

食源性致病菌溯源分型技术研究进展

伊廷存^{1,2*}, 霍胜楠^{1,2}, 程祥龙^{1,2}, 孟 静^{1,2}

(1. 山东省食品药品检验研究院, 济南 250101;

2. 山东省特殊医学用途配方食品质量控制工程技术研究中心, 济南 250101)

摘 要: 微生物溯源分型, 是根据微生物的生化特征或基因特征, 对不同来源微生物间的关系进行分型溯源。通过对食源性致病菌的分型研究, 精确分析食源性致病菌的特征, 查找食源性致病菌的来源, 为有效应对食品安全提供技术支持。随着分子生物学和测序技术的发展, 微生物溯源分型技术获得了巨大的发展, 传统的溯源分型方法主要是表型分型和基因型分型, 本文以沙门氏菌为例介绍了食源性致病菌溯源分型技术的最新研究进展, 综述了食源性致病菌分型技术中的生化分型法、血清学分型法、抗生素耐药分型法、基于蛋白质指纹图谱分型技术、脉冲场凝胶电泳技术、重复序列扩增分型技术、有规律间隔的短回文重复序列技术、核心基因组多位点序列分析分型法、基于全基因组测序的单核苷酸多态性分型法等技术, 为做好食源性致病菌的监管工作提供有力参考

关键词: 微生物溯源; 分型技术; 食源性致病菌

Advances in traceability typing and identification of foodborne pathogens

YI Ting-Cun^{1,2*}, HUO Sheng-Nan^{1,2}, CHENG Xiang-Long^{1,2}, MENG Jing^{1,2}

(1. Shandong Institute of Food and Drug Control, Jinan 250101, China; 2. Shandong Quality Control Engineering Technology Research Center of Foods for Special Medical Purpose, Jinan 250101, China)

ABSTRACT: Based on the biochemical characteristics or genetic characteristics of microorganisms, microbial traceability typing is classification of the relationship between different sources of microorganisms. Through the typing study of foodborne pathogens, the characteristics of foodborne pathogens are accurately analyzed, and the sources of foodborne pathogens are found, which provide technical support for effective response to food safety. With the development of molecular biology and sequencing technology, microbial traceability typing technology has made great progress. The traditional traceability typing methods are mainly phenotypic typing and genotyping. Taking *Salmonella* as an example, this paper introduced the latest research progress of traceability typing technology of foodborne pathogenic bacteria, and reviewed biochemical typing, serological typing, antibiotic resistance typing, protein fingerprinting typing, pulsed field gel electrophoresis, repetitive sequence amplification typing, regularly spaced short palindrome repeat technology, core genome multilocus sequence typing, and whole genome sequencing, which provided a powerful reference for the supervision of foodborne pathogenic bacteria.

KEY WORDS: microbial traceability; typing technology; foodborne pathogens

*通讯作者: 伊廷存, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: yitc_999@126.com

*Corresponding author: YI Ting-Cun, Senior Engineer, Shandong Institute of Food and Drug Control, No.2749, Xinluo Street, Jinan High-Tech Zone, Jinan 250101, China. E-mail: yitc_999@126.com

1 引言

改革开放 40 年来,我国食品工业快速发展,食品生产模式发生了巨大的转变,由此引发的食源性疾病突发事件不断增加,而且食源性致病菌也从地域性问题向全国、全球性问题转变。如何通过可靠的溯源手段将不同地区爆发的食品安全事件进行识别追踪,对政府监管部门和技术部门提出了挑战^[1]。

微生物溯源,最早由 Hagedorn 和 Wiggins 提出,是指通过比较污染样品和可能污染源中的微生物差异或其他生物标记的有无来判断 2 者之间的联系,进而确定污染来源^[2,3]。采用微生物溯源技术,将食源性致病菌进行分型比较,明确食源性致病菌的来源,为食品安全监管提供有力的技术支撑。2011 年德国对肠出血性大肠埃希氏菌 O104:H4 疫情进行溯源调查,采用基于重复序列的聚合酶反应(repetitive sequence based polymerase chain reaction, Rep-PCR)和脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel-electrophoresis, PFGE) 2 种分子溯源技术对爆发菌株进行分析和比对,最终成功追踪到埃及进口的葫芦巴豆种子^[4,5],为各国政府食源性致病菌溯源监管提供了宝贵的经验。

