

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2019.01.026

鸡白痢沙门氏菌直接-多重 PCR 检测体系的建立

程玲玲¹, 严伟², 侯若彤², 帅培强¹, 张彪³, 白林含²

(1. 四川省出入境检验检疫局技术中心, 成都 610041;

2. 四川大学生命科学学院 动物疫病防控与食品安全四川省重点实验室, 成都 610065;

3. 成都市食品药品检验研究院, 成都 610045)

摘要: 通过对鸡白痢沙门氏菌毒力质粒 pSPUV 上入侵质粒抗原 J 蛋白和质粒共转移调控因子的编码基因 *ipaJ* 和 *traJ* 的序列分析, 在特异区域设计 PCR 引物, 经沙门氏菌属不同种及常见肠道致病菌的交叉验证, 筛选出三对鸡白痢沙门氏菌特异检测引物 ipaJ-417、traJ-387、traJ-476. 并且调试出一种利用两种 DNA 聚合酶的直接三重 PCR 检测体系: invA-211/traJ-387/16S-495, 可以对鸡白痢沙门氏菌进行快速准确的鉴定.

关键词: 鸡白痢沙门氏菌; 毒力质粒 pSPUV; 特异检测引物; DNA 聚合酶共用反应缓冲液; 直接三重 PCR 检测体系

中图分类号: S852.61

文献标识码: A

文章编号: 0490-6756(2019)01-0149-06

Establishment of a direct multiplex PCR detection system of *Salmonella pullorum*

CHEN Ling-Ling¹, YAN Wei², HOU Ruo-Tong², SHUAI Pei-Qiang¹,

ZHANG Biao³, BAI Lin-Han²

(1. Inspection and Quarantine Technical Center of Sichuan Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Chengdu 610041, China; 2. College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China;

3. Chengdu institutes for food and drug control, Chengdu 610045, China)

Abstract: In this paper, we screened out three pairs of specific detection primers of *Salmonella pullorum*, ipaJ-417, traJ-387, and traJ-476, by the blast analysis of the coding genes ipaJ and traJ which coded the invasion plasmid antigen protein J and plasmid co-transfer regulatory factor in *Salmonella pullorum* virulence plasmid Pspuv. And these PCR primers were designed in special regions and identified in the different species of Salmonella and common intestinal pathogens. And a common reaction buffer of two kinds of DNA polymerase for the direct triple PCR system was also established (invA-211/traJ-387/16S-495). This direct triple PCR system can be used for fast and accurate identification of *Salmonella pullorum*.

Keywords: *Salmonella pullorum*; Virulence plasmid pSPUV; Specific detection primers; Common reaction buffer of DNA polymerase; Direct triple PCR system

收稿日期: 2017-09-29

基金项目: 国家蛋鸡产业技术体系岗位科学家项目(CARS-41-K09)

作者简介: 程玲玲(1964—), 女, 工程师, 研究方向: 食品微生物检测. E-mail: 645872122@qq.com

通讯作者: 白林含. E-mail: bailinhan@scu.edu.cn

1 引言

沙门氏菌是常见的重要人兽共患病原菌,根据沙门菌对不同宿主的侵袭力差异可以分为广嗜性沙门氏菌和宿主专嗜性特异性沙门氏菌^[1]。鸡是沙门菌最主要的宿主,鸡白痢沙门氏菌和鸡伤寒沙门氏菌仅感染鸡和火鸡,具有高度宿主适应性和宿主专嗜性,可以引起雏鸡急性败血症,导致很高的发病率和病死率;鸡白痢是由鸡白痢沙门氏菌血清型感染鸡群引起的,主要是存在于卵巢、睾丸、肝脏等器官,可由感染的父母代鸡传染给雏鸡^[2,3]。2周以下的雏鸡发病后死亡率可达40%~70%,受感染的雏鸡在4~7d死亡,急性时可在1~3d死亡。控制鸡白痢沙门氏菌病最有效的措施是严格管理结合根除计划。因此,快速鉴定和清除感染的父母代鸡群至关重要。及时、准确地检测病原菌和诊断对鸡场有效防治与净化鸡沙门菌病具有重要作用。

