅速而准确地确定亚种和菌株水平上鉴别微生物分离株。与 PFGE, MLST 等方法进行比较,该系统显示了更高的分型效率,并且可在 4h 内完成鉴定,具有高效、快速、易操作等特点。适合应用于沙门菌病暴发的流行病学调查<sup>[19-20]</sup>。Nath<sup>[21]</sup> 针对近 20 年来的 113 株沙门菌伤寒血清型菌株,研究了 rep-PCR 和 RAPD 2 种方法的分型能力。结果表明,rep-PCR 的分辨率高于 RAPD,同时 rep-PCR 的重现率可高达 100%,明显高于 RAPD 的重现率 40%,表明 rep-PCR 方法在沙门菌分型中具有广阔的应用前景。

rep-PCR 技术具有简捷、快速、结果稳定等特点,可对细菌进行分子标记,用于菌株分型、分类鉴定和亲缘关系等方面的研究。

#### 2.5 多位点序列分型技术(multilocus sequence typing, MLST)

MLST 针对微生物群体中缓慢积累的基因,选用多个看家基因位点进行序列分析,给每一基因位点分别指派等位基因数值,每个看家基因位点生成相应的等位基因谱,每种等位基因谱被认定为一个序列型,从而将属于同一属的细菌分为不同的序列型<sup>[22-23]</sup>。MLST 技术现已逐渐应用于细菌的遗传进化和种群相关性研究。李燕俊等<sup>[24]</sup> 采用 MLST 方法对 19 株肠炎沙门菌进行了分型,认为 MLST 技术揭示了在沙门菌同一血清型内各菌株看家基因碱基序列的高度保守,揭示出 MLST 技术替代、补充血清型分型的前景。张代涛等<sup>[25]</sup> 对 201 株沙门菌分离株进行 MLST 分型,同时对所有菌株进行血清型鉴定和 PFGE 实验,MLST 分析将 45 个血清型沙门菌分离株分为 46 个序列型,表明 MLST 分型结果与血清型分型结果有明显的对应关系,二者联合应用可以作为 PFGE 实验结果的有效补充。本实验室正在进行 90 余株沙门菌的 MLST 分型研究,旨在对全国各地具有代表性的沙门菌分离株进行鉴定及分型,建立中国沙门菌 MLST 分型数据库。

越来越多的证据表明,细菌常通过横向基因转移而获得外源 DNA,有些致病基因会从一个基因型转移至另一个基因型,这对使用看家基因进行细菌 MLST 分型带来困难。

Tankouo-Sandjong<sup>[26]</sup> 选择沙门菌的 2 个看家基因 gyrB, atpD 及 2 个鞭毛抗原决定基因 fliC, fljB 进行了多位点序列分型,结果显示同时使用这 4 个基因可以鉴别肠炎沙门菌及非肠炎沙门菌,有较高的分辨率,进一步提高了沙门菌疫情调查的准确度。

MLST 基于核酸序列测定技术,通过测定基因序列的变化反映菌株之间的进化关系,每种细菌的等位基因信息可通过互联网使其全球标准化,具有快速、实验结果可比性高和分

辨水平高等优点。该方法的缺点是依赖基因测序,在现有的实验技术和实验条件下,测序成本较高,使得这项技术现只局限在大型的全球性流行病学研究中心使用,影响其推广普及。

2.6 变性高效液相色谱技术(denaturing high-performance liquid chromatography, DHPLC) DHPLC 是在高效液相色谱法的基础上发展起来的一种 DNA 分离方法。用标准菌株作为 DHPLC 分析的参考模板,将其 PCR 扩增产物与待测样本 PCR 扩增产物相混合,在部分变性温度下,样品中形成同源和异源的双链,由于两种链的洗脱时间不同,会形成不同的色谱峰,通过比对色谱峰进行病原菌的检测和溯源。

Xu 等<sup>[27]</sup> 第一次利用 DHPLC 检测技术建立了产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶细菌基因的快速基因分型方法,基因分型结果与 DNA 测序进行比较,认为利用 DHPLC 技术检测产 CTX-M 型超广谱  $\beta$ -内酰胺酶细菌具有精确、快速、经济等优点,对流行病学研究及预防具有重大意义。王传得等<sup>[28]</sup> 建立了多种致病性弧菌和霍乱弧菌 MPCR-DHPLC 检测与分型方法,分型结果与用传统血清学鉴定的结果完全一致,并且具有快速、高通量等优点,认为 MPCR-DHPLC 在致病性弧菌的检测与霍乱弧菌分型上具有很好的应用价值,并有望在沙门菌属内进行溯源与分型。