沙门氏菌,是目前导致食源性疾病的主要原因,广泛存在于食品及其相关产品中,可引起胃肠炎、败血症等多种疾病。为掌握和追踪沙门氏菌在整个食品生产链中的分布,沙门氏菌溯源分型技术的发展成为迫切需求。近年来,随着基因组技术和 PCR 技术的发展,微生物溯源分型技术取得一定程度的发展,提高了沙门氏菌溯源分型的水平,本文综述了沙门氏菌溯源分型技术的最新进展及其应用,为选择合适的分型技术提供了理论依据。

2 表型分型

传统的表型分型技术主要包括血清分型方法、生化分型方法、噬菌体分型方法和抗生素耐药性分型方法。传统分型方法是沙门氏菌溯源分型的首选方法,是进行食品安全和公共卫生分析的基石。

2.1 生化分型方法

生化分型方法是根据特征性生理生化反应进行分型,如对不同糖类或多种碳源的代谢产生的特异生化反应而进行分型。该技术难点是寻找恰当的代谢标志物,由于沙门氏菌种类繁多,其鉴定工作必然相当繁琐^[6]。现在被广泛采用的商品化设备有 VITECK、Biolog 等鉴定系统,使用成本偏高,且对沙门氏菌的分型过于简单。

2.2 血清学的分型方法

血清学分型是基于抗原抗体间免疫学反应进行的一种分型技术^[7],常见的血清学类型有:表面 O 抗原(细胞壁脂多糖最外层的特异性多糖)、K 抗原(位于 O 抗原外层,为

多糖)以及 H 抗原(鞭毛)组成其血清学分型^[8,9]。血清分型方法是鉴定沙门氏菌的一种重要分型技术,血清学和 Kauffmann White Scheme (KWS)一直是沙门氏菌血清分型的黄金标准,在沙门氏菌分型鉴定中发挥巨大的作用,但由于沙门氏菌个体差异,现有的血清分型技术已不能满足沙门氏菌的鉴定要求,而要寻找新的血清抗原和抗体则是非常困难的,因此其技术发展受到一定的制约。目前该方法仍作为基本的分型方法用于沙门氏菌的鉴定,且与 PCR 技术结合开发基于血清型的特异 PCR 分型技术^[10]。

2.3 抗生素耐药性分析法

细菌的耐药性分析是根据致病菌对已知某种或多种抗生素不敏感现象,判断可能的致病性细菌的类型。该分型方法多用于兽类和人类的病原学监测,研究抗生素的耐药性现状^[11]。抗生素耐药分析法通常是依据已知细菌的耐药药物图谱进行判断,需要与其他分型方法配合使用,但由于耐药基因随着外界因素的作用发生转移,单独使用获得结果的准确性有待验证^[12]。该法多用于肉制品沙门氏菌耐药性谱的检测^[13,14],以了解抗生素在禽畜饲养过程中抗生素的使用情况。

3 基于蛋白质指纹图谱分型技术

基质辅助激光解析电离飞行时间质谱法(matrix-assisted laser desorption and ionization-time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)是依据细菌形成的不同蛋白指纹图谱进行分型,通过对蛋白质的解离分析完成对微生物的鉴定与分型,利用离子飞行时间(time of flight, TOF)检测器检测采集数据并获得图谱,通过软件分析得到鉴定结果,从而对样品进行定性和定量分析^[15,16]。Kang 等^[17]采用 MALDI-TOF MS 对沙门氏菌进行溯源分型分析,证明了该技术在溯源分型方面的能力。该技术最大优势在于鉴定速度快,远高于表型分型和基因分型,且在沙门氏菌种水平具有较高的准确度,但分辨率有待提高,无法与血清型完美匹配,且在亚型水平呈现低分辨率^[18]。MALDI-TOF MS 分型技术的关键是蛋白指纹图谱的设计和数据库的构建鉴定,Gekenidis 等^[19]找到了 3 种特异性生物标记肽,用于沙门氏菌亚种水平的分型鉴定,极大地提高了 MALDI-TOF MS 分型技术的精度。

4 基因型分型技术

基因分型是从染色体或染色体外的 DNA 获得遗传元件,对不同的细菌进行分型鉴定。基因分型技术主要包括基于酶切技术、PCR 技术和测序为主的分型方法。沙门氏菌溯源分型中,以酶切技术为主的代表方法为脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE),基于 PCR 技术和测序技术为主的分型方法有 2 类,一类是针对血清型

