

沙门氏菌分型研究进展

陈玲^{1,2} 张菊梅^{1*} 杨小鹏¹ 吴清平¹

(1. 广东省微生物研究所 省部共建华南应用微生物国家重点实验室 广东省菌种保藏与应用重点实验室

广东省微生物应用新技术公共实验室 广东 广州 510070)

(2. 中国检验认证集团澳门有限公司 广东 珠海 519000)

摘要: 沙门氏菌是重要的致病菌之一, 该菌属型别繁多。沙门氏菌的分型方法可分为以表型特征为依据的表型分型方法和以基因特征为依据的分子分型方法。沙门氏菌的表型分型主要有血清分型和噬菌体分型。分子分型主要有分子血清分型、脉冲场凝胶电泳(Pulsed field gel electrophoresis, PFGE)、多位点序列分析(Multi-locus sequence typing, MLST)、多位点可变重复序列分析(Multi-locus variable numbers tandem repeat analysis, MLVA)以及成簇的规律间隔的短回文重复序列分析(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)等。与表型分型相比, 分子分型技术具有快速、准确、重复性好等特点, 现已得到广泛应用。其中, 分子血清分型是鉴定沙门氏菌血清型的新方法, PFGE被认为是病原微生物分子分型的“金标准”, MLST和MLVA以其分辨率高、可重复性好和可比性强等优势满足了全球流行病学发展的要求, 能实现序列数据交换和共享, 成为新一代的分子分型新工具, 而近年发现的CRISPR分型对同源性较高的同种血清型具有较高的分型能力。但每种分型方法也有各自的优缺点和使用条件及适用范围, 因此可以根据菌株特性、分型目的和实验室拥有的条件选择最合适的分型方法。

关键词: 沙门氏菌, 血清分型, PFGE, MLST, MLVA, CRISPR

Advances in *Salmonella* subtyping—a reviewCHEN Ling^{1,2} ZHANG Ju-Mei^{1*} YANG Xiao-Juan¹ WU Qing-Ping¹

(1. Guangdong Institute of Microbiology, State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangzhou, Guangdong 510070, China)

(2. China Certification & Inspection (Group) Macau Company Limited, Zhuhai, Guangdong 519000, China)

Abstract: *Salmonella* is an important foodborne pathogenic bacterium, with more than 2 500 serotypes. A number of techniques have been developed for *Salmonella* subtyping, including phenotypic and genotypic techniques. Traditionally, *Salmonella* isolates are identified and typed by phenotypic techniques such as serotyping and phage typing. During the last two decades, genotypic techniques

Foundation item: Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (No. 2013B050800026, 2014A040401055)

***Corresponding author:** Tel: 86-20-37656160; Fax: 86-20-87680942; E-mail: zhangjm926@126.com

Received: June 08, 2015; **Accepted:** September 06, 2015; **Published online** (www.cnki.net): September 28, 2015

基金项目: 广东省科技计划项目(No. 2013B050800026, 2014A040401055)

***通讯作者:** Tel: 86-20-37656160; Fax: 86-20-87680942; E-mail: zhangjm926@126.com

收稿日期: 2015-06-08; **接受日期:** 2015-09-06; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2015-09-28

have been used for differentiation of *Salmonella* isolates and source tracing of foodborne outbreaks. These methods include molecular serotyping, pulsed field gel electrophoresis (PFGE), multi-locus sequence typing (MLST), multi-locus variable number of tandem repeats analysis (MLVA), and clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR). Compared with phenotypic methods, genotypic methods are widely applied for *Salmonella* typing due to their high discriminatory power and good reproducibility. Molecular serotyping, as a new method, is to identify serotypes of *Salmonella* by PCR. PFGE is considered the “gold standard” for *Salmonella* subtyping. MLST and MLVA, as DNA sequencing-based methods, are publicly available online and can be compared readily between laboratories. CRISPR typing has a high distinguish capacity among the same serotype with homology and satisfying genotyping result. However, each typing method has different advantages and drawbacks, operating conditions, and applicability. Therefore, it is necessary to choose the suitable typing methods for genetic diversity analysis according to the characteristic of strains and experimental facilities available.