传统的沙门菌检测方法是通过细菌分离培养、生化及血清学鉴定,耗时费力,且肠杆菌科细菌间的生化反应多有交叉,灵敏性与特异性受到局限;目前对沙门菌的快速检测多采用免疫学方法、核酸分子杂交及PCR扩增技术等检测抗体和病原^[4-6]。国内外针对沙门氏菌属已建立的单重及多重PCR方法,多用于检测菌株的血清型、毒力因子或耐药基因,而针对沙门氏菌属中特殊致病性种的报道较少^[7-10]。沙门氏菌毒力因子包括菌毛、肠毒素、毒力岛、毒力质粒等。

本研究拟通过对鸡白痢沙门氏菌毒力质粒pSPUV的序列分析,寻找鸡白痢沙门氏菌种特异性靶标,结合沙门氏菌属特异检测靶标,设计多重PCR引物;通过选取两组在应用上可用于免提取DNA直接PCR的聚合酶,利用不同酶适配引物范围的差异,调试配伍共用反应缓冲液、混合酶制剂,达成在多重检测靶的前提下实行免提取直接PCR的反应模式,简化样本前处理流程增加检测通量。以期对鸡源致病性沙门菌的快速检测和流行病学调查提供更有用的技术手段。

2 材料和方法

2.1 材料

2.1.1 菌株 鸡白痢沙门氏菌标准株(CVCC533)、肠炎沙门氏菌 CVCC3377、鼠伤寒沙门氏菌(CVCC2222)、大肠杆菌(CVCC25922)、金黄色葡萄球菌(CVCC25923)购自购自中国兽医药品监

察所;部分菌株分离自四川圣地乐鸡场病鸡,由本室鉴定保存;其它菌株由本实验室保存;

2.1.2 沙门氏菌感染鸡群 由绵阳梓潼圣迪乐养殖场提供,经全血凝集实验鉴定;

2.1.3 试剂 dNTPs、DL2000 Marker 购自 TaKaRa 公司(大连);Taq 酶购自天根公司、DNA Polymerase KOD 购自 TOYOBO 公司、Tfl DNA Polymerase 为 Promega 产品;Buffer 调试所需试剂 Tris-HCl、MgCl₂、(NH₄)₂SO₄、KCl、Triton-X10、BSA、DTT 均为分子生物学级别,购自阿拉丁。

2.1.4 引物合成 由上海生工生物工程公司合成。

2.2 方法

2.2.1 鸡白痢沙门氏菌特异靶标引物设计 在 NCBI GenBank 数据库中下载序列: pSPUV (JN885081), pSGAV(CM001154.1), pSDUV(NC_007208.1), pSCSV(NC_006855.1), pSPCV(NC_012124.1), p14028S(CP001362.1) 和 pSLT(NC_003277.1)。通过 MAUVE 程序搜索 pSPUV 和其它 VP 之间的保守区域和特异区域。分歧程度由 SITES 程序计算,窗口大小为 1000 bp,步长为 100 bp^[11]。在鸡白痢沙门氏菌毒力质粒 pSPUV 的特异区域设计检测引物。

2.2.2 特异引物验证 分别取验证菌株菌液各 200 μ L, 10000 r/min 离心 3 min 后弃上清,用 1 mL 无菌水洗一遍,10000 r/min 离心 3 min 后用 50 μ L 无菌水重悬菌体,煮沸处理 10 min, 12000 r/min 离心 2 min 后上清作为 PCR 模板。PCR 反应体系总体积为 25 μ L, 其中 10 \times PCR buffer 2.5 μ L, dNTPs (2.5 μ mol/L), 特异引物各 0.5 μ L, 模板 1 μ L, Taq 酶 0.5 μ L, 三蒸水补充体积至 25 μ L。PCR 循环参数: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延 50 s, 经 30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 保温 10 min。电泳观察结果。

2.2.3 DNA 聚合酶共用反应 buffer 调试 根据市售商用酶用户手册和宣讲信息选择 DNA 聚合酶 Tfl 和 KOD,以两种酶的反应缓冲液成分参考信息为基础,综合考虑各组分在 PCR 反应中对于特异性、反应效率的贡献水平,按照表 1 配制反应缓冲液系分别进行 PCR,根据扩增效果筛选可供两种 DNA 聚合酶的共用反应缓冲液。

2.2.4 三重 PCR 引物筛选 三重 PCR 引物采用 16S rDNA、沙门氏菌属特异性引物(表 2)以及本文筛选验证的鸡白痢沙门氏菌特异引物组成。根据不同片段长度及扩增效率进行组合筛选。