进行分型技术, 也称为分子血清分型, 另一类是以 DNA 序列为靶标的分型技术^[20]。本文主要综述了 PFGE、Rep-PCR、CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)、核心基因组多位点序列分析分型法和全基因组测序的单核苷酸多态性分型法。

4.1 脉冲场凝胶电泳技术

脉冲场凝胶电泳技术(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE), 最早由 Schwarz 和 Cantor 提出, 基本原理是通过限制性内切酶(Xba)切割基因组 DNA 特异性位点, 产生 10~30 个限制性片段, 范围从 10~800 kb^[21], 这些大片段在脉冲电场作用下, 在琼脂糖凝胶作用下分离成不同的条带, 从而将食源性致病菌进行溯源分型。目前该技术已用于食源性致病菌分子流行病学和溯源性分析研究, 是食源性致病菌识别和溯源应用最广泛的技术, 是沙门氏菌分子溯源分型的“金标准”。该方法分辨率高、成本低、复现性高, 成为各国进行食源性致病菌溯源分型网络应用的首选, 如美国的 PulseNet 溯源网络、我国的国家致病菌识别网、中国细菌性传染病分子分型网络等。PFGE 的鉴别能力取决于整个 DNA 中限制性位点的数量和分布, 包括质粒、转录子和整合子, 它们定义了每个谱中条带的数量和大小^[22], 因此可以通过使用不同数量和/或不同限制性内切核酸酶的组来提高 PFGE 分型能力^[23]。该方法在沙门氏菌溯源分型方面得到了广泛应用, 但仍存在一些缺点, 如技术要求高、耗时、通常需要 3 d, 另外还存在基因序列发生遗传变化时, 分辨力下降问题。

4.2 重复序列扩增分型(repetitive sequence-based PCR, Rep-PCR)

重复序列 DNA 插入因子分布在整个 DNA 基因组上, 由于细菌种类的不同构成其在基因组上的分布差异。在分型过程中, 相互靠近的插入序列之间的片段得到扩增, 由于扩增片段的大小不同产生该菌株特异性的 DNA 指纹图谱。并建立了目前商业化的 DiversiLab 分型系统, 郑晶等^[24]采用 DiversiLab 分型系统对阪崎肠杆菌进行溯源分型, 成功追踪到阪崎肠杆菌的同源关系, 此外在沙门氏菌中^[25]也有广泛应用, 该方法具有便捷性、高重复性、高分辨率的特点。

4.3 CRISPR 分型法

CRISPR 序列由一种成簇的、有规律间隔的短回文重复序列构成, 与周围的辅助蛋白(CRISPR-associated sequence, Cas)共同组成 CRISPR-Cas 系统(简称 CASS 系统)。该系统主要由 leader/repeats/spacer 和一套 cas 基因组成。短的重回文序列 repeat 是最核心的结构, cas 基因负责编码修饰核酸的相关蛋白。沙门氏菌的 CRISPR 序列具有高度多态性, 且与沙门氏菌血清型和多位点序列型密切相关^[26,27]。CRISPR 分型能够有效抵抗抗外源 DNA 的影响^[28,29], 对沙门氏菌进行分型优于 PFGE 分型, 且具有高

通量、速度快(<24 h)、产物稳定性高等特点, 有望成为分子血清分型的“金标准”, 但也需要建立相应的数据库资源。沙门氏菌具有 2 个 CRISPR 位点: CRISPR1 和 CRISPR2, 有文章表明此 2 个 CRISPR 序列是沙门氏菌血清特异的^[30]。有关文献报道了 CRISPR-Cas 在沙门氏菌^[31]的应用, Bachmann 等^[32-34]研究了不同来源沙门氏菌的溯源分型, 尤其是亚型分型方面, 表明 CASS 系统能够有效应对沙门氏菌疾病爆发的溯源分型分析, 而且还可与其他技术结合, 共同用于沙门氏菌的分型鉴定。