Keywords: *Salmonella*, Serotype, PFGE, MLST, MLVA, CRISPR

沙门氏菌(*Salmonella* spp.)是一种常见的人畜共患病原菌,对人类和动物都有极大的危害。食物传播是人类感染沙门氏菌的主要途径^[1],肉类(尤其是禽肉)、海产品、蛋类等许多食品都与沙门氏菌病有关。不同血清型沙门氏菌的侵袭力与致病力显著不同,其所引起的疾病都是和宿主相互对应的^[2]。因此,对菌属型别繁多的沙门氏菌进行快速、灵敏的诊断分型具有重大意义。

目前,沙门氏菌的分型方法可分为表型分型和分子分型两类。表型分型方法主要包括血清分型和噬菌体分型。近年来,分子分型技术发展迅速,它将分子生物学技术用于流行病学调查,发展出了分子血清分型、脉冲场凝胶电泳(Pulsed field gel electrophoresis, PFGE)、多位点序列分析(Multi-locus sequence typing, MLST)、多位点可变重复序列分析(Multi-locus variable numbers tandem repeat analysis, MLVA)以及成簇的规律间隔的短回文重复序列(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)等方法。特别是近二十年来,沙门氏菌分子分型技术不断完善,具有高通量、高灵敏度、可重复性好、便于推广应用等特点,对于流行病学调查和溯源具有重要意义。

本文就沙门氏菌的分型方法进行综述,重点阐述各方法的原理、优缺点、发展和应用前景,并结合本实验室的相关研究工作提出相应见解。

1 表型分型

1.1 血清分型

自1934年第一次发表Kauffmann-White抗原表,血清分型就成为沙门氏菌分型最主要的分型形式^[3]。最新的Kauffman-White抗原表(2007年版)显示沙门氏菌血清型已达2 500多个,而国内报道的仅有300多个。

沙门氏菌的血清分型是基于其菌体细胞表面的鞭毛、荚膜或粘液层、纯化的蛋白质等与特异抗血清产生不同的凝集反应而区分^[4]。沙门氏菌的抗原主要有三种类型:菌体(O)抗原、鞭毛(H)抗原以及荚膜(Vi)抗原。O抗原主要由沙门氏菌细胞壁的脂多糖(Lipopolysaccharides, LPS)构成,具有较高的稳定性,耐高温。H抗原则主要由沙门氏菌的鞭毛蛋白构成,稳定性差,不耐高温。大多数沙门氏菌会表达两种H抗原,分别称为第1相(H1)和第2相(H2)。少数菌株仅表达一种鞭毛抗原,即为单相菌^[5];极个别菌株表达三四种鞭毛抗原^[3]。

血清玻片凝集试验作为早期沙门氏菌分型方法,直观可靠。本实验室近几年来在全国范围内开展食品中沙门氏菌污染调查^[6-7],分离大量沙门氏菌菌株,采用玻片凝集法对菌株进行血清分型,发现血清玻片凝集法存在不足之处:(1)鉴定时间长:确定一株沙门氏菌的血清型需要1-2 d甚至更长的

时间。特别是对不常见的血清型,往往需要试验全部的血清试剂。(2) 菌株本身:某些菌株发生变异,由光滑型变为粗糙型,产生自凝现象,无法分型。(3) 存在交叉凝集等错误结果。(4) 诊断血清方面:国内实验室大多使用成都生物制品研究所或兰州生物制品研究所生产的成套化血清进行沙门氏菌的分型,但其鉴定结果并不能让人满意。许学斌等^[8]将2006和2007年全球沙门菌监测(GSS)项目病例分离的沙门氏菌以泰国产血清的分型结果作为参照,分别与上述两家所生产血清进行分型比对试验,结果表明泰国产血清在使用性能、分群及分型能力和准确性方面优于国产血清。因此,建议使用国产血清搭配部分进口产血清的组合,来达到低成本和高效率的沙门氏菌分型效果。(5) 实验人员操作经验:对有些沙门氏菌抗原与血清的凝集反应较为迟缓、反应程度较弱等情况,就需要经验丰富的实验人员进行鉴定,否则易造成错误的分型结果。

