

沙门氏菌的血清分型及分子鉴定研究进展

李可¹, 方莹¹, 张晓峰¹, 陆金虎¹, 刘斌^{2*}

(1. 浙江出入境检验检疫局, 杭州 310016; 2. 西北农林科技大学食品科学与工程学院, 杨凌 712100)

摘要: 沙门氏菌(*Salmonella*)是常见的食源性致病菌, 该菌属型别繁多。沙门氏菌血清型的划分对菌株的分类与鉴定有着重要的意义。本文主要介绍了沙门氏菌的 O 抗原、H 抗原和 Vi 抗原的特性及结构特征, 阐述了多种分子鉴定方法在血清分型检测中应用的进展情况, 这些方法大多是以 PCR 为基础建立的, 如多重 PCR、基因芯片、高分辨率熔解曲线技术等, 使用的引物是根据沙门氏菌的 O 抗原、H 抗原和 Vi 抗原的编码基因设计的。此外, 本文还介绍了两种高通量鉴定方法, 通用探针沙门氏菌血清分型法和 PremiTest 沙门氏菌分型法, 但是这两种方法的探针设计比较复杂, 使用的设备较为特殊, 不易推广。环介导等温扩增(LAMP)方法是等温扩增方法之一, 虽然简单、快速、灵敏, 但是只适合于单一血清组或血清型的检测。

关键词: 沙门氏菌; 抗原; 血清分型; 分子鉴定

Research progress of *Salmonella* serotyping and molecular identification methods

LI Ke¹, FANG Ying¹, ZHANG Xiao-Feng¹, LU Jin-Hu¹, LIU Bin^{2*}

(1. Zhejiang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Hangzhou 310016, China; 2. College of Food Science and Engineering, Northwest Agriculture & Forestry University, Yangling 712100, China)

ABSTRACT: *Salmonella* is a kind of common foodborne pathogen, with many types of bacteria. The classification of *Salmonella* serotyping has an important significance for the classification and identification of the strains. This review focused on the characteristics and structural features of the O, H, and Vi antigens. The advancements of various molecular methods for *Salmonella* serotyping were also reviewed. Most of these methods were based on PCR, such as multiple PCR, gene chip, high resolution melt (HRM) technology, etc., and the primers were designed according to the genes encoding O, G, and Vi antigen of *Salmonella*. Moreover, this study also introduced two methods of high flux identification, probe method and PremiTest in *Salmonella* serotyping, but the probe design was more complex and it should be used in the special device, which made these methods not easy to promote. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) was one of the isothermal amplification methods, which was simple, rapid, and sensitive, but only suitable for a single group or serum detection.

KEY WORDS: *Salmonella*; antigen; serotyping; molecular identification

基金项目: 浙江省科技计划项目(2015C33042)、国家质检总局科技计划项目(2014IK123)、西北农林科技大学基本科研业务费项目(Z109021426)

Fund: Supported by the Science and Technology Program of Zhejiang Province (2015C33042), General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine (2014IK123), and Fundamental Research Funds for the Central Universities (Z109021426)

*通讯作者: 刘斌, 博士, 讲师, 研究方向为食品安全。E-mail: liu_binn@163.com

*Corresponding author: LIU Bin, Ph.D., Lecturer, College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, 22 Xinong Rd, Yangling 712100, China. E-mail: liu_binn@163.com

1 引言

沙门氏菌(*Salmonella*)是最常见的食源性致病菌之一,由其引起的食物中毒病例在世界各地的食物中毒中常居于首位。该菌分布很广,通常寄居在人体和动物体的肠道中,并随排泄物污染它们的生存环境和食物,而且能够在人体与动物体间进行传播^[1]。沙门氏菌的株型繁多,目前全世界已经报道的血清型有2500多种,分属于46个血清组;而我国报道的血清型约有300种,分布于37个血清组^[2-4]。沙门氏菌血清型的划分对菌株的分类与鉴定有着重要的意义,对于监测与控制致病菌的传播也有重要作用。