表 1 DNA 聚合酶不同反应缓冲液
Tab. 1 DNA polymerase chain reaction buffer

编号	倍数	Tris-HCl (mM)	pH	MgCl ₂ (mM)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (mM)	KCl (mM)	Triton-X100 (%)	BSA (%)	DTT (mM)
1	10	200	7.5	80				0.05	5.0
2	10	500	8.3	25	60	100	0.01	0.01	
3	2	240	8.8	4.0	110	100	0.2		
4	2	240	8.0	2.4	12	20	0.2	0.02	
5	10	200	8.0	20	60	100	1.0	0.1	
6	10	200	8.8	20	100	100	1.0		
7	2	240	8.0	4.0	110	100	0.2		
8	2	240	8.8	2.4	12	20	0.2	0.02	
9	10	500	8.3	25	60	100	0.1	1.0	

表 2 本文使用引物
Tab. 2 Primers in this study

Primer	Sequence 5'-3'	Gene size(bp)	来源	用途
fliC-new	5'-CGG CTA CTG GTC TTG GTG GTA CT-3' 5'-GTC ACC TCA CCG TTC GTC TTA TC-3'	157	文献 6	沙门氏菌属特异引物
invA	5'-ATC AGT ACC AGT CGT CTT ATC TTG AT-3' 5'-TCT GTT TAC CGG GCA TAC CAT-3'	211	文献 4	沙门氏菌属特异引物
ipaB	5'-GGA CTT TTT AAA AGC GGC GG-3' 5'-GCC TCT CCC AGA GCC GTC TGG-3'	314	文献 9	沙门氏菌属特异引物
fliC-d	5'-GCT TAA TGT CCA AGA TGC CTA C-3' 5'-GAG CAA CGC CAG TAC CAT CTG-3'	587	文献 7	沙门氏菌属特异引物
spvC	5'-CGG AAA TAC CAT CTA CAA ATA-3' 5'-CCC AAA CCC ATA CTT ACT CTG-3'	669	文献 10/11	沙门氏菌属特异引物
traJ	5'-GCTTTGTTTCGGGAATTGTTC-3' 5'-AGAACTATGACTTAGTCCTGAACTG-3'	387	本文	鸡白痢沙门氏菌特异引物
traJ	5'-TGTTTCGGGAATTGTTCCTG-3' 5'-CAATTCATCCCTGTTACAGACTG-3'	476	本文	鸡白痢沙门氏菌特异引物
ipaJ	5'-GTTGCTGCTAAAGAGCTTGAAT-3' 5'-TCGCTGAAGCACCCAGTGTA-3'	417	本文	鸡白痢沙门氏菌特异引物
16S	5'-GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3' 5'-GWA TTA CCG CGG CKG CTG-3'	495	通用引物	PCR 体系验证引物

2.2.5 三重 PCR 体系设置 PCR 体系选用 25 μ L 体系,各个组分如表 3,基础 PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,56 $^{\circ}$ C 退火 20 s,72 $^{\circ}$ C

延伸 1 min 20 s.共 30 个循环.根据扩增效果,分别调整各引物浓度、两种 DNA 聚合酶的添加比例以及退火温度等.

表 3 三重 PCR 反应体系(μ L)
Tab. 3 Triple PCR reaction system(μ L)

2 \times buffer	Enhancer	dNTP	P1	P2	P3	P4	P5	P6	Polymerase	Modle
12.5	5	2	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1	1.0

PCR enhancer(5 \times):Betaine 2.7M,DTT 6.7mM,DMSO 6.7%,BSA 55 μ g/mL;P1、P2 为 16S 引物;P3、P4 为沙门氏菌属特异引物;P5、P6 为鸡白痢沙门氏菌特异引物.