1.2 噬菌体分型

噬菌体(Bacteriophage/Phage)是一类感染细菌的病毒,主要由核酸和蛋白质外壳组成,它可以通过蛋白质外壳与宿主菌表面的受体特异性结合,将其遗传物质DNA或RNA注入宿主菌体内。噬菌体对宿主细菌的感染和裂解作用常具有高度的特异性,即一种噬菌体往往只能感染和裂解某一类型细菌^[9]。沙门氏菌的噬菌体分型方法就是依据噬菌体与特定的沙门氏菌宿主之间的这种高度专一性,利用烈性噬菌体快速裂解沙门氏菌而形成直观清晰的噬菌斑原理来进行的,能够将同一血清型的沙门氏菌划分出不同的噬菌体型^[10]。噬菌体分型能与其他分型技术联合,全面反映致病菌的信息,如Bhatta等^[11]采用多种分型方法联合使用能更为精确划分同一血清型的沙门氏菌不同的噬菌体型。

噬菌体分型方法可为流行病学追踪传染源、切断传播途径、控制疫情、探讨流行规律提供科学依据,国内外已制定了噬菌体分型的标准步骤,现已建立了沙门氏菌较为完整的噬菌体分型体系^[10]。噬

菌体分型简单、价格相对较低、省时,是一种实用而有效的分型技术;但也有其不足之处,如分辨率有限、重复性较差;人为因素影响大,而且需要大量标准化的噬菌体等。

2 分子分型

2.1 分子血清分型

聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)技术被广泛应用于各类致病微生物的检测,分子生物技术的发展为微生物诊断提供了很多新的检测方法,同时也为分子分型提供支持。随着沙门氏菌基因组测序工作的完成,人类对沙门氏菌的认识越来越深入。通过生物信息学技术,采用比较基因组方法,发掘沙门氏菌的血清型特异PCR靶点,从而建立起多重PCR检测体系用于鉴定菌株的血清型。

PCR方法分型弥补了传统血清鉴定方法的不足,加快了沙门氏菌诊断的进程。目前沙门氏菌血清组PCR分型的靶点是以*rfb*基因(编码O抗原)为主,*wzx*和*wzy*基因(编码O抗原转运酶和聚合酶)也被作为检测靶点。Cardona-Castro等^[12]建立了两组多重PCR(Multiplex polymerase chain reactions, M-PCR)体系。第1组是以*rfbJ*和*wzx*基因作为检测靶点,第2组采用*fliC*、*fljB*、*wcdB*基因和*sdf-I*序列等作为检测靶点,PCR检测结果与标准的血清鉴定结果对比发现符合率达到了96.5%。刘斌^[13]发掘了沙门氏菌血清组A-D和8种常见血清型(伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、丙型副伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、婴儿沙门氏菌、肠炎沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌和鸡沙门氏菌)的特异PCR检测靶点,建立了相应的M-PCR检测体系。在传统血清鉴定方法不能鉴定和区分的一些血清型方面,分子血清分型发挥着重要作用。20世纪90年代初以来,新现血清型沙门氏菌1,4,5,12:i:-与鼠伤寒沙门氏菌具有相似的抗原式,两者不能通过传统血清鉴定方法区分。Tennant等^[14]建立了以*fljB*和IS200片段为靶基因的M-PCR体系来鉴定和区分沙

门氏菌 1,4,[5],12:i:-与鼠伤寒沙门氏菌菌株。本实验室参考该方法^[15], 结合传统血清分型, 较好地分离和鉴定了 58 株鼠伤寒沙门氏菌菌株和 13 株沙门氏菌 1,4,[5],12:i:-菌株, 并将两种血清型菌株进行了菌株遗传多样性分析比较。

越来越多的研究者在寻找新的靶点, 从而简化沙门氏菌血清型菌株的检测, 增强 PCR 检测的特异性和灵敏度, 不过这些新靶点的寻找还缺乏快捷而确定的发掘方法。不可否认, 以 M-PCR 为基础的分子血清分型方法不仅缩短血清型鉴定的时间, 还能与其他分子分型方法结合, 更有效地追踪沙门氏菌的传播。