2 沙门氏菌的血清分型

沙门氏菌的菌体表面含有多种抗原性物质,如脂多糖、糖蛋白、脂蛋白等,可与宿主的血清发生免疫反应^[5]。沙门氏菌的血清分型正是基于其菌体表面的抗原性物质与特异血清产生的免疫反应进行鉴定和区分的^[6]。沙门氏菌的抗原主要分为3种类型:菌体(O抗原),鞭毛或菌毛(H抗原)以及荚膜(Vi抗原)。

2.1 沙门氏菌的O抗原

O抗原主要是由沙门氏菌细胞壁的脂多糖构成,主要组成成分为脂质A、核心寡糖和O特异性多糖^[7]。其多糖主链是由重复排列的寡糖链(2到6个糖基)构成,侧链则是一些特殊的单糖,这些组成决定了O抗原的特异性^[8]。依据沙门氏菌O抗原的特异抗性,将含有共同O抗原的菌株分在同一血清组,则可将沙门氏菌分为40多种血清组^[2]。

2.2 沙门氏菌的H抗原

H抗原主要是由沙门氏菌的鞭毛蛋白质构成,其特异性主要是由鞭毛蛋白中氨基酸的排列顺序和空间构型以及蛋白高级结构共同决定的^[9]。大多数沙门氏菌是H抗原双相菌,即有两种H抗原可以表达,分别称为1相和2相;少数菌株只能表达一种H抗原,称为单相菌;极个别菌株还会表达一些附加H抗原,被定名为3型或R型H抗原,但这些抗原不稳定,容易丢失。到目前为止,在发现的沙门氏菌中,只有鸡沙门氏菌不表达H抗原,是唯一不运动的血清型^[10,11]。

2.3 沙门氏菌的Vi抗原

Vi抗原是由聚-N-乙酰-D-半乳糖胺糖醛酸组成,主要是由伤寒沙门氏菌、丙型副伤寒沙门氏菌和都柏林沙门氏菌具有。与O抗原和H抗原相比,Vi抗原的抗原性较弱,当沙门氏菌感染人体后可产生相应的抗体;但当菌体被清除后,相应的抗体就会随之消失^[12]。

3 血清学鉴定方法

自从1934年第一次发表Kauffmann-White血清表,沙

门氏菌的血清分型就成为最主要的分型形式^[13]。当前,沙门氏菌的检测是以传统分离检测方法为主,即以沙门氏菌的生化反应与免疫反应结合进行分型鉴定的。挑取的疑似菌株经生化反应确定为沙门氏菌后,再利用沙门氏菌的鉴定血清,分别与该菌的3种抗原进行反应,以产生的颗粒状凝集现象来区分不同菌株的类型,最后根据沙门氏菌的Kauffmann-White血清表获知菌株的血清型。通过这种方法可将沙门氏菌划分出46个血清组,2500多种血清型^[2,14]。虽然此方法直观可靠,但是也存在一些缺陷,主要是需要预先准备350种不同的抗原——用于制备分型血清;其次,制备的250种分型血清也需要通过复杂程序来控制其质量;最后,依据该方法分型,确定一株沙门氏菌的血清型至少需要3d,费时又费力^[15]。

4 聚合酶链式反应(PCR)鉴定方法

PCR技术具有操作简便、快速、灵敏度高、特异性强等特点,现已广泛地应用于沙门氏菌的检测。1992年,Rahn等^[16]以鼠伤寒沙门氏菌的*invA*基因为检测靶基因,首次建立了检测沙门氏菌的PCR方法。此后,国内外很多研究者也开始将分子技术应用于沙门氏菌特异鉴定和血清分型的研究中,包括反转录PCR(reverse-transcription PCR, RT-PCR)、real-time PCR、多重PCR、DNA测序、毛细管电泳(capillary electrophoresis)和DNA芯片分析等^[13,17-18]。