2.2.6 三重 PCR 体系灵敏度检测 取 CVCC533 菌株经平板划线纯化过夜培养,菌液用细菌计数板

计数,通过稀释控制浓度于 $1 \times 10^8 \sim 3 \times 10^8$ /mL.再取 200 μ L 菌液入 EP 管中,并加入 1 mL 水,按

6 倍梯度稀释,共设 8 个梯度;菌液按梯度稀释好后 10000 r/min 离心 2 min 后弃上清,再用 50 μ L 无菌水重悬菌体,煮沸处理 10 min,最后 12000 r/min 离心 2 min 后上清作为 PCR 模板。同时每管梯度稀释菌液充分混匀后皆取 10 μ L 涂平板,培养 24 h 后进行菌落计数。

2.2.7 养殖场鸡群的 PCR 检测 圣迪乐养殖场鸡群按全血平板凝集试验的方法筛选的感染沙门氏菌的阳性鸡,用消毒棉签通过泄殖腔采样后放入 LB 培养液试管中保存运输。1200 r/min 离心后去上清,加入灭菌水,混匀。沸水煮 10 min,1200 r/min 离心取上清做模板,按照 2.2.5 的反应体系进行 PCR。

3 结果

3.1 特异引物设计及验证

3.1.1 pSPUV 序列分析及特异引物设计 通过对鸡白痢沙门氏菌特殊质粒 pSPUV 上入侵质粒抗原 J 蛋白和质粒共转移调控因子的编码基因 *ipaJ* 和 *traJ* 的 BLAST 分析,在特异区域设计 PCR 引物(表 2)。

3.1.2 鸡白痢引物特异性验证 图 1-A 可见,引物 *traJ*-476 在鸡白痢沙门氏菌标准株中均能扩增出单一清晰条带,而在沙门氏菌其它种以及肠道菌中目标位置皆没有出现条带。在提高退火温度至 59 $^{\circ}$ C 退火 15s 时,原来肠炎沙门氏菌、福氏志贺菌、甲型副伤寒沙门氏菌和 S17-1 的非特异性条带都已消失,而对照菌株 CVCC528 在 476bp 处条带很亮且单一。

引物 *ipaJ*-417 在 CVCC528 未出现目的条带,具有偶然性,原因未明,此外,在 8 $^{\#}$ 肠炎沙门氏菌、9 $^{\#}$ 福氏志贺菌;12 $^{\#}$:鸡白痢沙门氏菌和 14 $^{\#}$ S17-1 中出现可不同程度的非特异扩增,在退火温度为 59 $^{\circ}$ C 退火 15s 时,原来 8 $^{\#}$ 肠炎沙门氏菌、9 $^{\#}$ 福氏志贺菌、12 $^{\#}$ 鸡场分离菌(已鉴定不是鸡白痢沙门氏菌)和 S17-1 的非特异性条带都已消失,而对照菌株 CVCC528 在 417bp 处条带很亮且单一。

引物 *traJ*-387 在 8 $^{\#}$ 肠炎沙门氏菌在非主带位置出现一条非特异条带外,其他非鸡白痢菌中都没有非特异扩增,进一步提高退火温度 57 $^{\circ}$ C~60 $^{\circ}$ C 15~20 s,58 $^{\circ}$ C 退火 15s 时,非特异条带变淡但没有消除,而到了 60 $^{\circ}$ C 退火 15 s 时,非特异条带仍然没有消除,且标准株中的特异条带亮度变暗,因此最适退火温度仍为 58 $^{\circ}$ C。

从图中看,设计的三对引物在鸡白痢沙门氏菌

标准株中均能扩增出单一清晰条带,而在沙门氏菌其它种以及肠道菌中目标位置皆没有出现条带,且通过提高退火温度降低了非特异扩增,说明以上引物具备特异性,可以作为鸡白痢沙门氏菌的特异检测引物。

