

综述

多位点可变数量串联重复序列分析在细菌分子分型中的应用

王晔茹¹,徐潇²,崔生辉²,李凤琴¹

(1. 国家食品安全风险评估中心 卫生部食品安全风险评估重点实验室,北京 100021;

2. 中国食品药品检定研究院,北京 100050)

摘要:多位点可变数量串联重复序列分析(multiple-locus variable number tandem repeat analysis, MLVA)是通过基因组中可变数量串联重复序列(variable number tandem repeat, VNTR)的特征来实现分型的分子分型技术,其特征是简单、快速、通量高、分辨力强,目前已广泛用于多种细菌分子分型。本文就 MLVA 技术的原理、在细菌分子分型中的应用及与其他分型方法的比较进行综述。

关键词:多位点可变数量串联重复序列分析;分子分型;细菌

中图分类号:R155;TS201.3 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2013)02-0185-05

Application of multiple-locus variable number tandem repeat analysis in bacterial molecular typing

Wang Yeru, Xu Xiao, Cui Shenghui, Li Fengqin

(Key Lab of Food Safety Risk Assessment of Ministry of Health, China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective Multiple-locus variable number tandem repeat analysis (MLVA) is a molecular subtyping technique characterized by the trait of variable number tandem repeat (VNTR). This method is simple and rapid with high-throughput and great capability to distinguish different strains, and has been widely used in molecular typing of a variety of bacteria. The principle, application and the comparison of MLVA with other approaches in bacterial molecular typing were reviewed.

Key words: Multiple-locus variable number tandem repeat analysis; molecular typing; bacterium

细菌分型是指通过一定的实验方法对属于同一种或亚种的细菌分离株进行遗传特征分析,并结合分离菌株的流行病学资料,阐明被分析菌株间的遗传关系^[1-2]。目前用于细菌分型的方法主要包括传统的表型分型方法和基于 DNA 序列的基因分型方法两大类。表型分型方法主要包括生化分型、血清学分型、抗生素敏感性分型、噬菌体分型等传统的分型方法。基于 DNA 序列的细菌基因分型方法包括质粒分析、染色体 DNA 限制性酶切分析、DNA 探针杂交、脉冲场凝胶电泳分析(pulsed field gel electrophoresis, PFGE)^[3]、聚合酶链式反应、核酸序列测定等,是目前在核酸和分子水平上鉴定细菌的主要手段。优秀的细菌分型方法应具备分辨力强、

重复性好、操作简便、便于进行实验室间数据比较和实验室间推广等特点^[4]。在诸多基于 DNA 序列的分型方法中,多位点可变数量串联重复序列分析(multiple-locus variable number tandem repeat analysis, MLVA)方法作为一种新兴的细菌分子分型方法正在细菌分子流行病学领域得到逐步认可和完善。本文就 MLVA 技术在细菌分子分型中的应用进行综述。

1 MLVA 技术的原理

MLVA 是通过基因组中可变数量串联重复序列(variable number tandem repeat, VNTR)的特征来实现对细菌的分型,并以简单、快速、通量高、分辨力强等特点得到广泛应用^[5-6]。VNTR 是存在于生物染色体中由短片段 DNA 序列头-尾串联重复组成的重复 DNA 片段,其重复的次数在不同个体间存在高度的可变性,对不同可变位点重复序列重复次数的准确测定可用于生物的个体识别^[4-7]。VNTR 位点由中间的核心区和外围的侧翼区组成,核心区含有两个或两个以上头尾

收稿日期:2013-02-04

基金项目:国家高技术研究发展计划(863 计划:2012AA101603)

作者简介:王晔茹 女 博士生 研究方向为食品微生物 E-mail: ruru-19830916@163.com

通信作者:李凤琴 女 研究员 研究方向为食品微生物 E-mail: lifengqin0224@gmail.com

串联重复的短片段 DNA 序列,每个重复片段长度约 6~40 bp,重复次数在几次至几百次不等^[8],VNTR 的多态性主要来自串联重复序列重复次数不同。同一种属的细菌之间表现为侧翼区相似而串联重复片段的重复次数不等,通过多重 PCR 方法对细菌染色体上多个 VNTR 位点进行扩增,并结合毛细管电泳方法精确测定 VNTR 位点的重复次数,而后通过聚类软件(如 Bionumerics 软件)对不同菌株 VNTR 位点重复次数进行聚类分析,以确定不同菌株间的亲缘进化关系^[9]。