4.4 核心基因组多位点序列分析分型法

核心基因组多位点序列分析法(core genome multi-locus sequence typing, cgMLST), 是在多位点序列分析法(multi-locus sequence typing, MLST)基础上发展起来的更高精度的食源性致病菌分型方法。传统的 MLST 是检测和比对 7~10 个看家基因序列差异, 而 cgMLST 是检测和比对核心基因组中成千上万个基因的差异。该方法沿用 MLST 的数据分析方法, 以基因比对的方式在核心基因组中查找等位基因差异, 赋予每株菌一组等位基因编号进行分型^[35]。cgMLST 分析法是在全基因组测序基础上发展起来的, 克服了全基因组溯源分型数据过大的问题, 具有更高的效率、准确度和复现性^[36]。Ghanem 等^[37]通过对欧洲爆发沙门氏菌疫情进行 cgMLST 溯源分型研究, 证明该方法可作为一种标准化和可扩展的分型方法。cgMLST 分型法目前已纳入美国 Plusnet 网络试点, 用于溯源食源性致病菌^[38], 如 Ruppitsch 对单核细胞增生李斯特氏菌进行了 cgMLST 溯源分型研究, 发现其能够很好区分不同爆发的菌株及与爆发相关或不相关的菌株^[39], 此外在肠球菌分型领域也有应用^[40]。cgMLST 分型由于其核心基因数量一定低于泛基因组数量, 其准确度必然低于 WGS 分型; 另外还存在由于基因重叠性, 造成的低分辨率情况。

4.5 基于全基因组测序的单核苷酸多态性分型法

基于全基因组测序单核苷酸多态性(whole genome single nucleotide polymorphisms, wgSNP), 是在全基因组测序的基础上, 检测对比不同细菌基因组中的 SNP 信息, 从而达到对同一种内不同细菌分型的目的。wgSNP 分型方法目前有 2 种方式: 基于标准参考序列的 SNPs 分析和基于 K-mer 的 SNPs 分型。基于标准参考序列的 SNPs 分析, 通过与参考序列比对分型, 根据覆盖率和阅读频率选择 SNPs 位点, 获得高质量 SNPs, 比较不同菌株之间的 SNPs 揭示菌株之间的种系发生关系^[41]。基于 K-mer 的 SNPs 分析是通过将测序数据切割成序列长 K 长度的序列, 通过 K-mer 之间的比对筛选分析 SNPs 位点, 进而确定菌株间分型。目前 wgSNP 已应用于沙门氏菌溯源分型, Ghanem 等^[37,42-44]采用 wgSNP 技术, 对英国 2015~2016 年餐馆爆发的鼠伤寒沙门氏菌疫情进行溯源调查, 最终追溯到排水系

统缺陷致使发生沙门氏气溶胶污染^[45]。基于WGS技术沙门氏菌基因分型正在替代传统分型方法,而且在食源性疾病爆发监测方面非常有效^[46-48],此外还可预测抗生素耐药性^[49],改进溯源分型技术^[50],及阐明沙门氏菌亚型的进化关系^[51]。

5 展 望

随着分子生物学和基因测序技术的发展,食源性致病菌的溯源分型发展到一个新的阶段,食源性致病菌的溯源追踪呈现多种变化趋势,利用下一代测序技术进行WGS溯源分型在未来具有很大的潜力。采用WGS溯源分型技术与其他分型技术结合,共同对沙门氏菌进行溯源追踪也会成为未来发展的方向,如Ford等^[50]利用WGS和多位点变量串联重复分析(multilocus variable-number tandem-repeat analysis, MLVA)、SNP技术对沙门氏菌成功进行溯源分型,但WGS溯源分型关键在于如何对获得的序列数据进行计算和分析,需要完善的生物信息学分析流程和专家解释系统。另一方面,由于食源性致病菌爆发的区域化、全球化趋势,作好微生物溯源必须开展国际化合作,共同监管食源性疾病的发生。因此为了在各国各区域间使用分型技术,标准化和商业化成为必然趋势。

总之,微生物溯源技术发展必然会促进食品微生物监管的发展,合理高效使用溯源分型技术可精准查找食源性致病菌的来源,为从源头上控制食品微生物污染提供有力支撑,及完善科学监管模式提供可能。