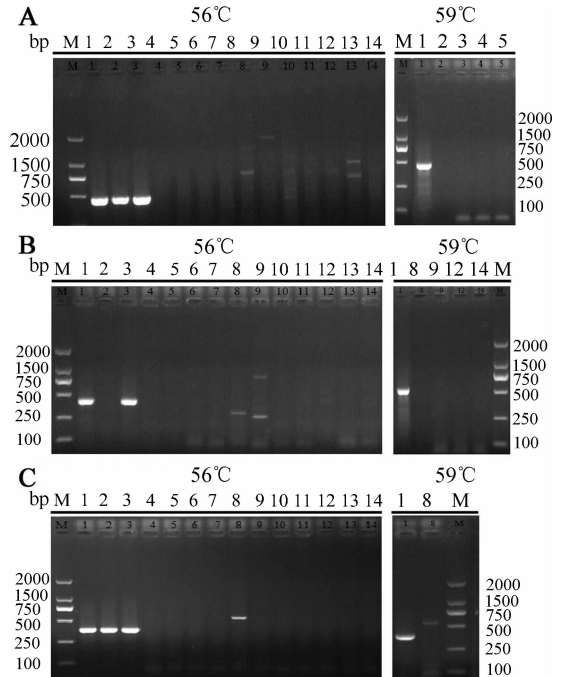


图 1 鸡白痢沙门氏菌特异引物验证

Fig. 1 Confirmation of *Salmonella pullorum* specific primers

A: *traJ*-476; B: *ipaJ*-417; C: *traJ*-387; 1: 鸡白痢沙门氏菌 CVCC533; 2: 鸡白痢沙门氏菌 CVCC528; 3: 鸡场分离菌 a(鉴定为鸡白痢沙门氏菌); 4: 大肠杆菌 JM-109; 5: 大肠杆菌 BL-21; 6: 大肠杆菌 JM-CPR; 7: 大肠杆菌 DH-5 α ; 8: 肠炎沙门氏菌; 9: 福氏志贺菌; 10: 甲型副伤寒沙门氏菌; 11: 鼠伤寒沙门氏菌; 12: 鸡场分离菌 b(鉴定不是鸡白痢沙门氏菌); 13: 鸡场分离菌 c(鉴定不是鸡白痢沙门氏菌); 14: 大肠杆菌 S17-1

3.2 多重 PCR 体系的设置

3.2.1 混合酶共用 PCR 反应缓冲液筛选 将两种不同的 DNA 聚合酶 Tfl 和 KOD 用不同配方的反应缓冲液进行 PCR 扩增效果比较(图 2),buffer 3 $^{\#}$ 和 7 $^{\#}$ 都能够使分属于不同家族的 DNA 聚合酶同时发挥较好的扩增作用,buffer 3 $^{\#}$ 效果最好。因此,后续实验将 buffer 3 $^{\#}$ 作为混合酶的 PCR 反应 buffer。

3.2.2 三重 PCR 检测体系 三重 PCR 引物采用 16S rDNA、沙门氏菌属特异性引物以及本文筛选验证的鸡白痢沙门氏菌特异引物(表 2)组成,筛选到最佳引物组合为 *invA*-211/*traJ*-387/16S-495。在样品预处理和扩增预变性的温度上做了调整,样品预处理为煮沸 8 min,预变性的温度为 95 $^{\circ}$ C,

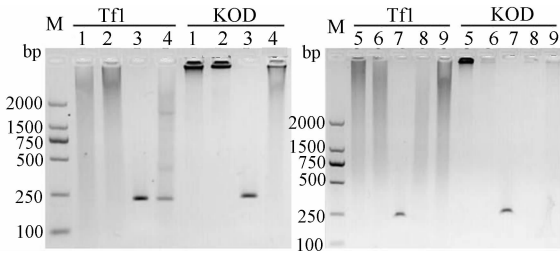


图 2 不同配方的共用反应缓冲液 PCR 扩增效果
Fig. 2 PCR amplification results of different common reaction buffer

56 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 1 min 20 s, 共 30 个循环. 三对引物浓度比为 *invA*-211 : *traJ*-387 : 16S-495:1 : 0.5 : 1; 混合酶浓度比 Tfl : KOD:10 : 1.

3.2.3 三重 PCR 检测体系灵敏度测试 由图 3 可知,泳道 7、8 分别为模板稀释 46656 ×、279936 ×,三重 PCR 的条带依然可见. 其中第 7、8 泳道细菌涂布结果有效计数分别为 11 个和 2 个菌落,则该模板菌液中的活菌浓度分别为: 1.1×10^3 CFU/mL、 2×10^2 CFU/mL. 所以该三重 PCR 检测限为小于 1000 CFU/mL,可以快速准确的实现低浓度沙门氏菌样本的检测.