2 MLVA 技术在细菌分型中的应用

MLVA 技术面世十余年,发展较快,已由最初应用于生物恐怖病原体的跟踪溯源^[4,10],逐渐扩展到对常见细菌的分型和流行病学溯源上。

2.1 炭疽芽孢杆菌

炭疽芽孢杆菌是危害极其严重的生物恐怖病原菌。MLVA 技术在 20 世纪 90 年代最先应用于炭疽芽孢杆菌的分型。炭疽芽孢杆菌经典的 8 位点 VNTR 分析(MLVA-8)包括炭疽芽孢杆菌染色体上的 6 个基因 *vrnA*、*vrnB₁*、*vrnB₂*、*vrnC₁*、*vrnC₂* 和 *CG3*,以及位于 pXO1 和 pXO2 质粒上的两个基因 *pXO1* 和 *pXO2*。随着 VNTR 位点数量的增加和后续分析方法的改进,MLVA 对炭疽芽孢杆菌的分辨力和重复性在逐渐提高,已是目前炭疽芽孢杆菌公认的标准分型技术^[10-11],为生物恐怖疫情爆发时炭疽芽孢杆菌的快速鉴定溯源提供了有力工具。

2.2 鼠疫耶尔森菌

鼠疫耶尔森菌引起的鼠疫是我国法定的甲类传染病,也是第二次世界大战期间日本和德国使用过的细菌武器。MLVA 技术自 2000 年开始应用于鼠疫耶尔森菌的分型中,目前已报道了针对鼠疫耶尔森菌的多种 VNTR 位点^[12-13]。国内有学者用 MLVA 方法结合现场流行病学调查,对云南玉龙的突发鼠疫疫情进行了溯源分析,结果显示云南玉龙菌株 16 个 VNTR 位点的重复数完全相同,为同一 MLVA 型,提示它们来源相同。同时聚类结果显示,云南玉龙菌株与青藏高原型菌株的亲缘关系更为接近,为进一步确定当地潜在鼠疫疫源地的性质和感染来源提供了科学依据^[14]。

2.3 结核分枝杆菌

结核分枝杆菌引起的结核病至今仍是世界范围内的重要传染病,MLVA 技术在结核分枝杆菌分型上应用,有利于结核病流行中对传染源的追溯及分析流行趋势^[15]。目前,美国疾病预防控制中心已建议将 MLVA 作为结核分枝杆菌基因分型的首选方法^[16]。国内很多研究集中在 MLVA 与其他基因分型方法在结核

分枝杆菌分型的对比研究上。如有研究评价 MLVA 的 15 位点组合在北京基因型结核分枝杆菌(MTB)基因分型研究中具有重要的应用价值。研究通过采用 MLVA (15 位点)对来源于北京胸科医院的 72 株北京基因型 MTB 菌株进行基因分型。并将结果与金标准 IS6110 限制性片段多态性分析的分型结果进行比较。结果显示 MLVA(15 位点)分型后共得到 59 个类型,其中 53 个为独特类型,其总体分辨力为 0.990。据此认为 MLVA(15 位点)在北京基因型菌株中具有较好的分辨能力^[17]。

2.4 志贺氏菌

志贺氏菌是导致人类细菌性痢疾的病原菌。志贺氏菌 MLVA 的研究主要集中在筛选适用于志贺氏菌不同血清群分子分型的 VNTR 位点上。对从 2001—2009 年北京地区痢疾监测中收集到的志贺氏菌菌株 18 个 VNTR 位点进行多态性筛选。根据每年监测到的菌株数量和血清型别按 15% 的比例抽取,共选择 180 株菌株,其中宋内志贺氏菌 50 株,福氏志贺氏菌 130 株。经筛选保留 10 个 VNTR 位点(sh1~sh10)分成 3 组以多重 PCR 方法进行检测,利用毛细管片段分析对 180 株菌株进行检测和 MLVA 分子分型。结果显示,筛选的 10 个 VNTR 位点在 180 株志贺氏菌菌株中等位基因数目为 2~11 种,多态性分辨系数(*D* 值)为 0.158~0.766。在不同血清群间,10 个位点的多态性不同,其中 sh6 在福氏志贺氏菌、sh2 和 sh3 在宋内志贺氏菌中均只有 1 种等位基因。180 株志贺氏菌分成 84 种 MLVA 型别,*D* 值为 0.967(95% *CI*:0.956~0.978),其中 130 株福氏志贺氏菌分成 63 种型别,命名为 TF001~TF063,其中 TF001、TF002 和 TF005 为主要型别,分别包含 17、16 和 15 株菌株;50 株宋内志贺氏菌分成 21 个型别,命名为 TS001~TS021,而 TS002 和 TS001 为主要型别,分别包含 14 株和 7 株菌株。据此初步建立了志贺氏菌 10 个 VNTR 位点的 MLVA 分型方法。通过 MLVA 分析,揭示志贺氏菌北京分离株分子型别比较分散,存在多克隆来源^[18]。