2.2 脉冲场凝胶电泳

PFGE 技术是 20 世纪 80 年代发展起来的, 通过限制性内切酶消化菌株 DNA, 经 PFGE 分离, 比较染色体限制性内切酶图谱, 确定菌株的亲缘关系, 从而进行细菌分型鉴定^[16]。沙门氏菌的 PFGE 分型方法中多采用 *Xba* I (识别位点为 5'-T↓CTAGA-3')、*Spe* I (识别位点为 5'-A↓CTAGT-3') 等限制性内切酶。Rivoal 等^[17]采用 *Xba* I 和 *Spe* I 对鸡蛋中分离到的肠炎沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌和婴儿沙门氏菌进行消化后, 产生相应的 PFGE 型别, 其中肠炎沙门氏菌的 PFGE 型别, 以 *Xba* I 的区分能力较强。Wang 等^[18]通过 PFGE 将 123 株肠炎沙门氏菌(其中有 7 株未分型)分为 4 个簇, 44 个基因型。PFGE 技术因其易标准化、可重复性强、分辨率高、结果稳定, 广泛应用于细菌分子分型、种群特异性鉴定及遗传分析等方面。

1996 年, 美国疾病控制和预防中心(Centers for Disease Control and Prevention, CDC)建立了标准化的脉冲场凝胶电泳方法, 成立了由 CDC 和一些实验室参与的监测食源性微生物的分子分型网络, 称之为“脉冲网”(PulseNet, <http://www.cdc.gov/pulsenet>)。通过该网络, 可以快速将可疑食品样本的细菌 PFGE 实验结果与全国各地的结果进行比较, 确定各地致病菌的亲缘关系, 追溯污染食品的源头所

在, 对疫情分析具有实际的应用价值^[19]。沙门氏菌 PFGE 分型方法主要参照美国 PulseNet 分子分型标准方法, 在沙门氏菌的监测和疾病的预防控制中发挥着重要作用; 但其步骤比较繁琐、耗时、费用高, PFGE 技术在电泳图谱比较、识别及不同研究之间互相对比时仍存在一定的局限性, 且 PFGE 难以区分长期进化过程中源于同一克隆的不同菌株之间微小的 DNA 位点变异。

2.3 多位点序列分型

MLST 是 Maiden 等^[20]在 1998 年基于多位点酶切电泳技术(Multi-locus enzymatic electrophoresis, MLEE)发展而来的一种高分辨率分型技术, 最早应用于脑膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitidis*)。MLST 方法主要是选择沙门氏菌基因组上 7 个相对保守的看家基因(Housekeeping gene), 分别是 *aroC*、*dnaN*、*hemD*、*hisD*、*purE*、*sucA* 和 *thrA*, 利用 DNA 测序技术获取看家基因的等位基因, 通过基因碱基突变来揭示致病菌或耐药性改变时基因谱的改变^[21]。Liu 等^[22]对 121 株沙门氏菌的 7 个看家基因进行 PCR 扩增, 共产生 42 个序列型, 与血清分型分离出的 36 种不同沙门氏菌相比, 其分辨率更高。刘慧玲等^[23]采用 PFGE 和 MLST 两种方法对进出口食品中分离的两种血清型(鼠伤寒沙门氏菌和肠炎沙门氏菌)共 30 株沙门氏菌分型表明, MLST 更适合于不同沙门氏菌血清型间的分型, 在替代、补充血清型分型方面具有优势。Singh 等^[24]采用针对性的发夹选择器作为 DNA 模板, 包含目标区域两侧通用的启动序列, 选取 14 个靶基因(包括 *aroC*、*dnaN*、*hisD*、*purE*、*sucA*、*thrA*、*flimA*、*mdn*、*pgmB*、*atpD*、*glnA*、*aceK*、*glpF* 和 *icdA*)进行 PCR 扩增, 并与新一代测序技术(New generation sequencing, NGS)结合, 将 38 株沙门氏菌[Heidelberg (*n*=23), Montevideo (3), Senftenberg (2), Typhimurium (2), Enteritidis (2), Gaminara (2), Anatum (1), Worthington (1), Muenster (1)和未分型(1)]进行 MLST 分型, 可分为 37 个序列型。利用 MLST 分析我们实验室分离鉴定的鼠伤寒