DHPLC 是新近发展起来一种简单、快速、非凝胶的核酸分析方法,灵敏度和特异性非常高,产物分子量 1% 大小的片段即能够被分离检出。但是,该技术不足之处在于只能对 DNA 片段大小及序列有无差异进行分析,而不能直观观察其序列差异情况。另外,由于 DHPLC 技术依赖于计算机程序控制,其操作系统非常精密,对试剂和环境要求较高,其检测效率的进一步提高则有待于新的计算机软件的开发。

### 3 结 语

沙门菌分型的目的是为了更好地了解其生理生化特性,了解它们之间的亲缘关系,为沙门菌流行病的控制和溯源提供理论根据。基于核酸的分型手段,从根本上阐释了细菌菌株内部基因的不同;蛋白质是基因表达的产物,可以间接反映出不同菌株的基因组结构差异。总之,分子分型方法比表现分型方法占有一定优势,且不同的分子分型方法适用于不同实验条件。

PFGE 方法是现今细菌分子分型的“金标准”<sup>[29]</sup>,目前在一些发达国家,已建立了基于 PFGE 技术的细菌分子分型国家电子网络,以便进行食物中毒的快速反应和预警;MALDI-TOF-MS 和 PFGE 分型分别代表了同一菌株基于蛋白质和 DNA 分型的 2 个方面,二者结合使用可扩大基因型对亚种水平的分型能力。AFLP、PFGE 和 RAPD 等全基因分型方法,是针对微生物群体基因序列中高度变异的位点或区域进行的分型,分辨率较高,分型结果与血清型分型结果有较高的吻合率,适合地区性疫情暴发研究,但是由于与流行病学相关菌株基因突变现象频繁,不同的技术会造成分型结果不一致;同时,分型鉴定结果受限制性内切酶和随机引物的选择影响较大;rep-PCR 基于细菌基因组重复序列进行 PCR 扩增,并出现了自动化程度较高的仪器,但上述分子分型方法大多依赖电泳图谱进行群体分析,存在电泳图谱重复性差,无法在全世界各个实验室进行重复比对的缺点。

MLST 可针对沙门菌 16SrDNA, dnaN, hemD, purE, aruC 等多个基因设计引物、扩增、测序、聚类分析,还可针对细菌内部广泛存在的毒力基因进行分型,这对病原菌准确溯源具有重

要意义。随着测序成本逐渐降低,更有利于 MLST 方法在全世界推广使用,如与血清学分型、PFGE、噬菌体分型等其他分型方法联合应用,可为沙门菌溯源提供更有力的依据。DHPLC 技术通过扩增细菌内部代表性序列,在一定条件下进行 DH-PLC 检测,通过对比样品与参照菌株的色谱峰图达到分型溯源的目的,具有快速、高通量及高敏感度等特点,是沙门菌鉴定和分型的发展趋势。

随着对沙门菌感染研究的日益深入,传统的表型分型技术已不能满足疾病诊断和流行病学调查的需要,因此,需要从分子水平上对沙门菌进行基因分型,并且要求分型方法不断标准化和规范化,最终形成一套兼顾操作简便、低成本、高分辨力、高灵敏度、高重复性的分型方法。随着分子生物学等各种新技术的不断发展,沙门菌的分子分型技术将不断得到改进更新,从而为食品安全控制带来更多便利。

#### 参考文献

- (1) 张钧. 食品安全与微生物控制综述[J]. 安徽预防医学杂志, 2006, 12(6): 408-410.
- (2) Lailler R, Grimont F, Jones Y, et al. Subtyping of *Salmonella Typhimurium* by pulsed-field gel electrophoresis and comparisons with phage types and resistance types[J]. Pathologie Biologie, 2002, 50(6): 361-368.
- (3) 宋春花, 段广才, 郝园林, 等. 志贺菌多位点酶电泳分析[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2003, 38(6): 886-890.
- (4) Brighi JJ, Clayton MA, Soufian M, et al. Rapid typing of bacteria using matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry and pattern recognition software[J]. Journal of Microbiological Methods, 2002, 48(2-3): 127-138.
- (5) 王晔茹, 崔生辉, 李凤琴. 基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱在沙门菌检测和鉴定分型中的应用研究[J]. 卫生研究, 2008, 37(6): 685-689.
- (6) 白松涛, 林琳, 刘渠, 等. 食品中多重耐药大肠埃希氏菌和沙门菌质粒图谱分析[J]. 现代预防医学, 2005, 32(9): 1035-1037.
- (7) 刘秀梅, 周正, 郭云昌. 食源性沙门菌分离株自动化核糖体分型的研究[J]. 中国食品学报, 2006, 6(2): 1-5.
- (8) 张代涛, 阙帆. 沙门菌属分子分型技术研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2009, 25(5): 465-468.
- (9) 周廷清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 174-182.
- (10) Torpdahl M, Skov MN, Sandvang D, et al. Genotypic characterization of *Salmonella* by multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism[J]. Journal of Microbiological Methods, 2005, 63(2): 173-184.
- (11) 陈智, 叶临湘. 伤寒沙门菌扩增片断长度多态性-银染体系的建立[J]. 公共卫生与预防医学, 2007, 18(1): 9-15.
- (12) 孙贵娟, 黄彦, 黄纯健, 等. 脉冲场电泳技术在一起鼠伤寒沙门菌食物中毒病原溯源中的应用[J]. 应用预防医学, 2009, 15(5): 259-261.
- (13) Bergmire-Sweat D, Schlegel J, Marin C, et al. Multistate outbreak of human *Salmonella* infections associated with exposure to turtles - United States, 2007-2008[J]. Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR), 2008, 57(3): 69-72.
- (14) Long SG, DuPont HL, Gaul L, et al. Pulsed-field gel electrophoresis