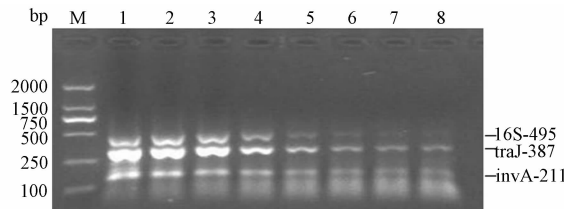


图 3 模板不同稀释度三重 PCR 扩增效果
Fig. 3 PCR amplification effects of different dilutions of the template
M: maker; 1~8 分别为模板稀释倍数: 6 ×、36 ×、216 ×、1296 ×、7776 ×、46656 ×、279936 ×

3.2.4 养殖场鸡群测试结果 由图 4 可知,各泳道均扩增出沙门氏菌属特异条带,8[#]/10[#]/12[#] 样品由于未扩增出 16S 条带,证明模板处理不合格,为确保避免假阳性结果出现,进行了重复验证试验,扩增出 16S 和沙门氏菌属特异条带(结果未呈现). 证明所有全血平板凝集试验的阳性鸡利用本检测方法结果均为阳性,判定为沙门氏菌感染. 其中 1[#]~7[#] 和 11[#] 样品扩增出鸡白痢沙门氏菌特异条带,可以判定为鸡白痢沙门氏菌感染.

4 讨论

目前包括我国在内的许多国家对沙门氏菌这类致病菌的检验大多仍沿用传统的细菌培养及免疫鉴定等方法,检验步骤繁琐,检验周期较长,而且

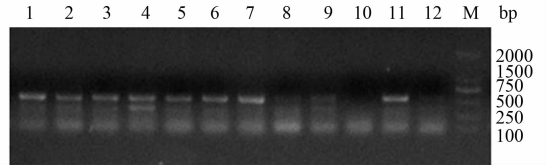


图 4 养殖场鸡群直接多重 PCR 检测结果
Fig. 4 Direct multiple PCR detection results of chicken farms

检测的灵敏度也较低. 尤其是在应对突发公共卫生事件上,不能够满足诊断及时、结果准确、敏感性和特异性高的要求. 利用 PCR 方法对致病菌进行检测在敏感性、特异性与速度上都具有很大优势^[12]. 检测的准确性取决于所选择的扩增靶序列是否为其待检菌高度保守的特异性片段,灵敏度的提升对 DNA 聚合酶的模板抓捕能力有较高的要求,同时对检测样品前处理的简化是进一步提高检测速度的手段,对 DNA 聚合酶耐受能力也需要有较高要求. 本实验即是从以上几个方面共同优化建立了免培养、免 DNA 提取直接多重 PCR 检测方法.

沙门氏菌毒力质粒的遗传方式大部分是垂直遗传^[10]. 迄今为止,八种血清型沙门氏菌,即 Abortusovis, Choleraesuis, Paratyphi C, Dublin, Enteritidis, Gallinarum / Pullorum, Sendai 和 Typhimurium 含有毒力质粒,目前发现只有肠炎沙门氏菌通过水平转移获得 pSENV. 这些事实强烈地表明垂直传输是沙门氏菌获得毒力质粒的主要方式. 因此本文通过对鸡白痢沙门氏菌毒力质粒 pSPUV 进行序列比对,寻找遗传稳定的特异靶标.

传统 PCR 技术以及在此基础上衍生出来的各项新技术新应用,都有一个前提,就是需要事先获得高纯度的核酸模版. 任何生物学样本,都需要经过一些列复杂繁琐的样品处理,才能够获得符合 PCR 技术要求的核酸样本. 因此,简化前处理、不进行核酸分离提取,直接以组织样本为对象,加入目标基因引物进行 PCR 反应直接 PCR 技术,将极大加快检测速度,但同时 DNA 聚合酶及酶反应 buffer 都有更高的要求. 高保真 DNA 聚合酶 KOD 和 Pfu 均具有极高的环境耐受能力,可针对低丰度模板和非纯核酸样本进行直接 PCR 的能力. 本文选择 KOD 作为直接 PCR 反应体系的基础 DNA 聚合酶.

KOD 来自 *Pyrococcus* sp., 可以粗样品为模板进行 DNA 扩增,具有高保真性,有强的校正功能的 DNA 聚合酶^[13]. 3' → 5' 外切活性强,酶浓度

稍高就可能扩不出片段,使其扩增效果不不稳定,在本文中考虑混合酶系来解决问题. TFL 酶属于 DNA 聚合酶 A 家族,与 KOD 相比具有更强的扩增效率. 不同家族 DNA 聚合酶最适反映条件是不同的,本文筛选出两个酶的共用缓冲液,使得 KOD/TFL 混合酶体系中的两个酶均能发挥较高的效率,样本低丰度时,由 KOD 启动扩增,此时 3'→5' 外切活性很难发挥,后续扩增由 TFL 接力完成.