沙门氏菌菌株,发现鼠伤寒沙门氏菌主要是 ST19、ST34、ST36、ST1544 序列型^[15],另外发现了 ST1922 新的序列型。通过 MLST 分型可以分析菌株间的亲缘关系,找出菌株共同的母系来源,还可以追踪较长时间内致病菌的遗传谱来源,为沙门氏菌等食源性致病菌的溯源提供可靠依据^[25]。经典的沙门氏菌 MLST 能建立血清型间的区分,但不能很好区分血清型内菌株差异,尤其表现在伤寒沙门氏菌和肠炎沙门氏菌。之后又有一些学者加入毒力相关基因进行 MLST 分型,能较好地提高血清型内的差异^[26]。MLST 鉴定变异是通过对等位基因片段核苷酸序列测定,所得数据容易保存和共享。特别是近年来,该技术应用范围不断扩大,似乎将不可避免地占据大多数细菌分型方法的主导地位。

MLST 技术的优势在于获得结果可在不同实验室间进行数据参比,通过互联网数据系统进行共享。目前,包括沙门氏菌在内的许多病原菌的 MLST 数据库都已经建立,其中最主要的两个是爱尔兰库克大学(<http://mlst.ucc.ie>)和牛津大学(<http://www.pubmlst.org>)的 MLST 数据库。MLST 技术的出现,为沙门氏菌分型提供更高的分辨力,能够了解流行病学上不相关菌株的进化关系,使不同实验室间的结果具有可重复性和可比性,实现数据交换和共享^[27-28];不足之处在于 MLST 技术主要针对供试菌看家基因的突变点进行研究,看家基因的高度保守性也导致 MLST 在某些病原菌分型应用中有一定的局限^[29]。但应用于 MLST 技术费用高,需特定仪器,使该技术局限于大型的流行病学研究和局部的食物中毒病暴发的溯源,一般实验室较少用。

2.4 多位点可变重复序列分析

MLVA 是以 PCR 为基础,根据待检测菌株在基因组中不同独立位点的可变串联重复序列(Variable number tandem repeats, VNTRs)重复次数的差异来进行基因分型。MLVA 具有快速简便、分辨率高、重复性好等优点。在区分不同的散发个体来源菌株上具有比 PFGE 和噬菌体分型更高的鉴别能力,刘

雯静^[30]将 124 株沙门氏菌株进行 MLST、PFGE 和 MLVA 分型,共分为 33 个 MLST 型、62 个 PFGE 型、78 个 VNTR 型,可见应用 MLVA 方法来鉴别散发菌株的基因相似度和差异时分辨率最高。另外,MLVA 可对同一个噬菌体型的沙门氏菌进行分型,在沙门氏菌的流行病学监测和暴发调查中发挥了重要作用。Malorny 等^[31]对 240 株肠炎沙门氏菌分别进行基于 9 个 VNTRs 位点的 MLVA 分型和噬菌体分型,MLVA 对 PT 4 和 PT 8 的噬菌体型别菌株分别进行分型,将 62 株 PT4 型菌株分为 24 个 MLVA 型,81 株 PT8 型菌株分为 21 个 MLVA 型。Tien 等^[32]对伤寒沙门氏菌进行基于 11 个 VNTRs 位点的 MLVA 分型以及基于 *Xba* I 和 *Bln* I 酶切的 PFGE 分型结果比较发现,MLVA 分型方法分辨率更高,更好地诠释了同一种沙门氏菌间基因关系。虽然 MLVA 能够区分 PFGE 带型相同的克隆株,但对于多重耐药的 DT104 菌株,MLVA 分型也存在不足。除此以外,该方法需使用毛细管电泳仪,很难精确测定出片段大小。