参考文献

- [1] 崔生辉, 赵琳娜, 路勇. 食品微生物追踪溯源网络分析探讨[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(13): 3514-3517.
Cui SH, Zhao LN, Lu Y. Food microorganism traceability network analysis and discussion [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(13): 3514-3517.
- [2] Meays CL, Broersma K, Nordin R, *et al.* Source tracking fecal bacteria in water: A critical review of current methods [J]. J Environ Manage, 2004, 73(1): 71-79.
- [3] Scott TM, Rose JB, Jenkins TM, *et al.* Microbial source tracking: Current methodology and future directions [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(12): 5796-5803.
- [4] Mora A, Herrera A, Cecilia L, *et al.* Characteristics of the shiga-toxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104: H4 German outbreak strain and of STEC strains isolated in Spain [J]. Int Microbiol Off J Spanish Soc Microbiol, 2011, 14(3): 121-141.
- [5] 黄熙, 邓小玲, 梁骏华, 等. 2011年德国肠出血性大肠杆菌 O104: H4 感染暴发疫情溯源调查[J]. 中国食品卫生杂志, 2011, 23(6): 555-559.
Huang X, Deng XL, Liang JH, *et al.* A retrospective investigation of the outbreak of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104: H4 infection in Germany in 2011 [J]. Chin J Food Hyg, 2011, 23(6): 555-559.
- [6] Sloan A, Wang G, Cheng K. Traditional approaches versus mass spectrometry in bacterial identification and typing [J]. Clin Chim Acta, 2017, 473: 180-185.
- [7] Hélène J, Staub AM, Alouf JE. Isolation of an (O, H, Vi)-free immunoprotective antigenic fraction with mannose receptor-like activity from *Salmonella typhi* [J]. J Infect Dis, 1981, 143: 106-113.
- [8] 管峰, 杨季芳. 食源性致病菌溯源分型技术研究进展[J]. 浙江万里学院学报, 2012, 25(4): 86-90.
Guan F, Yang JF. Advances in traceability and typing of food-borne pathogens [J]. J Zhejiang Wanli Univ, 2012, 25(4): 86-90.
- [9] Johnson JR, Orskov I, Orskov F, *et al.* O, K, and H antigens predict virulence factors, carboxylesterase b pattern, antimicrobial resistance, and host compromise among *Escherichia coli* strains causing urosepsis [J]. J Infect Dis, 1994, 169(1): 119-126.
- [10] Ferrato C, Chui L, King R, *et al.* Utilization of a molecular serotyping method for *Salmonella enterica*, in a routine laboratory in Alberta Canada [J]. J Microbiol Methods, 2017, 135: 14-19.
- [11] Mir IA, Kashyap SK, Maherchandani S. Isolation, serotype diversity and antibiogram of *Salmonella enterica*, isolated from different species of poultry in India [J]. Asian Pac J Trop Biomed, 2015, 5(7): 561-567.
- [12] Ferrari RG, Panzenhagen PHN, Conte-Junior CA. Phenotypic and genotypic eligible methods for *Salmonella* phimurium source tracking [J]. Front Microbiol, 2017, 8: 2587.
- [13] Schulman LS. Bacterial resistance to antibodies: A model evolutionary study [J]. J Theor Biol, 2017, 417: 61-67.
- [14] Hassan ARHA, Salam HSH, Abdel-Latef GK. Serological identification and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates from broiler carcasses and human stools in Beni-Suef, Egypt [J]. Beni-Suef Univ J Basic Appl Sci, 2016, 5(2): 202-207.
- [15] Sauer S, Kliem M. Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria [J]. Nat Rev Microbiol, 2010, 8(1): 74-82.
- [16] 杜美红, 赵瑞雪, 李静雯. 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱分析技术在微生物检测与鉴定中的应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, (2): 99-103.
Du MH, Zhao RX, Li JW. Application of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in microbial detection and identification [J]. J Food Saf Qual, 2017, (2): 99-103.
- [17] Kang L, Li N, Li P, *et al.* MALDI-TOF mass spectrometry provides high accuracy in identification of *Salmonella* at species level but is limited to type or subtype *Salmonella* serovars [J]. Eur J Mass Spectrom, 2017, 23(2): 70-82.
- [18] 郑秋月, 战晓微, 徐杨, 等. 食源性致病菌沙门氏菌 MALDI-TOF MS 溯源分析[J]. 食品科技, 2013, (12): 315-320.
Zheng QY, Zhan XW, Xu Y, *et al.* Traceability analysis of food-borne pathogenic *Salmonella* MALDI-TOF MS [J]. Food Sci Technol, 2013, (12): 315-320.
- [19] Gekenidis MT, Studer P, Wuthrich S, *et al.* Beyond the matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) biotyping workflow: In search of microorganism-specific tryptic peptides enabling discrimination of subspecies [J]. Appl Environ Microbiol, 2014, 80(14): 4234-4241.
- [20] Ferrari RG, Panzenhagen PHN, Conte-Junior CA. Phenotypic and genotypic eligible methods for *Salmonella* phimurium source tracking [J]. Front Microbiol, 2017, 8: 2587.
- [21] Swaminathan B, Gerner-Smidt P, Ng LK, *et al.* Building pulsenet international: An interconnected system of laboratory networks to facilitate timely public health recognition and response to food-borne