2.5 沙门氏菌

到目前为止,MLVA 已应用于沙门氏菌众多血清型的分型研究中,包括伤寒沙门氏菌,甲型副伤寒沙门氏菌及其他食源性非伤寒沙门氏菌。2003 年首次报道 MLVA 技术应用于沙门氏菌的分型中,其中对鼠伤寒沙门氏菌、肠炎沙门氏菌的分型报道较多^[19]。Torpdahl M 等^[20]研究了 1 019 株人源鼠伤寒沙门氏菌分离株,用 PFGE 方法将其分为 148 型,用 MLVA 方法则分为 373 型,因此认为 MLVA 方法在鼠伤寒沙门氏菌的常规监测和暴发调查中优于 PFGE。同时该研究小组用 MLVA 方法对丹麦

一起鼠伤寒沙门氏菌暴发事件病原体进行了分析,结果发现人源分离株与猪屠宰场分离株的 MLVA 型一致,从而追踪到这起暴发事件的源头^[21]。Ethelberg 等人^[22]用 MLVA 技术对丹麦另一起鼠伤寒沙门氏菌耐药株引起的暴发事件进行调查,发现病人分离株与食物来源分离株高度相关,进而判断中毒载体为进口的生牛肉片。因此 MLVA 技术在追查食品中沙门氏菌污染来源、确定传播途径等方面具有重要价值。

2.6 在其他细菌分型中的应用

伴随着 MLVA 技术在生物恐怖病原菌和食源性致病菌分子分型中的广泛应用,从 2003 年开始,逐渐有研究报道 MLVA 技术广泛应用于铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、钩端螺旋体、流感嗜血菌、尿肠球菌、麻风分枝杆菌、脑膜炎奈瑟球菌、土拉热弗朗西丝菌、布鲁氏菌等病原体的分型中^[10,23-27]。

3 MLVA 技术的标准化

鉴于具有简单、快速、通量高、分辨力强等特点的 MLVA 技术在目前的细菌分型中表现出显著的优势,美国疾病预防控制中心已将 MLVA 方法列为 PulseNet 中仅次于 PFGE 的第二大重要分子分型方法。为了保证结果的重现性以及实验室间分析数据的可比性,PulseNet 针对几种目的细菌制定了一套完整的标准操作程序,包括试剂的供应商、试剂的配制、电泳仪的选用以及工作条件等,标准化程序涉及 MLVA 过程的各个方面,通过严格的程序和质量控制,来实现结果的高重现性。目前,美国疾病预防控制中心已公布针对 O157 产志贺毒素大肠杆菌,鼠伤寒沙门氏菌和肠炎沙门氏菌 MLVA 分析的标准化程序。此外,单核细胞增生李斯特菌的 MLVA 分析标准化方法也在确证过程中。近期待完

成 MLVA 方法标准化的细菌包括纽波特沙门氏菌、宋内志贺氏菌和不产志贺毒素的大肠杆菌 O157^[28-33]。该网络利用标准化的细菌实验室分子分型技术,通过分布于各地的网络实验室实际检测和监测,建立网络平台,及时交流和比对数据,从而识别传染病发生的关联,调查暴发流行,快速鉴定暴发的来源^[34]。PulseNet China 对 MLVA 在国内的标准化工作也在有序进行中。

4 MLVA 分型方法与其他方法的比较

MLVA 的辨别力可通过计算生物种群的辛普森多样性指数 (simpson's diversity index, SID) 来衡量。Elberse 等^[35]对肺炎球菌的研究显示,263 株肺炎球菌被分到 164 个型别中,每一型别包含 1~14 株菌株不等,MLVA 的 SID 为 0.993,高于 PFGE (0.985) 和多位点序列分型 (multi-locus sequence typing, MLST) (0.987)。