2.5 成簇的规律间隔的短回文重复序列

CRISPR 是一类结构特殊、长度为 21–47 bp 的同向重复序列(Direct repeats, DRs)家族,广泛存在大多数细菌(包括沙门氏菌),Jansen 等^[33]将其命名为 CRISPR。它是由不连续的重复序列和大小相近的间区序列(Spacers)间隔排列而成,紧邻前导序列(Leader)和 CRISPR 相关蛋白基因(*cas*)大多数 CRISPR 位点的 DRs 具有高度的保守性,而 Spaces 则具有极高的多态性^[34],于是 CRISPR 位点成为研究包括沙门氏菌在内的细菌种内分型和微进化的分子靶标,进而了解菌株间的遗传相关性及其流行病学的意义。有研究报道所有血清型沙门氏菌中均含有两个 CRISPR 位点(Locus): CRISPR 1 和 CRISPR 2。Fabre 等^[35]对 130 种血清型的 783 株沙门氏菌研究发现,CRISPR 序列在沙门氏菌中具有高度多态性,还建立了鼠伤寒沙门氏菌、1,4,[5],12:i-菌株及肠炎沙门氏菌 CRISPR 位点分型

方法。Liu 等^[36]研究发现以毒力基因(*fimH* 和 *sseL*)和 CRISPR 基因为基础的序列分型(CRISPR-MVLST)对肠炎沙门氏菌菌株的鉴别和区分能力高于 PFGE; Shariat 等^[37]采用此法将 141 株肠炎沙门氏菌分离株(属 13 种 PFGE 型别)分为 22 种序列型(Enteritidis sequence types, ESTs), EST 4 和 EST 8 较为常见,其中还发现 6 个新的 CRISPR 等位基因。由于 CRISPR 位点在沙门氏菌中具有高度多态性,通过比较菌株间的 Spacers 差异,能够区分高度同源的血清型。特别是对于引起人感染食源性疾病的两种主要血清型:鼠伤寒沙门氏菌和肠炎沙门氏菌,相同血清型沙门氏菌菌株间的 CRISPR 基因存在显著的序列差异性,可以很好地应用于亚型分型。

目前,CRISPRs 分型技术在沙门菌分型理论和技术方面正在不断地完善,专门的 CRISPRs 网络数据库(<http://crispr.u-psud.fr/crispr/>)已经建立完成,可在该数据库检索已完成全基因组测序的原核生物的 CRISPR 位点信息,并可利用 CRISPRionary、BLAST CRISPRs、Flank Align 等工具进行在线分析。可以用于不同实验室之间数据的交换,在数据分析、输出、标准化、解释和数据交换方面要优于现行的分型方法,应用将越来越广泛。

3 结语

沙门氏菌是常见的致病菌之一,在发生沙门氏菌食品安全重大事件时,选择合适的分型方法对分离菌株的鉴定分析意义重大,同时也为追踪传染源、控制疫情和研究菌株的进化关系奠定了基础。传统分型方法有其存在的价值和意义,暂时无法被替代;分子分型方法发展迅速,能够揭示沙门氏菌的流行病学相关性和传播特点。其中 PFGE 是基于电泳图谱分析的分型方法,操作复杂、重复性差,不利于实验数据的交流。随着核酸测序技术的快速发展,测序速度提高、成本降低,且基于 Web 的数据库和分析工具的改进,MLST、MLVA 和 CRISPR 方法日趋完善,广泛用于病原生物分子分型。特别

是通过各种不同分型方法的有效组合,能够达到更为理想的分型效果。总之,每种分型技术都有其优点和缺点,应根据菌株特性、分型目的和实验室拥有的条件选择最合适的分型方法进行相关研究。