4.1 检测靶点为O抗原编码基因

沙门氏菌血清组O抗原就是由其*rfb*基因编码的,抗原的差异性就是由基因簇编码序列的多样性导致的。*rfb*基因簇的编码基因可以分为3种类型:O抗原单位的糖基合成酶基因、转运酶基因(可以将糖基组装到O抗原亚单位上)以及其他参与O抗原组建的蛋白基因(如O抗原转移酶和O抗原合成酶基因)^[19,20]。最初,用于鉴定沙门氏菌血清组A~D的多重PCR方法的靶点就是利用了*rfb*基因簇的差异性,例如,Luk等^[21]在1993年建立的多重PCR方法所采用的靶基因为*rfbJ*和*rfbS*,分别负责编码阿比可塘和泊雷糖的合成酶。然而,该方法只能够鉴定出3种血清组(B、C2和D/A),而且对于血清组A和D的菌株不能区分。为此,2011年作者采用比较基因组学的方法重新筛选了O抗原靶基因,共筛选到37个特异基因,并验证了这些基因的特异性。最后,以新的靶基因建立了多重PCR,可以区分出血清组为A、B、C1、C2和D的沙门氏菌^[22]。

4.2 检测靶点为H抗原编码基因

多数沙门氏菌有两个H抗原基因,*fliC*基因和*fljB*基因,前者编码1相抗原,后者编码2相抗原。在2002年,Echeita等^[23]利用沙门氏菌的1,2、1,5、1,6、1,7、1,w、e,n,x和e,n,z15等2相H抗原基因,建立了鉴定沙门氏菌血清型的多重PCR方法。在2010年,Tennant等^[24]通过检测沙门

氏菌的 *fliC* 和 *fliB* 基因, *fliB-fliA* 基因间隔区以及 *sdfI* 序列, 建立了可以鉴定鼠伤寒沙门氏菌及其变种、肠炎沙门氏菌、都柏林沙门氏菌、斯坦利维尔菌株的 PCR 方法。

4.3 检测靶点为其他编码基因

沙门氏菌各个血清型的抗原结构均存在差异, 其抗原编码基因的序列也会各不相同。一株沙门氏菌的血清型的精确确定至少需要 3 个检测靶点(O 抗原、H 抗原的 1 相和 2 相编码基因), 而同时检测多种血清型时, 检测种类的数量则会受到引物数量的限制, 而且引物之间的干扰不仅会降低检测的灵敏度, 还有可能会因错配检测出一些相近血清型的菌株, 甚至因严重干扰而不能与靶基因匹配, 得到假阴性结果。为了探索新的检测靶点, 寻求以单一靶点来检测单一血清型, 作者课题组利用比较基因组学的方法筛选了肠炎沙门氏菌和鼠伤寒沙门氏菌的特异序列。在筛选的特异序列中, 包含了 Agron 等^[25]采用减差杂交(subtractive hybridization)方法筛选到的肠炎沙门氏菌特异片段 *SdfI*, 以及 Kim 等^[26]发掘到的鼠伤寒沙门氏菌特异基因 STM4497。随后, 我们对所筛选的靶点进行了评价, 并重新建立了针对这两种沙门氏菌血清型的 PCR 检测方法^[27]。

5 其他分子鉴定方法

由于沙门氏菌的抗原结构呈多态性, 其相应的 *rfb* 基因的序列在沙门氏菌血清型之间也各不相同, 增加了设计多重引物的难度。因此, 各国研究工作者尝试借助其他新技术应用于沙门氏菌的血清分型, 建立更加便捷的鉴定方法, 促使分型方法走向高特异性和高通量的发展方向。