不同分型方法间分型结果的一致性可以用 Wallace 系数来评价,这个系数表示被一种分型方法分到同一型别的两个菌株,被另一种方法也分到同一型别的可能性。由表 1 可见,采用不同方法对肺炎球菌进行分型,MLST 和 MLVA 分型结果间具有很好的定向相关性:两个菌株有相同的 MLVA 分型 (MT) 和 MLST 分型 (ST) 的概率为 87.4%,这一数值对预测 MLST 克隆系甚至更高,达到 99.5%。MLVA 与其他分型方法相应的 Wallace 系数是:血清分型 82.2%,PFGE 分型 46.5%。相比之下,两株菌株同时具有相同 MLST 分型和 MLVA 分型的可能性为 43.3%,而具有相同 MLVA 克隆系的几率为 99.2%。而血清分型和 PFGE 分型得到的数值较低,这些差异可用 MLVA 方法比其他方法具有更高的分型能力来解释。

表 1 使用 Wallace 系数对不同分型方法对肺炎球菌分型结果的比较^[35]

Table 1 Congruence between typing methods expressed by Wallace coefficients for *Streptococcus pneumoniae*^[35]

分型方法	血清分型	PFGE	MLST	MLST 克隆系	MLVA	MLVA 克隆系
血清分型		0.091 (0.064-0.118)	0.187 (0.132-0.242)	0.343 (0.279-0.407)	0.087 (0.053-0.122)	0.631 (0.553-0.710)
PFGE	0.386 (0.329-0.442)		0.325 (0.273-0.376)	0.550 (0.493-0.607)	0.209 (0.157-0.261)	0.718 (0.649-0.786)
MLST	0.875 (0.848-0.902)	0.358 (0.276-0.439)		1.000 (1.000-1.000)	0.433 (0.316-0.550)	0.992 (0.983-1.001)
MLST 克隆系	0.575 (0.526-0.623)	0.232 (0.180-0.284)	0.419 (0.356-0.481)		0.202 (0.140-0.263)	0.881 (0.849-0.912)
MLVA	0.822 (0.779-0.865)	0.465 (0.396-0.535)	0.874 (0.825-0.923)	0.995 (0.991-1.000)		1.000 (1.000-1.000)
MLVA 克隆系	0.769 (0.717-0.822)	0.295 (0.224-0.366)	0.582 (0.486-0.679)	0.998 (0.997-0.000)	0.295 (0.199-0.391)	

注:括号内数字为 Wallace 系数的 95% 可信区间。

5 MLVA 技术的优缺点

虽然传统的表型分型方法具有较长的使用历史和大量的数据积累,在细菌流行病学调查和分型分析中仍占有重要的地位,但由于此类方法所提供的遗传学信息有限,且耗时费力,已远不能满足目前疾病爆发的流行病学调查需求。而直接基于 DNA 序列的分型方法由于其分型能力可随着分析

位点的增加而增强、数据可以直接电子化、实验结果可在实验室间直接比对等特征而得到飞速发展^[4]。近年来,基于核酸序列的各种微生物分子分型方法发展极为迅速,但是存在 DNA 纯度要求较高、成本较高、实验室间可比性差等缺点。MLVA 技术与其他几种分子分型技术在病原微生物分型中的比较情况见表 2。

表 2 几个重要分子分型技术关键特征比较^[2]

Table 2 Comparison of the key attributes of the most important sequence-based methods^[2]

技术	分辨力	稳定性	实验室间可比性	数据的客观性	通量
脉冲场凝胶电泳分析	强	强	中等	中等	中等
多位点序列分析	中等	强	强	强	中等
MLVA	强	强	强	强	高
固相基质微阵列	强	强	强	强	高
液相微阵列	强	强	强	强	高
全基因组测序	强	强	强	中等	中等
基质辅助激光解析电离飞行时间质谱	中等	强	强	强	高

与其他分子分型方法相比,MLVA 技术具有以下优点,①实验设计方便易行:由于相应序列分析软件的开发及数据库的不断完善,通过软件分析即可在较短时间内完成实验设计;②实验操作简便快速:MLVA 方法是通过 PCR 扩增 VNTR 位点,由毛细管电泳分析重复序列的拷贝数,整个过程可在数小时内完成,且可以实现高通量分析;③提供数字化的实验结果,便于实验室间比对。总之,MLVA 技术简单、快速、通量高、分辨力强是其他分子分型技术所无法比拟的。