- for *Salmonella* infection surveillance, Texas, USA, 2007 [J/OL]. Emerging Infectious Diseases, 2010, 16(6): 983-985.
- (15) Li JJ, Pei GL, Pang HX, et al. A new method for RAPD primers selection based on primer bias in nucleotide sequence data[J]. Journal of Biotechnology, 2006, 126: 415-423.
- (16) 郭爱玲, 谢跻, 栗婉媛, 等. 随机扩增多态性 DNA 技术在沙门氏菌同源性分析中的应用[J]. 食品科学, 2008, 29(4): 355-357.
- (17) 高瞻, 俞晓进, 刘光中, 等. 江苏省常见噬菌体型伤寒沙门菌的分子流行病学研究[J]. 中国公共卫生, 2000, 16(5): 465-467.
- (18) Lim H, Lee KH, Hong CH. Comparison of four molecular typing methods for the differentiation of *Salmonella* spp [J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 105(3): 411-418.
- (19) Kilic A, Bedir O, Kocak N. Analysis of an outbreak of *Salmonella* enteritidis by repetitive-sequence-based PCR and pulsed-field gel electrophoresis[J]. Internal Medicine, 2010, 149(1): 31-36.
- (20) Darif EB, Pinna ED, Threlfall EJ. Comparison of a semi-automated rep-PCR system and multilocus sequence typing for differentiation of *Salmonella enterica* isolates [J]. Journal of Microbiological Methods, 2010, 81(1): 11-16.
- (21) Nath G, Maurya P, Gulati AK. ERIC PCR and RAPD based fingerprinting of *Salmonella Typhi* strains isolated over a period of two decades [J]. Infection, Genetics and Evolution, 2010, 10(4): 530-536.
- (22) Enright MC, Day NP, Davies CE, et al. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus* [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2000, 38(3): 1008-1015.
- (23) Cooke FJ, Brown DJ, Fookes M, et al. Characterization of the genomes of a diverse collection of *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* definitive phage type [J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(24): 8155-8162.
- (24) 李燕俊, 计融, 王玉平, 等. 肠炎沙门菌多位点序列分型技术的研究[J]. 卫生研究, 2008, 37(1): 46-49.
- (25) 张代涛. 沙门菌属分离株 MLST 分析及甲型副伤寒沙门菌 MLVA 实验方法的建立与评价[D]. 中国疾病预防控制中心, 北京, 2009.
- (26) Tankou-Sandjong B, Sessitsch A. MLST-v, multilocus sequence typing based on virulence genes for molecular typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars [J]. Journal of Microbiological Methods, 2007(69): 23-26.
- (27) Xu L, Evans J, Ling T, et al. Rapid genotyping of CTX-M extended-spectrum  $\beta$  lactamases by denaturing high-performance liquid chromatography [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2007(4): 1446-1454.
- (28) 王传得, 邵良平, 邵碧英. 致病性弧菌 MPCR-DHPLC 检测和分型方法的建立[D]. 福建: 福建农林大学, 2009.
- (29) Melles DC, van Leeuwen WB, Snijders SV, et al. Comparison of multilocus sequence typing (MLST), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and amplified fragment length polymorphism (AFLP) for genetic typing of *Staphylococcus aureus* [J]. Journal of Microbiological Methods, 2007(69): 371-375.

收稿日期: 2010-07-09

(孔繁学编辑 解学魁校对)