5.1 芯片技术分型法

芯片技术与多重 PCR 方法的结合, 可以大幅提高检测沙门氏菌血清型的数量, 在可区分沙门氏菌的血清组和血清型的基础上, 还能够检测一些与沙门氏菌重要表型相关的基因, 如毒力因子、抗药基因等^[28]。Malorny 等^[29]针对沙门氏菌的菌体抗原、鞭毛抗原、毒力基因、质粒相关基因以及抗生素表达基因等靶点, 合成了 109 个 35~40 bp 的核酸探针, 以 19 株沙门氏菌和 1 株大肠杆菌作为阳性和阴性对照, 测试结果显示准确性可达 97.4%。McQuiston 等^[30]以沙门氏菌的 H 抗原基因为检测靶基因建立了一种基于微球的液体芯片检测方法, 探针的靶点包括了 15 个 H 抗原基因, 5 个主要的复合抗原基因, 16 个 2 相复合抗原基因, 通过对 500 株分离株的检测, 结果显示该方法的检测准确率可达 92.2%。在 2013 年, Shin 等^[31]构建了一种基于 *carB* 基因的特异捕获探针的新型寡核苷酸芯片, 该芯片能够清晰地区分猪霍乱沙门氏菌、肠炎沙门氏菌和鼠伤寒沙门氏菌, 并且彼此间不会产生干扰信号。

5.2 通用探针沙门氏菌血清分型法

通用探针沙门氏菌血清分型法(the universal probe *Salmonella* serotyping, UPSS)技术的应用是高通量技术发展之一。该方法仍然是基于 PCR 技术, 因而具备了 PCR 的高灵敏性、强特异性和快速的特点, 采用了基于纳米颗粒表面进行聚合酶链式反应(nanoPCR)的开放式芯片平台, 可完成 1024 个反应。其特异性是依靠通用探针识别通用引物的扩增子实现的。在其通用引物上标记有 TaqMan 荧光物质, 该通用引物可以扩增到来自 12 个特异基因的扩增子。最后, 借助于 CCD 相机读取数据, 通过电子表格分析数据^[32]。

5.3 PremiTest 沙门氏菌分型法

PremiTest 沙门氏菌检测仍然是基于 DNA 检测的方法, 其使用的技术是通过一系列的多重连接检测反应, 产生一个连接探针集合, 再使用单对引物进行 PCR 再扩增。PCR 使用的引物对中标记有生物素, 因此扩增产物就会含有生物素标记。扩增产物再被杂交到 DNA 芯片上, 通过比色检测确定检测结果。每一个沙门氏菌的血清型都会有一个单一的微阵列杂交图, 能够检测 300 种血清型^[33]。

5.4 环介导等温扩增(LAMP)快速检测方法

LAMP 具有高特异性和灵敏性, 操作十分简单, 适合基层快速诊断, 已经广泛地应用于多种致病微生物的检测。在 2010 年, Yang 等^[34]应用筛选到的 *SdfI* 序列建立了检测肠炎沙门氏菌的 LAMP 方法, 能够很好地区分肠炎沙门氏菌和其它血清型的菌株, 该方法检测 DNA 模板的灵敏度为 4 copies/ μ L, 与 FQ-PCR 相近。2012 年, Ravan 等^[35]结合 LAMP 和 ELISA(酶联免疫)技术建立了检测沙门氏菌血清组 D/A 的检测方法, 每管反应可以检测到 4 CFU, 远低于同一靶基因 *pri* 建立的 PCR-ELISA 检测方法的检测限。

5.5 高分辨率熔解曲线(high resolution melt, HRM)检测方法

HRM 技术是近些年来在 PCR 基础上发展起来新的分型方法^[36,37]。通过 PCR 扩增后, 扩增产物的 DNA 序列如果存在差异, 那么它们产生的熔解曲线也会发生变化, 即使是只有 1~2 个碱基发生改变也会引起产物序列的熔解曲线有所不同。因此, 通过识别熔解曲线的变化来区分产物核酸序列的遗传差异, 进而凭借熔解曲线数据对来源不同的菌株进行分类和分型^[38,39]。2009 年, Bratikov 等^[40]采用 HRM 技术对沙门氏菌进行基因分型, 结果显示沙门氏菌的基因型与它们的血清型存在着关联性。但是, 他们采用的检测靶基因来自基因组的重复区段, 而这一区段的 DNA 序列在不同菌株间存在很大的差异, 即使是同一血清型菌株, 因而这段重复区段并不适合作为血清分型的靶基因。2012 年, Zeinzingera 等^[41]再次利用 HRM 技术区分