参考文献

- [1] Chen L, Zhang JM, Yang XJ, et al. Prevalence and characterization of *Salmonella* spp. from foods in South China[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2013, 53(12): 1326-1333 (in Chinese)
陈玲, 张菊梅, 杨小鹏, 等. 南方食品中沙门氏菌污染调查及分型[J]. 微生物学报, 2013, 53(12): 1326-1333
- [2] Bäumler AJ, Tsolis RM, Ficht TA, et al. Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*[J]. Infection and Immunity, 1998, 66(10): 4579-4587
- [3] Edwards PR, Kauffmann F. A simplification of the Kauffmann-White schema[J]. American Journal of Clinical Pathology, 1952, 22(7): 692-697
- [4] Soler-García ÁA, de Jesús AJ, Taylor K, et al. Differentiation of *Salmonella* strains from the SARA, SARB and SARC reference collections by using three genes PCR-RFLP and the 2100 Agilent Bioanalyzer[J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 417
- [5] Yang XJ, Wu QP, Zhang JM, et al. Phenotypic and molecular characteristics of *Salmonella enterica* serotype 1,4,[5],12:i:-a review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2014, 54(11): 1248-1255 (in Chinese)
杨小鹏, 吴清平, 张菊梅, 等. 沙门氏菌 1,4,[5],12:i:-耐药性和遗传特征研究进展[J]. 微生物学报, 2014, 54(11): 1248-1255
- [6] Yang XJ, Wu QP, Zhang JM, et al. Prevalence, enumeration, and characterization of *Salmonella* isolated from aquatic food products from retail markets in China[J]. Food Control, 2015, 57: 308-313
- [7] Yang XJ, Huang JH, Wu QP, et al. Prevalence, antimicrobial resistance and genetic diversity of *Salmonella* isolated from retail ready-to-eat foods in China[J]. Food Control, 2016, 60: 50-56
- [8] Xu XB, Ran L, Zhu C. A comparative study of the serotyping of *Salmonella* (Shanghai, 1999-2007)[J]. Laboratory Medicine, 2010, 25(1): 21-25 (in Chinese)
许学斌, 冉陆, 朱超. 沙门氏菌分型血清对比研究(上海市, 1999至2007年)[J]. 检验医学, 2010, 25(1): 21-25
- [9] Wattiau P, Boland C, Bertrand S. Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* subtyping: gold standards and alternatives[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(22): 7877-7885
- [10] Rakonjac J, Bennett NJ, Spagnuolo J, et al. Filamentous bacteriophage: biology, phage display and nanotechnology applications[J]. Current Issues in Molecular Biology, 2011, 13(2): 51-76
- [11] Bhatta DR, Bangtrakulnonth A, Tishyadhigama P, et al. Serotyping, PCR, phage-typing and antibiotic sensitivity testing of *Salmonella* serovars isolated from urban drinking water supply systems of Nepal[J]. Letters in Applied Microbiology, 2007, 44(6): 588-594
- [12] Cardona-Castro N, Sánchez-Jiménez M, Lavalett L, et al. Development and evaluation of a multiplex polymerase chain reaction assay to identify *Salmonella* serogroups and serotypes[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2009, 65(3): 327-330
- [13] Liu B. Mining of molecular targets and development of multiplex PCR methods for serogrouping and serotyping *Salmonella* spp.[J]. Shanghai: Doctoral Dissertation of Shanghai