- disease outbreaks and emerging food-borne diseases [J]. Food-borne Pathog Dis, 2006, 3(1): 36–50.
- [22] Zheng J, Keys CE, Zhao S, *et al.* Simultaneous analysis of multiple enzymes increases accuracy of pulsed-field gel electrophoresis in assigning genetic relationships among homogeneous *Salmonella* strains [J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(1): 85–94.
- [23] Rivoal K, Protais J, Stéphane Q, *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]. Int J Food Microbiol, 2009, 129(2): 180–186.
- [24] 郑晶, 唐中伟, 陈彬, 等. 应用 DiversiLab 分型系统对奶制品中的阪崎肠杆菌进行同源性分析[J]. 中国乳品工业, 2012, 40(6): 11–14.
- Zheng J, Tang ZW, Chen B, *et al.* Homology analysis of *Enterobacter sakazakii* in dairy products using *DiversiLab* typing system [J]. China Dairy Ind, 2012, 40(6): 11–14.
- [25] 郑晶, 唐中伟, 陈彬, 等. 应用 DiversiLab 分型系统对沙门氏菌进行同源性分析[J]. 食品科技, 2012, (10): 291–295.
- Zheng J, Tang ZW, Chen B, *et al.* Homology analysis of *Salmonella* by *DiversiLab* typing system [J]. Food Sci Technol, 2012, (10): 291–295.
- [26] Laëtitia F, Zhang J, Guigon G, *et al.* Correction: CRISPR typing and subtyping for improved laboratory surveillance of *Salmonella* infections [J]. PLoS One, 2012, 7(5): e36995.
- [27] Fricke WF, Mammel MK, McDermott PF, *et al.* Comparative genomics of 28 *Salmonella* enterica isolates: Evidence for CRISPR-mediated adaptive sublineage evolution [J]. J Bacteriol, 2011, 193(14): 3556–3568.
- [28] Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, *et al.* CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes [J]. Science, 2007, 315(5819): 1709–1712.
- [29] Garneau JE, Dupuis ME, Villion M, *et al.* The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA [J]. Nature, 2010, 468(7320): 67–71.
- [30] Thompson CP, Doak AN, Naufa A, *et al.* High-resolution identification of multiple salmonella serovars in a single sample by using CRISPR-SeroSeq [J]. Appl Environ Microbiol, 2018, 84(21): e01859–18.
- [31] Shariat N, Sandt CH, Dimarzio MJ, *et al.* CRISPR–MVLST subtyping of *Salmonella* enterica subsp. enterica serovars *Typhimurium* and *Heidelberg* and application in identifying outbreak isolates [J]. BMC Microbiol, 2013, 13(1): 1–17.
- [32] Bachmann NL, Petty NK, Zakour NLB, *et al.* Genome analysis and CRISPR typing of *Salmonella* enterica serovar Virchow [J]. BMC Genomics, 2014, 15: 389.
- [33] Li Q, Wang X, Yin K, *et al.* Genetic analysis and CRISPR typing of *Salmonella* enterica serovar *Enteritidis* from different sources revealed potential transmission from poultry and pig to human [J]. Int J Food Microbiol, 2017, 266: 119.
- [34] Li Q, Yin K, Xie X, *et al.* Detection and CRISPR subtyping of *Salmonella*, spp. isolated from whole raw chickens in Yangzhou from China [J]. Food Control, 2017, 82: 291–297.
- [35] 周海健, 阚颀. 细菌基因组分型方法的应用研究进展[J]. 疾病监测, 2016, 31(8): 668–675.
- Zhou HJ, Kan B. Advances in the application of bacterial genotyping [J]. Dis Surveillance, 2016, 31 (8): 668–675.
- [36] Pearce ME, Ali Khan NF, Dallman TJ, *et al.* Comparative analysis of core genome MLST and SNP typing within a European, *Salmonella*, serovar *Enteritidis* outbreak [J]. Int J Food Microbiol, 2018, 274: 1–11.
- [37] Ghanem M, Wang L, Zhang Y, *et al.* Core genome multilocus sequence typing (cgMLST): A standardized approach for molecular typing of mycoplasma gallisepticum [J]. J Clin Microbiol, 2017, 56(1): JCM.01145–17.