虽然 MLVA 技术在不同种属细菌的分型中应用广泛,但其本身存在一些缺点限制了它的应用,①高质量特异性引物的设计。鉴于已报道的全基因组序列菌株未能囊括同一属种内更多亚种或者不同血清型,导致较难设计出特异性较好的引物。MLVA 的引物设计首先需要全基因组序列信息。目前,同一种细菌已公布的参考菌株全基因组序列太少,而不同种属菌株的侧翼区多态性较高,从而较难设计出与侧翼区相匹配的特异性较好的引物,因此 PCR 反应过程中会存在一些交叉反应,有扩增干扰和重复数确定干扰等现象发生。同时由于导致疾病爆发的病原体基因中,可能有碱基的缺失或插入等突变,因此,结果解释需慎重^[9-10]。②采用不同仪器和电泳方法得到的实验结果间还不具有可比性。目前,美国 PulseNet 中已将 Beckman Coulter CEQTM 8000/8800 和 Applied Biosystems Genetic Analyzer 3130xl 和 3730xl 平台的结果标准化。而用 Beckman Coulter CEQTM GeXP 和 Applied Biosystems Genetic Analyzer 3500 和 3500xl 仪器的分析结果与前几种已标准化的数据不具有可比性^[36]。因此,提

高结果可比性的研究是未来工作的重点。③标准物质的应用。目前,美国 PulseNet 中 MLVA 的标准化程序主要通过标准化实验流程和实验设备来实现。这点区别于 PFGE 通过标准菌株 (*Salmonella brandrup* 9812) 的应用来实现实验方法的标准化。如未来可建立针对 MLVA 实验的标准菌株,可更大程度上简化实验的标准化控制,有利于 MLVA 技术在不同实验室中推广应用。

6 展望

MLVA 技术以其操作简便、快速,高通量等优点在细菌分型中得到广泛应用。随着细菌全基因组序列的公布,越来越多的细菌 VNTR/MLVA 数据库在逐渐建立和完善。为更便于数据比较和分析,未来 MLVA 技术应着重进行不同分析仪器、实验标准操作规程及标准菌株的应用研究,以便构建全球或地区统一的 MLVA 分型数据库,使 MLVA 技术在细菌分型方面发挥更大的作用。

参考文献

- [1] 严杰,钱利生,余传霖. 临床医学分子细菌学[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:7-10.
- [2] Hyytiä-Trees E K, Cooper K, Ribot E M, et al. Recent developments and future prospects in subtyping of foodborne bacterial pathogens[J]. Future Microbiol, 2007, 2(2):175-185.
- [3] 孙贵娟,黄彦,唐振柱,等. 广西香港海鸥菌分离菌株脉冲场凝胶电泳分子分型研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2011, 23(6):494-496.
- [4] 杨瑞馥,宋亚军. 微生物法医学:理论与技术[M]. 北京:化学工业出版社,2005:34.
- [5] Ramisse V, Houssu P, Hernandez E, et al. Variable number of tandem repeats in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* for typing