- Jiao Tong University, 2012 (in Chinese)
刘斌. 沙门氏菌血清分型分子靶点的发掘及鉴定体系的建立[D]. 上海: 上海交通大学博士学位论文, 2012
- [14] Tennant SM, Diallo S, Levy H, et al. Identification by PCR of non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars associated with invasive infections among febrile patients in Mali[J]. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2010, 4(3): e621
- [15] Yang XJ, Wu QP, Zhang JM, et al. Prevalence and characterization of monophasic *Salmonella* serovar 1,4,[5],12:i:- of food origin in China[J]. PLoS One, 2015, 10(9): e0137967
- [16] Besser J. Pulsed-field gel electrophoresis for disease monitoring and control[A]//Jordan K, Dalmasso M. Pulse Field Gel Electrophoresis: Methods in Molecular Biology[M]. New York: Springer, 2015, 1301: 3-7
- [17] Rivoal K, Protais J, Quéguiner S, et al. Use of pulsed-field gel electrophoresis to characterize the heterogeneity and clonality of *Salmonella* serotype Enteritidis, Typhimurium and Infantis isolates obtained from whole liquid eggs[J]. International Journal of Food Microbiology, 2009, 129(2): 180-186
- [18] Wang Y, Yang BW, Wu Y, et al. Molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis on retail raw poultry in six provinces and two National cities in China[J]. Food Microbiology, 2015, 46: 74-80
- [19] Favier GI, Estrada CSML, Otero VL, et al. Prevalence, antimicrobial susceptibility, and molecular characterization by PCR and pulsed field gel electrophoresis (PFGE) of *Salmonella* spp. isolated from foods of animal origin in San Luis, Argentina[J]. Food Control, 2013, 29(1): 49-54
- [20] Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(6): 3140-3145
- [21] Gunel E, Kilic GP, Bulut E, et al. *Salmonella* surveillance on fresh produce in retails in Turkey[J]. International Journal of Food Microbiology, 2015, 199: 72-77
- [22] Liu WB, Liu B, Zhu XN, et al. Diversity of *Salmonella* isolates using serotyping and multilocus sequence typing[J]. Food Microbiology, 2011, 28(6): 1182-1189
- [23] Liu HL, Wan ZG, Hong XL, et al. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and multilocus sequence typing of *Salmonella* in import and export foods[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2014, 5(11): 3454-3461 (in Chinese)
刘慧玲, 万志刚, 洪小柳, 等. 进出口食品中不同血清型沙门氏菌 PFGE 和 MLST 分型比较研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(11): 3454-3461
- [24] Singh P, Foley SL, Nayak R, et al. Massively parallel sequencing of enriched target amplicons for high-resolution genotyping of *Salmonella* serovars[J]. Molecular and Cellular Probes, 2013, 27(2): 80-85
- [25] Hendriksen RS, Leekitcharoenphon P, Lukjancenko O, et al. Genomic Signature of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi isolates related to a massive outbreak in Zambia between 2010 and 2012[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2015, 53(1): 262-272
- [26] Tankouo-Sandjong B, Sessitsch A, Liebana E, et al. 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(1): 23-36
- [27] Nair S, Wain J, Connell S, et al. *Salmonella enterica* subspecies II infections in England and Wales-the use of multilocus sequence typing to assist serovar identification[J]. Journal of Medical Microbiology, 2014, 63(6): 831-834
- [28] Zhang SK, Yin YL, Jones MB, et al. *Salmonella* serotype determination utilizing high-throughput genome sequencing data[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2015, 53(5): 1685-1692
- [29] Seridi L, Ryu T, Ravasi T. Dynamic epigenetic control of highly conserved noncoding elements[J]. PLoS One, 2014, 9(10): e109326
- [30] Liu WJ. The molecular typing and epidemiological analysis of *Salmonella* in some regions of China[D]. Beijing: Master's Thesis of Academy of Military Medical Sciences, 2011 (in Chinese)
刘雯静. 我国部分地区沙门氏菌的分子分型及流行特征分析[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院硕士学位论文, 2011
- [31] Malorny B, Junker E, Helmuth R. Multi-locus variable-number tandem repeat analysis for outbreak studies of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis[J]. BMC Microbiology, 2008, 8(1): 84
- [32] Tien YY, Ushijima H, Mizuguchi M, et al. Use of multilocus variable-number tandem repeat analysis in molecular subtyping of *Salmonella enterica* serovar Typhi isolates[J]. Journal of Medical Microbiology, 2012, 61(2): 223-232
- [33] Jansen R, van Embden JDA, Gaastra W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes[J]. Molecular Microbiology, 2002, 43(6): 1565-1575
- [34] Yan YF. The development of genomic diversity database of important pathogens modeled on *Yersinia pestis* and its application[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Academy of Military Medical Sciences, 2014 (in Chinese)
颜焱锋. 以鼠疫菌为模型的重要致病细菌基因组多态性数据库的构建及应用研究[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院博士学位论文, 2014
- [35] Fabre L, Zhang J, Guigon G, et al. CRISPR typing and subtyping for improved laboratory surveillance of *Salmonella* infections[J]. PLoS One, 2012, 7(5): e36995
- [36] Liu FY, Barrangou R, Gerner-Smidt P, et al. Novel virulence gene and clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) multilocus sequence typing scheme for subtyping of the major serovars of *Salmonella enterica* subsp. *enterica*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(6): 1946-1956
- [37] Shariat N, DiMarzio MJ, Yin S, et al. The combination of CRISPR-MVLST and PFGE provides increased discriminatory power for differentiating human clinical isolates of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis[J]. Food Microbiology, 2013, 34(1): 164-173