了37种不同的沙门氏菌血清型。然而,他们所使用的检测基因为沙门氏菌的 *fljB*、*gyrB* 和 *ycfQ* 基因,这3条基因都不是沙门氏菌的特异基因,在分型之前还需要先确定检测的菌株为沙门氏菌,因而不便于食品样品的检测;而且,这3条基因也并不是在所有的沙门氏菌菌株中都存在的,如基因 *fljB* 在肠炎沙门氏菌和鸡沙门氏菌中就不存在。基于上述研究成果的局限,笔者所在课题组采用新的检测基因来完善 HRM 分型技术,通过比较基因组学和生物信息学方法筛选到沙门氏菌属特异性基因,并依据各个血清型间沙门氏菌基因序列的差异性,建立更加简便、快速、灵敏、准确的 HRM 血清型分型体系,目前成功对20余个沙门氏菌血清型进行了分型,相关数据正在进一步整理中。

综上所述,虽然沙门氏菌的血清分型主要还是通过血清学方法鉴定的,但是其鉴定效率远远不能满足目前的快节奏的社会发展,快速鉴定方法成为的血清鉴定发展的必然趋势。PCR 作为最常用的分子快速检测方法已经应用于沙门氏菌的血清鉴定,虽然方法简单、成本低,但是该方法只能检测有限的几种血清型,若要增加鉴定的数量,则需要借助于其他方法,如基因芯片、测序等,便会大大增加鉴定的成本。通用探针沙门氏菌血清分型法和 PremiTest 沙门氏菌分型法虽然能够实现高通量的鉴定,但是使用的设备特殊,探针设计复杂,成本昂贵。LAMP 方法只适合于单一的血清组或者血清型的鉴定,尽管方法简单快速。HRM 检测方法可以同时鉴定几十种血清型,鉴定的种类数量与其使用的引物和扩增产物有密切的相关性。

6 展望

血清型分型是沙门氏菌分类与鉴定的核心,不仅是提供国内流行病学调查数据的重要基础,也是与国外监管部门交换数据的重要方式。由于血清鉴定存在着一些缺陷,因而研究者采用分子鉴定方法对其进行补充。尽管分子方法目前还只能检测常见的血清型菌株,但是随着沙门氏菌基因组测序数量的增加,以及分子检测手段的不断完善,沙门氏菌血清型分子鉴定方法将会得到进一步发展,有可能成为血清学鉴定的替代方法之一。