本文建立的三重 PCR 检测体系可以简化样品前处理程序,进行免核酸提取的直接 PCR 检测,检测限为小于 1000 CFU/mL,可以对普通沙门氏菌感染及鸡白痢沙门氏菌感染进行快速准确的鉴定. 同鸡场现行采用的全血凝集实验相比,无需采血,采样操作明显简化,而且对鸡群的扰动也降至最低. 同时本文建立的混合 DNA 聚合酶反应体系,可以推广至不同粗糙样本及低浓度核酸样本检测.

参考文献:

- [1] Xiong D, Song L, Geng S Z, *et al.* One step PCR detection of *Salmonella pullorum*/gallinarum using a novel target: the flagellar biosynthesis gene flhB [J]. *Front Microbiol*, 2016, 22: 1863.
- [2] Geng S Z, Jiao X A, Barrow P, *et al.* Virulence determinants of *Salmonella gallinarum* biovar pullorum identified by PCR signature-tagged mutagenesis and the spiC mutant as a candidate live attenuated vaccine [J]. *Vet Microbiol*, 2014, 168: 388.
- [3] Souza A I, Neto O C, Batista D F, *et al.* ERIC-PCR genotyping of field isolates of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *gallinarum* biovars *gallinarum* and *pullorum* [J]. *Avian Pathol*, 2015, 44: 475.
- [4] Majchrzak M, Krzyzanowska A, Kubiak A B, *et al.* TRS-based PCR as a potential tool for inter-serovar discrimination of *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. infantis*, *S. virchow*, *S. hadar*, *S. newport* and *S. anatum* [J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41: 7121.
- [5] Shah D H, Park J H, Cho M R, *et al.* Allele-specific PCR method based on rfb S sequence for distinguishing *Salmonella gallinarum*, from *Salmonella pullorum*: serotype-specific rfb S sequence polymorphism [J]. *J Microbiol Methods*, 2005, 60: 169.
- [6] Cheraghchi N, Khaki P, Moradi B S, *et al.* Identification of isolated *Salmonella enterica* serotype *gallinarum* biotype *pullorum* and *gallinarum* by PCR-RFLP [J]. *Jundishapur J Microbiol*, 2014, 7: 19135.
- [7] Mølbak K. Human health consequences of antimicrobial drug-resistant *Salmonella* and other food-borne pathogens [J]. *Clin Infect Dis*, 2005, 41: 1613.
- [8] Shanmugasundaram M, Radhika M, Murali H S, *et al.* Detection of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* by selective amplification of *fliC*, *fljB*, *iroB*, *invA*, *rflJ*, *STM2755*, *STM4497* genes by polymerase chain reaction in a multiplex and multiplex format [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2009, 25: 1385.
- [9] Kumar S, Balakrishna K, Batra H V. Detection of *Salmonella enterica* serovar *Typhi* (*S. Typhi*) by selective amplification of *invA*, *viaB*, *fliC-d* and *prt* genes by polymerase chain reaction in multiplex format [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2006, 42: 149.
- [10] 宋雪, 赵格, 刘文化, 等. 不同来源沙门氏菌的毒力基因检测与耐药性分析 [J]. *中国动物检疫*, 2017, 34: 40.
- [11] Feng Y, Liu J, Li Y G, *et al.* Inheritance of the *Salmonella* virulence plasmids: Mostly vertical and rarely horizontal [J]. *Infect Genet Evol*, 2012, 12: 1058.
- [12] 张萍, 冯芳. 沙门氏菌的检测技术和方法的研究进展 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2015, 6 (5): 1834.
- [13] Kitabayashi M, Nishiya Y, Esaka M, *et al.* Gene Cloning and Polymerase Chain Reaction with Proliferating Cell Nuclear Antigen from *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2002, 66: 2194.

引用本文格式:

中文: 程玲玲, 严伟, 侯若彤, 等. 鸡白痢沙门氏菌直接-多重 PCR 检测体系的建立 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2019, 56: 149.

英文: Chen L L, Yan W, Hou R T, *et al.* Establishment of a direct multiplex PCR detection system of *Salmonella pullorum* [J]. *J Sichuan Univ: Nat Sci Ed*, 2019, 56: 149.