- purposes[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(12):5722-5730.
- [6] Liu Y, Lee M A, Ooi EE, et al. Molecular typing of *Salmonella enterica* serovar typhi isolates from various countries in Asia by a multiplex PCR assay on variable-number tandem repeats [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(9):4388-4394.
- [7] Klevytska AM, Price LB, Schupp JM, et al. Identification and characterization of variable-number tandem repeats in the *Yersinia pestis* genome [J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(9):3179-3185.
- [8] 唐学明. 数目可变的串联重复顺序(VNTR)的研究方法进展[J]. 国外医学遗传学分册, 1994, 3:120-124.
- [9] 张翠彩, 蒋秀高. 多位点串联重复序列分析在钩端螺旋体基因分型和流行病学中的应用[J]. 中华流行病学杂志, 2008, 29(4):405-408.
- [10] Lindstedt BA. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria [J]. Electrophoresis, 2005, 26(13):2567-2582.
- [11] 左庭婷, 端青. MLVA 和 SNP 分析在炭疽芽孢杆菌基因分型中的应用[J]. 军事医学科学院院刊, 2010, 34(3):290-292.
- [12] Lowell J L, Wagner D M, Atshabar B, et al. Identifying sources of human exposure to plague [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(2):650-656.
- [13] Adair D M, Worsham P L, Hill K K, et al. Diversity in a variable-number tandem repeat from *Yersinia pestis* [J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(4):1516-1519.
- [14] 张晓媛. 中国鼠疫耶尔森菌多位点可变数目串联重复序列分析[D]. 北京:中国疾病预防控制中心, 2008.
- [15] 吕冰, CHRITINE P, 刘敬华, 等. 结核分枝杆菌多位点可变数目串联重复序列分型方法标准化操作程序的建立[J]. 中华流行病学杂志, 2008, 29(9):919-924.
- [16] Crawford J T. Genotyping in contact investigations: a CDC perspective [J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2003, 7(12 Suppl 3):S453-S457.
- [17] 焦伟伟, 李兆娜, 孙琳, 等. 多位点数目可变串联重复序列分析在北京基因型结核分枝杆菌基因分型中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2008, 31(11):1249-1252.
- [18] 曲梅, 张新, 黄瑛, 等. 北京地区志贺菌多位点可变数目串联重复序列分析分子分型研究[J]. 中华预防医学杂志, 2012, 46(4):329-333.
- [19] 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, 8:84.
- [20] Torpdahl M, Sorensen G, Lindstedt B A, et al. Tandem repeat analysis for surveillance of human *Salmonella typhimurium* infections [J]. Emerg Infect Dis, 2007, 13(3):388-395.
- [21] Torpdahl M, Sorensen G, Ethelberg S, et al. A regional outbreak of *S. typhimurium* in Denmark and identification of the source using MLVA typing [J]. Euro Surveill, 2006, 11(5):134-136.
- [22] Ethelberg S, Sorensen G, Kristensen B, et al. Outbreak with multi-resistant *Salmonella typhimurium* DT104 linked to carpaccio, Denmark, 2005 [J]. Epidemiol Infect, 2007, 135(6):900-907.
- [23] Johansson A, Forsman M, Sjostedt A. The development of tools for diagnosis of tularemia and typing of *Francisella tularensis* [J]. APMIS, 2004, 112(11-12):898-907.
- [24] Onteniente L, Brisse S, Tassios P T, et al. Evaluation of the polymorphisms associated with tandem repeats for *Pseudomonas aeruginosa* strain typing [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(11):4991-4997.
- [25] Sabat A, Krzysztos-Russjan J, Strzalka W, et al. New method for typing *Staphylococcus aureus* strains; multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(4):1801-1804.
- [26] Majed Z, Bellenger E, Postic D, et al. Identification of variable-number tandem-repeat loci in *Leptospira interrogans sensu stricto* [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(2):539-545.
- [27] 杨杰, 赵素莲, 崔步云, 等. 多位点可变数目串联重复序列分型方法检测布鲁氏菌分型标准化操作方法的建立和应用[J]. 疾病监测, 2012, 27(2):137-140.
- [28] PulseNet international [DB/OL]. New Zealand: Environmental Science and Research (ESR), (2011-08-25) [2013-03-01]. <http://www.pulsenetinternational.org/Pages/default.aspx>.
- [29] Hernandez S M, Keel K, Sanchez S, et al. Epidemiology of a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar typhimurium strain associated with a songbird outbreak [J]. Appl Environ Microbiol, 2012, 78(20):7290-7298.
- [30] Loharikar A, Briere E, Schwensohn C, et al. Four multistate outbreaks of human *Salmonella* infections associated with live poultry contact, United States, 2009 [J]. Zoonoses Public Health, 2012, 59(5):347-354.
- [31] Loharikar A, Vawter S, Warren K, et al. Outbreak of human *Salmonella typhimurium* infections linked to contact with baby poultry from a single agricultural feed store chain and mail-order hatchery, 2009 [J]. Pediatr Infect Dis J, 2013, 32(1):8-12.
- [32] Neil K P, Biggerstaff G, Macdonald J K, et al. A novel vehicle for transmission of *Escherichia coli* O157:H7 to humans; multistate outbreak of *E. coli* O157:H7 infections associated with consumption of ready-to-bake commercial prepackaged cookie dough, United States, 2009 [J]. Clin Infect Dis, 2012, 54(4):511-518.
- [33] Slayton R B, Turabelidze G, Bennett S D, et al. Outbreak of *Shiga Toxin-Producing Escherichia coli* (STEC) O157:H7 associated with romaine lettuce consumption, 2011 [J]. PLoS One, 2013, 8(2):e55300.
- [34] 徐建国. 发现新病原、建立新病原学的技术与理论体系 [J]. 微生物与感染, 2010, 5(3):129-134.
- [35] Elberse K E, Nunes S, Sá-Leão R, et al. Multiple-locus variable number tandem repeat analysis for *Streptococcus pneumoniae*: comparison with PFGE and MLST [J]. PLoS One, 2011, 6(5):e19668.
- [36] Eija T. PulseNet MLVA protocols-general overview [DB/OL]. New Zealand: Environmental Science and Research (ESR), (2011-05-18) [2013-03-01]. <http://www.pulsenetinternational.org/protocols/Pages/mlva.aspx>.