参考文献

- [1] Tatavarthy A, Cannons A. Real-time PCR detection of *Salmonella* species using a novel target: the outer membrane porin F gene (*ompF*) [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2010, 50(6): 645–652.
- [2] Hong Y, Duda KA, Cunneen MM, *et al.* The WbaKacetyl transferase of *Salmonella enterica* group E gives insights into O antigen evolution [J]. *Microbiology*, 2013, 159(Pt 11): 2316–2322.
- [3] Hiriart Y, Serradell M, Martinez A, *et al.* Generation and selection of anti-flagellin monoclonal antibodies useful for serotyping *Salmonella enteric* [J]. *Springer Plus*, 2013, 2: 640.
- [4] Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, *et al.* Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens [J]. *Emerg Infect Dis*, 2011, 17(1): 7–15.
- [5] Akiba M, Kusumoto M, Iwata T. Rapid identification of *Salmonella enterica* serovars, Typhimurium, Choleraesuis, Infantis, Hadar, Enteritidis, Dublin and Gallinarum, by multiplex PCR [J]. *J Microbiol Meth*, 2011, 85(1): 9–15.
- [6] Barrow PA. ELISAs and the serological analysis of *Salmonella* infections in poultry: a review [J]. *Epidemiol Infect*, 1992, 109(3): 361–369.
- [7] Holzer SU, Schlumberger MC, Jackel D, *et al.* Effect of the O-antigen length of lipopolysaccharide on the functions of Type III secretion systems in *Salmonella enterica* [J]. *Infect Immun*, 2009, 77(12): 5458–5470.
- [8] Reeves PR, Cunneen MM, Liu B, *et al.* Genetics and evolution of the *Salmonella* galactose-initiated set of O antigens [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e69306.
- [9] Aldridge P, Gnerer J, Karlinsey JE, *et al.* Transcriptional and translational control of the *Salmonella* *fljC* gene [J]. *J Bacteriol*, 2006, 188(12): 4487–4496.
- [10] Smith NH, Selander RK. Molecular genetic basis for complex flagellar antigen expression in a triphasic serovar of *Salmonella* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(3): 956–960.
- [11] Sonne-Hansen J, Jenabian SM. Molecular serotyping of *Salmonella*: identification of the phase 1 H antigen based on partial sequencing of the *fljC* gene [J]. *APMIS*, 2005, 113(5): 340–348.
- [12] Chen J, Zhang L, Paoli GC, *et al.* A real-time PCR method for the detection of *Salmonella enterica* from food using a target sequence identified by comparative genomic analysis [J]. *Int J Food Microbiol*, 2010, 137(2–3): 168–174.
- [13] Edwards PR, Kauffmann F. A simplification of the Kauffmann-White schema [J]. *Am J Clin Pathol*, 1952, 22(7): 692–697.
- [14] O'Regan E, Quinn T, Pages JM, *et al.*, Fanning S. Multiple regulatory pathways associated with high-level ciprofloxacin and multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis: involvement of RamA and other global regulators [J]. *Antimicrob Agents Ch*, 2009, 53(3): 1080–1087.
- [15] Yoshida C, Franklin K, Konczyk P, *et al.* Methodologies towards the development of an oligonucleotide microarray for determination of *Salmonella* serotypes [J]. *J Microbiol Meth*, 2007, 70(2): 261–271.
- [16] Rahn K, De Grandis SA, Clarke RC, *et al.* Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella* [J]. *Mol Cell Probe*, 1992, 6(4): 271–279.
- [17] Jacobsen CS, Holben WE. Quantification of mRNA in *Salmonella* sp. seeded soil and chicken manure using magnetic capture hybridization RT-PCR [J]. *J Microbiol Meth*, 2007, 69(2): 315–321.
- [18] Tankouo-Sandjong B, Sessitsch A, Stralis-Pavese N, *et al.* Development of an oligonucleotide microarray method for *Salmonella* serotyping [J]. *Microb Biotechnol*, 2008, 1(6): 513–522.
- [19] Fitzgerald C, Collins M, van Duyn S, *et al.* Multiplex, bead-based suspension array for molecular determination of common *Salmonella* serogroups [J]. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(10): 3323–3334.
- [20] Fitzgerald C, Gheesling L, Collins M, *et al.* Sequence analysis of the *rflB* loci, encoding proteins involved in the biosynthesis of the *Salmonella enterica* O17 and O18 antigens: serogroup-specific identification by PCR [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(12): 7949–7953.