- [38] Jackson BR, Tarr C, Strain E, *et al.* Implementation of nationwide real-time whole-genome sequencing to enhance listeriosis outbreak detection and investigation [J]. Clin Infect Dis, 2016, 63(3): 380–386.
- [39] Ruppitsch W, Pietzka A, Prior K, *et al.* Defining and evaluating a core genome multilocus sequence typing scheme for whole-genome sequence-based typing of *Listeria monocytogenes* [J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(9): 2869–2876.
- [40] De BM, Pinholt M, Top J, *et al.* A core genome MLST scheme for high-resolution typing of *Enterococcus faecium* [J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(12): JCM.01946–15.
- [41] Wilson MR, Brown E, Keys C, *et al.* Whole genome DNA sequence analysis of *Salmonella* subspecies enterica serotype *Tennessee* obtained from related peanut butter food-borne outbreaks [J]. PLoS One, 2016, 11(6): e0146929.
- [42] Inns T, Ashton PM, Herrera-Leon S, *et al.* Prospective use of whole genome sequencing (WGS) detected a multi-country outbreak of *Salmonella* *Enteritidis* [J]. Epidemiol Infect, 2017, 145(2): 289–298.
- [43] Saltykova A, Véronique W, Mattheus W, *et al.* Comparison of SNP-based subtyping workflows for bacterial isolates using WGS data, applied to *Salmonella* enterica serotype *Typhimurium* and serotype [J]. PLoS One, 2018, 13(2): e0192504.
- [44] John MJ, Roberta BS, Caroline H, *et al.* Investigation using whole genome sequencing of a prolonged restaurant outbreak of *Salmonella* *Typhimurium* linked to the building drainage system, England, February 2015 to March 2016 [J]. Eurosurveillance, 2017, 22(49): 1–9.
- [45] Allard MW, Luo Y, Strain E, *et al.* High resolution clustering of *Salmonella* enteric serovar *Montevideo* strains using a next-generation sequencing approach [J]. BMC Genomics, 2012, 13(1): 32.
- [46] Hoffmann M, Luo Y, Monday SR, *et al.* Tracing origins of the *Salmonella* bareilly strain causing a food-borne outbreak in the United States [J]. J Infect Dis, 2015, 213(4): 502–508.
- [47] Octavia S, Wang Q, Tanaka MM, *et al.* Delineating community outbreaks of *Salmonella* enterica serovar *Typhimurium* by use of whole-genome sequencing: Insights into genomic variability within an outbreak [J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(4): 1063–1071.
- [48] McDermott PF, Tyson GH, Kabera C, *et al.* The use of whole genome sequencing for detecting antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella* [J]. Antimicrob Agents Chemotherapy, 2016, 60(9): 5515.
- [49] Phillips A, Sotomayor C, Wang Q, *et al.* Whole genome sequencing of *Salmonella* *Typhimurium* illuminates distinct outbreaks caused by an endemic multi-locus variable number tandem repeat analysis type in Australia, 2014 [J]. BMC Microbiol, 2016, 16(1): 211.
- [50] Ford L, Carter GP, Wang Q, *et al.* Incorporating whole-genome sequencing into public health surveillance: Lessons from prospective

sequencing of *Salmonella Typhimurium* in Australia [J]. Food-borne Pathog Dis, 2018, 15(3).

- [51] 李柏生, 柯昌文, 张永慧. 全基因组测序在食源性疾病监控和暴发调查中的应用[J]. 中国食品卫生杂志, 2016, 28(2): 269–272.

Li BS, Ke CW, Zhang YH. Application of whole genome sequencing in food-borne disease surveillance and outbreak investigation [J]. Chin J Food Hyg, 2016, 28(2): 269–272.

(责任编辑: 苏笑芳)

作者简介



伊廷存, 高级工程师, 主要研究方向为食品微生物。

E-mail: yitc_999@126.com