- [21] Luk JM, Kongmuang U, Reeves PR, *et al.* Selective amplification of abequose and paratose synthase genes (*rfb*) by polymerase chain reaction for identification of *Salmonella* major serogroups (A, B, C2, and D) [J]. *J Clin Microbiol*, 1993, 31(8): 2118–2123.
- [22] Liu B, Zhang L, Zhu X, *et al.* PCR identification of *Salmonella* serogroups based on specific targets obtained by comparative genomics [J]. *Int J Food Microbiol*, 2011, 144(3): 511–518.
- [23] Echeita MA, Herrera S, Garaizar J, *et al.* Multiplex PCR-based detection and identification of the most common *Salmonella* second-phase flagellar antigens [J]. *Res Microbiol*, 2002, 153(2): 107–113.
- [24] 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 Neglect Trop Dis*, 2009, 4(3):233–238.
- [25] Agron PG, Walker RL, Kinde H, *et al.* Identification by subtractive hybridization of sequences specific for *Salmonella enterica* serovar Enteritidis [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(11): 4984–4991.
- [26] Kim HJ, Park SH, Lee TH, *et al.* Identification of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium using specific PCR primers obtained by comparative genomics in *Salmonella* serovars [J]. *J Food Protect*, 2006, 69(7): 1653–1661.
- [27] Liu B, Zhou X, Zhang L, *et al.* Development of a novel multiplex PCR assay for the identification of *Salmonella enterica* Typhimurium and Enteritidis [J]. *Food Control*, 2012, 27(1): 87–93.
- [28] Ricke SC, Khatiwara A, Kwon YM. Application of microarray analysis of foodborne *Salmonella* in poultry production: a review [J]. *Poul Sci*, 2013, 92(9): 2243–2250.
- [29] Malorny B, Bunge C, Guerra B, *et al.* Molecular characterisation of *Salmonella* strains by an oligonucleotide multiprobe microarray [J]. *Mol Cell Probe*, 2007, 21(1): 56–65.
- [30] McQuiston JR, Waters RJ, Dinsmore BA, *et al.* Molecular determination of H antigens of *Salmonella* by use of a microsphere-based liquid array [J]. *J Clin Microbiol*, 2011, 49(2): 565–573.
- [31] Shin HH, Hwang BH, Seo JH, *et al.* Specific discrimination of three pathogenic *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotypes by *carB*-based oligonucleotide microarray [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80(1): 366–373.
- [32] Mertes F, Biens K, Lehrach H, *et al.* High-throughput universal probe *Salmonella* serotyping (UPSS) by nanoPCR [J]. *J Microbiol Meth*, 2010, 83(2): 217–223.
- [33] Wattiau P, Van Hesse M, Schlicker C, *et al.* Comparison of classical serotyping and PremiTest assay for routine identification of common *Salmonella enterica* serovars [J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(12): 4037–4040.
- [34] Yang JL, Ma GP, Yang R, *et al.* Simple and rapid detection of *Salmonella* serovar Enteritidis under field conditions by loop-mediated isothermal amplification [J]. *J Appl Microbiol*, 2010, 109(5): 1715–1723.
- [35] Ravan H, Yazdanparast R. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method in conjunction with an enzyme-linked immunosorbent assay for specific detection of *Salmonella* serogroup D [J]. *Anal Chim Acta*, 2012, (733): 64–70.
- [36] Gurtler V, Grando D, Mayall BC, *et al.* A novel method for simultaneous *Enterococcus* species identification/typing and van genotyping by high resolution melt analysis [J]. *J Microbiol Meth*, 2012, 90(3): 167–81.
- [37] Jin D, Luo Y, Zhang Z, Fang W, *et al.* Rapid molecular identification of *Listeria* species by use of real-time PCR and high-resolution melting analysis [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2012, 330(1): 72–80.
- [38] Pietzka AT, Stiger A, Huhulescu S, *et al.* Gene scanning of an internalin B gene fragment using high-resolution melting curve analysis as a tool for rapid typing of *Listeria monocytogenes* [J]. *J Mol Diagn*, 2011, 13(1): 57–63.
- [39] Wang J, Yamada S, Ohashi E. Rapid identification of *Listeria* species and screening for variants by melting curve and high-resolution melting curve analyses of the intergenic spacer region of the rRNA gene [J]. *Can J Microbiol*. 2010, 56(8): 676–82.
- [40] Bratčikov M, Mauricas M. The use of high-resolution melting analysis for *Salmonella* spp. CRISPR sequence genotyping [J]. *Acta Med Lituanica*, 2009, 16(3): 98–102.
- [41] Zeinzinger J, Pietzka A T, Stöger A, *et al.* One-step triplex high-resolution melting analysis for rapid identification and simultaneous subtyping of frequently isolated *Salmonella* serovars [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78(9): 3352–60.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



李 可, 高级工程师, 主要研究方向为食源性致病微生物检测、分子分型溯源。
E-mail: lk@zjq.gov.cn



刘 斌, 博士, 讲师, 主要研究方向为食品安全。
E-mail: liu_binn@163.com